T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA KATKI MADDELERİNİN HPLC İLE ANALİZİ VE VALİDASYONU

DİLEK YILDIRIM KÜÇÜKKARACA

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. BÜRGE AŞÇI

İSTANBUL, 2014

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA KATKI MADDELERİNİN HPLC İLE ANALİZİ VE VALİDASYONU

Dilek YILDIRIM KÜÇÜKKARACA tarafından hazırlanan tez çalışması 05.03.2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Bürge Aşçı

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Bürge Aşçı

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Sıdıka Sungur

Yeni Yüzyıl Üniversitesi _____

Doç. Dr. Özlem Aksu Dönmez

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen, hoşgörülü ve anlayışlı tez danışmanım, Sayın. Doç. Dr. Bürge Aşçı'ya ve tüm yardımları için Araş.Gör. Dr. Şule Dinç'e teşekkür ederim.

Ayrıca yaşantımın her anında yanımda olan eşim Emrah KÜÇÜKKARACA'ya ve aileme tüm destekleri için teşekkür ederim.

Mart, 2014

Dilek YILDIRIM KÜÇÜKKARACA

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ....vii

KISALTMA LİSTESİ....viii

ŞEKİL LİSTESİ....ix

ÇİZELGE LİSTESİ....x

ÖZET....xii

ABSTRACT....xiv

BÖLÜM 1

GİRİŞ....1

1.1 Literatür Özeti....1
1.2 Tezin Amacı....3
1.3 Hipotez....3

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER....4

2.1 Gıda Katkı Maddeleri....4
2.1.1 Gıda Katkı Maddelerinin Tanımı....4
2.1.2 Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırması....4
2.1.2.1 Raf Ömrünü Uzatan Katkı Maddeleri....4
2.1.2.1.1 Asitlik Düzenleyiciler....4
2.1.2.1.2 Antimikrobiyal Maddeler (Koruyucular)....5
2.1.2.1.3 Antioksidanlar....5
2.1.2.2 Duyusal Özellikleri Modifiye Eden Katkı Maddeleri....6
2.1.2.2.1 Dokusal Yapıyı Düzenleyiciler....6
2.1.2.2.1.1 Emülgatörler ve Emülsifiye Edici Tuzlar....6
2.1.2.2.1.2 Kıvam Vericiler....6
2.1.2.2.1.3 Topaklanmayı Önleyiciler....7
2.1.2.2.1.4 Yapışkanlığı Önleyiciler....7
2.1.2.2.2 Boyalar (Renklendiriciler)....7
2.1.2.2.2.1 Doğal Renklendiriciler....7
2.1.2.2.2.2 Yapay Renklendiriciler....7
2.1.2.2.3 Tat ve Koku Maddeleri....8

2.1.2.2.3.1 Lezzet ve Tat Verenler 8
2.1.2.2.3.2 Lezzet Arttırıcılar 8
2.1.2.3 Beslenme Değerini Düzenleyici Katkı Maddeleri 8
2.1.2.3.1 Tatlandırıcılar 8
2.1.2.3.2 Zenginleştirme Katkıları 9
2.1.2.3.2.1 Vitaminler 9
2.1.2.3.2.2 Aminoasitler 9
2.1.2.3.2.3 Mineraller 9
2.1.2.4 İşlem Yardımcı Katkı Maddeleri 9
2.1.2.4.1 İtici Gazlar 9
2.1.2.4.2 Taşıyıcılar ve Taşıyıcı Çözücüler 10
2.1.2.4.3 Enzimler 10
2.1.3 Gıda Katkı Maddelerinin Toksik Etkileri 10
2.1.4 Gıda Katkı Maddelerinin Kullanım Şartları 11
2.1.5 Gıda Katkı Maddelerinin Analiz Yöntemleri 19
2.1.6 Limon Sosu ve İçeceklerindeki Gıda Katkı Maddeleri 22
2.1.6.1 Molekül Yapıları ve Özellikleri 22
2.1.6.1 Analiz Yöntemleri 25
2.2 Deneysel Tasarım 31
2.2.1 Tanımı 31
2.2.2 Önemi 32
2.2.3 Tarama Tasarımları 34
2.2.3.1 Faktöriyel Tasarım 34
2.2.3.1.1 Tam Faktöriyel Tasarım 34
2.2.3.1.2 Fraksiyonel Faktöriyel Tasarım 36
2.2.3.2 Plackett-Burman Tasarımı 37
2.2.4 Optimizasyon Tasarımları 39
2.2.4.1 Merkezi Kompozit Tasarım 39
2.2.4.2 Box-Behnken Tasarımı 40
2.2.4.3 Doehlert Tasarımı 41
2.2.4.4 D-optimal Tasarım 41
2.2.5 Varyans Analizi 42
2.2.6 Faktöriyel Tasarımın Analitik Kimyada Uygulamaları 42
2.3 Validasyon 48
2.3.1 Validasyonun Tanımı ve Önemi 48
2.3.2 Endüstride Validasyon Çeşitleri 48
2.3.3 Analitik Yöntem Validasyonu 49
2.3.3.1 Amaç 49
2.3.3.2 Analitik Yöntem Validasyon Parametreleri 49
2.3.3.2.1 Seçicilik/Spesifiklik 50
2.3.3.2.2 Stabilite 50
2.3.3.2.3 Doğrusallık 50
2.3.3.2.4 Çalışma Aralığı 51
2.3.3.2.5 Doğruluk 51
2.3.3.2.6 Kesinlik (Tekrarlanabilirlik) 51
2.3.3.2.6.1 Gün İçi Tekrarlanabilirlik 52

2.3.3.2.6.2 Günler Arası Tekrarlanabilirlik 52
2.3.3.2.6.3 Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirlik 52
2.3.3.2.7 Tutarlılık 52
2.3.3.2.8 Miktar Tayini Limiti ve Tanıma Limiti 53
2.3.3.2.8.1 Tanıma Limiti (LOD) 53
2.3.3.2.8.2 Miktar Tayin Limiti (LOQ) 53
2.3.3.2.9 Güvenilirlik 53
2.3.4 Validasyon İle İlgili Bazı Örnekler 53

BÖLÜM 3

DENEYSEL BÖLÜM 57

3.1 Kullanılan Maddeler 57
3.2 Çözeltiler 57
3.3 Araç ve Gereçler 58
3.4 HPLC ile Analiz 58
3.4.1 Kromatografik Şartların Belirlenmesi ve Optimizasyonu 58
3.4.1.1 Klasik Yöntem ile Şartların Belirlemesi 58
3.4.1.2 Deneysel Tasarım İle Optimizasyon 59
3.4.2 Validasyon 59
3.4.2.1 Doğrusallık 59
3.4.2.2 Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik 60
3.4.2.3 Doğruluk 60
3.4.2.4 Tanıma ve Tayin Sınırı (LOD, LOQ) 61
3.4.2.5 Çözelti Dayanıklılığı 61
3.4.3 Örnek Analizi 61

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER 62

4.1 Kromatografik Şartların Belirlenmesi ve Optimizasyonu 62
4.1.1 Klasik Yöntem ile Şartların Belirlenmesi 62
4.1.2 Deneysel Tasarım ile Optimizasyon 62
4.1.2.1 Box-Behnken Tasarımı 62
4.1.2.2 Veri Değerlendirme 63
4.1.2.3 Modelleme 66
4.2 Validasyon 69
4.2.1 Doğrusallık 69
4.2.2 Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik 69
4.2.3 Doğruluk 76
4.2.4 Tanıma ve Tayin Sınırı (LOD-LOQ) 76
4.2.5 Çözelti Dayanıklılığı 77
4.3 Örnek Analizi 77
4.4 Tartışma 80
KAYNAKLAR 82

ÖZGEÇMİŞ 107

SİMGE LİSTESİ

k : Faktör sayısı
x : Faktör
N: Deney sayısı
α: Farklı tasarımlardaki seviye
X: Tasarım noktalarının matrisi
T: Transpoze

KISALTMA LİSTESİ

BHA: Bütillendirilmiş Hidroksi Anisol
BHT: Bütillendirilmiş Hidroksi Toluen
CAC: Codex Alimentarius Commission (gıda kodeks komisyonu)
DAD: Diode Array Detector (diyot dedektörü)
ELSD: Evaporative Light Scattering Detector (evaporatif ışık saçma dedektörü)
ESI: Electrospray Ionization (elektrospey iyonlaşma)
FDA: Food and Drug Administration (birleşik devletler gıda ve ilaç dairesi)
FTIR: Foyler Transform Infrared Spectrometr (foyler transform infrared spektrometresi)
GMP: Good Manufacturing Practices (iyi üretim uygulamaları)
HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
ICH: International Conference on Harmonisation (uluslararası uyumlandırma konferansı)
IR: Infrared (kızıl ötesi)
LC: Liquid Chromatography (sıvı kromatografisi)
PAH: Polycyclic aromatic hydrocarbon (poliaromatik hidrokarbon)
PHB: Poli-β-Hidroksi Bütirat
QS: Quantity Sufficient (yeterli miktarda)
RSD: Relative Standard Deviation (bağıl standart sapma)
SPME: Solid phase microextraction (katı faz mikroekstraksiyon)
TBHQ: Tertiary Butly Hydro Quinone (tersiyer bütil hidro kinon)
THBP: Tri Hydroxy Benzo Phenone (tri hidroksi benzo fenon)
TOF-MS: Time Of Flight Mass Spectrometry (iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi)

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1 Potasyum sorbat molekülü 22
Şekil 2. 2 Sodyum benzoat molekülü 23
Şekil 2. 3 Kinolin sarısı molekülü 24
Şekil 2. 4 Sunset sarısı molekülü 24
Şekil 2. 5 pH ve katalizör konsantrasyonuna bağlı olarak reaksiyon verimindeki değişme. 32
Şekil 2. 6 Katalizör konsantrasyonu 2,0 mM da sabit tutularak bulunan optimum pH .. 33
Şekil 2. 7 pH 3,4'te sabit tutularak bulunan optimum konsantrasyon 33

Şekil 4. 1 Box-Behnken tasarımı ile elde edilen Pareto grafiği 64
Şekil 4. 2 Faktörlerin değerleri ile ayırma gücünün değişimi 65
Şekil 4. 3 Box-Behnken tasarımı ile elde edilen A ve B faktörleri arasındaki tahmini cevap yüzeyleri (hareketli faz oranı % 85 de sabit tutularak elde edilen değişim) 67
Şekil 4. 4 Box-Behnken tasarımı ile elde edilen B ve C faktörleri arasındaki tahmini cevap yüzeyleri (pH; 6,0 da sabit tutularak elde edilen değişim) 67
Şekil 4. 5 Box-Behnken tasarımı ile elde edilen A ve C faktörleri arasındaki tahmini cevap yüzeyleri (akış hızı 0,8 mL/dak'da sabit tutularak elde edilen değişim) 68
Şekil 4. 6 Optimum koşullarda kromatogram (1) 3 µg mL^{-1} kinolin sarısı (2), 15µg mL^{-1} sodyum benzoat, (3) 15 µg mL^{-1} potasyum sorbat, (4) 3 µg mL^{-1} sunset sarısı 69
Şekil 4. 7 Potasyum sorbatın doğrusallık grafiği 70
Şekil 4. 8 Sodyum benzoatın doğrusallık grafiği 71
Şekil 4. 9 Kinolin sarısının doğrusallık grafiği 72
Şekil 4. 10 Sunset sarısının doğrusallık grafiği 73

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2. 1 Türk gıda kodeksi yönetmeliğince kullanılmasına izin verilen 12
Çizelge 2. 2 Koruyucuların HPLC ile analizi ilgili çalışmalar 20
Çizelge 2. 3 Antioksidanların HPLC ile analizi ilgili çalışmalar 20
Çizelge 2. 4 Renklendiricilerin HPLC ile analizi ilgili çalışmalar 21
Çizelge 2. 5 Tatlandırıcıların HPLC ile analizi ilgili çalışmalar 21
Çizelge 2. 6 Sodyum benzoatın HPLC ile analizi 25
Çizelge 2. 7 Sodyum benzoat ve potasyum sorbatın HPLC ile analizi 27
Çizelge 2. 8 Kinolin sarısı-sunset sarısının HPLC ile analizi 27
Çizelge 2. 9 Sunset sarısının HPLC ile analizi 27
Çizelge 2. 10 Potasyum sorbatın diğer yöntemlerle analizi 28
Çizelge 2. 11 Sodyum benzoatın diğer yöntemlerle analizi 28
Çizelge 2. 12 Kinolin sarısının diğer yöntemlerle analizi 28
Çizelge 2. 13 Sunset sarısının diğer yöntemlerle analizi 29
Çizelge 2. 14 Kinolin sarısı ve sunset sarısı 30
Çizelge 2. 15 Faktör için Tam Faktöriyel Tasarım 35
Çizelge 2. 16 Faktör için fraksiyonlu faktöriyel tasarım 36
Çizelge 2. 17 Plackett-Burman tasarımı için üreticiler 37
Çizelge 2. 18 11 Faktör için Plackett-Burman tasarımı 38
Çizelge 2. 19 Faktör için merkezi kompozit tasarımı 40
Çizelge 2. 20 3 Faktör için Box-Behnken tasarımı 40
Çizelge 2. 21 3 Faktör için Doehlert tasarımı 41
Çizelge 2. 22 Atomik spektroskopide deneysel tasarımın uygulandığı çalışmalar 43
Çizelge 2. 23 Kromatografik analizlerde deneysel tasarımın uygulandığı çalışmalar 44
Çizelge 2. 24 Elektroforez ile analizlerde deneysel tasarımın uygulandığı çalışmalar 46
Çizelge 2. 25 HPLC ile analizlerde validasyon aşamasında kullanılan deneysel tasarımlar 47
Çizelge 2. 26 Analiz amacına göre değişen parametreler 50
Çizelge 2. 27 Gıda katkı maddelerinin HPLC ile analizinde uygulanan validasyon çalışmaları 54

Çizelge 3. 1 Denenen kromatografik şartlar 58
Çizelge 3. 2 Faktörler ve seviyeleri 59

Çizelge 4. 1 Box- Behnken tasarımı ve belirtilen şartlarda elde edilen ayırma gücü değerleri 63
Çizelge 4. 2 Regresyon analizi sonuçları 64
Çizelge 4. 3 ANOVA sonuçları 65
Çizelge 4. 4 Ana faktörler ve etkili etkileşimler 66
Çizelge 4. 5 Faktörlerin optimum değerleri 68
Çizelge 4. 6 Potasyum sorbatın ölçü eğrisine ait pik alanları değerleri 70
Çizelge 4. 7 Potasyum sorbatın regresyon analizine ait parametreler 70
Çizelge 4. 8 Sodyum benzoatın ölçü eğrisine ait pik alanları değerleri 71
Çizelge 4. 9 Sodyum benzoatın regresyon analizine ait parametreler 71
Çizelge 4. 10 Kinolin sarısının ölçü eğrisine ait pik alanları değerleri 72
Çizelge 4. 11 Kinolin sarısının regresyon analizine ait parametreler 72
Çizelge 4. 12 Sunset sarısının ölçü eğrisine ait pik alanları değerleri 73
Çizelge 4. 13 Sunset sarısının regresyon analizine ait parametreler 73
Çizelge 4. 14 Gün içi tekrarlanabilirlik 74
Çizelge 4. 15 Günler arası tekrarlanabilirlik 75
Çizelge 4. 16 doğruluk 76
Çizelge 4. 17 LOD-LOQ değerleri 76
Çizelge 4. 18 Limon sosu I'in HPLC ile analizi 77
Çizelge 4. 19 Limon sosu II'nin HPLC ile analizi 78
Çizelge 4. 20 Limon sosu III'ün HPLC ile analizi 78
Çizelge 4. 21 Limonata I'in HPLC ile analizi 79
Çizelge 4. 22 Limonata II'nin HPLC ile analizi 79

ÖZET

GIDA KATKI MADDELERİNİN HPLC İLE ANALİZİ VE VALİDASYONU

Dilek YILDIRIM KÜÇÜKKARACA

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Bürge AŞÇI

Bu tezde çeşitli gıdalara koruyucu olarak katılan potasyum sorbat ve sodyum benzoat ile renklendirici olarak katılan kinolin sarısı ve sunset sarısının bir arada analizi için HPLC yöntemi geliştirilmiştir.

Öncelikle bu maddelerin kromatografik olarak ayrılması için çeşitli çözücü sistemleri denendi. Daha sonra deneysel tasarım kullanılarak analiz şartları optimize edildi. Deneysel Tasarım ile optimizasyonda faktör olarak; pH, akış hızı ve hareketli faz oranı kullanıldı.Bu faktörlerin ve aralarındaki etkileşimlerin, HPLC kromatogramındaki piklerin ayırma gücü üzerine etkileri incelendi. İncelemede 3 faktör için Box-Behnken Tasarımı kullanıldı. Her faktör için 3 seviye seçildi. Bu seviyeler pH için 6-6,5-7, akış hızı için 0,8-1-1,2 hareketli faz oranı için 80-85-90 olarak belirlendi. Faktörlerin düşük seviyeleri için –1 orta seviyeleri için 0 ve yüksek seviyeleri için +1 işareti kullanıldı. Toplam 15 deney yapıldı. Sonuçlarının değerlendirilmesi için regresyon analizi yapıldı. Ayırma gücüne en etkili faktörün hareketli fazın ikinci dereceden etkisine ait olduğu, akış hızının, pH'ın ve pH-akış hızı etkileşiminin de etkili olduğu saptandı. Sonuçların güvenilirliğini test etmek için ANOVA yapıldı. Elde edilen verilere göre ayırma gücüne ilişkin bir model oluşturuldu. Oluşturulan model kullanılarak ayırma gücü değerleri elde edildi. Bu değerlerle deneysel olarak bulunan değerler arasındaki ilişki incelendi. İncelemede regresyon katsayısı 0,9066 olarak bulundu.Ve modelin uygun olduğuna karar verildi. Geliştirilen model kullanıldığında, potasyum sorbat, sodyum benzoat, kinolin sarısı ve sunset sarısının HPLC ile bir arada analizi için optimum koşullar; pH 6,

akış hızı 0,8 mL/dak ve hareketli faz bileşimi asetonitril-asetat tampon çözeltisi (15/85) olarak bulundu.

Maddelerin kromatogramları, deneysel tasarım ile bulanan optimum koşullarda, potasyum sorbat ve sodyum benzoat için 230 nm, kinolin sarısı ve sunset sarısı için 460 nm'de spektrofotometrik dedektör kullanılarak kaydedildi.

Geliştirilen yöntemin, doğrusallık, tekrarlanabilirlik, doğruluk, tanınma ve tayin sınırı ve dayanıklılık parametreleri incelenerek analitik yöntem validasyonu yapıldı. Doğrusallık parametresi için, potasyum sorbat, sodyum benzoat, kinolin sarısı ve sunset sarısının konsantrasyonları ile pik alanları arasındaki ilişki incelendi. Elde edilen sonuçların regresyon analizi yapıldığında regresyon katsayısı (R^2) sırası ile 0,9979; 0,9980; 0,9979; 0,9993 olarak bulundu. Tekrarlanabilirlik parametresi için, her maddenin 3 farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinin aynı gün içinde 3 kez ve 4 farklı günde analizi yapıldı. Potasyum sorbat, sodyum benzoat, kinolin sarısı ve sunset sarısı için sırasıyla aynı gün içinde yapılan analizlerde 0,862-1,236; 0,200-1,447; 1,379-1,576; 0,287-1,275 farklı günlerde yapılan analizlerde 1,026-1,244; 0,228-0,638; 1,158-4,446; 0,854-1,933 % RSD değerleri elde edildi. Doğruluk için, incelenen maddeleri içeren örnek çözeltisi içine potasyum sorbat, sodyum benzoat, kinolin sarısı ve sunset sarısından 3 farklı konsantrasyonda ilave edilerek analizi yapıldı. Sırası ile %97,600-103,350; 104,280-104,730; 95,600-104,600; 98,600-100,260 % geri kazanım değerleri elde edildi. Potasyum sorbat, sodyum benzoat, kinolin sarısı ve sunset sarısı için sırası ile tanıma sınırı 0,082; 0,154; 0,044; 0,069 μg mL^{-1}, tayin sınırı 0,273; 0,513; 0,146; 0,230μg mL^{-1} olarak hesaplandı. Çözeltilerin stabilitelerini incelemek için su ve hareketli faz içerisinde, oda sıcaklığında ve $4C^{o}$'de belli sürelerde bekletilerek analiz edildi. Potasyum sorbat, kinolin sarısı ve sunset sarısının tüm şartlarda, sodyum benzoatın $4C^{o}$ de en az 1 ay boyunca bozulmadığı görüldü.

Geliştirilen yöntem kullanılarak limon sosu ve içecekleri analiz edildi. Bu ürünlerin 55,69-267,79 μg mL^{-1} potasyum sorbat, 105,47-159,34 μg mL^{-1} sodyum benzoat, 2,39-15,02 μg mL^{-1} kinolin sarısı, 0,86-0,92 μg mL^{-1} sunset sarısı içerdiği saptandı. Örnek analizlerinde 0,746-2,629 aralığında % RSD değerleri elde edildi.

Anahtar Kelimeler: Potasyum sorbat, sodyum benzoat, kinolin sarısı, sunset sarısı, HPLC, validasyon, deneysel tasarım.

ABSTRACT

ANALYSIS AND VALIDATION OF FOOD ADDITIVES WITH HPLC

Dilek YILDIRIM KÜÇÜKKARACA

Department of Analytical Chemistry

MSc. Thesis

Advisor: Associate Professor Bürge AŞÇI

In this thesis, an HPLC method is developed for analysis of sodium benzoate, potassium sorbate, which are added to preprocessed foods as preservatives, sunset yellow and quinoline, which are added as dyestuffs.

First of all, several solvent systems were carried out to separate these substances chromatographically. Then analytical conditions were optimized by using experimental design. pH, flow rate and mobile phase ratio were selected as optimization factors in the experimental design. Effects of these factors and the interactions between them on resolution between peaks in HPLC chromatogram were analyzed. Box-Behnken design was used for analysis of the 3 factors. 3 levels were selected for each factor. These levels were determined as pH 6-6.5-7, flow rate 0.8-1-1.2 mobile phase ratio 80-85-90. The values; -1, for low, 0, for middle, and +1, for high levels of the factors were used. 15 experiments were done in total. Regression analysis was used for evaluation of the results. It was determined that the second effect of mobile phase ratio is the most efficient factor; flow rate, pH and pH-flow rate interaction are also effective. ANOVA was performed to test reliability of the results. According to the data obtained a model was created with respect to the resolution. Resolution values were obtained by using the model. The relationship between these values and the empirical values has been examined. Regression coefficient was found 0.9066 at the end of the examination. And it was decided that the model is appropriate. When the model was used, the optimum

conditions for the simultaneous analysis of sodium benzoate, potassium sorbate, sunset yellow and quinoline were found as pH 6, flow rate 0.8 mL min^{-1} and mobile phase combination 15/85 asetonitrile-acetate buffer.

Chromatograms of the substances were recorded by using spectrophotometric detector, at the optimum conditions found in the experimental design, as potassium sorbate and sodium benzoate 230 nm, quinoline and sunset yellow at 460 nm.

Analytical method validation was made by the examination of the stability parameters as linearity, repeatability, accuracy, limit of quantification and detection. The correlation between the peak areas and the concentrations of potassium sorbate, sodium benzoate, quinoline and sunset yellow was examined for linearity parameter. The correlation coefficients (R^2) were found 0.9979; 0.9980; 0.9979; 0.9993 respectively by regression analysis of the results. The solutions which were prepared at 3 different concentrations of each substance were analyzed 3 times within the same day and 4 times on different days for the repeatability parameter. In the analysis, RSD% values were obtained in the analysis performed for potassium sorbate, sodium benzoate, quinoline and sunset yellow, respectively, on the same day 0.862-1.236; 0.200-1.447; 1.379-1.576; 0.287-1.275, on different days 1.026-1.244; 0.228-0.638; 1.158-1.446; 0.854-1.933. In order to calculate accuracy, analyses were performed by the addition of 3 different concentrations of potassium sorbate, sodium benzoate, sunset yellow and quinoline into the examined samples which contain the substances. The recovery percentage values were obtained respectively, 97.600-103.350; 104.280-104.730; 95.600-104.600; 98.600-100.260. The limit of detection values were calculated as 0.082; 0.154; 0.044; 0.069 μg mL^{-1} and the limit of quantification values were calculated as 0.273; 0.513; 0.146; 0.230 μg mL^{-1} for sodium benzoate, quinoline and sunset yellow respectively. In order to determine stabilities of the substances, they were analyzed both in water and the mobile phase and both at 4^0C and room temperature. It was determined that potassium sorbate, quinoline and sunset yellow are stable at any condition and sodium benzoate is stable at 4^0C at least one month.

Some lemon juice and drink samples were analyzed by using the developed method. It was determined that these samples contain 55.69-267.79 μg mL^{-1} potassium sorbate, 105.47-159.34 μg mL^{-1} sodium benzoate, 2.39-15.02 μg mL^{-1} quinoline, 0.86-0.92 μg mL^{-1} sunset yellow. The RSD% values were obtained between 0.746-2.629 from the sample analysis.

Keywords: Potassium sorbate, sodium benzoate, quinoline, sunset yellow, HPLC, validation, experimental design.

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

İşlenmiş gıdaların üretiminde, teknolojik işlemlere yardımcı olma, mikrobiyolojik bozulmayı önleme, dayanıklılığı arttırma, besleyici değeri koruma, renk, görünüş, lezzet ve benzeri duyusal özellikleri düzeltme gibi değişik amaçlarla çeşitli kimyasal maddeler kullanılmaktadır. Bununla birlikte her kimyasalın alınan miktarına bağlı olarak zararlı etki gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle gıda katkı maddeleri olarak adlandırılan bu kimyasal maddelerin gıda ürünleri içindeki miktarlarının analizi insan sağlığı açısından çok önemlidir. Gıda katkı maddelerinin analizleri için en çok tercih edilen yöntem HPLC'dir. HPLC ile yapılan çalışmalarda genellikle kullanım amaçlarına göre gruplandırılarak aynı gruptaki katkı maddelerinin bir arada analizini yapılmıştır. Çalışmalar özellikle koruyucular, yapay tatlandırıcılar, renklendiriciler ve antioksidanlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Farklı gruplardaki katkı maddelerinin ayrı ayrı analiz edilmesi zaman ve madde kaybına neden olmaktadır. Bununla birlikte farklı grupların bir arada analiz edildiği bazı çalışmalarda olmuştur. Günümüzde gıda katkı maddelerinin analizinde HPLC'ye alternatif olarak çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri popülerlik kazanmıştır. Çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri genellikle spektroskopik verilere uygulanmaktadır. Bu yöntemle çeşitli gıdalardaki tatlandırıcı, renklendirici, lezzet arttırıcı, koruyucu, antioksidan, zenginleştirme katkıları ve asit düzenleyicilerin miktar tayini yapılmıştır. Çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri HPLC verilerine uygulanarak da renklendirici analizi yapılmıştır. Ayrıca çeşitli gıdalardaki antioksidanlar, tatlandırıcılar, renklendirici ve lezzet arttırıcılar kapiler elektroforez ile koruyucu, emülgatör ve antioksidanlar gaz kromatografisi (GC) ile analiz edilmiştir. Voltametre ve türev spektroskopi yöntemleri ile yapılmış çalışmalarda bulunmaktadır.

Bu çalışma kapsamında analizi yapılacak olan limon sosu ve içeceklerinde bulunan katkı maddelerinin tek başına ve/veya bir arada analizine yönelik yapılan literatür araştırmasında en çok HPLC yöntemi kullanıldığı görülmüştür. Sodyum benzoat, sodyum benzoat ve potasyum sorbat, sunset sarısının, kinolin sarısı ve sunset sarısının, HPLC ile analizine yönelik yapılan pek çok çalışma bulunmaktadır. HPLC dışında diğer yöntemler ile potasyum sorbat, sodyum benzoat, kinolin sarısı, sunset sarısı, sunset sarısı ve kinolin sarısı analizi için yapılan çalışmalar da vardır. Yapılan literatür araştırmasında bu maddelerin hepsinin bir arada analizine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bir deneysel çalışmada o deneyin performansını etkileyecek parametrelerin belirlenmesi ve kontrolü, doğru ve güvenilir sonuçların eldesinde oldukça önemlidir. Deney sonuçlarını etkileyebilecek herhangi bir deneysel parametre faktör olarak isimlendirilir. Faktörlerin en uygun değerleri ile yapılan bir çalışma ise cevap sinyalini büyülterek maddelerin çok küçük miktarlarının analizine imkan vermektedir. Bu en uygun faktör değerinin belirlendiği aşamaya optimizasyon adı verilir. Son yıllarda deneysel tasarımlar, analitik kimyada optimum analiz koşullarının saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu tasarımlar ile optimizasyonda deney sayısı, süre ve maliyet azalmaktadır. Bu tasarımlarla faktörlerin bireysel etkilerinin dışında birbirleri ile etkileşimleri ve bu etkileşimlerin sonuca etkisi de incelenmektedir. Bu nedenle deneysel tasarımlar kullanılarak yapılan çalışmalarda klasik yöntemlere göre daha güvenilir sonuçlar elde edilmektedir. Deneysel tasarıma en çok başvurulan yöntemler atomik spektroskopi, kromatografi ve elektroforezdir. Ayrıca literatür araştırmalarında UV-VIS spektroskopi, yakın IR, Floresans spektroskopi ve elektroanalitik yöntemlerle analizlerde de deneysel tasarım uygulanmasına rastlanmıştır. Deneysel tasarım, geliştirilen analitik yöntemlerin geçerliliğini kontrol etmek amacı ile yapılan validasyon çalışmalarında da tutarlılık parametresinin incelmesinde kullanılmaktadır.

Validasyon, aynı kalitede ve aynı şartlarda üretim yaparak, tüm üretilen ürünlerin kalitesinin aynı olmasını sağlamak amacıyla yürütülen çalışmalardır. Bu amaçla temizlik yöntemleri, makine/ekipman, proses ve analitik yöntem valide edilir. Validasyon işlemi tüm ürünlerin kalite kontrollerine uygulanabilir. Özellikle insan sağlığı açısından büyük önem taşıyan ilaç ve gıda endüstrisinde geniş uygulama alanına sahiptir. Analitik Yöntem validasyonu, yeni bir analiz yöntemi tasarlandığında bu yöntemin kabul edilebilirliğini kanıtlamak ve analitik prosedürün kantitatif ve kalitatif

olarak doğru sonuçlar verdiğini belirleyebilmek amacı ile yapılır. Yöntem validasyonu için çeşitli uluslar arası ve ulusal kuruluşlarca tanımlanmış parametreler bulunmaktadır. Seçicilik (spesifiklik), dayanıklılık, doğrusallık, doğruluk ve geri kazanabilirlik, kesinlik (tekrarlanabilirlik), tutarlılık, tanıma sınırı, tayin sınırı ve güvenilirlik olarak belirlenen bu parametreler incelenerek geliştirilen yöntemin validasyonu yapılır. Yapılan literatür araştırmasında, gıda katkı maddelerinin HPLC ile analizinde, validasyon uygulamasına yönelik pek çok çalışmaya rastlanmıştır.

1.2 Tezin Amacı

Bu tezde çeşitli gıdalara koruyucu olarak katılan potasyum sorbat ve sodyum benzoat ile renklendirici olarak katılan kinolin sarısı ve sunset sarısının bir arada analizi için HPLC yöntemi geliştirilmesi, valide edilmesi ve bu maddeleri içeren gıda ürünlerinin analiz edilmesi amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Potasyum sorbat, sodyum benzoat, kinolin sarısı ve sunset sarısının HPLC ile bir arada analizi için kromatografik şartların belirlenmesinde, deneysel tasarım kullanılarak, klasik yönteme göre daha az sayıda deney yapılıp, daha kısa sürede sonuca ulaşılması ve dolayısıyla maliyetin azalması beklenmektedir. Ayrıca hem bireysel etkileri hem de faktörlerin birbirleri ile etkileşimleri ve bu etkileşimlerin sonuca etkisi inceleneceğinden daha güvenilir sonuçlar elde edilmesi öngörülmektedir. Bu tez kapsamında geliştirilen ve valide edilen yöntem, gıda laboratuvarlarında bu katkı maddelerini içeren gıda ürünlerinin rutin analizlerinde kullanılabilecektir. Bu sayede bu tez çalışması ile gıda sektörüne hizmet edileceği düşünülmektedir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 Gıda Katkı Maddeleri [1]

2.1.1 Gıda Katkı Maddelerinin Tanımı

Gıda katkı maddeleri, tek başına gıda olarak tüketilmeyen, bir gıda ürününün ana bileşeni, hammaddesi veya yardımcı maddesi olarak kullanılmayan, fakat o ürünün işlenmesi, ambalajlanması ve/veya depolanması ile ilgili olarak ve ürünün tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek veya istenmeyen değişikliklere engel olmak amaçları ile gıda ürünlerine katılımlarına izin verilen ve kalıntı veya türevleri mamul maddede kalan kimyasal madde veya maddeler karışımıdırlar.

2.1.2 Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırması

Gıda katkı maddeleri kullanım amaçlarına göre; raf ömrünü uzatanlar, duyusal özellikleri modifiye edenler, beslenme değerini düzenleyiciler ve işlem yardımcı maddeleri olmak üzere 4 temel sınıfa ayrılırlar.

2.1.2.1 Raf Ömrünü Uzatan Katkı Maddeleri

2.1.2.1.1 Asitlik Düzenleyiciler

Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (CAC) tarafından asitlik düzenleyiciler, gıdaların asitliğini veya bazlığını değiştiren veya kontrol eden maddeler olarak tanımlamaktadırlar. Bu maddeler ayrıca asit, baz, tampon, tamponlama ajanı ve pH ajanı olarak da ifade edilmektedir. Sterilizasyon yardımcısı olarak kullanılmaktadırlar.

Gıdaların muhafazasındaki koruyucu maddelerdir ve aynı zamanda ürün standardizasyonunu sağlamaktadırlar. En önemli fonksiyonlarından birisi de gıdaların tatlılık ve lezzet özelliklerini etkilemeleri olup, asit düzenleyicilerin kullanılmadığı durumlarda şekerlemelerin, jelatinli tatlıların, gazlı-gazsız içeceklerin ve diğer birçok ürünün lezzetinin yavan veya çok tatlı olduğu bilinmektedir. En çok kullanılan asitlik düzenleyiciler; asetik asit, hidroklorik asit, sülfürik asit, süksinik asit, adipik asit, fumarik asit, laktik asit, malik asit, tartarik asit, sitrik asit, fosforik asit, sodyum hidroksit, glukono delta-laktondur.

2.1.2.1.2 Antimikrobiyal Maddeler (Koruyucular)

Gıdaların endüstride kullanılan başlıca koruma yöntemleri ısıtma, dondurma, kurutma ve ışınlamadır. Ancak bunların uygulanamadığı veya yetersiz kaldığı bazı durumlarda gıdalara koruyucu madde katılımı söz konusudur. Koruyucu maddeler gıdayı mikroorganizmaların sebep olduğu bozulmalara karşı koruyarak gıdanın raf ömrünü uzatan kimyasal maddeler olarak tanımlanmaktadır. Tuz (NaCl), benzoik asit, PHB esterleri, sorbik asit, propiyonik asit, kükürt dioksit ve sülfitler, nitrat ve nitritler, etilen oksit ve propilen oksit en çok kullanılan antimikrobiyallerdir.

2.1.2.1.3 Antioksidanlar

CAC tanımına göre antioksidanlar gıdada yağın acılaşması ve renk değişimleri gibi oksidasyon reaksiyonları sonucunda oluşan bozulmaları önleyerek raf ömrünü uzatan maddeler olarak ifade edilmektedir. Antioksidanlar oksidatif ve otooksidatif işlemlerin başlangıcında etki göstererek oksidasyonu ve buna bağlı olarak oluşan istenmeyen reaksiyon ürünlerinin (kötü koku ve lezzet) oluşumunu engelleyebilmektedir. Antioksidanlar doğal ve sentetik olmak üzere ikiye ayrılır. Tokoferoller, askorbik asit ve tuzları, askorbil palmitat, askorbil stearat ve glikoz oksidaz doğal antioksidanlardır. Eritorbik asit ve sodyum eritorbat, galatlar, bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA), bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT), tersiyer bütilhidrokinon (TBHQ) sentetik antioksidanlardır.

2.1.2.2 Duyusal Özellikleri Modifiye Eden Katkı Maddeleri

2.1.2.2.1 Dokusal Yapıyı Düzenleyiciler

2.1.2.2.1.1 Emülgatörler ve Emülsifiye Edici Tuzlar

CAC tanımına göre emülgatörler gıdada yağ ve su gibi birbirleri ile karışmayan iki veya daha fazla fazın karışmasını sağlamak amacıyla ilave edilen maddeler olarak ifade edilmekte ve plastikleştirici, disperse edici ajan, yüzey aktif ajan, surfaktan ve nemlendirici ajan olmak üzere alt sınıflara ayrılmaktadır. Kısaca emülgatör ve emülsifiye edici ajan terimleri ara yüzey hareketi ile emülsiyon oluşumunu sağlayan kimyasal maddeler için kullanılmaktadır. Emülgatörler doğal ve sentetik olmak üzere ikiye ayrılırlar. Lesitin ve gliseridler bu amaçla kullanılırlar.

2.1.2.2.1.2 Kıvam Vericiler

Gam olarak bilinen bu maddeler kıvam arttırıcı ve/veya jelleştirici bir etki vermek için suda dağılabilen veya çözünebilen polimerik maddelerdir. Düzgün, tekdüze bir yapıyı veya dokuyu oluşturmak, stabilize etmek ve emülsifikayonu düzeltmek, kıvam arttırmak ve daha birçok amaçlar için gıda formülasyonlarında kullanımı giderek artan gamların önemli fonksiyonları suyu tutmak, nem buharlaşmasını azaltmak, donma derecesini değiştirmek, buz-kristal oluşumunun modifikasyonu, reolojik özellikleri veya viskoziteyi düzenlemek olarak sıralanabilir. CAC tarafından yapılan sınıflandırmada gamlar adı altında bir sınıf oluşturulmamıştır. Ancak fonksiyonlarına göre jelleştirme ajanları (gıdaya jel oluşumu ile doku kazandıran maddeler) ve kalınlaştırıcılar (gıdanın viskozitesini arttıran maddeler) olmak üzere iki sınıf altında toplanmıştır. Kalınlaştırıcılar sınıfı altında kalınlaştırma ajanı, doku verici ve yapıyı düzeltici olmak üzere üç alt sınıf oluşturulmuştur. Kıvam vericiler yapıları, izolasyon metotları, fonksiyonları ve yükleri gibi birçok açıdan değişik sınıflandırılabilirler. Elde edilişlerine göre doğal, yapay ve modifiye edilmiş veya yarı yapay gamlar olmak üzere üçe ayrılırlar.

2.1.2.2.1.3 Topaklanmayı Önleyiciler

Toz halindeki gıda ürünlerinde topaklanmayı önleme amacıyla kullanılan bu maddeler; kendileri hidrofob karakterde olup hidrofil özellikteki, havadan bile su alan gıdalara (kakao, süt tozu, pudra şekeri vb.) katılırlar. Hepsi anorganik tuzlardır.

2.1.2.2.1.4 Yapışkanlığı Önleyiciler

Şekerlemeler, çikletler gibi doğal yapışkanlığı olan gıda maddelerinde kullanılırlar. Çoğu yağ asitlerinin bazik metallerle yaptığı tuzlardır.

2.1.2.2.2 Boyalar (Renklendiriciler)

CAC tanımına göre renklendiriciler gıdanın rengini düzelten veya renk vermek amacıyla katılan maddelerdir. Renk stabilize edici ajanları CAC tanımına göre gıdanın rengini stabilize eden, kalıcılığını sağlayan maddelerdir. Doğal ve yapay renklendiriciler olmak üzere iki çeşittir.

2.1.2.2.2.1 Doğal Renklendiriciler

Mikrobiyal, bitkisel, hayvansal ve mineral kaynaklardan elde edilen pigmentlerdir. Renk aralıkları sınırlı olan bu renk maddeleri genel olarak zayıf bir stabilite ile zayıf bir renklendirme gücüne sahiptirler, ısı ve pH'dan etkilenirler. Ancak son yıllarda yapılan araştırmalar sonucunda doğal renk maddelerinin sağlık üzerine olumlu etkileri olduğu belirtilmiştir. Doğal renklendiricilerin çoğu suda çözünmemektedir. Organik doğal renklendiricilerden bazıları anatto, antosiyaninler, kantaksantin, karamel, karotenler, kurkumindir. Titanyum dioksit, kalsiyum karbonat da inorganik doğal renklendiricilere örnektir.

2.1.2.2.2.2 Yapay Renklendiriciler

Kimyasal yapıları itibariyle doğada bulunmayan ancak kimyasal sentez yoluyla üretilebilen renk maddeleridir. Hemen hepsinin sentezinde başlangıç materyali olarak kömür katranı kullanıldığından bu renklendiriciler kömür katranı renklendiricileri olarak da adlandırılırlar. Çok saf kimyasal maddeler olan bu renklendiricilerin renklendirme güçleri kuvvetlidir. Yapay renklendiricilerin gıda işleme koşullarında stabiliteleri yüksek olmakla birlikte, renklendiricinin kullanıldığı ortama,

konsantrasyonuna, gıda maddelerinin konsantrasyonuna, sıcaklık, süre gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterir. Yapay renklendiriciler çok yüksek oranlarda suda çözünme özelliğine sahiptirler. Çözünürlüklerine göre suda çözünenler ve yağda çözünenler olmak üzere ikiye ayrılırlar.

2.1.2.2.3 Tat ve Koku Maddeleri

2.1.2.2.3.1 Lezzet ve Tat Verenler

Gıdaya lezzet ve/ veya koku veren maddeleridir. Bu maddelerden en çok kullanılanlar vanilin, kumarin ve timoldur.

2.1.2.2.3.2 Lezzet Arttırıcılar

CAC tanımına göre lezzet arttırıcılar gıdada var olan tat ve/veya kokuyu arttıran maddelerdir. Kendilerine özgü lezzetleri olmayan ancak katıldıkları gıdanın lezzetini arttıran bu maddeler 5 karbon atomu içeren L-aminoasitler ve 6-hidroksipürin içeren 5-nükleotidler olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır. Gıdalarda kullanılan lezzet arttırıcılar kimyasal yapılarına bağlı olarak aminoasitler, nükleotidler ve maltol olmak üzere üçe ayrılırlar.

2.1.2.3 Beslenme Değerini Düzenleyici Katkı Maddeleri

2.1.2.3.1 Tatlandırıcılar

CAC tanımına göre tatlandırıcılar gıdaya tatlı tadı veren, şeker olmayan maddelerdir. Genellikle bitkisel olan doğal kaynaklardan elde edilenler doğal tatlandırıcı, sentezleme yolu ile elde edilen ve doğal maddelerle benzerliği bulunmayanlar yapay tatlandırıcı olarak sınıflandırılırlar. Aspartam, sakarin, sukraloz, alitam gibi tatlandırıcılar çok düşük miktarlarda kullanıldıklarında bile şiddetli tatlılık oluştururlar. Bu tatlandırıcılara yoğun tatlandırıcılar denir. Ayrıca tatlandırıcılık etkisinin yanı sıra su tutarak hacim verme özelliği bulunan tatlandırıcılar da vardır. Hacim verici tatlandırıcılardan bazıları polioller, mannitol, ksilitol, izomalt ve sorbitoldur.

2.1.2.3.2 Zenginleştirme Katkıları

Bebek mamalarının yanı sıra, margarinler, süt ve sporcu içecekleri vb. ürünlerine vitaminler, kalsiyum, fosfor, demir, iyot gibi mineraller ve lisin, metiyonin, triptofan gibi temel aminoasitler ilave edilmektedir.

2.1.2.3.2.1 Vitaminler

Birçok ürüne özellikle de meyve sularına, konserve sebzelere, un ve ekmeklere, sütlere, margarinlere ve bebek mamalarına besin değerini arttırmak veya işleme sırasında oluşan kayıpları düzeltmek için vitamin eklenmektedir. Birçok vitamin istenen etkileri vermemektedir.

2.1.2.3.2.2 Aminoasitler

İnsanların bir gün boyunca alması gereken aminoasitler vardır. Bunlar izolosin, losin, lisin, metionin, sistein, fenilalanin, tirozin, treonin, triptofan ve valindir. Bazı gıdalar önemli aminoasitleri içermemektedir. Hububatlar ve diğer bitki kaynaklı gıdalar lisin, et ve süt ürünleri metionin, buğday ve çavdar treonin, mısır ve pirinç triptofan yönünden fakirdir. Bu nedenden dolayı aminoasit veya aminoasit karışımları çeşitli gıdalara eklenmektedirler.

2.1.2.3.2.3 Mineraller

Gıdalar çeşitli mineral ilavesi ile zenginleştirilmektedir. Örneğin gıdalara demir, kalsiyum, magnezyum, bakır ve çinko eklenmektedir.

2.1.2.4 İşlem Yardımcı Katkı Maddeleri

2.1.2.4.1 İtici Gazlar

Gıdanın bulunduğu kaptan dışarı çıkmasını sağlayan hava dışındaki gazlardır. Argon, helyum, azot, azot oksit, bütan, izobütan, diklorodiflormetan, propan, oksijen, hidrojen itici gaz olarak kullanılırlar.

2.1.2.4.2 Taşıyıcılar ve Taşıyıcı Çözücüler

Gıda katkı maddelerini çözmek, seyreltmek veya dağılımını sağlamak gibi fiziksel yollarla gıdaları modifiye etmek için kullanılan maddelerdir. Gıdaların teknolojik fonksiyonlarını değiştirmezler ve aynı zamanda kendileri de teknolojik bir fonksiyon katmazlar.

2.1.2.4.3 Enzimler

Doğal kaynaklı oldukları için tercih edilirler ve toksik değildirler. Aktiviteleri kolaylıkla standardize edilebilir. Böylece istenmeyen reaksiyonlara neden olmazlar. Reaksiyonun şekli, hızı, sıcaklığı, reaksiyon süresi ve pH'ı kolaylıkla ayarlanabilir. Gerektiği zaman reaksiyon durdurabilir ve çok az miktarlarda kullanımı bile istenilen etkiyi verir. Amilaz, pektinaz, glukoz, katalaz, invertaz, proteaz, lipaz, glukoz izomeraz ve aroma enzimleri gıda endüstrisinde kullanılan enzimlerdir.

2.1.3 Gıda Katkı Maddelerinin Toksik Etkileri

Kıvam verme, koruma, renklendirme, tat verme gibi birçok nedenden dolayı 3000'den fazla gıda katkı maddesi gıdalara katılır. Katılan katkı maddelerinin tümü belirli bir dozun üzerine çıktığında toksik özellik taşır, kaldı ki genel olarak bir kimyasal maddenin toksik olup olmaması dozuna bağlıdır. Kullanılan gıda katkı maddelerinden özellikle 15 tanesinin (E310 Propil gallat, E320 BHA, E321 BHT, E924, Potasyum bromat, E621 Monosodyum glutamat, E951 Aspartam, E950 Asesülfam-k, E250-E251 Sodyum nitrit, E220-E228 Sülfitler, E210-E219 Benzoatlar, Hidrojene edilmiş bitkisel yağ, E102, E127 Eritrosin, E133 Brilliant mavisi FCF, E110 Sunset sarısı FCF, Oranj sarısı S, Olestra) alerji, astım, beyin hasarı, kanser gibi hastalıklara neden olabileceği bildirilmektedir. Bu sebeple katkı maddeleri belirlenen dozlardan fazla kullanılmamalıdır.

2.1.4 Gıda Katkı Maddelerinin Kullanım Şartları

Gıda katkı maddeleri toplumun her ferdinin doğuştan ölüme kadar, bilgileri dışında maruz kalabildikleri maddelerdir. Bu nedenle insan sağlığının korunması yönünden en sıkı denetim altında tutulan kimyasal madde grubudur. Dünya Sağlık Örgütü'nden ulusal sağlık otoritelerine kadar çok sayıda kuruluş, yoğun araştırmalar yaparak gıda katkıları ile ilgili güvenli kullanım ilkelerini belirlemiştir. Toksikolojik değerlendirmede, incelenen katkının organizmaya alımından atılımına kadar vücutta olan olayların toplamı incelenir. Emilimi (kana geçişi), dağılımı (kan yardımıyla organlara taşınması), biyotransformasyonu (vücutta diğer kimyasallara dönüşümü) ve atılımı içeren bir değer elde edilir. Bu değer bu 4 aşamanın İngilizce karşılıklarının (Absoption, Distrubition, Metabolism, Excretion) baş harfleri alınarak ADME olarak tanımlanmıştır. ADME değerlerine göre, bazı gıda katkı maddeleri yasaklanmış veya kullanımı sınırlandırılmıştır. FDA'nın (Food and Drug Administration- Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi) bugüne kadar kullanımına onay verdiği gıda katkı maddesi sayısı yaklaşık 2800'dür. Ancak bugün bunların önemli bir bölümü daha uygun alternatifleri bulunduğu için teknik sebeplerle kullanılmamaktadır. Avrupa Birliği'nde kullanımına onay verilen gıda katkısı sayısı 297'dir.

Ülkemizde gıda katkı maddelerinin kullanımı Türk Gıda Kodeksi yönetmeliği ile düzenlenmiştir. Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğinde 300 civarında gıda katkı maddesinin çeşitli gıdalarda değişen miktarlarda kullanılmasına izin verilmiştir. Bu yönetmelikte, uluslararası kuruluşların tespit ettiği değerlerden yola çıkılarak gıda katkılarının kullanım limitleri belirlenmiştir. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nce kullanılmasına izin verilen gıda katkı maddeleri ve kullanılabilecek maksimum miktarları Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2. 1 Türk gıda kodeksi yönetmeliğince kullanılmasına izin verilen gıda katkı maddeleri

Katkı Maddesi Türü	**Madde Adı**	**E Kodu**	**Kullanıldığı Yerler**	**Maksimum Miktar**
Antioksidanlar ve sinerjistleri	Alfatokoferol ve tokoferol karışımları	E306	Soslar	QS
			Mayonez	
			Margarinler	
	Askorbik asit	E300	Ekmek	QS
			Reçel, jöle marmelat	
			Süt ve süt tozu	
			Katı ve sıvı yağ	
			Şarap	250 mg/L
			Yaş makarna	QS
			Bira	
			Et karışımları	
	Bütillendirilmiş hidroksi anisol (BHA)	E320	Katı-sıvı Yağ	100 mg/kg
			Hazır kek karışımı	200 mg/kg
			Soslar	200 mg/kg
			Sakız	400 mg/kg
			Aroma vericiler	100 mg/kg
	Bütillendirilmiş hidroksi toluen (BHT)	E321	Katı-sıvı Yağ	100 mg/kg
			Hazır kek karışımı	200 mg/kg
			Soslar	200 mg/kg
			Sakız	400 mg/kg
			Aroma vericiler	100 mg/kg
	Tersinir bütil hidrokinon (TBHQ)	E319	Katı-sıvı Yağ	100 mg/kg
			Hazır kek karışımı	200 mg/kg
			Soslar	200 mg/kg
			Sakız	400 mg/kg
			Aroma vericiler	100 mg/kg

Çizelge 2. 1'in devamı

Katkı Maddesi Türü	Madde Adı	E Kodu	Kullanıldığı Yerler	Maksimum Miktar				
	Sorbatlar (Sa)	E200 E202 E203	Alkolsüz içecekler	Sa 300	Ba 150	PHB	Sa+Ba 250Sa+ 150Ba	Sa+Ba +PHB
			Alkolsüz bira		200			
	Benzoatlar (Ba)	E210 E211 E212 E213	Reçel, jöle		500		1000	
			Zeytin ve zeytin bazlı ürünler	1000	500		1000	
			Sıvı yumurta				5000	
	Hidroksi benzoatlar (PHB)	E214 E215 E218 E219	Şekerleme					1500 (max 300 PHB)
Koruyucular			Hardal				1000	
			Hazır salata				1500	
			Şalgam suyu		200			
	Sodyum nitrit Potasyum nitrit	E250 E249	Et ürünleri (sosis salam sucuk vs.)	100mg/kg				
			Sterilize et ürünleri	150mg/kg				
	Sodyum nitrat Potasyum nitrat	E251 E252	Et ürünleri	150 mg/kg				
			Sert, yarı sert ve yarı yumuşak peynir	150 mg/kg				

Çizelge 2. 1'in devamı

Katkı Maddesi Türü	Madde Adı	E Kodu	Kullanıldığı Yerler	Maksimum Miktar
Yapay tatlandırıcılar	Asesülfam-k	E950	Alkolsüz içecek	350 mg/L
			Tatlılar	350 mg/kg
			Şekerlemeler	500 mg/kg
			Sakız	2000 mg/kg
			Soslar	350 mg/kg
			Hardal	350 mg/kg
			Bira	25 mg/L
	Aspartam	E951	Alkolsüz içecek	600 mg/L
			Tatlılar	1000 mg/kg
			Şekerlemeler	1000 mg/kg
			Sakız	5500 mg/kg
			Soslar	350 mg/kg
			Hardal	350 mg/kg
			Çorbalar	110 mg/L
			Bira	25 mg/L
	Sakarin ve sodyum-potasyum-kalsiyum tuzları	E954	Alkolsüz içecekler	80 mg/L
			Tatlılar	100 mg/kg
			Şekerlemeler	500 mg/kg
			Sakız	1200 mg/kg
			Soslar	160 mg/kg
			Hardal	320 mg/kg
			Çorbalar	110 mg/kg
			Reçel ve marmelat	200 mg/kg
	Sukraloz	E955	Alkolsüz içecekler	300 mg/L
			Tatlılar	400 mg/kg
			Şekerlemeler	1000 mg/kg
			Sakız	3000 mg/kg
			Soslar	450 mg/kg
			Hardal	140 mg/kg
			Çorbalar	45 mg/L
			Reçel ve marmelat	400 mg/kg
			Bira	10 mg/L
	Taumatin	E957	Şekerlemeler	50 mg/kg
			Sakız	50 mg/kg
	Neohesperidin DC	E959	Alkolsüz içecekler	30 mg/L
			Tatlılar	50 mg/kg
			Şekerlemeler	100 mg/kg
			Sakız	400 mg/kg
			Soslar	50 mg/kg
			Hardal	50 mg/kg
			Çorbalar	50 mg/kg
			Bira	10 mg/kg
			Reçel ve marmelat	50 mg/kg

Çizelge 2. 1'in devamı

Katkı Maddesi Türü	Madde Adı	E Kodu	Kullanıldığı Yerler	Maksimum Miktar
Yapay tatlandırıcılar	Siklamik asit ve sodyum-kalsiyum tuzları	E952	Alkolsüz içecek	250 mg/L
			Tatlılar	250 mg/kg
			Şekerlemeler	500 mg/kg
			Sakız	1500 mg/kg
			Reçel ve marmelat	1000 mg/kg
	Neotam	E961	Alkolsüz içecekler	20 mg/L
			Tatlılar	32 mg/kg
			Şekerlemeler	32 mg/kg
			Sakız	250 mg/kg
			Soslar	12 mg/kg
			Hardal	12 mg/kg
			Çorbalar	5 mg/kg
			Bira	1 mg/kg
	Aspartam-asesülfam tuzu	E962	Alkolsüz içecekler	350 mg/L(a)*
			Tatlılar	350mg/kg(a)*
			Şekerlemeler	500mg/kg(a)*
			Sakız	2000mg/kg(a)*
			Soslar	350 mg/kg(b)*
			Hardal	350 mg/kg(b)*
			Çorbalar	110 mg/kg(b)*
			Reçel ve marmelat	1000 mg/kg(b)*
Doğal tatlandırıcılar	Mannitol	E421	Tatlılar	QS
			Şekerlemeler	
			Soslar	
			Hardal	
			Sakız	
	Sorbitol	E420	Tatlılar	QS
			Şekerlemeler	
			Soslar	
			Hardal	
			Sakız	
	İzomalt	E953	Tatlılar	QS
			Şekerlemeler	
			Soslar	
			Hardal	
			Sakız	

Çizelge 2. 1'in devamı

Katkı Maddesi Türü	Madde Adı	E Kodu	Kullanıldığı Yerler	Maksimum Miktar
Doğal tatlandırıcılar	Maltitol	E965	Tatlılar	QS
			Şekerlemeler	
			Soslar	
			Hardal	
			Sakız	
	Laktitol	E966	Tatlılar	QS
			Şekerlemeler	
			Soslar	
			Hardal	
			Sakız	
	Ksilitol	E967	Tatlılar	QS
			Şekerlemeler	
			Soslar	
			Hardal	
			Sakız	
	Eritritol	E968	Tatlılar	QS
			Şekerlemeler	
			Soslar	
			Hardal	
			Sakız	
Renklendiriciler	B-Karoten karamel	E160	Alkolsüz içecekler	100 mg/L
			Meyve sebze şekerlemeleri	200 mg/kg
			Süsleme ve kaplama maddeleri	500 mg/kg
			Dondurma	150 mg/kg
			Hardal	300 mg/kg
			Soslar	500 mg/kg
			Tatlılar	150 mg/kg
			Çorbalar	50 mg/kg
	Eritrosin	E127	Alkolsüz içecekler	100 mg/L
			Meyve sebze şekerlemeleri	200 mg/kg
			Süsleme ve kaplama maddeleri	500 mg/kg
			Dondurma	150 mg/kg
			Hardal	300 mg/kg
			Soslar	500 mg/kg
			Tatlılar	150 mg/kg
			Çorbalar	50 mg/kg
	Sunset sarısı	E110	Alkolsüz içecekler	100 mg/L
			Meyve sebze şekerlemeleri	200 mg/kg
			Süsleme ve kaplama maddeleri	500 mg/kg
			Dondurma	150 mg/kg
			Hardal	300 mg/kg
			Soslar	500 mg/kg
			Tatlılar	150 mg/kg
			Çorbalar	50 mg/kg

Çizelge 2. 1'in devamı

Katkı Maddesi Türü	Madde Adı	E Kodu	Kullanıldığı Yerler	Maksimum Miktar
Renklendiriciler	Tartrazin	E102	Alkolsüz içecekler	100 mg/L
			Meyve sebze şekerlemeleri	200 mg/kg
			Süsleme ve kaplama maddeleri	500 mg/kg
			Dondurma	150 mg/kg
			Hardal	300 mg/kg
			Soslar	500 mg/kg
			Tatlılar	150 mg/kg
			Çorbalar	50 mg/kg
	Ponso 4r	E124	Alkolsüz içecekler	100 mg/L
			Meyve sebze şekerlemeleri	200 mg/kg
			Süsleme ve kaplama maddeleri	500 mg/kg
			Dondurma	150 mg/kg
			Hardal	300 mg/kg
			Soslar	500 mg/kg
			Tatlılar	150 mg/kg
			Çorbalar	50 mg/kg
	Kurkumin	E100	Alkolsüz içecekler	100 mg/L
			Meyve sebze şekerlemeleri	200 mg/kg
			Süsleme ve kaplama maddeleri	500 mg/kg
			Dondurma	150 mg/kg
			Hardal	300 mg/kg
			Soslar	500 mg/kg
			Tatlılar	150 mg/kg
			Çorbalar	50 mg/kg
	Kinolin sarısı	E104	Alkolsüz içecekler	100 mg/L
			Meyve sebze şekerlemeleri	200 mg/kg
			Süsleme ve kaplama maddeleri	500 mg/kg
			Dondurma	150 mg/kg
			Hardal	300 mg/kg
			Soslar	500 mg/kg
			Tatlılar	150 mg/kg
			Çorbalar	50 mg/kg
	Koşineal	E120	Alkolsüz içecekler	100 mg/L
			Meyve sebze şekerlemeleri	200 mg/kg
			Süsleme ve kaplama maddeleri	500 mg/kg
			Dondurma	150 mg/kg
			Hardal	300 mg/kg
			Soslar	500 mg/kg
			Tatlılar	150 mg/kg
			Çorbalar	50 mg/kg

Çizelge 2. 1'in devamı

Katkı Maddesi Türü	Madde Adı	E Kodu	Kullanıldığı Yerler	Maksimum Miktar
Renklendiriciler	Karmosin	E122	Alkolsüz içecekler	100 mg/L
			Meyve sebze şekerlemeleri	200 mg/kg
			Süsleme ve kaplama maddeleri	500 mg/kg
			Dondurma	150 mg/kg
			Hardal	300 mg/kg
			Soslar	500 mg/kg
			Tatlılar	150 mg/kg
			Çorbalar	50 mg/kg
	Allura kırmızısı	E129	Alkolsüz içecekler	100 mg/L
			Meyve sebze şekerlemeleri	200 mg/kg
			Süsleme ve kaplama maddeleri	500 mg/kg
			Dondurma	150 mg/kg
			Hardal	300 mg/kg
			Soslar	500 mg/kg
			Tatlılar	150 mg/kg
			Çorbalar	50 mg/kg
	Patent mavisi	E131	Alkolsüz içecekler	100 mg/L
			Meyve sebze şekerlemeleri	200 mg/kg
			Süsleme ve kaplama maddeleri	500 mg/kg
			Dondurma	150 mg/kg
			Hardal	300 mg/kg
			Soslar	500 mg/kg
			Tatlılar	150 mg/kg
			Çorbalar	50 mg/kg
	İndigotin	E132	Alkolsüz içecekler	100 mg/L
			Meyve sebze şekerlemeleri	200 mg/kg
			Süsleme ve kaplama maddeleri	500 mg/kg
			Dondurma	150 mg/kg
			Hardal	300 mg/kg
			Soslar	500 mg/kg
			Tatlılar	150 mg/kg
			Çorbalar	50 mg/kg
	Brilliant mavisi	E133	Alkolsüz içecekler	100 mg/L
			Meyve sebze şekerlemeleri	200 mg/kg
			Süsleme ve kaplama maddeleri	500 mg/kg
			Dondurma	150 mg/kg
			Hardal	300 mg/kg
			Soslar	500 mg/kg
			Tatlılar	150 mg/kg
			Çorbalar	50 mg/kg

Çizelge 2. 1'in devamı

Katkı Maddesi Türü	Madde Adı	E Kodu	Kullanıldığı Yerler	Maksimum Miktar
Emilsufye edici tuzlar	Sodyum fosfat	E339	Muhtelif gıda	QS
	Sodyum pirofosfat	E450	Muhtelif gıda	QS
Emülgatörler	Lesitin	E322	Margarin	QS
			Çikolata	
			Mayonez	
			Süt tozu	
	Sorbitan mono stearat	E491	Muhtelif gıda	QS
Asit düzenleyiciler	Asetik asit	E260	Domates salçası	QS
	Laktik asit	E270	Bebek gıdaları	QS
	Tartarik asit	E334	Meyve konserveleri	QS
	Sodyum sitrat	E331	Margarinler	QS
	Alüminyum silikat	E559	Süt tozu	QS
Topaklanmayı önleyiciler	Magnezyum karbonat		Rafine sofra tuzu	QS
	Silikon dioksit	E551	Hazır kek unları	QS

*(a) Asesülfam K cinsinden, (b) ise Aspartam cinsinden limit değerleridir.

2.1.5 Gıda Katkı Maddelerinin Analiz Yöntemleri

Gıda katkı maddelerinin analizleri için en çok tercih edilen yöntem HPLC'dir. HPLC ile son yıllarda yapılmış bazı çalışmalar, koruyucular için Çizelge 2.2'de , antioksidanlar için Çizelge 2.3'de, renklendiriciler için Çizelge 2.4'de, tatlandırıcılar için Çizelge 2.5'de verilmiştir.

Günümüzde gıda katkı maddelerinin analizinde HPLC'ye alternatif olarak çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri popülerlik kazanmıştır. Çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri genellikle spektroskopik verilere uygulamaktadır. Bu yöntemle çeşitli gıdalardaki tatlandırıcı, renk verici, lezzet arttırıcı, koruyucu, antioksidan, zenginleştirme katkıları ve asit düzenleyicilerin miktar tayini yapılmıştır [2-7]. Çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri HPLC verilerine uygulanarak da renk vericilerin analizi yapılmıştır [8].

Ayrıca çeşitli gıdalardaki antioksidanlar, tatlandırıcılar, renk ve lezzet vericiler kapiler elektroforez ile [9-11], koruyucu,emülgatör ve antioksidanlar gaz kromatografisi (GC) ile analiz edilmiştir [12]. Voltametre [13, 14] ve türev spektroskopi [15] yöntemleri ile yapılmış çalışmalarda bulunmaktadır.

Çizelge 2. 2 Koruyucuların HPLC ile analizi ilgili çalışmalar

Koruyucu	**Hareketli Faz**	**Dedektör**	**Kaynak**
Benzoik asit, sorbik asit	Fosfat tamponu (pH 6,7),metanol	UV	[16]
Benzoik asit, sorbik asit	Fosfat tamponu (pH 4), metanol	UV	[17]
Sodyum benzoat, potasyum sorbat	Amonyum asetat tamponu (pH 4,2), asetonitril	UV	[18]
Benzoik asit, sorbik asit	Asetonitril, amonyum asetat tamponu (pH 4)	UV	[19]
Benzoik asit, sorbik asit	Fosfat 0,02mol (pH 4)	UV	[20]
Sodyum benzoat	Asetik Asit (pH 3,45)	UV	[21]
Sodyum benzoat, sorbik asit	0,1 M Fosfat (pH 4,0)	UV	[17]
Benzoik asit, sorbik asit	% 15Amonyum asetat(0,005M)	UV	[19]
Benzoik asit, sorbik asit, metilparaben, propilparaben	Metanol, asetat tamponu (pH 4)	UV	[22]
Benzil alkol, etilen glikol, monofenileter, metil hidroksi benzoat, etil hidroksi benzoat, bütil hidroksi benzoat	Su,asetonitril	DAD	[23]
Metilparaben, etilparaben, propilparaben, bütilparaben	Asetonitril, fosfat tamponu, metanol	DAD	[24]
Benzoik asit, sorbik asit, dehidroasetik asit, parabenler	Asetonitril, su, amonyum asetat, formik asit	TOF-MS	[25]

Çizelge 2. 3 Antioksidanların HPLC ile analizi ilgili çalışmalar

Antioksidan	**Hareketli Faz**	**Dedektör**	**Kaynak**
Askorbik asit	Fosfat (pH7,8), %16 metanol	Floresans	[26]
Askorbik asit	Asetonitril, sodyum asetat	UV	[27]
BHA, TBHQ, THBP, IONOX-100, PG, OG	Asetonitril, su	TOF-MS	[28]

Çizelge 2. 4 Renklendiricilerin HPLC ile analizi ilgili çalışmalar

Boya	**Hareketli Faz**	**Dedektör**	**Kaynak**
Tartrazin, kinolin sarısı, oranj sarısı, azorubin, ponso	Fosfat tamponu (pH 4,2)	UV	[29]
Tartrazin, kinolin sarısı, sunset sarısı, karmosin, amarant, ponso 4r, eritrosin, allura kırmızısı, patent mavisi, indigo karmin, brilliant mavisi	Amonyum asetat tamponu (pH 5), asetonitril, metanol	UV DAD	[30]
Tartrazin, brilliant mavisi, sunset sarısı	Metanol-EDTA, sodyum asetat, fosfat tamponu (pH 7)	UV DAD	[31]
40 çeşit boya	Amonyum asetat (pH 6,7)	DAD	[32]
Tartrazin, ponso 4r, sunset sarısı	Metanol, 0,02 M amonyum asetat tamponu	UV DAD	[33]
Ponso 4r, sunset sarısı, tartrazin	Metanol, fosfat tamponu (pH 4)	UV	[17]
Tartrazin, amarant, ponso, sunset sarısı	Metanol, asetat tamponu (pH 6,5)	UV	[34]
Amarant, sunset sarısı, tartrazin	Metanol,asetat tamponu	DAD	[8]
Ponso 4r, ponso 6r, amarant, tartrazin, sunset sarısı, azorubin, allura kırmızısı, brilliant mavisi	Amonyum asetat (pH6,7), metanol, asetonitril	DAD	[32]

Çizelge 2. 5 Tatlandırıcıların HPLC ile analizi ilgili çalışmalar

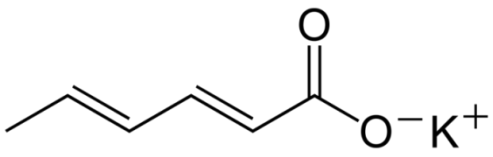
Tatlandırıcılar	**Hareketli Faz**	**Dedektör**	**Kaynak**
Sakarin, asesülfam-k	Fosfat tamponu (pH 6,7), metanol,	UV	[16]
Aspartam, asesülfam-k, sakarin	Fosfat tamponu (pH 4), metanol	UV	[17]
Aspartam, asesülfam-k, sakarin	Asetonitril, amonyum asetat tamponu (pH 4)	UV	[19]
Aspartam, asesülfam-k, sakarin, siklohekzanon	Na_2CO_3	UV	[35]
Asesülfam-k, aspartam, sakarin,	Metanol-fosfat tamponu(pH 4)	UV	[17]
Asesülfam-k,aspartam, sakarin	Asetonitril, su, metanol, fosfat tamponu	DAD	[24]
Asesülfam-k, aspartam, sakarin	Amonyum asetat (pH 4)	UV	[19]
Asesülfam-k, sakarin, alitame, siklohekzanon, aspartam, sukraloz, dulkin, neohesparidin	Metanol, aseton	ELSD	[36]
Asesülfam-k, sakarin, alitame, siklohekzanon, aspartam, sukraloz, neohesparidin, steviol	Metanol, aseton	ESI-MS	[37]
Asesülfam-k, sakarin, aspartam, siklohekzanon	KOH	Kondüktivite	[38]

2.1.6 Limon Sosu ve İçeceklerindeki Gıda Katkı Maddeleri

2.1.6.1 Molekül Yapıları ve Özellikleri

Bu çalışma kapsamında analizi yapılacak olan limon sosu ve içeceklerinde bulunan gıda katkı maddeleri ve özellikleri aşağıda verilmiştir.

Potasyum Sorbat

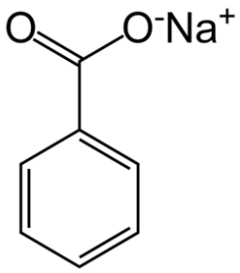


Şekil 2. 1 Potasyum sorbat molekülü

Molekül Formülü: $C_6H_7KO_2$

Potasyum sorbat, polimer yapıda beyaz veya sarı beyaz renkte, toz veya granüller halde, kendine has hafif bir kokusu olan, tadıldığında ekşilik hissi uyandıran doymamış bir yağ asididir. Organik asitler içinde gıda kodeksine uygun olan tek koruyucu potasyum sorbattır. Potasyum sorbatın insan sağlığına olumsuz etkisi yoktur. Suda ve etanolde iyi çözünen potasyum sorbat E202 gıda katkı maddesi olarak bilinir. Potasyum sorbat suda çözündüğünde iyonlaşarak sorbik asit haline dönüşür. pH=6,5'a kadar etkilidir, ancak pH değeri düştükçe potasyum sorbatın etkisi artar. 250 ppm – 1000 ppm seviyelerinde geniş bir aralıkta; ketçap, mayonez, hazır soslar, ekmek, margarin, içecek, fermente ürünler, zeytin, salça, balık, işlenmiş et ürünler, şekerlemeler, meyve ürünleri gibi gıdanın yer aldığı birçok sektörde küf maya ve bazı bakteri türlerinin gelişimini önlemek amacıyla kullanılır. Potasyum sorbat gıda dışı olarak kişisel bakım ürünlerinde de mikrobiyal gelişimi önleme ve raf ömrünü arttırmada kullanılmaktadır.

Sodyum Benzoat

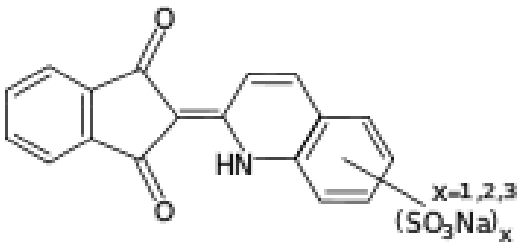


Şekil 2. 2 Sodyum benzoat molekülü

Molekül formülü: $C_7H_5NaO_2$

Sodyum benzoat beyaz renkte ve katıdır. Gıda katkıları listesinde E211 olarak kodlanmıştır. Sodyum benzoat bir kimyasal tuzdur. Benzoik asidin sodyum bikarbonat, sodyum karbonat veya sodyum hidroksit ile nötralizasyonu sonucunda elde edilir. Özellikle alkolsüz içeceklerde maya ve küf oluşumuna karşı koruyucu olarak kullanılmaktadır. Sodyum benzoat doğada saf halde bulunmaz. Fakat türevlendiği benzoik asit birçok hayvan ve bitkide doğal olarak bulunur. Elma, tarçın, kuru erik, sarımsak ve ham karanfil gibi gıdalar benzoik asit içeren gıdalara örnek olarak verilebilir. Gıda sektöründe gazlı içecekler ve benzeri meşrubatlarda, turşularda, ketçap ve benzeri soslarda, marmelat ve reçellerde, margarin, zeytin üretiminde, işlenmiş balık ürünlerinde ve şekerlemelerde % 0,1-0,2 aralığında yaygın olarak kullanılır. Ülkemizde ise en çok % 0,1 oranında kullanılabilmekte ve daha fazlasına izin verilmemektedir. Benzoatlar özellikle çocuklarda astım ve egzamaya neden olmaktadır.

Kinolin Sarısı

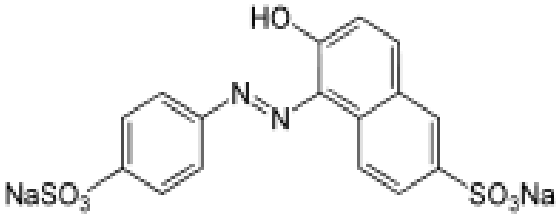


Şekil 2. 3 Kinolin sarısı molekülü

Molekül Formülü: $C18H_9NNa_2O_8S_2$

Kinolin sarısı; sarı renkte toz veya granüller halinde bulunmaktadır. Suda çözünür nitelikte bulunan bu madde, etanolde çok az çözünmektedir. Ruj, saç bakım ürünleri, kolonya üretimi ve eczacılıkta kullanılır. Deri rahatsızlığına neden olur.

Sunset Sarısı



Şekil 2. 4 Sunset sarısı molekülü

Molekül Formülü: $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$

Sunset Sarısı; turuncu-kırmızı renkte toz veya granüller halinde bulunmaktadır. Sarı renklendirici olarak unlu gıdalar, pasta, tatlı, çerez, dondurma, içecek ve konserve balık, hazır çorba ve bazı şurup cinsi ilaçların üretiminde kullanılır. Astım hastalığını arttırır. Benzoatlarla birlikte kullanıldığında çocuklarda hiperaktiviteye yol açabilir. Ayrıca kurdeşen, rinit (burun akması), burun tıkanıklığı, alerji, böbrek tümörü, kromozom hasarı, karın ağrısı, bulantı ve kusma, hazımsızlık ve iştahsızlığa neden olur.

2.1.6.1 Analiz Yöntemleri

Bu çalışma kapsamında analizi yapılacak olan limon sosu ve içeceklerinde bulunan katkı maddelerinin tek başına ve/veya bir arada analizine yönelik yapılan literatür araştırmasında en çok HPLC yöntemi kullanıldığı görülmüştür. Çizelge 2.6'da sodyum benzoat analizi için, Çizelge 2.7'de sodyum benzoat ve potasyum sorbat bir arada analizi için, Çizelge 2.8'de kinolin sarısı ve sunset sarısı bir arada analizi için, Çizelge 2.9'da sunset sarısı analizi için HPLC ile yapılan çalışmalar verilmiştir.

HPLC dışında diğer yöntemler ile yapılan çalışmalar da potasyum sorbat için Çizelge 2.10'da, sodyum benzoat için Çizelge 2.11'de, kinolin sarısı için Çizelge 2.12'de, sunset sarısı için Çizelge 2.13'de, sunset sarısı ve kinolin sarısı için Çizelge 2.14'de verilmiştir.

Yapılan literatür araştırmasında bu maddelerin hepsinin bir arada analizine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çizelge 2. 6 Sodyum benzoatın HPLC ile analizi

Örnek	**Diğer Madde**	**Kolon**	**Hareketli Faz**	**Dedektör**	**Kaynak**
Kozmetik, içecek, su örnekleri	Metilparaben, etilparaben, propilparaben	C18	Asetat tamponu, asetonitril	UV	[39]
Ağrı kesici süspansiyon	Metilparaben, etilparaben, propilparaben	C18	Asetat tamponu, asetonitril	DAD	[40]
Öksürük ilacı	-	C18	Asetonitril-su	UV	[41]
Farmasötik ürünler	-	C18	Potasyum fosfat, asetonitril	UV	[42]
Farmasötik ürünler	Metilparaben, propilparaben	C18	Potasyum fosfat, asetonitril	DAD	[43]
İlaç örneği	Metilparaben, propilparaben	C18	Potasyum fosfat, asetonitril	DAD	[44]
Soğuk algınlığı ilaçları	Psödöfedrin dekstrometorfan	C18	Metanol, dihidrojen fosfat tamponu	DAD	[45]
Multivitamin şurup	Metilparaben	C18	Asetonitril, sodyum sülfat tamponu	DAD	[46]
Şurup	Parasetamol, kafein	C18	Bütanol, su	DAD	[47]

Çizelge 2. 6'nın devamı

Örnek	Diğer Madde	Kolon	Hareketli Faz	Dedektör	Kaynak
Şurup	Metilparaben, propilparaben	C18	Asetonitril, potasyum dihidrojen fosfat	UV	[48]
Soğuk algınlığı ilaçları	Psodofedrin hidroklorit, dekstrometorfan hidrobromid	C18	Metanol, su	UV	[49]
Alkolsüz içecek		C18	Metanol, su	DAD	[21]
Öksürük şurubu	Metilparaben, propilparaben	C18	Asetonitril, metanol	DAD	[50]
İlaç	Metilparaben, propilparaben	C18	Asetonitril, potasyum fosfat	UV	[51]
Şurup	Dekstrometorfan, hidrobromid	C18	Asetonitril, potasyum dihidrojen fosfat	UV	[52]
Gıda	Sodyum sakarin, vanilin	C18	Asetonitril, amonyum asetat tamponu	UV	[19]
Farmasötik ürünler	Metilparaben, propilparaben	C18	Metanol, su	UV	[53]
Ayva reçeli		C18	Metanol	DAD	[54]
İnsan plazması	Dekstrometorfan	C18	Asetonitril, su	Floresans	[55]
İçme suyu	Hidroksi benzoik asit	C18	Asetonitril, tampon	UV	[56]
Soğuk algınlığı ilacı	Dekstrometorfan, fenilpropanol	C18	Asetonitril, metanol	DAD	[57]
İçecek	Kafein	C18	Metanol, tampon	UV	[58]
Asetaminofen kodein fosfat süspansiyonu	Metilparaben, asetaminofen	C18	Asetonitril, tampon	UV	[59]
İlaç	Guaifenesin, fenilpropanol, amin hidroklorit	C18	Asetonitril, potasyum fosfat	UV	[60]
Kola	Sodyum sakarin, kafein	C18	Metanol, su	UV	[61]
Portakal suyu	-	C18	Asetonitril, su	DAD	[62]

Çizelge 2. 7 Sodyum benzoat ve potasyum sorbatın HPLC ile analizi

Örnek	Diğer Madde	Kolon	Hareketli Faz	Dedektör	Kaynak
Sosis, sucuk	Sodyum sakarin	C18	Metanol, amonyum asetat tampon	DAD	[63]
Alkolsüz içecekler	-	C18	Su, asetonitril	DAD	[64]
Yiyecek ürünleri	-	C18	Asetonitril,amonyum asetat tampon	UV	[18]
Gıda maddeleri	-	C18	Metanol, asetat tampon	UV	[65]
Gıda maddeleri	-	C18	Asetonitril, amonyum asetat tampon	DAD	[66]

Çizelge 2. 8 Kinolin sarısı-sunset sarısının HPLC ile analizi

Örnek	Diğer Madde	Kolon	Hareketli Faz	Dedektör	Kaynak
İçecek, şekerleme	Tartrazin	C18	Asetonitril, metanol, su	DAD	[32]
Suda çözünür gıdalar	Tartrazin	C18	Asetonitril, metanol, su	DAD	[30]
Alkolsüz içecek	Tartrazin	C18	Metanol, asetat tampon	UV	[29]
Alkolsüz içecek	Tartrazin	C18	Metanol, asetat tampon	DAD	[67]

Çizelge 2. 9 Sunset sarısının HPLC ile analizi

Örnek	Diğer Madde	Kolon	Hareketli Faz	Dedektör	Kaynak
Gıda örneği	Amarant	C18	Metanol, amonyum asetat tampon	UV	[68]
Havyar	-	C18	Metanol, sodyum asetat tampon	DAD	[69]
Dondurma	Ponso 4r	C18	Sodyum fosfat, sodyum borat	DAD	[70]
Gıda maddeleri	Brilliant mavisi, tartrazin	C18	Amonyum asetat tampon, metanol	UV-DAD	[71]
Gıda maddeleri	Ponso 4r tartrazin	C18	Amonyum asetat tampon, metanol	DAD	[33]
Gıda ürünleri	Amarant, brillant mavisi, tartrazin	C18	Metanol, sodyum fosfat tamponu	UV	[72]

Çizelge 2. 10 Potasyum sorbatın diğer yöntemlerle analizi

Örnek	**Diğer Madde**	**Analiz Yöntemi**	**Kaynak**
Domuz eti	-	İnfrared spektrofotometri	[73]
Gıda ürünleri	Sodyum laktad	Kapiler elektroforez	[10]
Gıda ürünleri	-	Kapiler elektroforez	[74]
Meyve suyu	-	Kapiler elektroforez	[75]

Çizelge 2. 11 Sodyum benzoatın diğer yöntemlerle analizi

Örnek	**Diğer Madde**	**Analiz Yöntemi**	**Kaynak**
Alkolsüz içecek	-	Spektrofotometri	[76]
D-Amino asit	-	Kapiler elektroforez	[77]
Farmasötik ürünler	-	Gaz kromatografisi	[78]
Gıda ürünleri	-	Atomik emisyon spektrofotometri	[79]
Ananas şarabı	-	Spektrofotometri	[80]
Öksürük şurubu	Pirilamin maleat	Sıvı kromatografisi	[81]
Şurup	-	İnce tabaka kromatografisi	[82]
İlaç	Kafein	Spektrofotometri	[83]
Şurup	Dekstrometorfan	Spektrofotometri	[84]
Meyankökü tabletleri	Morfin	Kapiler elektroforez	[85]
İçecek	-	Potansiyometri	[86]
İçecek	-	Potansiyometri	[87]
Şurup	-	Potansiyometri	[88]
İlaç	-	Türev spektrofotometrisi	[89]
İçecek	-	İnce tabaka kromatografisi	[90]

Çizelge 2. 12 Kinolin sarısının diğer yöntemlerle analizi

Örnek	**Diğer Madde**	**Analiz Yöntemi**	**Kaynak**
Jöleli tatlılar	Azorubine	Densitometri	[91]
Gıda ürünleri	-	Voltametri	[92]
Gıda ürünleri	Brillant mavisi, eritrosin	Voltametri	[93]
Gıda ürünleri	-	Spektrofotometri	[94]
Serinletici içecekler	-	Voltametri	[95]
Gıda ürünleri	-	Spektrofotometri	[96]
Kozmetik ürünleri	Brillant mavisi	Spektrofotometri	[97]
Alkolsüz içecek	-	Spektrofotometri	[98]

Çizelge 2. 13 Sunset sarısının diğer yöntemlerle analizi

Örnek	**Diğer Madde**	**Analiz Yöntemi**	**Kaynak**
Gıda ürünleri	-	Voltametri	[99]
Farmasötik ürünler	-	Densitometri	[100]
Gazlı içecekler	-	IR spektrofotometrisi	[101]
Alkolsüz içecekler	-	Spektrofotometri	[102]
Gıda ürünleri	-	UV spektrofotometri	[103]
Meyve suyu şarap, süt	-	Spektrofotometri	[104]
Meyve suyu, şeker	-	Kapiler elektroforez	[105]
Gıda ürünleri	-	Kapiler elektroforez	[106]
Kiraz kompostosu	Eritrosin	Kapiler elektroforez	[107]
Gıda ürünleri	-	Kemometri	[108]
Gıda ürünleri	-	Elektrokinetik kromatografi	[109]
Toz içecek	Riboflavine	Spektrofotometri	[110]
Dondurma	-	Kapiler elektroforez	[70]
Somon	Ponso 4r	Spektrofotometri	[111]
Gıda ürünleri	-	Spektrofotometri	[112]
İlaç	Eritrosin	Türev spektrofotometrisi	[113]
Gıda ürünleri	-	Kapiler elektroforez	[114]
Jelatin tozu	Ponso 4r	Türev spektrofotometrisi	[115]
İlaç	-	Kromatografi	[116]
Serinletici içecekler	-	Voltametri	[117]
Gıda ürünleri	-	Kemometri	[118]
Gıda ürünleri	Amarant	Voltametri	[119]
Alkolsüz içecek	-	Spektrofotometri	[120]
Gıda-kozmetik ürünleri	-	Spektrofotometri	[121]
Şekerleme ürünleri	-	Elektrokinetik kromatografi	[122]
Mantar	-	Polarografi	[123]
Gıda örnekleri	Allura kırmızısı, karamel, tartrazin	Kemometri	[124]
Jelatin, toz içecek	Tartrazin	Voltametri	[125]
Gıda örnekleri	Ponso 4r, tartrazin	Türev spektrofotometrisi	[126]
Toz içecek Şekerleme ürünleri	Tartrazin	Spektrofotometri	[127]
Atık su, gıda örnekleri	Tartrazin	Sıvı-sıvı ekstraksiyonu	[128]
Gıda ürünleri	Tartrazin	Türev spektrofotometrisi	[129]
Gıda ürünleri	Tartrazin	UV spektrofotometrisi	[4]
Gıda ürünleri	Brillant mavisi, Tartrazin	Türev spektrofotometrisi	[130]
İçecek ürünleri	Allura kırmızısı, karamel,tartrazin	Kemometri	[131]
Alkolsüz içecek ürünleri	Allura kırmızısı, tartrazin	Kromatografi	[132]
İçecek örnekleri	Tartrazin	UV spektrofotometrisi	[133]
Gıda örnekleri	Tartrazin	İnce tabaka kromatografisi	[134]
Gıda örnekleri	Allura kırmızısı, tartrazin	Voltametri	[135]

Çizelge 2. 13'ün devamı

Gıda örnekleri	Allura kırmızısı, tartrazin	Spektrofotometri	[136]
Gıda örnekleri	Tartrazin	Türev spektrofotometrisi	[137]
Alkolsüz toz içecekler	Tartrazin	UV spektrofotometrisi	[138]
Multivitamin tabletleri	Tartrazin	Spektrofotometri	[139]
Meyve suyu	Allura kırmızısı, tartrazin	Kemometri	[140]
Toz içecekler	Tartrazin	Türev spektrofotometrisi	[141]
Gıda ürünleri	Brillant mavisi, allura kırmızısı,tartrazir	Kapiler elektroforez	[142]
Alkolsüz toz içecek	Allura kırmızısı, tartrazin	Türev spektrofotometrisi	[143]
Jelatin tozu	Tartrazin	Türev spektrofotometrisi	[115]
Gıda ürünleri	Tartrazin	Spektrofotometri	[144]
Gıda ürünleri	Tartrazin	Spektrofotometri	[145]
Kiraz, böğürtlen, ananas	Allura kırmızısı, tartrazin	Spektrofotometri	[146]
Gıda ürünleri	Tartrazin	Türev spektrofotometrisi	[147]
Alkolsüz içecekler	Tartrazin	Voltametri	[148]
Alkolsüz içecek	Tartrazin	Voltametri	[149]
Alkolsüz içecek	Tartrazin	Voltametri	[150]
Gıda ürünleri	Tartrazin	Diferansiyel titreşim polarografisi	[5]
Gıda ürünleri	Tartrazin	UV spektrofotometrisi	[151]
Şekerleme ürünleri	Tartrazin	Türev spektrofotometrisi	[152]
Gıda ürünleri	Tartrazin	Türev spektrofotometrisi	[153]
Gıda ürünleri	Brillant mavisi, tartrazin	Spektrofotometri	[154]
Kozmetik ürünleri	Tartrazin	Türev spektrofotometrisi	[155]
Gıda ürünleri	Tartrazin	Diferansiyel titreşim polarografisi	[156]

Çizelge 2. 14 Kinolin sarısı ve sunset sarısının diğer yöntemlerle analizi

Örnek	**Diğer Madde**	**Analiz Yöntemi**	**Kaynak**
Şurup ve tabletler	-	Türev spektrofotometrisi	[157]
Alkolsüz içecekler	-	Spektrofotometri	[158]
Gıda ürünleri	-	Türev spektrofotometrisi	[159]
Gıda ürünleri	Brillant mavisi, tartrazin	Spektrofotometri	[160]
Gıda ürünleri	Brillant mavisi, tartrazin	Türev spektrofotometrisi	[161]
Soda, şeker, sakız	Tartrazin	İnce tabaka kromatografisi	[162]

2.2 Deneysel Tasarım [163]

2.2.1 Tanımı

Bir deneyden elde edilen sonuçları etkileyen herhangi bir deneysel koşul, faktör olarak adlandırılır. Faktörler araştırmacı tarafından kontrol edilebilen ve kontrol edilemeyen olarak iki türde olabilir. Örneğin; çözeltinin saklama koşulları araştırmacı tarafından değiştirilebildiği için bu tür bir faktör kontrol edilebilirken, rastgele örnekleme içeren bir faktör kontrol edilemeyen faktördür. Sayısal bir değer verilmediğinden bu faktörlerin her ikisine de nitel faktörler denir. Sayısal olarak düzenlenebilen sıcaklık, pH ve derişim gibi faktörlerde nicel faktörler olarak isimlendirilir. Bir faktörün aldığı farklı değerler ise farklı seviyeler olarak ifade edilir.

Bir deneyden doğru sonuç elde edebilmek için sonucu etkileyecek faktörlerin belirlenmesi ve mümkünse kontrol edilmesi gerekir. Analitik teknikler çoğu zaman maddelerin çok küçük miktarlarının analizi ile ilgilendiğinden cevabın bağlı olduğu faktörlerin sayısal değerleri elde edilecek cevabı en üst değerde olmasını sağlayacak şekilde seçilmesi gerekir. Bu değerlere optimum değerler denir.

Deneysel tasarım, deney koşullarını etkileyecek faktörlerin seviyelerinin sistematik bir şekilde değiştirilmesi ile ölçülen cevaptaki değişimin gözlenmesi ve yorumlanması için kullanılan istatistiksel bir tekniktir. Deneysel tasarım; tarama, optimizasyon ve modelleme olmak üzere 3 aşamadan oluşur.

1. Tarama (Screening): Deneysel çalışmalarda sonucu etkileyen önemli faktörleri belirlemek amacı ile yapılır. Tarama tasarımları ile bir kimyasal reaksiyonun verimini etkileyen faktörler, kullanılan reaktif konsantrasyonu, katalizör konsantrasyonu, sıcaklık, pH, reaksiyon süresi, karıştırma hızı, vb. 10 faktör etkilediği dikkate alındığında bu faktörlerden hangilerinin önemli olduğu, hangilerinin elimine edilebileceğine ve hangilerinin ayrıntılı olarak incelenmesi gerektiğine karar verilir.

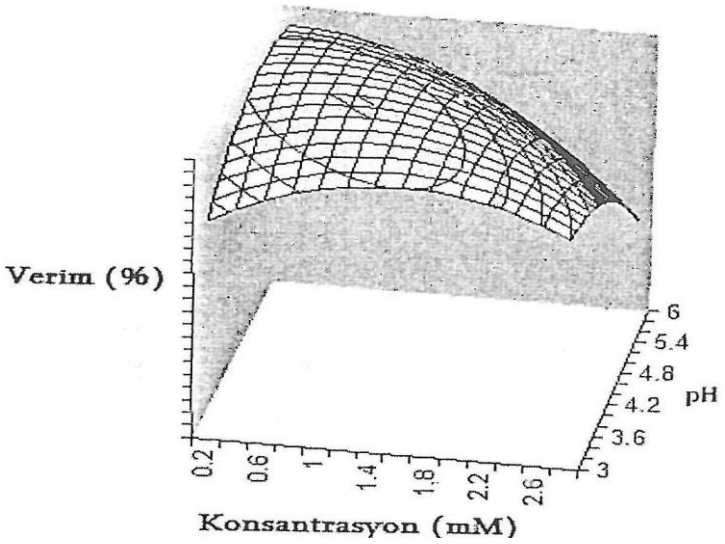
2. Optimizasyon: Tarama tasarımları ile bulunan önemli faktörlerin optimum değerlerinin belirlenmesi için yapılır.

3. Modelleme: Tarama tasarımı ve optimizasyon sonucu her bir faktörün etkisi matematiksel modelle ifade edilir. Böylece deneysel olarak bulunan sonucun yanında,

hesapla tahmini sonuç da bulunmuş olur. Beklenen sonucun deneysel olarak gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edilir.

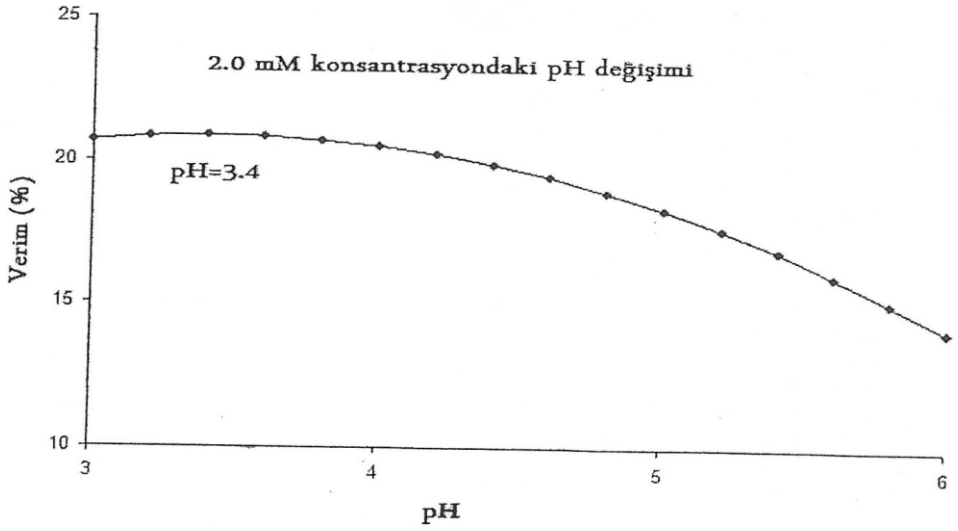
2.2.2 Önemi

Klasik yöntemlerle faktörlerin optimum değerleri, bir faktörün değerini değiştirme diğerlerini ise sabit tutma yöntemi ile belirlenmektedir. Çok sayıda faktör incelendiğinde çok fazla deney yapılması gerekmekte bu nedenle de zaman alıcı ve maliyetli olmaktadır. Deneysel tasarımda ise istatistiksel bir yaklaşımla öncelikle az sayıda seviye ile bütün faktörler sistematik olarak aynı anda değiştirilir ve etkili faktörler bulunur. Daha sonra sadece etkili faktörler, farklı seviyelerde yine aynı anda sistematik olarak değiştirilerek incelenir ve optimum değerler bulunur. Bu nedenle klasik yönteme göre daha az sayıda deney yapılarak daha kısa sürede sonuca ulaşılmaktadır. Dolayısıyla maliyet de azalmaktadır. Deneysel tasarımın en önemli avantajı ise klasik yöntemlerde sadece faktörlerin bireysel olarak etkileri incelenirken deneysel tasarımda hem bireysel etkileri hem de faktörlerin birbirleri ile etkileşimleri ve bu etkileşimlerin sonuca etkisi incelenmektedir. Bu sayede daha güvenilir sonuçlar elde edilmektedir. Deneysel tasarımın önemi bir örnekle de açıklanabilir. Bu çalışmada pH ve katalizör konsantrasyonunun optimum değerlerinin bulunması için önce deneysel tasarım ve optimizasyon yöntemi kullanılmış, işlem sonunda pH:4,4 ve katalizör konsantrasyonu 1,0 mM olarak bulunmuştur (Şekil 2.5).



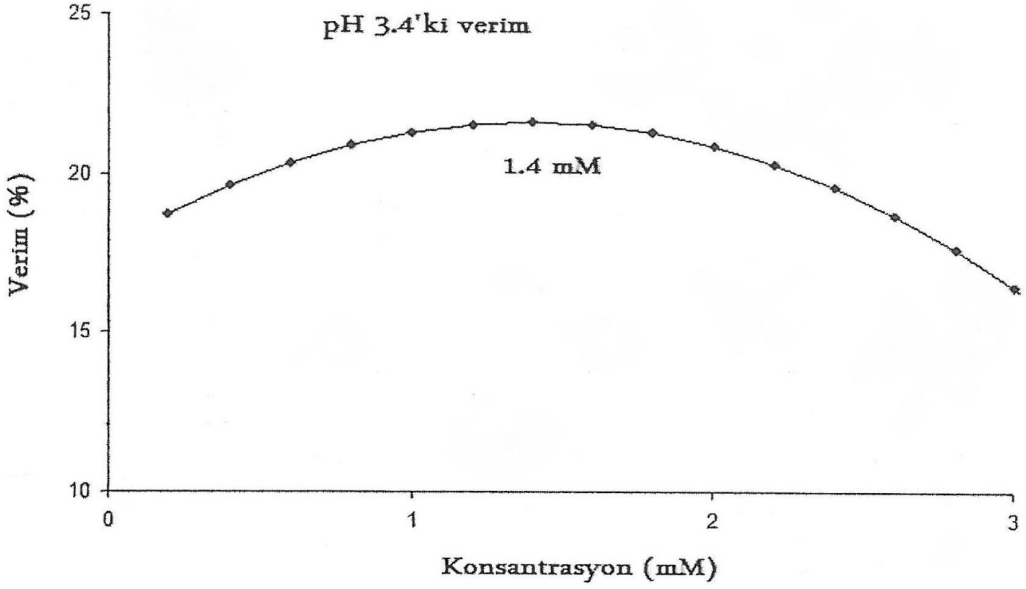
Şekil 2. 5 pH ve katalizör konsantrasyonuna bağlı olarak reaksiyon verimindeki değişme.

pH ve katalizör konsantrasyonu klasik yöntem ile optimize edilmek istendiğinde katalizör konsantrasyonu 2,0 mM'da sabit tutularak pH değiştirilmiş ve optimum pH 3,4 olarak bulunmuştur (Şekil 2.6).



Şekil 2. 6 Katalizör konsantrasyonu 2,0 mM da sabit tutularak bulunan optimum pH

pH=3,4 optimum olarak bulunduktan sonra pH bu değerde sabit tutularak konsantrasyon değiştirilmiştir. Optimum konsantrasyon 1,4 mM olarak bulunmuştur. (Şekil 2.7)



Şekil 2. 7 pH 3,4'te sabit tutularak bulunan optimum konsantrasyon

Çalışmada optimum değerler deneysel tasarım ve optimizasyon yöntemi ile pH 4,4 ve katalizör konsantrasyonu 1,0 mM olarak bulunurken klasik yöntem ile yapılan çalışmalarda pH 3,4 ve konsantrasyon 1,4 mM olarak bulunmuştur. Değerler birbirinde çok farklıdır. Bu farkın nedeni, optimum değerlerin bulunmasında, deneysel tasarım yönteminde pH ve konsantrasyon arasındaki etkileşim göz önüne alınırken klasik yöntemde göz ardı edilmiş olmasıdır.

2.2.3 Tarama Tasarımları

Bu tasarımlar deneysel çalışmalarda sonucu etkileyen önemli faktörleri belirlemek için kullanılır. Tarama tasarımlarında, istatistiksel bir yaklaşımla öncelikle az sayıda seviye ile bütün faktörler sistematik olarak aynı anda değiştirilir. Bu değişimlerin deney sonuçlarına etkisi incelenir. Her bir faktörün etkisi için sayısal değerler elde edilir. Bu değerler doğrultusunda deney sonuçlarına gerçekten etki eden faktörler bulunur.

Tarama aşamasında en çok faktöriyel tasarım ve Plackett-Burman tasarımları kullanılır.

2.2.3.1 Faktöriyel Tasarım

Deneysel tasarımın en çok uygulanan şeklidir. Bu tasarımla deneyi etkileyen faktörlerin iki ya da daha fazla seviyesinde cevap üzerindeki etkileri incelenir. Faktöriyel tasarım tam faktöriyel ve fraksiyonlu faktöriyel tasarım olarak 2'ye ayrılır.

2.2.3.1.1 Tam Faktöriyel Tasarım

Tam faktöriyel tasarım sonuç üzerine etki eden faktörlerin hangileri ve ne kadar etkili olduğunu anlamada kullanılan iki seviyeli bir tarama tasarımıdır.

Bu tasarımda deney sayısı 2^k formülü ile hesaplanır. Bir kimyasal reaksiyon pH ve sıcaklığa bağlı olarak değişiyorsa, iki seviyeli iki faktörlü bir deney tasarlanabilir. Burada 2, seviye sayısı (-1 ve +1 olarak kodlanır), k ise faktör sayısıdır. 2 faktör için deney sayısı 4 (2^2), 3 faktör için deney sayısı 8'dir (2^3). Tam faktöriyel tasarım tablosu aşağıdaki şekilde oluşturulur.

1. Her bir faktör için yüksek ve düşük seviyeler belirlenir. Örneğin sıcaklık 30^oC ve 60^oC, pH 4 ve 6.

2. Yüksek (+1) ve düşük (-1) seviyelere göre tasarım tablosu oluşturulur.

3. Kodlanmış değerler yerine faktörlerin gerçek değerleri yerleştirilerek deneysel çalışma gerçekleştirilir.

4. Etkileşimler de dikkate alınarak tasarım matrisi analiz edilir.

Örnek olarak 3 faktörlü (X_1, X_2, X_3) bir deneyde faktör seviyelerinin 2x2x2=8 adet mümkün kombinasyonları Çizelge 2.15 de gösterilmiştir. Her sütundaki (+) işareti faktörün yüksek seviyedeki değerini (-) işareti ise faktörün düşük seviyedeki değerini gösterir.

Çizelge 2. 15 3 faktör için tam faktöriyel tasarım

Deney sayısı	X_1	X_2	X_3	Cevap
1	-	-	-	y_1
2	+	-	-	y_2
3	-	+	-	y_3
4	+	+	-	y_4
5	-	-	+	y_5
6	+	-	+	y_6
7	-	+	+	y_7
8	+	+	+	y_8

Faktörlerin etkisini belirlemek için aşağıda verilen doğrusal denklemdeki b katsayıları hesaplanır.

$y=b\,X$

Burada b katsayısı;

$b=(X'X)^{-1}X'y$

formülünden hesaplanır. b katsayıları doğru denkleminde yerine konulur.

$y= b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3$

2.2.3.1.2 Fraksiyonel Faktöriyel Tasarım

Tam faktöriyel tasarımda her bir faktörün ve etkileşimlerinin deney sonucuna etkileri incelenir. 2^k formülüne göre 7 faktör için 128 deney, 10 faktör için 1024 deney yapılması gerekir. Burada görüldüğü gibi faktör sayısı artıkça deney sayısı da çok fazla arttığı için bu yöntem pratik olmamaktadır. Birçok durumda faktörler arasındaki ikili, üçlü ve daha yüksek etkileşimler çok önemli olmayabilir. Bu durumda örneğin 7 faktör için 128'den daha az deney yaparak faktörlerin etkileri incelenebilir. Gereğinden fazla olan bu deney sayısı tam faktöriyel tasarımın 1/2'si, 1/4'ü, 1/8'i vs. şeklinde alınarak azaltılabilir. Bu tasarımlar fraksiyonlu faktöriyel tasarım olarak adlandırılmaktadır. Fraksiyonlu faktöriyel tasarımda deney sayısı 2^{k-p} formülünden hesaplanır. Deney sayısı p sayısı kadar bir azalma gösterir. Örneğin p=1 için tasarım yarı fraksiyonlu tasarım adını alır. Çizelge 2.16'de 2 seviyeli 5 faktörlü fraksiyonlu faktöriyel tasarım (2^{5-1}) görülmektedir.

Çizelge 2. 16 5 faktör için fraksiyonlu faktöriyel tasarım

Deney sayısı	**Faktörler** X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	**Cevap**
1	-	-	-	-	+	y_1
2	+	-	-	-	-	y_2
3	-	+	-	-	-	y_3
4	+	+	-	-	+	y_4
5	-	-	+	-	-	y_5
6	+	-	+	-	+	y_6
7	-	+	+	-	+	y_7
8	+	+	+	-	-	y_8
9	-	-	-	+	-	y_9
10	+	-	-	+	+	y_{10}
11	-	+	-	+	+	y_{11}
12	+	+	-	+	-	y_{12}
13	-	-	+	+	+	y_{13}
14	+	-	+	+	-	y_{14}
15	-	+	+	+	-	y_{15}
16	+	+	+	+	+	y_{16}

Fraksiyonel faktöriyel tasarımda deney sayısı azaltılırken bazı faktörler arası etkileşimler incelenemez. Belirlenen amaca göre tam faktöriyel veya fraksiyonel faktöriyel tasarım kullanılmalıdır. Fraksiyonel faktöriyel tasarımın birçok avantajları olmakla beraber bazı eksiklikleri de vardır;

1. Deneysel tasarım sadece iki seviyeli olduğu için parabolik terimler incelenememektedir.
2. Tekrar edilen deneyler olmadığı için hata hesabı yapılamamaktadır.
3. Deneysel tasarım sadece ikinin katları şeklindedir.

2.2.3.2 Plackett-Burman Tasarımı

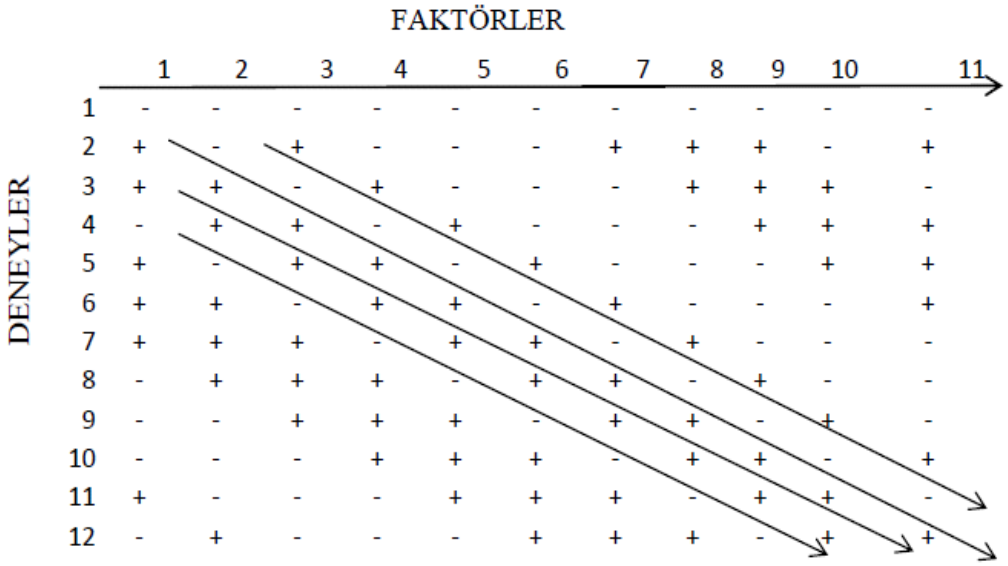
Çok sayıda faktörün etkisi incelenmek istendiğinde tam faktöriyel ve fraksiyonel faktöriyel tasarım yöntemlerin pratik olarak uygulanması zorlaşmaktadır. Sadece faktörlerin kendi etkileri incelendiğinde, yani faktörler arasındaki etkileşimlerin önemli olmadığı durumlarda Plackett-Burman tasarımı pratik olarak uygulanabilir. Bu tasarımda geçerli olan deney sayısı, faktör sayısı ve üretici Çizelge 2.17'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. 17 Plackett-Burman tasarımı için üreticiler

Deney Sayısı	**Faktörler**	**Üretici**
8	7	+ + + - + - -
12	11	+ + - + + + - - - + -
16	15	+ + + + - +- ++- - + - - -
20	19	+ + - + + + + - + - + - - - - + + -
24	23	+ + + + + - + - + + - - + + - - + - + - - - -

11 faktör ve 12 deneyi içeren Plackett Burman tasarımı Çizelge 2.18'de gösterilmektedir.

Çizelge 2. 18 11 Faktör için Plackett-Burman tasarımı



Bu tasarımın bazı özellikleri vardır.

- Birinci satır aynı seviyeye sahiptir(-1 veya +1).
- İkinci satır üretici satırdır. Çizelge 2.17'deki üreticilerden birisi kullanılır. Faktör sayısı her zaman tek sayı ve deney sayısı faktör sayısından bir fazladır.
- Üçüncü satırın ikinci satırın bir yana kaydırılması ile elde edilir (Çizelge 2.18).
- Bütün faktörler için yüksek ve düşük seviye sayısı eşittir. Bu da kolonların birbiri ile ortagonal (kolonlar birbirinden bağımsız) olduğunu gösterir.

Plackett Burman tasarımda faktör sayısı deney sayısından bir düşüktür 11 faktör için 12 deney yapmak gerekir. Ancak gerçekte 10 faktör var ise 11. faktör sonuç üzerinde herhangi bir etkisi olmayan rastgele bir faktör seçilir. Bu faktöre dummy faktör denilir. Tasarım tablosuna kesim noktası (b_0) ilave edildiğinde kare matris elde edilir. Bu durumda b katsayıları aşağıdaki gibi hesaplanabilir.

$b = D^{-1}y$

Tasarım tablosunda kodlanmış değerler kullanıldığında b katsayıları her bir kolon ölçülen değerlerle (y) çarpıldıktan sonra deney sayısına bölünerek de hesaplanabilir.

$$b_j = \sum_{i=1}^{N} X_{ij}\, y_i \frac{1}{N}$$

2.2.4 Optimizasyon Tasarımları

Tarama tasarımları 2 seviye ile her bir faktörün etkilerini genel olarak inceleyen yöntemlerdir. Tekrarlanan deney sayısı ve parabolik etkileri incelemez. Bazı durumlarda faktörler arasındaki etkileşimleri incelemek mümkün değildir. Bu nedenle bu tasarımlar ile önemli faktörler belirlendikten sonra detaylı inceleme yani optimizasyon yapılır. İki nedenle optimizasyona ihtiyaç vardır. Birincisi, deneysel sonucu etkileyen faktörlerin optimum değerlerini bulmaktır. Örneğin, organik sentezde maksimum verimi etkileyen faktörlerin veya kromatografik ayırmada ayırma gücünü etkileyen faktörlerin optimizasyonu gibi. İkinci neden ise, her bir faktörün sonuca etkisini gösteren matematiksel modelin oluşturulmasıdır. Örneğin, bir ürünün FTIR spektrumu ile ürünün özelliği ve üretim prosesi arasındaki ilişki kurulmasına ihtiyaç duyulabilir. Optimizasyon tasarımlarında sadece, tarama tasarımı ile bulunan etkili faktörlerin sonuca etkisi incelenir. Bu aşamada daha fazla seviye ile çalışılır. Tekrarlanan deney sayısı, parabolik etkiler ve faktörler arasındaki etkileşimler hesaplanır.

En yaygın kullanılan optimizasyon tasarımları merkezi kompozit tasarım, Box-Behnken Tasarımı, Doehlert Tasarımı ve D-optimal Tasarımı'dır.

2.2.4.1 Merkezi Kompozit Tasarım

Merkezi kompozit tasarımda deney sayısı aşağıdaki formüle göre belirlenir.

Deney sayısı $=2^{k} + 2k + 1$ (k: faktör sayısı)

Formüldeki 2^{k} tam faktöriyel veya fraksiyonlu faktöriyel tasarımdaki deney sayılarını, 2k star tasarım deney sayısını ve 1 ise orta seviyedeki deney sayısını gösterir. 2^{k}'daki seviyeler (-1) ve (+1), 2k'dakiler ±α ,1'deki ise (0) dır. α değeri dairesel ve ortagonal tasarıma göre farklı seviyeler alır. α Dairesel tasarımda $\pm\sqrt[4]{2^{k}}$, ortagonal tasarımda ise $\pm\sqrt{k}$ formüle göre hesaplanır. 3 faktör için Merkezi Kompozit tasarımı örneği Çizelge 2.19'da verilmiştir.

Çizelge 2. 19 3 faktör için merkezi kompozit tasarımı

Deney Sayısı	Faktörler		
	X_1	X_2	X_3
1	0	0	0
2	-1	0	0
3	+1	0	0
4	0	-1	0
5	0	+1	-1
6	0	0	+1
7	0	0	-0,5
8	-0,5	-0,5	-0,5
9	-0,5	+0,5	-0,5
10	0,5	+0,5	-0,5
11	0,5	-0,5	0,5
12	-0,5	-0,5	0,5
13	-0,5	+0,5	0,5
14	0,5	+0,5	0,5
15	0,5	-0,5	0,5

2.2.4.2 Box-Behnken Tasarımı

Box-Behnken tasarımı üç ya da daha fazla seviyeye sahiptir ve üç ya da daha fazla faktöre sahip problemlere uygulanabilir. Faktöriyel veya ekstremum noktaları yoktur. Bu tasarım (2k(k-1))+nc sayıda noktadan oluşur. Bu sayı merkez kompozit tasarıma göre daha az, üç faktör için ise Doehlert tasarım ile aynıdır. Box-Behnken tasarımı, optimum değerin faktör aralığı ortasında olduğu bilinen, ikiden daha fazla faktörün bulunduğu sistemlerde önerilir. 3 faktör için Box-Behnken tasarımı örneği Çizelge 2.20'de verilmiştir.

Çizelge 2. 20 3 Faktör için Box-Behnken tasarımı

Deney Sayısı	Faktörler		
	A	B	C
1	-1	-1	0
2	+1	-1	0
3	-1	+1	0
4	+1	+1	0
5	-1	0	-1
6	+1	0	-1
7	-1	0	+1
8	+1	0	+1
9	0	-1	-1
10	0	+1	-1
11	0	-1	+1
12	0	+1	+1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

2.2.4.3 Doehlert Tasarımı

Doehlert tasarımları, merkez kompozit ve Box-Behnken dizaynları gibi döndürülebilir değildir örneğin, farklı faktörler için farklı tahmin nitelikleri verebilir. Ancak çok kullanışlı olup farklı faktörler için farklı seviye sayıları vardır. Böylece, önemli faktörler daha fazla seviyelerde ölçülebilir. Bu tasarım verilen faktör boşluğunu mümkün olduğunca düzgün olarak doldurmaya çalışır. Bir Doehlert tasarımı k^2+k+nc noktadan oluşur. 3 faktör için Doehlert tasarımı örneği Çizelge 2.21'de verilmiştir.

Çizelge 2. 21 3 Faktör için Doehlert tasarımı

Deney Sayısı	Faktörler A	B	C
1	0	0	0
2	1	0	0
3	0,5	0,866	0
4	0,5	0,289	0,817
5	-1	0	0
6	-0,5	-0,866	0
7	-0,5	-0,289	-0,817
8	0,5	0,866	0
9	0,5	0,289	-0,817
10	-0,5	0,866	0
11	0	0,577	-0,817
12	-0,5	0,289	0,817
13	0	-0,577	0,817

2.2.4.4 D-optimal Tasarım

D-optimal tasarımlar, çözücü bileşimi ve çözünen konsantrasyonlarının kombinasyonlarının uygun olmaması gibi faktör alanı düzgün bir şekilde elde edilebilir olmadığında tercih edilir. Bir başka kullanışlı yanı ise deney sayısı belirlenebilir. Bu sayı modeldeki etkilerin katsayılarını hesaplamak için minimum olmalıdır (etkilerin sayısı + terim sabiti). D-Optimal çözüm, toplam sayıdan tasarım noktalarını seçerek noktaların optimal dağılımı nedir sorusunu cevaplar. Bu, X XT determinantının maksimize edilmesiyle gösterilebilir (X tasarım noktalarının matrisi, T transpoze). Minimum bir tasarım analiz edildiğinde, aynı prensiple sistem hakkındaki bilgiyi belirginleştirmek için daha fazla nokta eklenebilir.

2.2.5 Varyans Analizi

Varyans analizi, ikiden fazla popülasyonun ortalamaları arasında anlamlı fark olup olmadığını, anlamlı bir fark varsa hangi spesifik popülasyon ortalamasının diğerlerinden farklı olduğunu bulmak için kullanılan istatistiksel bir işlemdir. Ve kısaca ANOVA olarak bilinir. Deneysel tasarım yöntemlerinde de ANOVA'nın avantajlarından yararlanır. ANOVA tarama tasarımlarında ve optimizasyonda farklı amaçla kullanılır. Tarama tasarımlarında, faktörlerin etkileri sayısal olarak hesaplanır. Bu sayısal değerler ANOVA ile incelenerek değerlerin anlamlı olup olamadığı yani faktörün deney sonucunda etkili olup olmadığına karar verilir. Optimizasyonda ise ANOVA ile modelleme sonucu elde edilen teorik sonuçlarla, deneysel sonuçlar arasında anlamlı fark olup olmadığı belirlenir. Böylelikle oluşturulan modelin güvenilirliği test edilir.

2.2.6 Faktöriyel Tasarımın Analitik Kimyada Uygulamaları

Analitik Kimyada çeşitli yöntemlerle yapılan analizlerde analiz sonuçlarını etkileyen faktörlerin belirlenmesi ve optimum değerlerinin bulunması amacı ile deneysel tasarımdan yararlanılmaktadır. Deneysel tasarıma en çok başvurulan yöntemler atomik spektroskopi, kromatografi ve elektroforezdir. Çizelge 2.22'de atomik spektroskopi, Çizelge 2.23'de kromatografi, Çizelge 2.24'da elektroforez ile yapılan analizlerde kullanılan deneysel tasarım yöntemleri verilmiştir. Ayrıca literatür araştırmalarında UV-VIS spektroskopi [164], [165], yakın IR [166], Floresans spektroskopi [167] ve elektroanalitik yöntemlerle [168], [169] analizlerde de deneysel tasarım uygulanmasına rastlanmıştır. Deneysel tasarım, geliştirilen analitik yöntemlerin geçerliliğini kontrol etmek amacı ile yapılan validasyon çalışmalarında da tutarlılık parametresinin incelmesinde kullanılmaktadır. Çizelge 2.25'de HPLC ile yapılan analizlerde validasyon aşamasında kullanılan deneysel tasarım yöntemleri verilmiştir.

Çizelge 2. 22 Atomik spektroskopide deneysel tasarımın uygulandığı çalışmalar

Analit	**Örnek**	**Analiz Yöntemi**	**Deneysel Tasarım**	**Kaynak**
Cr, Cu, Ni, Zn	Su	ICP-OES	Fraksiyonel faktöriyel Merkezi kompozit	[170]
Pt	Plastik	AAS	Plackett-Burman Merkezi kompozit	[171]
Rutenyum		AAS	Tam Faktöriyel	[172]
Cu	Yağ	AAS	Fraksiyonel faktöriyel Merkezi kompozit	[173]
Mn (II)	Yüzey ve deniz suyu, biyolojik örnek	FAAS	2^4 Tam Faktöriyel Doehlert	[173]
Hg	Su örnekleri	CVAAS	Plackett-Burman	[174]
V (II), Cu (II)	Deniz suyu	ICP-OES	2^4 Tam Faktöriyel Doehlert	[175]
Pb (II)	Musluk suyu, toprak, siyah çay, evsel atık	FAAS	2^3 Tam Faktöriyel	[176]
Cu (II)	Alkolsüz içecek	FAAS	2^{4-1} Fraksiyonlu faktöriyel	[177]
Cu (II)	Çeşitli su örnekleri	FAAS	2^3 Tam Faktöriyel Doehlert	[178]
Pt (IV)	Musluk suyu	ICP-OES	2^3 Tam Faktöriyel	[179]
Cu (II)	Musluk ve nehir suyu	FAAS	2^{5-1} Fraksiyonlu faktöriyel	[180]
Zn (II)	Su örnekleri yapraklar, pirinç unu	FAAS	2^3 Tam Faktöriyel Doehlert	[181]
Cu (II)	Doğal yiyecekler, çeşitli unlar, Yapraklar	FAAS	Doehlert	[182]
Zn (II)	Biyolojik örnekler	FAAS	2^4 Tam Faktöriyel Doehlert	[183]
Fe (III)	Su örnekleri	GF-AAS	Doehlert	[184]
Cu (II), Fe (II) Mn (II), Ni (II)	İdrar	FAAS	Plackett-Burman Merkezi kompozit	[185]
Al (III)	Çeşitli su örnekleri	GF-AAS	Doehlert	[186]
Cd (II)	İçme suyu	FAAS	2^4 Tam Faktöriyel Doehlert	[187]
Pb (II)	Çeşitli su örnekleri	ICP-AES	2^5 Tam Faktöriyel Box-Behnken	[188]

Çizelge 2. 23 Kromatografik analizlerde deneysel tasarımın uygulandığı çalışmalar

Analit	**Örnek**	**Analiz Yöntemi**	**Deneysel Tasarım**	**Kaynak**
Akrilamid	Kahve	LC-MS	Merkezi kompozit	[189]
-	Hava	GC-DMS	Tam faktöriyel	[190]
PAH	Hava	GC×GC–MS	Merkezi kompozit	[191]
Kalıntı	İlaç	GC-FID SPME	Tam faktöriyel	[192]
Estrojenik bileşikler	Çevresel örnekler	GC–MS	Merkezi kompozit	[193]
Polisiklik aromatik hidrokarbonlar	Süt	GC–MS	Merkezi kompozit	[194]
Uyuşturucu	İdrar	GC–MS	Tam faktöriyel Merkezi kompozit	[195]
-	Farklı polaritelerde örnekler	GC–MS	Tam faktöriyel	[196]
Bakım ürünleri	Su	GC–MS SPME	Merkezi kompozit	[197]
Pestisit	Su	GC–MS SPME	Fraksiyonel faktöriyel	[198]
Organik kirleticiler	Su	GC–MS	Tam faktöriyel	[199]
Bozunma ürünleri	Kan	GC–MS	Tam faktöriyel Merkezi kompozit	[200]
Paraben	Toz	GC–MS	Merkezi kompozit	[201]
Polihalojenlenmiş bileşikler	Biyolojik sıvı	GC–MS/MS	Plackett-Burman Merkezi kompozit	[202]
Biyojenik amin ve bozunma ürünleri	Fare beyini	HPLC-amperometri	Fraksiyonel faktöriyel	[203]
-	İlaç	HPLC-DAD	Tam faktöriyel	[204]
Kanabinoit	Bitki	HPLC-DAD	Tam faktöriyel	[205]
Sulindak	İlaç	HPLC-DAD	Tam faktöriyel	[206]
Poliribosil-ribitol fosfat	Aşı	HPLC-amperometri	Merkezi kompozit	[207]
Tersiyer alkaloit	Bitki	HPLC-UV	Tam faktöriyel	[208]
Safsızlık	Pridinol mezilat	HPLC-UV	Tam faktöriyel	[209]
Organik asit	Endüstriyel atık	HPLC-UV	Merkezi kompozit	[210]
Sephalosporin	Plazma ve amniyotik sıvı	HPLC-UV	Tam faktöriyel	[211]
2-Arilimidazoline türevleri	-	HPLC-UV	Tam faktöriyel	[212]
Üre asitleri	-	Moleküler eleme, LC-UV	Merkezi kompozit	[213]
Selüloz türevleri	İlaç	LC-buharlaştırıcı ışık saçılımı	Tam faktöriyel	[214]
Estrojenik bileşikler	Bira	LC–MS	Tam faktöriyel	[215]
Kortizonlar	-	LC–MS semi preparatif	Tam faktöriyel	[216]
12 iyonik per ve poliflorin alkil bileşikleri	Hava	LC–MS/MS	Merkezi kompozit	[217]

Çizelge 2.23' ün devamı

Analit	Örnek	Analiz Yöntemi	Deneysel Tasarım	Kaynak
Sideroforlar	-	LC–MS/MS	Merkezi kompozit	[218]
Protein	İlaç	LC–MS/MS	Merkezi kompozit	[219]
Pestisit	Hava	Mikrodalga destekli ekstraksiyon,LC-MS/MS	Merkezi kompozit	[220]
Binafitil türevleri		Elektrokromatografi-MS	Merkezi kompozit	[221]
SPE flavonoidler	Bal	Elektrokromatografi MS	Tam faktöriyel	[222]
Sulfonamid kalıntıları	-	Moleküler eleme-LC	Tam faktöriyel	[223]
Doğal organik maddeler	-	Moleküler eleme-LC	Tam faktöriyel	[224]
	Kompleks organik karışımlar	Moleküler eleme-LC	Merkezi kompozit	[225]
Metoprolol	İlaç	Süperkritik akışkan	Tam faktöriyel	[226]
Asetil kolinesteraz		UHPLC	Merkezi kompozit	[227]
2,4,6-trikloroanisol	Şarap	GC-ECD	Box-Behnken	[228]
Benzen	Gıda	GC–IDMS	Fraksiyonel faktöriyel	[229]
Anabolik steroid		GC–MS	Doehlert	[230]
Metabolit	Kan	GC–MS	D-optimal	[200]
Non steroid antiflamatuvarlar	İlaç	GC–MS, SPME	D-optimal	[231]
-	Fare	GC–TOFMS	D-optimal	[232]
Sulindak	İlaç	HPLC-UV	Kompozit dizayn	[233]
Silika sentezi	-	HPLC-UV	Tam Faktöriyel	[234]
Organik bileşikler		HPLC-UV	D-optimal	[235]
İyonik bileşikler		HPLC-UV	D ve G-optimal	[236]
-	Çay	HPLC-UV	Karışık dizayn	[237]
Organik asit	-	Moleküler eleme LC-DAD	Kompozit dizayn	[238]
Salisilik asit, asetil salisilik asit, askorbik asit	İlaç	Moleküler eleme LC-DAD	Box-Behnken	[239]
Asit	-	LC-MS	Merkezi kompozit	[240]
Protein	Karaciğer	LC-MS/MS	Ortagonal diziliş	[241]
Geniposit ve genipin	-	LC-MS/MS	Fraksiyonel faktöriyel	[242]
Monolitik polimerler		LC-UV	D-optimal	[243]
Protein A	Sentetik antikor	Karışık mod kromatografisi	Box-Behnken	[244]
Sentetik polimer sentezi		Moleküler eleme MS	D-optimal	[245]

Çizelge 2. 24 Elektroforez ile analizlerde deneysel tasarımın uygulandığı çalışmalar

Analit	**Örnek**	**Deneysel Tasarım**	**Kaynak**
Etambutol hidroklorür	İlaç preparatı	Box–Behnken	[246]
Akonitin ve hipoksantin	Kurtboğan şifalı ot	Merkezi kompozit	[247]
Huperzine	Farmasötik ürün ve biyolojik sıvı	ANN	[248]
RS86017	Enantiyomerik saflığının tayini	Merkezi kompozit	[249]
Peptidlerin ayrılması	Siklodekstrinli ortam	Merkezi kompozit	[250]
β-bloker enantiyomerik ayrılması	-	Fraksiyonel Faktöriyel	[251]
Arbutin, kojik asit ve hidrokinon	Kozmetik	Tam faktöriyel	[252]
Antihistaminler	İlaç, idrar ve serum	Tam faktöriyel	[253]
Sığır kazeinlerin	-	Faktöriyel Merkezi kompozit	[254]
Glutatyon ve amino asit	İnsan kanı	Tam faktöriyel	[255]
Non-steroidlerin enantiyomerik ayrılması	Anti-inflamatuvar ilaç	Merkez kompozit	[256]
β-agonistlerin ayrılması,	-	Tam faktöriyel	[257]
H-Tyr-(d) Arg-Phe-Phe-NH_2 ve ilgili 9 bileşik	-	ANN	[258]
Çinko, sodyum, kalsiyum ve magnezyum	Su	Faktöriyel	[259]
Deksfenfluraminin enantiyomerik saflığının tayini	Anorektik ilaç	Plackett-Burman	[260]
Klorlanmış bileşikler	Balık	ANN	[261]
Kodein ve parasetamol	İlaç	Merkezi kompozit	[253]
Antihistaminik	İdrar	Merkezi kompozit	[262]
İmmunoglobilin	İnsan sıvısı	Fraksiyonel faktöriyel Merkezi kompozit	[263]
Klomifenin Z ve E izomerleri	-	Plackett-Burman	[264]
İbuprofen, kodein fosfat ve safsızlıkları	Analzejik ilaç	Fraksiyonel faktöriyel	[265]
Rufloksasin hidroklorür	Kaplamalı masalar	Plackett-Burman Doehlert	[266]
Pilokarpin ve bozunma ürünleri	-	Fraksiyonel faktöriyel	[267]
Tetraksilin klortetraksilin oksitetraksilin doksisiklin	İlaç	Faktöriyel Merkezi kompozit	[268]
Streptomisin oksitetrasiklin	Antimikrobiyaller antibiyotik	Merkezi kompozit	[269]

Çizelge 2. 24'ün devamı

Analit	Örnek	Deneysel Tasarım	Kaynak
Enalapril, lisinopril, quinapril, fosinopril, perindopril, ramipril, benazepril, cilazapril	İlaç	Tam faktöriyel	[270]
Gamma-aminobütirik asit	Biyolojik örnek	Plackett-Burman Merkezi kompozit	[271]
V-aminobütirik asit	Mikro diyalizat	Faktöriyel	[272]
Gluten	Buğday	Faktöriyel	[273]
C vitamini, B2 vitamini, flavanonlar hidroksisinnamik asit.	Nutrasötik	D-optimum	[274]
Glukosinolat	-	Doehlert	[275]
Sitalopramın enantiyomerik ayrılması	İlaç	Plackett–Burman Faktöriyel tasarım	[276]
Yağ asitleri	-	Tam faktöriyel	[277]
13 fenolik bileşik	Sızma zeytinyağı	Merkezi kompozit	[278]
Nörotransmitter amino asit	-	Merkezi kompozit	[279]

Çizelge 2. 25 HPLC ile analizlerde validasyon aşamasında kullanılan deneysel tasarımlar

Analit	Örnek	Analiz Yöntemi	Deneysel Tasarım	Kaynak
Safsızlık	Pridinol	UV	Fraksiyonel faktöriyel	[209]
(2S,3R)-2-amino-3-oktadekanol hidro-kloritin	İlaç	UV	Plackett-Burman	[280]
Protein	Biyolojik sıvı	Floresans	Plackett-Burman	[281]
Loksifoksifen	İlaç	UV	-	[282]
pregabalin, gabapentin ve vigabatrin	Biyolojik sıvı	Floresans	Plackett- Burman	[283]
Anti-epilektik ilaçlar	Biyolojik sıvı	DAD	Fraksiyonel faktöriyel	[284]
	İlaç	UV	Plackett-Burman	[285]

2.3 Validasyon [286]

2.3.1 Validasyonun Tanımı ve Önemi

Validasyon, ürün kalitesine etki edebilecek tüm imkan ve operasyonların önceden belirlenmiş spesifikasyonları sağlayacak şekilde işlendiğini garanti altına almak amacıyla yürütülen çalışmalardır. Her zaman aynı kalitede ve aynı şartlarda üretim yaparak, tüm üretilen ürünlerin kalitesinin aynı olmasını sağlamaktır.

Validasyonun GMP kuralları için yapılması gerekir. Validasyon, kaliteyi güvence altına alır, değişkenliği en aza indirger, iyi kontrol edilmiş, güvenilir prosesler oluşmasını sağlar, ekipman ve prosesler hakkında daha iyi bilgi sahibi olunmasını, bozuk çıkan malın imhası, yeniden işlem görmesi, yeniden örnek alınması, ekstradan analiz yapılması gibi olaylardan kaynaklı maliyeti azaltır, verimliliği arttırır ve organizasyon içindeki birimlerde koordinasyon, iletişim ve bilgi akışını arttırır.

Validasyon işlemi tüm ürünlerin kalite kontrollerine uygulanabilir. Ülkemizde validasyon işlemi genellikle ilaç sektöründe geniş uygulama alanı bulmaktadır.

2.3.2 Endüstride Validasyon Çeşitleri

Endüstride yapılan validasyonlar 4 ana başlık altında toplanır.

Temizlik işleri validasyonu, imalat alanında bulunan tüm imalatla ilgili ekipmanların temizlenmesi amacı ile yapılan çalışmalardır.

Analitik yöntem validasyonu, analitik prosedürün kalitatif ve kantitatif olarak doğru sonuçlar verdiğini belirleyen çalışmalardır.

Ekipman validasyonu, ekipmanın doğru bir şekilde çalışıp çalışmadığını, fonksiyonlarını doğru bir şekilde yerine getirip getirmediğini gözlemlemek amacı ile yapılan çalışmalardır.

Proses validasyonu, spesifik olarak bir ürünün araştırma kademesinden final ürün haline gelene kadar geçen sürede yapılan çalışmalardır.

2.3.3 Analitik Yöntem Validasyonu

2.3.3.1 Amaç

Analitik yöntem validasyonu, tasarlanmış analitik yöntemin kabul edilebilirliğini kanıtlamak ve analitik prosedürün kantitatif ve kalitatif olarak doğru sonuçlar verdiğini belirlemek amacıyla yapılır.

2.3.3.2 Analitik Yöntem Validasyon Parametreleri

Yöntem validasyonu için parametreler uluslararası komitelerce, ulusların farklı kuruluşları tarafından ve literatürde tanımlanmıştır. Fakat bazı tanımlar kurumlara göre farklılık gösterebilir. Validasyon parametrelerinin deney sırası hakkında resmi bir yönerge yoktur. Yöntemin özelliğine göre en uygun sıra oluşturulur. En çok kabul gören validasyon parametreleri ve sırası aşağıda verilmiştir.

1. Seçicilik - Spesifiklik
2. Stabilite
3. Doğrusallık
4. Çalışma aralığı
5. Doğruluk ve geri kazanabilirlik
6. Kesinlik(tekrarlanabilirlik)
    - Gün içi tekrarlanabilirlik
    - Günler arası tekrarlanabilirlik
    - Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik
7. Tutarlılık
8. Tanıma limiti(LOD)
9. Miktar tayini limiti(LOQ)
10. Güvenilirlik

Yöntem validasyonu için gerekli parametreler analizin amacına göre de farklılık gösterir. Analizler genel olarak 3 amaçla yapılır.

1. Hammadde veya bitmiş ürün içindeki aktif maddenin tayini
2. Hammaddede ki safsızlıkların veya bitmiş üründeki parçalanma ürünlerinin tayini
3. Ürünün performans özelliklerinin tayini

Çizelge 2.26'da analiz amacına göre değişen parametreler gösterilmektedir:

Çizelge 2. 26 Analiz amacına göre değişen parametreler

Parametreler	**1**	**2**	**3**
Seçicilik	+	+ +	-
Doğrusallık	+	+ -	+
Çalışma aralığı	+	+ *	*
Doğruluk ve geri kazanım	+	+ -	*
Kesinlik	+	+ *	+
Tutarlılık	+	+ +	+
Tanıma limiti	+	+ +	*
Miktar tayin limiti	+	+ +	*
Güvenirlilik	+	+ +	+

(*): Spesifik testlere bağlı olarak gerekirse yapılır.

2.3.3.2.1 Seçicilik/Spesifiklik

Spesifiklik, genellikle bir tek analit için üretilen yönteme karşılıktır. Seçicilik ise birbirinden ayırt edilen ya da edilemeyen kimyasal içerikler için kullanılmıştır. Kısacası; girişim yapan maddeler varlığında analitin doğru olarak ölçebilirliğini ifade eder. Likit kromatografisinde seçicilik, optimum ayırma ve kolon koşullarının seçimiyle elde edilmiştir. Seçiciliğin üstünlüğü, kullanılan analiz yönteminde sadece o etken maddeye özgün ve spesifik olduğunu ifade etmesidir. Bizim yöntemimiz sadece etken maddeyi ölçebilmeli ve diğerleri ile reaksiyon vermemelidir.

2.3.3.2.2 Stabilite

Etken madde ile maddenin parçalandıktan sonra meydana gelen parçalanma ürünlerinin ve miktarlarının birbirinden bağımsız olarak ayrı ayrı tespit edebilme özelliğidir.

2.3.3.2.3 Doğrusallık

Doğrusallık, yöntemin verilen bir alanda örnek içindeki analitin konsantrasyonu ile cihaz sinyali arasındaki ilişki olarak ifade edilir. Analit konsantrasyonun %25-150'si olacak şekilde en az 5 farklı konsantrasyonda çözeltiler hazırlanır ve cihaza verilir. Konsantrasyonla cihaz cevabı arasında grafik çizilerek regresyon analizi yapılır. Hesaplanan korelasyon katsayısı değeri doğrusallık hakkında bilgi edinmemizi sağlar. Bu değer 0,997'den büyük veya eşit olmalıdır.

2.3.3.2.4 Çalışma Aralığı

Bir analitik yöntemin çalışma aralığı; kesinlik, doğruluk ve doğrusallık belirlenirken üst ve alt aralıklarıdır. Örneğin analiz konsantrasyonu yöntemin çalışma aralıklarını belirler. ICH'ye göre analiz konsantrasyonu:

Kimyasal analizlerde : %80-%120

Safsızlık analizlerinde : %50-%120 olmalıdır.

2.3.3.2.5 Doğruluk

Doğruluk, yöntem ile elde edilen test sonuçlarının gerçek değerle uygunluğunun bir ölçüsüdür. Doğruluk değerlendirilmesi birçok yolla elde edilebilir:

I. Referans yöntemi ile örnek yönteminin karşılaştırılması yapılabilir. Bu yaklaşımda referans yönteminin belirsizliği bilinmektedir.

II. Konsantrasyonları bilinen bir örneğin analizi ile tayin edilebilir. Bir sertifikalı örnek ve ölçülmüş doğru değer kıyaslanır.

% geri kazanım bulunan sonuçların gerçek değere yakınlığının ölçülmesidir. Elimizde sertifikalı örnek bulunmuyorsa boş deneme çözeltisine konsantrasyonu bilinen hacimde ve ağırlıkta analit eklenir. Sonra matriksten, analitin ekstraksiyonu sonucu elde edilen analitin standart çözeltilere göre % geri kazanımları hesaplanır. Bu sayede boş deneme çözeltisine ilave edilen etken maddenin tam olarak geri kazanıp kazanılmadığı anlaşılır. Elde edilen geri kazanım değerleri $\%100 \pm 3$ limitleri içinde olmalıdır. Ama analit konsantrasyonu çok düşük olduğu zaman bu sınır genişler. Beklenen geri kazanım örnek matriksine ve analit konsantrasyonuna bağlıdır.

2.3.3.2.6 Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)

Bir yöntemin kesinliği birkaç kez enjeksiyon yapıldığında sonuçların birbirine uygunluk derecesidir. Yani homojen bir karışımdan, birden fazla örnek alındığında elde edilen sonuçların birbiriyle uyumlu olmasıdır. Bir yöntemin kesinliği genellikle test sonuçlarının % RSD (bağıl standart sapma) değeri ile ölçülür. Kesinlik için kabul edilebilirlik sınırı yapılan analizin türüne bağlıdır. İlaç analizlerinde kabul edilebilirlik sınırı %2'nin altında iken, çevre ve gıda analizlerinde matrikse, analit konsantrasyonuna ve analiz tekniklerine bağlı olarak %2 ile %20 arasında değişmektedir.

Tekrarlanabilirlik gün içi, günler arası ve laboratuvarlar arası olmak üzere 3 kategoride incelenir.

2.3.3.2.6.1 Gün İçi Tekrarlanabilirlik

Bir analistin laboratuvarda bir ekipman ile kısa zamanda analizi gerçekleştirdiğinde elde edilen sonuçların tutarlılığıdır. 2 ya da 3 farklı konsantrasyonda aynı standartlar kullanılarak hazırlanan çözeltiler, aynı gün içerisinde, aynı cihazlarla, aynı analist tarafından 3 ya da 4 kez analiz edilir ve % RSD hesaplanır.

2.3.3.2.6.2 Günler Arası Tekrarlanabilirlik

Aynı laboratuarda farklı günlerde elde edilen sonuçların birbiri ile tutarlılığıdır. 2 ya da 3 farklı konsantrasyonda farklı standartlar kullanılarak hazırlanan çözeltiler, farklı günlerde, aynı cihazlarla, aynı analist tarafından 3 ya da 4 kez analiz edilir ve % RSD hesaplanır.

2.3.3.2.6.3 Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirlik

Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik, farklı laboratuvarlardan elde edilen sonuçların birbiri ile tutarlılığıdır. Farklı laboratuvarlarda, farklı analistlerle ve farklı işlevsel, çevresel şartlar altında ama aynı yöntem ile analiz tekrarlanır. Eğer yöntem farklı laboratuvarlarda kullanılacaksa bu validasyon parametresi önemlidir. Bir yöntemin laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliğini, oda içindeki sıcaklık ve nem farklılıkları, farklı tecrübe ve farklı gayretteki analistler, farklı özellikteki donanım, malzeme ve aletlerdeki koşulların varyasyonları, farklı şirketlerin kolonları, çözücüler, belirteçler ve farklı kalitedeki aletler etkiler.

2.3.3.2.7 Tutarlılık

Bir analiz yönteminin tutarlılığı, aynı analiz örneğinin uzun zaman aralıklarında farklı koşullarda analizi yapıldığında bu değişikliklerden etkilenip etkilenmemesinin bir ölçüsü olarak tanımlanmıştır. Yani normal koşullarda farklı kişiler veya farklı laboratuvarda elde edilen sonuçların ölçülmesidir.

2.3.3.2.8 Miktar Tayini Limiti ve Tanıma Limiti

2.3.3.2.8.1 Tanıma Limiti (LOD)

Bir maddenin % 95 ya da % 99 güvenirlilik sınırı içinde teşhis edilebildiği minimum miktarı olarak tanımlanmıştır. Genellikle bu seviyelerde güvenilir kantitatif sonuçlar elde edilemez.

2.3.3.2.8.2 Miktar Tayin Limiti (LOQ)

Bir maddenin % 95 ya da % 99 güvenirlik sınırı içinde tayin edilebilen minimum miktarı olarak tanımlanır. Bu miktar analiz koşullarında, kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk değerlerine sahip tayin edilebilecek en düşük konsantrasyondaki madde miktarıdır. Bu parametre özellikle hammadde veya bitmiş üründeki safsızlık, parçalanma ürünü gibi düşük miktardaki maddelerin analizinde önem taşımaktadır.

2.3.3.2.9 Güvenilirlik

Güvenilirlik testleri, yöntemde ufak değişiklikler yapıldığı zaman sonuçların yine de uygun olduğunu göstermek için yapılır. Örneğin sıvı kromatografisinde akış hızı, dedektör, dalga boyu veya hareketli faz bileşiminin gerçek değerinden toleranslar ölçüsünde sapması sonucu analizlerin bu sapmalardan etkilenip etkilenmediği tespit edilir.

2.3.4 Validasyon İle İlgili Bazı Örnekler

Yapılan araştırmalarda çeşitli endüstrilerde uygulanan çok sayıda validasyon çalışmalarına rastlanmıştır. Bu tezin konusu olan gıda katkı maddelerinin HPLC ile analizinde yapılmış validasyon çalışmaları Çizelge 2.27'de verilmiştir.

Örnek	Analit	Hareketli Faz	Kolon	Dedektör	Parametreler	Kaynak
Sosis, jambon	Potasyum sorbat, sodyum benzoat, parafin, sodyum sakarin	0,02M metanol, amonyum asetat (pH 6)	C18	DAD	LOD, LOQ, doğrusallık, doğruluk, kesinlik	[63]
Besin takviyesi	Kondroitin sülfat	50mM, 1,2 M sodyum klorür (pH 4)	İyon değiştirici	UV	LOD, LOQ, doğrusallık, kesinlik, doğruluk.	[287]
Besin takviyesi	Kondroitin sülfat	125 mM sodyum sülfat, 2 mM sodyum fosfat (pH 6)	Moleküler elek	UV	Stabilite, spesifiklik	[287]
Diyet ürünleri	Aspartam, sakarin	0,08 M trietanol amin, fosfat tamponu (pH 3), metanol, tetrahidrofuran	C18	UV	Doğrusallık, LOD, LOQ	[288]
Alkolsüz içecek, reçel	Sakarin, asesülfam-k, sodyum benzoat, sorbik asit	Metanol, fosfat tamponu (pH 6,7)	C18	UV	Doğrusallık, LOD, LOQ	[16]
Alkolsüz içecek	Asesülfam-k, aspartam, sakarin, tartrazin, sunset sarısı, ponso 4r, sorbik asit, sodyum benzoat	Metanol, fosfat tamponu (pH 4)	C18	UV	Doğrusallık, LOD, LOQ	[17]
Kola, toz içecek	Asesülfam-k, aspartam, sakarin, vanilya, sorbik asit, sodyum benzoat	Asetonitril, amonyum asetat tamponu (pH 4)	C18	UV	Doğrusallık, LOD, LOQ	[19]
Çeşitli gıdalar	Aspartam, alitame, neohesparidin	Asetonitril, fosfat tamponu (pH 4)	C18	UV	Doğrusallık, LOD, LOQ	[289]
Çeşitli gıdalar	Asesülfam-k, sakarin, siklohekzanon, aspartam, sukraloz, dulkin, steviol	Dibütil amonyum asetat tamponu, asetonitril, su	C18	ESI-MS	Doğrusallık, LOD, LOQ	[290]

Çizelge 2.27'nin devamı

Örnek	Analit	Hareketli Faz	Kolon	Dedektör	Parametreler	Kaynak
Gazsız ve alkolsüz içecekler, konserve meyve ve yoğurt	Asesülfam-k, sakarin, siklohekzanon, aspartam, sukraloz, dulkin, alitame, neohesparidin	Trietanol amin format tamponu, metanol, aseton	C18, C8	ELSD	Doğrusallık, LOD, LOQ	[36]
Meşrubat, konserve meyve, kek	Asesülfam-k, sakarin, siklohekzanon, aspartam, sukraloz, alitame, neohesparidin, steviol	Trietanol amin format tamponu, metanol, aseton	C18	ESI-MS	Doğrusallık, LOD, LOQ	[37]
Alkolsüz içecek	Tartrazin, kinolin sarısı, sunset sarısı, karmosin, ponso 4r	Metanol, 40mM amonyum asetat (pH5)	C18	UV	LOD, LOQ, doğrusallık, kesinlik	[29]
Reçel, alkolsüz meyve aromalı içecek	Tartrazin, kinolin sarısı, sunset sarısı, karmosin, amarant, ponso 4r, eritrosin, allura kırmızısı, patent mavisi, indigotin, brilliant mavisi, yeşil	Asetonitril, %1'lik amonyum asetat (pH 7,5), metanol	C18	UV-DAD	LOD, LOQ , % geri kazanım, doğruluk, kesinlik	[30]
Alkolsüz içecek, jöle tozu, katı meyve tozu	Tartrazin, sunset sarısı, amarant, allura kırmızısı brilliant mavisi	Metanol, 0,08 M sodyum asetat 0,005M EDTA, 0,03M sodyum asetat (pH 3,5)	C18	UV-DAD	Doğrusallık, LOD, LOQ	[291]

Çizelge 2.27'nin devamı

Örnek	Analit	Hareketli Faz	Kolon	Dedektör	Parametreler	Kaynak
Meyve suyu, jelatin	Tartrazin, sunset sarısı, brilliant mavisi	%0,25 Triton X-100 sulu çözeltisi, 50mM fosfat tamponu (pH 7)	C18	UV-DAD	LOD, LOQ	[31]
İçecek, şekerleme	40 adet gıda boyası	0,1M amonyum asetat (pH 6,7), asetonitril, metanol	XDB-C18	UV-DAD	LOD, LOQ, %geri kazanım, doğrusallık	[32]
Reçel, alkolsüz içecek, tuzlanmış sebze	Tartrazin, sunset sarısı, amarant, ponso 4r, allura kırmızısı,	Trietilamin, asetik asit (pH 6,2), metanol	C18	UV-DAD	LOD, %geri kazanım, doğrusallık	[112]
Zencefil, biber,acı baharatlar	Tartrazin ,sunset sarısı, amarant, ponso 4r	Trietilamin, asetik asit (pH 6,2), metanol	C18	UV-DAD	LOD, LOQ, seçicilik, doğruluk, doğrusallık, kesinlik	[33]
Bisküvi, salatalık turşusu, ayran	Potasyum sorbat, sodyum benzoat	Asetonitril, amonyum asetat tamponu (pH 4,2)	C18	UV	Doğruluk, kesinlik, doğrusallık	[18]
Gıda ürünleri	Sodyum benzoat, potasyum sorbat	Asetonitril, 50mM alfa-hidroksibütirik asit (pH 4,5)	C18	UV	LOD, LOQ	[18]
Alkolsüz içecekler	Potasyum sorbat, sodyum benzoat	Su, asetonitril, 0,025 M fosfat tamponu (pH 2,0)	C18	DAD	LOD, LOQ, seçicilik, doğruluk, doğrusallık, kesinlik, stabilite	[64]

BÖLÜM 3

DENEYSEL BÖLÜM

3.1 Kullanılan Maddeler

Potasyum sorbat, sodyum benzoat, kinolin sarısı, sunset sarısı, asetik asit, sodyum asetat, HPLC saflıkta asetonitril ve metanol (Merck), ultra saf su, çeşitli limon sosu ve içecekleri.

3.2 Çözeltiler

Stok sodyum benzoat çözeltisi (500 μg mL^{-1}): 0,05 g sodyum benzoat suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

Stok potasyum sorbat çözeltisi (500 μg mL^{-1}): 0,05 g potasyum sorbat suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

Stok kinolin sarısı çözeltisi (50 μg mL^{-1}): 0,005g kinolin sarısı suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

Stok sunset sarısı çözeltisi (50 μg mL^{-1}): 0,005g sunset sarısı suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

Asetat tamponu (pH 4,6 ve 6,5): 0,025 M asetik asit üzerine amonyum asetat eklenerek ilgili pH'a pH metre ile ayarlandı.

Fosfat tamponu (pH 7): 0,025 M potasyum dihidrojen fosfat üzerine potasyum fosfat eklenerek ilgili pH a pH metre ile ayarlandı.

3.3 Araç ve Gereçler

pH metre ve cam elektrodu, Chiltern manyetik karıştırıcı, Sartorius analitik terazi (0,1 mg'a kadar duyarlı), Anzak ultrasonik banyo, Hamilton enjektör, 4,6mm x 150mm x 5 µm İntersil ODS-3V C18 kolon, LC-20 AT pompa, SPD-20A UV-VIS dedektör, 7725 (20 µL) enjeksiyon ve bilgisayar sisteminden oluşan Shimadzu HPLC.

3.4 HPLC ile Analiz

3.4.1 Kromatografik Şartların Belirlenmesi ve Optimizasyonu

3.4.1.1 Klasik Yöntem ile Şartların Belirlemesi

Sodyum benzoat, potasyum sorbat, kinolin sarısı ve sunset sarısının HPLC yöntemi ile bir arada analizi için uygun şartların belirlenmesi amacı ile 10 mL'lik balonjoje içerisine 500 µg mL^{-1} potasyum sorbat ve sodyum benzoat ile 50 µg mL^{-1} kinolin sarısı ve sunset sarısı çözeltilerinden 0,3'er mL konulduktan sonra hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözelti C18 kolon içeren kromatografa enjekte edildi. Kromatografi işlemi izokratik teknik uygulanarak çeşitli hareketli faz karışımlarında, farklı pH ve akış hızlarında tekrar edildi. İncelenen şartlar Çizelge 3.1'de verilmiştir. Maddeler spektrofotometrik dedektörle 230 nm de izlendi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1'de verilmiştir.

Çizelge 3. 1 Denenen kromatografik şartlar

Hareketli faz	**Oran**	**pH**	**Akış hızı**	
Asetonitril-su	10/90	-	1mL/dak	
Asetonitril-asetat tampon	10/90 10/90	4 6,5	1mL/dak 1mL/dak	1,5mL/dak 1,5mL/dak
Asetonitril-fosfat tampon	10/90	7	1mL/dak	1,5mL/dak
Metanol-asetat tampon	10/90	6,5	1mL/dak	1,5mL/dak

3.4.1.2 Deneysel Tasarım İle Optimizasyon

Sodyum benzoat, potasyum sorbat, kinolin sarısı ve sunset sarısının HPLC yöntemi ile bir arada analizi için optimum koşulların bulunması amacı ile kromatografik ayrılmayı etkileyebilecek faktörlerin ve birbirleri ile etkileşimlerinin ayırma gücüne etkisi incelendi. İncelemede 3 faktörlü 3 seviyeli Box-Behnken tasarımı kullanıldı. Tasarım için seçilen faktörler ve seviyeleri Çizelge 3.2'de verilmiştir. Optimizasyon için 500 µg sodyum benzoat ve potasyum sorbat, 50 µg kinolin sarısı ve sunset sarısı çözeltilerinden 0,3'er mL alınıp 10 mL'lik balon jojede su ile hacmine tamamlanarak bir karışım hazırlandı. Elde edilen karışımın hazırlanan tasarıma göre 15 kez 230 nm'de kromatogramı alındı. Ve her bir kromatogramdaki, tüm ardışık piklere ait ayırma gücü değerleri tek tek hesaplandı. Hesaplanan değerlere regresyon analizi yapıldı. Sonuçların güvenilirliğini test etmek için ANOVA yapıldı. Elde edilen veriler doğrultusunda model oluşturuldu. Oluşturulan model kullanılarak faktörlerin optimum değerleri hesaplandı. Sonuçlar Bölüm 4.1.2'de verilmiştir.

Çizelge 3. 2 Faktörler ve seviyeleri

Faktör	Düşük (-1)	Orta (0)	Yüksek (+1)
pH(A)	6,0	6,5	7,0
Akış Hızı (mL/dak)(B)	0,8	1,0	1,2
*Hareketli Faz Oranı (%) (C)	80	85	90

*Asetat tamponu cinsindendir. Her seviye asetonitril ile 100'e tamamlanarak hareketli faz hazırlanmıştır

3.4.2 Validasyon

3.4.2.1 Doğrusallık

Potasyum sorbat, sodyum benzoat, kinolin sarısı ve sunset sarısının bir arada analizi için geliştirilen yöntemin doğrusallığını incelemek amacı ile 10 mL'lik balonjoje içersine 500 µg mL^{-1} potasyum sorbat ve sodyum benzoat ile 50 µg mL^{-1} kinolin sarısı ve sunset sarısı çözeltilerinden 0,1-0,6'şar mL alındıktan sonra hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltilerin C18 kolonda 0,8 mL/dak akış hızında asetonitril/pH 6 asetat tamponu (15/85)

hareketli fazı ile izokratik teknik kullanılarak kromatogramı alındı. Kromatogramlar, spektrofotometrik dedektörle koruyucular için 230 nm, boyalar için 460 nm de izlendi ve pik alanları hesaplandı. Pik alanları ile konsantrasyon arasında ölçü eğrileri çizilerek regresyon analizi yapıldı. İşlemler 3 kez tekrarlandı. Sonuçlar Bölüm 4.2.1'de verilmiştir.

3.4.2.2 Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik

Potasyum sorbat, sodyum benzoat, kinolin sarısı ve sunset sarısının bir arada analizi için geliştirilen yöntemin, gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliği incelemek amacı ile doğrusal alan içinde olacak şekilde 3 ayrı konsantrasyon seçildi. Seçilen konsantrasyondaki çözeltileri hazırlamak amacı ile her biri 500 μg mL^{-1} olan potasyum sorbat ve sodyum benzoat, 50 μg mL^{-1} olan kinolin sarısı ve sunset sarısı çözeltilerinden 10 mL'lik balon jojeye I. için seviye 0,2 mL ; II. seviye için 0,3 mL; III. seviye için 0,4 mL alınarak hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltilerin, gün içi tekrarlanabilirlik için aynı gün içerisinde 3 kez, günler arası tekrarlanabilirlik için 4 farklı günde bir kez C18 kolonda 0,8 mL/dak akış hızında asetonitril/pH 6 asetat tamponu (15/85) hareketli fazı kullanılarak 230 nm ve 460 nm'de kromatogramları alındı ve pik alanları belirlendi. İlgili ölçü eğrileri yardımı ile maddelerin konsantrasyonları bulundu. Geri kazanım yüzdeleri ve bağıl standart sapmaları hesaplandı. Sonuçlar Bölüm 4.2.2'de verilmiştir.

3.4.2.3 Doğruluk

Potasyum sorbat, sodyum benzoat, kinolin sarısı ve sunset sarısının bir arada analizi için geliştirilen yöntemin doğruluğunu incelemek amacı ile, 10 mL'lik balonjoje içine potasyum sorbat, sodyum benzoat, kinolin sarısı ve sunset sarısı içeren örnek çözeltisinden (limon sosu I) 0,5 mL konuldu. Üzerine 500 μg mL^{-1}'lik potasyum sorbat, sodyum benzoat ve 50 μg mL^{-1} kinolin sarısı ve sunset sarısı çözeltilerinden I. seviye için 0,1 mL, II. seviye için 0,2 mL; III. seviye için 0,3 mL eklenip hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltilerin kromatogramları, C18 kolonda 0,8 mL/dak akış hızında asetonitril/pH 6 asetat tamponu (15/85) hareketli fazı kullanılarak, 230 nm ve 460 nm'de alınarak pik alanları belirlendi. İlgili ölçü eğrisi yardımı ile maddelerin konsantrasyonları bulundu. Geri kazanımları yüzdeleri hesaplandı. Sonuçlar Bölüm 4.2.3'de verilmiştir.

3.4.2.4 Tanıma ve Tayin Sınırı (LOD, LOQ)

Potasyum sorbat, sodyum benzoat, kinolin sarısı ve sunset sarısının bir arada analizi için geliştirilen yöntemin tanıma ve tayin sınırının hesaplanması için boş deneme çözeltisinin, C18 kolonda 0,8 mL/dak akış hızında asetonitril/pH 6 asetat tamponu (15/85) hareketli fazı kullanılarak, 230 nm ve 460 nm'de kromatogramı alındı. Boş deneme çözeltisinin, her bir maddeye ait pikin alıkonma zamanındaki pik alanı ölçüldü. Bu işlem 10 kez tekrar edildikten sonra standard sapma hesaplandı. Standart sapmasının tanınma sınırı için 3 katı, tayin sınırı için 10 katı pik alanı kabul edilerek bunlara karşılık gelen madde konsantrasyonları ilgili ölçü eğrileri yardımıyla bulundu. Sonuçlar Bölüm 4.2.4'de verilmiştir.

3.4.2.5 Çözelti Dayanıklılığı

Potasyum sorbat, sodyum benzoat, kinolin sarısı ve sunset sarısının çözücü içerisindeki dayanıklılığını saptamak amacı ile su ve hareketli faz içerisinde 10 µg mL^{-1}'lik çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerin oda sıcaklığında ve $4C^{o}$'de belli aralıklarla, C18 kolonda 0,8 mL/dak akış hızında asetonitril/pH 6 asetat tamponu (15/85) hareketli fazı kullanılarak, 230 nm ve 460 nm'de kromatogramları alındı. Sonuçlar Bölüm 4.2.5'de verilmiştir.

3.4.3 Örnek Analizi

Potasyum sorbat, sodyum benzoat, kinolin sarısı ve sunset sarısının limon sosu ve içeceklerindeki miktarını belirlemek amacı ile limon sosu ve içecekleri uygun oranlarda seyreltilerek örnek çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan tüm çözeltiler C18 kolonda 0,8 mL/dak akış hızında asetonitril/pH 6 asetat tamponu (15/85) hareketli fazı ile izokratik teknik kullanılarak kromatografiye edildi. Kromatogramlar, spektrofotometrik dedektörle koruyucular için 230 nm, boyalar için 460 nm de izlendi ve pik alanları hesaplandı. İlgili ölçü eğrileri yardımı ile gıda katkı maddelerinin örnek içersindeki miktarları bulundu. Sonuçlar Bölüm 4.3'de verilmiştir.

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 Kromatografik Şartların Belirlenmesi ve Optimizasyonu

4.1.1 Klasik Yöntem ile Şartların Belirlenmesi

Sodyum benzoat, potasyum sorbat, kinolin sarısı ve sunset sarısının HPLC ile bir arada analizi için kromatografik şartların belirlenmesi amacı ile Bölüm 3.4.1.1'de anlatıldığı şekilde çalışıldı. Bu çalışmalar sonucunda C18 kolonda 1 mL/dak akış hızında asetonitril-pH 6,5 asetat tamponu (10/90) hareketli fazının kromatografik ayırma için uygun olduğu görüldü. Kinolin sarısının 3 izomeri de bu şartlarda birbirinden ayrıldı.

4.1.2 Deneysel Tasarım ile Optimizasyon

4.1.2.1 Box-Behnken Tasarımı

Sodyum benzoat, potasyum sorbat, kinolin sarısı ve sunset sarısının HPLC ile bir arada analizi için kromatografik ayrılmayı etkileyen faktör ve etkileşimleri belirlemek ve bunların optimum değerlerini saptamak amacı ile Bölüm 3.4.1.2'de anlatıldığı şekilde çalışıldı. 3 seviyeli 3 faktörlü Box-Behnken tasarımı ve ayırma gücü değerleri Çizelge 4.1'de görülmektedir.

Çizelge 4. 1 Box- Behnken tasarımı ve belirtilen şartlarda elde edilen ayırma gücü değerleri

Deney No	pH (A)	Akış Hızı (mL/dak) (B)	Hareketli Faz Oranı (%) (C)	pH (A)	Akış Hızı (mL/dak) (B)	Hareketli Faz Oranı (%) (C)	*Ayırma gücü (R_{12}x R_{23}x R_{31}x R_{14}x R_{41})
1	6	1	80	-1	0	-1	**0,00**
2	7	1	80	1	0	-1	**0,11**
3	6	1	90	-1	0	1	**229,07**
4	7	1	90	1	0	1	**30,30**
5	6	0,8	85	-1	-1	0	**1681,76**
6	7	0,8	85	1	-1	0	**362,20**
7	6	1,2	85	-1	1	0	**391,56**
8	7	1,2	85	1	1	0	**202,66**
9	6,5	0,8	80	0	-1	-1	**0,55**
10	6,5	1,2	80	0	1	-1	**0,00**
11	6,5	0,8	90	0	-1	1	**2,35**
12	6,5	1,2	90	0	1	1	**0,00**
13	6,5	1	85	0	0	0	**572,69**
14	6,5	1	85	0	0	0	**502,70**
15	6,5	1	85	0	0	0	**658,94**

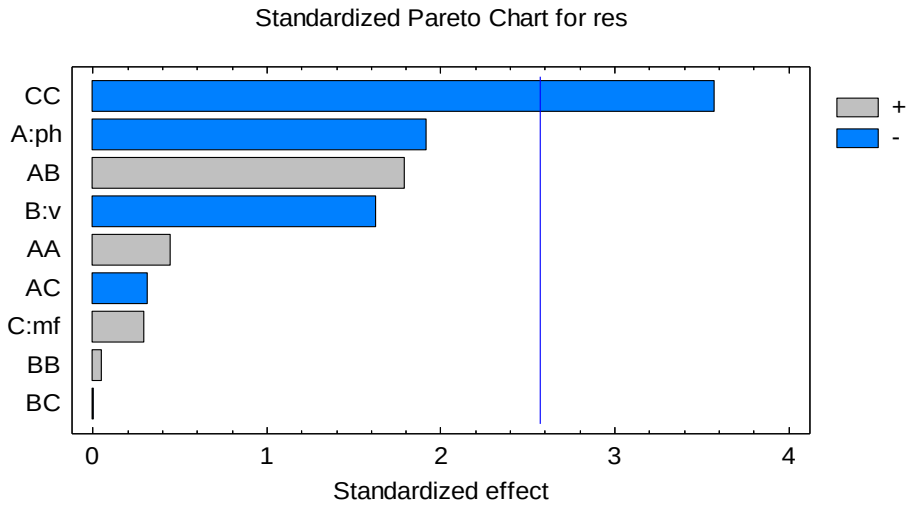
*Ayırma gücü; **R_{12}, R_{23}, R_{31},R_{14}, R_{41}'** ün çarpım değeridir.R_{12} Kinolin sarısı$_{(1)}$ ve Sodyum Benzoat; R_{23} sodyum benzoat ve potasyum sorbat; R_{31} potasyum sorbat ve kinolin sarısı$_{(2)}$; R_{14} kinolin sarısı$_{(2)}$ ve sunset sarısı; R_{41} sunset sarısı ve kinolin sarısı$_{(3)}$'e ait pikler arasındaki ayırma gücü değerleridir.

4.1.2.2 Veri Değerlendirme

Her bir faktörün tek ve birbirleri ile etkileşimine ait etki değerlerini hesaplamak amacı ile Box-Behnken tasarımı uygulanarak elde edilen ayırma gücü değerlerine regresyon analizi yapıldı. Sonuçlar Çizelge 4.2'de, bu sonuçlar doğrultusunda elde edilen Pareto grafiği Şekil 4.1'de verilmiştir. Regresyon analizi sonuçları ve Pareto grafiğinden, ayırma gücü üzerindeki en büyük etkinin C faktörünün ikinci dereceden (CC) etkisine ait olduğu, A ve B faktörleri ile AB etkileşiminin de rezolüsyon üzerinde etkili olduğu, diğer faktör ve etkileşimlerin etkisinin çok az olduğu görülmektedir. Ayrıca regresyon analizi sonuçlarından, A ve B faktörleri ile CC ve AC etkileşimlerinin azalan, diğer faktör ve etkileşimlerin artan değeri ile ayırma gücünün arttığı anlaşılmaktadır.

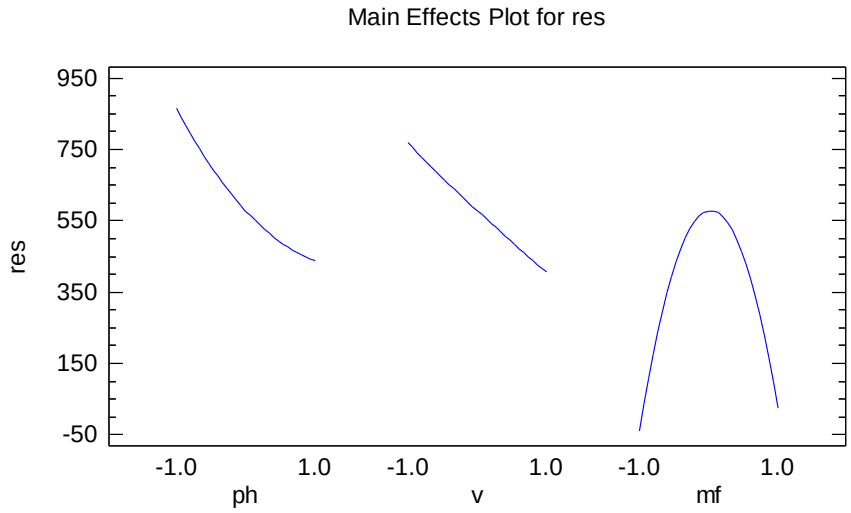
Çizelge 4. 2 Regresyon analizi sonuçları

Faktörler	Regresyon Katsayısı	Etki	Kareler Toplamı
Genel Ortalama	578,11		
A	-213,393	-426,785	364291
B	-181,58	-363,16	263770
C	32,635	65,27	8520,35
AA	72,7925	145,585	19564,6
AB	282,665	565,33	319598
AC	-49,725	-99,45	9890,3
BB	8,6425	17,285	275,789
BC	-0,45	-0,9	0,81
CC	-586,028	-1172,06	1,26804 x10^6



Şekil 4. 1 Box-Behnken tasarımı ile elde edilen Pareto grafiği

Ana faktör değerlerinin ayırma gücüne etkisi Şekil 4.2'de daha ayrıntılı olarak verilmiştir. Buradan da A ve B faktörleri ile ayırma gücü arasında ters bir ilişki olduğu görülmektedir. Ayırma gücü artan C faktörü değerleri ile önce artarken, orta değerden sonra ise artan C değeri ile azalmaktadır.



Şekil 4. 2 Faktörlerin değerleri ile ayırma gücünün değişimi

Regresyon analizi sonuçlarının güvenilirliğini kontrol etmek amacı ile ANOVA yapıldı. ANOVA sonuçları Çizelge 4.3'de verilmiştir. ANOVA sonuçlarından $^{0,05}F_{1,9} = 5,12$ tablo değerinden büyük ve kritik p değeri 0,05'ten küçük olan A faktörü ile AB ve CC etkileşimlerinin ayırma gücü üzerinde daha etkili olduğu anlaşılmaktadır.

Çizelge 4. 3 ANOVA sonuçları

Değişim Kaynağı	**Serbestlik Derecesi**	**Kareler Toplamı**	**Kareler Ortalaması**	**F**	**P-Değeri**
A	1	364291	364291	6,23	0,0341
B	1	263770	263770	4,51	0,0626
C	1	8520,35	8520,35	0,15	0,7115
AB	1	319598	319598	5,47	0,0442
CC	1	$1,30771 \times 10^6$	$1,30771 \times 10^6$	22,37	0,0011
Hata	9	526135	58459,5		
Toplam	14	$2,79003 \times 10^6$			

4.1.2.3 Modelleme

Regresyon analizi ve ANOVA sonuçlarına göre ayırma gücü modelinde bulunması gereken faktör ve etkileşimlerin regresyon katsayıları Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4. 4 Ana faktörler ve etkili etkileşimler

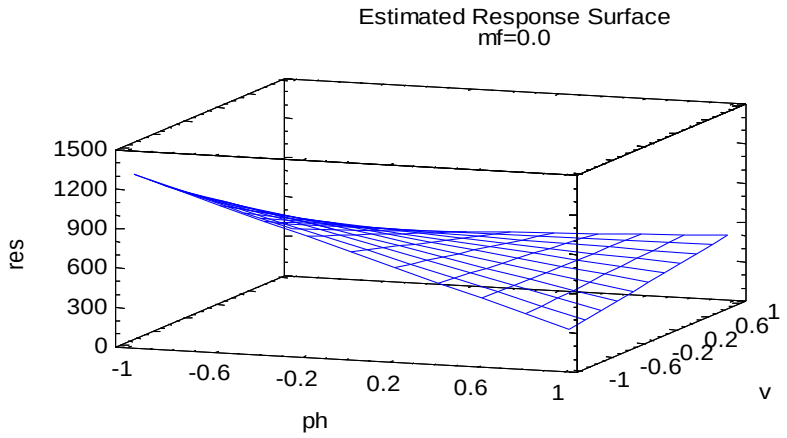
Faktörler	**Genel ortalama**	A	B	C	AB	CC
Regresyon katsayısı	624,644	-213,393	-181,58	32,635	282,665	-591,844

Ana faktörler ve etkili etkileşimlerin katsayılarından oluşturulan model aşağıdadır.

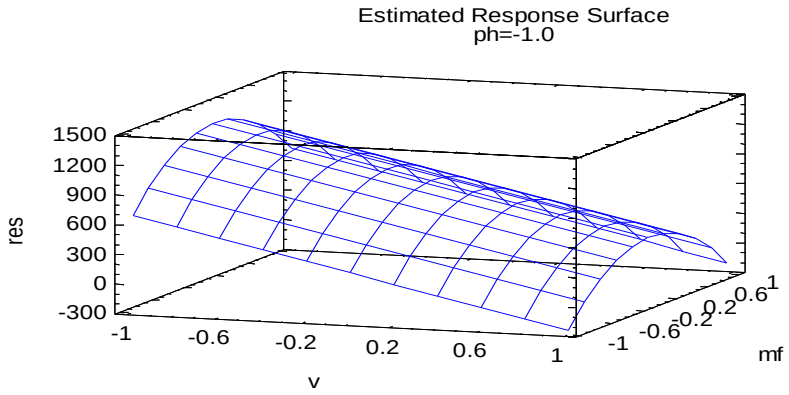
$$\hat{y}_i = 624{,}644 - 213{,}393\, X_1 - 181{,}58\, X_2 + 32{,}635\, X_3 + 282{,}665\, X_1X_2 - 591{,}844\, X_3^2$$

(X_1; A faktörünü, X_2; B faktörünü, X_3; C faktörünü, X_1X_2; A ve B faktörlerinin etkileşimini, X_3^2; C faktörünün ikinci dereceden etkisini göstermektedir.)

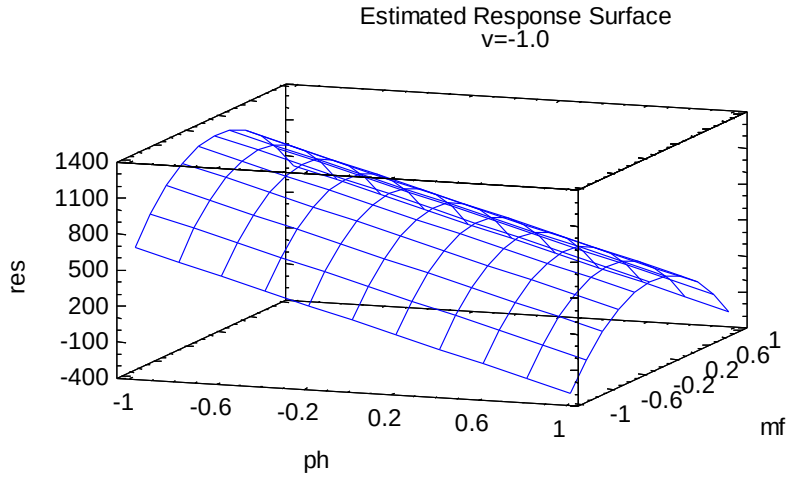
Oluşturulan model kullanılarak elde edilen tahmini ayırma gücü değeri ile deneysel olarak bulunan ayırma gücü değerleri arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla regresyon analizi yapıldı. Regresyon katsayısı 0,9066 olarak bulundu. Elde edilen regresyon modelinden her bir değişken için çizilen yüzey cevapları Şekil 4.3 - 4.5'de verilmiştir. Şekillerden pH ve akış hızının düşük değerleri ile hareketli faz bileşiminin orta değerlerine karşılık gelen ayırma gücü değerlerinin daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4. 3 Box-Behnken tasarımı ile elde edilen A ve B faktörleri arasındaki tahmini cevap yüzeyleri (hareketli faz oranı % 85 de sabit tutularak elde edilen değişim)



Şekil 4. 4 Box-Behnken tasarımı ile elde edilen B ve C faktörleri arasındaki tahmini cevap yüzeyleri (pH; 6,0 da sabit tutularak elde edilen değişim)



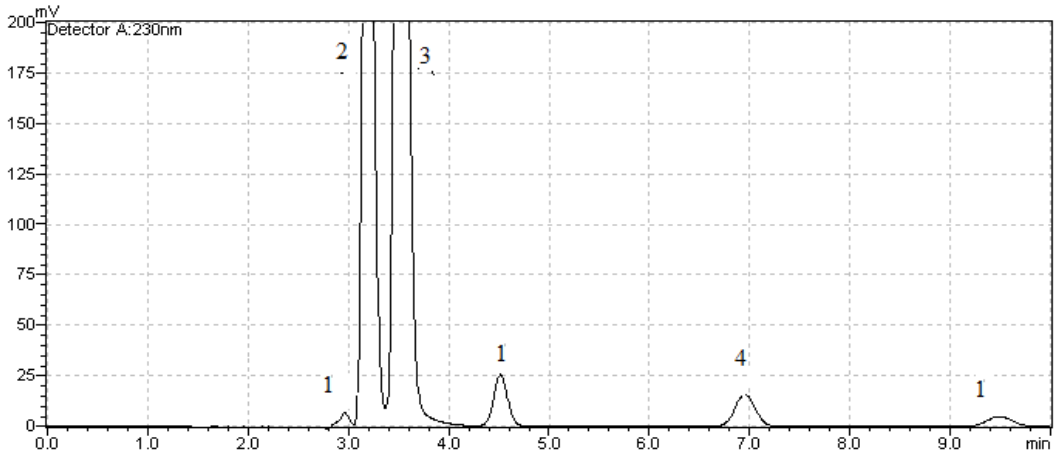
Şekil 4. 5 Box-Behnken tasarımı ile elde edilen A ve C faktörleri arasındaki tahmini cevap yüzeyleri (akış hızı 0,8 mL/dak'da sabit tutularak elde edilen değişim)

Oluşturulan model kullanılarak ayırma gücünün en yüksek olmasını sağlayan kodlu ve gerçek faktör seviyeleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5'de verilmiştir. Bu şartlarda ayırma gücü değeri 1302,73 olmaktadır.

Çizelge 4. 5 Faktörlerin optimum değerleri

Faktör	**Düşük**	**Yüksek**	**Optimum değer (kodlu)**	**Optimum değer (gerçek)**
pH (A)	-1,0	1,0	-1,0	6,0
Akış Hızı (mL/dak)(B)	-1,0	1,0	-1,0	0,8
Hareketli Faz Oranı (%) (C)	-1,0	1,0	0,028	85

Bu sonuçlar doğrultusunda kromatografik şartlar pH 6,0, akış hızı 0,8 mL/dak ve hareketli faz oranı 85/15 asetat tamponu/asetonitril olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda 230 nm'de spektrofotometrik dedektör ile elde edilen kromatogram Şekil 4.6'da verilmiştir. Alıkonma zamanları dakika cinsinden sodyum benzoat için 3,20; potasyum sorbat için 3,54; sunset sarısı için 6,89; kinolin sarısı için 2,95; 4,56; 9,39 olarak bulunmuştur.



Şekil 4. 6 Optimum koşullarda kromatogram (1)1,5 µg mL^{-1} kinolin sarısı (2), 15µg mL^{-1} sodyum benzoat, (3) 15 µg mL^{-1} potasyum sorbat, (4) 1,5 µg mL^{-1} sunset sarısı

4.2 Validasyon

4.2.1 Doğrusallık

Potasyum sorbat, sodyum benzoat, kinolin sarısı ve sunset sarısının bir arada analizi için geliştirilen yöntemin doğrusallığını incelemek amacıyla Bölüm 3.4.2.1'de anlatıldığı şekilde çalışıldı. Çalışmalar sonucunda hesaplanan pik alanları ortalaması, standard sapma ve bağıl standard sapma değerleri potasyum sorbat için Çizelge 4.6'da, sodyum benzoat için Çizelge 4.8'de, sunset sarısı için Çizelge 4.10'da ve kinolin sarısı için Çizelge 4.12'de verilmiştir. Çizelge 4.7'de potasyum sorbat, Çizelge 4.9'da sodyum benzoat, Çizelge 4.11'de kinolin sarısı ve Çizelge 4.13'de sunset sarısı için oluşturulan her bir ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler yer almaktadır. Regresyon analizlerinin ortalama değerleri kullanılarak elde edilen doğru denklemleri ve oluşturulan ölçü eğrileri potasyum sorbat için Şekil 4.7'de, sodyum benzoat için Şekil 4.8'de, kinolin sarısı için Şekil 4.9'da ve sunset sarısı için Şekil 4.10'da verilmiştir.

4.2.2 Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik

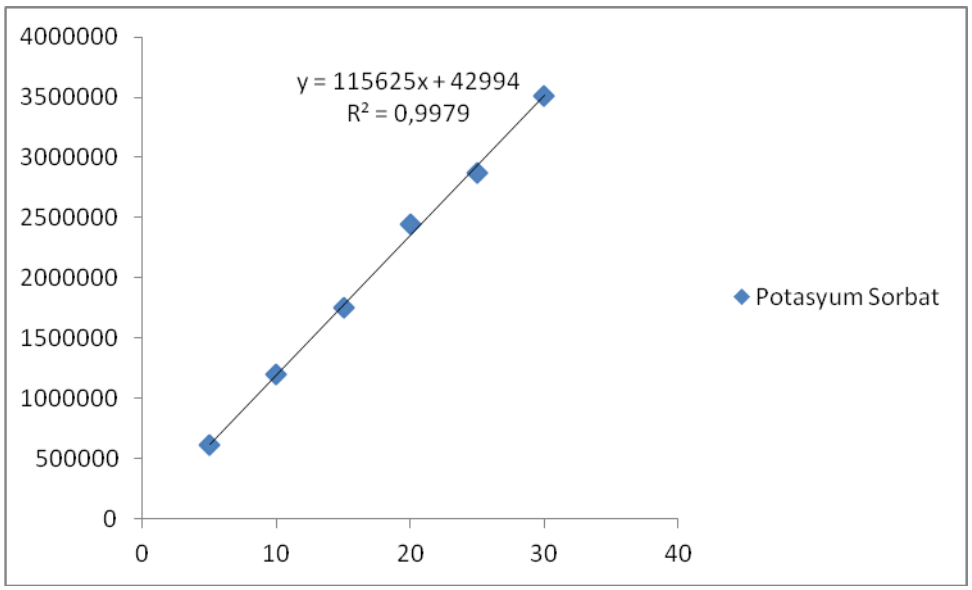
Potasyum sorbat, sodyum benzoat, kinolin sarısı ve sunset sarısının bir arada analizi için geliştirilen yöntemin, gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliği incelemek amacı ile Bölüm 3.4.2.2'de anlatıldığı şekilde yapılan çalışmalar sonucu elde edilen değerler gün içi tekrarlanabilirlik için Çizelge 4.14'de, günler arası tekrarlanabilirlik için Çizelge 4.15'de verilmiştir.

Çizelge 4. 6 Potasyum sorbatın ölçü eğrisine ait pik alanları değerleri

NO	C (µg mL^{-1})	A1	A2	A3	ORT	STD	%RSD
1	5	613479	610334	605937	609917	3788,28	0,621
2	10	1197849	1197989	1199543	1198460	940,23	0,078
3	15	1692664	1803736	1769751	1755384	56912,76	3,242
4	20	2476406	2462774	2400698	2446626	40354,60	1,649
5	25	2844307	2937295	2847741	2876448	52723,30	1,833
6	30	3486997	3578034	3470155	3511749	58036,29	1,653

Çizelge 4. 7 Potasyum sorbatın regresyon analizine ait parametreler

	1	2	3	Ortalama
A	42880	26815	59308	42994
B	114804	118374	113695	115625
R^2	0,9950	0,9988	0,9986	0,9979
Sa	79118,26	39789,27	41575,67	51377,55
Sb	4063,14	2043,39	2135,13	2638,51



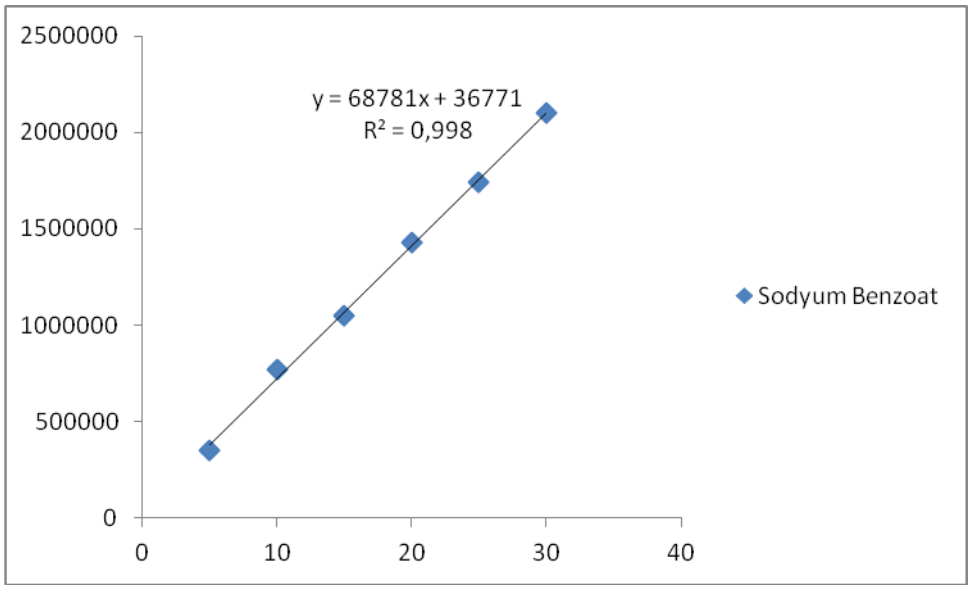
Şekil 4. 7 Potasyum sorbatın doğrusallık grafiği

Çizelge 4. 8 Sodyum benzoatın ölçü eğrisine ait pik alanları değerleri

NO	C(µg mL^{-1})	A1	A2	A3	ORT	STD	%RSD
1	5	334312	356327	358692	349777	13445,18	3,844
2	10	787313	773534	757452	772766	14945,29	1,934
3	15	993697	1085144	1069071	1049304	48823,04	4,653
4	20	1444961	1411540	1432884	1429795	16923,28	1,184
5	25	1751621	1742543	1728181	1740782	11818,85	0,679
6	30	2110051	2096956	2093573	2100203	8702,95	0,414

Çizelge 4. 9 Sodyum benzoatın regresyon analizine ait parametreler

	1	2	3	Ortalama
A	14704	50684	44935	36771
B	69845	68209	68288	68781
R^2	0,9943	0,9984	0,9987	0,9980
Sa	51605,62	26465,15	24235,46	30123,50
Sb	26502,20	1359,12	1244,62	1547,00



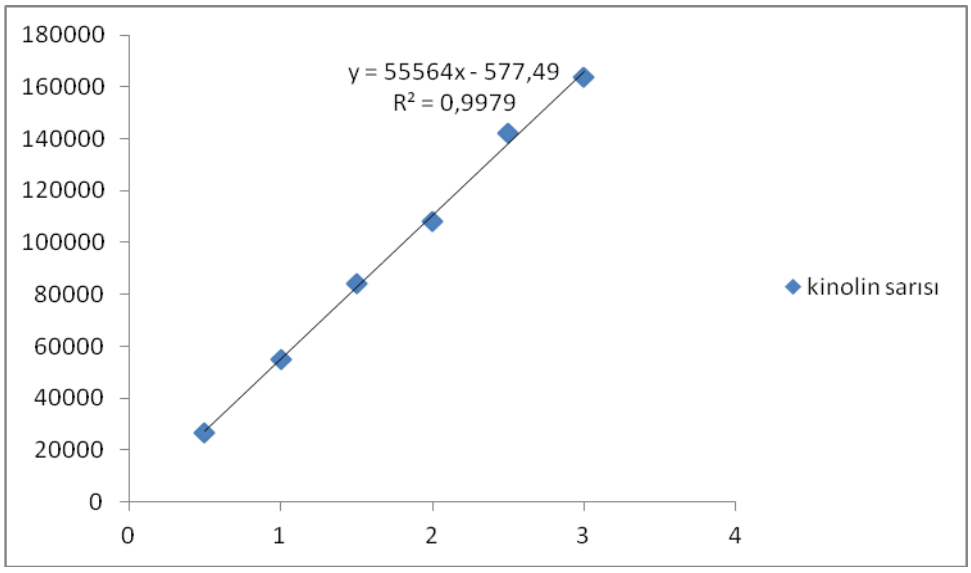
Şekil 4. 8 Sodyum benzoatın doğrusallık grafiği

Çizelge 4. 10 Kinolin sarısının ölçü eğrisine ait pik alanları değerleri

NO	C(µg mL^{-1})	A1	A2	A3	ORT	STD	%RSD
1	0,5	27356	26366	26363	26695	572,44	2,144
2	1	53199	55599	55904	54901	1481,56	2,699
3	1,5	84153	84202	83811	84055	213,01	0,253
4	2	107636	109180	107359	108058	981,22	0,908
5	2,5	142454	142806	141765	142342	529,51	0,372
6	3	167740	163787	160181	163903	3780,82	2,307

Çizelge 4. 11 Kinolin sarısının regresyon analizine ait parametreler

	1	2	3	Ortalama
A	-2227,1	-380,43	875,07	-577,49
B	56752	55640	54298	55564
R^2	0,9982	0,9978	0,9962	0,9979
Sa	2372,03	2539,30	3268,80	2510,95
Sb	1218,16	1304,06	1678,70	1289,51



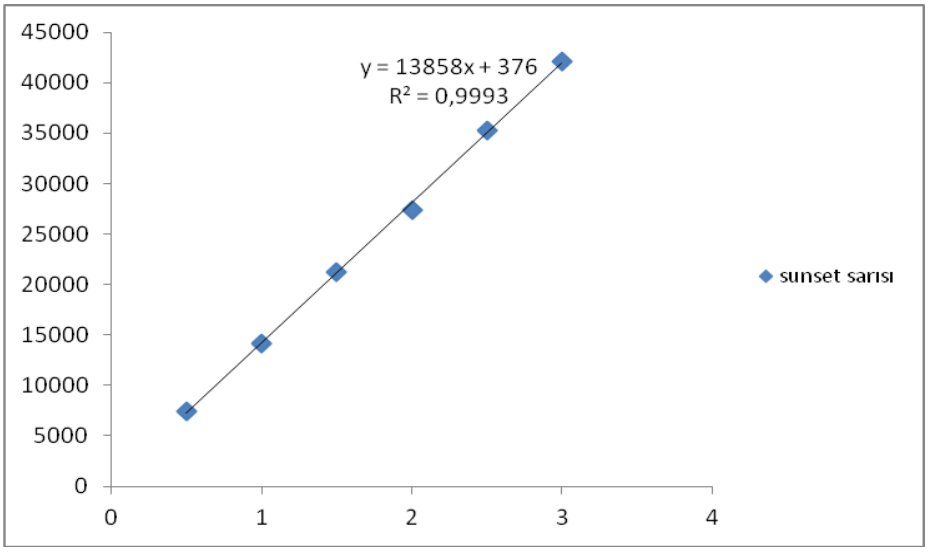
Şekil 4. 9 Kinolin sarısının doğrusallık grafiği

Çizelge 4. 12 Sunset sarısının ölçü eğrisine ait pik alanları değerleri

NO	C(µg mL^{-1})	A1	A2	A3	ORT	STD	%RSD
1	0,5	7512	7485	7469	7489	21,73	0,290
2	1	14218	14172	14124	14171	47,00	0,332
3	1,5	20576	22183	21110	21290	818,43	3,844
4	2	27164	27877	27231	27424	393,74	1,436
5	2,5	35633	35277	35028	35313	304,07	0,861
6	3	42323	41426	42493	42081	573,29	1,362

Çizelge 4. 13 Sunset sarısının regresyon analizine ait parametreler

	1	2	3	Ortalama
A	82,20	865,27	180,53	376,00
B	13994	13641	13940	13858
R^2	0,9981	0,9985	0,9988	0,9993
Sa	600,25	506,72	472,97	361,37
Sb	308,26	260,23	242,90	185,57



Şekil 4. 10 Sunset sarısının doğrusallık grafiği

Çizelge 4. 14 Gün içi tekrarlanabilirlik

	Potasyum sorbat ($\mu g\ mL^{-1}$)			**Sodyum benzoat ($\mu g\ mL^{-1}$)**			**Kinolin sarısı ($\mu g\ mL^{-1}$)**			**Sunset sarısı ($\mu g\ mL^{-1}$)**		
	10,000	15,000	20,000	10,000	15,000	20,000	1,000	1,500	2,000	1,000	1,500	2,000
1	9,846	14,765	19,338	10,262	14,442	19,108	0,996	1,501	1,947	1,019	1,511	1,996
2	10,013	15,084	19,799	9,980	14,261	19,039	1,014	1,525	1,975	0,993	1,493	1,990
3	9,966	15,087	19,848	10,053	14,328	19,101	1,027	1,545	2,002	1,008	1,481	1,985
X(ort)	9,942	14,979	19,661	10,100	14,344	19,083	1,012	1,524	1,975	1,007	1,495	1,990
S	0,086	0,185	0,281	0,146	0,092	0,038	0,016	0,022	0,027	0,013	0,016	0,006
%RSD	0,862	1,236	1,132	1,447	0,638	0,200	1,576	1,439	1,379	1,275	1,039	0,287
% geri kazanım	99,417	99,858	98,307	100,985	95,625	95,414	101,241	101,600	98,733	100,675	99,685	99,523

Çizelge 4. 15 Günler arası tekrarlanabilirlik

	Potasyum sorbat (µg mL^{-1})			**Sodyum benzoat (µg mL^{-1})**			**Kinolin sarısı (µg mL^{-1})**			**Sunset sarısı (µg mL^{-1})**		
	10,000	15,000	20,000	10,000	15,000	20,000	1,000	1,500	2,000	1,000	1,500	2,000
1	10,046	14,704	19,472	10,619	14,479	19,169	1,000	1,495	1,958	0,988	1,516	1,955
2	10,219	15,022	19,938	10,346	14,299	19,102	1,019	1,519	1,986	0,962	1,498	1,948
3	10,174	15,024	19,988	10,418	14,366	19,164	1,032	1,539	2,012	0,977	1,485	1,942
4	9,942	14,979	19,661	10,100	14,344	19,083	1,012	1,524	1,975	1,007	1,495	1,990
X(ort)	10,095	14,932	19,765	10,370	14,372	19,129	1,016	1,519	1,983	0,983	1,499	1,959
S	0,216	0,153	0,242	0,092	0,077	0,044	0,015	0,018	0,023	0,019	0,013	0,022
%RSD	1,244	1,026	1,225	0,638	0,534	0,228	1,446	1,194	1,158	1,933	0,854	1,111
% geri kazanım	100,950	99,547	98,823	95,625	95,812	95,647	101,556	101,278	99,133	98,324	99,906	97,940

4.2.3 Doğruluk

Potasyum sorbat, sodyum benzoat, kinolin sarısı ve sunset sarısının bir arada analizi için geliştirilen yöntemin doğruluğunu incelemek amacı ile Bölüm 3.4.2.3'de anlatıldığı şekilde yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen değerler Çizelge 4.16'da verilmiştir.

Çizelge 4. 16 Doğruluk

	Örnekten gelen	**Konulan**	**Bulunan**	**% geri kazanım**
Potasyum sorbat (µg mL^{-1})	2,784	5,000	7,922	102,760
		10,000	12,544	97,600
		15,000	18,287	103,350
Sodyum benzoat (µg mL^{-1})	5,274	5,000	10,488	104,280
		10,000	15,730	104,560
		15,000	20,984	104,730
Kinolin sarısı (µg mL^{-1})	0,136	0,500	0,614	95,600
		1,000	1,182	104,600
		1,500	1,674	102,530
Sunset sarısı (µg mL^{-1})	0,046	0,500	0,539	98,600
		1,000	1,088	104,200
		1,500	1,550	100,260

4.2.4 Tanıma ve Tayin Sınırı (LOD-LOQ)

Potasyum sorbat, sodyum benzoat, kinolin sarısı ve sunset sarısının bir arada analizi için geliştirilen yöntemin tanınma ve tayin sınırlarının belirlenmesi için bölüm 3.4.2.4'de anlatıldığı gibi yapılan çalışmalar sonucunda Çizelge 4.17'de ki değerler elde edilmiştir.

Çizelge 4. 17 LOD-LOQ değerleri

	Potasyum sorbat	**Sodyum benzoat**	**Kinolin sarısı**	**Sunset sarısı**
LOD(µg mL^{-1})	0,082	0,154	0,044	0,069
LOQ(µg mL^{-1})	0,273	0,513	0,146	0,230

4.2.5 Çözelti Dayanıklılığı

Potasyum sorbat, sodyum benzoat, kinolin sarısı ve sunset sarısının çözücü içerisindeki dayanıklılığını incelemek için Bölüm 3.4.2.5'de anlatıldığı şekilde çalışıldığında potasyum sorbat, kinolin sarısı ve sunset sarısının tüm şartlarda, sodyum benzoatın 4^{o}C'de en az 1 ay boyunca bozulmadığı görüldü.

4.3 Örnek Analizi

Limon sosu ve içeceklerinde bulunan potasyum sorbat, sodyum benzoat, kinolin sarısı ve sunset sarısı miktarını belirlemek amacı ile Bölüm 3.4.3'de anlatıldığı şekilde yapılan çalışmalar sonucu limon sosu ve içecekleri için Çizelge 4.18 - 4.22'deki değerler elde edilmiştir.

Çizelge 4. 18 Limon sosu I'in HPLC ile analizi

Örnek	**Deneme sayısı**	**Potasyum sorbat (µg mL^{-1})**	**Sodyum benzoat (µg mL^{-1})**	**Kinolin sarısı (µg mL^{-1})**	**Sunset sarısı (µg mL^{-1})**
Limon sosu I	**1**	55,051	105,293	2,627	0,953
	2	55,571	106,301	2,718	0,933
	3	56,314	106,783	2,721	0,948
	4	56,498	107,657	2,662	0,920
	5	55,364	102,543	2,754	0,890
	6	55,571	103,575	2,756	0,915
	7	56,314	105,827	2,697	0,899
	8	56,498	106,722	2,791	0,879
	9	54,459	103,266	2,794	0,894
	10	54,668	104,298	2,662	0,924
	11	55,900	106,267	2,754	0,904
	12	56,086	107,160	2,757	0,919
	Ortalama	55,691	105,474	2,724	0,916
	Standard sapma	0,700	1,673	0,053	0,021
	% RSD	1,257	1,587	1,958	2,389

Çizelge 4. 19 Limon sosu II'nin HPLC ile analizi

Örnek	**Deneme sayısı**	**Potasyum sorbat (µg mL^{-1})**	**Sodyum benzoat (µg mL^{-1})**	**Kinolin sarısı (µg mL^{-1})**	**Sunset sarısı (µg mL^{-1})**
Limon sosu II	**1**	-	131,368	2,394	0,874
	2	-	130,961	2,323	0,878
	3	-	127,788	2,358	0,877
	4	-	130,193	2,426	0,857
	5	-	131,368	2,355	0,860
	6	-	130,961	2,390	0,864
	7	-	130,829	2,459	0,845
	8	-	130,193	2,387	0,855
	9	-	131,205	2,423	0,848
	10	-	130,794	2,426	0,861
	11	-	131,141	2,355	0,861
	12	-	130,500	2,390	0,862
	Ortalama		130,609	2,391	0,862
	Standard sapma	-	0,974	0,038	0,010
	% RSD	-	0,746	1,608	1,210

Çizelge 4. 20 Limon sosu III'ün HPLC ile analizi

Örnek	**Deneme sayısı**	**Potasyum sorbat (µg mL^{-1})**	**Sodyum benzoat (µg mL^{-1})**	**Kinolin sarısı (µg mL^{-1})**	**Sunset sarısı (µg mL^{-1})**
Limon sosu III	**1**	61,011	169,236	-	-
	2	57,331	171,979	-	-
	3	58,209	175,826	-	-
	4	59,346	168,019	-	-
	5	57,714	172,587	-	-
	6	59,087	174,930	-	-
	7	60,258	168,667	-	-
	8	60,665	172,949	-	-
	9	58,700	175,289	-	-
	10	59,883	176,387	-	-
	11	58,660	168,645	-	-
	12	59,824	172,500	-	-
	Ortalama	59,224	172,251	-	-
	Standard sapma	1,1542	3,013	-	-
	% RSD	1,949	1,749	-	-

Çizelge 4. 21 Limonata I'in HPLC ile analizi

Örnek	**Deneme sayısı**	**Potasyum sorbat (µg mL^{-1})**	**Sodyum benzoat (µg mL^{-1})**	**Kinolin sarısı (µg mL^{-1})**	**Sunset sarısı (µg mL^{-1})**
Limonata I	**1**	266,725	134,171	-	-
	2	256,624	131,212	-	-
	3	255,285	131,151	-	-
	4	263,205	131,190	-	-
	5	262,290	137,747	-	-
	6	252,764	130,842	-	-
	7	264,327	130,780	-	-
	8	263,885	138,430	-	-
	9	254,266	131,252	-	-
	10	261,166	133,038	-	-
	11	261,325	131,102	-	-
	12	260,421	131,041	-	-
	Ortalama	260,190	132,663	-	-
	Standard sapma	4,434	2,730	-	-
	% RSD	1,704	2,058	-	-

Çizelge 4. 22 Limonata II'nin HPLC ile analizi

Örnek	**Deneme sayısı**	**Potasyum sorbat (µg mL^{-1})**	**Sodyum benzoat (µg mL^{-1})**	**Kinolin sarısı (µg mL^{-1})**	**Sunset sarısı (µg mL^{-1})**
Limonata II	**1**	272,637	162,378	14,593	-
	2	271,754	159,538	14,519	-
	3	256,597	157,260	15,278	-
	4	264,894	160,997	14,827	-
	5	263,643	158,089	14,752	-
	6	272,199	157,515	15,519	-
	7	270,562	161,653	15,021	-
	8	265,251	158,748	14,945	-
	9	273,891	157,894	15,722	-
	10	270,042	161,681	14,812	-
	11	261,764	158,797	14,737	-
	12	270,259	157,553	15,505	-
	Ortalama	267,791	159,342	15,019	
	Standard sapma	5,295	1,859	0,395	-
	% RSD	1,977	1,166	2,629	-

4.4 Tartışma

Bu çalışmada, limon sosu ve içeceklerinde bulunan sodyum benzoat, potasyum sorbat, kinolin sarısı ve sunset sarısının bir arada analizi için geliştirilen HPLC yönteminde, çalışılacak hareketli faz bileşenleri, pH ve akış hızı klasik yöntem ile yaklaşık olarak bulunduktan sonra deneysel tasarımdan yararlanılarak optimum koşullar belirlenmiştir. Maddeler spektrofotometrik dedektörle 230 nm'de saptanmıştır. Maddelerin bir arada analizi, izokratik teknik kullanılarak 10 dakikada gerçekleştirilmiştir.

Kinolin sarısı ve sunset sarısının gıda ürünleri içindeki miktarının çok az olması ve 230 nm'deki absorpsiyonun çok düşük olması nedeni ile bu maddelerin miktar tayinleri, absorpsiyonlarının daha yüksek olduğu 460 nm'de elde edilen kromatogramlar kullanılarak yapılmıştır.

Kromatogramlarda kinolin sarısına ait 3 ayrı pik gözlemlenmiştir. Bunun nedeni kinolin sarısının 3 ayrı izomerinin bir arada bulunmasıdır. Bu durum literatür bilgileri ile uyum göstermektedir. Kinolin sarısının miktar tayini yapılırken literatürdeki çalışmalar göz önüne alınarak bu 3 pikin alanları toplamı kullanılmıştır.

Geliştirilen yöntemin doğrusallığının incelenmesinde, maddelerin örnekler içindeki miktarları göz önüne alınarak belirlenen konsantrasyon aralığında, pik alanı ile konsantrasyon arasındaki ilişkiden yararlanılmıştır. Hazırlanan 3 ayrı ölçü eğrisi sonuçlarının birbirleri ile tutarlı olduğu ve regresyon katsayılarının uygun olduğu görülmüştür.

Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirlik parametrelerinin incelenmesi için belirlenen konsantrasyon aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonda sentetik karışımlar hazırlanmış ve analiz edilmiştir. Kabul edilebilirlik için üst limit olan % 2'nin altında RSD değerleri elde edilmiştir.

Geliştirilen yöntemin doğruluk parametresinin incelemesi için örnek olarak, içerisinde incelenen 4 maddenin de bulunduğu limon sosu I kullanılmıştır. Örnek içersine farklı konsantrasyonlarda maddelerden eklenerek hazırlanan çözeltiler analiz edildiğinde analitik açıdan kabul edilebilir sınırlar içinde (95-105) geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

Geliştirilen yöntem ile piyasada var olan 3 adet limon sosu ve 2 adet limonata analiz edilmiştir. Tekrarlanan 12'şer örnek için gıda ürünleri için üst limit olan % 2-20'nin altında RSD değerleri elde edilmiştir. Gıda örneklerindeki katkı maddelerinin miktarları bilinmediğinden ve incelenen 4 maddenin bir arada analizine yönelik herhangi bir standart yöntem bulunmadığından geliştirilen analiz yönteminin T ve F testi kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırılması yapılamamıştır.

Yapılan çalışmalarda, incelenen limon sosu ve içeceklerinden biri hariç hepsinde gıdalara koruyucu olarak katılan potasyum sorbat ve sodyum benzoatın bir arada var olduğu, içeceklerin soslara oranla bu maddelerden daha fazla içerdiği, sosların içindeki koruyucu madde miktarlarının Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğince belirlenen sınırlar içinde (250 potasyum sorbat - 150 sodyum benzoat) olduğu, limonata örneklerinde bu miktarın sınırın biraz üstünde olduğu (260, 267 potasyum sorbat-159 sodyum benzoat) saptanmıştır. Bununla birlikte aşılan miktarın az olması ve analizde yapılmış olabilinecek hata da göz önüne alınarak bu doz aşımın tolere edilebileceği düşünülmektedir.

Gıdalara renklendirici olarak katılan kinolin sarısı ve sunset sarısının, incelenen bir sos ve bir limonata örneğinde bulunmadığı, diğer limonata örneğinde sadece kinolin sarısı var olmakla birlikte miktarının incelenen diğer 2 sosta bulunan kinolin sarısı ve sunset sarısı miktarından oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Bununla birlikte incelenen örneklerin içeriğindeki katkı maddelerinin Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğince belirlenen sınırlar içinde olduğu saptanmıştır.

Bu tez kapsamında geliştirilmiş ve yapılan çalışmalar ile geçerliliği kanıtlanmış olan analiz yönteminin, gıda kontrol labarotuvarlarında bu maddeleri içeren örneklerin rutin analizlerinde kullanılmasının uygun olduğu söylenebilir.

KAYNAKLAR

[1] Gurtan T. (2007). Nar suyundaki gıda katkı maddelerinin HPLC ile analizi, Lisans Bitirme Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, İstanbul.

[2] Monakhova Y.B., Mushtakova S.P. ve Kolesnikova S.S., (2010). "Chemometrics-assisted spectrophotometric method for simultaneous determination of vitamins in complex mixtures", Analytical Bioanalytical Chem, 397 (3): 1297-1306.

[3] Miguel A., Pellerano R.G., Marchevsky E.J ve Camin J.E., (2008). "Simultaneous Determination of Saccharin and Aspartame in Commercial Noncaloric Sweeteners Using the PLS-2 Multivariate Calibration Method and Validation by Capillary Electrophoresis", Food Chem., 56: 9345–9349.

[4] Dos Santos M.E., Demiate I.M. ve Nagata N., (2010). "Simultaneous determination of tartrazine and sunset yellow in food by spectrophotometry UV-VIS and multivariate calibration methodology", Ciencia E Tecnologia De Alimentos, 30: 903-909.

[5] Lopez-De-Alba P.I, Lopez-Martinez L. ve De-Leon-Rodriguez L.M., (2002). "Simultaneous determination of synthetic dyes tartrazine, allura red and sunset yellow by differential pulse polarography and partial least squares. A Multivariate Calibration Method", Electroanalysis, 14: 197-205.

[6] Cantarelli A, Pellerano G. ve Marchevsky J., (2008). "Simultaneous determination of saccharin and aspartame in commercial noncaloric sweeteners using the PLS-2 multivariate calibration method and validation by capillary electrophoresis", J Agric Food Chem., 56: 20, 9345-9349.

[7] Lachenmeier D.W. ve Kessler W., (2008). "Multivariate Curve Resolution of Spectrophotometric Data for the Determination of Artificial Food Colors", Food Chem. , 56: 5463–5468.

[8] Culzoni M.J., Schenonea A.V., Llamas N.E., Nezio M.S., Band F. ve Goicoecheaa C. (2009). "Fast chromatographic method for the determination of dyes in beverages by using high performance liquid chromatography—Diode array detection data and second order algorithms", Journal of Chromatography A, 1216: 7063–7070.

[9] Tuma P, Malkova K ve Samcova E., (2011). "Rapid monitoring of mono and disaccaharides in drinks, foodstuffs and foodstuffs additives by capillary electrophoresis", Analytical Chimica Acta, 698: 1-2, 1-5.

[10] Wang W., Wang Y., Zhang J. Ve Quingcui C., (2010). "Simultaneous determination of electroactive and non-electroactive food preservatives by novel capillary electrophoresis with amperometric detection", Analytica Chimica Acta, 678: 39-43.

[11] Boyce M.C., (2007). "Determination of additives and organic contaminants in food by CE and CEC", Electrophoresis, 28(22): 4046-4062

[12] Tombesi B. ve Freije H., (2002)." Application of solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry to the determination of butylated hydroxytoluene in bottled drinking water", J Chromatography A, 963: 1-2, 179-183.

[13] Alghamdi A.F. (2009). "A square-wave adsorptive stripping voltammetric method for determination of fast gren dye", J AOAC International, 92 (6): 1714-1719.

[14] Alghamdi A.H., Alshammery H.M., Abdalla M.A. ve Alghamdi A.F., (2009). "Determination of carmine food dye(E 120) in Foodstuffs by stripping voltammetry", Journal of AOAC International 92 (5): 1454-1459.

[15] Ojeda C.B. ve Rojas F.S., (2004). "Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry", Analytica Chemica Acta, 518(1-2): 1-24.

[16] Hannisdal A., (1992). "Analysis of acesulfame-k, saccharin and preservatives in beverages and jams by HPLC" . Z Lebensm Unters Forsch, 194 (6): 517-519.

[17] Dossi N, Toniolo R, Susmel S, Pizzarello A. ve Bontempelli G., (2006). "Simultaneous RP-LC determination of additives in soft drinks", Chromatographia, 63: 11-12, 557-562.

[18] Mahboubifar M., Sobhani Z., Dehghanzadeh G. ve Javidnia K., (2011). "A Comparison between UV Spectrophotometer and High-performance Liquid Chromatography Method for the Analysis of Sodium Benzoate and Potassium Sorbate in Food Products" Food Analytical Methods, 4: 150–154.

[19] Demiralay E.C., Ozkan G. ve Guzel-Seydim Z., (2006). "Isocratic separation of some food additives by reversed phase liquid chromatography", Chromatographia, 63: 1-2, 91-96.

[20] Wen Y., Wang Y. ve Feng Y.Q., (2007). "A simple and rapid method for simultaneous determination of benzoic and sorbic acids using in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography", Analytical and Bioanalytical Chemistry, 388 (8): 1779-1787.

[21] Altiokka G, Ergun B, Can N.O. ve Aboul-Enein H.Y. (2007). "Validated reversed phase HPLC method for the analysis of the food additive, sodium benzoate, in soft drinks and jams", Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 30: 5-8, 1125-1136.

[22] Saad B, Bari F, Saleh M.I. ve Ahmad K. (2005). "Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography", Journal of Chromatography A, 1073: 1-2, 393-397.

[23] Shabir G.A. (2007). "Method Development and Validation of Preservatives Determination (Benzyl Alcohol, Ethylene Glycol Monophenyl Ether, Methyl Hydroxybenzoate, Ethyl Hydroxybenzoate, Propyl Hydroxybenzoate, and Butyl Hydroxybenzoate) using HPLC", Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 13 (30): 1951–1961.

[24] Jimenez J.F.G, Valencia M.C ve Valley L.F.C, (2007). "Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweetener additives in food and cosmetics by flow injection analysis coupled to a monolithic column", Analytica Chimica Acta, 594: 226–233.

[25] Li X. Q. ,Zhang F. ,Sun Y.Y. ,Yong W. ,Chu X. G. ,Fang Y.Y. ve Zweigenbaum J., (2008). "Accurate screening for synthetic preservatives in beverage using high performance liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry", Analytica chimicacta 608: 165–177.

[26] Burini G. (2007). "Development of a quantitative method for the analysis of total L-ascorbic acid in foods by high-performance liquid chromatography", Journal of Chromatography A, 1154: 1-2, 97-102.

[27] Fontannaz P., Kilinc T. ve Heudi O. (2006). "HPLC-UV determination of total vitamin C in a wide range of fortified food products", Food Chemistry, 94 (4): 626-631.

[28] Quin. L.X. ,Chao J. ,Yan-Yan S. ,Min-Li Y. ve Xiao-Gang C. (2009). "Analysis of synthetic antioxidants and preservatives in edible vegetable oil by HPLC/TOF-MS", Food Chemistry 113(2): 672-700.

[29] Garcia-Falcon M.S. ve Simal-Gandara J., (2005). "Determination of food dyes in soft drinks containing natural pigments by liquid chromatography with minimal clean-up", Food Control, 16(3), 293–297.

[30] Minioti K.S., Sakellariou C.F. ve Thomaidis N.S., (2007)."Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector", Analytica Chimica Acta, 583(1): 103–110.

[31] Vidotti E.C, Costa W.F. ve Oliveira C.C., (2006). "Development of a green chromatographic method for determination of colorants in food samples", Talanta, 68(3): 516-521.

[32] Yoshioka N. ve Ichihashi K. (2008). "Determination of 40 synthetic food colors in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection". Talanta, 74(5): 1408–1413.

[33] Ma M., Luo X., Chen B, Su S. ve Yao S., (2006). "Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-performance liquid chromatography–diyote array detection–electrospray mass spectrometry". Journal of Chromatography A, 1103(1): 170–176.

[34] Vachirapatama N., Mahajaroensiri J. ve Viesessanguan W.O., (2008). "Identification and Determination of Seven Synthetic Dyes in Foodstuffs and Soft Drinks on Monolithic C18 Column by High Performance Liquid Chromatography" Journal of Food and Drug Analysis, 16: 77-82

[35] Chen Q., Mou S., Liu K., Yang Z. ve Ni Z., (1997). "Separation and determination of four artificial sweeteners and citric acid by high-performance anion-exchange chromatography", Journal of Chromatography A, 771(1-2): 135-143.

[36] Wasik A., McCourt J. ve Buchgraber M., (2007). "Simultaneous determination of nine intense sweeteners in foodstuffs by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. Development and single-laboratory validation", Journal of Chromatography A, 1157 (1-2): 187-196.

[37] Yang D. ve Chen B., (2009). "Simultaneous Determination of nonnutritive sweeteners in foods by HPLC/ESI-MS", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 3022-3027.

[38] Zhu Y., Guo Y., Ye M. ve James F.S. (2005). "Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography". Journal of Chromatography A 1085: 143-146.

[39] Yamini Y., Saleh A. ve Rezaee M., (2012). "Ultrasound-assisted emulsification microextraction of various preservatives from cosmetics, beverages, and water samples", Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 35(18): 2623-2642

[40] Khan J.A., Salar M., Iqbal Z. Khan A., Nasir F., Khan I.U., Khan M.I., Khan A. ve Zakir S., (2012). "Evaluation of commonly used preservatives in various analgesic suspensions through HPLC and microbial assay", Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 35(13): 1853-1870

[41] Shabir, G. A. (2011). "A sensitive and validated method for determination of four additives in ham sausage by HPLC-DAD method", Journal of Analytical Chemistry, 66: 963-968

[42] Elkady E.F. ve Abbas S.S., (2011). "Development and validation of a reversed-phase column liquid chromatographic method for the determination of five cephalosporins in pharmaceutical preparations", Journal of AOAC International, 94(5): 1440-1446

[43] Hewala I., El-Fatatry H., Emam E. (2011). "Development and application of a validated stability-indicating high-performance liquid chromatographic method using photodiode array detection for simultaneous determination of granisetron, methylparaben, propylparaben, sodium benzoate and their main degradation products in oral pharmaceutical preparations", Journal of AOAC International, 94: 1447-1460

[44] Abdollahpour A., Forouhi M. ve Shamsipur M., (2010). "High performance liquid chromatographic determination of sodium benzoate, methylparaben and propylparaben as preservative components in nystatin suspensions", Journal of The Iranian Chemical Society, 7: 516-520

[45] Louhaichi M.R., Jebali S. ve Loueslati M.H., (2009). "Simultaneous determination of pseudoephdrine, pheniramine, guaifenisin, pyrilamine, chlorpheniramine and dextromethorphan in cough and cold medicines by high performance liquid chromatography" Talanta, 78: 991-997

[46] Vidovic S., Stojanovic B. ve Veljkovic J., (2008). "Simultaneous determination of some water-soluble vitamins and preservatives in multivitamin syrup by validated stability-indicating high-performance liquid chromatography method", Journal of Chromatography A, 1202: 155-162

[47] Kulikov A.U. ve Verushkin A.G., (2008). "Simultaneous determination of paracetamol, caffeine, guaifenesin and preservatives in syrups by micellar LC", Chromatographia, 67(5-6): 347-355

[48] Hadad G.M., El-Gindy A. ve Mahmoud W.M.M., (2008). "New validated liquid chromatographic and chemometrics-assisted UV spectroscopic methods for the determination of two multicomponent cough mixtures in syrup", Journal of AOAC International, 91(1): 39-51

[49] Ali M.S., Ghori M., Rafiuddin S. And Khatri A.R., (2007). "A new hydrophilic interaction liquid chromatographic (HILIC) procedure for the simultaneous determination of pseudoephedrine hydrochloride (PSH), diphenhydramine hydrochloride (DPH) and dextromethorphan hydrobromide (DXH) in cough-cold formulations", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 43: 158-167.

[50] Grosa G., Del Grosso E. ve Russo R., (2006). "Simultaneous, stability indicating, HPLC-DAD determination of guaifenesin and methyl and propyl-parabens in cough syrup", Journal of Pharmaceutıcal and Biomedical Analysis, 41: 798-803.

[51] El-Gindy A., Emara S. ve Mostafa A., (2006). "Application and validation of chemometrics-assisted spectrophotometry and liquid chromatography for the simultaneous determination of six-component pharmaceuticals", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41: 421-430.

[52] El-Gindy A., Emara S. ve Mesbah M.K., (2006). "New validated methods for the simultaneous determination of two multicomponent mixtures containing guaiphenesin in syrup by HPLC and chemometrics-assisted UV-spectroscopy", Analytical Letters, 39: 2699-2723.

[53] Koundourellis J.E., Malliou E.T. ve Broussali T.A., (2000). "High performance liquid chromatographic determination of ambroxol in the presence of different preservatives in pharmaceutical formulations", Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis, 23 (2-3): 469-475.

[54] Liu X., Jiang S.X., Chen L.R., Xu Y.Q. ve Ma P., (1997). "Determination of inorganic ions in oil field waters by single-column ion chromatography", Journal of Chromatography A, 789(1-2): 569-573

[55] Stavchansky S., Demirbaş S., Reyderman L. ve Chai C.K., (1995). "Simultaneous determinatıon of dextrorphan and guaifenesin in human plasma by liquid-chromatography with fluorescence detection", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 13: 919-925.

[56] Papadoyannis I., Samanidou V. ve ZotouA., (1995). "Highly selective simultaneous determination of 8 inorganic anions in drinking-water by single-column high-pressure anion chromatography", Journal of Liquid Chromatography, 18(7): 1383-1403.

[57] Wilson T.D., Jump W.G., Neumann W.C. ve San Martin T., (1993). "Validation of improved methods for high-performance liquid-chromatographic determination of phenylpropanolamine, dextromethorphan, guaifenesin and sodium benzoate in a cough-cold formulation", Journal of Chromatography, 641(2): 241-248.

[58] Kitada Y., Sasaki M., Yamazoe Y., Maeda Y., Yamamoto M. ve Nakazawa H., (1988). "Determination of water-soluble vitamins, sodium benzoate and caffeine in beverage by HPLC", Bunseki Kagaku, 37(11): 561-565.

[59] Atwell S.H., Bell R.G. ve Vyas R., (1992). "HPLC method for the simultaneous determination of acetaminophen, codeine phosphate, sodium benzoate, and methylparaben in acetaminophen and codeine phosphate oral suspension", Pharmacopeial Forum, 18: 3735-3745

[60] Schieffer G.W., Smith W.O., Lubey G.S. ve Newby D.G., (1984). "Determination of the structure of a synthetic impurity in guaifenesin - modification of a high-performance liquid-chromatographic method for phenylephrine hydrochloride, phenylpropanolamine hydrochloride, guaifenesin, and sodium benzoate in dosage forms", Journal of Pharmaceutical Sciences, 73(12): 1856-1858.

[61] Tyler T., (1984). "Liquid-chromatographic determination of sodium saccharin, caffeine, aspartame, and sodium benzoate in cola beverages", Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 67(4): 745-747.

[62] Fisher J.F., (1983). "High-performance liquid-chromatographic determination of sodium benzoate when used as a tracer to detect pulpwash adulteration of orange juice", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 31: 66-68.

[63] Yan Q.H., Yang L. ve Zhang H.R., (2012). "A sensitive and validated method for determination of four additives in ham sausage by HPLC-DAD method", Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 35: 268-279.

[64] Can N.O.,Arli G. ve Lafci Y., (2011). "A novel RP-HPLC method for simultaneous determination of potassium sorbate and sodium benzoate in soft drinks using C18-bonded monolithic silica column", Journal of Separation Science, 34(16-17): 2214-2222.

[65] Antakli S., Alahmad A. ve Badinjki H., (2010). "Simultaneous determination of sodium benzoate and potassium sorbate preservatives in foodstuffs using high performance liquid chromatography", Asian Journal of Chemistry, 22(1-2): 3275-3282.

[66] Pylypiw Jr. H.M. ve Grether M.T., (2000). "Rapid high-performance liquid chromatography method for the analysis of sodium benzoate and potassium sorbate in foods", Journal of Chromatography A, 883: 299-304.

[67] Gianotti V., Angioi S. ve Gosetti F., (2005). "Chemometrically assisted development of IP-RP-HPLC and spectrophotometric methods for the identification and determination of synthetic dyes in commercial soft drinks", Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 28: 923-937.

[68] Zhang Y., Gan T. ve Wan C., (2013). "Morphology-controlled electrochemical sensing amaranth at nanomolar levels using alumina", Analytıca Chimica Acta,764: 53-58.

[69] Kirschbaum J., Krause C. ve Bruckner H., (2006). "Liquid chromatographic quantification of synthetic colorants in fish roe and caviar", European Food Research and Technology, 222: 572-579.

[70] Del Giovine L. ve Bocca A.P., (2003). "Determination of synthetic dyes in ice-cream by capillary electrophoresis", Food Control,14,131-135

[71] Alves, S.P., Brum D.M., Branco De Andrade E.C. ve Netto A.P.P., (2008). Determination of synthetic dyes in selected foodstuffs by high performance liquid chromatography with UV-DAD detection. Food Chemistry,107,489-496

[72] Vidotti E.C., Cancino J.C., Oliveira C.C. ve Rollemberg M.C.E., (2005). "Simultaneous determination of food dyes by first derivative spectrophotometry with sorption onto polyurethane foam", Analytical Sciences, 21: 149-153.

[73] Wang Y., Ni C. ve Zhao M. (2013). "Quantitative determination of potassium sorbate in muddy flesh by near-infrared spectroscopy", Asian Journal of Chemistry, 25: 1481-1484.

[74] Horie M., Ishikawa F., Oishi M., Shindo T., Yasui A. ve Ito K., (2007). "Rapid determination of cyclamate in foods by solid-phase extraction and capillary electrophoresis", Journal of Chromatography A, 1154(1-2): 423-428.

[75] Klockow A., Paulus A. ve Figueiredo V., (1994). "Determination of carbohydrates in fruit juices by capillary electrophoresis and high-performance liquid-chromatography", Journal of Chromatography A, 680: 187-200.

[76] Alizadeh, N., Saburi N. ve Hosseini S.E., (2012). "Rapid determination of benzoate in soft drinks by solid-state benzoate ion selective sensor based on conducting polypyrrole film", Food Control, 28: 315-320.

[77] Zhang H., Qi L., Qiao J. ve Mao L., (2011). "Determination of sodium benzoate by chiral ligand exchange CE based on its inhibitory activity in D-amino acid oxidase mediated oxidation of D-serine", Analytica Chimica Acta, 691: 103-109.

[78] Liu H., Tang Q. ve Markovich R.J., (2011). "A general static-headspace gas chromatographic method for determination of residual benzene in oral liquid pharmaceutical products", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 54: 417-421.

[79] Zhu Z.K., Chen J.G., Wei D.Y. ve Jin X.Z., (2011). "Application of soluble membrane filter in simultaneous determination of trace levels of cadmium, copper, lead and zinc in food additives by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry", Application of Chemical Engineering, 236-238: 2236-2241.

[80] Pino J.A., Queris O., (2010). "Analysis of volatile compounds of pineapple wine using solid-phase microextraction techniques", Food Chemistry, 122: 1241-1246.

[81] Louhaichi M.R., Jebali S. ve Loueslati M.H., (2009). "Simultaneous determination of dextromethorphan hydrobromide, pyrilamine maleate and sodium benzoate in a cough cold syrup by LC", Chromatographia, 69: 421-427.

[82] Popovic G., Cakar M. ve Agbaba D., (2007). "Simultaneous determination of loratadine and preservatives in syrups by thin-layer chromatography", Acta Chromatographica, 19: 161-169.

[83] Huang X.R., Cai Y.M. ve Tai Y., (2005). "Ratio spectrophotometry and its application to assay of compound pharmacy preparations", Spectroscopy And Spectral Analysis, 25: 620-623.

[84] Kompany-Zareh M. ve Mirzaei S., (2004). "Spectrophotometric resolution of ternary mixtures of pseudoephedrine hydrochloride, dextromethorphan hydrobromide, and sodium benzoate in syrups using wavelength selection by net analyte signals calculated with hybrid linear analysis", Analytica Chimica Acta, 526: 83-94.

[85] Sun G.X., Wang Y. ve Sun Y.Q., (2003). "The quantitative determinations of glycyrrhizic acid, glycyrrhetinic acid, morphine, and sodium benzoate in compound liquorice tablets by hpce", Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 26: 43-51.

[86] Saad B., Bee-Leng Y. ve Saleh M.I.,(2001). "Polyvinyl chloride-based membranes for flow injection analysis of quinine in beverages", Journal of AOAC International, 84: 1151-1157.

[87] Pezza L., Santini A.Q. ve Pezza H.R., (2001). "Benzoate ion determination in beverages by using a potentiometric sensor immobilized in a graphite matrix", Analytica Chimica Acta, 433: 281-288.

[88] Lima J.L.F.C., Montenegro M.C., Sales M.G.F., (1996). "Benzoate ion-selective electrode with improved selectivity and reproducibility for benzoate determination in medicinal syrups" Mikrochimica Acta, 124: 35-41.

[89] Dol I., Altesor C. ve Knochen M., (1996). "Application of an optical compensation method to the simultaneous determination of butamirate citrate and sodium benzoate by derivative spectrophotometry in the ultraviolet", Quimica Analitica, 15: 148-153.

[90] Khan S.H., Murawskı M.P. ve Sherma J., (1994). "Quantıtatıve high-performance thin-layer chromatographic determination of organic-acid preservatives in beverages", Journal of Liquid Chromatography, 17: 855-865.

[91] Cobzac S.C., Casoni D. ve Fazakaş A.L., (2012). "Determination of food synthetic dyes in powders for jelly desserts using slit-scanning densitometry and image analysis methods", Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 35: 1429-1443.

[92] Alghamdi, A.H. (2010). "Applications of stripping voltammetric techniques in food analysis", Arabian Journal of Chemistry, 3: 1-7.

[93] Florian M., Yamanaka H. ve Carneiro P.A., (2002). "Determination of brilliant mavisi FCF in the presence and absence of erythrosine and quinoline yellow food colours by cathodic stripping voltammetry", Food Additives And Contaminants, 19: 803-809.

[94] Maslowska J. ve Janiak J., (1997). "Spectrophotometric and polarographic studies on quinoline yellow as a food dye", Deutsche Lebensmittel-Rundscha, 93: 224-227.

[95] Nevado J.J.B, Flores J.R. ve Llerena M.J.V., (1997). "Adsorptive stripping voltammetric determination of quinoline yellow at the hanging mercury drop electrode", Quimica Analitica,16: 51-58.

[96] Capitan F., Capitanvallvey L.F. ve Fernandez M.D.,(1996). "Determination of colorant matters mixtures in foods by solid-phase spectrophotometry", Analytica Chimica Acta, 331: 141-148.

[97] Capitanvallvey L.F., Iglesias N.N. ve Paya I.O., (1996). "Simultaneous determination of quinoline yellow and brilliant mavisi FCF in cosmetics by solid-phase spectrophotometry", Talanta, 43: 1457-1463.

[98] Capitanvallvey L.F., Deorbe I. ve Lopezrodriguez S., (1995). "Determination of unsulphonated quinoline yellow in soft drinks by solid-phase spectrophotometry", Mikrochimica Acta, 117: 129-135.

[99] Medeiros R.A., Lourencao B.C. ve Rocha-Filho R.C., (2012). "Simultaneous voltammetric determination of synthetic colorants in food using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode" Talanta, 97: 291-297.

[100] Casoni D., Boldan A. ve Cobzac S.C., (2012). "TLC-densitometric determination of synthetic food colorants from pharmaceutical powders" Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia, 57: 83-92.

[101] Li J.H., Du G.R., Kang J., Cai W.S. ve Shao X.G., (2011). "Determination of sunset yellow in carbonated drinks by anion exchange resin in combination with near ınfrared diffuse reflectance spectroscopy", Chinese Journal of Analytical Chemistry, 39: 898-901.

[102] Miao X., Wang W. ve Xiong B., (2011). "A separation-free method for simultaneous determination of sucrose and sunset yellow in different abundance by integrating RBI and TL detectors", Analytical Methods, 3: 514-518.

[103] Zhuo J., Wang J. ve Chen X.X., (2011). "Apparatus and approach for rapid determination of synthetic edible pigment in food", Chinese Journal of Analytical Chemistry, 39: 283-287.

[104] Mitic S.S., Micic R.J., Simonovic R.M. (2009). "Analytical application of food dye sunset yellow for the rapid kinetic determination of traces of copper(II) by spectrophotometry", Food Chemistry, 117: 461-465.

[105] Fraige K., Assuncao N.A. ve Pinto R.D.S., (2009). "Analytical assessment of a home made capillary electrophoresis equipment with linear charge coupled device for visible light absorption detection in the determination of food dyes", Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 32: 1862-1878.

[106] Dossi N., Piccin E. ve Bontempelli G., (2007). "Rapid analysis of azo-dyes in food by microchip electrophoresis with electrochemical detection", Electrophoresis, 28: 4240-4246.

[107] Ryvolova M., Taborsky P., Vrabel P. Ve Krasensky P., (2007). "Sensitive determination of erythrosine and other red food colorants using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection", Journal of Chromatography A, 1141: 206-211

[108] Dinc E., Baleanu D. ve Ustundag O., (2005). "Chemometric calibration based on the wavelet transform for the quantitative resolution of two-colorant mixtures", Revue Roumaine De Chimie, 50: 283-290.

[109] Huang H.Y., Chuang C.l. ve Chiu C.W., (2005). "Determination of food colorants by microemulsion electrokinetic chromatography", Electrophoresis, 26: 867-877.

[110] Ozgur M.U., (2004). "A Rapid spectrophotometric method to resolve a binary mixture of food colorants (riboflavine and sunset yellow)", Turkish Journal Of Chemistry, 28: 325-333.

[111] Karl H. ve Koch R., (2003). "Simple photometric method for the determination of the food colours e 110 and e 124 in salmon substitute products", Archiv Fur Lebensmittelhygiene, 54: 8-12.

[112] Fuh M.R. ve Chia K.J., (2002). "Determination of sulphonated azo dyes in food by ion-pair liquid chromatography with photodiode array and electrospray mass spectrometry detection", Talanta, 56: 663-671.

[113] Ozgur M.U., Alpdogan G. ve Koyuncu I., (2002). "Zero-crossing derivative spectrophotometric determination of mixtures of sunset yellow and erythrosine in pure form and in tablets", Analytical Letters, 35: 721-732.

[114] Perez-Urquiza M. ve Beltran J.l., (2000). "Determination of dyes in foodstuffs by capillary zone electrophoresis", Journal of Chromatography A, 898: 271-275.

[115] Bozdogan A, Ozgur M.U. ve Koyuncu I., (2000). "Simultaneous determination of sunset yellow and ponceau 4R in gelatin powder by derivative spectrophotometry and partial least-squares multivariate spectrophotometric calibration", Analytical Letters, 33: 2975-2982.

[116] Nsengiyumva C., Debeer J. ve Vandewauw W., (1997). "An experimental design approach to selecting the optimum liquid chromatographic conditions for the determination of vitamins B-1, B-2-phosphate, B-3, B-6 and C in effervescent tablets containing saccharin and sunset yellow FCF", Chromatographia, 44: 634-644.

[117] Nevado J.J.B., Flores J.R. ve Llerena M.J.V., (1997). "Square wave adsorptive voltammetric determination of sunset yellow", Talanta, 44: 467-474.

[118] Ni Y.N., Bai J.l. ve Jin L., (1997). "Multicomponent chemometric determination of colorant mixtures by voltammetry", Analytical Letters, 30: 1761-1777.

[119] Ni Y.N. ve Bai J.I., (1997). "Simultaneous determination of amaranth and sunset yellow by ratio derivative voltammetry", Talanta, 44: 105-109.

[120] Lau O.W., Poon M.M.K., Mok S.C., (1995). "Spectrophotometric determination of single synthetic food colour in soft drinks using ion-pair formation and extraction", International Journal of Food Science and Technology, 30: 793-798.

[121] Capitanvallvey LF., Fernandez M.D. ve De Orbe I., (1995). "Simultaneous determinatıon of sunset yellow FCF and sudan I by solid-phase spectrophotometry", Analyst, 120: 2421-2424.

[122] Thompson C.O ve Trenerry V.C., (1995). "Determınation of synthetic colors in confectionery and cordials by micellar electrokinetic capillary chromatography", Journal of Chromatography A, 704: 195-201.

[123] Barros A.A. ve Rodrigues J.A.M., (1991). "Polarographic identification and determination of synthetic coloring matter in corks", Electroanalysis, 3: 243-245.

[124] Ertokus G.P. ve Aktas A.H., (2012). "Simultaneous determination of allura red, tartrazine, sunset yellow and caramel in commercial product by potentiometry using chemometry", Revista De Chimie, 63: 772-776.

[125] Gomez M., Arancibia V. ve Rojas C., (2012). "Adsorptive stripping voltammetric determination of tartrazine and sunset yellow in gelatins and soft drink powder in the presence of cetylpyridinium bromide", International Journal of Electrochemical Science, 7: 7493-7502.

[126] Vargas A.M.M., Martins A.C. ve Almeida V.C., (2012). "Ternary adsorption of acid dyes onto activated carbon from flamboyant pods (delonix regia): analysis by derivative spectrophotometry and response surface methodology", Chemical Engineering Journal, 195: 173-179.

[127] Unsal Y.E., Soylak M. ve Tuzen M., (2012). "Column Solid-phase extraction of sunset yellow and spectrophotometric determination of its use in powdered beverage and confectionery products", International Journal of Food Science and Technology, 47: 1253-1258.

[128] Razmara R.S., Daneshfar A. ve Sahrai R., (2011). "Determination of methylene mavisi and sunset yellow in wastewater and food samples using salting-out assisted liquid-liquid extraction", Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 17: 533-536.

[129] Saad A., Nazira S. ve Rasha A., (2011). "Determination of tartrazine and sunset yellow in foodstuffs by derivative spectrophotometric method", Asian Journal of Chemistry, 23: 1825-1828.

[130] Coelho T. M., Vidotti E.C. ve Rollemberg M.C., (2010). "Photoacoustic spectroscopy as a tool for determination of food dyes: comparison with first derivative spectrophotometry", Talanta, 81: 202-207.

[131] Aktas A.H. ve Ertokus G.P., (2010). "Spectral simultaneous determination of tartrazine, allura red, sunset yellow and caramel in drink sample by chemometric method", Reviews in Analytical Chemistry, 29: 107-115.

[132] Rouhani S. ve Haji-Ghasemi T., (2009). "Novel PVC-based coated graphite electrode for selective determination of quinoline yellow", Journal of the Iranian Chemical Society, 6: 679-685.

[133] Llamas N.E., Garrido M., Nezio M.S.D. ve Band B.S.F., (2009). "Second order advantage in the determination of amaranth, sunset yellow FCF and tartrazine by UV-VIS and multivariate curve resolution-alternating least squares", Analytica Chimica Acta, 655: 38-42.

[134] Soponar F., Mot A.C. ve Sarbu C., (2008). "Quantitative determination of some food dyes using digital processing of images obtained by thin-layer chromatography". Journal of Chromatography A, 1188: 295-300.

[135] Silva M.L.S., Garcia M.B.Q., Lima J.L.F.C. ve Barrado E., (2007). "Voltammetric determination of food colorants using a polyallylamine modified tubular electrode in a multicommutated flow system", Talanta, 72: 282-288.

[136] Aktas A.H. ve Pekcan G., (2006). "Simultaneous spectrophotometric determination of tartrazine, sunset yellow and allura red in commercial products by artificial neural network calibration", Asian Journal of Chemistry, 18: 2025-2031.

[137] Vidotti E.C. ve Rollemberg M.C.E., (2006). "Derivative spectrophotometry: a simple strategy for simultaneous determination of food dyes", Quimica Nova, 29: 230-233.

[138] Dinc E, Baleanu D. ve Ustundag O., (2006). "Discrete and continuous wavelet transforms for the multicomponent determination of sunset yellow and tartrazine in their soft drink powders", Revista De Chimie, 57: 29-35.

[139] Doka O., Bicanic D., Ajtony Z., (2005). "Determination of sunset yellow in multi-vitamin tablets by photoacoustic spectroscopy and a comparison with alternative methods", Food Additives and Contaminants, 22: 503-507.

[140] Marsili N.R., Lista A. ve Band B.S.F., (2005). "Evaluation of complex spectral-ph three-way arrays by modified bilinear least-squares: determination of four different dyes in interfering systems" Analyst, 130: 1291-1298.

[141] Ozgur M.U., Koyuncu I., Bozdogan A., (2005). "The resolution of ternary mixtures of dyes by partial least-squares multivariate spectrophotometric calibration and derivative spectrophotometry", Chemia Analityczna, 50: 605-614.

[142] Ishikawa F., Oishi M. ve Kimura K., (2004). "Determination of synthetic food dyes in food by capillary electrophoresis", Journal of the Food Hygienic Society of Japan, 45: 150-155.

[143] Dinc E., Baydan E. ve Kanbur M., (2002). "Spectrophotometric multicomponent determination of sunset yellow, tartrazine and allura red in soft drink powder by double divisor-ratio spectra derivative, inverse least-squares and principal component regression methods", Talanta, 58: 579-594.

[144] Valencia M.C., Uroz F. ve Tafersiti Y., (2000). "A flow-through sensor for the determination of the dye sunset yellow and its subsidiary sudan 1 in foods", Quimica Analitica, 19: 129-134.

[145] Capitanvallvey L.F., Fernandez M.D. ve De Orbe I., (1998). "Simultaneous determination of the colorants tartrazine, ponceau 4R and sunset yellow FCF in foodstuffs by solid phase spectrophotometry using partial least squares multivariate calibration", Talanta, 47: 861-868.

[146] Lopez-De-Alba P.L., Lopezmartinez L. ve Wrobelkaczmarczyk K., (1996). "A new spectrophotometric methods for binary mixtures resolution", Boletin De La Sociedad Chilena De Quimica, 41: 111-119.

[147] Nevado J.J., Flores J.R. ve Llerena M.J., (1993). "Simultaneous determination of tartrazine and sunset yellow by derivative spectrophotometry and ratio spectra derivative", Talanta, 40: 1391-1396.

[148] Gan T., Sun J. ve Cao S., (2012). "One-step electrochemical approach for the preparation of graphene wrapped-phosphotungstic acid hybrid and its application for simultaneous determination of sunset yellow and tartrazine", Electrochimica Acta, 74: 151-157.

[149] Diacu E., Ungureanu E. ve Jurcovan M.M., (2012). "Voltammetric studies for detection and degradation assessment of some synthetic food dyestuffs II. sunset yellow - E-110", Revista De Chimie, 63: 580-583.

[150] Ghoreishi S.M., Behpour M. ve Golestaneh M., (2012). "Simultaneous determination of sunset yellow and tartrazine in soft drinks using gold nanoparticles carbon paste electrode", Food Chemistry, 132: 637-641.

[151] Ni Y.N., Qi M. ve Kokot S., (2001). "Simultaneous spectrophotometric determination of ternary mixtures of tartrazine, sunset yellow, and ponceau 4R by H-point standard addition method", Analytical Letters, 34: 2585-2596.

[152] Sayar S. ve Ozdemir Y., (1998). "First-derivative spectrophotometric determination of ponceau 4R, sunset yellow and tartrazine in confectionery products", Food Chemistry, 61: 367-372.

[153] Lopez-De-Alba P.L., Michelini-Rodriguez L.I. ve Amador-Hernandez J., (1997). "Extraction of sunset yellow and tartrazine by ion-pair formation with adogen-464 and their simultaneous determination by bivariate calibration and derivative spectrophotometry", Analyst, 122: 1575-1579.

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

[155] Capitanvallvey L.F., Iglesias N.N. ve Paya I.D., (1997). "Simultaneous determination of tartrazine and sunset yellow in cosmetic products by first-derivative spectrophotometry", Mikrochimica Acta, 126: 153-157 .

[156] Dominguez F.B., Diego F.G. ve Mendez J.H., (1990). "Determination of sunset yellow and tartrazine by differential pulse polarography", Talanta, 37: 655-658.

[157] Ozgur M.U. ve Koyuncu I., (2002). "The simultaneous determination of quinoline yellow (E-104) and sunset yellow (E-110) in syrups and tablets by second derivative spectrophotometry", Turkish Journal of Chemistry, 26: 501-508.

[158] Capitanvallvey L.F., Fernandez M.D. ve Deorbe I., (1997). "Simultaneous determination of the colorants sunset yellow FCF and quinoline yellow by solid-phase spectrophotometry using partial least squares multivariate calibration", Analyst, 122: 351-354.

[159] Nevado J.J.B., Flores J.R. ve Llerena M.J.V., (1994). "Simultaneous determination of quinoline yellow and sunset yellow by derivative spectrophotometry and ratio spectra derivative", Analytical Letters, 27: 1009-1029.

[160] Maria T. ve Muste S., (2004). "Preliminary research regarding the determination of some synthetic food colorants in food products", Bulletin of the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, 60: 295-299.

[161] Nevado J.J.B., Flores J.R. ve Llerena M.J.V., (1993). "Resolution of ternary mixture of tartrazine, quinoline yellow and sunset yellow by derivative spectrophotometry and ratio spectra derivative", Bulletin Des Societes Chimıques Belges, 102: 527-538.

[162] Rizova V. ve Stafilov T., (1995). "XAD-2 HPTLC method of identification and determination of some synthetic food colorings", Analytical Letters, 28: 1305-1316.

[163] Demir C. (2009). II. Kemometri yaz okulu ders notları, İzmir İleri Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, İzmir.

[164] Munoz M.A., Carmona C. ve Balon M., (2004). "The ground and singlet excited-state hydrogen-bonding interactions of N-methylindole with trifluoroethanol in n-hexane: a model to explain the anomalous fluorescence of indole in polar protic solvents", Chemical Physics Letters, 393(1): 217-221.

[165] Lemos V.A., Vieira D.R., Novaes C.G., Rocha M.E., Santos M.S. ve Yamaki R.T., (2006). "Preconcentration Systems Using Polyurethane Foam/Me-BDBD for Determination of Copper in Food Samples", Microchimica Acta, 153(3-4): 193-201.

[166] Wortel V., Hansen W.G. ve Wiedemann S., (2001). "Optimising multivariate calibration by robustness criteria", Journal of near IR, 9(2): 141-151.

[167] Wiberg K., Sterner A. ve Jacobsson S.P., (2004). "Simultaneous determination of albumin and immunoglobulin G with fluorescence spectroscopy and multivariate calibration", Talanta, 62(3): 567-574.

[168] Ensafi A.A, (2003). "Determination of ascorbic acid by electrocatalytic voltammetry with methylene mavisi" Analytical Letters, 36(3): 591-604.

[169] Gonzalez M.J., Renedo O.D, Lomillo M.A. ve Martinez M.J., (2004). Determination of gallium by adsorptive stripping voltammetry." 62(3): 457-462.

[170] Sereshti H., Khojeh V. ve Samadi S., (2011). "Optimization of dispersive liquid-liquid microextraction coupled with inductively coupled plasma-optical emission spectrometry with the aid of experimental design for simultaneous determination of heavy metals in natural waters", Talanta, 83(3):885-890.

[171] Malaxechevarria Y. ve Millan E., (2009). "Application of Experimental Design to the Optimization of a Wet Acid Digestion Procedure for Cd Determination in Plastic Materials by Atomic Absorption Spectrometry", Spectroscopy Letters, 42(1): 12-19.

[172] Benzo Z., Salas J., Araujo PW., Camardiel A. ve Carrion N., (1998). "Estimation of experimental parameters for the determination of ruthenium by flame atomic absorption spectroscopy" Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 40(1):109-117

[173] Lelievre C., Hennequin D., Barillier D. ve Lemasson F., (1996). "Development of an electrothermic method for rapid determination of trace metals in butter by atomic absorption spectroscopy. Application of the experimental design theory to the determination of copper", ANALUSIS, 24(2): 9-42.

[173] Ferreira A., Korn M.G.A. ve Ferreira S.L.C., (2004). "Multivariate optimization in preconcentration procedure for manganese determination in seawater samples by FAAS" Microchimica Acta, 146: 271-278.

[174] Segade S.R. ve Tyson J.F., (2007). "Determination of methylmercury and inorganic mercury in water samples by slurry sampling cold vapor atomic absorption spectrometry in a flow injection system after preconcentration on silica C-18 modified", Talanta, 71: 1696-1702.

[175] Ferreira S.L.C., Queiroz A.S., Fernandes M.S. ve Dos Santos H.C., (2002). "Application of factorial designs and Doehlert matrix in optimization of experimental variables associated with the preconcentration and determination of vanadium and copper in seawater by inductively coupled plasma optical emission spectrometry", Spectrochimica Acta Part B, 57: 1939-1950.

[176] Soylak M., Narin İ., Bezerra M.A. ve Ferreira S.L.C., (2005). "Factorial design in the optimization of preconcentration procedure for lead determination by FAAS", Talanta, 65: 895-899.

[177] Castro M.T.P.O. ve Baccan N., (2005). "Application of factorial design in optimization of preconcentration procedure for copper determination in soft drink by flame atomic absorption spectrometry", Talanta, 65: 1264-1269.

[178] Tarley C.R.T., Santos W.N.L., Santos C.M., Arruda M.A.Z. ve Ferreira S.L.C., (2004). "Analytical Letters, 'Factorial design and doehlert matrix in optimization of flow system for preconcentration of copper on polyurethane foam loaded with 4-(2-pyridylazo)-resorcinol", 37(7): 1437-1455.

[179] Cerutti S., Salonia J.A., Ferreira S.L.C., Olsina R.A ve Martinez L.D., (2004). "Factorial design for multivariate optimization of an on-line preconcentration system for platinum determination by ultrasonic nebulization coupled to inductively coupled plasma optical emission spectrometry", Talanta, 63: 1077-1082.

[180] Hashemi P., Bagheri S. ve Fathi M.R., (2005). "Factorial design for optimization of experimental variables in preconcentration of copper by a chromotropic acid loaded Q-Sepharose adsorbent", Talanta, 68: 72-78

[181] Santos W.N.L., Santos C.M.C. ve Ferreira S.L.C., (2003). "Application of three-variables Doehlert matrix for optimisation of an on-line pre-concentration system for zinc determination in natural water samples by flame atomic absorption spectrometry", Microchemical Journal, 75: 211-221.

[182] Ferreira S.L.C., Bezerra M.A., Dos Santos W.N.L. ve Neto B.B., (2003). "Application of Doehlert designs for optimisation of an on-line preconcentration system for copper determination by flame atomic absorption spectrometry", Talanta, 61: 295-303.

[183] Dutra R.L., Maltez H.F. ve Carasek E., (2006). "Development of an on-line preconcentration system for zinc determination in biological samples", Talanta, 69: 488-493.

[184] Vanloot P., Boudenne J.L., Brach-Papa C., Sergent M. ve Coulomb B., (2007). "An experimental design to optimize the flow extraction parameters for the selective removal of Fe(III) and Al(III) in aqueous samples using salicylic acid grafted on Amberlite XAD-4 and final determination by GF-AAS", Journal of Hazardous Materials, 147(1-2): 463-470.

[185] Cespon-Romero M. ve Yebra M.C., (2008). "Determination of trace metals in urine with an on-line ultrasound-assisted digestion system combined with a flow-injection preconcentration manifold coupled to flame atomic absorption spectrometry", Analytica Chimica Acta, 609: 184-191.

[186] Vanloot P., Boudenne L.J., Vassalo L., Sergent M. ve Coulomb B., (2007). "Experimental design approach for the solid-phase extraction of residual aluminium coagulants in treated waters", Talanta, 73: 237-245.

[187] Santos W.N.L., Costa J.L.O., Araujo R.G.O. ve Costa A.C.S., (2006). "An on-line pre-concentration system for determination of cadmium in drinking water using FAAS", Journal of Hazardous Materials, 137(3): 1357-1361.

[188] Zougagh M., De Torres A.G., Alonso E.V., Pavon J.M.C., (2004). "Automatic on line preconcentration and determination of lead in water by ICP-AES using a TS-microcolumn", Talanta, 62: 503-510.

[189] Pardo O., Yusa V., Coscolla C., Leon N. ve Pastor A., (2007). "Determination of acrylamide in coffee and chocolate by pressurised fluid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry", Food Additives & Contaminants, 24: 663-672.

[190] Molina M.A., Zhao W., Sankaran S., Schivo M., Kenyon N.J. ve Davis C.E., (2008). "Design-of-experiment optimization of exhaled breath condensate analysis using a miniature differential mobility spectrometer (DMS)", Analytica Chimica Acta, 628 (2): 155-161.

[191] Yusa V., Quintas G., Pardo O., Pastor A. ve de la Guardia M., (2006). "Determination of PAHs in airborne particles by accelerated solvent extraction and large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometry", Talanta, 69(4): 807-815.

[192] Legrand S., Dugay J. ve Vial J., (2003). "Use of solid-phase microextraction coupled with gas chromatography for the determination of residual solvents in pharmaceutical products", Journal of Chromatography A, 999(1-2): 195-201.

[193] Vallejo A., Fernandez L.A., Olivares M., Prieto A., Etxebarria N., Usobiaga A. ve Zuloaga O., (2010) . "Optimization of large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry analysis for the determination of estrogenic compounds in environmental samples", Journal of Chromatography A, 1217(52): 8327-8333.

[194] Bianchi F., Careri M., Mangia A. ve Mattarozzi M. ve Musci M., (2008). "Experimental design for the optimization of the extraction conditions of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk with a novel diethoxydiphenylsilane solid-phase microextraction fiber", Journal of Chromatography A, 1196–1197: 41-45.

[195] Costa S., Barroso M., Castanera A. ve Dias M., (2010). "Design of experiments, a powerful tool for method development in forensic toxicology: application to the optimization of urinary morphine 3-glucuronide acid hydrolysis", Analitical and Bioanalitical Chemistry, 396(7): 2533-3542.

[196] Vincelet C., Roussel J.M. ve Benanou D., (2010). "Experimental designs dedicated to the evaluation of a membrane extraction method: membrane-assisted solvent extraction for compounds having different polarities by means of gas chromatography-mass detection" Analitical and Bioanalitical Chemistry, 396(6):2285-2292.

[197] Basaglia G., Pasti L. ve Pietrogrande M.C., (2011). "Multi-residual GC-MS determination of personal care products in waters using solid-phase microextraction" Analitical and Bioanalitical Chemistry, 399: 2257-2265.

[198] Passeport E., Guenne A., Culhaoglu T., Moreau S., Bouye J.M. ve Tournebize J., (2010). 'Design of experiments and detailed uncertainty analysis to develop and validate a solid-phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 16 pesticides in water ", Journal of Chromatography A, 1217(33): 5317-5327.

[199] Prieto A., Zuloaga O., Usobiaga A., Etxebarria N. ve Fernandez L.A., (2007). "Development of a stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous determination of several persistent organic pollutants in water samples", Journal of Chromatography A, 1174(1-2): 40-49.

[200] Jiye A., Trygg J., Gullberg J., Johansson A.I., Jonsson P., Antti H., Marklund S.L. ve Moritz T., (2005). "Extraction and GC/MS Analysis of the Human Blood Plasma Metabolome", Analtical Chemistry, 77(24): 8086-8094.

[201] Ramirez N., Marce R.M. ve Borrull F., (2011). "Determination of parabens in house dust by pressurised hot water extraction followed by stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry", Journal of Chromatography A, 1218(37): 6226-6231.

[202] Yusa V., Pardo O., Pastor A. ve De La Guardia M., (2006). "Optimization of a microwave-assisted extraction large-volume injection and gas chromatography-ion trap mass spectrometry procedure for the determination of polybrominated diphenyl ethers, polybrominated biphenyls and polychlorinated naphthalenes in sediments", Analytica Chimica Acta, 557(1-2): 304-313.

[203] Nguyen A.T., Aerts T., Van Dam D. ve De Deyn P.P., (2010). "Biogenic amines and their metabolites in mouse brain tissue Development, optimization and validation of an analytical HPLC method", Journal of Chromatography B, 878(29): 3003-3014.

[204] Debrus B., Lebrun P., Ceccato A., Caliaro G., Rozet E., Nistor I., Oprean R., Ruperez F.J., Barbas C., Boulanger B. ve Hubert P., (2011). "Application of new methodologies based on design of experiments, independent component analysis and design space for robust optimization in liquid chromatography", Analytica Chimica Acta, 691(1-2): 33-42.

[205] De Backer B., Debrus B., Lebrun P., Theunis L., Dubois N., Decock L., Verstraete A., Hubert P. ve Charlier C., (2009). "Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material", Journal of Chromatography B, 877 (32): 4115-4124.

[206] Krier F., Brion M., Debrus B., Lebrun P., Driesen A., Ziemons E., Evrard B. ve Hubert P., (2011). "Optimisation and validation of a fast HPLC method for the quantification of sulindac and its related impurities", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 54(4): 694-700.

[207] Belfast M., Lu R., Capen R., Zhong J., Nguyen M.A., Gimenez J., Sitrin R. ve Mancinelli R., (2006). "A practical approach to optimization and validation of a HPLC assay for analysis of polyribosyl-ribitol phosphate in complex combination vaccines", Journal of Chromatography B, 832(2): 208-215.

[208] Nistor I., Cao M., Debrus B., Lebrun P., Lecomte F., Rozet E., Angenot L., Frederich M., Oprean R. ve Hubert P., (2011). "Application of a new optimization strategy for the separation of tertiary alkaloids extracted from Strychnos usambarensis leaves", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 56(1): 30-37.

[209] Bianchini R.M., Castellano P.M. ve Kaufman T.S., (2009). "Development and validation of an HPLC method for the determination of process-related impurities in pridinol mesylate, employing experimental designs", Analytica Chimica Acta, 654(2): 141-147.

[210] Destandau E., Vial J., Jardy A., Hennion M.C., Bonnet D. ve Lancelin P., (2006). "Robustness study of a reversed-phase liquid chromatographic method for the analysis of carboxylic acids in industrial reaction mixtures", Analytica Chimica Acta, 572(1): 102-112.

[211] Nemutlu E., Kir S., Katlan D. ve Beksac M.S., (2009). "Simultaneous multiresponse optimization of an HPLC method to separate seven cephalosporins in plasma and amniotic fluid: Application to validation and quantification of cefepime, cefixime and cefoperazone", Talanta, 80(1): 117-126.

[212] Vucicevic K., Popovic G., Nikolic K., Vovk I. ve Agbaba D., (2009). "An Experimental Design Approach to Selecting the Optimum HPLC Conditions for the Determination of 2-Arylimidazoline Derivatives' Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 32(5): 656-667.

[213] Quiming N.S., Denola N.L., Saito Y., Catabay A.P. ve Jinno K., (2008). "Chromatographic behavior of uric acid and methyl uric acids on a diol column in HILIC", Chromatographia, 67(7-8): 507-515.

[214] RashanJr J. ve Chen R., (2007). "Developing a versatile gradient elution LC/ELSD method for analyzing cellulose derivatives in pharmaceutical formulations", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 44(1): 23-28.

[215] Maragou N.C., Rosenberg E., Thomaidis N.S. ve Kouppa M.A., (2008). "Direct determination of the estrogenic compounds 8-prenylnaringenin, zearalenone, alpha- and beta-zearalenol in beer by liquid chromatography-mass spectrometry", Journal of Chromatography A, 1202(1): 47-57.

[216] Cole D.C., Pagano N., Kelly M.F. ve Ellingboe J., (2004). "Use of design of experiments to optimize high-throughput semipreparative LC and LC/MS methods", Journal of Combinatorial Chemistry, 6(1): 78-82.

[217] Beser M.I., Pardo O., Beltran J. ve Yusa V., (2011). "Determination of per- and polyfluorinated substances in airborne particulate matter by microwave-assisted extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry", Journal of Chromatography A, 1218(30): 4847-4855.

[218] Moberg M., Bergquist J. ve Bylund D., (2006). "A generic stepwise optimization strategy for liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry methods" Journal of Mass Spectrometry, 41(10): 1334-1345.

[219] Switzar L., Giera M., Lingeman H., Irth H., ve Niessen W.M.A., (2011). "Protein digestion optimization for characterization of drug-protein adducts using response surface modeling" Journal of Chromatography A, 1218(13):1715-1723.

[220] Coscolla C., Yusa V., Beser M.I. ve Pastor A., (2009). "Multi-residue analysis of 30 currently used pesticides in fine airborne particulate matter (PM 2.5) by microwave-assisted extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry" Journal of Chromatography A, 1216 (51): 8817-8827.

[221] He J. ve Shamsi S.A., (2009). "Multivariate approach for the enantioselective analysis in micellar electrokinetic chromatography-mass spectrometry I. Simultaneous optimization of binaphthyl derivatives in negative ion mode", Journal of Chromatography A, 1216(5): 845-856.

[222] Hadjmohammadi M.R. ve Nazari S.S.S.J., (2010). "Separation optimization of quercetin, hesperetin and chrysin in honey by micellar liquid chromatography and experimental design" Journal of Separation Science, 33(20): 3144-3151.

[223] Davies M.P., De Biasi V. ve Perrett D., (2004). "Approaches to the rational design of molecularly imprinted polymers", Analytica Chimica Acta, 504(1): 7-14.

[224] Duarte R.M.B.O. ve Duarte A.C., (2011). "Optimizing size-exclusion chromatographic conditions using a composite objective function and chemometric tools: Application to natural organic matter profiling", Analytica Chimica Acta, 688(1): 90-98.

[225] Duarte R.M.B.O. ve Duarte A.C., (2010). "A new chromatographic response function for use in size-exclusion chromatography optimization strategies Application to complex organic mixtures", Journal of Chromatography A, 1217(48): 7556-7563.

[226] Lundgren J., Salomonsson J., Gyllenhaal O., Johansson E., (2007). "Supercritical fluid chromatography of metoprolol and analogues on aminopropyl and ethylpyridine silica without any additives", Journal of Chromatography A, 1154 (1-2): 360-367.

[227] Deshpande G.R., Roy A.K., Rao N.S., Rao B.M. ve Reddy J. R., (2011). "Rapid Screening of Volatile Ion-Pair Reagents Using UHPLC and Robust Analytical Method Development Using DoE for an Acetyl Cholinesterase Inhibitor: Galantamine HBr", Chromatographia 73: 639-648.

[228] Martendal E., Budziak D. ve Carasek E., (2007). "Preparation and application of NiTi alloy coated with ZrO2 as a new fiber for solid-phase microextraction", Journal of Chromatography A, 1164(1-2): 18-24.

[229] Vinci R.M., Canfyn M., De Meulenaer B., De Schaetzen T., Van Overmeire I., De Beer J. ve Van Loco J., (2010). 'Determination of benzene in different food matrices by distillation and isotope dilution HS-GC/MS", Analytica Chimica Acta, 672(1-2): 124-129.

[230] Hadef Y., Kaloustian J., Portugal H. ve Nicolay A., (2008). "Multivariate optimization of a derivatisation procedure for the simultaneous determination of nine anabolic steroids by gas chromatography coupled with mass spectrometry", Journal of Chromatography A, 1190(1-2): 278-285.

[231] Arroyo D., Ortiz M.C. ve Sarabia L.A., (2011). "Optimization of the derivatization reaction and the solid-phase microextraction conditions using a D-optimal design and three-way calibration in the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk by gas chromatography-mass spectrometry", Journal of Chromatography A, 1218(28): 4487-4497.

[232] Pan L., Qiu Y., Chen T., Lin J., Chi Y., Su M., Zhao A. ve Jia W., (2010). "An optimized procedure for metabonomic analysis of rat liver tissue using gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 52(4): 589-596.

[233] Cotton M.L. ve Down G.R.B., (1983). "Reversed-phase high-performance liquid-chromatography of sulindac and related-compounds using a computer-simulation" , Journal of Chromatography A, 259: 17-36.

[234] Dabre R., Schwammle A., Lammerhofer M. ve Lindner W., (2009). "Statistical optimization of the silylation reaction of a mercaptosilane with silanol groups on the surface of silica gel", Journal of Chromatography A, 1216(16): 3473-3479.

[235] Le Mapihan K., Vial J. ve Jardy A., (2004). "Reversed-phase liquid chromatography column testing: robustness study of the test", Journal of Chromatography A, 1061(2): 149-158.

[236] Torres-Lapasio J.R., Pous-Torres S., Baeza-Baeza J.J. ve Garcia-Alvarez-Coque M.C., (2011). "Optimal experimental designs in RPLC at variable solvent content and pH based on prediction error surfaces", Analytical Bioanalytical Chemistry, 400(5): 1217-1230.

[237] Borges C.N., Bruns R.E., Almeida A.A. ve Scarminio I.S., (2007). "Mixture-mixture design for the fingerprint optimization of chromatographic mobile phases and extraction solutions for Camellia sinensis", Analytica Chimica Acta, 595(1-2): 28-37.

[238] Guo Y., Srinivasan S. ve Gaiki S., (2007). "Investigating the effect of chromatographic conditions on retention of organic acids in hydrophilic interaction chromatography using a design of experiment", Chromatographia 66(3-4): 223-229.

[239] Hatambeygi N., Abedi G. ve Talebi M., (2011). "Method development and validation for optimised separation of salicylic, acetyl salicylic and ascorbic acid in pharmaceutical formulations by hydrophilic interaction chromatography and response surface methodology', Journal of Chromatography A, 1218(35): 5995-6003.

[240] Seto C., Bateman K.P. ve Gunter B., (2002). "Development of generic liquid chromatography-mass spectrometry methods using experimental design", Journal of American Society for Mass Spectrometry, 13(1): 2-9.

[241] Cao J., Covarrubias V.M., Straubinger R.M., Wang H., Duan X., Yu H., Qu J. ve Blanco J.G., (2010). "A Rapid, Reproducible, On-the-Fly Orthogonal Array Optimization Method for Targeted Protein Quantification by LC/MS and Its Application for Accurate and Sensitive Quantification of Carbonyl Reductases in Human Liver", Analytical Chemistry, 82(7): 2680-2689.

[242] Wang S.S.C., Liao H.J., Lee W.C., Huang C.M. ve Tsai T.H., (2008). "Using orthogonal array to obtain gradient liquid chromatography conditions of enhanced peak intensity to determine geniposide and genipin with electrospray tandem mass spectrometry", Journal of Chromatography A, 1212(1-2) 68-75.

[243] Urban J., Svec F. ve Frechet J.M.J., (2010). "Hypercrosslinking: New approach to porous polymer monolithic capillary columns with large surface area for the highly efficient separation of small molecules", Journal of Chromatography A,1217(52): 8212-8221.

[244] Toueille M., Uzel A., Depoisier J.F. ve Gantier R., (2011). "Designing new monoclonal antibody purification processes using mixed-mode chromatography sorbents' Journal of Chromatography B, 879(13-14): 836-843.

[245] Gruendling T., Guilhaus M. ve Barner-Kowollik C., (2009). „Design of Experiment (DoE) as a Tool for the Optimization of Source Conditions in SEC-ESI-MS of Functional Synthetic Polymers Synthesized via ATRP", Macromolecular Rapid Communications, 30(8): 589-597.

[246] Ragonese R, Macka M., Hughes J. ve Petocz P., (2002). "The use of the Box-Behnken experimental design in the optimisation and robustness testing of a capillary electrophoresis method for the analysis of ethambutol hydrochloride in a pharmaceutical formulation", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 27(6): 995-1007

[247] Liu H., Wen Y., Luan F. ve Gao Y., (2009). "Application of experimental design and radial basis function neural network to the separation and determination of active components in traditional Chinese medicines by capillary electrophoresis", Analytica Chimica Acta, 638(1) 88-93.

[248] Ben Hameda A., Elosta S. ve Havel J., (2005). "Optimization of the capillary zone electrophoresis method for Huperzine A determination using experimental design and artificial neural Networks", Journal of Chromatography A, 1084(1–2): 7-12.

[249] Liu M., Zheng Y., Ji Y. ve Zhang C., (2011). "Development and validation of a capillary electrophoresis method for the enantiomeric purity determination of RS86017 using experimental design", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 55(1): 93-100.

[250] Loukas Y. L., Sabbah S. ve Scriba G. K.E., (2001). "Method development and validation for the chiral separation of peptides in the presence of cyclodextrins using capillary electrophoresis and experimental design", Journal of Chromatography A, 931(1–2): 141-152.

[251] Vargas M.G., Heyden Y.V., Maftouh M. ve Massart D.L., (1999). "Rapid development of the enantiomeric separation of beta-blockers by capillary electrophoresis using an experimental design approach", Journal of Chromatography A, 855(2):681-693.

[252] Lin Y.H., Yang Y.H. ve Wu S.M., (2007). "Experimental design and capillary electrophoresis for simultaneous analysis of arbutin, kojic acid and hydroquinone in cosmetics", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 44(1): 279-282.

[253] Capella-Peiró M.E., Bose D., Rubert M. F. ve Esteve-Romero J., (2006). "Optimization of a capillary zone electrophoresis method by using a central composite factorial design for the determination of codeine and paracetamol in pharmaceuticals", Journal of Chromatography B, 839(1–2): 95-101.

[254] Ortega N., Albillos S.M. ve Busto M.D., (2003). "Application of factorial design and response surface methodology to the analysis of bovine caseins by capillary zone electrophoresis", Food Control, 14(5): 307-315.

[255] Žunić G. ve Spasić S., (2008). "Capillary electrophoresis method optimized with a factorial design for the determination of glutathione and amino acid status using human capillary blood", Journal of Chromatography B, 873(1): 70-76.

[256] Ficarra R., Cutroneo P., Aturki Z., Tommasini S., Calabrò M.L., Phan-Tan-Luu R., Fanali S. ve Ficarra P., (2002). "An experimental design methodology applied to the enantioseparation of a non-steroidal anti-inflammatory drug candidate", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 29(6): 989-997.

[257] Anurukvorakun O., Suntornsuk W. ve Suntornsuk L., (2006). "Factorial design applied to a non-aqueous capillary electrophoresis method for the separation of beta-agonists", Journal of Chromatography A, 1134 (1–2): 326-332.

[258] Brunnkvist H., Karlberg B., Astervik Å. ve Granelli I., (2004). "Experimental design-based development of a rapid capillary electrophoresis method for determining impurities in the tetrapeptide H-Tyr-(D)Arg-Phe-Phe-NH_2", Journal of Chromatography B, 80(2): 293-300

[259] González J. A., Galindo-Riaño M. D. ve García-Vargas M., (2003). "Factorial designs applied to the development of a capillary electrophoresis method for the analysis of zinc, sodium, calcium and magnesium in water samples", Talanta, 59(4): 775-783

[260] Boonkerd S., Detaevernier M.R., Vander Heyden Y., Vindevogel J. ve Michotte Y., (1996). "Determination of the enantiomeric purity of dexfenfluramine by capillary electrophoresis: Use of a Plackett-Burman design for the optimization of the separation", Journal of Chromatography A, 736(1–2): 281-289.

[261] Papadopoulos V. D., Beligiannis G. N. ve Hela D. G., (2011). "Combining experimental design and artificial neural networks for the determination of chlorinated compounds in fish using matrix solid-phase dispersion", Applied Soft Computing, 11(8): 5155-5164.

[262] Zhu D., Li X., Sun J. ve You T., (2012). "Chemometrics optimization of six antihistamines separations by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection", Talanta, 88: 265-271.

[263] Armenta J. M., Gu B., Humble P. H., Thulin C. D. ve Lee M. L., (2005). "Design and evaluation of a coupled monolithic preconcentrator-capillary zone electrophoresis system for the extraction of immunoglobulin G from human serum", Journal of Chromatography A, 1097(1–2): 171-178.

[264] Bempong D. K. ve Honigberg I. L., (1996). "Multivariate analysis of capillary electrophoresis separation conditions for Z-E isomers of clomiphene", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 15(2): 233-239.

[265] Persson-Stubberud K. ve Åström O., (1998). "Separation of ibuprofen, codeine phosphate, their degradation products and impurities by capillary electrophoresis - I. Method development and optimization with fractional factorial design", Journal of Chromatography A, 798 (1–2): 307-314.

[266] Furlanetto S., Orlandini S., La Porta E., Coran S. ve Pinzauti S., (2002). "Optimization and validation of a CZE method for rufloxacin hydrochloride determination in coated tablets", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 28(6): 1161-1171.

[267] Persson K. ve Åström O., (1997). "Fractional factorial design optimization of the separation of pilocarpine and its degradation products by capillary electrophoresis", Journal of Chromatography B: 697(1–2): 207-215

[268] Mamani M.C.V., Farfán J. A. , Reyes F.G. R. ve Rath S.,(2006). "Simultaneous determination of tetracyclines in pharmaceuticals by CZE using experimental design", Talanta, 70 (2): 236-243.

[269] Maia P.P., Amaya-Farfán J., Rath S. ve Reyes F.G.R., (2007). "Simultaneous determination of streptomycin and oxytetracycline in agricultural antimicrobials by CZE after an experimental design", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 43 (2): 450-456

[270] Hillaert S., Vander Heyden Y. ve Van den Bossche W., (2002). "Optimisation by experimental design of a capillary electrophoretic method for the separation of several inhibitors of angiotensin-converting enzyme using alkylsulphonates", Journal of Chromatography A, 978(1–2): 231-242.

[271] Fabre H. ve Mesplet N., (2000). "Robustness testing for a capillary electrophoresis method using the "short-end injection" technique", Journal of Chromatography A, 897(1–2): 329-338

[272] Ehlen J.C., Albers H.E. ve Breyer E.D., (2005). "MEKC-LIF of gamma-amino butyric acid in microdialysate: Systematic optimization of the separation conditions by factorial analysis", Journal of Neuroscience Methods, 147 (1): 36-47.

[273] Ronda F., Rodríguez-Nogales J.M., Sancho D. ve Gómez B.O.M., (2008). "Multivariate optimisation of a capillary electrophoretic method for the separation of glutenins. Application to quantitative analysis of the endosperm storage proteins in wheat", Talanta, 108 (1): 287-296.

[274] Orlandini S., Giannini I., Pinzauti S. ve Furlanetto S., (2008). "Multivariate optimisation and validation of a capillary electrophoresis method for the analysis of resveratrol in a nutraceutical", Talanta, 74(4): 570-577.

[275] Paugam L., Ménard R., Larue J.P. ve Thouvenot D. (1999). "Optimization of glucosinolate separation by micellar electrokinetic capillary chromatography using a Doehlert's experimental design", Journal of Chromatography A, 864(1): 155-162.

[276] Nevado J.J.B., Cabanillas C.G., Llerena M.J.V. ve Robledo V.R., (2005). "Enantiomeric determination, validation and robustness studies of racemic citalopram in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis", Journal of Chromatography A, 1072(2): 249-257.

[277] De Oliveira M.A.L., Micke G.A., Bruns R.E. ve Tavares M.F.M., (2001). "Factorial design of electrolyte systems for the separation of fatty acids by capillary electrophoresis", Journal of Chromatography A, 924 (1–2): 533-539.

[278] Ballus C.A., Meinhart A.D., Bruns R.E. ve Godoy H.T., (2011). "Use of multivariate statistical techniques to optimize the simultaneous separation of 13 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary electrophoresis", Talanta, 83(4): 1181-1187.

[279] Wan H., Öhman M. ve Blomberg L.G., (2001). "Chemometric modeling of neurotransmitter amino acid separation in normal and reversed migration micellar electrokinetic chromatography", Journal of Chromatography A, 916(1-2): 255-263.

[280] Den Brok M.W.J., Nuijen B., Miranda E., Floriano P., Munt S., Manzanares I. ve Beijnen J.H., (2003). 'Development and validation of a liquid chromatography-ultraviolet absorbance detection assay using derivatisation for the novel marine anticancer agent ES-285-HCl [(2S,3R)-2-amino-3-octadecanol hydrochloride] and its pharmaceutical dosage form", Journal of Chromatography A, 1020(2): 251-258.

[281] Rao R.N., Maurya P.K., Shinde D.D., Khalid S. ve Pharm J., (2011). "Precolumn derivatization followed by liquid chromatographic separation and determination of tramiprosate in rat plasma by fluorescence detector: Application to pharmacokinetics", Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis, 55(2): 282-287.

[282] Space J.S., Opio A.M., Nickerson B., Jiang H., Dumont M. ve Berry M., (2007). "Validation of a dissolution method with HPLC analysis for lasofoxifene tartrate low dose tablets", Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis, 44(5): 1064-1071.

[283] Vermeij T.A.C. ve Edelbroek P.M., (2004). "Simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of pregabalin, gabapentin and vigabatrin in human serum by precolumn derivatization with o-phtaldialdehyde and fluorescence detection", Journal Chromatography B, 810(2): 297-303.

[284] Vermeij T.A.C. ve Edelbroek P.M., (2007). "Robust isocratic high performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of seven antiepileptic drugs including lamotrigine, ox carbazepine and zonisamide in serum after solid-phase extraction", Journal of Chromatography B, 857(1): 40-46.

[285] Ye C., Liu J., Ren F. ve Okafo N., (2000). "Design of experiment and data analysis by JMP (R) (SAS institute) in analytical method validation", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 23(2-3): 581-589.

[286] S.Eral, Parasetamol, (2007). "Kafein ve propifenazon içeren tabletlerin HPLC ile analizinin faktöriyel tasarım ile optimizasyonu", Yüksek Lisans tezi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[287] Volpi N. ve Maccari F. (2007). "Quantitative and qualitative evaluation of chondroitin sulfate in dietary supplements", Food Analytical Methods, 2008, 1: 195-204.

[288] Di Piedra A.M., Cavrini V., Bonazzi D. ve Benfenati L., (1990). "HPLC analysis of aspartame and saccharin in pharmaceutical and dietary formulations", Chromatographia, 30(3-4): 215-219.

[289] Matsumoto H, Hirata K, Sakamaki N, Hagino K, Ushiyama H. 2008. Simultaneous determination of neotame, alitame and aspartame in foods by HPLC. Shokuhin Eiseigaku Zasshi 49,31.

[290] Koyama M., Yoshida K., Uchibori N., Wada I., Akiyama K. ve Sasaki T., (2005). "Analysis of nine kinds of sweeteners in foods by LC/MS" Shokuhin Eiseigaku Zasshi 46(3): 72-78.

[291] Alves Pereira S, Brum Mares D, Branco de Andrade Castello E, Pereira Netto Duarte A. 2008. Determination of synthetic dyes in selected foodstuffs by high performance liquid chromatography with UV-DAD detection. Food Chemistry, 107,489-496.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Dilek KÜÇÜKKARACA

Doğum Tarihi ve Yeri :30.12.1981 İstanbul

Yabancı Dili :İngilizce

E-posta :dilekkaraca@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans			
Lisans	Kimya öğretmenliği	Boğaziçi Üniversitesi	2005
Lise	Kimya	İnönü Meslek Lisesi	1998

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2011	Özel MEF Lisesi	Kimya öğretmeni
2009	Özel İstek Bilge Kağan Lisesi	Kimya öğretmeni
2007	İleri Eğitim Analiz Dershanesi	Kimya öğretmeni