

**İŞLENMİŞ GIDALARIN LEZZETİNİ
DEĞİŞTİRMEK İÇİN KULLANILAN BAZI
KATKI MADDELERİNİN EŞZAMANLI
ANALİZİ**

Burcu SEZGİN

Doktora Tezi

**İŞLENMİŞ GIDALARIN LEZZETİNİ
DEĞİŞTİRMEK İÇİN KULLANILAN BAZI
KATKI MADDELERİNİN EŞZAMANLI
ANALİZİ**

Burcu SEZGİN

Doktora Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Eskişehir, Ocak 2016

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Göksel ARLI

İkinci Tez Danışmanı : Doç. Dr. N. Öncü CAN

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No.1202S035).

Jüri ve Enstitü Onayı

Burcu Sezgin'in "İŞLENMİŞ GIDALARIN LEZZETİNİ DEĞİŞTİRMEK İÇİN KULLANILAN BAZI KATKI MADDELERİNİN EŞZAMANLI ANALİZİ" başlıklı, Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki Doktora tezi, **11 Ocak 2016** tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

| | Adı-Soyadı | İmza |
|---------------------|--|------|
| Üye (Tez Danışmanı) | Prof. Dr. Göksel ARLI Anadolu Üniversitesi | |
| Üye | Prof. Dr. Zeki ATKOŞAR Anadolu Üniversitesi | |
| Üye | Prof. Dr. Sermet KABASAKAL Eskişehir Osmangazi Üniversitesi | |
| Üye | Doç. Dr. Bülent ERGUN Anadolu Üniversitesi | |
| Üye | Yrd. Doç. Dr. Musa ŞÖLENER Eskişehir Osmangazi Üniversitesi | |

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun **26.01.2016** tarih ve**3**..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler:

Karabacakoglu, B., Cetin (Sezgin), B., İyon Değişimi-Elektrodiyaliz Yöntemlerinin Birlikte Kullanımı ile Bazı Ağır Metal İyonlarının Giderimi, Yedinci Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, 5-8 Eylül, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir (2006).

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalıŐmalarım boyunca engin bilgileriyle beni yönlendiren, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen Sayın DanıŐman Hocalarım Prof. Dr. Göksel ARLI ve Doç. Dr. Nafiz nc CAN'a,

ÇalıŐmalarım boyunca akademik yönlendirmeleri ile beni destekleyen Sayın Hocalarım Prof. Dr. Zeki ATKOŞAR ve Doç. Dr. Bülent ERGUN'a,

Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki Sayın Hocalarıma ve çalışma arkadaŐlarıma,

ÇalıŐmalarım süresince her türlü destek ve yardımları ile yanımda olan sevgili eŐim ve aileme,

Sonsuz teŐekkürlerimi sunarım...

İŞLENMİŞ GIDALARIN LEZZETİNİ DEĞİŞTİRMEK İÇİN KULLANILAN BAZI KATKI MADDELERİNİN EŞZAMANLI ANALİZİ

ÖZET

Değişen yaşam şartları ve gelişen teknolojiye bağlı olarak, gıda ve farmasötik ürünlerde çok çeşitli katkı maddeleri kullanılmaktadır. Özellikle gıda güvenliğine verilen önemin artması ve katkı maddelerinin kullanımındaki yasal kısıtlamalardan dolayı, gıda içeriklerinin belirlenmesi güncel bir konu haline gelmiştir. Katkı maddelerinin başlıca kullanım amaçlarından biri gıdaların ve farmasötik ürünlerin lezzetini değiştirmektir ve lezzet değiştiricilerin önemli gruplarından biri de tatlandırıcılardır. Çeşitli sağlık sorunları ve estetik kaygılar nedeniyle tatlandırıcıların tüketimi artmaktadır, dolayısıyla günlük toplam alınan miktarların tahmin edilebilmesi için bunların gıdalardaki ve farmasötik ürünlerdeki miktarlarının belirlenmesi gerekmektedir.

Bu çalışmanın amacı, yaygın kullanılan bazı tatlandırıcıların eş zamanlı analizi için ucuz, basit, hızlı ve duyarlı bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmesi ve Türkiye’de tüketilen çeşitli gıdalar ve farmasötik ürünlere uygulanmasıdır. Önerilen yöntem bir *core-shell* partiküllü kolon (Ascentis® Express C₁₈ (2.7 µm, 100×4.6 mm)) ve asetonyril: su: fosfat tamponu (0.025 M, pH 3.0) içeren bir hareketli faz kullanarak uygulanmıştır. Hareketli faz 1.0 mL dk⁻¹ akış hızında pompalanmış ve analitler fotodiyot dizisi dedektör ile 210 nm dalga boyunda değişken hareketli faz sistemiyle 15 dk’lık bir zaman aralığında tespit edilmiştir.

Yöntemin doğrusalılığı, saptama ve tayin limitleri, tekrar edilebilirliği, doğruluğu ve sağlamlığı değerlendirilmiştir. Geliştirilen yöntem, asesülfam potasyum, sakkarin, aspartam, alitam, neohesperidin dihidrokalkon, rebadiosit A ve neotam olarak adlandırılan yedi yoğun tatlandırıcının tayini için başarıyla uygulanmıştır. Sonuçlar istatistiksel olarak incelenmiş ve gıdalardaki tatlandırıcı seviyeleri mevzuata uygunluk açısından değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: gıda katkı maddeleri, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, işlenmiş gıdalar, lezzet değiştiriciler, tatlandırıcılar.

SIMULTANEOUS ANALYSIS of SOME ADDITIVES USED TO MODIFY THE FLAVOUR of PROCESSED FOODS

ABSTRACT

Depending on the changes in living conditions and developments in technology, various additives are used in food and pharmaceutical products. Determination of food constituents has become a current topic especially as a result of the increase of importance on food security and legal limitations on the use of additives. One of the main purposes of using additives is to modify the flavour of foods and pharmaceuticals, and an important group of flavour modifiers is the sweeteners. The consumption of sweeteners is increasing due to several health problems and esthetic worries, and in consequence, to estimate their daily total intake, it is required to determine the amount of them in foodstuffs and pharmaceuticals.

The aim of this study was development of a cheap, simple, rapid and sensitive high-performance liquid chromatography method for simultaneous analysis of some commonly used sweeteners and its application on various foodstuffs and pharmaceuticals consumed in Turkey. The proposed method was applied using a *core-shell* particle column (Ascentis[®] Express C₁₈ (2.7µm, 100×4.6 mm)) and a mobile phase consisting of acetonitrile: water: phosphate buffer (0.025 M pH 3.0). Mobile phase was pumped at 1 mL min⁻¹ flow rate and analytes were detected at 210 nm wavelength by a photo diode array detector after a gradient run within average time of 15 min.

Linearity, limits of detection and quantitation, repeatability, trueness and ruggedness of the method were evaluated. The developed method was successfully applied for determination of seven intense sweeteners, namely acesulfame potassium, saccharine, aspartame, alitame, neohesperidin dihydrochalcone, rebaudioside A and neotame. The results were examined statistically and sweeteners' levels in foods were evaluated in term of suitability to legislation.

Keywords: food additives, high-performance liquid chromatography, processed foods, flavour modifiers, sweeteners.

| İÇİNDEKİLER | SAYFA |
|---|--------------|
| ÖZGEÇMİŞ | i |
| TEŞEKKÜR | iii |
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT | v |
| İÇİNDEKİLER | vi |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | ix |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xii |
| SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ | xviii |
| GİRİŞ ve AMAÇ | 1 |
| KAYNAK BİLGİSİ | 3 |
| Asesülfam Potasyum'un Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri | 5 |
| Sakkarin'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri | 6 |
| Aspartam'ın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri | 7 |
| Alitam'ın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri | 7 |
| Neohesperidin Dihidrokalikon'un Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri | 8 |
| Rebaudiosit A'nın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri | 8 |
| Neotam'ın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri | 9 |
| Tatlandırıcı Analizleri ile İlgili Yapılmış Çalışmalar | 9 |
| GEREÇLER | 13 |
| Kullanılan Kimyasallar | 13 |
| Kullanılan Cihazlar | 13 |
| YÖNTEMLER | 14 |
| UV-Görünür Alan Spektrofotometrisi Yöntemi | 14 |

| İÇİNDEKİLER (Devam) | SAYFA |
|---|--------------|
| <i>Standart Çözeltilerin Hazırlanışı</i> | 14 |
| <i>Analiz Parametreleri</i> | 14 |
| YPSK Yöntemi | 14 |
| <i>Hareketli Fazın Hazırlanışı</i> | 14 |
| <i>Standart Çözeltilerin Hazırlanışı</i> | 15 |
| <i>Gıda ve Farmasötik Ürün Örneklerinin Hazırlanışı</i> | 15 |
| <i>Analiz Parametreleri</i> | 16 |
| Sonuçların Değerlendirilmesi | 16 |
| Yöntem Geçerliliğinin Tespiti (Validasyon) | 16 |
| <i>Sistem Uygunluk Testleri</i> | 16 |
| <i>Doğrusallık</i> | 17 |
| <i>Doğruluk</i> | 18 |
| <i>Keskinlik</i> | 18 |
| <i>Saptama Sınırı ve Tayin Alt Sınırı</i> | 18 |
| <i>Spesifiklik</i> | 18 |
| <i>Sağlamlık</i> | 19 |
| BULGULAR ve TARTIŞMA | 20 |
| Tatlandırıcıların UV Bölgedeki Spektral Özelliklerinin İncelenmesi | 20 |
| YPSK Yöntemi Geliştirme | 24 |
| YPSK Yönteminin Validasyonu | 34 |
| Örnek Uygulamaları | 50 |
| SONUÇ ve ÖNERİLER | 89 |
| KAYNAKLAR | 90 |

| İÇİNDEKİLER (Devam) | SAYFA |
|---|--------------|
| EK 1 ACE-K standart maddesi analiz sertifikası | 96 |
| EK 2 SAC standart maddesi analiz sertifikası | 97 |
| EK 3 ASP standart maddesi analiz sertifikası | 98 |
| EK 4 ALI standart maddesi analiz sertifikası | 99 |
| EK 5 NHDC standart maddesi analiz sertifikası | 100 |
| EK 6 RBA standart maddesi analiz sertifikası | 101 |
| EK 7 NEO standart maddesi analiz sertifikası | 102 |
| EK 8 Ascentis® Express C₁₈ kolonu performans raporu | 103 |
| EK 9 Ascentis® Express Phenyl-Hexyl kolonu performans raporu | 104 |
| EK 10 Ascentis® Express F5 kolonu performans raporu | 105 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| ÇİZELGE NO VE ADI | SAYFA | |
|-------------------|---|----|
| Çizelge 1 | Tayini gerçekleştirilen tatlandırıcıların özellikleri | 5 |
| Çizelge 2 | Analiz sırasındaki UV parametreleri | 14 |
| Çizelge 3 | Sistem uygunluk parametreleri ile ilgili eşitlikler | 17 |
| Çizelge 4 | Değişken hareketli faz sistemi | 27 |
| Çizelge 5 | İçecek matriksi için SUT sonuçları | 31 |
| Çizelge 6 | Şekerleme matriksi için SUT sonuçları | 32 |
| Çizelge 7 | Reçel matriksi için SUT sonuçları | 33 |
| Çizelge 8 | İçecek matriksi için doğruluk çalışmalarının sonuçları | 34 |
| Çizelge 9 | Şekerleme matriksi için doğruluk çalışmalarının sonuçları | 35 |
| Çizelge 10 | Reçel matriksi için doğruluk çalışmalarının sonuçları | 35 |
| Çizelge 11 | İçecek matriksinde tatlandırıcı standart çözeltileri için kesinlik çalışmalarının istatistiksel değerlendirmesi | 36 |
| Çizelge 12 | Şekerleme matriksinde tatlandırıcı standart çözeltileri için kesinlik çalışmalarının istatistiksel değerlendirmesi | 37 |
| Çizelge 13 | Reçel matriksinde tatlandırıcı standart çözeltileri için kesinlik çalışmalarının istatistiksel değerlendirmesi | 38 |
| Çizelge 14 | İçecek matriksi için ACE-K standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi | 39 |
| Çizelge 15 | İçecek matriksi için SAC standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi | 40 |
| Çizelge 16 | İçecek matriksi için ASP standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi | 40 |

| ÇİZELGE NO VE ADI (Devam) | SAYFA |
|--|--------------|
| Çizelge 17 İçecek matriksi için ALI standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi | 41 |
| Çizelge 18 İçecek matriksi için NHDC standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi | 41 |
| Çizelge 19 İçecek matriksi için RBA standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi | 42 |
| Çizelge 20 İçecek matriksi için NEO standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi | 42 |
| Çizelge 21 Şekerleme matriksi için ACE-K standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi | 43 |
| Çizelge 22 Şekerleme matriksi için SAC standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi | 43 |
| Çizelge 23 Şekerleme matriksi için ASP standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi | 44 |
| Çizelge 24 Şekerleme matriksi için ALI standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi | 44 |
| Çizelge 25 Şekerleme matriksi için NHDC standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi | 45 |
| Çizelge 26 Şekerleme matriksi için RBA standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi | 45 |
| Çizelge 27 Şekerleme matriksi için NEO standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi | 46 |
| Çizelge 28 Reçel matriksi için ACE-K standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi | 46 |

| ÇİZELGE NO VE ADI (Devam) | SAYFA |
|---|--------------|
| Çizelge 29 Reçel matriksi için SAC standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi | 47 |
| Çizelge 30 Reçel matriksi için ASP standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi | 47 |
| Çizelge 31 Reçel matriksi için ALI standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi | 48 |
| Çizelge 32 Reçel matriksi için NHDC standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi | 48 |
| Çizelge 33 Reçel matriksi için RBA standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi | 49 |
| Çizelge 34 Reçel matriksi için NEO standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi | 49 |
| Çizelge 35 Tatlandırıcı karışımı standart çözeltisi için sağlamlık çalışmaları sonuçları | 50 |
| Çizelge 36 Analizi yapılan içecek ürünlerinin tatlandırıcı içerikleri | 51 |
| Çizelge 37 Analizi yapılan şekerleme ürünlerinin tatlandırıcı içerikleri | 52 |
| Çizelge 38 Analizi yapılan reçel ürünlerinin tatlandırıcı içerikleri | 52 |
| Çizelge 39 Analizi yapılan farmasötik ürünlerin tatlandırıcı içerikleri | 53 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| ŞEKİL NO ve ADI | SAYFA |
|---|-------|
| Şekil 1 ACE-K'nın molekül yapısı | 6 |
| Şekil 2 SAC'in molekül yapısı | 6 |
| Şekil 3 ASP'nin molekül yapısı | 7 |
| Şekil 4 ALI'nin molekül yapısı | 8 |
| Şekil 5 NHDC'nin molekül yapısı | 8 |
| Şekil 6 RBA'nın molekül yapısı | 9 |
| Şekil 7 NEO'nin molekül yapısı | 9 |
| Şekil 8 ACE-K'nın UV-görünür bölgedeki spektrumu | 20 |
| Şekil 9 SAC'in UV-görünür bölgedeki spektrumu | 21 |
| Şekil 10 ASP'nin UV-görünür bölgedeki spektrumu | 21 |
| Şekil 11 ALI'nın UV-görünür bölgedeki | 22 |
| Şekil 12 NHDC'nin UV-görünür bölgedeki | 22 |
| Şekil 13 RBA'nın UV-görünür bölgedeki spektrumu | 23 |
| Şekil 14 NEO'nun UV-görünür bölgedeki spektrumu | 23 |
| Şekil 15 Ascentis® Express C ₁₈ (2.7 µm, 100×4.6 mm) kolon için ACE-K, ASP, ALI, NHDC, NEO (10.00 mg/L), SAC (5.00 mg/L) ve RBA (45.00 mg/L) standartlarını içeren çözeltinin kromatogramı | 24 |
| Şekil 16 Ascentis® Express Phenyl-Hexyl (2.7 µm, 100×4.6 mm) kolon için ACE-K, ASP, ALI, NHDC, NEO (10.00 mg/L), SAC (5.00 mg/L) ve RBA (45.00 mg/L) standartlarını içeren çözeltinin kromatogramı | 25 |
| Şekil 17 Ascentis® Express F5 (2.7 µm, 100×4.6 mm) kolon için ACE-K, ASP, ALI, NHDC, NEO (10.00 mg/L), SAC (5.00 mg/L) ve RBA (45.00 mg/L) standartlarını içeren çözeltinin kromatogramı | 25 |

| ŞEKİL NO ve ADI (Devam) | SAYFA |
|--|--------------|
| Şekil 18 ACN:Su (10:90, v/v) içeren hareketli faz ile elde edilen kromatogramlar (a) ACE-K, (b) SAC, (c) ASP, (d) ALI, (e) NHDC, (f) RBA ve (g) NEO | 26 |
| Şekil 19 İçecek matriksi içeren çözeltinin kromatogramı | 28 |
| Şekil 20 Şekerleme matriksi içeren çözeltinin kromatogramı | 28 |
| Şekil 21 Reçel matriksi içeren çözeltinin kromatogramı | 29 |
| Şekil 22 İçecek matriksinde ACE-K, ASP, ALI, NHDC, NEO (10.00 mg/L), SAC (5.00 mg/L) ve RBA (45.00 mg/L) standartlarını içeren çözeltinin kromatogramı | 29 |
| Şekil 23 Şekerleme matriksinde ACE-K, ASP, ALI, NHDC, NEO (10.00 mg/L), SAC (5.00 mg/L) ve RBA (45.00 mg/L) standartlarını içeren çözeltinin kromatogramı | 29 |
| Şekil 24 Reçel matriksinde ACE-K, ASP, ALI, NHDC, NEO (10.00 mg/L), SAC (5.00 mg/L) ve RBA (45.00 mg/L) standartlarını içeren çözeltinin kromatogramı | 30 |
| Şekil 25 Ç marka light gazoz numunesinden elde edilen kromatogram | 54 |
| Şekil 26 LC marka kola numunesinden elde edilen kromatogram | 54 |
| Şekil 27 U marka light gazoz numunesinden elde edilen kromatogram | 55 |
| Şekil 28 U marka light portakal numunesinden elde edilen kromatogram | 55 |
| Şekil 29 U marka light limonata numunesinden elde edilen kromatogram | 56 |
| Şekil 30 D marka limonata numunesinden elde edilen kromatogram | 56 |
| Şekil 31 C Z marka kola numunesinden elde edilen kromatogram | 57 |
| Şekil 32 C marka light kola numunesinden elde edilen kromatogram | 57 |
| Şekil 33 P M marka kola numunesinden elde edilen kromatogram | 58 |
| Şekil 34 P marka light kola numunesinden elde edilen kromatogram | 58 |
| Şekil 35 F marka light şeftali aromalı soğuk çay numunesinden elde edilen kromatogram | 59 |

| ŞEKİL NO ve ADI (Devam) | SAYFA |
|--|--------------|
| Şekil 36 L marka egzotik meyve aromalı soğuk çay numunesinden elde edilen kromatogram | 59 |
| Şekil 37 P marka karışık meyve aromalı izotonik sporcu içeceği numunesinden elde edilen kromatogram | 60 |
| Şekil 38 P marka limon ve greyfurt aromalı izotonik sporcu içeceği numunesinden elde edilen kromatogram | 60 |
| Şekil 39 P marka portakal aromalı izotonik sporcu içeceği numunesinden elde edilen kromatogram | 61 |
| Şekil 40 G marka enerji içeceği numunesinden elde edilen kromatogram | 61 |
| Şekil 41 R marka şekerli enerji içeceği numunesinden elde edilen kromatogram | 62 |
| Şekil 42 S marka şekerli gazoz numunesinden elde edilen kromatogram | 62 |
| Şekil 43 A marka mandalina aromalı soda numunesinden elde edilen kromatogram | 63 |
| Şekil 44 B marka mandalina aromalı gazoz numunesinden elde edilen kromatogram | 63 |
| Şekil 45 A marka limonata numunesinden elde edilen kromatogram | 64 |
| Şekil 46 T marka karanfil aromalı şekerleme numunesinden elde edilen kromatogram | 64 |
| Şekil 47 R marka nane aromalı şekerleme numunesinden elde edilen kromatogram | 65 |
| Şekil 48 R marka keskin nane aromalı şekerleme numunesinden elde edilen kromatogram | 65 |
| Şekil 49 R marka nar-çilek aromalı şekerleme numunesinden elde edilen kromatogram | 66 |
| Şekil 50 R marka ahududu-limon aromalı şekerleme numunesinden elde edilen kromatogram | 66 |
| Şekil 51 R marka mandalina-karpuz aromalı şekerleme numunesinden elde edilen kromatogram | 67 |

| ŞEKİL NO ve ADI (Devam) | SAYFA |
|--|--------------|
| Şekil 52 O marka yeşil nane aromalı draje numunesinden elde edilen kromatogram | 67 |
| Şekil 53 O marka mentol aromalı draje numunesinden elde edilen kromatogram | 68 |
| Şekil 54 MN marka çilek aromalı draje numunesinden elde edilen kromatogram | 68 |
| Şekil 55 MN marka nane aromalı draje numunesinden elde edilen kromatogram | 69 |
| Şekil 56 MN marka portakal aromalı draje numunesinden elde edilen kromatogram | 69 |
| Şekil 57 RS marka çilek aromalı şekerleme numunesinden elde edilen kromatogram | 70 |
| Şekil 58 L marka meyan köklü pastil numunesinden elde edilen kromatogram | 70 |
| Şekil 59 L marka kaktüs aromalı meyan köklü pastil numunesinden elde edilen kromatogram | 71 |
| Şekil 60 L marka ökaliptus aromalı pastil numunesinden elde edilen kromatogram | 71 |
| Şekil 61 Y marka diabetik çilek reçeli numunesinden elde edilen kromatogram | 72 |
| Şekil 62 Y marka diabetik turunç reçeli numunesinden elde edilen kromatogram | 72 |
| Şekil 63 Y marka diabetik ahududu reçeli numunesinden elde edilen kromatogram | 73 |
| Şekil 64 M-L marka diabetik vişne reçeli numunesinden elde edilen kromatogram | 73 |
| Şekil 65 M-L marka diabetik dört meyve reçeli numunesinden elde edilen kromatogram | 74 |
| Şekil 66 M-L marka diabetik turunç reçeli numunesinden elde edilen kromatogram | 74 |
| Şekil 67 M-L marka diabetik çilek reçeli numunesinden elde edilen kromatogram | 75 |

| ŞEKİL NO ve ADI (Devam) | SAYFA |
|--|--------------|
| Şekil 68 T marka diabetik çilek reçeli numunesinden elde edilen kromatogram | 75 |
| Şekil 69 T V marka ağız spreyi örneğinden elde edilen kromatogram | 76 |
| Şekil 70 G D marka çiğneme tableti örneğinden elde edilen kromatogram | 76 |
| Şekil 71 A marka mentollü pastil örneğinden elde edilen kromatogram | 77 |
| Şekil 72 A marka bal ve limon aromalı pastil örneğinden elde edilen kromatogram | 77 |
| Şekil 73 B marka şurup örneğinden elde edilen kromatogram | 78 |
| Şekil 74 D marka pediatrik şurup örneğinden elde edilen kromatogram | 78 |
| Şekil 75 F marka gargara örneğinden elde edilen kromatogram | 79 |
| Şekil 76 M marka gargara örneğinden elde edilen kromatogram | 79 |
| Şekil 77 Z marka oral damla örneğinden elde edilen kromatogram | 80 |
| Şekil 78 S marka süspansiyon örneğinden elde edilen kromatogram | 80 |
| Şekil 79 M marka pastil örneğinden elde edilen kromatogram | 81 |
| Şekil 80 A marka şurup örneğinden elde edilen kromatogram | 81 |
| Şekil 81 M marka oral sprey örneğinden elde edilen kromatogram | 82 |
| Şekil 82 N marka efervesan tablet örneğinden elde edilen kromatogram | 82 |
| Şekil 83 D marka efervesan tablet örneğinden elde edilen kromatogram | 83 |
| Şekil 84 A marka diş protez jeli örneğinden elde edilen kromatogram | 83 |
| Şekil 85 G marka boğaz pastili örneğinden elde edilen kromatogram | 84 |
| Şekil 86 A marka oral jel örneğinden elde edilen kromatogram | 84 |
| Şekil 87 G marka çiğneme tableti örneğinden elde edilen kromatogram | 85 |

| ŞEKİL NO ve ADI (Devam) | SAYFA |
|---|--------------|
| Şekil 88 S marka pastil örneğinden elde edilen kromatogram | 85 |
| Şekil 89 Z D marka çiğneme tableti örneğinden elde edilen kromatogram | 86 |
| Şekil 90 T marka çiğneme tableti örneğinden elde edilen kromatogram | 86 |
| Şekil 91 H V marka efervesan tablet örneğinden elde edilen kromatogram | 87 |
| Şekil 92 K marka şurup örneğinden elde edilen kromatogram | 87 |
| Şekil 93 R marka çiğneme tableti örneğinden elde edilen kromatogram | 88 |

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|----------|---|
| ABD | : Amerika Birleşik Devletleri |
| ACE-K | : Asesulfam potasyum |
| ACN | : Asetonitril |
| α | : Seçicilik faktörü |
| A_s | : Asimetri faktörü |
| ALI | : Alitam |
| ANOVA | : Tek yönlü varyans analizi |
| ASP | : Aspartam |
| BSS | : Bağlı standart sapma |
| CAC | : Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu |
| CYC | : Siklamat |
| DAD | : Diyod dizisi dedektör |
| dk | : Dakika |
| FDA | : Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi |
| FID | : Alev iyonlaştırma dedektörü |
| GKM | : Gıda katkı maddeleri |
| Hz | : Hertz |
| ICH | : Uluslararası Harmonizasyon Konferansı |
| JECFA | : Gıda Katkıları Birleşik Uzman Komitesi |
| k' | : Kapasite faktörü |
| KE | : Kapiler elektroforez |
| KS | : Kütle spektrometresi |
| LOD | : Saptama sınırı |
| LOQ | : Tayin alt sınırı |
| M | : Molarite |
| mAU | : Miliabsorbans birimi |
| MeOH | : Metanol |
| n | : Deney sayısı |
| N | : Teorik tabaka sayısı |

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

| | |
|-------|--|
| NaSAC | : Sodyum sakkarin |
| NaCYC | : Sodyum siklamat |
| NHDC | : Neohesperidin dihidrokalkon |
| NEO | : Neotam |
| PDA | : Fotodiyod dizisi dedektör |
| PVDF | : Poliviniliden florür |
| RBA | : Rebadiosit A |
| r | : Korelasyon katsayısı |
| rpm | : Dakika başına dönüş sayısı |
| SEM | : Ortalamanın standart sapması |
| SIR | : Seçici iyonizasyon kaydedici |
| SK/KS | : Sıvı kromatografi/ kütle spektrometrisi |
| SPE | : Katı faz ekstraksiyonu |
| SS | : Standart sapma |
| SUC | : Sukraloz |
| T | : Kuyruklanma faktörü |
| UHSK | : Ultra hızlı sıvı kromatografi |
| USP | : Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi |
| UV | : Mor ötesi |
| VKİ | : Vücut kitle indeksi |
| WHO | : Dünya Sağlık Örgütü |
| YPİTK | : Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi |
| YPSK | : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi |

GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzün en önemli konularının başında gıda güvenliğinin sağlanması gelmektedir. Gıda güvenliği; insanların yeterli ve dengeli beslenmelerini sağlayacak çeşitlilik ve miktarda, ekonomik erişilebilirliği olan gıdaların sunulması olarak tanımlanabilir. Gıda güvenliğinin sağlanmasında öne çıkan gıda üretiminin artırılması, gıdanın bol bulunduğu dönemden daha az bulunduğu döneme kalitelerini koruyarak saklanması ve raf ömrünün uzatılması gibi durumlar gıda katkı maddelerinin (GKM) kullanımını kaçınılmaz kılmaktadır (Yurttagül ve Ayaz, 2008).

Herhangi bir işleme uğratılmadan tüketilen gıdalar içerisinde gıda kontaminantları da dahil olmak üzere çok sayıda kimyasal madde vardır. İşlenmiş gıdalarda ise bu gruplara ilaveten GKM'de bulunur (Beier, 1990). GKM, besleyici değeri olsun veya olmasın, tek başına gıda olarak tüketilmeyen ve gıdanın karakteristik bileşeni olarak kullanılmayan, teknolojik bir amaç doğrultusunda üretim, muamele, işleme, hazırlama, ambalajlama, taşıma veya depolama aşamalarında gıdaya ilave edilmesi sonucu kendisinin veya yan ürünlerinin, doğrudan veya dolaylı olarak o gıdanın bileşeni olması beklenen maddeleri ifade etmektedir (Anonim, 2013).

Batı ülkelerinde tüketilen gıdaların %75'i işlenmiş ürünlerden oluşmaktadır. Yapılan hesaplamalar batı insanının yılda 5-6 kg veya daha fazla katkı maddesi tükettiğini göstermektedir. Bu maddelerin kullanımı sonucu pek çok sağlık problemi rapor edilmiştir. Bunlar arasında egzama, ürtiker, dermatit, barsak sendromu, bulantı, kusma, ishal gibi gastrik rahatsızlıklar, rinit, bronkospazm, migren, anafaksi, hiperaktivite ve çeşitli davranış bozuklukları sayılabilmektedir (Yetük, 2013).

Günümüzde GKM'nin kullanımı yasalarla düzenlenmektedir. Bu düzenlemelerin amacı, besinlerde kullanılan GKM'nin kötü kullanımını ve sağlık üzerinde oluşabilecek tehlikeleri önlemektir (Çalışır ve Çalışkan, 2003). GKM'nin kullanım izni uluslararası ve ulusal sağlık otoritelerinin yoğun ve dikkatli araştırma ve incelemeleri sonucunda verilmektedir. Bu yönüyle GKM kullanımı insan sağlığının korunması yönünden en sıkı denetim altında tutulan kimyasal madde gruplarından biridir (Gürcan, 1993).

Dünyada GKM ile ilgili çalışmalar, Birleşmiş Milletler'e bağlı Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ile Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) birlikte kurduğu ve Türkiye'nin de üyesi olduğu Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (CAC) tarafından yürütülmektedir. CAC'nin oluşturduğu Gıda Katkı Maddeleri Uzmanlar Komitesi (JECFA) her türlü GKM'nin tüm etkilerini belirlemek için uzun süreli olarak toksikolojik, karsinojenik, teratojenik ve mutajenik açıdan incelemeler yapmaktadır. Sağlığa zararlı olmadığına karar verilen katkı maddeleri için günlük tüketilebilir miktarlar (ADI) saptanmakta ve gıdalarda kullanım sınırları belirlenmektedir. Bunun yanında önemli bir konu bu maddelerin mevzuata uygun olarak kullanılıp kullanılmadığının kontrolüdür (Altuğ, 2009).

GKM'nin en önemli sınıflarından biri tatlandırıcılardır. Gıdaya tatlı tadı veren ancak şeker olmayan maddeler "tatlandırıcı" olarak adlandırılmaktadır. Yapılan araştırmalar, şekerin ve şeker içeren gıda maddelerinin tüketimlerinin diş çürümelerine ve obeziteye sebep oldukları, ayrıca kan şekerini ve serum

trigliseridlerini hızla artırarak diyabetli hastalarda olumsuz etki gösterdiklerini ortaya konmuştur. WHO verilerine göre ülkemizde obezite; vücut kitle indeksi (VKI) ≥ 25 kg/m² olarak alındığında 15 yaş ve üstü erkeklerde %32.5, kadınlarda ise %65.7 gibi ciddi rakamlara ulaşmaktadır. Bu ve benzeri sağlık ve estetik problemler nedeni ile doğal şekerler yerlerini tatlandırıcılara bırakmak zorunda kalmıştır. (Arslan, 2011; Temizkan, 2012).

Bu kapsamda önemli diğer bir konu uzun süreli sınırlandırmalar veya yasakların psikolojilerini olumsuz etkilemesi nedeniyle diyabetli çocuk ve adölesanların beslenmesinde şekeri tamamen çıkarmanın mümkün olmamasıdır. Bu noktada tatlandırıcılar; diyabetli çocuk ve adölesanların beslenmesinde, şekere alternatif olarak kullanılmaktadır (Aksu, 2012).

Ayrıca bu tatlandırıcılar; pastil, çiğneme tableti, şurup, süspansiyon, efervesan tablet, gargara, oral damla ve spreylere gibi birçok farmasötik üründe kötü tadı maskeleyen amacıyla yardımcı madde olarak kullanılmaktadır.

Tat algısının sadece dilde değil bağırsaklarımızda da bulunduğu çalışmalarda kanıtlanmıştır. Bu da tatlandırıcıların, sağladığı yapay tattan öte, metabolizmada aktif rol oynayabileceği konusunda şüpheler doğurmuştur (Temizkan, 2012). Ancak metabolizmadaki etkileri ve çeşitli yönleriyle tartışma konusu olan tatlandırıcıların farklı amaçlarla kullanılmaları günümüz koşullarında kaçınılmaz bir durum haline gelmiştir. Dolayısıyla bu tatlandırıcıların kullanımlarının denetlenmesi ve bu amaca yönelik olarak ucuz, kolay ve duyarlı analiz yöntemlerinin geliştirilmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır. Tatlandırıcıların gıdalardaki ve farmasötik ürünlerdeki miktarlarının tayini özellikle diyabetli hastaların günlük beslenme düzenlerinin oluşturulmasında büyük önem arz etmektedir.

Gerçekleştirilen çalışma kapsamında, ülkemizde ve dünyada oldukça fazla rağbet gören ve özellikle çocukların da tükettiği birçok gıdada ve farmasötik üründe kullanım alanı bulan tatlandırıcıların eş zamanlı tayinine yönelik bir analitik yöntem geliştirilmesi ve geliştirilen bu yöntemin ülkemizde tüketime sunulan çeşitli gıdalarda ve farmasötik ürünlerdeki tatlandırıcıların tayini için kullanımı amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, çalışmanın ilk kısmında yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) cihazı kullanılarak yeni bir sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmesi, optimum çalışma koşullarının belirlenmesi, sistem uygunluk testleri (SUT) ve validasyon çalışmalarının yapılması gerçekleştirilmiştir.

İkinci kısımda ise geliştirilen yöntemin çeşitli gıda ve farmasötik ürün örneklerine uygulanması, elde edilen verilerin değerlendirilerek analizi yapılan ürünlerin hedeflenen bileşikler yönünden profilinin çıkartılması, elde edilen verilerin yasal koşullara uygunluğunun denetlenmesi ve sonuçların yorumlanması yer almaktadır.

KAYNAK BİLGİSİ

Çağımızda dünyanın birçok yerinde gıda üretimi, küçük tarlalar, küçük gıda işletmeleri, ev ve restoran mutfaklarından dev gıda üretim ve işleme tesislerine taşınmıştır. Bu değişimlere bağlı olarak, gıda üretiminde birçok katkı maddesi kullanılmaya başlanmıştır (Zeliger, 2011).

GKM; CAC'ın tanımına göre tek başına gıda olarak kullanılmayan ve gıdanın tipik bir bileşeni olmayan, besleyici değeri olsun veya olmasın, imalat, işleme, hazırlama, uygulama, paketlenme, ambalajlama, taşıma, muhafaza ve depo aşamalarında gıdalara teknolojik amaçla katılan veya bu gıdaların içinde ve yan ürünlerinde doğrudan veya dolaylı olarak bir bileşeni haline gelen veya bunların karakteristiklerini değiştiren maddelerdir. Gıda katkı maddelerinin kullanım amaçları genel olarak;

- a) Gıdaların raf ömrünün uzatılması ve kayıpların azaltılması,
- b) Gıdaların duyu özelliklerinin düzeltilmesi ve geliştirilmesi,
- c) Gıda kalite karakteristiklerinin korunması,
- d) Gıda hazırlanmasına yardımcı olunması,
- e) Besleyici değerin korunması şeklinde sıralanabilmektedir (Altuğ, 2006).

Bir gıdanın lezzetini; koku, tat, ağızda bıraktığı sıcaklık, yumuşaklık ve dolgunluk gibi duyu özellikler oluşturur. Gıdaların lezzetini değiştirmek için kullanılan katkı maddeleri; bu özelliklerden bir veya bir kaçını değiştirerek etki ederler. Bu katkı maddeleri, lezzet modifiye ediciler, lezzet artırıcılar ve tatlandırıcılar şeklinde sınıflandırılabilirler (Matheis, 2007).

Diğer canlılar için olduğu gibi insanlar için de tat duygusu oldukça önem arz etmektedir. Bir gıdanın tadı, gıdanın kalitesi ve besleyici değeri hakkında önemli bilgiler içermektedir (Nelson ve ark., 2001). İnsanın algıladığı tatlar tatlı, acı, tuzlu, ekşi ve umami olmak üzere beş sınıfa ayrılabilir (Lindemann, 2001). Bunlardan en önemlisi antropolojik ve tıbbi nedenlere bağlı olarak tatlılıktır (Meyers ve Brewer, 2008).

GKM içinde önemli bir yere sahip olan tatlandırıcılar, gıdaya tatlı tadı veren ancak şeker olmayan maddelerdir. Tatlandırıcıların üç temel kullanım amacı;

- a) Enerji alımını azaltmak,
- b) Diş çürümelerini azaltmak,
- c) Diyabetliler için uygun tatlı gıdalar hazırlamaktır (Bright, 1999).

Tatlandırıcılar 1900'lü yılların başında ortaya çıkmış ve tüm dünyada özellikle diyabet hastaları tarafından geniş kullanım alanı bulmuştur. Dünyada obezitenin artması ve gelişen sağlık bilinci nedeni ile bireyler şeker tüketimini azaltmaya başlamışlardır. Bu durum tatlı tadı isteyen ancak fazla enerji almak istemeyen bireyler ve tüketicinin beklentisini karşılamak isteyen üreticiler tarafından tatlandırıcı kullanımının desteklenmesi ile sonuçlanmıştır (Yurttagül ve Ayaz, 2008).

İdeal bir tatlandırıcı en az şeker kadar tatlı, renksiz ve kokusuz olmalıdır. Karsinojen olmamalıdır. Tatlı tadını hemen verebilmeli, istenmeyen tat ve kokuya

neden olmamalıdır. Suda çözünebilmeli, asidik ve bazik koşullara ve ısı uygulamalara karşı dayanıklı olmalıdır. Ürünün raf ömrü boyunca stabilitesini korumalıdır. Ürünün içerdiği bileşenlerle uyumlu olmalı ve bu bileşenlerle tepkimeye girmemelidir. Toksik olmamalı, tüketildikten sonra normal bir şekilde metabolize olmalı ve vücutta birikmeden atılmalıdır. İnsan sağlığı için güvenilir olduğu bilimsel olarak kanıtlanmış olmalıdır. Sukroz ve diğer tatlandırıcılara göre ucuz olmalı, kolayca üretilbilmeli ve depolama ve taşıma sırasında problem yaratmamalıdır (Nabors, 2001).

Tatlandırıcılar tatlı tat elde etmek, kan şekeri ve enerji kontrolü sağlamak için birçok gıda ve içecek ürünü yanında farmasötik ürünlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Tatlandırıcıların kullanıldığı ürün grupları; alkolsüz içecekler, meyve suları, tatlılar, dondurmalar, reçel ve marmelatlar, şekerleme ve cikletler, unlu mamüller ve süt ürünleri olarak sıralanabilmektedir. Pastil, çiğneme tableti, şurup, süspansiyon, efervesan tablet, gargara, oral damla ve spreylere gibi farmasötik ürünlerde, diş macunlarında ve ağız çalkalama sularında tatlandırıcılar kullanılmaktadır (Altuğ ve Elmacı, 2006; Vistuba ve ark., 2015).

Türkiye’de tatlandırıcı ile tatlandırılmış ürünlerin ne sıklıkta kullanıldığına dair net veriler olmamakla beraber başka ülkelerin rakamlarına baktığımızda Brezilya’da yapılan bir çalışmada erişkin yaş grubunda bu oran %19 olarak belirtilmiştir (Zanini ve ark., 2011). Avusturalya’da satılan 3 meşrubattan birinin tatlandırıcı içerdiği bildirilmiştir (Barclay ve Brand-Miller, 2011).

Tatlandırıcılar, besleyici nitelikte olup olmamalarına, doğal veya yapay olmalarına göre sınıflandırılabilirler gibi hacim verici ve yoğun tatlandırıcılar olmak üzere iki sınıfa ayrılabilirler. Hacim verici tatlandırıcılar, tatlandırıcılık etkisinin yanı sıra su tutarak hacim verme özelliği bulunan tatlandırıcılardır. Çok düşük miktarda kullandıklarında bile şiddetli tatlılık oluşturma niteliği bulunanlar ise yoğun tatlandırıcılar olarak adlandırılmaktadır (Altuğ ve Elmacı, 2006).

Hacim verici tatlandırıcıların temel sınıfı olan polioller, şeker ve şuruplarının hidrojensasyonu ile elde edilen şeker alkolleridir. En önemli hacim veren tatlandırıcılar; izomalt, ksilitol, laktitol, maltitol, mannitol, sorbitol, eritritol, tagatoz ve trehalozdur. Hacim veren tatlandırıcılar, diş çürümelerine neden olmamaları, şekere göre düşük glikemik cevap oluşturarak diyabetli hastalara uygun olmaları ve şekere göre daha düşük kalorili olmaları nedeniyle tercih edilmektedirler. JECFA tarafından günlük alınabilir miktar sınırlaması yapılmamıştır. Ancak gastrointestinal etkileri nedeniyle yüksek miktarda alımları sakıncalıdır. Polioller içeren ürünlerin “Aşırı tüketimi laksatif etkiye neden olabilir” uyarısını taşıması yasal zorunluluktur (Kroger ve ark., 2006).

Yoğun tatlandırıcılar, tatlılık ve lezzetten ödün vermeksizin yiyecek ve içeceklerin enerji yoğunluğunu başarılı bir şekilde düşürebilmektedirler (Drewnowski, 1999). Yoğun tatlandırıcılar, asesülfam potasyum (ACE-K), siklamik asit, siklamik asit sodyum ve kalsiyum tuzları, sakkarin (SAC) ve sakkarin sodyum ve kalsiyum tuzları, aspartam (ASP), neotam (NEO), alitam (ALI), neohesperidin dihidrokalkon (NHDC), sukraloz, taumatın ve steviol glikozitler olarak sıralanabilir.

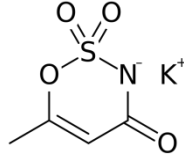
Çalışmamızda, ülkemizde tüketilen gıdalarda ve farmasötik ürünlerde kullanım sıklığı ve yasal izin durumları göz önüne alınarak yoğun tatlandırıcı bileşiklerinden ACE-K, SAC, ASP, ALI, NHDC, NEO ve steviol glikozitlerden rebaudiosit A (RBA)'nın çeşitli gıdalarda ve farmasötik ürünlerde miktar tayini hedeflenmiştir. Çalışmamızda eş zamanlı bir analiz yöntemi ile ayrılması hedeflenen tatlandırıcıların bazı özellikleri ile ilgili bilgiler **Çizelge 1**'de verilmiştir.

Çizelge 1. Tayini gerçekleştirilen tatlandırıcıların özellikleri (Whitehouse ve ark., 2008).

| | ACE | SAC | ASP | ALI | NHDC | RBA | NEO |
|--------------------------------|--------|--------|--------------|--------------|--------|--------|--------------|
| E Kodu | 950 | 954 | 951 | 956 | 959 | 960 | 961 |
| pKa | -0.28 | 1.60 | 3.71 7.55 | 3.71 7.64 | 6.85 | 12.51 | 3.68 8.33 |
| Log P | -1.330 | 0.910 | 0.542 | 1.508 | 0.205 | 0.636 | 3.834 |
| λ_{max} (nm) | 226 | 201 | 196 | 191 | 199 | 195 | 195 |
| MA (g/mol) | 201.24 | 205.17 | 294.31 | 331.43 | 612.58 | 967.01 | 378.47 |
| Tatlılık düzeyi (Sukroza göre) | x200 | x200 | x200- 700 | x2000 | x1500 | x250 | x8000 |
| ADI (mg/kg/gün) | 15 | 5 | 40 | 1 | 5 | 4 | 2 |

Asesülfam Potasyum'un Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

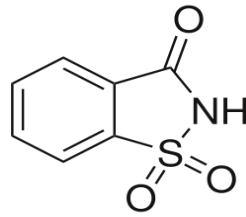
ACE-K 1967 yılında Karl Clauss ve Harold Jensen tarafından bulunmuştur. Kapalı formülü $C_4H_4NO_4SK$ olan ACE-K beyaz, kokusuz ve kristal yapıda bir maddedir. % 3'lük sukroz çözeltisine göre 200 kat daha tatlıdır. Molekül kütlesi 201,24 g/mol'dür. Isıya dayanıklı olduğundan pişirme ve fırınlamada kullanılmaktadır. İnsan vücudunda metabolize edilmediğinden kalorisizdir ve potasyum içeriğine rağmen potasyum alımına etki etmez. Tek başına tatlandırıcı olarak kullanılabilir gibi, ASP ile 1:1 ve 1:5 oranında kullanıldığında en uygun sinerjistik etkiyi yaratır. Oda sıcaklığındaki raf ömrü, ortalama 5 yıldır. Özellikle gazlı ve gazsız alkolsüz içeceklerde kullanımı yaygındır. Bunun yanında meyve nektarları, meyve suyu konsantreleri, süt ürünleri, dondurmalar, tatlılar, marmelatlar, jöleler, reçeller, fırınlanmış ürünler, sakızlar, bazı sebze turşuları, diş macunu, ağız spreyleri üretiminde kullanılmaktadır. JECFA tarafından belirlenen günlük alınabilir miktar vücut ağırlığı başına 15 mg/kg'dır. Literatürde insan sağlığına yönelik problem oluşturduğu rapor edilmemiştir ancak hayvan deneyleri ACE-K'nın kanser riskini artırabileceğini göstermiştir. Ayrıca depolama sırasında içeceklerde oluşabilecek olan bozunma ürünü asetoasetaminin insan sağlığına zararları ile ilgili daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Altuğ ve Elmacı, 2006; Kroger ve ark., 2006; Temizkan, 2012; Whitehouse ve ark., 2008).



Şekil 1. ACE-K'nın molekül yapısı

Sakkarin'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

SAC ilk kez 1879 yılında Constantin Fahlberg tarafından toluen'den sentezlenerek üretilmiştir. İlk kalorisiz yapay tatlandırıcıdır. 1. Dünya Savaşı sırasında şeker yokluğu nedeni ile yaygın kullanımı başlamıştır (Just ve ark., 2008). SAC, sukrozdan yaklaşık 300 kat daha tatlıdır. İnsan vücudunda metabolize olmadığından kalori içeriği sıfırdır. $C_7H_5NO_3S$ formülüne sahip SAC'in molekül kütlesi 183,18 g/mol'dür. Beyaz kristal toz halinde olan SAC bıraktığı acımsı ve metalik tadın maskelenmesi amacıyla genellikle siklamat, ASP, ACE-K veya sukraloz gibi tatlandırıcılarla karıştırılarak kullanılır. Termal dayanıklılık ve farklı pH'larda (pH 2-8) stabiliteye sahip olmasından dolayı fırınlanmış ürünler, salata sosları, reçeller, marmelatlar, gazlı içecekler, meyve konsantreleri ve konserve gıdalar gibi pek çok gıdada kullanılmaktadır. Raf ömrü, gıda maddelerinde 6 ay, ilaçlarda 2 yıl kadardır. Günlük alınabilir miktarı vücut ağırlığı başına 5 mg/kg olan SAC, 1999 yılına kadar Uluslararası Kanser Araştırmaları Komisyonu (IARC)'nun insanlar için kanserojen olabilecek maddeler listesinde yer almış, hayvan deneylerinde gözlenen risklerin insanlar için geçerli olmadığı gerekçesiyle bu listeden çıkarılmıştır. Ayrıca yapılan çalışmalarda, gebe kadınlarda epitel dokuda yapısal değişikliklere neden olabileceği ve anneden bebeğe geçerek birikme yapabileceği belirtilmiştir. Bu nedenle hamile bayanların SAC kullanması yasaklanmıştır (Pinheiro ve ark., 2005; Kroger ve ark., 2006; Whitehouse ve ark., 2008).



Şekil 2. SAC'in molekül yapısı

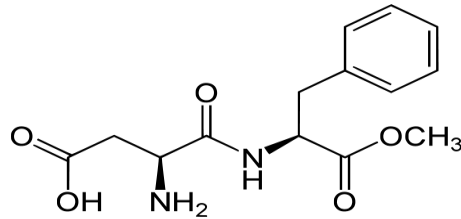
Aspartam'ın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

ASP olarak bilinen N-L- α -aspartil-L-fenilalanin-1-metil ester % 39,5 aspartikasit, % 50 fenilalanin ve % 10,5 metil ester içerir. Kapalı formülü $C_{14}H_{18}N_2O_5$ olan ASP beyaz, kokusuz ve kristal yapıda bir maddedir. % 4 ve % 10'luk sukroz çözeltilisine göre sırasıyla 133 ve 200 kat daha tatlıdır. Molekül kütlesi 294,31 g/mol'dür. Ağızda acı, kimyasal veya metalik bir tat bırakmaz. pH 3-5 arasındaki asidik çözeltilere dayanıklıdır. JECFA tarafından belirlenen günlük alınabilir

miktar vücut ağırlığı başına 40 mg/kg'dır. Birçok ülkede genel amaçlı tatlandırıcı olarak her türlü gıda ve içecek kategorisinde kullanılabilir. ASP içeren gıdaların, fenilketonüri hastalarının uyarılması amacıyla ürünün fenilalanin içerdiğini belirten ibare taşıması zorunludur. Literatürde ASP'nin baş ağrısı ve alerjik rahatsızlıklara neden olduğu bunun yanı sıra beyin tümörü ve meme kanseri riskini artırdığına yer verilmektedir (Pinheiro ve ark., 2005; Kroger ve ark., 2006).

ASP, ince barsakta proteolitik ve hidrolitik enzimlerle, %50 fenilalanin, %40 aspartik asit ve %10 metanole kadar parçalanır (Butchko ve Stargel, 2001). Metanolün büyük bölümü bağırsaklardan emilerek, hızlıca formaldehite, sonra da formik aside dönüşmektedir. Bu durum metabolik asidosise yol açmaktadır. Spazmlar, ani ağrılar, bacakta uyuşma, kramp, vertigo, bulantı, baş ağrısı, eklem ağrısı, bulanık görüş, hafıza kaybı semptomlarına neden olduğu görülmektedir. Beyin tümörleri oluşumu, Multipl Skleroz, epilepsi, alzheimer, parkinson hastalıklarını tetikleyici olabileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır (Whitehouse ve ark., 2008).

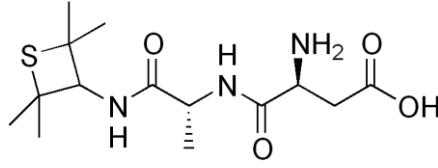
1g ASP, 4 kal enerji vermektedir. ASP'nin stabilitesi zaman, sıcaklık, pH ve su aktivitesine bağlı olarak değişmektedir. Kuru ortamlarda ASP'in minimum raf ömrü 5 yıldır. ASP sulu çözelti halinde 30-80°C sıcaklıkta depolandığında, hızla parçalanarak tatlandırma etkisini kaybetmektedir. Bu nedenle ASP'nin, yüksek sıcaklık uygulanan besinlerde kullanımı uygun değildir. (Whitehouse ve ark., 2008).



Şekil 3. ASP'nin molekül yapısı

Alitam'ın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

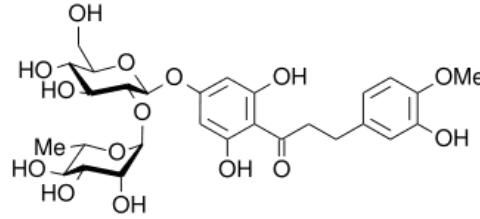
L-alfa-Aspartil-N-(2,2,4,4-tetrametil-3-titanil)-D-alaninamid yapısında bir dipeptid amiddir. Sukroza göre 2000 kat tatlılık verir. Beyaz, kristal, kokusuz toz halindedir ve suda iyi çözünür. Molekül ağırlığı 331.43 g/mol'dür. Oda sıcaklığında pH 5-8 ve pH 2-4 aralığında oldukça stabildir. Yarılanma ömrü ASP'ye göre 2 kat daha fazladır. ACE-K ve CYC veya SAC ile karıştırıldığında sinerjik etki yaratır. ALI'nin yüksek sıcaklıklarda stabilitesi iyi olduğundan ısı işlem görmüş gıdalarda da kullanılabilir. ALI bünyesindeki aspartik asitin metabolize olmasından dolayı 5.8 kJ/g kadar enerji içerir. FDA tarafından belirlenen günlük ADI değeri 1 mg/kg'dır (Nollet, 2004). ALI Avustralya, Yeni Zellanda, Meksika ve Çin gibi ülkelerde kullanılmasına rağmen çoğu Avrupa ülkesinde olduğu gibi ülkemizde de kullanımı yasaktır.



Şekil 4. ALI'nin molekül yapısı

Neohesperidin Dihidrokalikon'un Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

$C_{28}H_{36}O_{15}$ kimyasal formülüne sahip ve molekül kütlesi 612,58 g/mol olan ve neohesperidin hidrojensasyonu ile üretilen NHDC kokusuz kristal yapılı bir maddedir. % 6'lık sukroz çözeltisine göre yaklaşık 400 kat tatlılığı fazladır. Diğer tatlandırıcılarla birlikte düşük derişimlerde kullanıldığında sinerjistik etkisi ile gıdanın tatlılık kalitesini artırır. Günlük alınabilir miktarı vücut ağırlığı başına 5 mg/kg olarak belirlenmiştir (Borrego ve ark., 1994; Castellar ve ark., 1997).

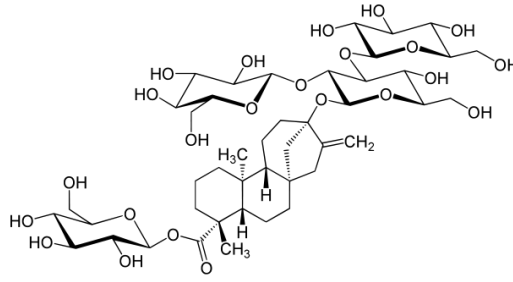


Şekil 5. NHDC'nin molekül yapısı

Rebaudiosit A'nın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Stevia rebaudiana Bertoni adlı bitkinin yapraklarından elde edilen steviol glikositler bitkinin türü ve yetiştirme koşullarına bağlı olarak çeşitli yüzdelerde steviosit, rebaudiosit A (RBA), B, C, D, E, F, dulkosit A, rubusosit ve steviolbiosit içerir (Gardana ve ark., 2010). Bunlardan steviosit ve RBA stevia yapraklarına tatlı tadı veren glikositlerin başındadır. Stevia yapraklarında (kuru madde esasına göre) %3.8 oranında RBA bulunur. Steviol glikozit preparatları beyaz-açık sarı renkte, toz yapıdadır ve suda çözünabilir özelliktedir. Kokusuzdur veya kendine has kokusu olabilir. RBA $C_{44}H_{70}O_{23}$ kimyasal formülüne ve 967,03 g/mol molekül kütlesine sahiptir. RBA % 0,4'lük sukroz çözeltisinden yaklaşık 300 kat daha fazla tatlılık gösterir. Günlük alınabilir miktar vücut ağırlığı başına (steviol olarak) 4 mg/kg'dır (Prakash ve ark., 2008; Wallen, 2007).

RBA sıcak-soğuk içecekler, reçeller, kompostolar, muhallebiler, pastalar, kurabiyeler, deniz ürünleri, şekerlemeler, yoğurtlar, suşi, soya sosu gibi birçok gıdada kullanılmaktadır. Tablet tatlandırıcı halinde 52 hafta, içecekler ve sakızlarda 26 hafta, yoğurt ürünlerinde ise 6 hafta stabil olduğu tespit edilmiştir (Prakash ve ark., 2008).

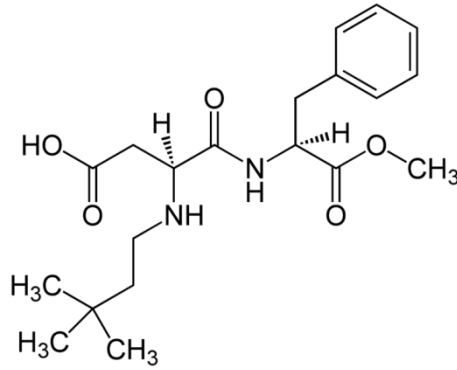


Şekil 6. RBA'nın molekül yapısı

Neotam'ın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

N-[N-(3,3-dimetilbutil)-L-aspartil]-L-fenilalanin-1-metilester yapısındaki NEO, aminoasitler, aspartik asit ve fenilalaninden oluşan bir dipeptittir. Yapısal ve kimyasal olarak ASP'a benzemektedir. Tatlılık derecesi ASP'dan 30–60 kat daha fazla iken, sukrozdan 7000-13000 kez daha tatlıdır. Tatlandırıcı olarak kullanımının yanı sıra aromayı artırıcı (özellikle nane aroması) etkisi de vardır. JECFA 2003 yılında NEO'nun günlük tüketilebilir miktarını 2 mg/kg vücut ağırlığı/gün olarak belirlemiştir (Yılmaz, 2007).

NEO, ciklet, gazlı içecekler, sofralık tatlandırıcılar, dondurulmuş tatlılar, pudingler, dolgu maddeleri, yoğurt tipi ürünler, fırınlanmış ürünler ve şekerlemeleri içeren yiyecek ve içeceklerin üretiminde kullanabilmektedir. NEO, vücutta hızla ve tamamen metabolize olmakta ve vücuttan normal biyolojik yolla atılmaktadır. NEO, diyabet hastalarında glikoz ve insülin derişimini etkilememektedir. Fenilketonürlü hastalar için NEO içeren ürünlerin etiketlenmesine de gerek yoktur. 15-30°C sıcaklık ve %35-60 oranında bağıl nem bulunan bir ortamda depolandığında 5 yıldan fazla stabilitesini korur (Nofre ve Tinti, 2000).



Şekil 7. NEO'nın molekül yapısı

Tatlandırıcı Analizleri ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

Tatlandırıcı bileşiklerini içeren gıdalar, içecekler, diyet ürünleri ve farmasötik ürünlerin analizine yönelik değişik prensiplere dayanan çok sayıda yöntem mevcuttur. Ancak onlarca tatlandırıcı kombinasyonu için çeşitli metotlar bulunmasına rağmen çok sayıda tatlandırıcının tek bir çalışma ile analiz

edilebileceği yeni analitik yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Son zamanlarda çoklu tatlandırıcı analizini içeren metotların yayınlanmasında ilerlemeler görülmektedir.

Tatlandırıcıların analizinde kromatografik yöntemler geniş yer kaplamaktadır. Bu alanda en güncel ve yaygın teknik YPSK'dir. Geniş kolon ve dedektör seçeneğine sahip olması YPSK'yi cazip bir teknik haline getirmektedir. Ters faz sıvı kromatografisi tatlandırıcıların ayrılması için iyi bilinen ve kusursuz uygulanabilen bir tekniktir. YPSK prosedürleri isokratik veya gradient ters faz kromatografisine dayanmaktadır. UV spektrometrisi, amperometri, kulometri, kütle spektrometrisi (KS), spektrofluorometri, ışık saçılma ve kondüktometri gibi çeşitli dedektör sistemleri kullanılmaktadır. Çoklu tatlandırıcı analizine uygun bir teknik olan iyon kromatografisi ayırmalarında ise eluent olarak organik çözücü ortamlı ayırmaların tersine zararsız ve ucuz tuz çözeltileri kullanılmaktadır. Bazı durumlarda ayırma gücü, analiz süresi ve çözücü tüketimi açısından YPSK'ye göre üstünlük gösteren kapiler elektroforez (CE) de eş zamanlı analiz için uygun ve ilgi çeken bir tekniktir. (Zyglar ve ark., 2009).

90'lı yıllarda yapılan çalışmalar çoğunlukla bir veya birkaç tatlandırıcı veya onların bozunma ürünlerinin tayinini kapsayan çalışmalar olarak karşımıza çıkmaktadır. Çalışmalarda çoğunlukla YPSK tekniği tercih edilmiş (Hayakawa ve ark., 1990; Hannisdal, 1992; Bazylak, 1994) iyon kromatografisine de uygulanan teknikler arasında yer verilmiştir (Heitkemper ve ark., 1994).

SAC, ASP, sodyum siklamat, ACE-K ve sitrik asitin tek bir enjeksiyon ile eş zamanlı analizinin hedeflendiği bir çalışmada yüksek performanslı anyon değişim kromatografisi kullanılmış ve uygulanan değişken hareketli faz sistemi sonunda UV dedektör ve iletkenlik dedektörünün birleşiminden oluşan bir sistem ile saptama sağlanmıştır. 2-100 µg/mL derişim aralığında uygun pik alanı cevabı ve doğrusallık gözlenmiştir. Saptama sınırı (LOD) değerleri; UV dedektör ile SAC için 0,019 µg/mL, ASP için 0,035 µg/mL, ACE-K için 0,044 µg/mL, iletkenlik dedektörü ile SAC için 0,26 µg/mL, sodyum siklamat için 0,16 µg/mL, ACE-K için 0,23 µg/mL ve sitrik asit için 0,22 µg/mL elde edilmiştir. Yöntem çeşitli içecekler ve toz tatlandırıcılara uygulanmıştır (Chen ve ark., 1997).

Çeşitli gıda katkı maddelerinin ters faz sıvı kromatografisi ile izokratik olarak ayrılmasına yönelik bir çalışmada, ASP, SAC, ACE-K, vanilin, sorbik asit ve benzoik asit YMC-ODS kolonda %15 amonyum asetat ve farklı yüzdelerde asetonitril içeren bir hareketli fazlar ile ayrılarak fotodiyot dizisi dedektör (DAD) dedektör ile saptanmıştır. Tüm katkı maddeleri 40 dakikalık bir sürede ayrılmıştır ve yöntem LOD, tayin alt sınırına (LOQ), doğrusallık, geri kazanım ve tekrarlanabilirlik açısından incelenmiştir (Demiralay ve ark., 2006).

İçeceklerde yapay tatlandırıcılar, koruyucular ve renklendiricilerin RP-YPSK ile eş zamanlı analizini amaçlayan bir diğer çalışmada, RP C₁₈ kolon kullanılmış ve metanol ve fosfat tamponundan oluşan hareketli faz uygun bir gradient elüsyon programı ile uygulanmıştır. 20 dakikanın altında çalışma zamanı ile başarılı bir ayırma sağlanmış ve 0,1-3,0 mg/L aralığında değişen LOD değerlerine ulaşılmıştır (Dossi ve ark., 2006).

Buharlaştırılmalı ışık saçma dedektörlü (ELSD) bir YPSK metodu ile yapılan bir çalışmada, yoğun tatlandırıcılardan ACE-K, ALI, ASP, siklamik asit, dulsin,

NEO, NHDC, SAC ve sukraloz'un gazlı ve gazsız içeceklerde, konserve ve şişelenmiş meyvelerde ve yoğurtlarda eş zamanlı olarak analizini içeren bir prosedür geliştirilmiştir. Yöntem, dokuz tatlandırıcının bir tampon çözelti ile ekstraksiyonunu, bir katı faz ekstraksiyon (SPE) kartuşu ile örnek hazırlanmasını takip eden bir YPSK-ELSD analizini içermektedir. Geliştirilen yöntemle dulisin dışındakiler için 15 µg/g'ın altında LOD, 30 µg/g'ın altında LOQ değerlerine ulaşılmıştır (Wasik ve ark., 2007). Ayrıca bu çalışma referans alınarak Buchgraber ve Wasik (2009) yedi ayrı laboratuvarında yöntemi uygulayarak yöntemin geçerliliğini test etmişlerdir.

Yang ve Chen (2009), yapmış oldukları çalışmada YPSK-KS yöntemi ile farklı gıdalarda yedi yapay (ASP, SAC, ACE-K, NHDC, sukraloz, ALI, siklamat) ve bir doğal (steviosit) tatlandırıcının saptamasını gerçekleştirmişlerdir. Hedef bileşikler, seçici iyonizasyon kaydedici ile internal standart olarak varfarin sodyum kullanılarak saptanmıştır. 0,10 µg/mL'nin altında LOD, 0,30 µg/mL'nin altında LOQ değerlerine ulaşılmıştır.

ASP, SAC ve sukralozun su ve içecek örneklerinde kromatografik analiz için geliştirilen bir metotta tatlandırıcılar su örneklerinden SPE kartuşları ile ekstrakte edilerek, bazı içeceklerde ise SPE olmaksızın sıvı kromatografisi-uçuş zamanı KS ile hızlı ve kolay şekilde analiz edilmiştir. Tatlandırıcıların kütle ölçümleri 2 ppm'in altında hata ile gerçekleştirilmiştir (Ferrer ve Thurman, 2010).

Bir başka çalışmada ASP, ACE-K, SAC ve indirgenme ürünleri bir SPE yöntemi ile lassi adlı içecekten izole edilerek YPSK yöntemi ile C₁₈ kolonda ayrılmış ve UV dedektör ile eşzamanlı olarak saptanmıştır. Çalışmada ayrıca lassiden sukraloz izolasyonu için kolay bir yöntemi geliştirilerek sukralozun yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi plakalarında kalitatif ve kantitatif tayini gerçekleştirilmiştir (George ve ark., 2010). Bu çalışmada olduğu gibi UV dedeksiyon tekniği tatlandırıcı tayinleri için son yıllarda kullanılan en yaygın tekniklerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır (Zhao ve ark., 2013; Bililign ve ark., 2014; Grembecka ve ark., 2014; Ma ve ark., 2014; Liu ve ark., 2014).

İçecekler, süt ve balık ürünleri gibi çeşitli gıdalarda dokuz yoğun tatlandırıcının (ACE-K, ASP, ALI, siklamat, dulsin, NHDC, NEO, SAC ve sukraloz) SPE ve YPSK-KS'i içeren bir analitik yöntem ile belirlendiği bir diğer çalışmada, analitler gradient elüsyon modunda C₁₈ kolonda ayrılmış ve negatif iyon modundaki bir elektrosprey kaynağı ile çalışan KS ile saptanmıştır. Metot doğrusalılık, LOD ve LOQ, doğruluk ve saptanabilirlik gibi validasyon parametreleri açısından irdelenmiştir. 0,25 µg/g'ın altında LOD, 2,5 µg/g'ın altında LOQ değerleri elde edilmiştir (Zygler ve ark., 2011).

Serdar ve Knežević (2011)'in çalışmalarında yapay tatlandırıcılardan ASP, ACE-K, SAC ve siklamat, içeceklerde ve özel beslenme ürünlerinde YPSK yöntemi ile saptanmıştır. Çalışmada ASP, ACE-K ve SAC için sokratik elüsyon ile bir YPSK yöntemi kullanılmıştır. Siklamat için ise C₁₈ kolonda metanol ve suyun hareketli faz olarak kullanıldığı ayrı bir YPSK yöntemi geliştirilmiştir. Her iki yöntemde de DAD kullanılmış ve optimum koşullar altında her iki yöntemin de doğrusalılık, kesinlik ve geri kazanım olarak iyi analitik performans gösterdiği belirtilmiştir.

Kokotou ve Thomaidis (2013) yaptıkları çalışmada sekiz yapay tatlandırıcının (ACE-K, ASP, ALI, siklamat, NHDC, NEO, SAC ve sukraloz) hidrofilik

etkileşim sıvı kromatografisi (HILIC) kullanarak eş zamanlı tayinini içeren bir yöntem geliştirmişlerdir. Çalışmada iki farklı silika bazlı kolon karşılaştırılmış, optimizasyon için hareketli faz, kolon sıcaklığı, pH ve tampon iyonik gücü parametrelerinin etkisi incelenmiştir. Yöntem şebeke suyu ve atık sular için valide edilmiş 0.24-4.4 µg/L aralığında değişen LOD ve %39-97 aralığında değişen geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

NEO'ın alkolsüz içeceklerde tayinine yönelik olarak geliştirilen bir kapiler zon elektroforez (CZE) yönteminde SPE uygulanmış ve 191 nm'de UV dedektör ile saptama gerçekleştirilmiştir. 0.118 µg /L LOD ve %90-95 aralığında geri kazanım değeri elde edilen çalışmada yöntem içecek numunelerine 5 dk'nın altında sürelerde başarıyla uygulanmıştır (Hu ve ark., 2013). CZE yöntemi gıda ve ilaç örneklerinde ASP, siklamat, ACE-K ve SAC'in tayininde 1 dk'dan kısa sürede ayırım gerçekleştirilmiş, 3.3-6.4 mg /L LOD ve %91-117 aralığında geri kazanım değerleri elde edilmiştir (Vistuba ve ark., 2015).

ACE-K ve ASP eş zamanlı analizlerinde kullanılan bir diğer yöntem de voltametridir. Hem doğrusal taramalı (Pierini ve ark., 2013) hem de diferansiyel puls (Deroco ve ark., 2015) voltametri teknikleri ile bu tatlandırıcıların tayinleri başarıyla gerçekleştirilmiştir. Diğer elektroanalitik yöntemlere göre daha düşük saptama sınırları yöntemi cazip kılmaktadır.

Midey ve arkadaşlarının (2013) yaptığı çalışmada ise yapay tatlandırıcılar yanında ftalat ve çeşitli renklendiricileri yüksek performanslı iyon mobilite spektrometri tekniği ile ayırma hedeflenmiştir. Tekniğin avantajı kısa sürede sonuçlanması ve zahmetli örnek hazırlama basamağı gerektirmemesi yanında düşük LOD değerlerine erişilebilmesi olarak karşımıza çıkmaktadır.

Son yıllarda YPSK-KS/KS yöntemi farmasötik ürünler, çeşitli gıdalar ve kişisel bakım ürünlerinin tatlandırıcı içeriğinin eş zamanlı belirlenmesinde en yaygın tekniklerden biri haline gelmiştir (Tran ve ark., 2013; Tsuruda ve ark., 2013; Kokotou ve Thomaidis, 2013; Lim ve ark., 2013; Chang ve Yeh, 2014; Kubica ve ark., 2015; Ordoñez ve ark., 2015; Arbeláez ve ark., 2015). Erişilen yüksek geri kazanım yüzdeleri, düşük LOD ve LOQ değerleri yöntemi cazip kılmaktadır.

Benzer şekilde son yıllarda öne çıkan diğer bir teknik de yüksek hız, kesinlik, doğruluk ve geri kazanım ve düşük LOD ve LOQ değerleri gibi artıları ile ultra performanslı sıvı kromatografisi (UYPSK) tekniğidir. Teknik başarıyla çeşitli gıda ürünleri (Lorenzo ve ark., 2015; Shah ve ark., 2015; Morlock ve ark., 2014) ve atık sularda (Wu ve ark., 2014) eş zamanlı analiz amaçlı uygulanmıştır.

Tatlandırıcı analizlerinde raman spektroskopisi (Büyükgöz ve ark., 2015); nanomembran teknolojisi ve YPSK'ni birleştiren seçici teknikler (Moein ve ark., 2015); eş zamanlı analize imkan veren spektrofotometrik teknikler (Turak ve Özgür, 2013) ve iki boyutlu YPSK tekniği de (Hou ve ark., 2015) kullanım imkanı bulabilmektedir.

GEREÇLER

Kullanılan Kimyasallar

Standart maddeler olarak kullanılan tatlandırıcılardan ACE-K, SAC, ASP, NHDC, RBA ve NEO Sigma-Aldrich (ABD) firması, ALI Toronto Research Chemicals (Kanada) firması tarafından tedarik edilmiştir. YPSK saflıktaki ACN Merck KGaA (Almanya) firmasından, fosfat tamponu hazırlamak için kullanılan %99.8 saflıktaki NaH_2PO_4 ve %99.6 saflıktaki $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Sigma-Aldrich (ABD) firmasından, YPSK saflıktaki su Merck KGaA (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Analizi yapılmış olan farklı markalardaki gıda örnekleri Türkiye'deki çeşitli marketlerden ve farmasötik ürün örnekleri ise çeşitli eczanelerden temin edilmiştir.

Kullanılan Cihazlar

Geliştirilen YPSK yönteminde LC-20AT model LPGE ünitesi takılmış gradient pompa, SIL-20A otomatik örnekleyici, CBM-20A model iletişim ünitesi, CTO-10-ASvp model kolon fırını, SPD-M20A model foto diyot dizisi dedektörü ve DGU-20A5 model gaz giderme ünitesinden oluşan Shimadzu (Japonya) firmasının ürünü YPSK cihazının yanında Intel Pentium 4 işlemcili bilgisayar ve Shimadzu LabSolution LCsolution v1.11 SP1 veri analiz programı kullanılmıştır.

Spektrofotometrik çalışmalar Shimadzu (Japonya) marka UV-2450 UV-vis spektrofotometrede yapılmıştır. Ölçümlerde 1 cm ışık yoluna sahip kuvars küvetler kullanılmıştır. Kimyasal maddelerin tartımında Mettler Toledo (İsviçre) marka Excellence Plus XP-205 model analitik terazi, çözeltilerin hazırlanmasında 100-1000 μL ve 20-100 μL aralığında çalışabilen Eppendorf (Almanya) marka Research model pipetörler, çözeltilerin içindeki çözünmüş gazın uzaklaştırılması için Bandelin (Almanya) marka RK 100H Sonorex model ultrasonik banyo ve çözeltilerin pH'ını ayarlama Mettler Toledo (İsviçre) marka Seven multi model pH metre, çözeltilerin süzülmesinde 0.2 μm gözenekli 50 mm çaplı Whatman (Almanya) marka rejenere selüloz membran filtreler, örneklerin süzülmesinde ise 0.2 μm gözenek çapına sahip Orange Scientific (Belçika) marka 13 mm çaplı steril polivinildenflorür (PVDF) membran filtreler kullanılmıştır. Sabit faz olarak Sigma-Aldrich (ABD) firmasının ürünü olan Ascentis® Express C₁₈ (2.7 μm , 100×4.6 mm), Ascentis® Express Phenyl-Hexyl (2.7 μm , 100×4.6 mm), Ascentis® Express F5 (2.7 μm , 100×4.6 mm) YPSK analiz kolonları kullanılmıştır. Analizler sırasında kolonların korunması amacıyla kolonlarla uyumlu aynı markanın ön kolonları (2.7 μm , 5×4.6 mm) kullanılmıştır.

YÖNTEMLER

UV-Görünür Alan Spektrofotometrisi Yöntemi

Standart Çözeltilerin Hazırlanışı

Geliştirilecek olan YPSK yönteminde sinyallerin tespitinde foto diyot dizisi dedektör kullanılacağından çalışılacak olan ışımaya bölgesinin belirlenebilmesi için standartların UV-spektroskopisi ile UV-görünür bölgedeki davranışlarının incelenmesi gerçekleştirilmiştir.

UV-spektrofotometrik yöntemde kullanılmak üzere her bir tatlandırıcı standart maddesini içeren standart çözeltiler ACN:Su (30:70, v/v) ortamında hazırlanmış ve 1×10^{-5} M olarak şekilde seyreltilmiştir.

Analiz Parametreleri

UV-spektrofotometrisi ile yapılan ölçümlerde maddenin maksimum absorbans verdiği dalga boyunu tespit edebilmek amacıyla spektrum taraması yapılmıştır. Analiz sırasındaki aletsel parametreler **Çizelge 2**'de verilmiştir.

Çizelge 2. Analiz sırasındaki UV parametreleri

| Parametre | Değer |
|--------------------|------------|
| Tarama aralığı | 190-400 nm |
| Ölçüm modu | Absorbans |
| Tarama modu | Tek |
| Tarama hızı | Orta |
| Örnekleme aralığı | 0.2 nm |
| Işık yolu uzunluğu | 1.0 cm |
| Aralık genişliği | 0.5 nm |

YPSK Yöntemi

Hareketli fazın hazırlanışı

Analizler boyunca değişken hareketli fazla elüsyon yapılmıştır. Hareketli faz ACN, Fosfat tamponu (0.025 M pH 3.0) ve YPSK saflıktaki su karışımından oluşmaktadır. Fosfat tamponu (0.025 M pH 3.0) için 3272.2 mg %99.6 saflıktaki $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılmış ve 1.695 g/mL yoğunlukta %86 saflıkta H_3PO_4 'dan 1.646 mL eklenerek 1000 mL'ye YPSK saflıktaki su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan tampon çözeltisi 0.2 μm gözenek boyutlu selüloz membran filtreden vakum altında süzülerek olası çözünmeyen partiküllerden arındırılmıştır. Çözelti içindeki çözülmüş gazların uzaklaştırılması için yaklaşık 10 dk ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Belirtilen çözücülerin istenen oranlarda karıştırılarak sisteme verilmesi YPSK cihazının pompa ünitesi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Standart çözeltilerin hazırlanışı

ACE-K, SAC, ASP, ALI, NHDC, RBA, NEO standart stok çözeltileri için 2.5 mg standart madde tartılıp 25 mL balon jode ACN: Fosfat tamponu (0.025 M pH 3.0): Su (35:50:15, v/v/v) kullanılarak çözülmüş ve 1000 µg/mL tatlandırıcı stok çözeltileri hazırlanmıştır. Son derişimler ACE-K, ASP, ALI, NHDC, NEO çözeltileri için 100 µg/mL, SAC çözeltisi 50 µg/mL, RBA çözeltisi 450 µg/mL olacak şekilde seyreltme için ACN: Fosfat tamponu (0.025 M pH 3.0): Su (35:50:15, v/v/v) kullanılarak tatlandırıcı standart karışımı hazırlanmıştır.

Validasyon çalışmaları içecek, şekerleme ve reçel olmak üzere üç ayrı matriks ortamında gerçekleştirilmiştir. İçecek matriksinde tatlandırıcı karışımı hazırlamak için ultrasonik banyoda 10 dk bekletilmiş hedef maddeleri içermeyen içecek örneğinden 1 mL, hazırlanan tatlandırıcı karışımdan 1 mL alınmış ve ACN: Fosfat tamponu (0.025 M pH 3.0): Su (35:50:15, v/v/v) karışımı ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan son karışım ultrasonik banyoda 10 dk bekletildikten sonra 0,2 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyona hazır hale getirilmiştir.

Şekerleme matriksinde tatlandırıcı karışımı hazırlamak için hedef maddeleri içermeyen toz haline getirilmiş şekerleme örneğinden 0,1 g tartılmış, hazırlanan tatlandırıcı karışımdan 1 mL alınmış ve ACN: Fosfat tamponu (0.025 M pH 3.0): Su (35:50:15, v/v/v) karışımı ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan son karışım ultrasonik banyoda 10 dk bekletildikten sonra 0,2 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyona hazır hale getirilmiştir.

Benzer şekilde reçel matriksinde tatlandırıcı karışımı hazırlamak için hedef maddeleri içermeyen homojenize edilmiş reçel örneğinden 0,1 g tartılmış, hazırlanan tatlandırıcı karışımdan 1 mL alınmış ve ACN: Fosfat tamponu (0.025 M pH 3.0): Su (35:50:15, v/v/v) karışımı ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan son karışım ultrasonik banyoda 10 dk bekletildikten sonra 0,2 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyona hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan tüm çözeltiler 4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

Gıda ve farmasötik ürün örneklerinin hazırlanışı

Yapılan çalışmalarda Türkiye'deki çeşitli marketlerden temin edilmiş olan 3 adet limonata, 2 adet buzlu çay, 11 adet gazlı içecek, 5 adet enerji içeceği, 15 adet şekerleme, 8 adet reçel ve 25 adet farmasötik ürün analiz edilmiştir. Örneklerin seçiminde öncelikle hedef maddeleri içerenler tercih edilmiştir.

İçecek örneklerinin hazırlanmasında yaklaşık 50 mL içecek 10 dk boyunca ultrasonik banyoda bekletilmiş, ardından içecek örneğinden 1 mL alınmış ve ACN: Fosfat tamponu (0.025 M pH 3.0): Su (35:50:15, v/v/v) karışımı ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. 1:10 oranında seyreltilmiş olan içecek örneği ultrasonik banyoda 10 dk bekletildikten sonra 0,2 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon gerçekleştirilmiştir.

Şekerleme örneklerinin hazırlanmasında toz haline getirilmiş şekerleme örneğinden 0.1 g, reçel örneklerinin hazırlanmasında ise homojenize edilmiş reçel örneğinden 0.1 g alınarak ACN: Fosfat tamponu (0.025 M pH 3.0): Su (35:50:15, v/v/v) karışımı ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Ultrasonik banyoda 10 dk bekletildikten sonra 0,2 µm PVDF filtreden süzülerek sisteme enjekte edilmiştir.

Farmasötik ürün örneklerinin hazırlanmasında sıvı formda olanlar içecek örneklerinin hazırlanmasına benzer şekilde hazırlanmış 1 mL farmasötik ürün örneği ACN: Fosfat tamponu (0.025 M pH 3.0): Su (35:50:15, v/v/v) karışımı ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Homojenize edilmiş katı ve jel formdaki farmasötik ürün örnekleri ise 0.1 g tartılarak 10 mL'ye ACN: Fosfat tamponu (0.025 M pH 3.0): Su (35:50:15, v/v/v) karışımı ile tamamlanmıştır. Tüm farmasötik ürün örneklerinin enjeksiyonu 10 dk'lık ultrasonik banyo basamağı ardından 0,2 µm PVDF filtreden süzülerek gerçekleştirilmiştir.

Analiz parametreleri

YPSK analizleri için ACN, Fosfat tamponu (0.025 M pH 3.0) ve YPSK saflığında sudan oluşan değişken hareketli faz sisteme 1.00 mL/dk sabit akış hızıyla verilmiştir.

Analiz başlamadan önce ACN:Su:Tampon (Fosfat tamponu (0.025 M pH 3.0)) (2:48:50, v/v/v) bileşimine sahip hareketli faz 1.00 mL/dk akış hızı ile sisteme verilirken, analiz süresince şu programa göre düzenlenmiştir: ACN oranı ilk 13 dk boyunca %2'ten %35'e çıkarılmış, 13-15 dk arasında %35'den tekrar %2'ye düşürülmüştür. 15-20 dk arasında şartlanmanın sağlanması için ACN oranı %2 olacak şekilde akışa devam edilmiştir. Analiz boyunca tampon oranı %50 oranında sabit tutulmuştur.

Analizlerde sabit faz olarak Sigma-Aldrich (ABD) firmasını ürünü fused core (core-shell) partikül teknoloji kolonların bir örneği olan Ascentis® Express C₁₈ kolon (2.7µm, 100×4.6 mm) ve onunla uyumlu aynı marka YPSK önkolonu (2.7µm, 5×4.6 mm) kullanılmıştır. Enjeksiyon hacmi 5 µL, kolon sıcaklığı 30°C olarak uygulanmıştır. Analitlerin dedektör yanıtları 210 nm dalga boyuna ayarlı foto diyot dizisi dedektör ile ölçülmüştür. Ayrıca dedektör sinyal toplama frekansı 6.25 Hz ve slit genişliği 1.2 nm'dir.

Sonuçların Değerlendirilmesi

Analizler sonucunda elde edilen kromatogramlar kullanılarak her bir derişim için pik alanları analitik yanıt olarak kabul edilmiştir. Çalışmalar matris ortamında yürütüldüğünden iç standart kullanılmamış ve her bir derişime karşı gelen pik alanı değerlerinden yararlanılarak yöntem geçerliliği uygulamalarındaki hesaplamalar yapılmıştır. Benzer şekilde pik alanı değerleri kullanılarak gıda ve farmasötik ürün örneklerindeki tatlandırıcı içeriklerinin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

Yöntem Geçerliliğinin Tespiti (Validasyon)

Uluslararası Harmonizasyon Konferansı'nın (ICH) tavsiye ettiği şekilde validasyon işlemleri geliştirilen yöntem uygulanmış ve yöntemin analitik açıdan kabul edilebilir veriler sağladığı gösterilmiştir. Yöntemin validasyonu için ICH kılavuzunda da belirtildiği şekilde spesifiklik, kesinlik, doğruluk, doğrusalık, tayin alt sınırı, saptama sınırı ve sistem uygunluk testleri yapılmıştır (ICH Q2(R1), 2005).

Sistem Uygunluk Testleri

Analizler sırasında kullanılan YPSK cihazının ve analiz kolonlarının performansını gösteren sistem uygunluk parametrelerinin hesaplanması yöntem

geliştirme basamağında oldukça önemlidir. Ayırım gücü (R_s), kuyruklanma (T) ve asimetri faktörü (A_s), teorik tabaka sayısı (N), kapasite faktörü (k) ve seçicilik faktörü (α) gibi parametreler sistem uygunluk parametrelerini oluşturur. Analizler sırasında değişken hareketli faz ile elüsyon yapıldığından bu parametrelerden N hesaplanmamıştır. Yöntem geliştirme sırasında bu parametrelerin her biri tüm tatlandırıcı standart maddeleri için Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi (USP) metoduna göre Shimadzu LabSolution LCsolution v1.11 SP1 veri analiz programı kullanılarak hesaplanmıştır (USP 30, 2006). Hesaplamalarda kullanılan formüller **Çizelge 3**'de verilmiştir.

Çizelge 3. Sistem uygunluk parametreleri ile ilgili eşitlikler

| Parametre | Eşitlik | |
|-----------------------|--|---|
| Kuyruklanma faktörü | $T = \frac{W_{0.05}}{2 \times \alpha_{0.05}}$ | T : kuyruklanma faktörü $W_{0.05}$: pikin %5 yüksekliğindeki pik genişliği $\alpha_{0.05}$: pikin %5 yüksekliğindeki ilk yarısının genişliği |
| Ayırım gücü | $R = 2 \times \frac{t_R - t_{Rp}}{W + W_p}$ | R : ayırım gücü t_R : alıkonma zamanı t_{Rp} : önceki pikin alıkonma zamanı W : pik genişliği W_p : önceki pikin pik genişliği |
| Kapasite faktörü | $k' = \frac{t}{t_0} - 1$ | k' = kapasite faktörü t : alıkonma zamanı t_0 : ölü zaman |
| Bağlı alıkonma zamanı | $\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0}$ | α : bağlı alıkonma zamanı k'_1 : birinci pikin kapasite faktörü k'_2 : ikinci pikin kapasite faktörü t_1 : birinci pikin alıkonma zamanı t_2 : ikinci pikin alıkonma zamanı t_0 : ölü zaman |

Doğrusallık

Derişime karşı analit cevabının geliştirilen yöntemde doğru orantılı olarak değiştiği ve korelasyon katsayısı (r) ile ifade edilen bir parametredir. Analizlerde

içecek, şekerleme ve reçel olmak üzere üç farklı matriks ortamında ACE-K, ASP, ALI, NHDC, NEO (1.00, 2.00, 4.00, 6.00, 8.00, 10.00, 16.00, 20.00, 24.00, 30.00, 36.00, 40.00 mg/L), SAC (0.50, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, 8.00, 10.00, 12.00, 15.00, 18.00, 20.00 mg/L) ve RBA (4.50, 9.00, 18.00, 27.00, 36.00, 45.00, 72.00, 90.00, 108.00, 135.00, 162.00, 180.00 mg/L) için derişime karşı analit cevabının yer aldığı grafikler elde edilmiştir. Doğrusallık, gün içi ve günler arası olarak incelenmiş ve doğrusal regresyon analiziyle eğim, kesim, korelasyon katsayısı, eğim ve kesim değerlerinin %95 güven seviyesindeki olası sınırları hesaplanmıştır. Bunların yanı sıra gruplar arası uyum, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiştir. İstatistiksel hesaplamalar GraphPad Prism v6.0b programı ile yapılmıştır.

Doğruluk

Analizler sonucu elde edilen değerlerin gerçek değere yakınlığı olarak tanımlanmaktadır. Geri kazanım çalışmalarında gerçek değere ne kadar yaklaşıldığının bir göstergesidir. Üç farklı matriks ortamı içerisine düşük, orta ve yüksek seviyelerine (ACE-K, ASP, ALI, NHDC, NEO için 5.00, 10.00, 15.00 mg/L; SAC için 2.50, 5.00, 7.50 mg/L ve RBA için 22.50, 45.00, 67.50 mg/L) denk gelecek şekilde standart madde ilave edilmiştir. Her derişim seviyesi için üçer set hazırlanıp analizlenmiş ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

Kesinlik

Geliştirilen YPSK yöntemiyle analizi yapılan etken maddelerin sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür. Kesinlik çalışmaları günler içi ve günler arası deneyleri içermektedir. Doğrusallık çalışmalarında kullanılan 10.00 mg/L derişimindeki ACE-K, ASP, ALI, NHDC, NEO; 5.00 mg/L derişimindeki SAC ve 45.00 mg/L derişimindeki RBA çözeltileri (n=10) aynı gün içerisinde ve ardışık üç gün süre ile belirlenen koşullarda analiz edilmiştir. Sonuçların istatistiksel değerlendirmesinde ortalama, ortalamanın standart hatası (SEM), SS, %BSS, ortalamanın %95 güven seviyesindeki olası sınırları olarak verilmiştir. Bunların yanı sıra gruplar arası uyum, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi ile incelenmiştir. İstatistiksel hesaplamalar GraphPad Prism v6.0b programı ile yapılmıştır.

Saptama sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ)

Saptama sınırı (LOD), analizi yapılan örneğin kromatogramdaki pikinin ve yerinin belirlediği, ama miktar tayini sınırları içerisine girmeyen en alt derişim olarak değerlendirilmektedir. Tayin alt sınırı (LOQ) ise analizi yapılan maddenin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği, doğrusallık aralığı dışında olan veya aralığın en alt sınırını oluşturan derişim düzeyi olarak bilinir. LOD ve LOQ değerleri, kromatogramlardaki sinyal şiddeti ve en yakın gürültü şiddeti oranları kullanılarak hesaplanmıştır. Her bir matriks için kromatogramlardan elde edilen sinyal şiddeti/gürültü şiddeti değeri saptama sınırı için 3, tayin sınırı için ise 10 ile çarpılmıştır.

Spesifikklik

Yöntemin seçiciliği, analizi yapılacak örnekte var olan ve bu maddeyle girişim yapabilecek safsızlıkların yanında analiz edilmek istenen maddenin ölçülebilme yeteneği olarak değerlendirilir. Analitlerin safsızlıklarının muhtemel etkisini ve

gıda ve ilaç matrislerindeki diğer maddelerin oluşturabileceği girişimleri incelemek için üç farklı analiz kolonu ile araştırmalar yapılmıştır. Her bir kolon ile elde edilen kromatogramlar karşılaştırılmış ve herhangi bir pozitif veya negatif girişime rastlanmamıştır. Ayrıca analitlerin saflıkları DAD dedektör ile kontrol edilmiştir.

Sağlamlık

Bir analitik yöntemin sağlamlığı yöntem parametrelerindeki gözlenen küçük değişmelerin analitik yanıtta etkisinin kabul edilebilir düzeylerde olduğunun gösterilmesidir. Bu amaçla 10.00 mg/L derişimindeki ACE-K, ASP, ALI, NHDC, NEO; 5.00 mg/L derişimindeki SAC ve 45.00 mg/L derişimindeki RBA çözeltileri akış hızı (0.98, 1.00 ve 1.02 mL/dk), kolon sıcaklığı (29, 30 ve 31 °C), tampon pH'ı (2.90, 3.00 ve 3.10) ve hareketli faz tampon yüzdesi (%49, %50 ve %51) parametreleri değiştirilerek analiz edilmiş (n=3) ve % BSS değerleri hesaplanmıştır (Dejaegher ve Vander Heyden, 2007).

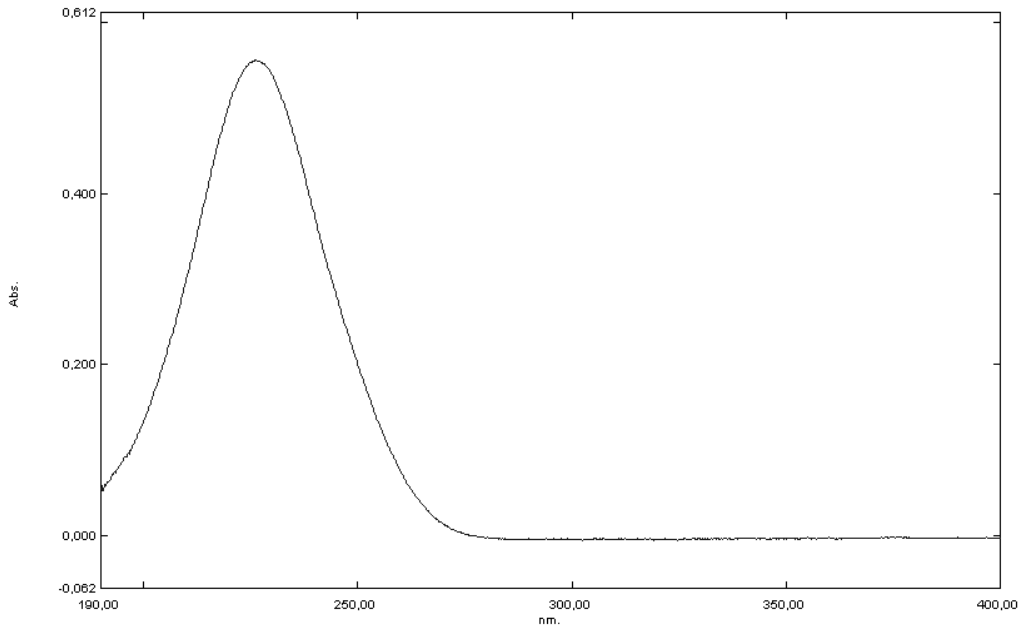
BULGULAR ve TARTIŞMA

Yoğun tatlandırıcı özellikli gıda katkı maddelerinin eş zamanlı tayini için yüksek ayırma gücü, doğruluk ve tekrar edilebilirlik özelliklerinden dolayı YPSK tekniği tercih edilmiştir. YPSK tekniği kullanılarak gıdalardaki tatlandırıcı içeriğinin saptanması çalışmalarına yöntem geliştirme çalışmaları ile başlanmıştır. Yöntem geliştirme sırasında özgün bir çalışma elde edebilmek için hareketli ve sabit fazın seçimi, en uygun analiz koşullarının belirlenmesi ve yöntemin geçerliliğinin sağlanmasından sonra, geliştirilen yöntem ticari olarak temin edilebilen gıda örneklerine uygulanmıştır.

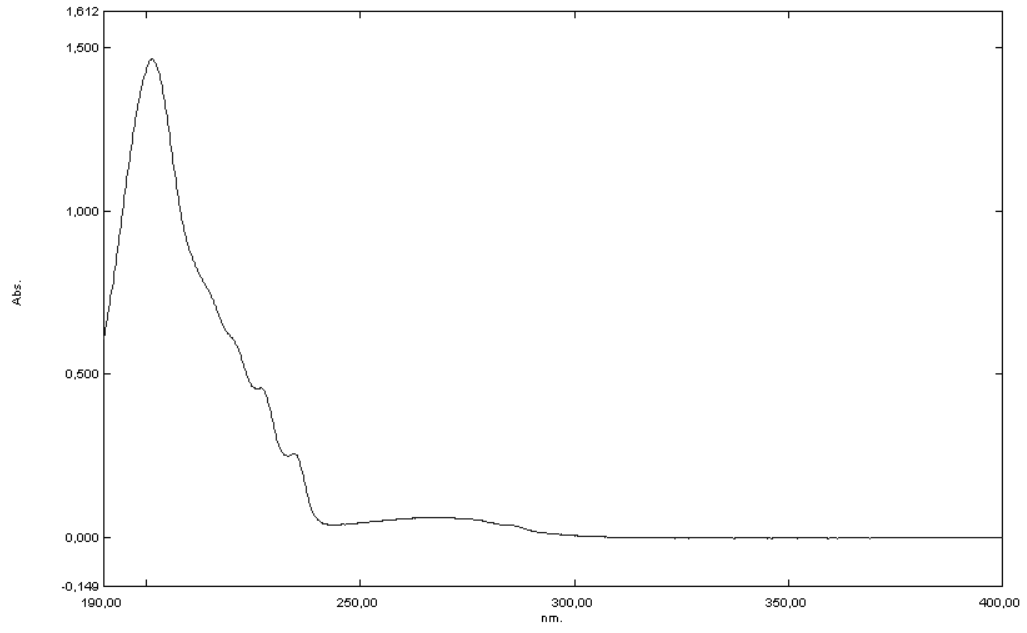
Tatlandırıcıların UV Bölgedeki Spektral Özelliklerinin İncelenmesi

Çalışmalara sinyallerin tespitinde foto diyot dizisi dedektör kullanılacağından çalışılacak olan ışınma bölgesinin belirlenebilmesi için standartların UV-spektroskopisi ile UV-görünür bölgedeki davranışlarının incelenmesi ile başlanmıştır. UV-spektrofotometrik yöntemde kullanılmak üzere her bir tatlandırıcı standart maddesini içeren standart çözeltiler ACN:Su (30:70, v/v) ortamında hazırlanmış ve 1.00×10^{-5} M olarak şekilde seyreltilmiş ve 190-400 nm aralığında tarama yapılmıştır.

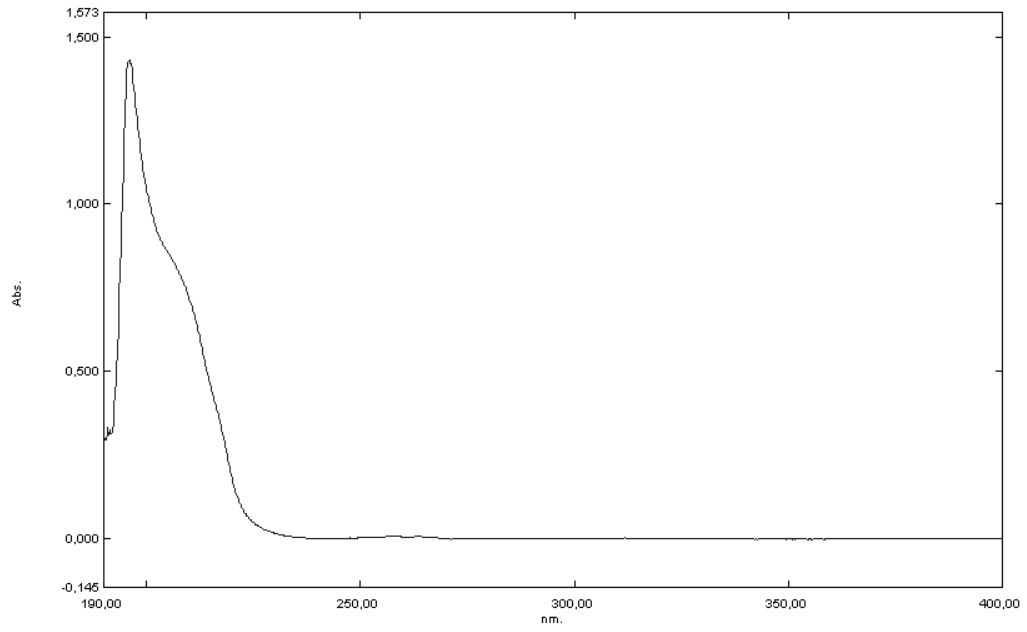
Maddelerin eş zamanlı olarak tayini için birbirleriyle girişim yapmadıkları ve en verimli sonuçların alınabileceği dalga boylarının seçilme zorunluluğu dikkate alınarak spektrumları taranmış ve eş zamanlı analizi mümkün kılacak dalga boyu seçilmiştir. Analitlerin hemen hemen tamamında uzun dalga boylarında absorpsiyona rastlanmamıştır. Ancak 200-210 nm yakınlarında belirgin absorbans sinyalleri gözlenmiş ve YPSK çalışmalarında foto diyot dizisi dedektörü kullanılarak 210 nm dalga boyunda sinyal tespiti yapılabileceğine karar verilmiştir. Spektrum taramaları **Şekil 8-Şekil 14**'de verilmiştir.



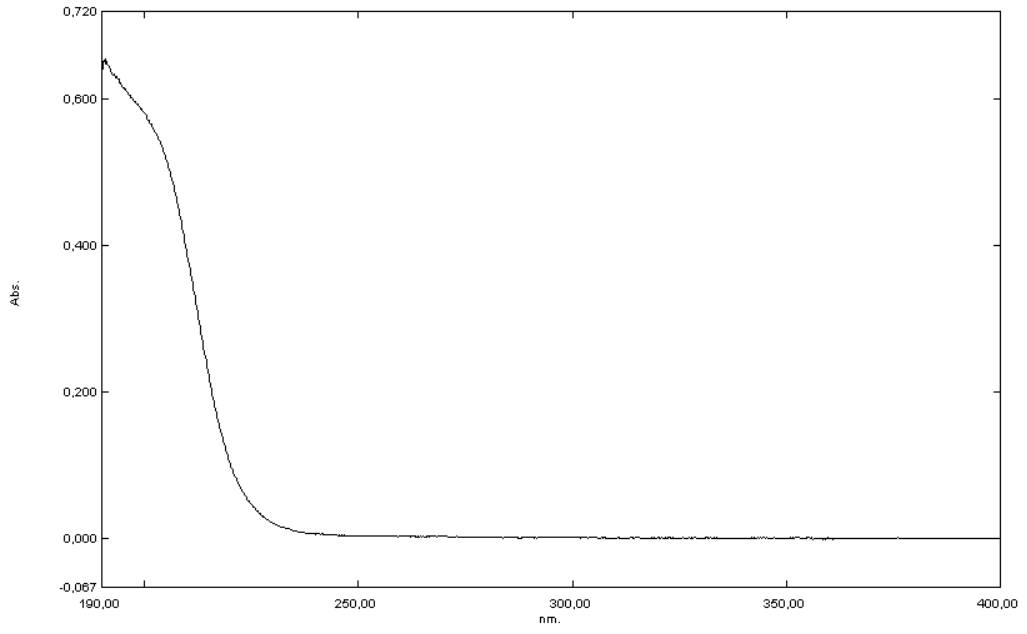
Şekil 8. ACE-K'nın UV-görünür bölgedeki spektrumu ($C=1.00 \times 10^{-5}$ M)



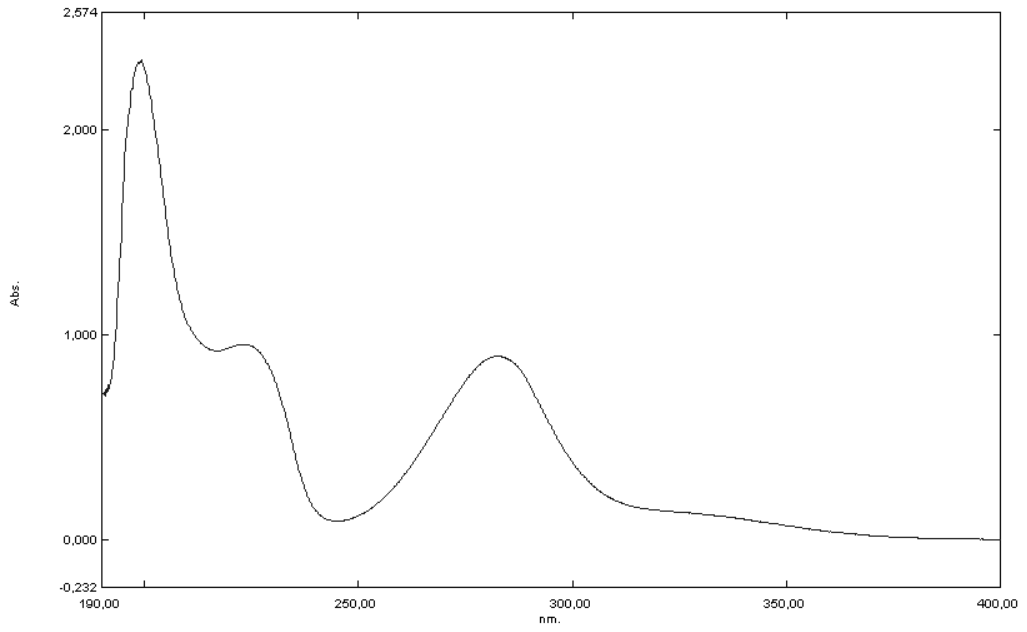
Şekil 9. SAC'in UV-görünür bölgedeki spektrumu ($C=1.00 \times 10^{-5}$ M)



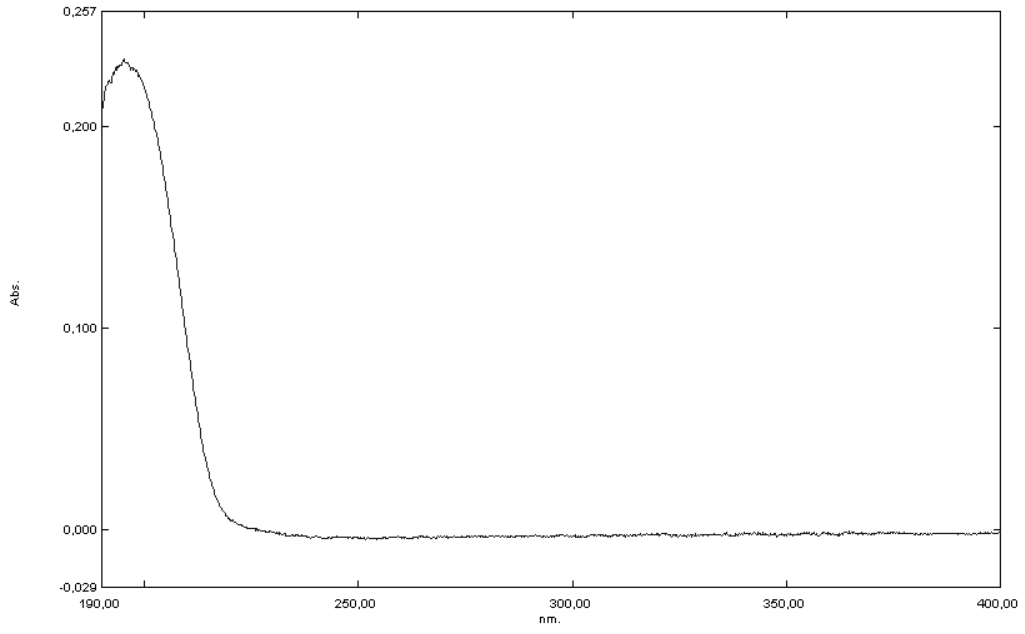
Şekil 10. ASP'nin UV-görünür bölgedeki spektrumu ($C=1.00 \times 10^{-5}$ M)



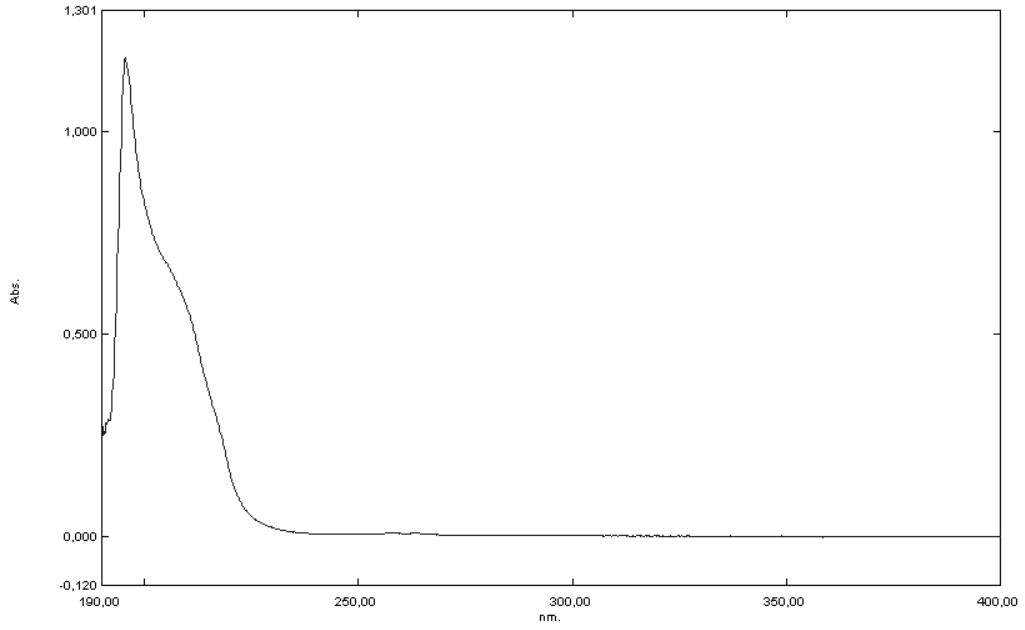
Şekil 11. ALI'nın UV-görünür bölgedeki spektrumu ($C=1.00 \times 10^{-5}$ M)



Şekil 12. NHDC'nin UV-görünür bölgedeki spektrumu ($C=1.00 \times 10^{-5}$ M)



Şekil 13. RBA'nın UV-görünür bölgedeki spektrumu ($C=1.00 \times 10^{-5}$ M)



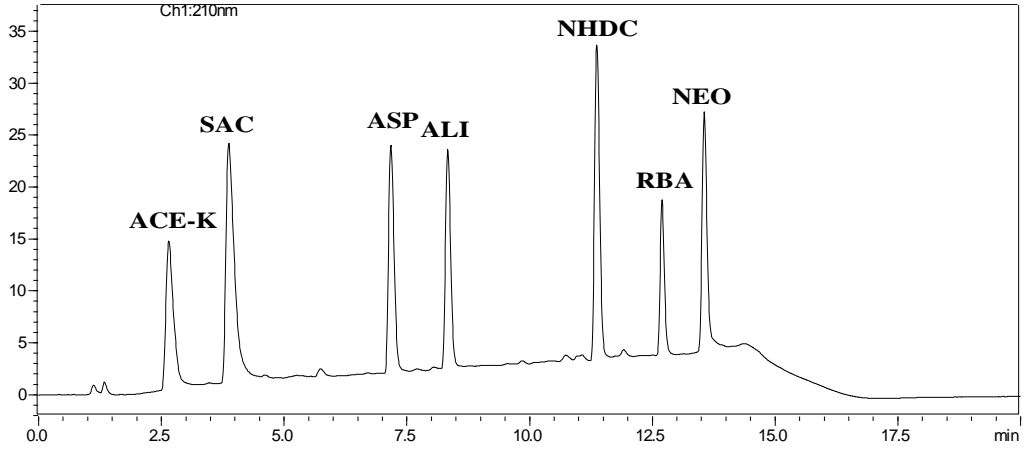
Şekil 14. NEO'nun UV-görünür bölgedeki spektrumu ($C=1.00 \times 10^{-5}$ M)

YPSK Yöntemi Geliştirme

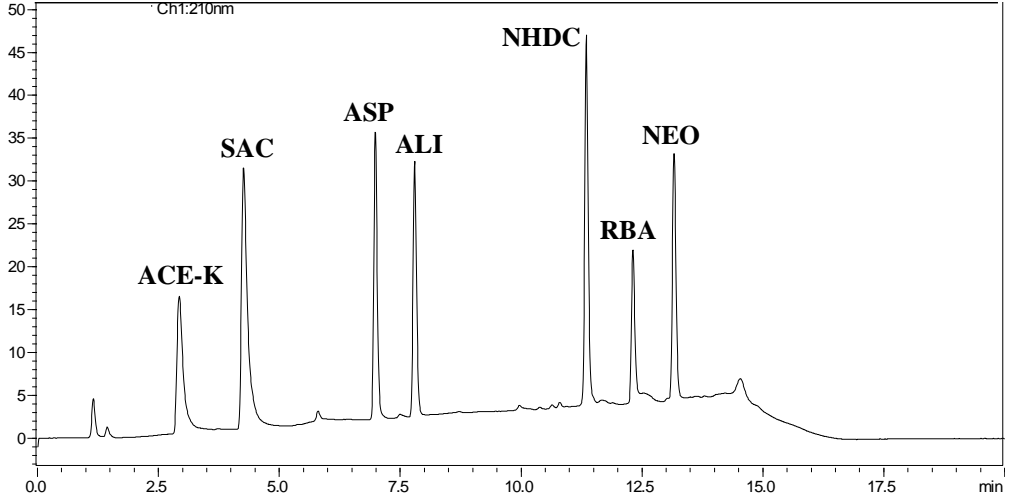
YPSK analizleri için yapılan yöntem geliştirme işlemlerine, tayini hedeflenen tatlandırıcıların kimyasal yapıları ve özellikleri, geçmişte yapılan çalışmalar ve güncel gelişmeler dikkate alınarak hareketli faz ve kolon (sabit faz) seçimiyle devam edilmiştir.

Sabit faz, kromatografik ayrımların kalbi niteliğinde olduğu için yöntemsel parametrelerin en önemlisidir. Sabit faz seçiminde göz önüne alınması gereken en önemli nokta, sabit fazın, analize konu olan bileşiklerin birbirlerinden ve girişim yapabilecek diğer bileşiklerden, sağlıklı analitik veri elde sağlanabilecek düzeyde ayrılmasını sağlayacak fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olmasıdır. Bu bağlamda partikülün fiziksel özellikleri (büyüklük, geçirgenlik, partiküller arası boşluklar, vb) ve kimyasal özellikleri (sahip olduğu ligadın özellikleri, basınç, sıcaklık ve kimyasal etkilere karşı direnç, karbon yükü, vb) değerlendirilmeli ve analitlere ve örneklere en uygun sabit faz seçilmelidir.

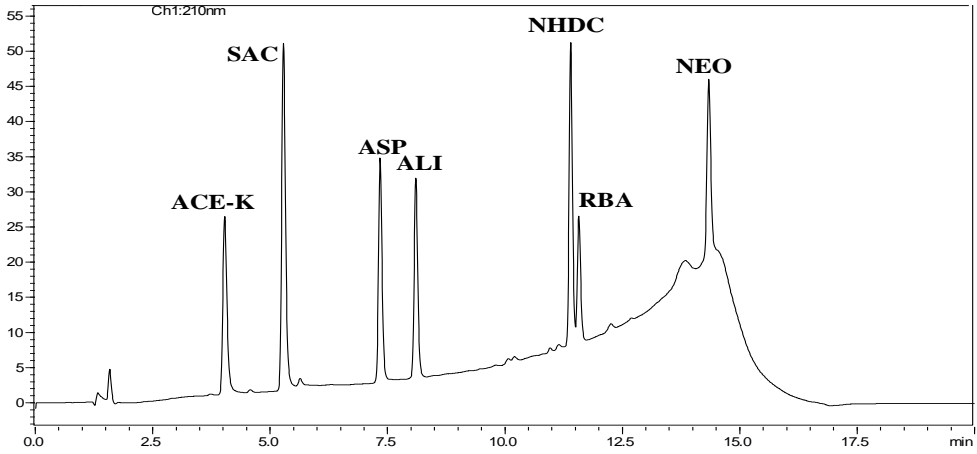
Çalışmamızda yukarıda sayılan karakteristik özellikler incelenerek ve günümüzün kolon teknolojileri konusundaki son gelişmeler göz önüne alınarak, yapısında katı bir çekirdek ve onun etrafını saran poröz bir katman taşıyan “core-shell” teknolojisi ile üretilmiş ters faz sıvı kromatografisi kolonları kullanılmıştır. Silika bazlı bu dolgu maddesi tipinin C₁₈, fenilheksil ve pentaflorofenil (PFP) ligandına sahip alt tipleri ile çalışılmış ve kromatografik açıdan en iyi sonuçlar C₁₈ ligantlı kolon ile elde edildiğinden deneysel çalışmalar bu kolon ile yürütülmüş ve tamamlanmıştır. **Şekil 15-Şekil 17**'de farklı ligantlı kolonlara ait kromatogramlar yer almaktadır.



Şekil 15. Ascentis® Express C₁₈ (2.7µm, 100×4.6 mm) kolon için ACE-K, ASP, ALI, NHDC, NEO (10.00 mg/L), SAC (5.00 mg/L) ve RBA (45.00 mg/L) standartlarını içeren çözeltinin kromatogram



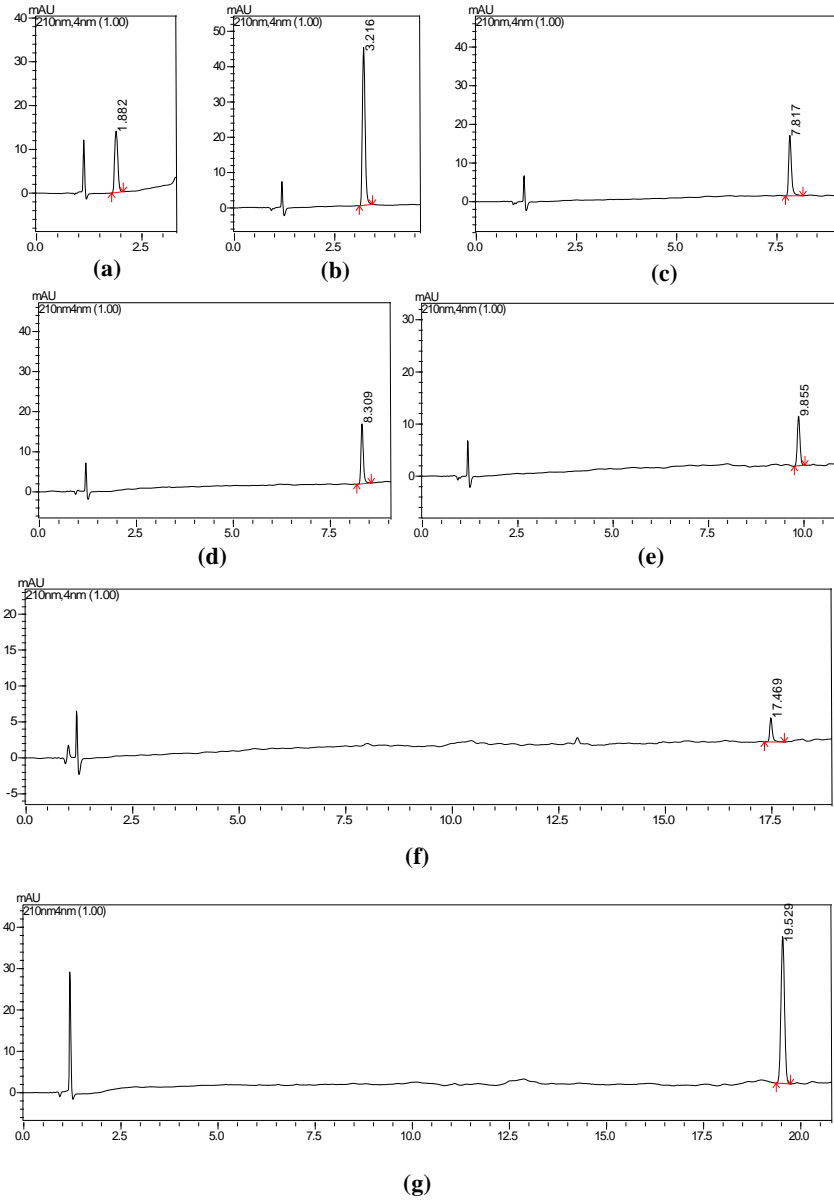
Şekil 16. Ascentis® Express Phenyl-Hexyl (2.7µm, 100×4.6 mm) kolon için ACE-K, ASP, ALI, NHDC, NEO (10.00 mg/L), SAC (5.00 mg/L) ve RBA (45.00 mg/L) standartlarını içeren çözeltinin kromatogram



Şekil 17. Ascentis® Express F5 (2.7µm, 100×4.6 mm) kolon için ACE-K, ASP, ALI, NHDC, NEO (10.00 mg/L), SAC (5.00 mg/L) ve RBA (45.00 mg/L) standartlarını içeren çözeltinin kromatogram

Hareketli faz seçimi için yürütülen çalışmalara genel kullanıma sahip, göreceli olarak ucuz YPSK çözücülerini olan su, MeOH, ACN ve çeşitli tampon tiplerini içeren hareketli fazların denenmesi ile başlanmıştır. MeOH-su ve ACN-su bileşimine sahip hareketli fazlar karşılaştırılmış, daha düşük viskozite ve daha yüksek ayırma verimi sağladığı ve MeOH-su karışımında çalışılan dalga boyunda daha yüksek baseline gürültüsü gözlemlendiği için uygulamada ACN-su karışımı tercih edilmiştir. Her bir tatlandırıcı için düşük polarlıktan yüksek polarlığa doğru ACN içeren hareketli fazlar denenmiş ve analitlerin kolondaki davranışları incelenmiştir. Bu çalışmalarda ACN:Su (30:70, v/v) ortamında hazırlanmış 1.00×10^{-5} M derişimindeki tatlandırıcı standart çözeltileri kullanılmıştır. Her bir tatlandırıcı standart çözeltisi için ACN:Su (10:90, v/v) içeren hareketli faz ortamında izokratik elüsyon gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar 1 ml/dk akış hızı ve 30 °C kolon sıcaklığında C_{18} ligantlı sabit fazda gerçekleştirilmiş ve 210 nm dalga boyunda analitik yanıtlar kaydedilmiştir. Analizlerden elde edilen kromatogramlar

Şekil 18’de yer almaktadır.



Şekil 18. ACN:Su (10:90, v/v) içeren hareketli faz ile elde edilen kromatogramlar (a) ACE-K, (b) SAC, (c) ASP, (d) ALI, (e) NHDC, (f) RBA ve (g) NEO

% 5’in üstünde ACN içeren hareketli fazlar kullanıldığında ACE-K ve SAC için çok düşük alıkonma zamanları gözlenmiş ve pikler birbirine çok yaklaşmıştır. ASP, ALI, NHDC, RBA ve NEO için ise % 5-10 aralığında ACN içeren hareketli fazlar ile elüsyon süresi çok uzadığından kabul edilebilir bir analiz süresi ve ayırım gücü ile eş zamanlı analiz gerçekleştirebilmek için değişken hareketli faz sistemi kullanılması zorunlu hale gelmiştir. % 2-40 aralığında ACN değişimini ve % 10-50 aralığında tampon içeren hareketli faz sistemleri analit karışımına (ACE-K, ASP, ALI, NHDC, NEO 10.00 mg/L; SAC 5.00 mg/L ve RBA 45.00 mg/L) uygulanmıştır.

Maddelerin birbirinden farklı asidik özelliklere sahip olması nedeniyle (ACE için $pK_a = -0.28$, $pK_a = 1.60$, ASP için $pK_{a1} = 3.71$ ve $pK_{a2} = 7.55$, ALI için $pK_{a1} = 3.71$ ve $pK_{a2} = 7.64$, NHDC için $pK_a = 6.85$, RBA için $pK_a = 12.51$, için $pK_{a1} = 3.68$ ve $pK_{a2} = 8.33$) pik şekillerinin iyileştirilmesi için hareketli faza tamponu eklenmesine karar verilmiştir. pH 2.0-7.0 aralığında değişen farklı derişimlerdeki tamponlar denenmiş ve elde edilen sonuçlar değerlendirilerek Fosfat tamponu (0.025 M pH 3.0) kullanılmasına karar verilmiştir.

Hareketli fazın akış hızını belirlemek için 0.8-1.2 mL/dk aralığında akış hızları denenmiş akış hızı düşüktüçe analitlerin kolondan çıkış sürelerinin uzadığı, pik alanlarının büyüdüğü, pik tabanlarının genişlediği ve pik morfolojilerinin simetrisini kaybederek kötüleştiği; akış hızı artırıldığında ise analitlerin elüsyon sürelerinin ve pik alanlarının azaldığı, pik tabanlarının daraldığı ve pik morfolojilerinin düzeldiği ancak piklerin birbirine gittikçe yaklaştığı tespit edilmiştir. Hareketli faz akış hızı olarak pik özelliklerinin istenen düzeyde tutulabildiği 1.00 mL/dk akış hızında çalışmalara devam edilmiştir.

Çalışmalarda kullanılacak kolon sıcaklığını belirlemek için 25-40 °C aralığında denemeler yapılmış sıcaklık artışının çözücü viskozitesini azalttığı için basıncı düşürdüğü ve moleküllerin kinetik enerjilerini artırarak elüsyon sürelerini kısalttığı görülmüştür. Elde edilen verilerden çalışmalarda kullanılacak sıcaklık gözlenen kolon basıncı ve kolon kimyası göz önüne alınarak 30 °C olarak belirlenmiştir.

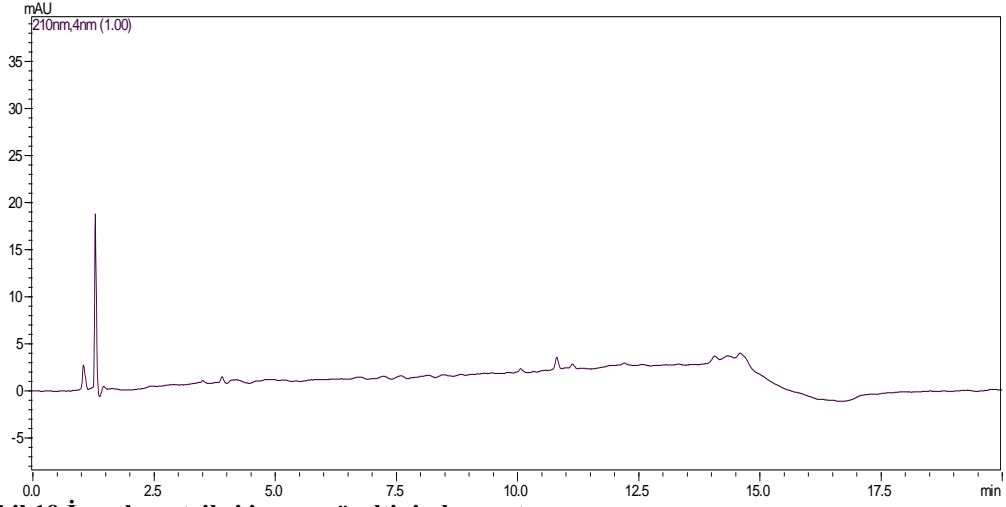
Belirtilen ön çalışmalar sonucunda 30 °C kolon sıcaklığı ve 1.00 mL/dk hareketli faz akış hızında Fosfat tamponu (0.025 M pH 3.0) kullanılarak **Çizelge 4**'deki hareketli faz sisteminin gerekli ayırmayı sağladığı düşünülmüş ve validasyon çalışmalarına bu sistemle devam edilmiştir. Bu sistemle analitler yaklaşık 13.0 dk sonunda birbirinden ayrılmış ve analiz 20.0 dk içinde tamamlanmıştır.

Çizelge 4. Değişken hareketli faz sistemi

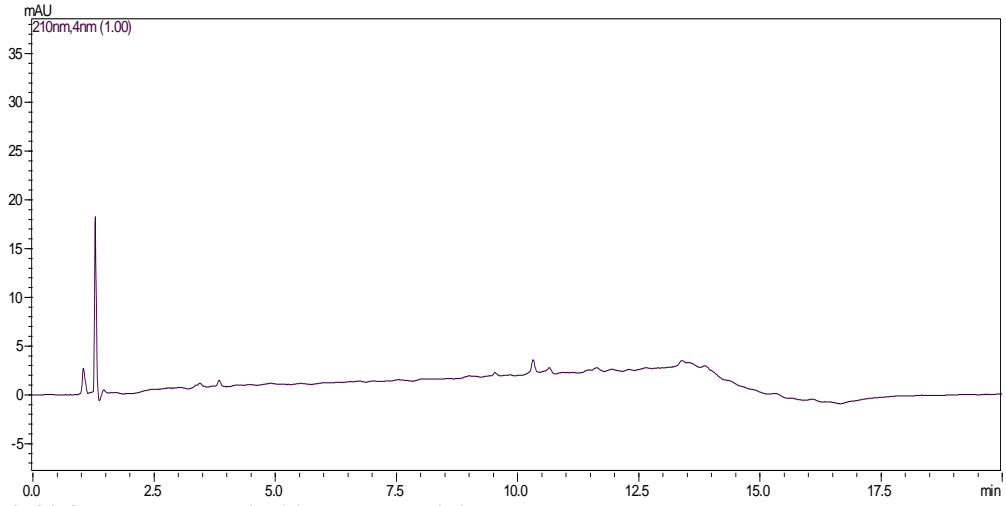
| Zaman (dk) | ACN (%) | Tampon (%) | Su (%) |
|------------|---------|------------|--------|
| 0.0 | 2 | 50 | 48 |
| 0.0-13.0 | 2→35 | 50 | 48→15 |
| 13.0-15.0 | 35→2 | 50 | 15→48 |
| 15.0-20.0 | 2 | 50 | 48 |

Çalışmalar üç farklı matris ortamında gerçekleştirildiğinden öncelikle matris çözeltilerinin kolondaki davranışları incelenmiştir. **Şekil 19-Şekil 21**'de içecek, şekerleme ve reçel matris çözeltilerinin uygulanan değişken hareketli faz sistemi ile elde edilen kromatogramlar yer almaktadır. **Şekil 22-Şekil 24**'de ise içecek, şekerleme ve reçel matrisinde 10.00 mg/L ACE-K, ASP, ALI, NHDC, NEO;

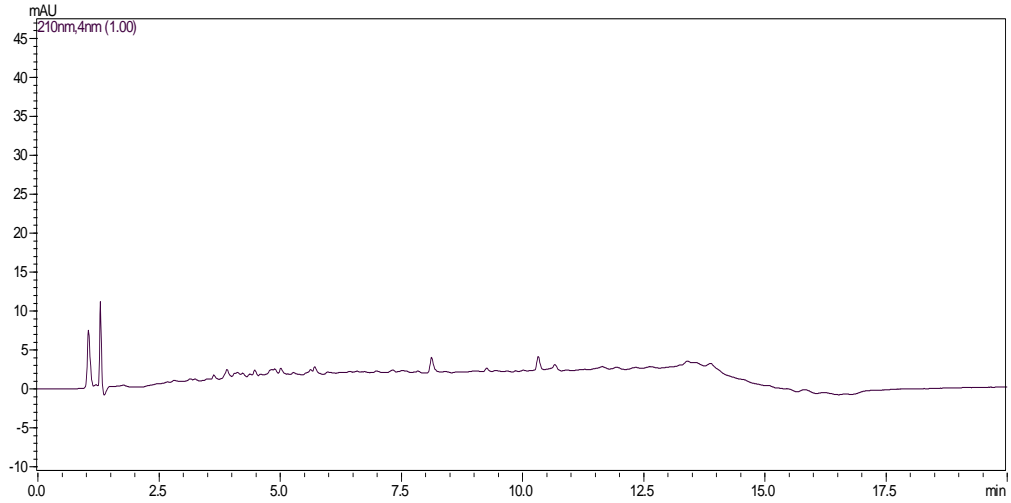
5.00 mg/L SAC ve 45.00 mg/L RBA içeren karışımların kromatogramları yer almaktadır.



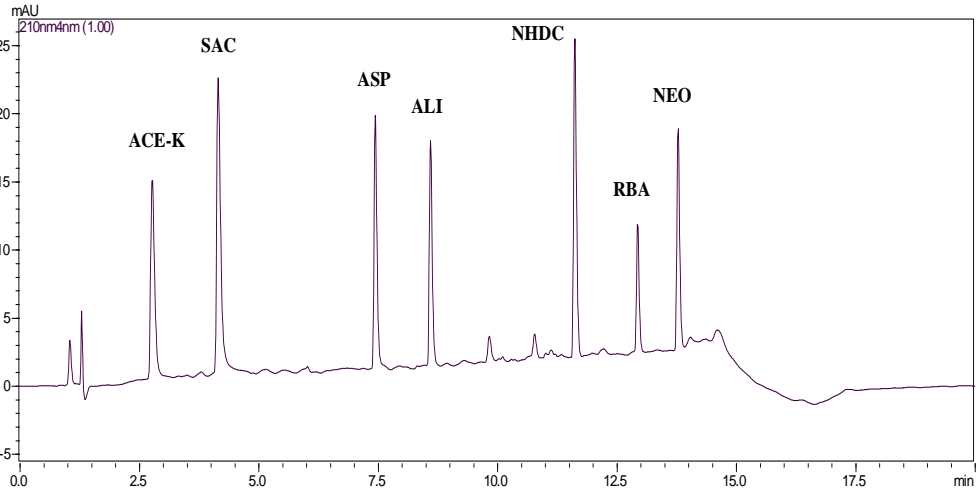
Şekil 19.İçecek matrisi içeren çözeltinin kromatogramı



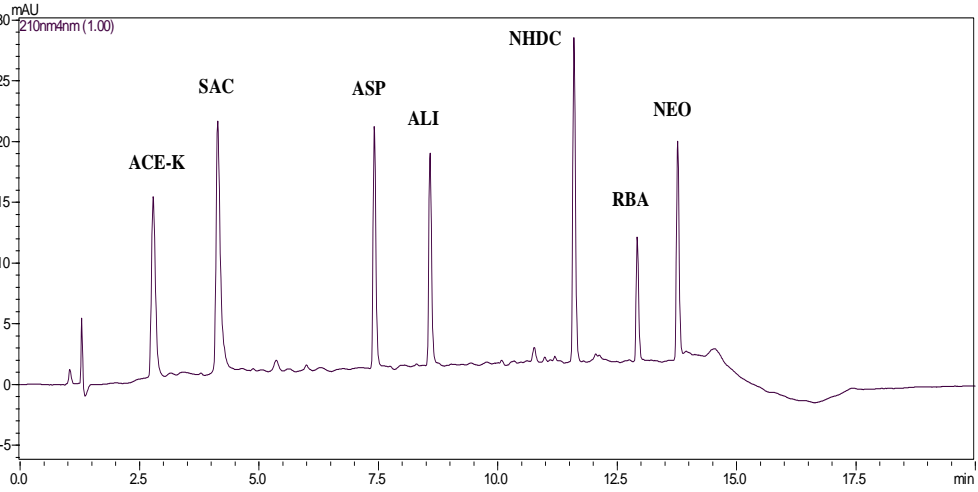
Şekil 20.Şekerleme matrisi içeren çözeltinin kromatogramı



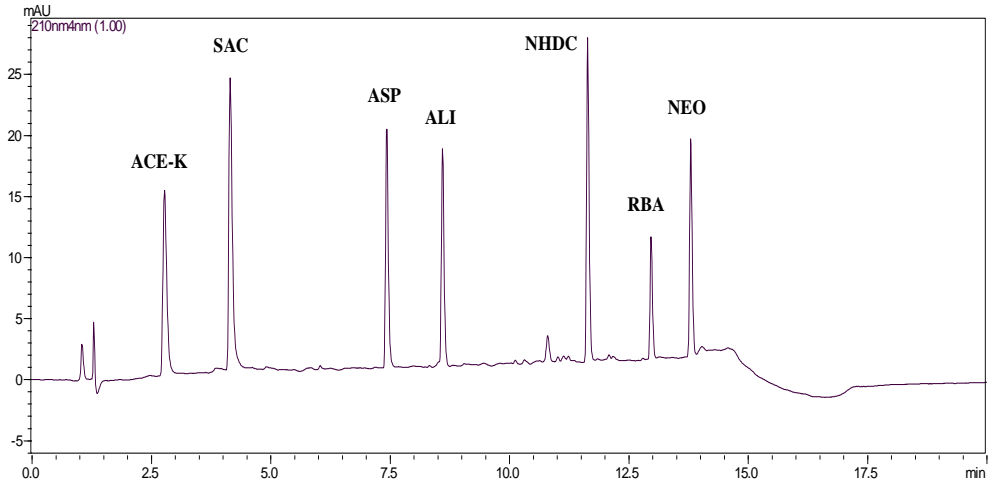
Şekil 21. Reçel matrisi içeren çözeltinin kromatogramı



Şekil 22. İçecek matrisinde ACE-K, ASP, ALI, NHDC, NEO (10.00 mg/L), SAC (5.00 mg/L) ve RBA (45.00 mg/L) standartlarını içeren çözeltinin kromatogramı



Şekil 23. Şekerleme matrisinde ACE-K, ASP, ALI, NHDC, NEO (10.00 mg/L), SAC (5.00 mg/L) ve RBA (45.00 mg/L) standartlarını içeren çözeltinin kromatogramı



Şekil 24. Reçel matrisinde ACE-K, ASP, ALI, NHDC, NEO (10.00 mg/L), SAC (5.00 mg/L) ve RBA (45.00 mg/L) standartlarını içeren çözeltinin kromatogramı

Validasyon çalışmaları öncesinde geliştirilen yöntemin kabul edilebilir veri sağladığının belirlenmesi için SUT analizi yapılmıştır. USP ölçütlerine göre yapılan değerlendirmede geliştirilen YPSK yönteminin analiz yapmaya uygun olduğu düşüncesine ulaşılmıştır (USP 30, 2006). SUT analizi sonuçları **Çizelge 5-Çizelge 7**'de verilmektedir

Çizelge 5. İçecek matriksi için SUT sonuçları

| Parametre | ACE-K | SAC | ASP | ALI | NHDC | RBA | NEO | Tavsiye edilen değer |
|--------------------------------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|----------------------|
| Alıkonma zamanı (dk) | 2.762 | 4.130 | 7.409 | 8.573 | 11.605 | 12.928 | 13.767 | |
| Kuyruklanma faktörü (T) | 1.555 | 1.897 | 1.509 | 1.466 | 1.451 | 1.415 | 1.386 | <2 |
| Asimetri faktörü (A_s) | 1.480 | 1.682 | 1.452 | 1.418 | 1.423 | 1.400 | 1.364 | $0,95 < A_s < 1,2$ |
| Kapasite faktörü (k) | 1.659 | 2.976 | 6.133 | 7.254 | 10.173 | 11.447 | 12.254 | $2 < k < 10$ |
| Ayırım gücü (R_s) | | 8.255 | 22.504 | 8.984 | 23.342 | 10.672 | 6.912 | >2 |
| Seçicilik faktörü (α) | | 1.794 | 2.061 | 1.183 | 1.402 | 1.125 | 1.070 | >1 |
| Alıkonma zamanının %BSS | 0.29 | 0.20 | 0.11 | 0.08 | 0.05 | 0.06 | 0.06 | <1 |

Çizelge 6. Şekerleme matrisi için SUT sonuçları

| Parametre | ACE-K | SAC | ASP | ALI | NHDC | RBA | NEO | Tavsiye edilen değer |
|--------------------------------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|----------------------|
| Alıkonma zamanı (dk) | 2.751 | 4.112 | 7.395 | 8.562 | 11.589 | 12.909 | 13.750 | |
| Kuyruklanma faktörü (T) | 1.360 | 1.749 | 1.330 | 1.328 | 1.281 | 1.387 | 1.291 | <2 |
| Asimetri faktörü (A_s) | 1.300 | 1.528 | 1.288 | 1.296 | 1.254 | 1.373 | 1.279 | $0,95 < A_s < 1,2$ |
| Kapasite faktörü (k) | 1.142 | 2.202 | 4.758 | 5.667 | 8.024 | 9.052 | 9.706 | $2 < k < 10$ |
| Ayırım gücü (R_s) | | 7.571 | 21.290 | 9.047 | 23.778 | 11.012 | 7.115 | >2 |
| Seçicilik faktörü (α) | | 1.928 | 2.161 | 1.191 | 1.416 | 1.128 | 1.072 | >1 |
| Alıkonma zamanının %BSS | 0.47 | 0.44 | 0.27 | 0.14 | 0.08 | 0.07 | 0.08 | <1 |

Çizelge 7. Reçel matriksi için SUT sonuçları

| Parametre | ACE-K | SAC | ASP | ALI | NHDC | RBA | NEO | Tavsiye edilen değer |
|--------------------------------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|----------------------|
| Alıkonma zamanı (dk) | 2.752 | 4.124 | 7.403 | 8.577 | 11.608 | 12.935 | 13.774 | |
| Kuyruklanma faktörü (T) | 1.505 | 1.934 | 1.459 | 1.418 | 1.428 | 1.441 | 1.380 | <2 |
| Asimetri faktörü (A_s) | 1.429 | 1.692 | 1.421 | 1.390 | 1.407 | 1.426 | 1.368 | $0,95 < A_s < 1,2$ |
| Kapasite faktörü (k) | 1.146 | 2.216 | 4.774 | 5.689 | 8.053 | 9.088 | 9.742 | $2 < k < 10$ |
| Ayırım gücü (R_s) | | 8.566 | 23.629 | 9.774 | 25.783 | 11.906 | 7.501 | >2 |
| Seçicilik faktörü (α) | | 1.934 | 2.155 | 1.192 | 1.415 | 1.129 | 1.072 | >1 |
| Alıkonma zamanının %BSS | 0.36 | 0.37 | 0.53 | 0.12 | 0.15 | 0.16 | 0.11 | <1 |

YPSK Yönteminin Validasyonu

Hedef maddelerin analizi için geliştirilen yöntemin validasyonu, analitik yöntemlerin validasyonu üzerine ICH tarafından yayınlanan kılavuzda belirtilen tavsiyeler üzerine yapılmıştır. Yöntemin doğruluğunu ve karmaşık gıda örneklerine uygulanabilirliğini belirleyebilmek amacıyla standart katma yöntemine dayalı geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Tayini hedeflenen maddeler dışındaki bileşenlerin yöntem ile yaptığı etkileşimi incelemek için üç ayrı matris ortamı içerisine düşük, orta ve yüksek seviyelerine (ACE-K, ASP, ALI, NHDC, NEO için 5.00, 10.00, 15.00 mg/L; SAC için 2.50, 5.00, 7.50 mg/L ve RBA için 22.50, 45.00, 67.50 mg/L) denk gelecek şekilde standart madde karışımı ilave edilmiştir. Her derişim seviyesi için üçer set hazırlanıp analizlenmiş ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar, örnek bileşenlerinin analitlerin tayinine beklenenden olumsuz etki yapmadığını göstermektedir. Yöntemin doğruluğuna ilişkin veriler **Çizelge 8-Çizelge 10**'da verilmektedir.

Çizelge 8. İçecek matrisi için doğruluk çalışmalarının sonuçları

| Tatlandırıcı | Derişim Yüzdesi | Eklenen (mg/L) | Bulunan (mg/L) | % Geri Kazanım | Ortalama Geri Kazanım |
|--------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------|
| ACE-K | 50 | 5.00 | 4.79 | 95.89 | 97.47 |
| | 100 | 10.00 | 9.98 | 99.75 | |
| | 150 | 15.00 | 14.52 | 96.78 | |
| SAC | 50 | 2.50 | 2.40 | 95.85 | 96.23 |
| | 100 | 5.00 | 4.85 | 96.92 | |
| | 150 | 7.50 | 7.19 | 95.92 | |
| ASP | 50 | 5.00 | 4.94 | 98.77 | 97.75 |
| | 100 | 10.00 | 10.04 | 100.37 | |
| | 150 | 15.00 | 14.12 | 94.12 | |
| ALI | 50 | 5.00 | 4.83 | 96.62 | 96.79 |
| | 100 | 10.00 | 9.83 | 98.28 | |
| | 150 | 15.00 | 14.32 | 95.46 | |
| NHDC | 50 | 5.00 | 4.95 | 98.92 | 97.99 |
| | 100 | 10.00 | 9.99 | 99.88 | |
| | 150 | 15.00 | 14.27 | 95.16 | |
| RBA | 50 | 22.50 | 21.28 | 94.59 | 95.94 |
| | 100 | 45.00 | 44.53 | 98.95 | |
| | 150 | 67.50 | 63.64 | 94.28 | |
| NEO | 50 | 5.00 | 4.86 | 97.10 | 97.72 |
| | 100 | 10.00 | 10.02 | 100.25 | |
| | 150 | 15.00 | 14.37 | 95.80 | |

Çizelge 9. Şekerleme matrisi için doğruluk çalışmalarının sonuçları

| Tatlandırıcı | Derişim Yüzdesi | Eklenen (mg/L) | Bulunan (mg/L) | % Geri Kazanım | Ortalama Geri Kazanım |
|--------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------|
| ACE-K | 50 | 5.00 | 4.80 | 95.85 | 96.45 |
| | 100 | 10.00 | 9.91 | 99.04 | |
| | 150 | 15.00 | 14.18 | 94.46 | |
| SAC | 50 | 2.50 | 2.38 | 95.26 | 96.36 |
| | 100 | 5.00 | 4.98 | 99.45 | |
| | 150 | 7.50 | 7.09 | 94.35 | |
| ASP | 50 | 5.00 | 4.86 | 97.16 | 97.56 |
| | 100 | 10.00 | 10.00 | 100.06 | |
| | 150 | 15.00 | 14.31 | 95.41 | |
| ALI | 50 | 5.00 | 4.70 | 94.01 | 95.73 |
| | 100 | 10.00 | 9.98 | 99.69 | |
| | 150 | 15.00 | 14.04 | 93.49 | |
| NHDC | 50 | 5.00 | 4.79 | 95.27 | 95.69 |
| | 100 | 10.00 | 9.99 | 100.04 | |
| | 150 | 15.00 | 13.77 | 91.77 | |
| RBA | 50 | 22.50 | 22.13 | 97.80 | 97.28 |
| | 100 | 45.00 | 44.68 | 99.16 | |
| | 150 | 67.50 | 64.23 | 94.89 | |
| NEO | 50 | 5.00 | 4.74 | 94.81 | 95.91 |
| | 100 | 10.00 | 9.96 | 99.64 | |
| | 150 | 15.00 | 13.98 | 93.27 | |

Çizelge 10 . Reçel matrisi için doğruluk çalışmalarının sonuçları

| Tatlandırıcı | Derişim Yüzdesi | Eklenen (mg/L) | Bulunan (mg/L) | % Geri Kazanım | Ortalama Geri Kazanım |
|--------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------|
| ACE-K | 50 | 5.00 | 4.81 | 96.04 | 96.96 |
| | 100 | 10.00 | 9.95 | 99.45 | |
| | 150 | 15.00 | 14.32 | 95.38 | |
| SAC | 50 | 2.50 | 2.36 | 94.39 | 96.91 |
| | 100 | 5.00 | 5.07 | 101.34 | |
| | 150 | 7.50 | 7.13 | 95.00 | |
| ASP | 50 | 5.00 | 4.72 | 94.41 | 97.26 |
| | 100 | 10.00 | 10.13 | 101.31 | |
| | 150 | 15.00 | 14.41 | 96.08 | |
| ALI | 50 | 5.00 | 5.22 | 104.39 | 103.09 |
| | 100 | 10.00 | 9.92 | 99.11 | |
| | 150 | 15.00 | 15.88 | 105.77 | |
| NHDC | 50 | 5.00 | 5.11 | 101.77 | 101.36 |
| | 100 | 10.00 | 10.02 | 100.39 | |
| | 150 | 15.00 | 15.30 | 101.92 | |
| RBA | 50 | 22.50 | 21.88 | 96.70 | 96.71 |
| | 100 | 45.00 | 44.34 | 98.40 | |
| | 150 | 67.50 | 64.31 | 95.01 | |
| NEO | 50 | 5.00 | 5.03 | 100.69 | 100.87 |
| | 100 | 10.00 | 10.07 | 100.81 | |
| | 150 | 15.00 | 15.15 | 101.09 | |

Yöntemin kesinliği, tekrar edilebilirlik çalışmaları ile saptanmıştır. Doğrusallık çalışmalarında kullanılan 10.00 mg/L ACE-K, ASP, ALI, NHDC, NEO; 5.00 mg/L SAC ve 45.00 mg/L RBA içeren çözelti aynı gün içerisinde ve ardışık 3 gün

süre ile belirlenen koşullarda analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçların standart sapması, bağıl standart sapması ve güven aralığı parametrelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesiyle geliştirilen yöntemin kesinlik yönünden analitik açıdan yeterli düzeyde (%BSS <2.0) olduğu görülmüştür. Kesinlik sonuçları Çizelge 11-Çizelge 13’de verilmiştir.

Çizelge 11. İçecek matrisinde tatlandırıcı standart çözeltileri için kesinlik çalışmalarının istatistiksel değerlendirmesi

| | | Gün içi | | | Günler arası (n=30) |
|-------|---------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------------|
| | | 1. Gün (n=10) | 2. Gün (n=10) | 3. Gün (n=10) | |
| ACE-K | Ortalama | 85712 | 85236 | 85403 | 85450 |
| | En düşük ortalama GA %95 | 84776 | 84840 | 84452 | 85035 |
| | En yüksek ortalama GA %95 | 86648 | 85633 | 86354 | 85862 |
| | SS | 1309.0 | 554.5 | 1330.0 | 1103.0 |
| | SEM | 413.8 | 175.3 | 420.5 | 201.3 |
| | %BSS | 1.53 | 0.65 | 1.56 | 1.29 |
| SAC | Ortalama | 126126 | 126071 | 125312 | 125836 |
| | En düşük ortalama GA %95 | 124922 | 125324 | 124387 | 125325 |
| | En yüksek ortalama GA %95 | 127330 | 126817 | 126237 | 126348 |
| | SS | 1683 | 1043 | 1293 | 1371 |
| | SEM | 532.2 | 329.9 | 409.0 | 250.2 |
| | %BSS | 1.33 | 0.83 | 1.03 | 1.09 |
| ASP | Ortalama | 79404 | 78610 | 78721 | 78911 |
| | En düşük ortalama GA %95 | 78728 | 77862 | 78388 | 78575 |
| | En yüksek ortalama GA %95 | 80080 | 79358 | 79054 | 79248 |
| | SS | 945.2 | 1045.0 | 465.5 | 900.6 |
| | SEM | 298.9 | 330.6 | 147.2 | 164.4 |
| | %BSS | 1.19 | 1.33 | 0.59 | 1.14 |
| ALI | Ortalama | 69080 | 69005 | 68625 | 68904 |
| | En düşük ortalama GA %95 | 68460 | 68086 | 68194 | 68550 |
| | En yüksek ortalama GA %95 | 69700 | 69923 | 69064 | 69259 |
| | SS | 867.0 | 1284.0 | 607.8 | 948.5 |
| | SEM | 274.2 | 406.0 | 192.2 | 173.2 |
| | %BSS | 1.26 | 1.86 | 0.89 | 1.38 |
| NHDC | Ortalama | 99186 | 98798 | 99245 | 99076 |
| | En düşük ortalama GA %95 | 98769 | 98593 | 98930 | 98897 |
| | En yüksek ortalama GA %95 | 99603 | 99004 | 99560 | 99256 |
| | SS | 582.5 | 287.4 | 440.8 | 481.5 |
| | SEM | 184.2 | 90.89 | 139.4 | 87.91 |
| | %BSS | 0.59 | 0.29 | 0.44 | 0.49 |
| RBA | Ortalama | 36470 | 35737 | 35335 | 35847 |
| | En düşük ortalama GA %95 | 35808 | 35414 | 35041 | 35556 |
| | En yüksek ortalama GA %95 | 37133 | 36060 | 35629 | 36139 |
| | SS | 925.6 | 451.5 | 411.1 | 781.2 |
| | SEM | 292.7 | 142.8 | 130.0 | 142.6 |
| | %BSS | 2.54 | 1.26 | 1.16 | 2.18 |
| NEO | Ortalama | 66673 | 66252 | 66747 | 66558 |
| | En düşük ortalama GA %95 | 66372 | 65884 | 66451 | 66375 |
| | En yüksek ortalama GA %95 | 66974 | 66620 | 67044 | 66740 |
| | SS | 420.7 | 514.6 | 414.5 | 489.6 |
| | SEM | 133.0 | 162.7 | 131.1 | 89.39 |
| | %BSS | 0.63 | 0.78 | 0.62 | 0.74 |

Çizelge 12. Şekerleme matriksinde tatlandırıcı standart çözeltileri için kesinlik çalışmalarının istatistiksel değerlendirmesi

| | | Gün içi | | | Günler arası (n=30) |
|-------|---------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------------|
| | | 1. Gün (n=10) | 2. Gün (n=10) | 3. Gün (n=10) | |
| ACE-K | Ortalama | 87456 | 87282 | 88000 | 87579 |
| | En düşük ortalama GA %95 | 86791 | 86251 | 87060 | 87115 |
| | En yüksek ortalama GA %95 | 88120 | 88313 | 88940 | 88043 |
| | SS | 928.8 | 1441 | 1314 | 1243 |
| | SEM | 293.7 | 455.7 | 415.6 | 226.9 |
| | %BSS | 1.06 | 1.65 | 1.49 | 1.42 |
| SAC | Ortalama | 130109 | 129163 | 131233 | 130168 |
| | En düşük ortalama GA %95 | 129356 | 127631 | 129810 | 129446 |
| | En yüksek ortalama GA %95 | 130861 | 130695 | 132656 | 130890 |
| | SS | 1052 | 2142 | 1989 | 1933 |
| | SEM | 332.6 | 677.3 | 629.1 | 352.9 |
| | %BSS | 0.81 | 1.66 | 1.52 | 1.48 |
| ASP | Ortalama | 80749 | 80812 | 80752 | 80771 |
| | En düşük ortalama GA %95 | 79977 | 80231 | 80055 | 80424 |
| | En yüksek ortalama GA %95 | 81521 | 81392 | 81449 | 81117 |
| | SS | 1079.0 | 811.3 | 974.0 | 927.9 |
| | SEM | 341.3 | 256.5 | 308.0 | 169.4 |
| | %BSS | 1.34 | 1.00 | 1.21 | 1.15 |
| ALI | Ortalama | 71069 | 71038 | 71566 | 71224 |
| | En düşük ortalama GA %95 | 70231 | 70364 | 70630 | 70800 |
| | En yüksek ortalama GA %95 | 71907 | 71712 | 72501 | 71649 |
| | SS | 1171.0 | 942.2 | 1308.0 | 1137 |
| | SEM | 370.3 | 258.0 | 413.6 | 207.6 |
| | %BSS | 1.65 | 1.33 | 1.83 | 1.60 |
| NHDC | Ortalama | 102729 | 102472 | 102597 | 102599 |
| | En düşük ortalama GA %95 | 102359 | 101883 | 102312 | 102377 |
| | En yüksek ortalama GA %95 | 103099 | 103061 | 102883 | 102822 |
| | SS | 517.3 | 823.5 | 399.1 | 595.3 |
| | SEM | 163.6 | 260.4 | 126.2 | 108.7 |
| | %BSS | 0.50 | 0.80 | 0.39 | 0.58 |
| RBA | Ortalama | 36254 | 36283 | 36319 | 36286 |
| | En düşük ortalama GA %95 | 35880 | 35922 | 36010 | 36109 |
| | En yüksek ortalama GA %95 | 36629 | 36644 | 36628 | 36462 |
| | SS | 523.9 | 504.7 | 431.9 | 472.1 |
| | SEM | 165.7 | 159.6 | 136.6 | 86.19 |
| | %BSS | 1.44 | 1.39 | 1.19 | 1.30 |
| NEO | Ortalama | 68274 | 68250 | 68410 | 68311 |
| | En düşük ortalama GA %95 | 67721 | 67745 | 67991 | 68060 |
| | En yüksek ortalama GA %95 | 68827 | 68755 | 68828 | 68562 |
| | SS | 773.0 | 705.9 | 584.8 | 671.8 |
| | SEM | 244.4 | 223.2 | 184.9 | 122.7 |
| | %BSS | 1.13 | 1.03 | 0.85 | 0.98 |

Çizelge 13. Reçel matrisinde tatlandırıcı standart çözeltileri için kesinlik çalışmalarının istatistiksel değerlendirilmesi

| | | Gün içi | | | Günler arası (n=30) |
|-------|---------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------------|
| | | 1. Gün (n=10) | 2. Gün (n=10) | 3. Gün (n=10) | |
| ACE-K | Ortalama | 85280 | 85263 | 85210 | 85251 |
| | En düşük ortalama GA %95 | 84433 | 84717 | 84475 | 84888 |
| | En yüksek ortalama GA %95 | 86127 | 85810 | 85946 | 85614 |
| | SS | 1183 | 764.1 | 1028 | 972.0 |
| | SEM | 374.2 | 241.6 | 325.1 | 177.5 |
| | %BSS | 1.39 | 0.90 | 1.21 | 1.14 |
| SAC | Ortalama | 127196 | 126170 | 125866 | 126411 |
| | En düşük ortalama GA %95 | 125721 | 125137 | 124580 | 125732 |
| | En yüksek ortalama GA %95 | 128671 | 127203 | 127152 | 127089 |
| | SS | 2062 | 1444 | 1798 | 1818 |
| | SEM | 652.0 | 456.6 | 568.4 | 331.9 |
| | %BSS | 1.62 | 1.14 | 1.43 | 1.44 |
| ASP | Ortalama | 78221 | 77815 | 78041 | 78092 |
| | En düşük ortalama GA %95 | 77607 | 77414 | 77290 | 77688 |
| | En yüksek ortalama GA %95 | 78835 | 78216 | 78792 | 78497 |
| | SS | 858.2 | 560.5 | 1050 | 1083 |
| | SEM | 271.4 | 177.2 | 331.9 | 197.7 |
| | %BSS | 1.10 | 0.72 | 1.34 | 1.39 |
| ALI | Ortalama | 69037 | 69218 | 68642 | 68966 |
| | En düşük ortalama GA %95 | 68370 | 68687 | 68104 | 68659 |
| | En yüksek ortalama GA %95 | 69703 | 69749 | 69181 | 69273 |
| | SS | 932.1 | 741.7 | 753.0 | 822.2 |
| | SEM | 294.7 | 234.6 | 238.1 | 150.1 |
| | %BSS | 1.35 | 1.07 | 1.10 | 1.19 |
| NHDC | Ortalama | 99092 | 99264 | 100164 | 99506 |
| | En düşük ortalama GA %95 | 98523 | 98885 | 99801 | 99219 |
| | En yüksek ortalama GA %95 | 99661 | 99642 | 100527 | 99794 |
| | SS | 795.3 | 529.7 | 507.1 | 769.4 |
| | SEM | 251.5 | 167.5 | 160.4 | 140.5 |
| | %BSS | 0.80 | 0.53 | 0.51 | 0.77 |
| RBA | Ortalama | 35628 | 35367 | 35817 | 35604 |
| | En düşük ortalama GA %95 | 35301 | 35088 | 35665 | 35454 |
| | En yüksek ortalama GA %95 | 35955 | 35646 | 35969 | 35754 |
| | SS | 457.0 | 389.8 | 212.1 | 401.5 |
| | SEM | 144.5 | 123.3 | 67.09 | 73.30 |
| | %BSS | 1.28 | 1.10 | 0.59 | 1.13 |
| NEO | Ortalama | 66778 | 66438 | 66930 | 66715 |
| | En düşük ortalama GA %95 | 66529 | 66204 | 66748 | 66578 |
| | En yüksek ortalama GA %95 | 67027 | 66671 | 67111 | 66852 |
| | SS | 348.4 | 326.1 | 253.9 | 366.7 |
| | SEM | 110.2 | 103.1 | 80.28 | 66.95 |
| | %BSS | 0.52 | 0.49 | 0.38 | 0.55 |

Yöntemin doğrusallığını incelemek amacıyla içecek, şekerleme ve reçel olmak üzere üç farklı matriks ortamında ACE-K, ASP, ALI, NHDC, NEO (1.00, 2.00, 4.00, 6.00, 8.00, 10.00, 16.00, 20.00, 24.00, 30.00, 36.00, 40.00 mg/L), SAC (0.50, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, 8.00, 10.00, 12.00, 15.00, 18.00, 20.00 mg/L) ve RBA (4.50, 9.00, 18.00, 27.00, 36.00, 45.00, 72.00, 90.00, 108.00, 135.00, 162.00, 180.00 mg/L) için derişime karşı analit cevabının yer aldığı grafikler elde edilmiştir. Doğrusallık, gün içi ve günler arası olarak incelenmiş ve doğrusal regresyon analiziyle eğim, kesim, korelasyon katsayısı, eğim ve kesim değerlerinin %95 güven seviyesindeki olası sınırları hesaplanmıştır. Tayini yapılan tüm tatlandırıcı tiplerinin yöntemin belirtilen derişim aralığında doğrusal sonuçlar verdiği ve Lambert-Beer Yasası'na uyduğu görülmüştür. Yöntemin gün içi ve günler arası doğrusallığına ilişkin istatistiksel veriler **Çizelge 14-Çizelge 34**'de verilmiştir.

Çizelge 14. İçecek matriksi için ACE-K standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi

| | Gün içi (n=12) | | | Günler arası (n=36) |
|----------------------|---------------------------|---------------|--------------|---------------------|
| Aralık (mg/L) | 1.00-40.00 | | | |
| Eğim | 8672 ± 30.62 | 8729 ± 25.41 | 8748 ± 70.67 | 8716 ± 26.09 |
| Kesim | -513.7 ± 640.4 | -1046 ± 531.4 | -1508 ± 1478 | -1022 ± 545.8 |
| r | 0.9999 | 1.000 | 0.9997 | 0.9998 |
| Eğim GA %95 | 8603 - 8740 | 8673 - 8786 | 8590 - 8905 | 8663 - 8769 |
| Kesim GA %95 | -1941 - 913.1 | -2230 - 138.3 | -4800 - 1785 | -2132 - 87.52 |
| LOQ (mg/L) | 0.35 | 0.34 | 0.34 | 0.34 |
| LOD (mg/L) | 0.11 | 0.10 | 0.10 | 0.10 |
| ANOVA | F (2.22) = 0.124 P > 0.05 | | | |

Çizelge 15. İçecek matriksi için SAC standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi

| | Gün içi (n=12) | | | Günler arası (n=36) |
|--------------------------------|---------------------------|---------------|---------------|---------------------|
| Aralık (mg/L) | 0.50-20.00 | | | |
| Eğim | 25636 ± 266.7 | 25987 ± 113.7 | 25853 ± 153.8 | 25825 ± 110.7 |
| Kesim | 2600 ± 2789 | -963.7 ± 1189 | -2106 ± 1608 | -156.4 ± 1158 |
| r | 0.9995 | 0.9999 | 0.9998 | 0.9997 |
| Eğim GA %₉₅ | 25042 - 26230 | 25733 - 26240 | 25511 - 26196 | 25600 - 26050 |
| Kesim GA %₉₅ | -3614 - 8814 | -3612 - 1685 | -5689 - 1478 | -2512 - 2199 |
| LOQ (mg/L) | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 |
| LOD (mg/L) | 0.04 | 0.03 | 0.04 | 0.04 |
| ANOVA | F (2.22) = 1.648 P > 0.05 | | | |

Çizelge 16. İçecek matriksi için ASP standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi

| | Gün içi (n=12) | | | Günler arası (n=36) |
|--------------------------------|---------------------------|----------------|---------------|---------------------|
| Aralık (mg/L) | 1.00-40.00 | | | |
| Eğim | 7906 ± 37.45 | 8036 ± 40.00 | 7896 ± 38.92 | 7946 ± 24.34 |
| Kesim | 1560 ± 783.2 | -906.0 ± 836.5 | 714.0 ± 814.1 | 455.8 ± 509.0 |
| r | 0.9999 | 0.9999 | 0.9999 | 0.9998 |
| Eğim GA %₉₅ | 7823 - 7990 | 7947 - 8125 | 7810 - 7983 | 7897 - 7996 |
| Kesim GA %₉₅ | -185.5 - 3305 | -2770 - 957.7 | -1100 - 2528 | -579.2 - 1491 |
| LOQ (mg/L) | 0.37 | 0.37 | 0.36 | 0.37 |
| LOD (mg/L) | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 |
| ANOVA | F (2.22) = 0.785 P > 0.05 | | | |

Çizelge 17. İçecek matriksi için ALI standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi

| | Gün içi (n=12) | | | Günler arası (n=36) |
|--------------------------------|---------------------------|----------------|--------------|---------------------|
| Aralık (mg/L) | 1.00-40.00 | | | |
| Eğim | 6985 ± 31.95 | 6962 ± 37.53 | 6907 ± 51.53 | 6951 ± 23.28 |
| Kesim | -123.3 ± 668.2 | -185.4 ± 784.9 | 1325 ± 1078 | 338.8 ± 486.9 |
| r | 0.9999 | 0.9999 | 0.9997 | 0.9998 |
| Eğim GA %₉₅ | 6914 - 7057 | 6878 - 7046 | 6792 - 7021 | 6904 - 6999 |
| Kesim GA %₉₅ | -1612 - 1365 | -1934 - 1563 | -1076 - 3726 | -651.3 - 1329 |
| LOQ (mg/L) | 0.42 | 0.43 | 0.43 | 0.43 |
| LOD (mg/L) | 0.13 | 0.13 | 0.13 | 0.13 |
| ANOVA | F (2.22) = 0.374 P > 0.05 | | | |

Çizelge 18. İçecek matriksi için NHDC standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi

| | Gün içi (n=12) | | | Günler arası (n=36) |
|--------------------------------|---------------------------|----------------|----------------|---------------------|
| Aralık (mg/L) | 1.00-40.00 | | | |
| Eğim | 9947 ± 13.13 | 9954 ± 15.64 | 9938 ± 15.00 | 9946 ± 8.181 |
| Kesim | -425.0 ± 274.6 | -509.6 ± 327.0 | -534.3 ± 313.7 | -489.6 ± 171.1 |
| r | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| Eğim GA %₉₅ | 9918 - 9976 | 9919 - 9988 | 9905 - 9972 | 9930 - 9963 |
| Kesim GA %₉₅ | -1037 - 186.8 | -1238 - 219.0 | -1233 - 164.7 | -837.6 - -141.7 |
| LOQ (mg/L) | 0.30 | 0.30 | 0.30 | 0.30 |
| LOD (mg/L) | 0.09 | 0.09 | 0.09 | 0.09 |
| ANOVA | F (2.22) = 0.637 P > 0.05 | | | |

Çizelge 19. İçecek matrisi için RBA standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirilmesi

| | Gün içi (n=12) | | | Günler arası (n=36) |
|--------------------------------|---------------------------|---------------|----------------|---------------------|
| Aralık (mg/L) | 4.50-180.00 | | | |
| Eğim | 808.8 ± 6.468 | 804.4 ± 4.152 | 816.8 ± 3.922 | 810.0 ± 2.867 |
| Kesim | 720.6 ± 608.7 | 1194 ± 390.8 | -40.85 ± 369.1 | 624.8 ± 269.8 |
| r | 0.9997 | 0.9999 | 0.9999 | 0.9998 |
| Eğim GA %₉₅ | 794.4 - 823.2 | 795.2 - 813.7 | 808.0 - 825.5 | 804.2 - 815.8 |
| Kesim GA %₉₅ | -635.5 - 2077 | 323.9 - 2065 | -863.2 - 781.5 | 76.10 - 1173 |
| LOQ (mg/L) | 3.37 | 3.61 | 3.54 | 3.51 |
| LOD (mg/L) | 1.01 | 1.08 | 1.06 | 1.05 |
| ANOVA | F (2.22) = 0.457 P > 0.05 | | | |

Çizelge 20. İçecek matrisi için NEO standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirilmesi

| | Gün içi (n=12) | | | Günler arası (n=36) |
|--------------------------------|---------------------------|----------------|----------------|---------------------|
| Aralık (mg/L) | 1.00-40.00 | | | |
| Eğim | 6693 ± 6.529 | 6723 ± 12.16 | 6717 ± 10.77 | 6711 ± 6.151 |
| Kesim | -215.1 ± 136.5 | -853.5 ± 254.3 | -444.3 ± 225.2 | -504.3 ± 128.7 |
| r | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| Eğim GA %₉₅ | 6679 - 6708 | 6695 - 6750 | 6693 - 6741 | 6698 - 6723 |
| Kesim GA %₉₅ | -519.3 - 89.15 | -1420 - -286.9 | -946.0 - 57.48 | -765.9 - -242.7 |
| LOQ (mg/L) | 0.45 | 0.45 | 0.45 | 0.45 |
| LOD (mg/L) | 0.14 | 0.14 | 0.13 | 0.14 |
| ANOVA | F (2.22) = 1.368 P > 0.05 | | | |

Çizelge 21. Şekerleme matriksi için ACE-K standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi

| | Gün içi (n=12) | | | Günler arası (n=36) |
|----------------------|---------------------------|---------------|---------------|---------------------|
| Aralık (mg/L) | 1.00-40.00 | | | |
| Eğim | 8781 ± 38.23 | 8794 ± 36.27 | 8787 ± 35.55 | 8787 ± 20.13 |
| Kesim | 1265 ± 799.6 | 759.9 ± 758.6 | 625.6 ± 743.4 | 883.6 ± 421.0 |
| r | 0.9999 | 0.9999 | 0.9999 | 0.9999 |
| Eğim GA %95 | 8696 - 8866 | 8713 - 8875 | 8708 - 8867 | 8747 - 8828 |
| Kesim GA %95 | -516.3 - 3047 | -930.2 - 2450 | -1031 - 2282 | 27.36 - 1740 |
| LOQ (mg/L) | 0.34 | 0.34 | 0.34 | 0.34 |
| LOD (mg/L) | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 |
| ANOVA | F (2.22) = 0.770 P > 0.05 | | | |

Çizelge 22. Şekerleme matriksi için SAC standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi

| | Gün içi (n=12) | | | Günler arası (n=36) |
|----------------------|---------------------------|---------------|---------------|---------------------|
| Aralık (mg/L) | 0.50-20.00 | | | |
| Eğim | 26346 ± 118.0 | 26267 ± 100.4 | 26380 ± 111.1 | 26331 ± 60.53 |
| Kesim | -953.6 ± 1234 | -721.8 ± 1050 | -1134 ± 1162 | -936.5 ± 632.9 |
| r | 0.9999 | 0.9999 | 0.9999 | 0.9999 |
| Eğim GA %95 | 26083 - 26609 | 26044 - 26491 | 26132 - 26627 | 26208 - 26454 |
| Kesim GA %95 | -3703 - 1795 | -3062 - 1618 | -3723 - 1454 | -2224 - 350.6 |
| LOQ (mg/L) | 0.11 | 0.11 | 0.12 | 0.12 |
| LOD (mg/L) | 0.03 | 0.03 | 0.04 | 0.03 |
| ANOVA | F (2.22) = 0.338 P > 0.05 | | | |

Çizelge 23. Şekerleme matriksi için ASP standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi

| | Gün içi (n=12) | | | Günler arası (n=36) |
|----------------------|---------------------------|---------------|---------------|---------------------|
| Aralık (mg/L) | 1.00-40.00 | | | |
| Eğim | 8066 ± 26.06 | 8057 ± 18.97 | 8035 ± 31.86 | 8053 ± 14.46 |
| Kesim | 700.5 ± 545.1 | 608.1 ± 396.8 | 969.8 ± 666.3 | 759.4 ± 302.4 |
| r | 0.9999 | 1.000 | 0.9999 | 0.9999 |
| Eğim GA %95 | 8008 - 8125 | 8015 - 8099 | 7964 - 8106 | 8023 - 8082 |
| Kesim GA %95 | -514.0 - 1915 | -276.1 - 1492 | -514.8 - 2454 | 144.4 - 1374 |
| LOQ (mg/L) | 0.36 | 0.37 | 0.37 | 0.37 |
| LOD (mg/L) | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 |
| ANOVA | F (2.22) = 0.186 P > 0.05 | | | |

Çizelge 24. Şekerleme matriksi için ALI standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi

| | Gün içi (n=12) | | | Günler arası (n=36) |
|----------------------|---------------------------|--------------|----------------|---------------------|
| Aralık (mg/L) | 1.00-40.00 | | | |
| Eğim | 7071 ± 26.67 | 7042 ± 21.29 | 7093 ± 17.77 | 7068 ± 13.20 |
| Kesim | 793.0 ± 557.8 | 1366 ± 445.2 | -161.9 ± 371.6 | 665.8 ± 276.1 |
| r | 0.9999 | 1.000 | 1.000 | 0.9999 |
| Eğim GA %95 | 7011 - 7130 | 6994 - 7089 | 7053 - 7132 | 7042 - 7095 |
| Kesim GA %95 | -449.8 - 2036 | 374.4 - 2358 | -989.7 - 666.0 | 104.4 - 1227 |
| LOQ (mg/L) | 0.41 | 0.42 | 0.43 | 0.42 |
| LOD (mg/L) | 0.12 | 0.13 | 0.13 | 0.13 |
| ANOVA | F (2.22) = 1.652 P > 0.05 | | | |

Çizelge 25. Şekerleme matriksi için NHDC standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi

| | Gün içi (n=12) | | | Günler arası (n=36) |
|----------------------|---------------------------|----------------|----------------|---------------------|
| Aralık (mg/L) | 1.00-40.00 | | | |
| Eğim | 10252 ± 9.049 | 10270 ± 12.82 | 10313 ± 10.27 | 10279 ± 7.315 |
| Kesim | 311.1 ± 189.3 | 73.00 ± 268.2 | -678.3 ± 214.7 | -98.09 ± 153.0 |
| r | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| Eğim GA %95 | 10232 - 10273 | 10242 - 10299 | 10290 - 10336 | 10264 - 10293 |
| Kesim GA %95 | -110.6 - 732.7 | -524.4 - 670.4 | -1157 - -200.0 | -409.2 - 213.0 |
| LOQ (mg/L) | 0.29 | 0.29 | 0.29 | 0.29 |
| LOD (mg/L) | 0.09 | 0.09 | 0.09 | 0.09 |
| ANOVA | F (2.22) = 0.029 P > 0.05 | | | |

Çizelge 26. Şekerleme matriksi için RBA standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi

| | Gün içi (n=12) | | | Günler arası (n=36) |
|----------------------|---------------------------|----------------|----------------|---------------------|
| Aralık (mg/L) | 4.50-180.00 | | | |
| Eğim | 811.0 ± 4.794 | 813.8 ± 4.442 | 819.5 ± 4.803 | 814.8 ± 2.672 |
| Kesim | 385.4 ± 451.2 | -215.7 ± 418.1 | -670.2 ± 452.1 | -166.8 ± 251.5 |
| r | 0.9998 | 0.9999 | 0.9998 | 0.9998 |
| Eğim GA %95 | 800.3 - 821.7 | 803.9 - 823.7 | 808.8 - 830.2 | 809.3 - 820.2 |
| Kesim GA %95 | -619.8 - 1391 | -1147 - 715.8 | -1677 - 337.0 | -678.3 - 344.7 |
| LOQ (mg/L) | 3.73 | 3.69 | 3.75 | 3.73 |
| LOD (mg/L) | 1.12 | 1.11 | 1.12 | 1.12 |
| ANOVA | F (2.22) = 2.753 P > 0.05 | | | |

Çizelge 27. Şekerleme matrisi için NEO standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirilmesi

| | Gün içi (n=12) | | | Günler arası (n=36) |
|----------------------|---------------------------|-----------------|----------------|---------------------|
| Aralık (mg/L) | 1.00-40.00 | | | |
| Eğim | 6885 ± 11.39 | 6888 ± 6.066 | 6871 ± 9.846 | 6881 ± 5.258 |
| Kesim | -321.2 ± 238.1 | -383.8 ± 126.9 | -39.90 ± 205.9 | -248.3 ± 110.0 |
| r | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| Eğim GA %95 | 6860 - 6910 | 6875 - 6902 | 6849 - 6893 | 6871 - 6892 |
| Kesim GA %95 | -851.7 - 209.3 | -666.4 - -101.1 | -498.7 - 418.9 | -471.9 - -24.68 |
| LOQ (mg/L) | 0.44 | 0.44 | 0.44 | 0.44 |
| LOD (mg/L) | 0.13 | 0.13 | 0.13 | 0.13 |
| ANOVA | F (2.22) = 0.058 P > 0.05 | | | |

Çizelge 28. Reçel matrisi için ACE-K standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirilmesi

| | Gün içi (n=12) | | | Günler arası (n=36) |
|----------------------|---------------------------|--------------|---------------|---------------------|
| Aralık (mg/L) | 1.00-40.00 | | | |
| Eğim | 8509 ± 39.58 | 8524 ± 68.73 | 8507 ± 51.35 | 8513 ± 29.91 |
| Kesim | 299.6 ± 827.8 | 490.2 ± 1438 | -10.96 ± 1074 | 259.6 ± 625.6 |
| r | 0.9999 | 0.9997 | 0.9998 | 0.9998 |
| Eğim GA %95 | 8421 - 8598 | 8371 - 8677 | 8392 - 8621 | 8452 - 8574 |
| Kesim GA %95 | -1545 - 2144 | -2713 - 3693 | -2404 - 2382 | -1013 - 1532 |
| LOQ (mg/L) | 0.36 | 0.34 | 0.36 | 0.35 |
| LOD (mg/L) | 0.11 | 0.10 | 0.11 | 0.11 |
| ANOVA | F (2.22) = 0.884 P > 0.05 | | | |

Çizelge 29. Reçel matrisi için SAC standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi

| | Gün içi (n=12) | | | Günler arası (n=36) |
|----------------------|---------------------------|---------------|---------------|---------------------|
| Aralık (mg/L) | 0.50-20.00 | | | |
| Eğim | 25718 ± 134.2 | 25497 ± 139.0 | 25495 ± 184.9 | 25509 ± 82.31 |
| Kesim | -3413 ± 1403 | -338.1 ± 1454 | -779.8 ± 1934 | -1162 ± 914.0 |
| r | 0.9999 | 0.9997 | 0.9999 | 0.9998 |
| Eğim GA %95 | 25419 - 26017 | 25187 - 25807 | 25082 - 25907 | 6135 - 6221 |
| Kesim GA %95 | -6540 - -286.6 | -3578 - 2901 | -5088 - 3529 | -790.4 - 166.3 |
| LOQ (mg/L) | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12 |
| LOD (mg/L) | 0.03 | 0.04 | 0.03 | 0.04 |
| ANOVA | F (2.22) = 0.535 P > 0.05 | | | |

Çizelge 30. Reçel matrisi için ASP standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi

| | Gün içi (n=12) | | | Günler arası (n=36) |
|----------------------|---------------------------|----------------|---------------|---------------------|
| Aralık (mg/L) | 1.00-40.00 | | | |
| Eğim | 7805 ± 39.58 | 7803 ± 23.38 | 7737 ± 41.50 | 7782 ± 20.48 |
| Kesim | 249.5 ± 827.7 | -169.9 ± 488.9 | 672.1 ± 867.9 | 250.5 ± 428.3 |
| r | 0.9999 | 1.000 | 0.9999 | 0.9999 |
| Eğim GA %95 | 7717 - 7893 | 7751 - 7855 | 7645 - 7830 | 7740 - 7823 |
| Kesim GA %95 | -1595 - 2094 | -1259 - 919.4 | -1262 - 2606 | -620.4 - 1122 |
| LOQ (mg/L) | 0.38 | 0.37 | 0.38 | 0.38 |
| LOD (mg/L) | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 0.11 |
| ANOVA | F (2.22) = 1.749 P > 0.05 | | | |

Çizelge 31. Reçel matrisi için ALI standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi

| | Gün içi (n=12) | | | Günler arası (n=36) |
|----------------------|---------------------------|--------------|--------------|---------------------|
| Aralık (mg/L) | 1.00-40.00 | | | |
| Eğim | 6906 ± 57.78 | 6770 ± 51.76 | 6937 ± 57.78 | 6871 ± 33.75 |
| Kesim | -177.4 ± 1208 | 1259 ± 1083 | 24.48 ± 1208 | 368.6 ± 705.8 |
| r | 0.9997 | 0.9997 | 0.9997 | 0.9996 |
| Eğim GA %95 | 6778 - 7035 | 6655 - 6885 | 6808 - 7066 | 6803 - 6940 |
| Kesim GA %95 | -2870 - 2515 | -1153 - 3671 | -2668 - 2717 | -1067 - 1804 |
| LOQ (mg/L) | 0.45 | 0.43 | 0.45 | 0.44 |
| LOD (mg/L) | 0.13 | 0.13 | 0.13 | 0.13 |
| ANOVA | F (2.22) = 1.844 P > 0.05 | | | |

Çizelge 32. Reçel matrisi için NHDC standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi

| | Gün içi (n=12) | | | Günler arası (n=36) |
|----------------------|---------------------------|----------------|----------------|---------------------|
| Aralık (mg/L) | 1.00-40.00 | | | |
| Eğim | 9921 ± 7.177 | 9931 ± 15.88 | 9941 ± 14.08 | 9931 ± 7.830 |
| Kesim | -223.8 ± 150.1 | 112.5 ± 332.2 | -578.0 ± 294.6 | -229.8 ± 163.8 |
| r | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| Eğim GA %95 | 9905 - 9937 | 9895 - 9966 | 9909 - 9972 | 9915 - 9947 |
| Kesim GA %95 | -558.2 - 110.6 | -627.6 - 852.6 | -1234 - 78.22 | -562.8 - 103.2 |
| LOQ (mg/L) | 0.30 | 0.30 | 0.30 | 0.30 |
| LOD (mg/L) | 0.09 | 0.09 | 0.09 | 0.09 |
| ANOVA | F (2.22) = 2.917 P > 0.05 | | | |

Çizelge 33. Reçel matrisi için RBA standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi

| | Gün içi (n=12) | | | Günler arası (n=36) |
|----------------------|---------------------------|---------------|---------------|---------------------|
| Aralık (mg/L) | 4.50-180.00 | | | |
| Eğim | 807.1 ± 7.075 | 805.3 ± 3.783 | 813.0 ± 5.037 | 808.5 ± 3.022 |
| Kesim | 969.7 ± 665.9 | 1087 ± 356.0 | 462.4 ± 474.1 | 839.8 ± 284.4 |
| r | 0.9996 | 0.9999 | 0.9998 | 0.9997 |
| Eğim GA %95 | 791.3 - 822.9 | 796.8 - 813.7 | 801.8 - 824.3 | 802.3 - 814.6 |
| Kesim GA %95 | -513.9 - 2453 | 294.3 - 1881 | -593.9 - 1519 | 261.5 - 1418 |
| LOQ (mg/L) | 1.90 | 1.91 | 1.90 | 1.90 |
| LOD (mg/L) | 0.57 | 0.57 | 0.57 | 0.57 |
| ANOVA | F (2.22) = 0.022 P > 0.05 | | | |

Çizelge 34. Reçel matrisi için NEO standart çözeltisinin gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi

| | Gün içi (n=12) | | | Günler arası (n=36) |
|----------------------|---------------------------|----------------|----------------|---------------------|
| Aralık (mg/L) | 1.00-40.00 | | | |
| Eğim | 6647 ± 10.77 | 6668 ± 8.313 | 6672 ± 6.919 | 6662 ± 5.192 |
| Kesim | -17.70 ± 263.0 | -301.2 ± 203.0 | -321.0 ± 168.9 | -213.3 ± 126.8 |
| r | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| Eğim GA %95 | 6623 - 6671 | 6649 - 6686 | 6657 - 6688 | 6652 - 6673 |
| Kesim GA %95 | -596.5 - 561.1 | -747.9 - 145.5 | -692.8 - 50.82 | -470.3 - 43.70 |
| LOQ (mg/L) | 0.45 | 0.45 | 0.45 | 0.45 |
| LOD (mg/L) | 0.13 | 0.13 | 0.13 | 0.13 |
| ANOVA | F (2.22) = 0.650 P > 0.05 | | | |

Yöntemin çalışma aralığının belirlenmesinde, analizlerde elde edilebilecek analiz sinyallerinin büyüklükleri, bunlara karşılık gelen derişimler ve matrisden kaynaklanan gürültü etkileri göz önüne alınmıştır. LOD ve LOQ değerleri, kromatogramlardaki sinyal şiddeti ve en yakın gürültü şiddeti oranları kullanılarak hesaplanmıştır. Her bir matris için kromatogramlardan elde edilen sinyal

şiddeti/gürültü şiddeti değeri saptama sınırı için 3, tayin sınırı için ise 10 ile çarpılmıştır. Hesaplamada kullanılan istatistiksel veriler doğrusallığın günler arası çalışmalarından elde edilmiştir.

Tayini hedeflenen maddelerin, örnekteki girişim yapabilecek diğer maddelerin varlığında dahi tam ve doğru olarak tayin edilebileceğinin gösterilmesi yönünden seçiciliğin belirlenmesi için örnek analizlerinde elde edilen kromatogramlar analitik olarak değerlendirilmiştir. Seçiciliğin belirlenmesinde seçicilik faktörünün (α) 1.0'den büyük olması referans alınmış, her bir analit için seçicilik faktörleri hesaplanmıştır. SUT sonuçlarına ilişkin çizelgelerde belirtildiği üzere elde edilen değerlerin bu kritere uyduğu, dolayısıyla yöntemin yeterli seçiciliğe sahip olduğu kabul edilmiştir.

Sağlamlık çalışmaları için 10.00 mg/L derişimindeki ACE-K, ASP, ALI, NHDC, NEO; 5.00 mg/L derişimindeki SAC ve 45.00 mg/L derişimindeki RBA çözeltileri akış hızı (0.98, 1.00 ve 1.02 mL/dk), kolon sıcaklığı (29, 30 ve 31 °C), tampon pH'ı (2.90, 3.00 ve 3.10) ve hareketli faz tampon yüzdesi (%49, %50 ve %51) parametreleri değiştirilerek analizler (n=3) gerçekleştirilmiş ve % BSS değerleri hesaplanmıştır. **Çizelge 35**'de görüldüğü gibi elde edilen düşük % BSS değerleri (<2) yöntemin sağlamlığını göstermektedir.

Çizelge 35. Tatlandırıcı karışımı standart çözeltileri için sağlamlık çalışmaları sonuçları (n=3)

| Parametre | %BSS | | | | | | |
|--|-------|------|------|------|------|------|------|
| | ACE-K | SAC | ASP | ALI | NHDC | RBA | NEO |
| Akış Hızı (0.98, 1.00 ve 1.02 mL/dk) | 1.14 | 0.59 | 1.65 | 0.92 | 0.49 | 1.72 | 0.38 |
| Kolon Sıcaklığı (29, 30 ve ve 31 °C) | 0.57 | 0.52 | 0.68 | 0.72 | 0.65 | 1.90 | 0.19 |
| Tampon pH'ı (2.90, 3.00 ve 3.10) | 0.65 | 0.64 | 1.45 | 0.81 | 0.85 | 1.55 | 0.64 |
| Hareketli Faz Tampon Yüzdesi (%49, %50 ve %51) | 0.68 | 0.39 | 0.58 | 0.87 | 0.65 | 1.15 | 0.95 |

Örnek Uygulamaları

Geliştirilen YPSK yöntemi ile ACE, SAC, ASP, ALI, NHDC, RBA ve NEO tayinleri içecek, şekerleme ve reçel olmak üzere üç tür gıda grubunda ve farmasötik ürün örneklerinde gerçekleştirilmiştir. Ticari olarak çeşitli marketlerden ve eczanelerde temin edilmiş farklı marka ve formlardaki gıda ve farmasötik ürün örnekleri basit örnek hazırlama teknikleri ile hazırlanmıştır. Yöntemin doğrusallık aralığında yer alacak şekilde içecek ve sıvı farmasötik ürün örnekleri 1/10 oranında seyreltilerek, şekerleme, reçeller, katı ve jel formdaki farmasötik ürün örnekleri ise 10 mg/mL derişimde hazırlanmış, ultrasonik banyoda

10 dk bekletildikten sonra 0.2 µm gözenek boyutlu PVDF filtrelerden süzülerek doğrudan kolona yüklenmiştir. Kalibrasyon aralığının dışında kalan F marka gargara, M marka gargara, Z marka oral damla, A marka şurup, M marka oral sprey, N marka efervesan tablet, D marka efervesan tablet, A marka diş protez jeli ve G marka boğaz pastili örnek çözeltileri 1/10 oranında seyreltilerek tekrar analiz gerçekleştirilmiş ve miktar tayini yapılmıştır. Tüm seyreltme işlemlerinde hareketli fazın son bileşimi kullanılmıştır. Çalışmada 3 adet limonata, 2 adet buzlu çay, 11 adet gazlı içecek, 5 adet enerji içeceği, 15 adet şekerleme, 8 adet reçel ve 25 adet farmasötik ürün örneğinin analizi belirlenen koşullarda gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucu elde edilen sonuçlar **Çizelge 36-Çizelge 39**'da, kromatogramlar **Şekil 25-Şekil 93**'de verilmiştir.

Çizelge 36. Analizi yapılan içecek ürünlerinin tatlandırıcı içerikleri

| Örnek | Bulunan Miktar (mg/L) ±SS (n=3) | | | |
|---|---------------------------------|------------|-------------|------------|
| | ACE-K | SAC | ASP | RBA |
| Ç marka light gazoz | 25.80±0.42 | - | - | - |
| LC marka kola | 179.21±2.72 | - | 211.21±1.33 | - |
| U marka light gazoz | 24.40±0.65 | - | 339.46±0.75 | - |
| U marka light portakal | 18.23±0.15 | - | 240.03±0.77 | - |
| U marka light limonata | 30.14±0.95 | - | 346.84±0.62 | - |
| D marka limonata | 170.12±0.47 | - | 180.14±3.77 | - |
| C Z marka kola | 136.50±2.56 | - | 138.52±2.60 | - |
| C marka light kola | 149.55±1.37 | - | 210.43±1.68 | - |
| P M marka kola | 36.55±1.65 | - | 395.58±0.96 | - |
| P marka light kola | 81.38±2.32 | - | 311.69±0.86 | - |
| F marka light şeftali aromalı soğuk çay | 93.39±1.85 | 28.38±0.91 | 78.17±0.11 | - |
| L marka egzotik meyve aromalı soğuk çay | - | - | - | 72.92±2.92 |
| P marka karışık meyve aromalı izotonik sporcu içeceği | 36.61±0.69 | - | - | - |
| P marka limon ve greyfurt aromalı izotonik sporcu içeceği | - | 52.47±0.16 | - | - |
| P marka portakal aromalı izotonik sporcu içeceği | 63.75±0.37 | - | - | - |
| G marka enerji içeceği | 275.71±0.35 | - | - | - |
| R marka şekerlessiz enerji içeceği | 182.36±2.06 | - | 109.54±1.07 | - |
| S marka şekerlessiz gazoz | 107.76±0.50 | - | 156.13±0.26 | - |
| A marka mandalina aromalı soda | 220.19±0.09 | - | - | - |
| B marka mandalina aromalı gazoz | 97.97±0.11 | - | 126.57±2.13 | - |
| A marka limonata | 213.36±4.74 | - | - | - |

Çizelge 37. Analizi yapılan şekerleme ürünlerinin tatlandırıcı içerikleri

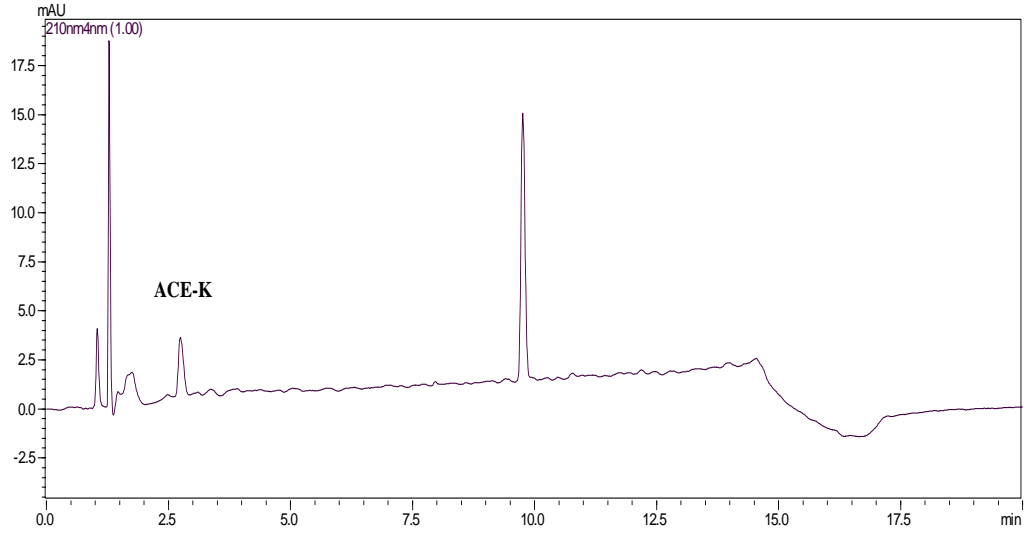
| Örnek | Bulunan Miktar (mg/kg) ±SS (n=3) | | | |
|--|----------------------------------|-----|--------------|--------------|
| | ACE-K | SAC | ASP | RBA |
| T marka karanfil aromalı şekerleme | 625.37±5.52 | - | - | - |
| R marka nane aromalı şekerleme | 356.21±6.93 | - | 225.45±2.81 | - |
| R marka keskin nane aromalı şekerleme | 241.77±2.40 | - | 2066.08±3.31 | - |
| R marka nar-çilek aromalı şekerleme | 433.74±2.39 | - | 879.57±8.58 | - |
| R marka ahududu-limon aromalı şekerleme | 209.29±4.37 | - | 679.31±6.37 | - |
| R marka mandalina-karpuz aromalı şekerleme | 414.53±3.23 | - | 848.94±2.38 | - |
| O marka yeşil nane aromalı draje | Tespit edilemedi | - | - | - |
| O marka mentol aromalı draje | 206.27±1.72 | - | - | - |
| MN marka çilek aromalı draje | 258.14±3.44 | - | 685.82±10.02 | - |
| MN marka nane aromalı draje | 348.61±6.13 | - | 1158.37±1.04 | - |
| MN marka portakal aromalı draje | 380.84±5.31 | - | 735.88±1.44 | - |
| RS marka çilek aromalı şekerleme | 2236.60±8.55 | - | 4029.13±0.25 | - |
| L marka meyan köklü pastil | - | - | - | 406.82±5.55 |
| L marka kaktüs aromalı pastil | - | - | - | 844.48±18.05 |
| L marka ökaliptus aromalı pastil | - | - | - | 782.31±14.32 |

Çizelge 38. Analizi yapılan reçel ürünlerinin tatlandırıcı içerikleri

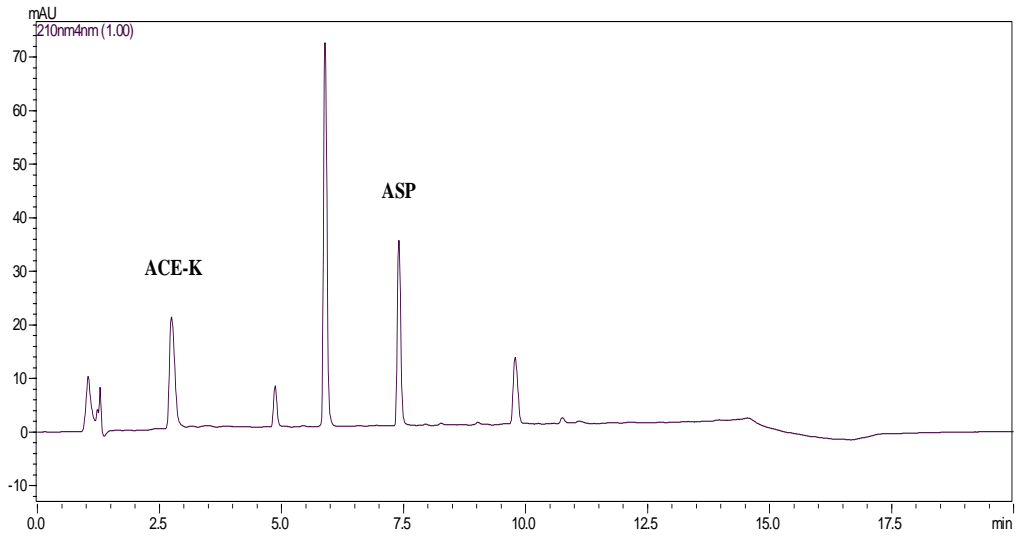
| Örnek | Bulunan Miktar (mg/kg) ±SS (n=3) | | | |
|--------------------------------------|----------------------------------|-----|-------------|-----|
| | ACE-K | SAC | ASP | RBA |
| Y marka diabetik çilek reçeli | 506.31±5.25 | - | 281.50±3.45 | - |
| Y marka diabetik turunç reçeli | 525.78±1.30 | - | 373.18±5.22 | - |
| Y marka diabetik ahududu reçeli | 383.68±2.77 | - | 142.90±6.61 | - |
| M-L marka diabetik vişne reçeli | 602.62±3.03 | - | 47.04±0.80 | - |
| M-L marka diabetik dört meyve reçeli | 268.35±5.85 | - | - | - |
| M-L marka diabetik turunç reçeli | 251.66±7.41 | - | 62.34±1.00 | - |
| M-L marka diabetik çilek reçeli | 470.70±6.20 | - | 122.84±7.94 | - |
| T marka diabetik çilek reçeli | - | - | - | - |

Çizelge 39. Analizi yapılan farmasötik ürünlerin tatlandırıcı içerikleri

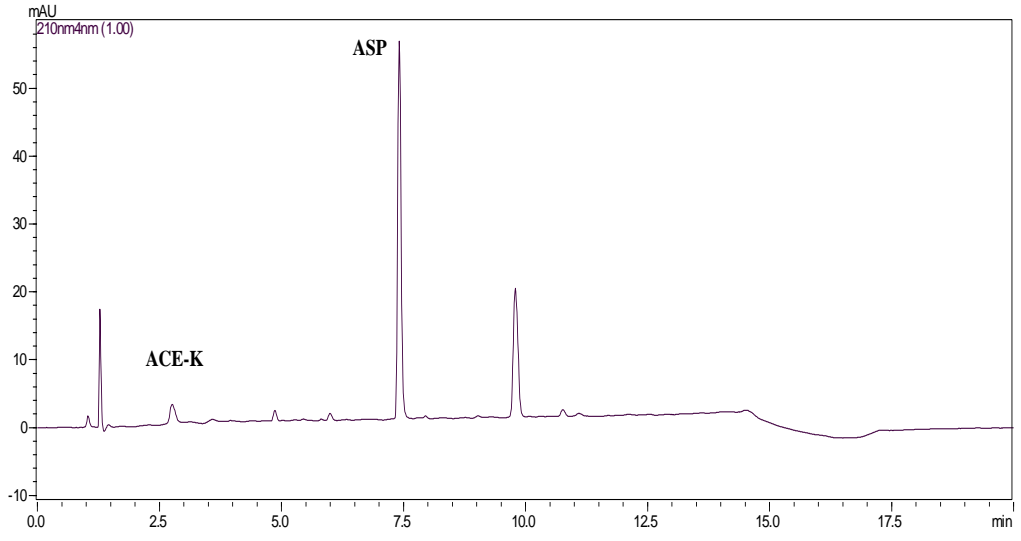
| Örnek | Bulunan Miktar (mg/L veya mg/kg) ±SS (n=3) | | |
|-------------------------------------|--|---------------|----------------|
| | ACE-K | SAC | ASP |
| T V marka ağız spreyi | - | 215.97±1.17 | - |
| G D marka çiğneme tableti | 400.97±5.30 | - | 2061.23±18.61 |
| A marka mentollü pastil | 313.87±7.12 | - | - |
| A marka bal ve limon aromalı pastil | 265.64±0.92 | - | - |
| B marka şurup | - | 151.92±1.49 | - |
| D marka pediatrik şurup | - | - | 377.10±0.04 |
| F marka gargara | - | 30.64±0.19 | 570.16±1.72 |
| M marka gargara | - | 1343.02±2.89 | - |
| Z marka oral damla | - | 9199.97±10.73 | - |
| S marka süspansiyon | - | 123.56±0.48 | - |
| M marka pastil | 3368.84±12.33 | - | - |
| A marka şurup | - | 817.60±0.91 | - |
| M marka oral spray | - | 1299.25±4.55 | - |
| N marka efervesan tablet | - | - | 20297.39±63.89 |
| D marka efervesan tablet | - | - | 11941.55±41.35 |
| A marka diş protez jeli | - | 3522.98±1.73 | - |
| G marka boğaz pastili | - | - | 15451.06±2.20 |
| A marka oral jel | - | 1138.69±4.38 | - |
| G marka çiğneme tableti | 4332.27±10.85 | - | 3674.30±9.86 |
| S marka pastil | - | 590.62±1.61 | - |
| Z D marka çiğneme tableti | - | 455.15±4.85 | 2049.09±13.30 |
| T marka çiğneme tableti | - | 583.50±7.59 | - |
| H V marka efervesan tablet | - | 2484.66±2.39 | - |
| K marka şurup | - | - | - |
| R marka çiğneme tableti | - | - | - |



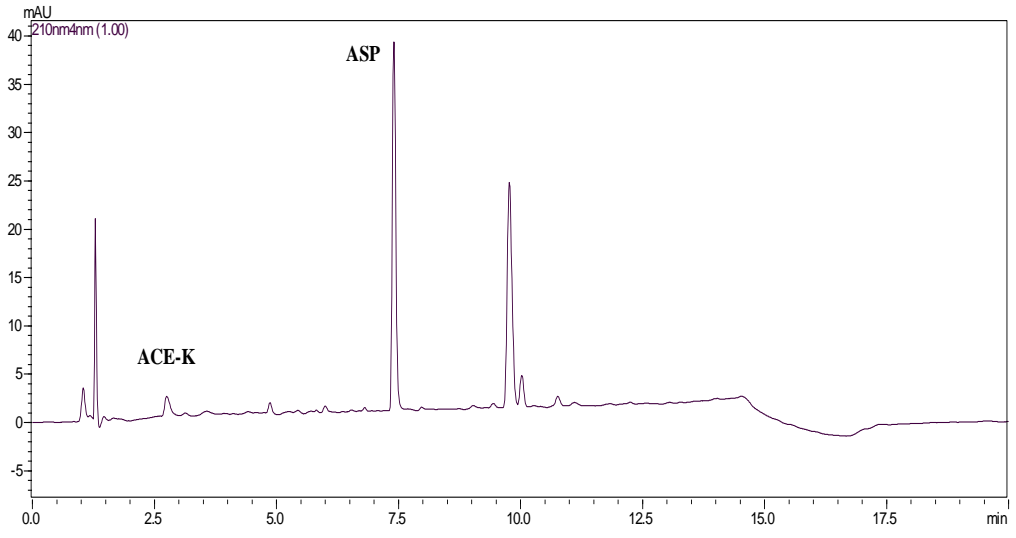
Şekil 25. Ç marka light gazoz örneğinden elde edilen kromatogram



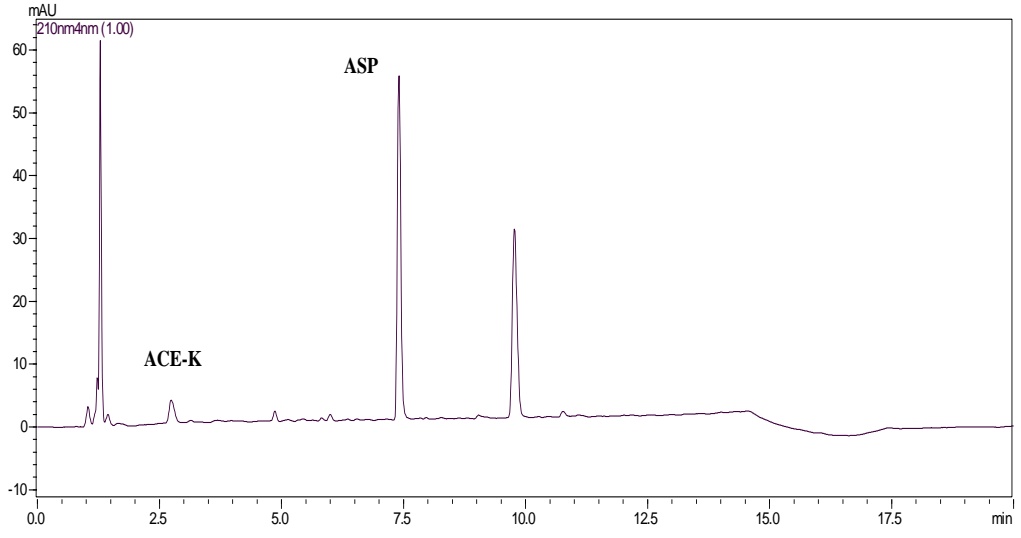
Şekil 26. LC marka kola örneğinden elde edilen kromatogram



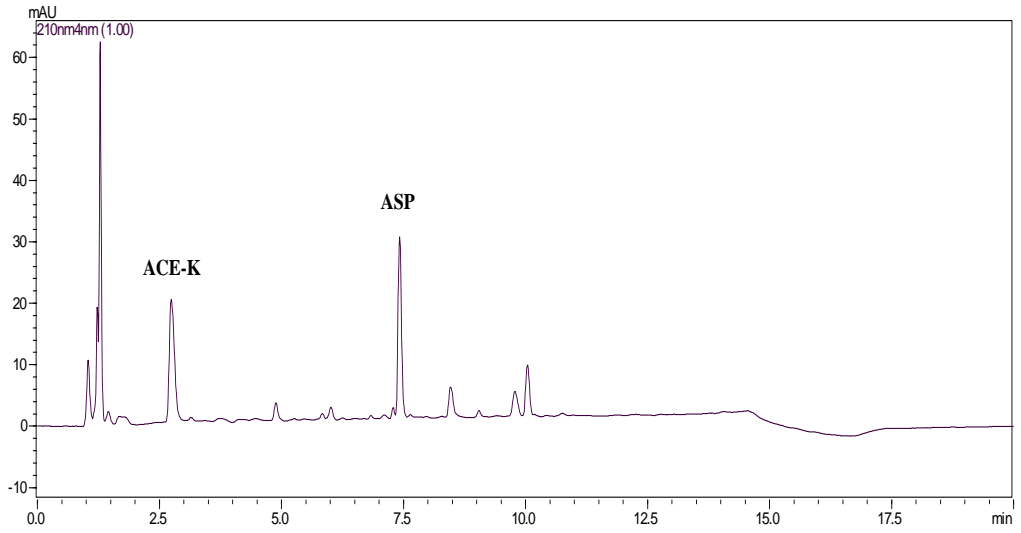
Şekil 27. U marka light gazoz örneğinden elde edilen kromatogram



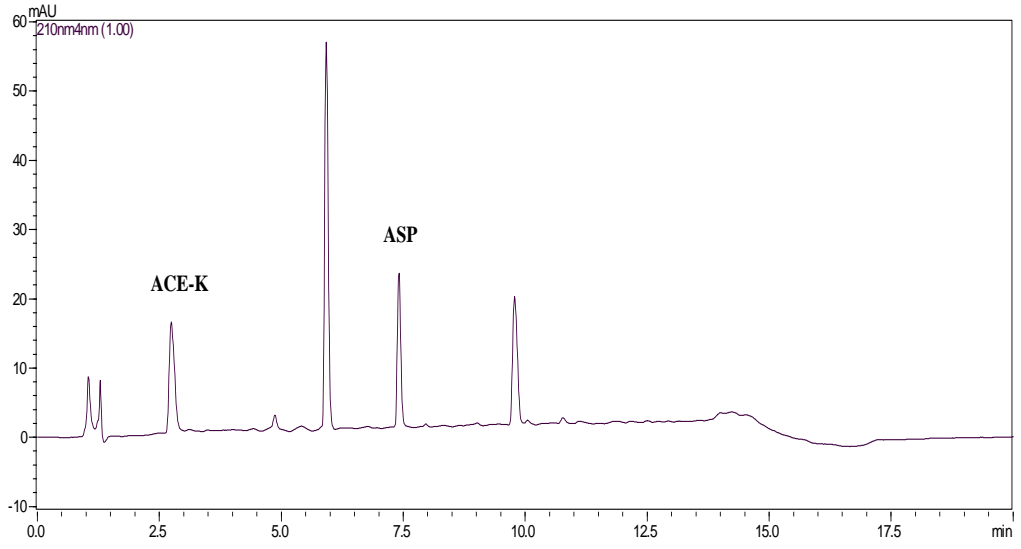
Şekil 28. U marka light portakal örneğinden elde edilen kromatogram



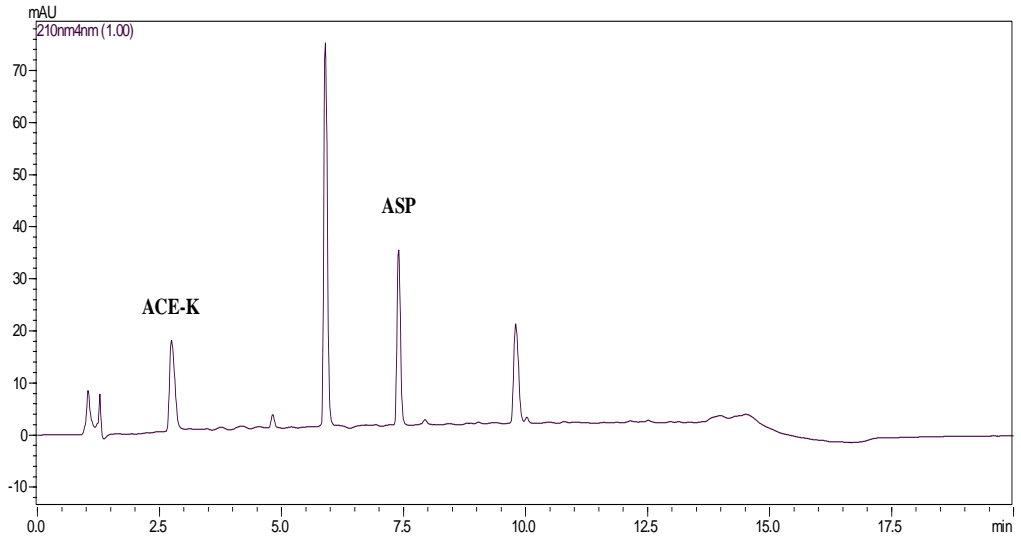
Şekil 29. U marka light limonata örneğinden elde edilen kromatogram



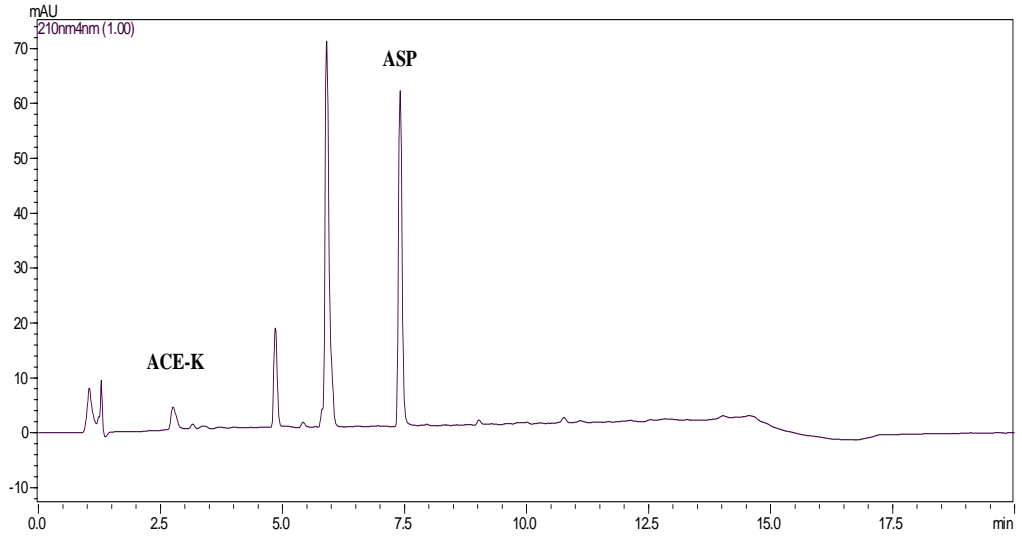
Şekil 30. D marka limonata örneğinden elde edilen kromatogram



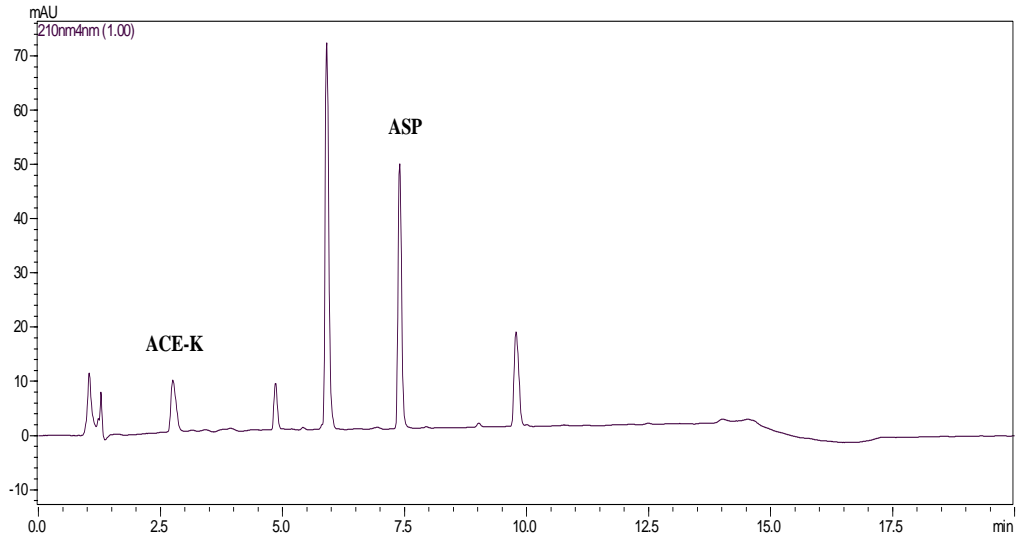
Şekil 31. C Z marka kola örneğinden elde edilen kromatogram



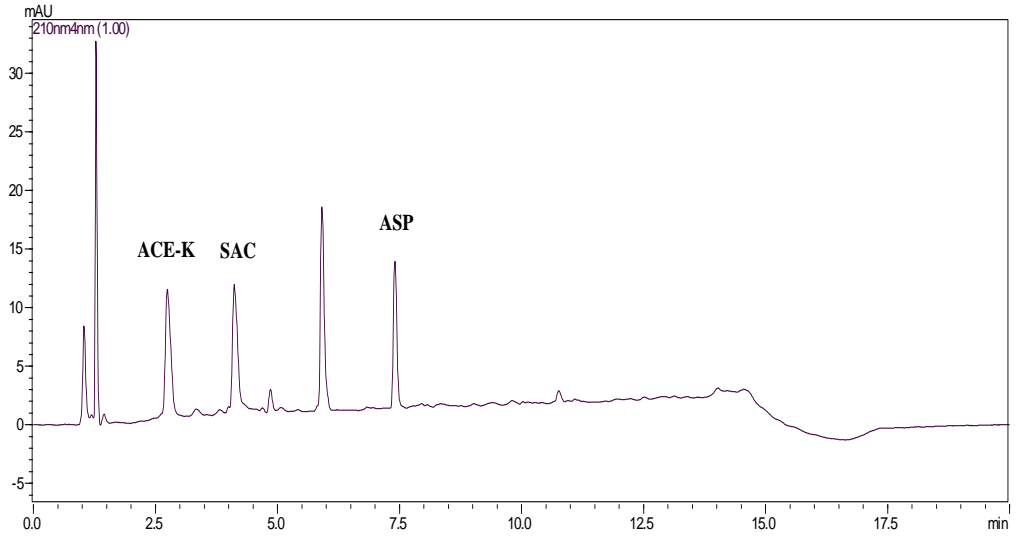
Şekil 32. C marka light kola örneğinden elde edilen kromatogram



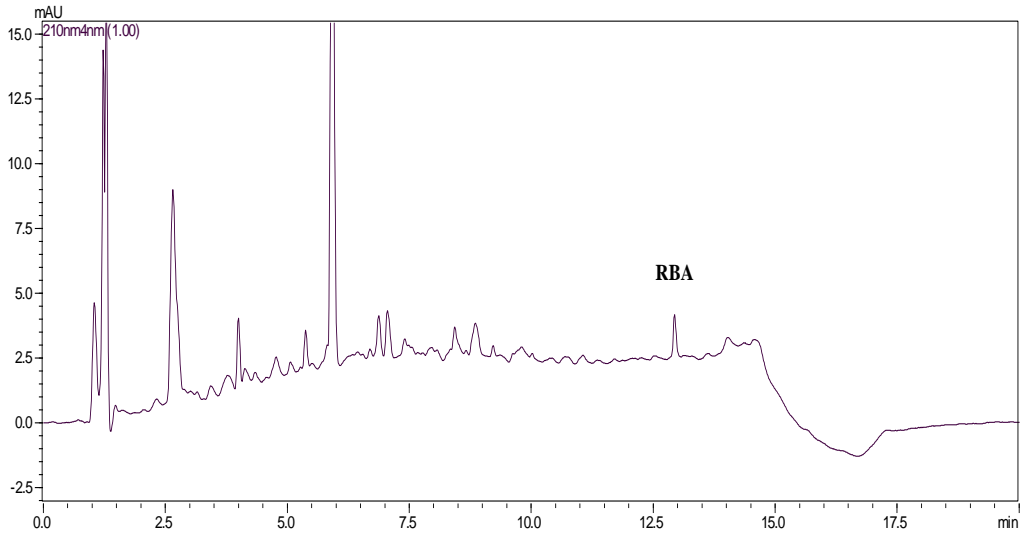
Şekil 33. P M marka kola örneğinden elde edilen kromatogram



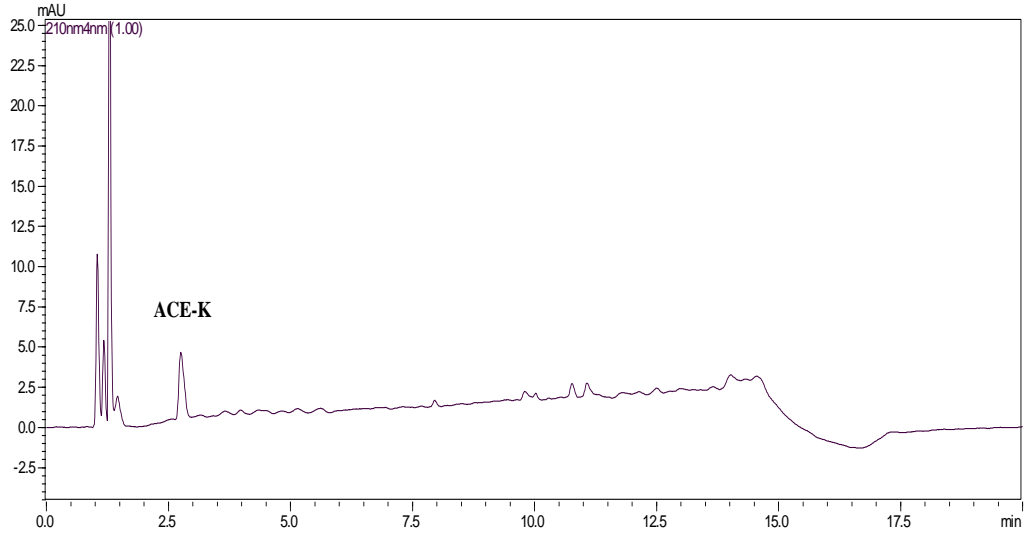
Şekil 34. P marka light kola örneğinden elde edilen kromatogram



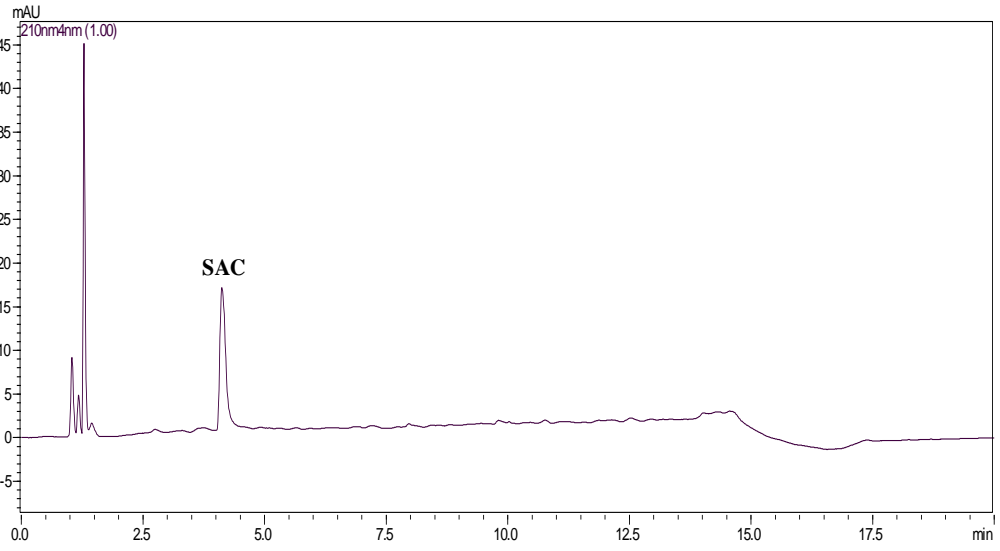
Şekil 35. F marka light şeftali aromalı soğuk çay örneğinden elde edilen kromatogram



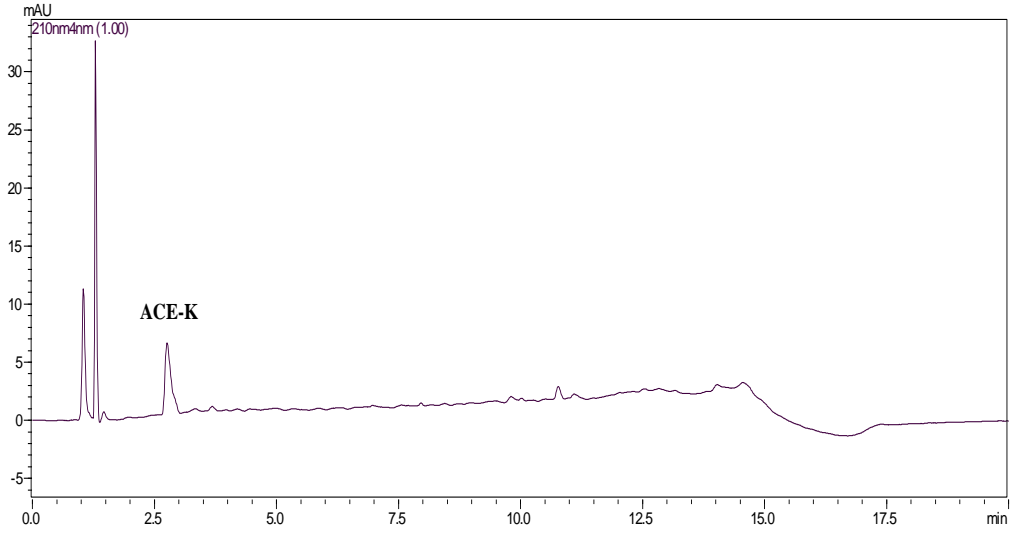
Şekil 36. L marka egzotik meyve aromalı soğuk çay örneğinden elde edilen kromatogram



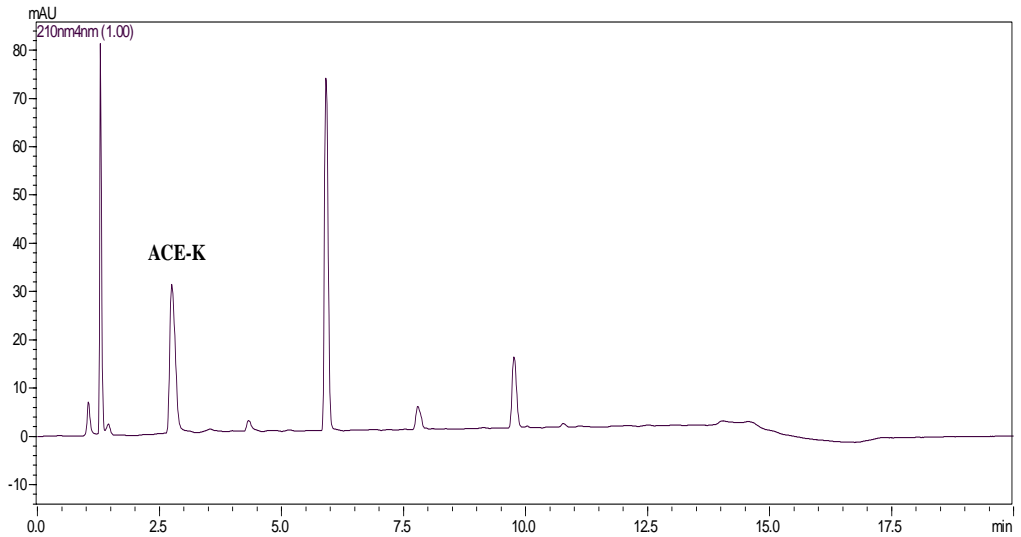
Şekil 37. P marka karışık meyve aromalı izotonik sporcu içeceği örneğinden elde edilen kromatogram



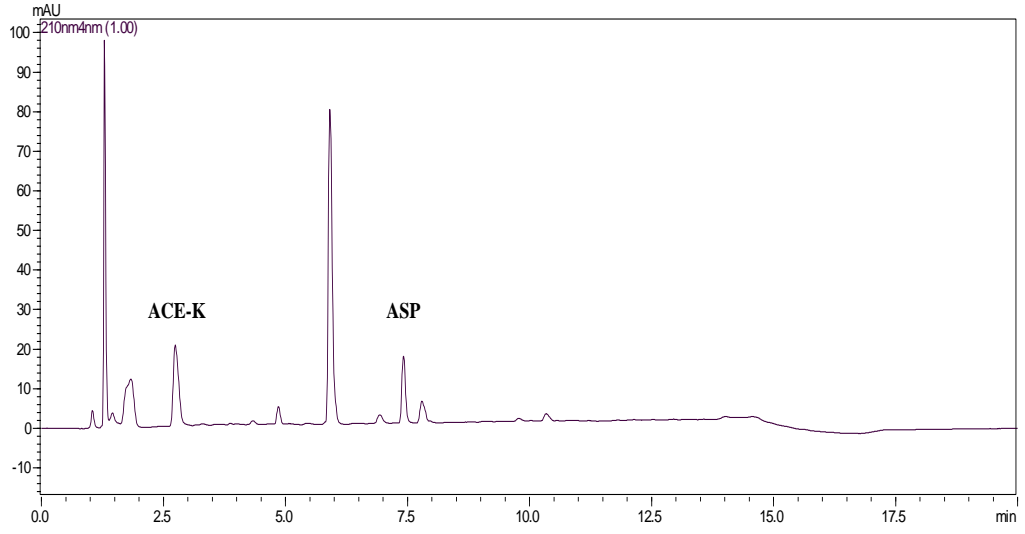
Şekil 38. P marka limon ve greyfurt aromalı izotonik sporcu içeceği örneğinden elde edilen kromatogram



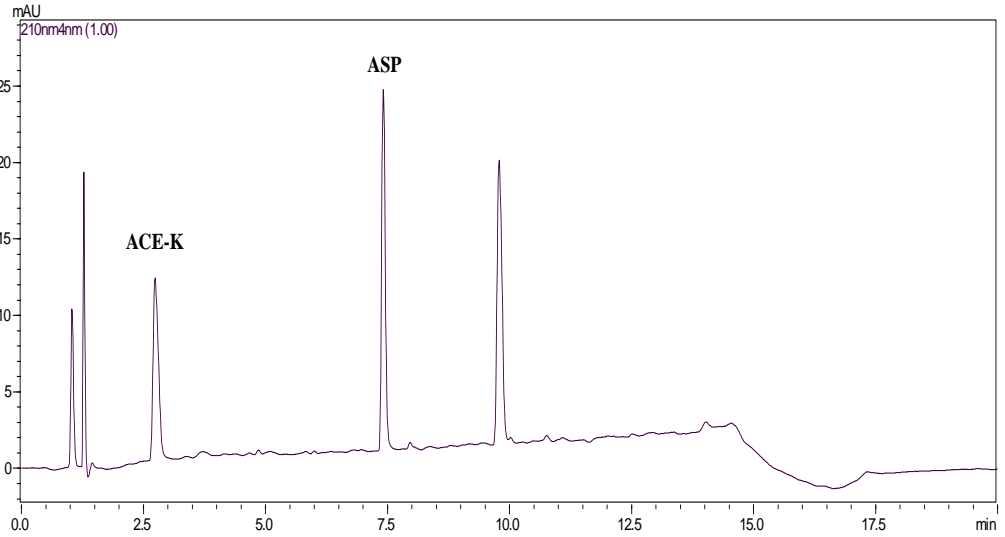
Şekil 39. P marka portakal aromalı izotonik sporcu içeceği örneğinden elde edilen kromatogram



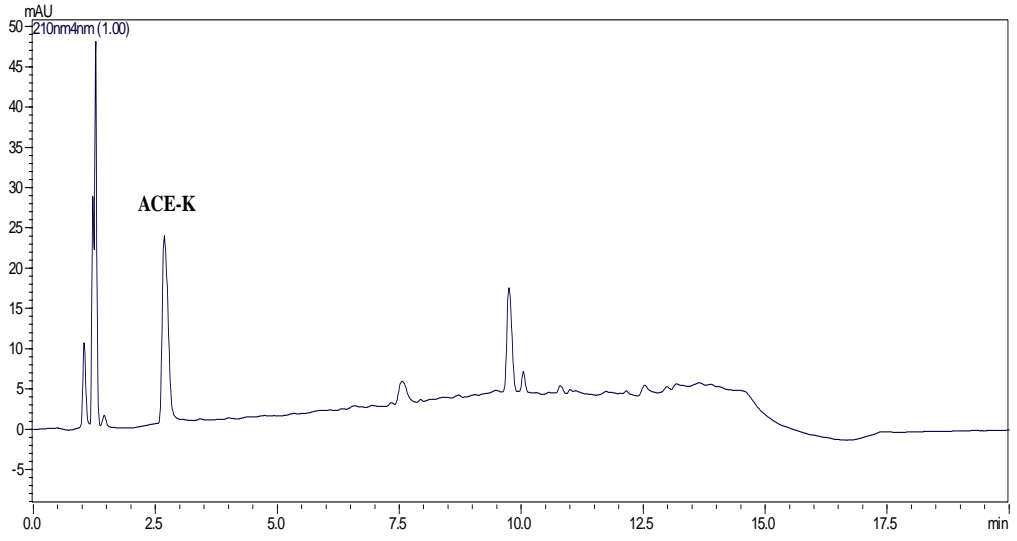
Şekil 40. G marka enerji içeceği örneğinden elde edilen kromatogram



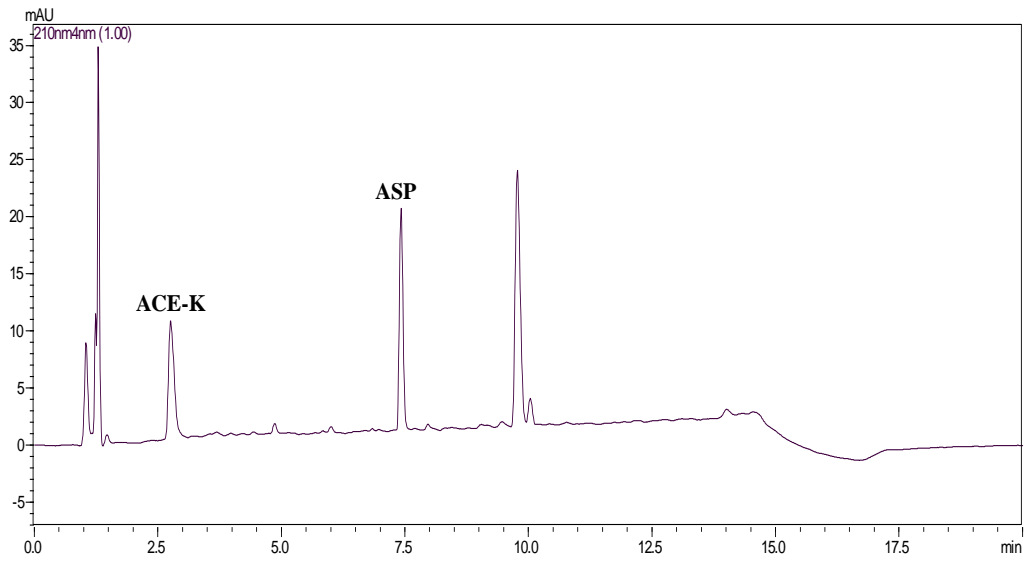
Şekil 41. R marka şekerli enerji içeceği örneğinden elde edilen kromatogram



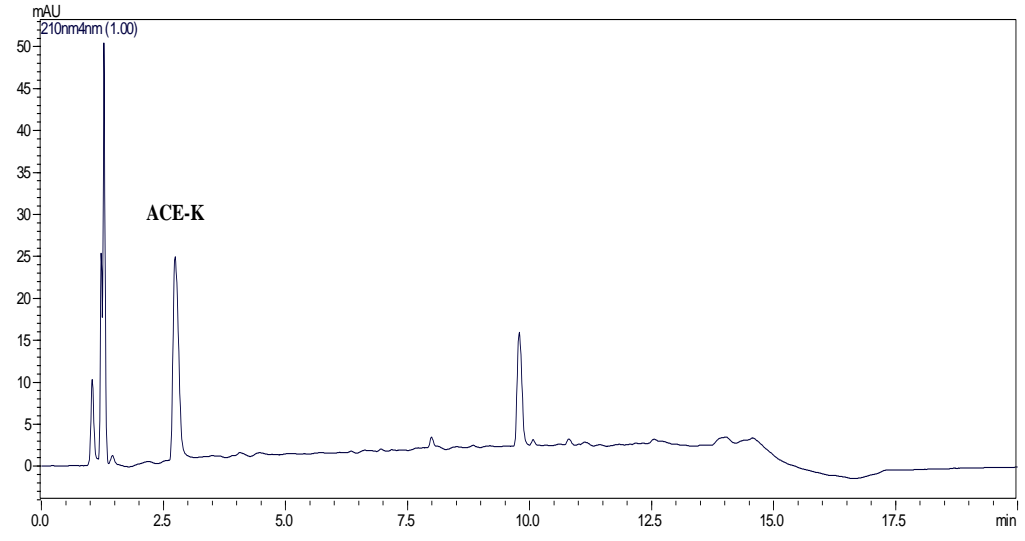
Şekil 42. S marka şekerli gazoz örneğinden elde edilen kromatogram



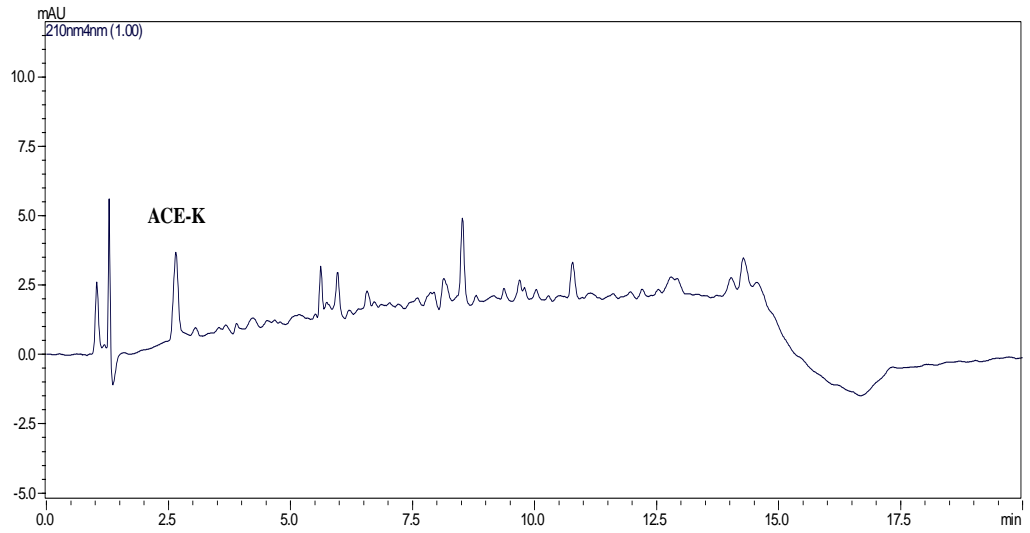
Şekil 43. A marka mandalina aromalı soda örneğinden elde edilen kromatogram



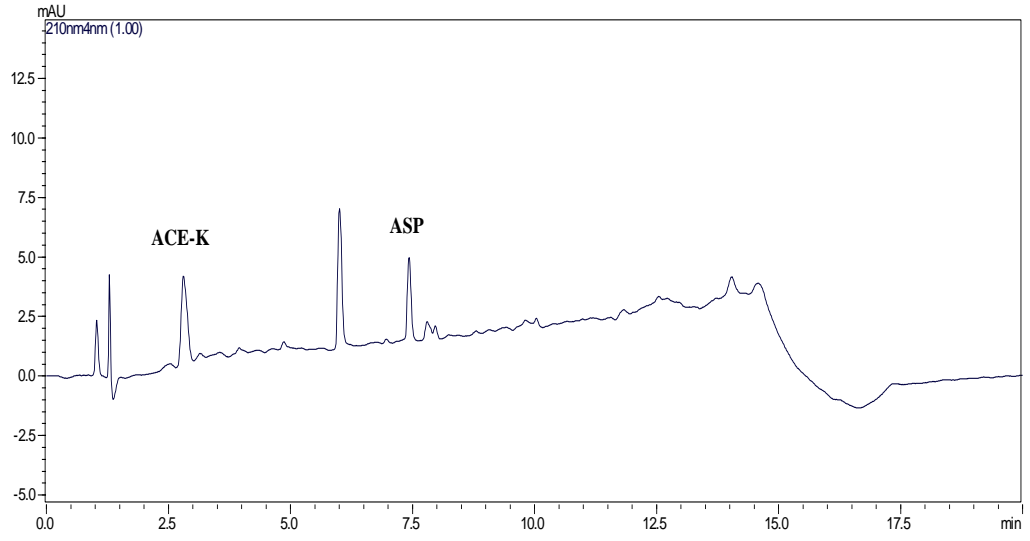
Şekil 44. B marka mandalina aromalı gazoz örneğinden elde edilen kromatogram



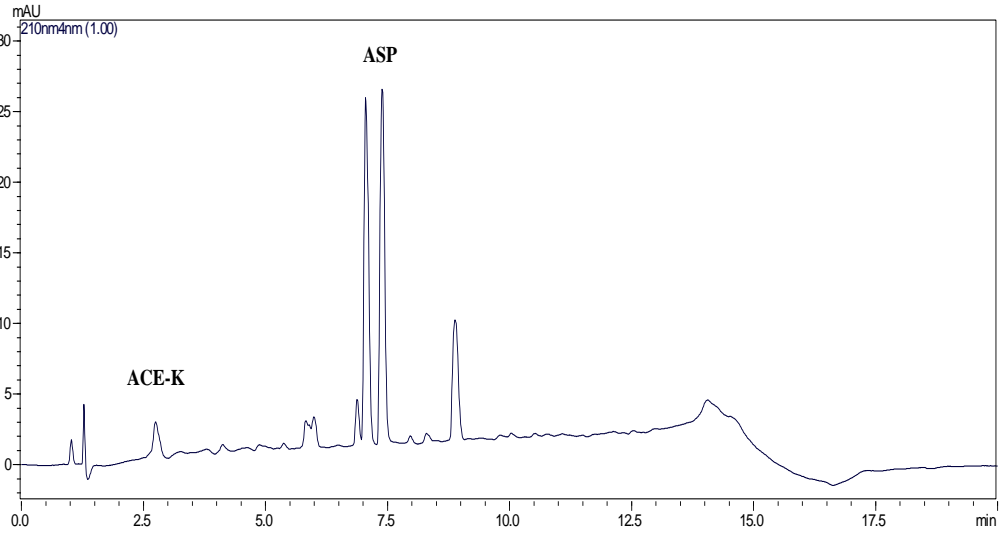
Şekil 45. A marka limonata örneğinden elde edilen kromatogram



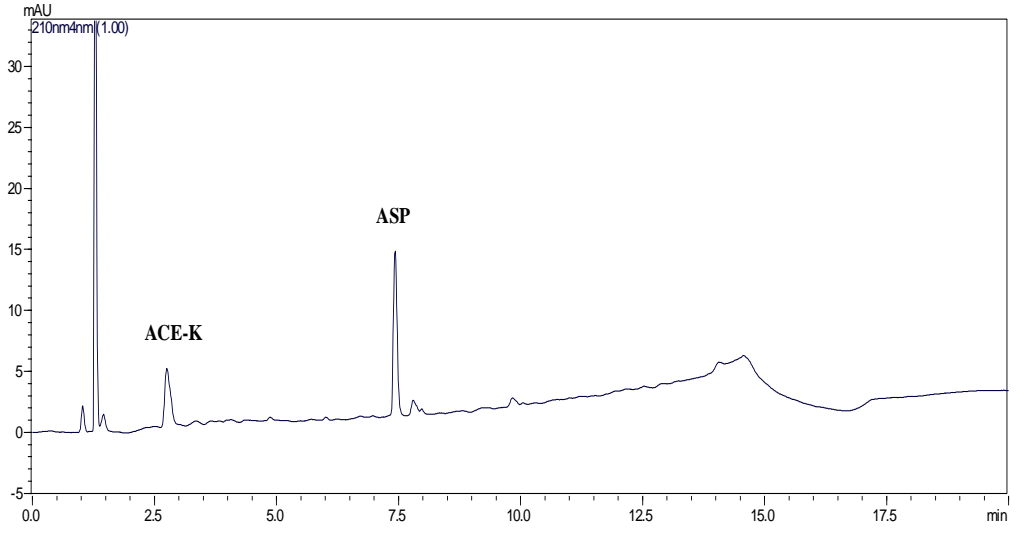
Şekil 46. T marka karanfil aromalı şekerleme örneğinden elde edilen kromatogram



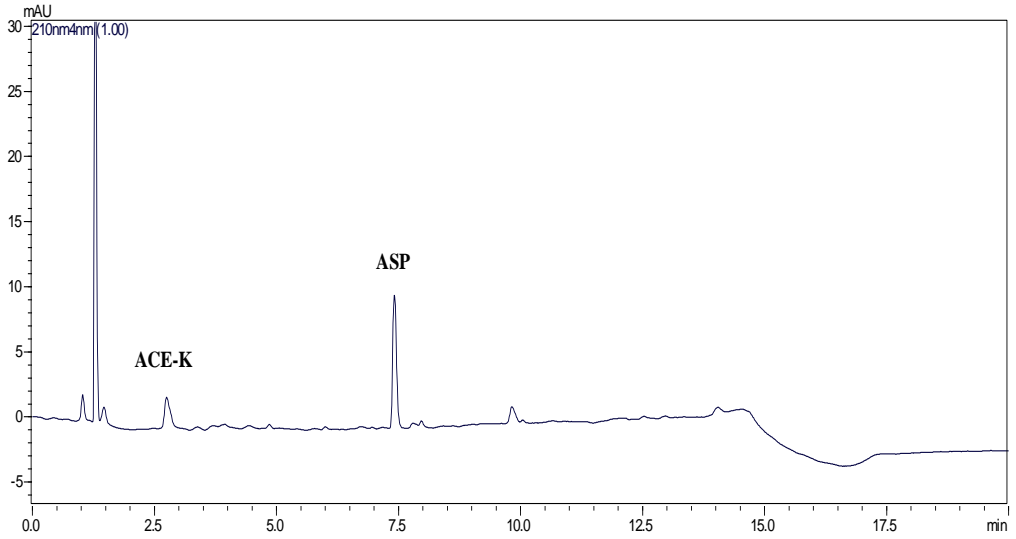
Şekil 47. R marka nane aromalı şekerleme örneğinden elde edilen kromatogram



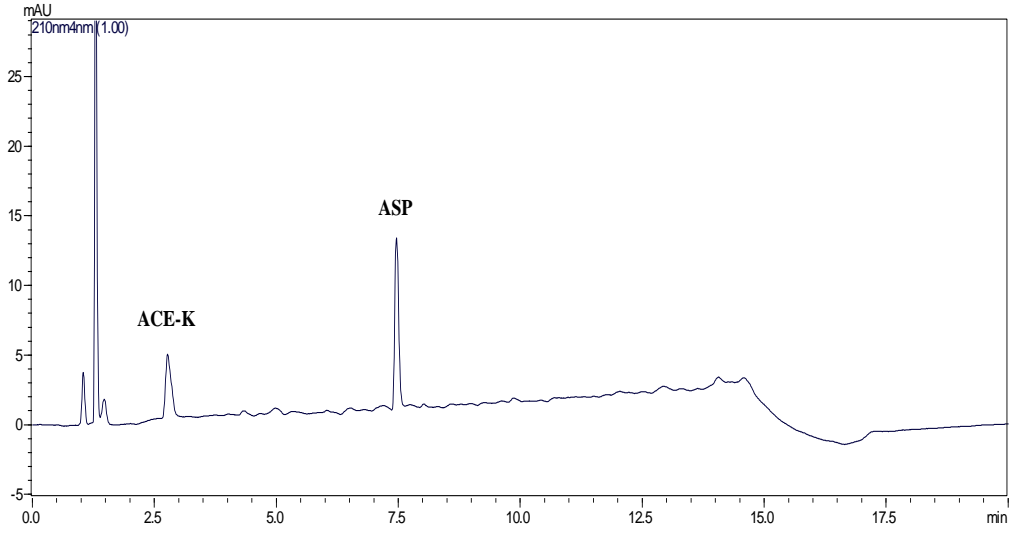
Şekil 48. R marka keskin nane aromalı şekerleme örneğinden elde edilen kromatogram



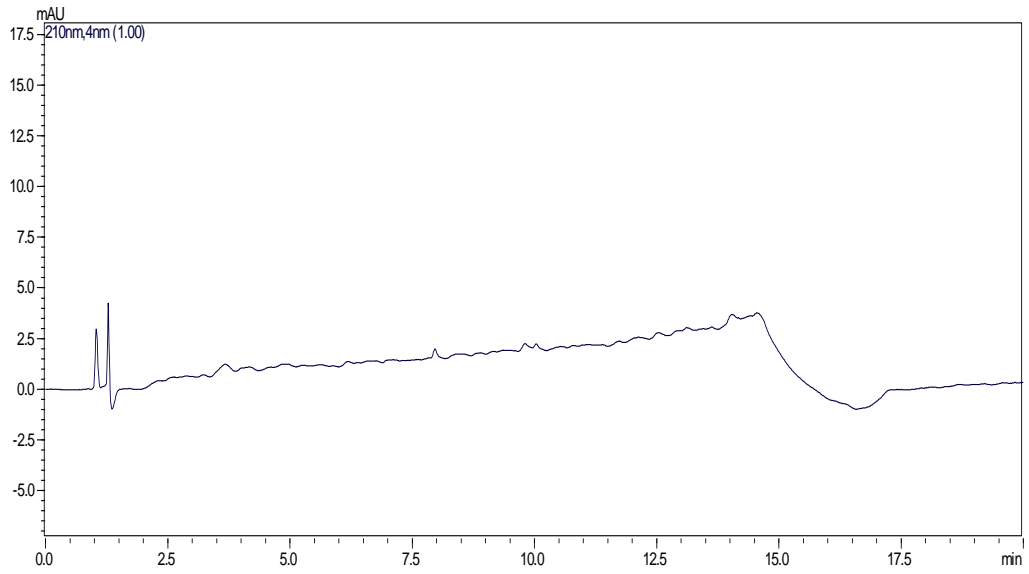
Şekil 49. R marka nar-çilek aromalı şekerleme örneğinden elde edilen kromatogram



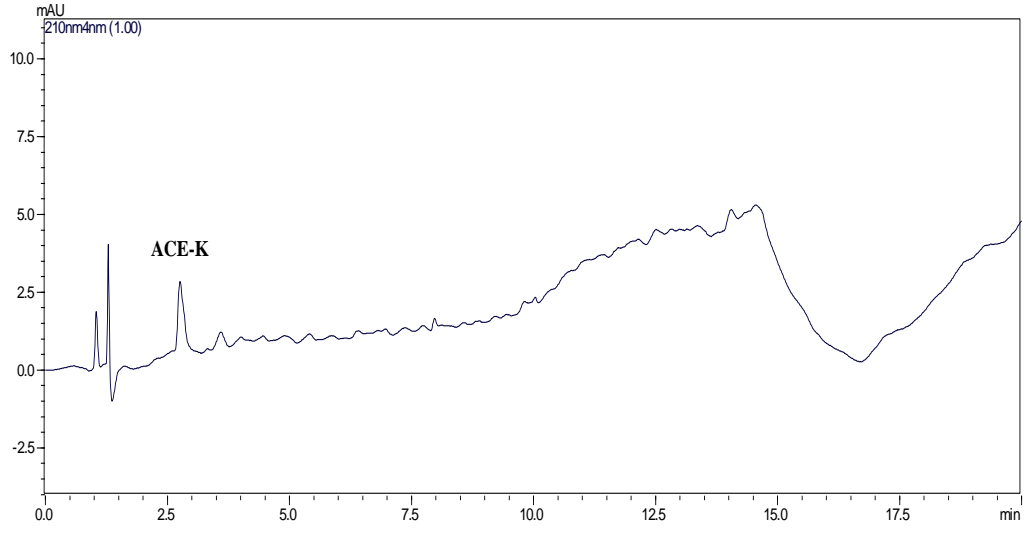
Şekil 50. R marka ahududu-limon aromalı şekerleme örneğinden elde edilen kromatogram



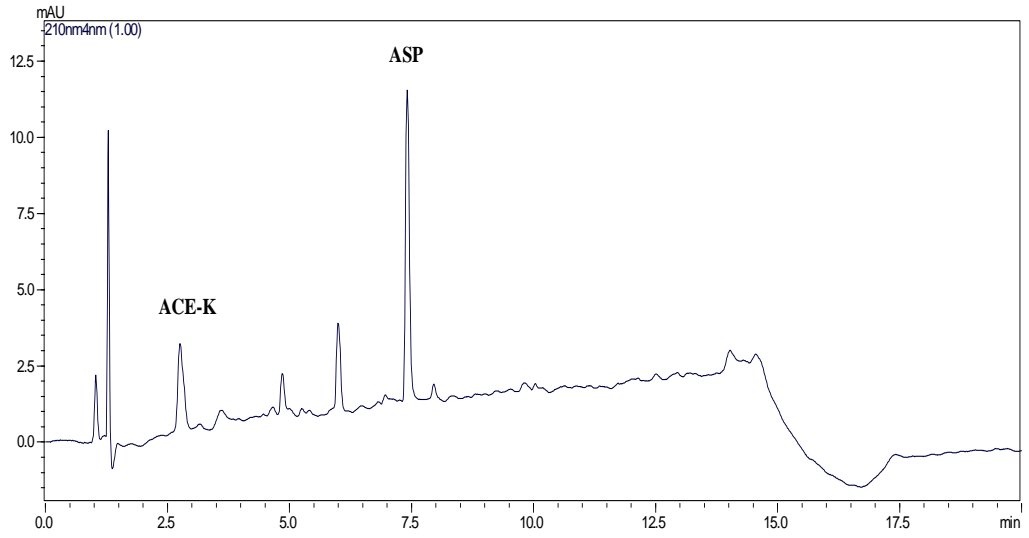
Şekil 51. R marka mandalina-karpuz aromalı şekerleme örneğinden elde edilen kromatogram



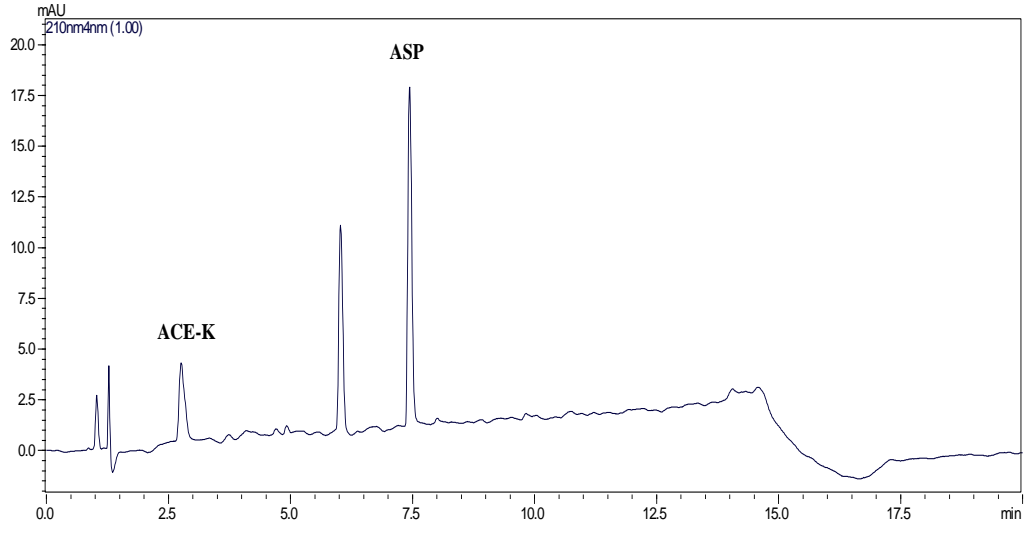
Şekil 52. O marka yeşil nane aromalı draje örneğinden elde edilen kromatogram



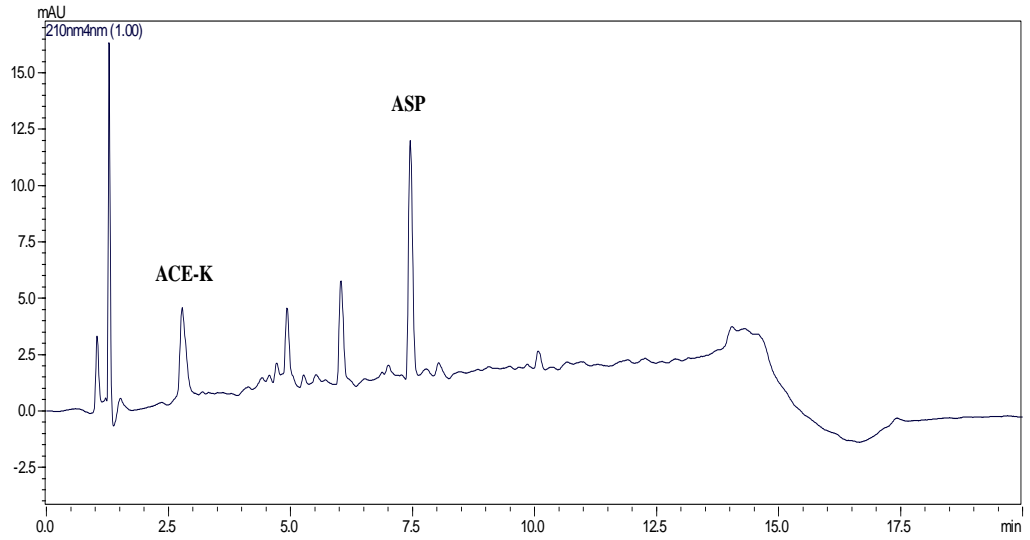
Şekil 53. O marka mentol aromalı draje örneğinden elde edilen kromatogram



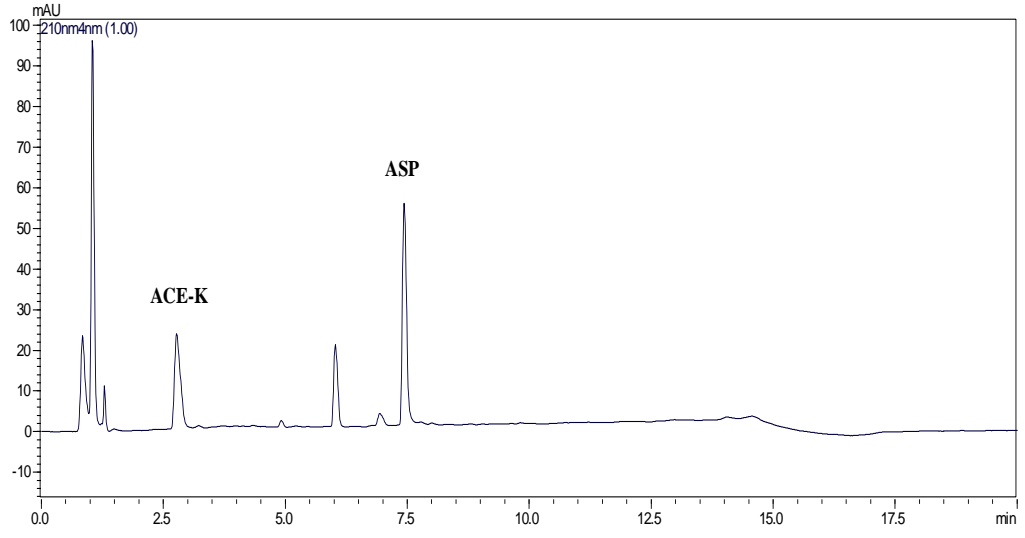
Şekil 54. MN marka çilek aromalı draje örneğinden elde edilen kromatogram



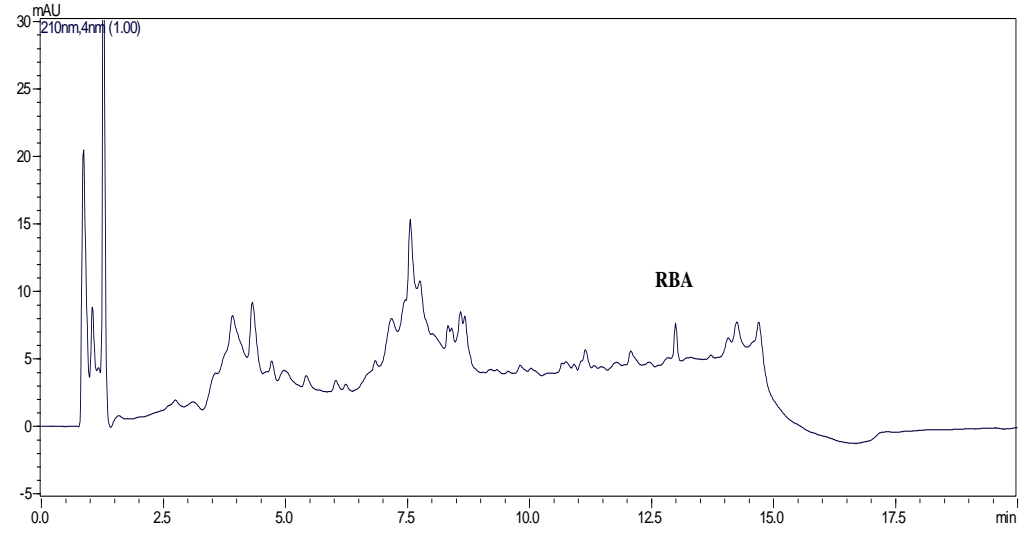
Şekil 55. MN marka nane aromalı draje örneğinden elde edilen kromatogram



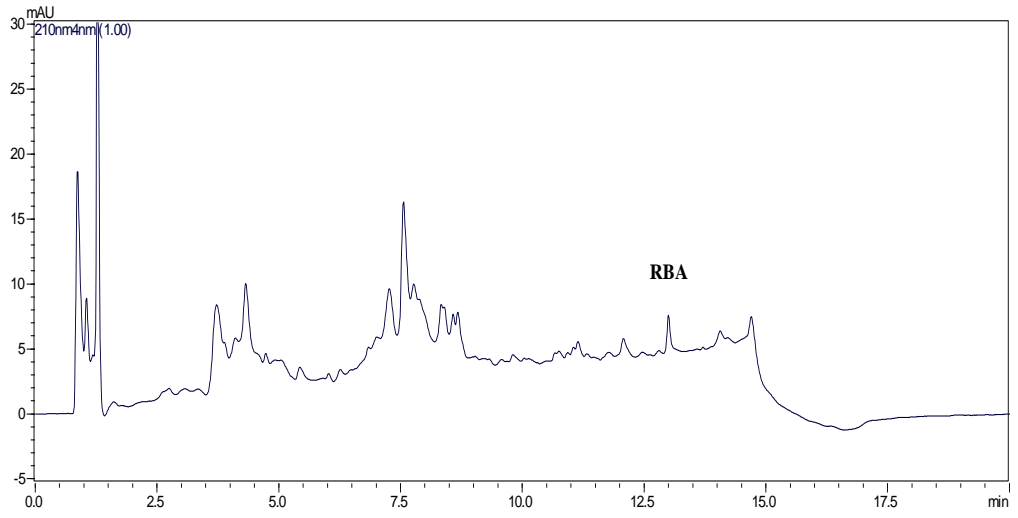
Şekil 56. MN marka portakal aromalı draje örneğinden elde edilen kromatogram



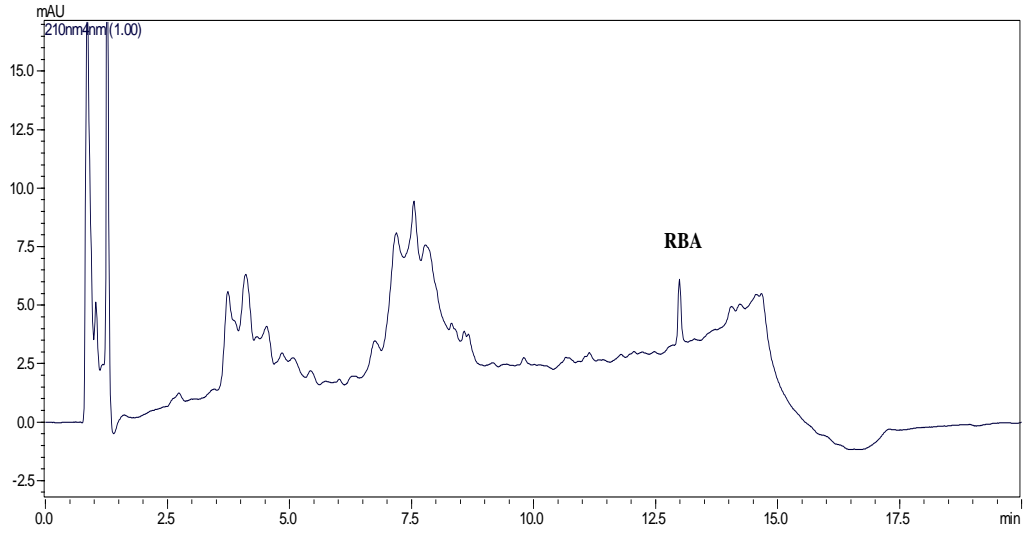
Şekil 57. RS marka çilek aromalı şekerleme örneğinden elde edilen kromatogram



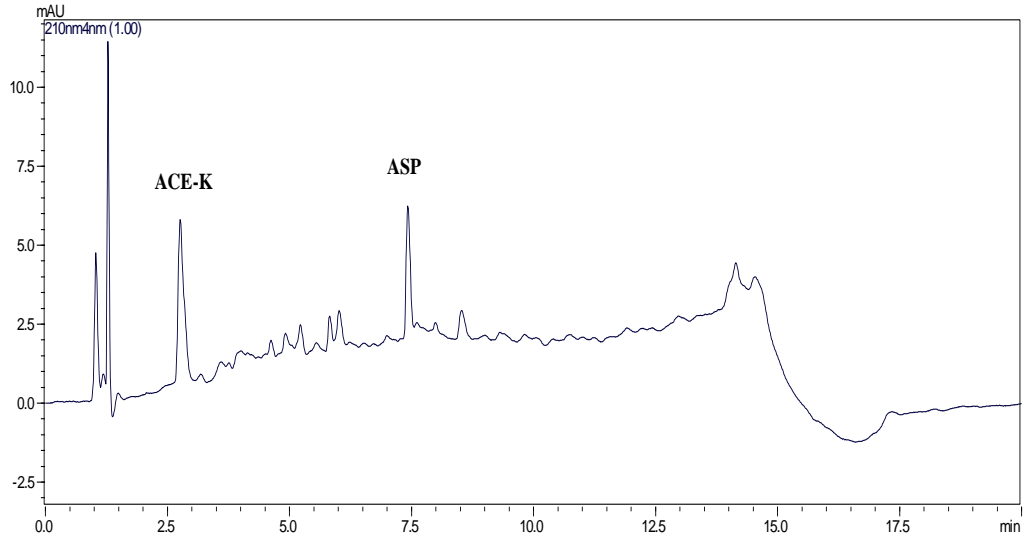
Şekil 58. L marka meyan köklü pastil örneğinden elde edilen kromatogram



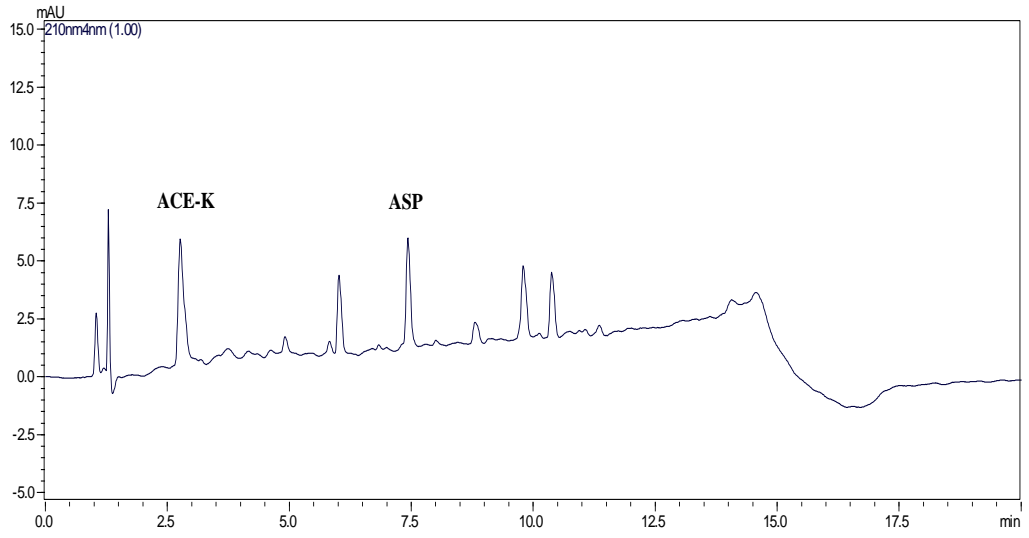
Şekil 59. L marka kaktüs aromalı meyan köklü pastil örneğinden elde edilen kromatogram



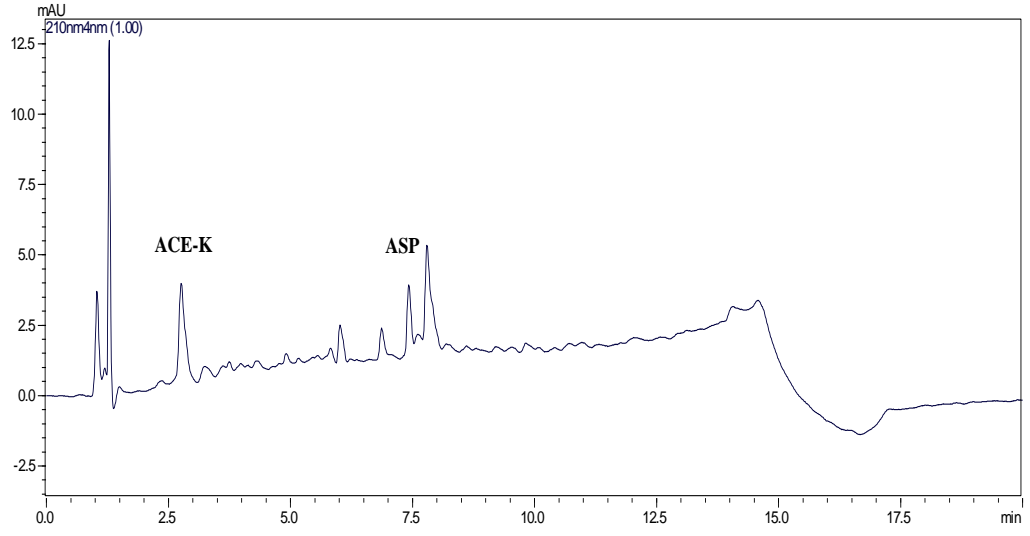
Şekil 60. L marka ökalyptus aromalı pastil örneğinden elde edilen kromatogram



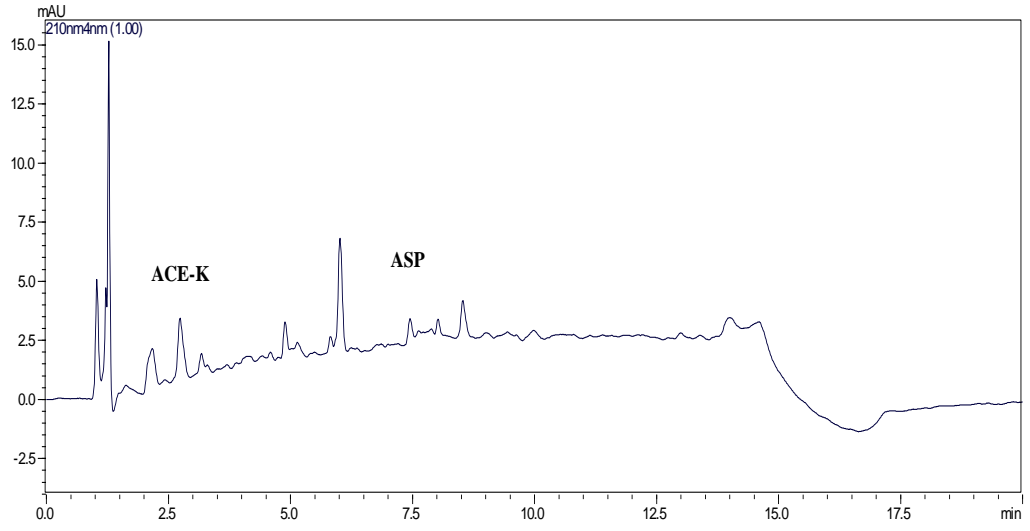
Şekil 61. Y marka diabetik çilek reçeli örneğinden elde edilen kromatogram



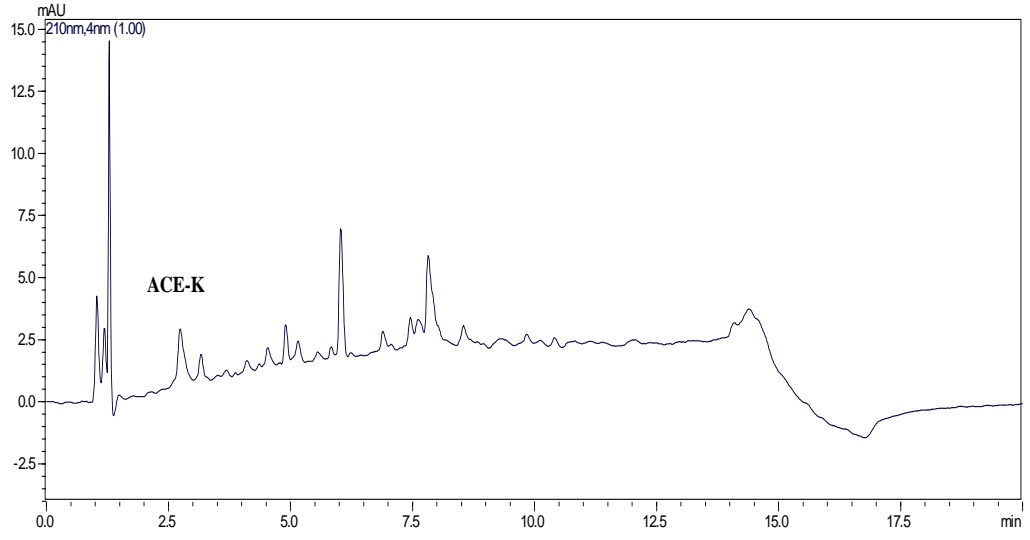
Şekil 62. Y marka diabetik turuncu reçeli örneğinden elde edilen kromatogram



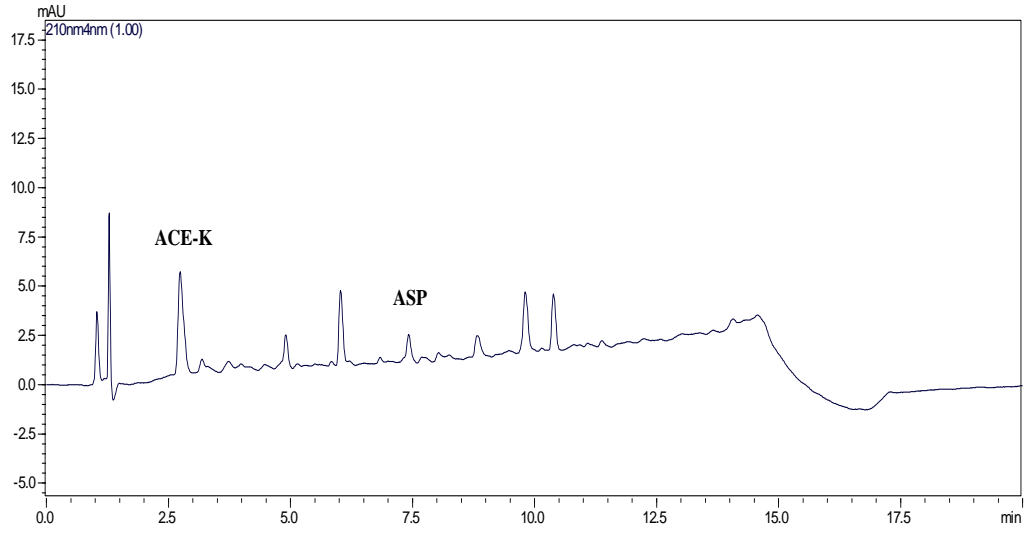
Şekil 63. Y marka diabetik ahududu reçeli örneğinden elde edilen kromatogram



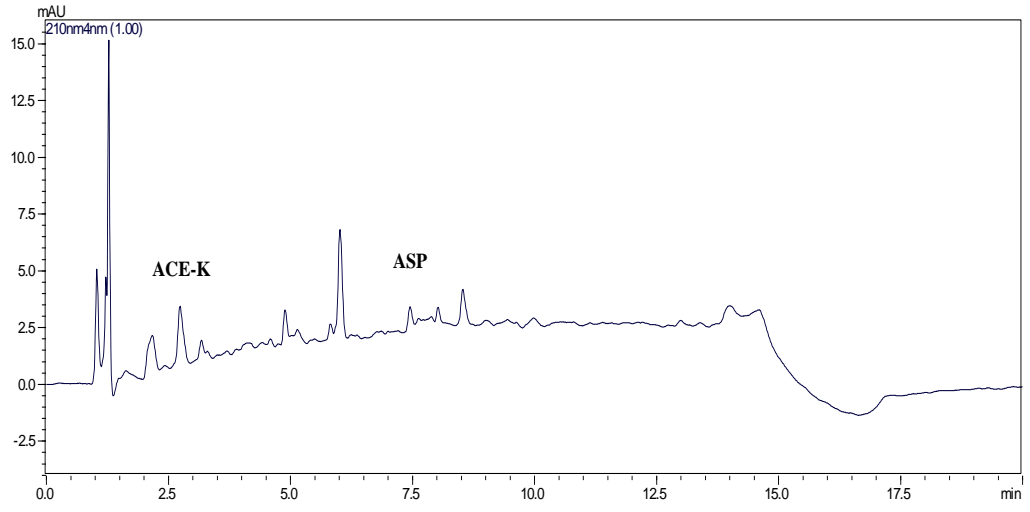
Şekil 64. M-L marka diabetik vişne reçeli örneğinden elde edilen kromatogram



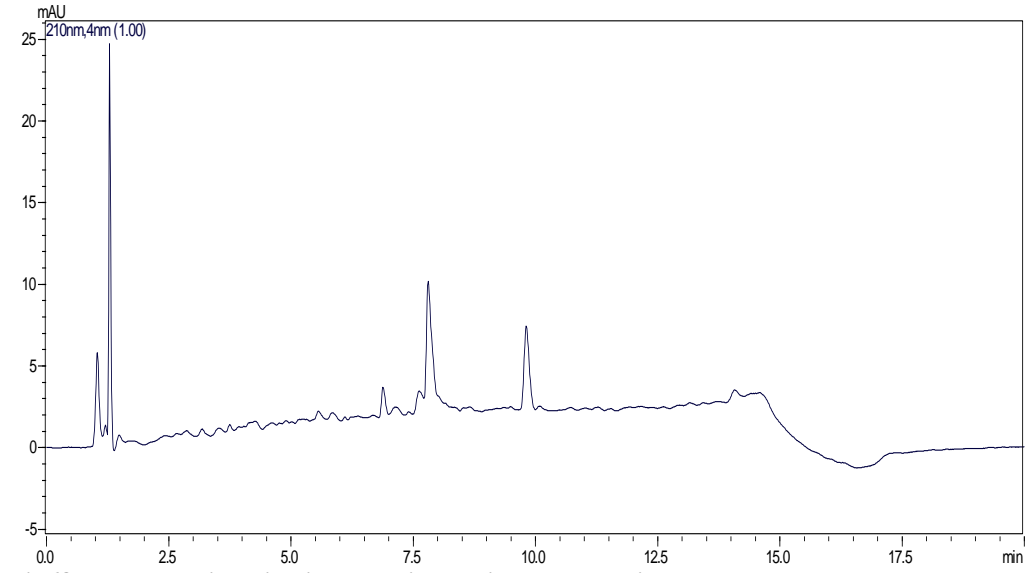
Şekil 65. M-L marka diabetik dört meyve reçeli örneğinden elde edilen kromatogram



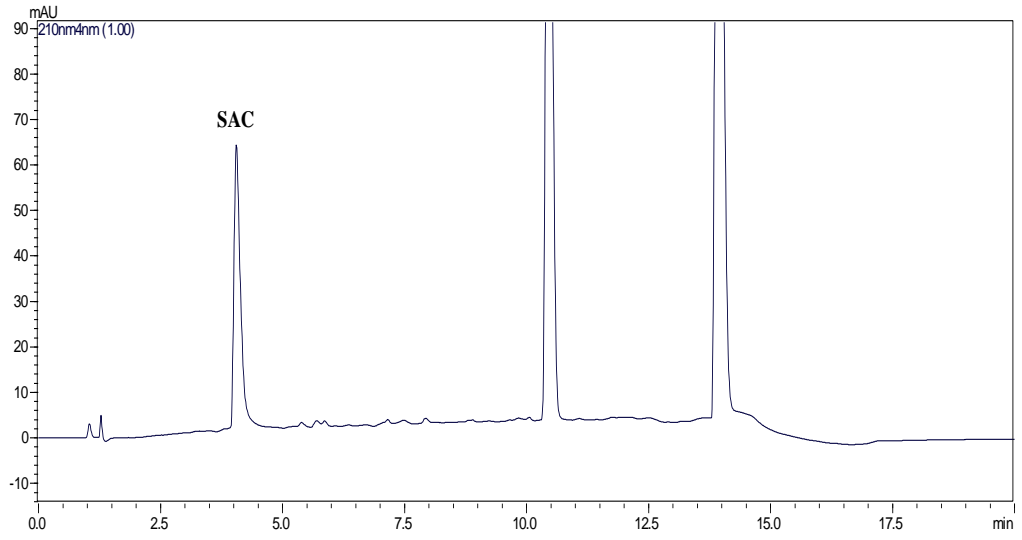
Şekil 66. M-L marka diabetik turuncu reçeli örneğinden elde edilen kromatogram



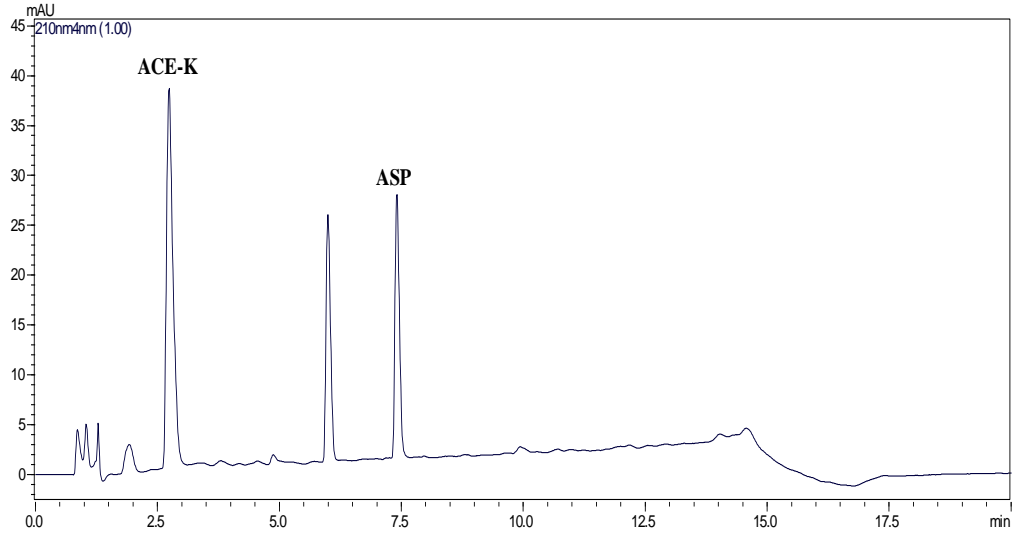
Şekil 67. M-L marka diabetik çilek reçeli örneğinden elde edilen kromatogram



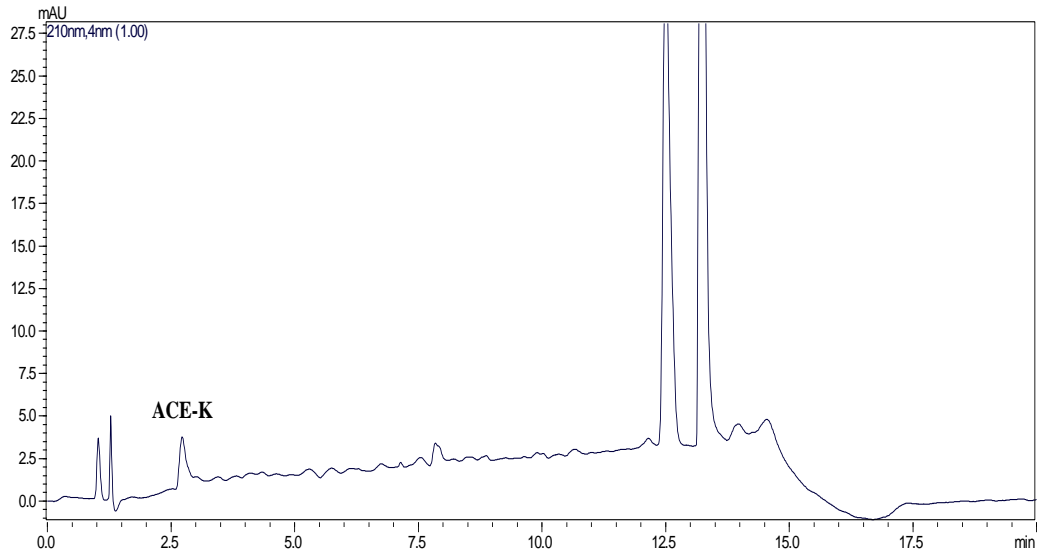
Şekil 68. T marka diabetik çilek reçeli örneğinden elde edilen kromatogram



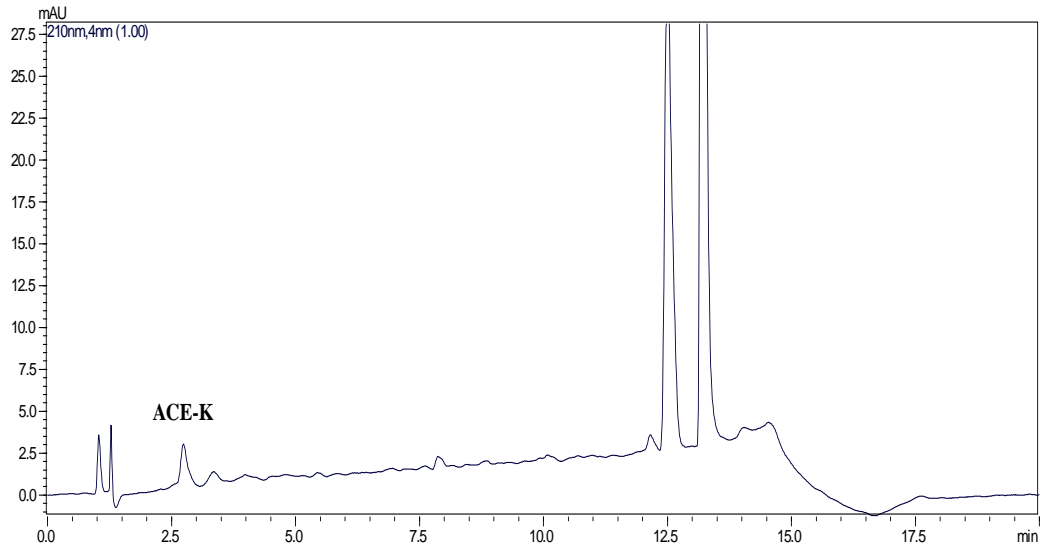
Şekil 69. T V marka ağız spreyi örneğinden elde edilen kromatogram



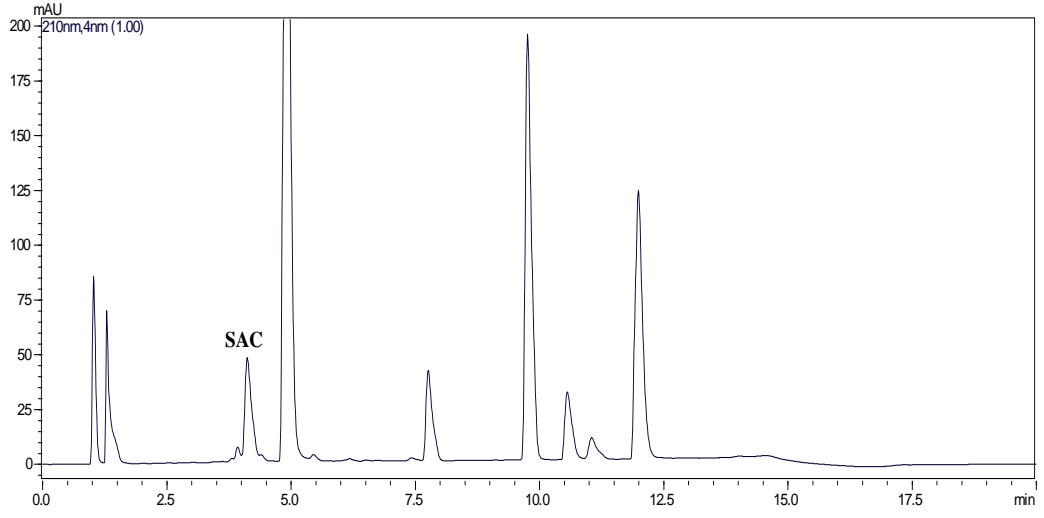
Şekil 70. G D marka çiğneme tableti örneğinden elde edilen kromatogram



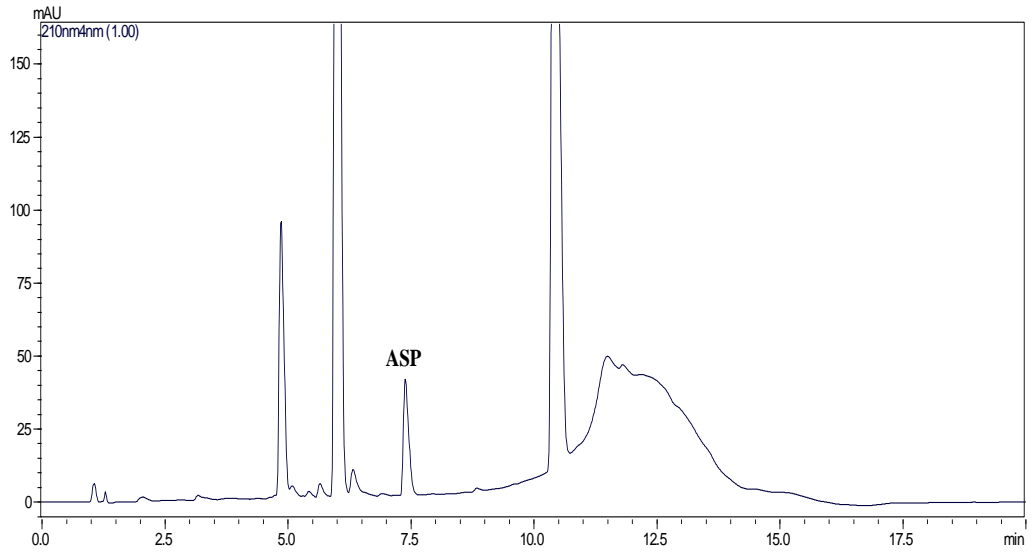
Şekil 71. A marka mentollü pastil örneğinden elde edilen kromatogram



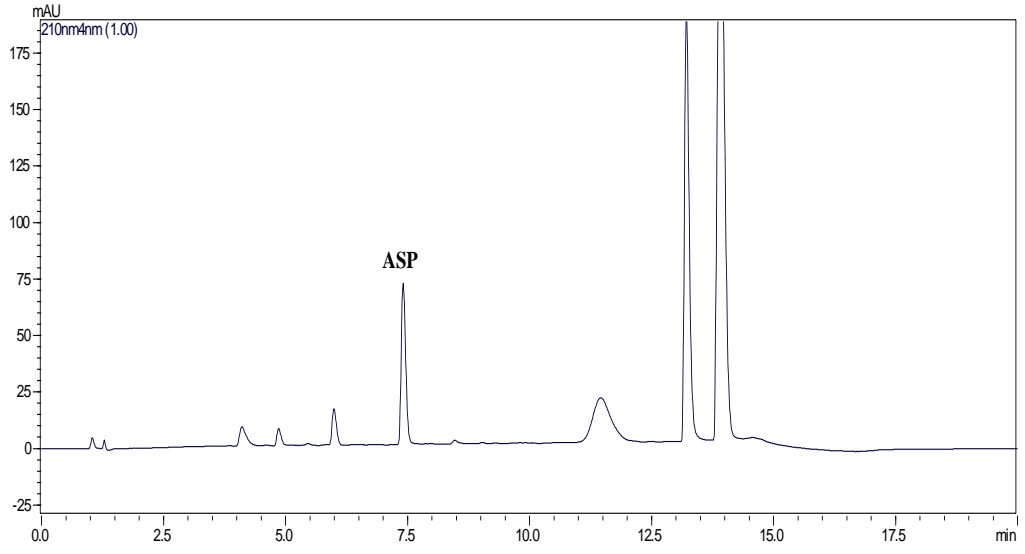
Şekil 72. A marka bal ve limon aromalı pastil örneğinden elde edilen kromatogram



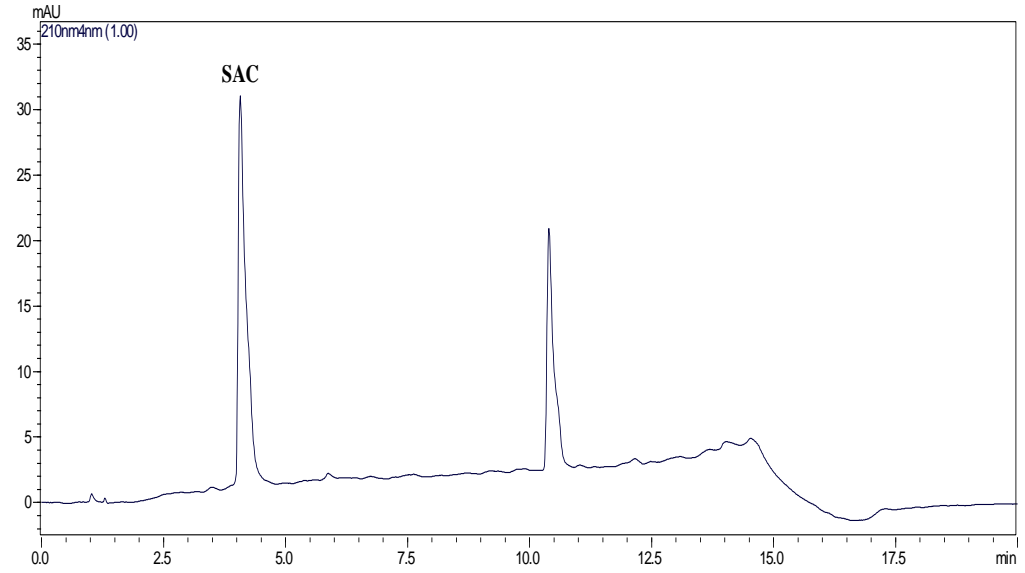
Şekil 73. B marka şurup örneğinden elde edilen kromatogram



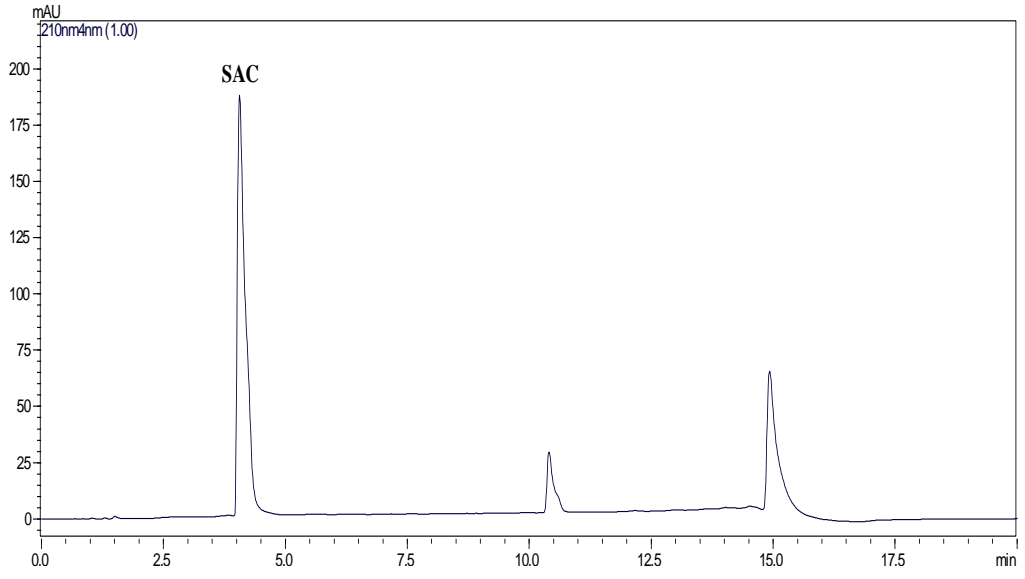
Şekil 74. D marka pediatrik şurup örneğinden elde edilen kromatogram



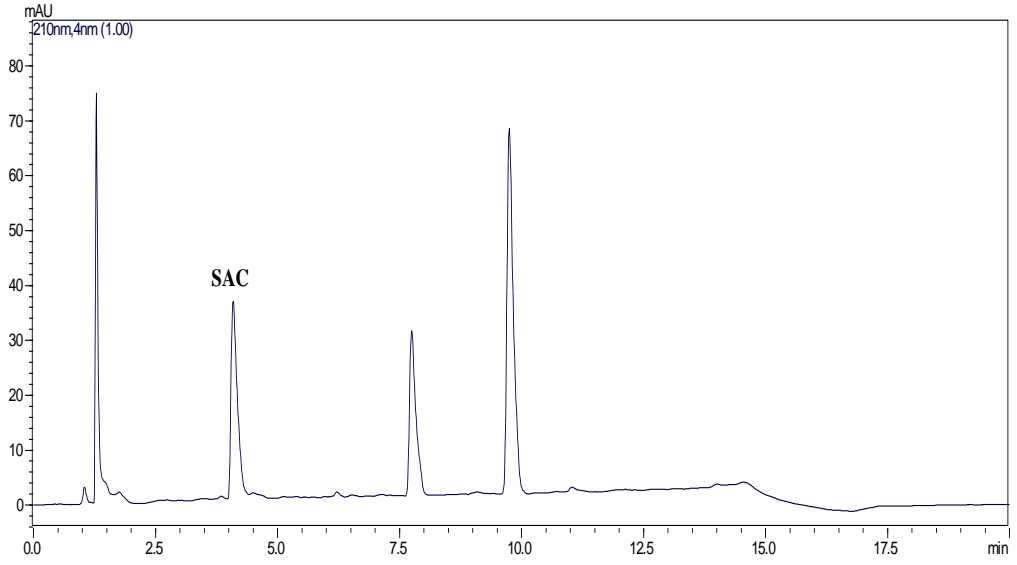
Şekil 75. F marka gargara örneğinden elde edilen kromatogram



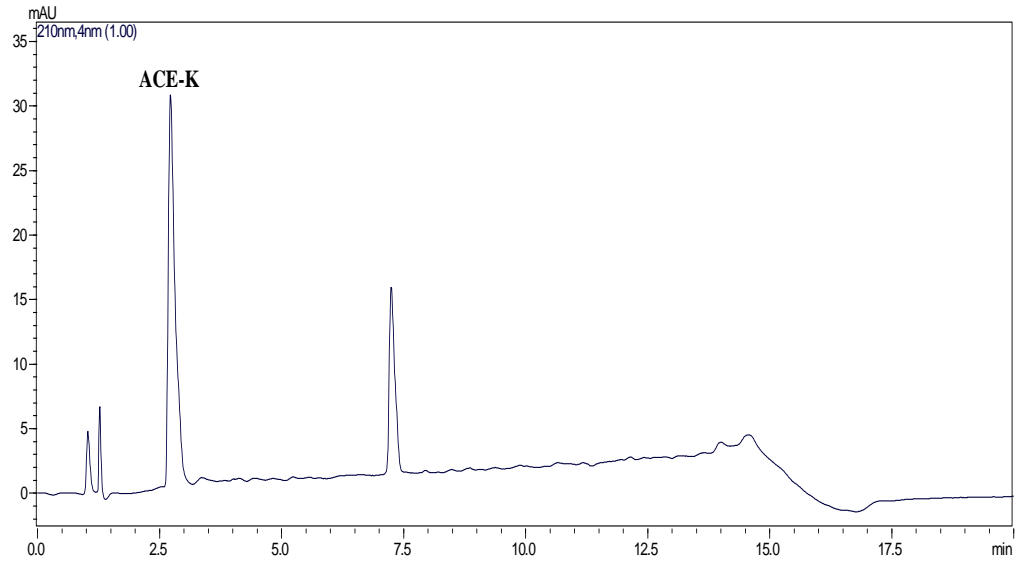
Şekil 76. M marka gargara örneğinden elde edilen kromatogram



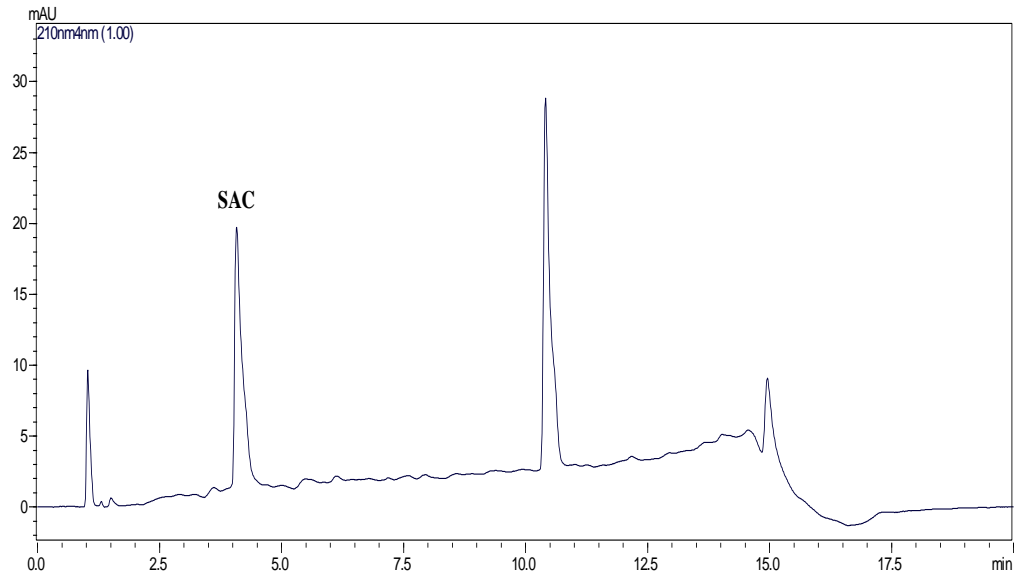
Şekil 77. Z marka oral damla örneğinden elde edilen kromatogram



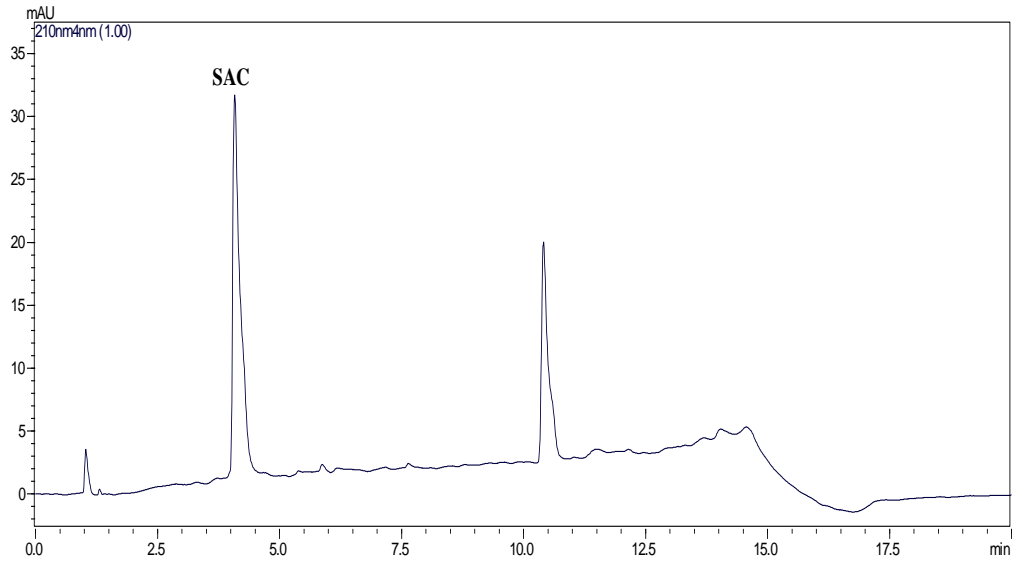
Şekil 78. S marka süspansiyon örneğinden elde edilen kromatogram



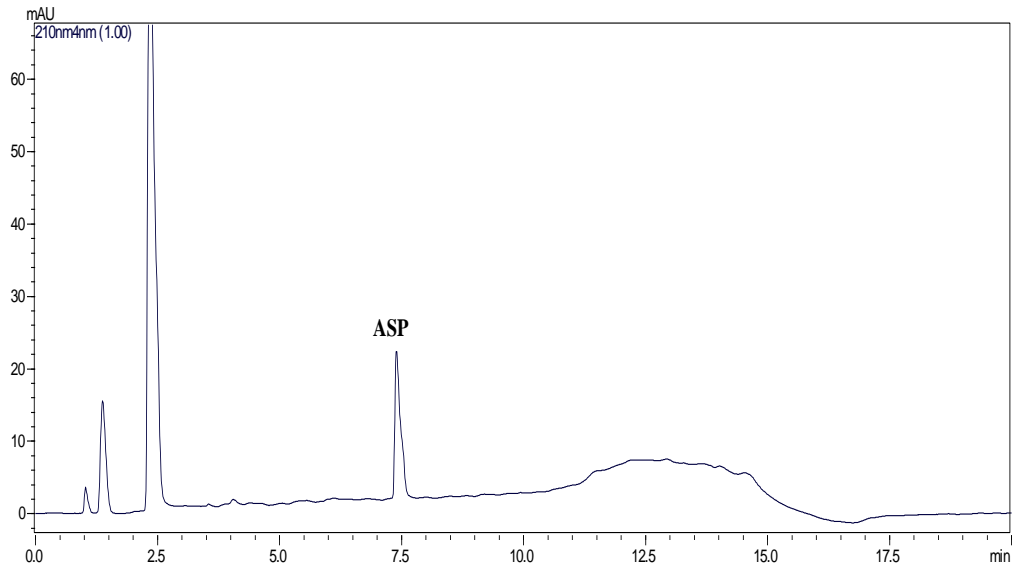
Şekil 79. M marka pastil örneğinden elde edilen kromatogram



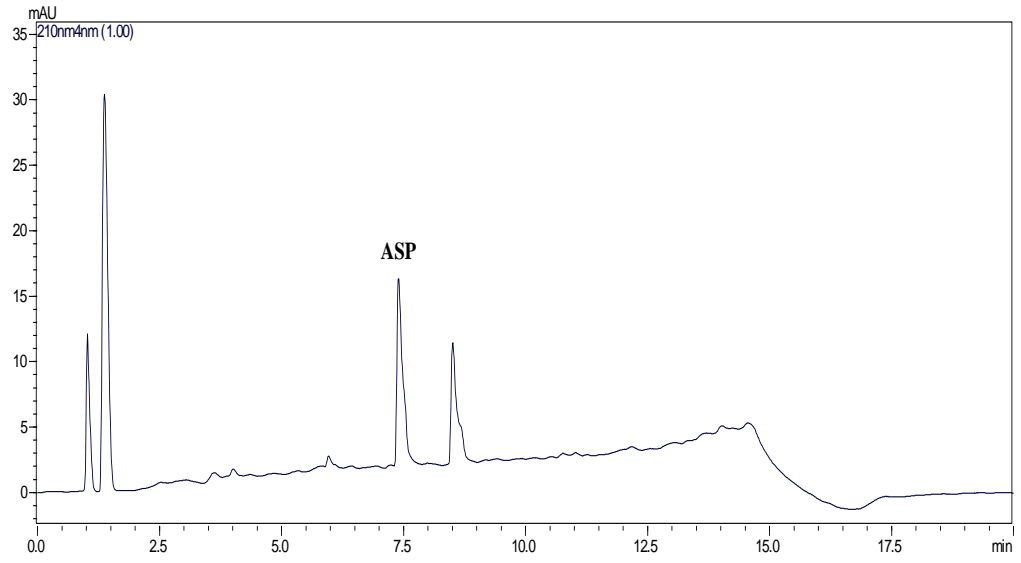
Şekil 80. A marka şurup örneğinden elde edilen kromatogram



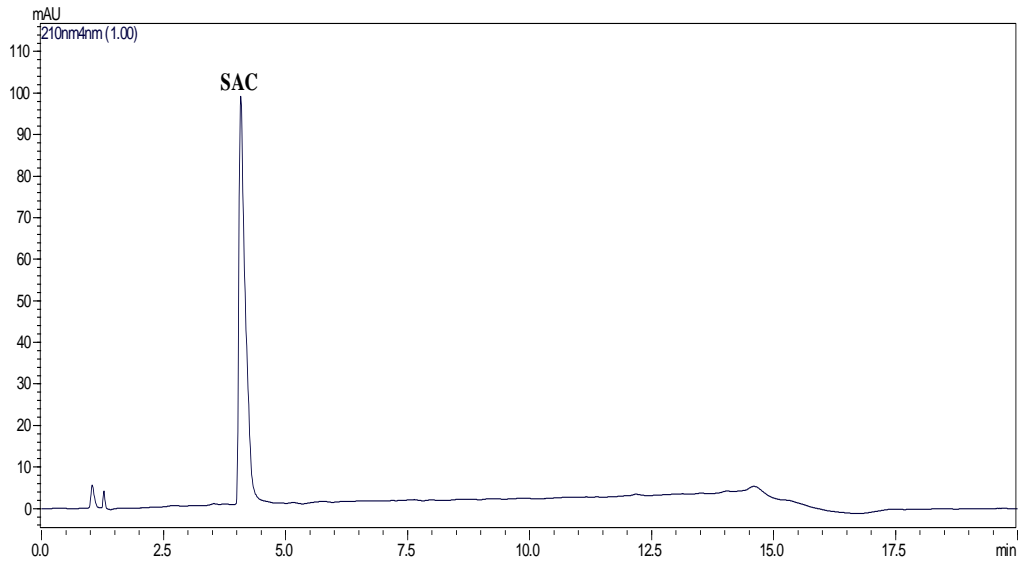
Şekil 81. M marka oral sprej örneğinden elde edilen kromatogram



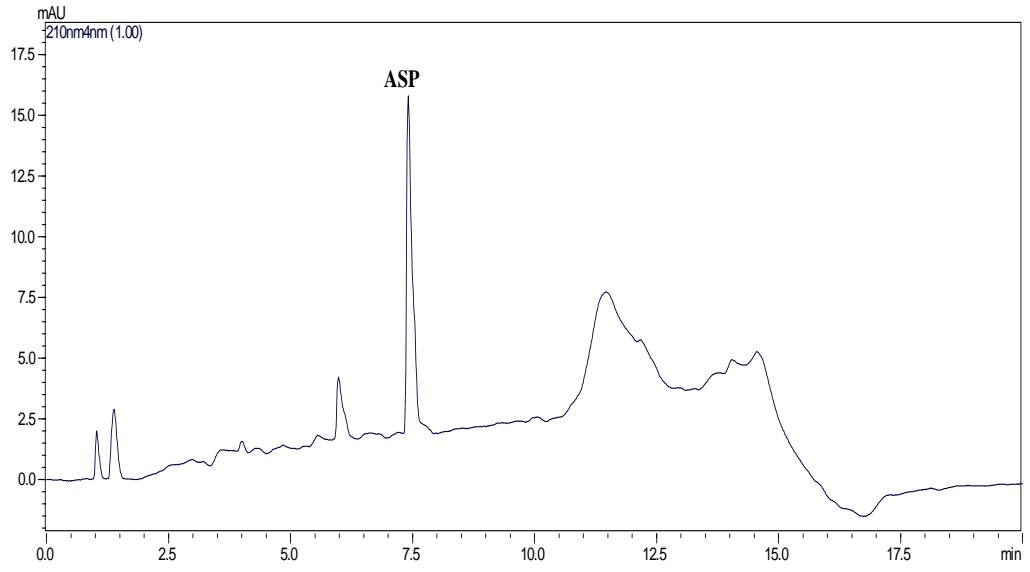
Şekil 82. N marka efervesan tablet örneğinden elde edilen kromatogram



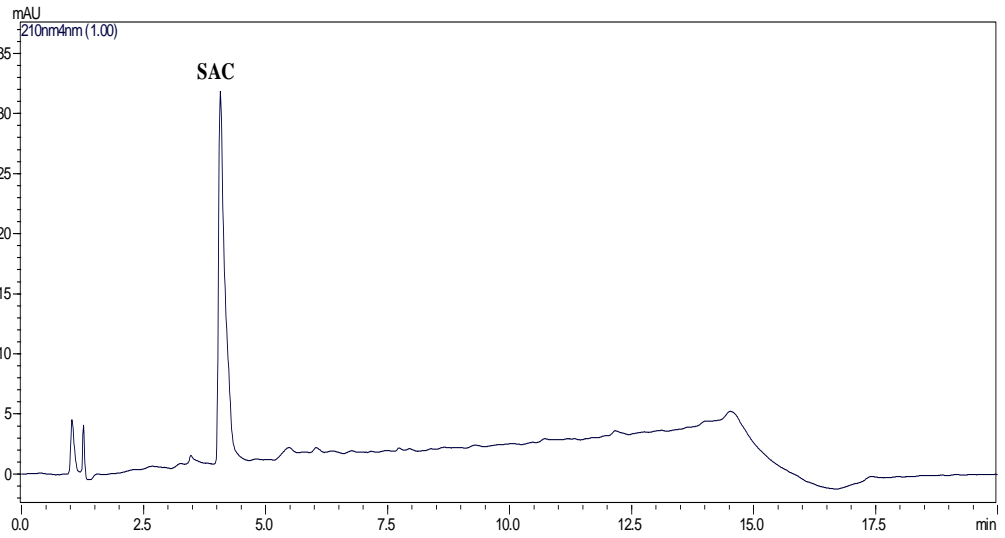
Şekil 83. D marka efervesan tablet örneğinden elde edilen kromatogram



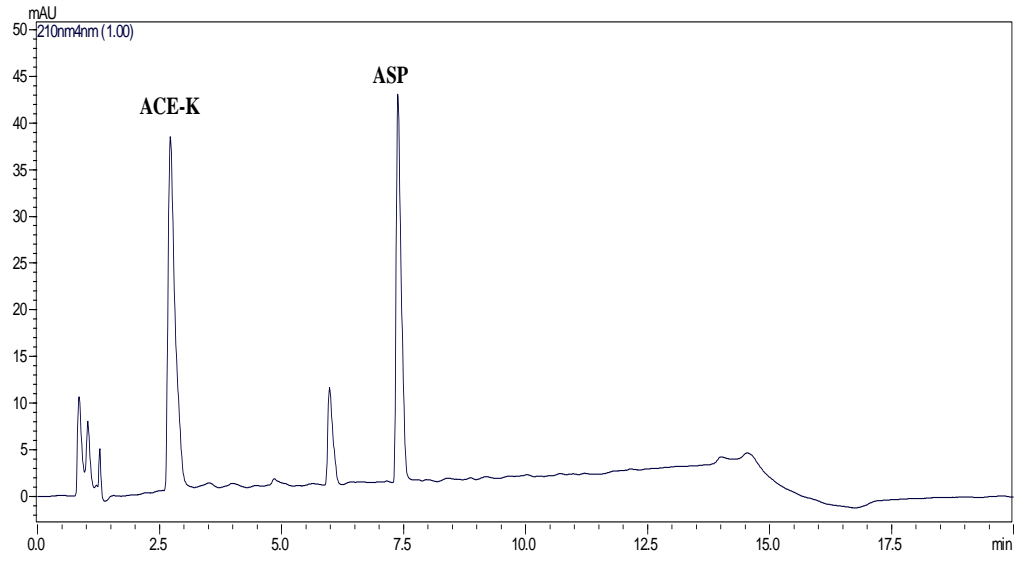
Şekil 84. A marka diş protez jeli örneğinden elde edilen kromatogram



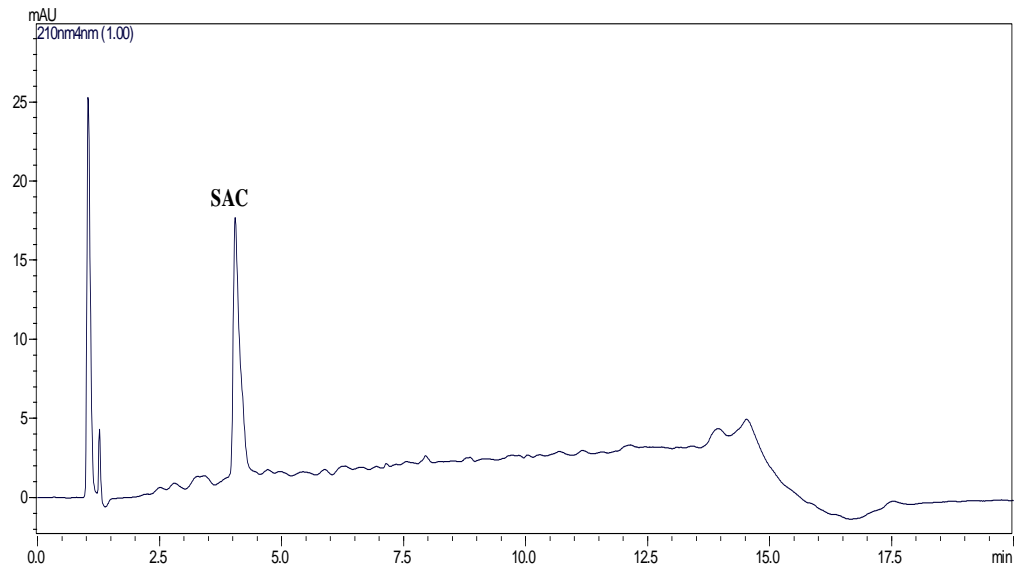
Şekil 85. G marka boğaz pastili örneğinden elde edilen kromatogram



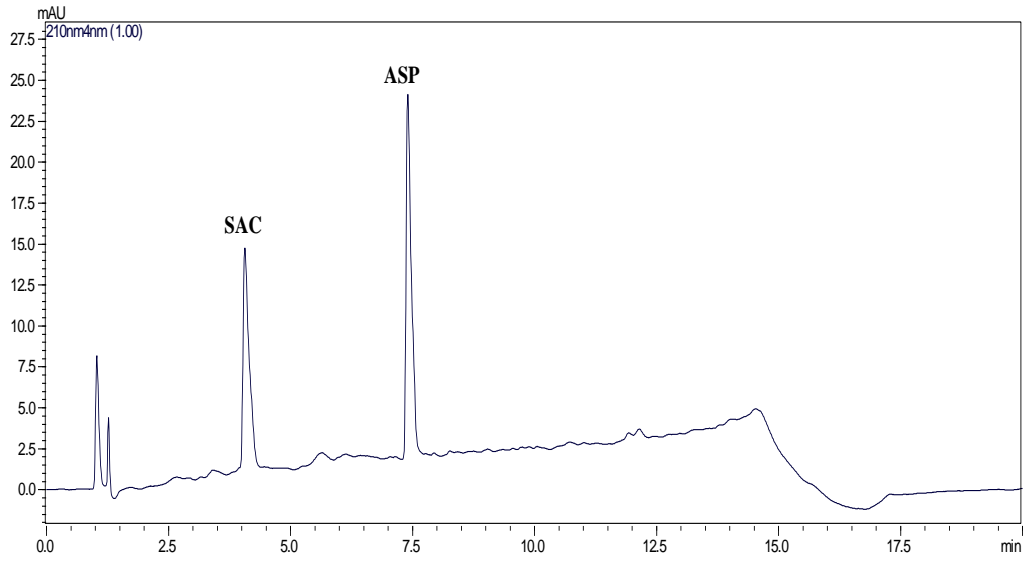
Şekil 86. A marka oral jel örneğinden elde edilen kromatogram



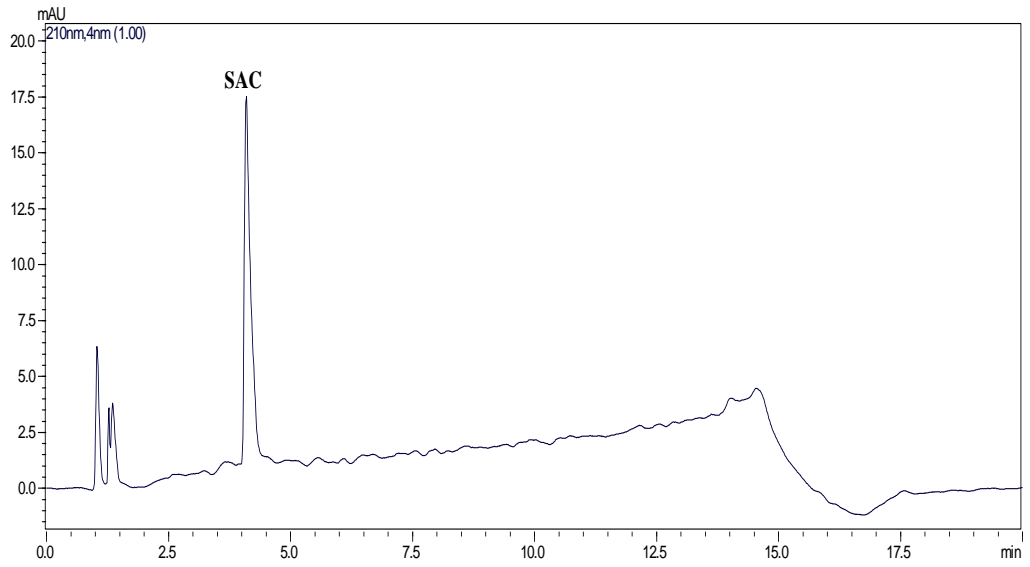
Şekil 87. G marka çiğneme tableti örneğinden elde edilen kromatogram



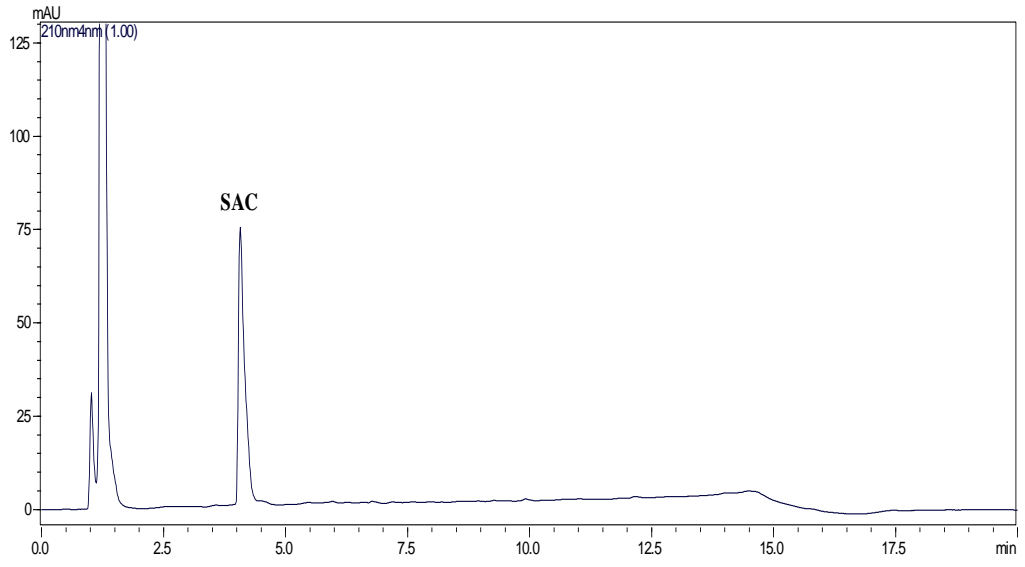
Şekil 88. S marka pastil örneğinden elde edilen kromatogram



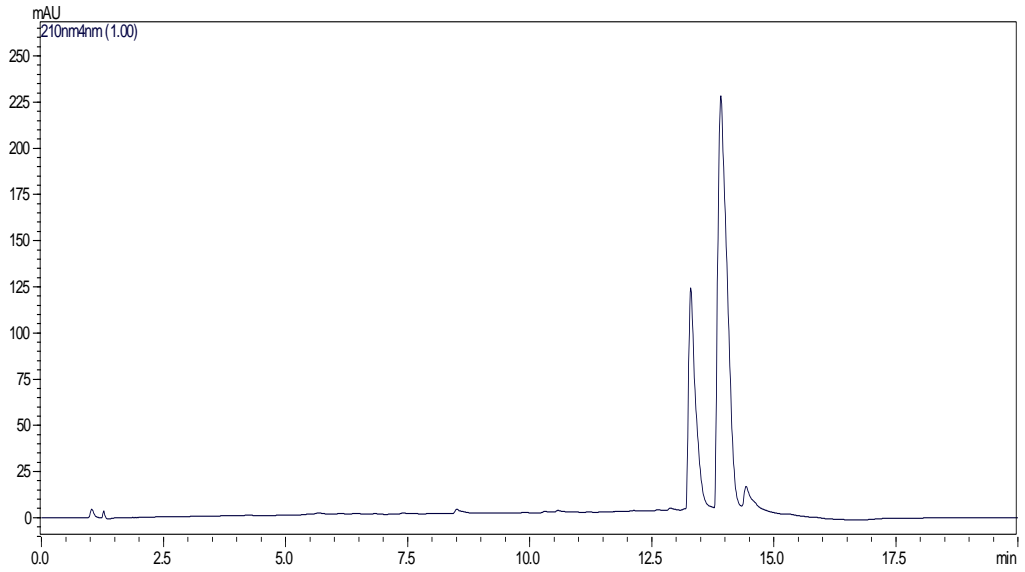
Şekil 89. Z D marka çiğneme tableti örneğinden elde edilen kromatogram



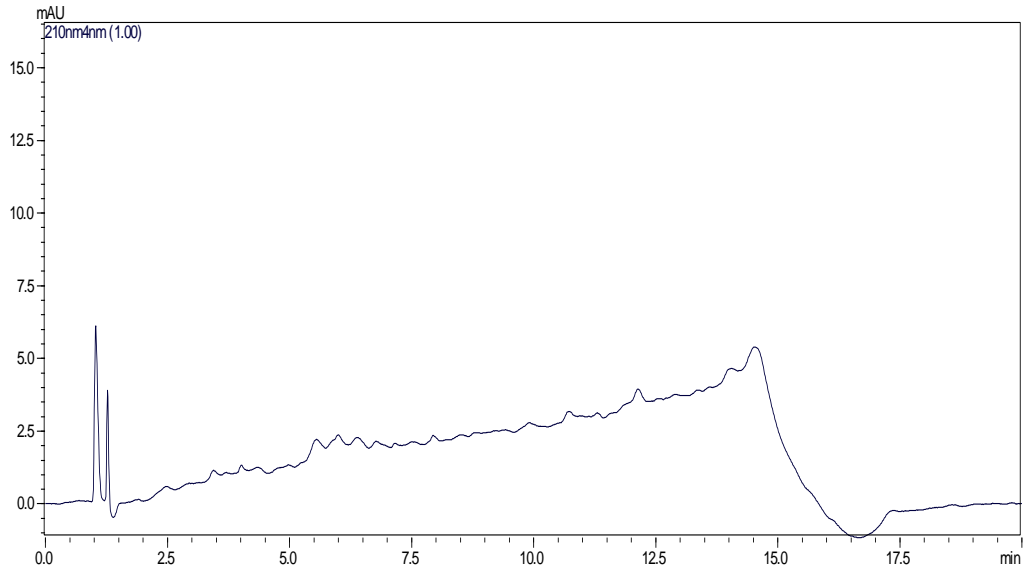
Şekil 90. T marka çiğneme tableti örneğinden elde edilen kromatogram



Şekil 91. H V marka efervesan tablet örneğinden elde edilen kromatogram



Şekil 92. K marka şurup örneğinden elde edilen kromatogram



Şekil 93. R marka çiğneme tableti örneğinden elde edilen kromatogram

Çalışmalardan elde edilen sonuçlar 28693 Sayılı Resmi Gazete’de yayınlanan Türk Gıda Kodeksi Gıdalarda Katkı Maddeleri Yönetmeliği’ne göre değerlendirilmiştir. İlgili yönetmeliğe göre enerjisi azaltılmış içeceklerde ACE-K 350 mg/L, SAC 80 mg/L, ASP 600 mg/L, NHDC 30 mg/L, RBA 100 mg/L (Steviol eşdeğeri olarak) ve NEO 20 mg/L olacak şekilde, enerjisi azaltılmış şekerleme ürünlerinde ACE-K 500 mg/kg, SAC 500 mg/kg, ASP 1000 mg/kg, NHDC 100 mg/kg, RBA 350 mg/kg (Steviol eşdeğeri olarak) ve NEO 32 mg/kg olacak şekilde, enerjisi azaltılmış reçel, jöle ve marmelatlarında ise ACE-K 500 mg/kg, SAC 200 mg/kg, ASP 1000 mg/kg, NHDC 50 mg/kg, RBA 200 mg/kg (Steviol eşdeğeri olarak) ve NEO 32 mg/kg olacak şekilde kullanımları sınırlandırılmıştır. ALI’ya ise kullanılabilir tatlandırıcılar listesinde yer verilmemiştir. Analizlenen gıda örneklerinin hiçbirinin yasal olarak getirilen sınırlamaların üzerinde olmadığı ve kullanımına izin verilmeyen ALI içermediği tespit edilmiştir.

Tayini gerçekleştirilen tatlandırıcılardan ACE-K’nın analizi yapılan içeceklerden %90.48, şekerlemelerden %73.33, reçellerde %87.50, farmasötik ürünlerin %20.00’sinde; SAC’in içeceklerden %9.52 ve farmasötik ürünlerin %56.00’sinde; ASP’nin içeceklerden %61.90, şekerlemelerden %60.00, reçellerde %75.00 ve farmasötik ürünlerin %32.00’sinde; RBA’nın ise analizi yapılan içeceklerden %4.76, şekerlemelerden %20.00’sinde kullanıldığı, diğer tatlandırıcı türlerine ise örneklerde rastlanmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca sonuçların ürün etiket bilgilerine uygun olduğu ve gıdalar için sınır değerleri aşmadığı gözlenmiştir (Anonim, 2013). Farmasötik ürünlerde ise doz hesaplamaları ile günlük diyete etkilerinin göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Sağlık ve yaşam kalitesi ile yakından ilgili olan gıda güvenliği, artan nüfusa bağlı olarak gıda sektörünün genişlemesi ve alternatif gıda ürünleri ve işleme teknolojilerinin ortaya konması ile büyük önem kazanmıştır. Gıda güvenliğinin sağlanması ülkelerin getirdiği yasal düzenlemelerle mümkün olmaktadır. Şüphesiz ki bu düzenlemelerin pratikteki uygulamalardaki denetimi hayati önem taşımaktadır. Gıda güvenliğinin en önemli yönlerinden biri gıda içeriklerinin belirlenmesidir.

Günümüzde gittikçe artan obezite, diyabet gibi sağlık sorunları, estetik kaygılar, dental sorunlar, gıda üretimindeki teknolojik ve ekonomik gereksinimler gibi nedenlere bağlı olarak yapay tatlandırıcıların kullanımı artmıştır. Türkiye’de diyet tatlandırıcı ile tatlandırılmış ürünlerin ne sıklıkta kullanıldığına dair net veriler olmamakla beraber başka ülkelerin rakamlarına baktığımızda Brezilya’da yapılan bir çalışmada erişkin yaş grubunda bu oran %19 olarak belirtilmiştir (Zanini ve ark., 2011). Avustralya’da satılan 3 meşrubattan birinin diyet tatlandırıcı içerdiği bildirilmiştir (Barclay ve Brand-Miller, 2011). Ayrıca bu tatlandırıcı ürünlerinin oral yolla alınan farmasötik ürünlerde kötü tadı maskeleyen amaçlı yardımcı madde olarak kullanımı bu alanda bir teknolojik gereksinim haline gelmiştir.

Tüm dünyada gıda yasaları ile kullanımları sınırlandırılmış bu katkı maddelerin gıdalardaki ve farmasötik ürünlerdeki miktarlarının tayini özellikle sağlık sorunları nedeniyle bu maddeleri kullanmak durumunda olan kişilerin günlük beslenmelerinin düzenlenmesi yönünden oldukça önem taşımaktadır. Özellikle bu maddelerin gıdalarda birlikte kullanılmaları nedeniyle eş zamanlı analizleri önem arz etmektedir. Yapılan çalışmada bu gereksinimleri karşılayacağı düşünülen hızlı, güvenilir, pratik bir eşzamanlı analiz yöntemi geliştirilmiş ve ülkemizde ticari olarak satışa sunulan bazı gıda örneklerine uygulanarak bunların yasal sınırlamalara uygunluğu denetlenmiştir. Bu amaçla kullanılan çok sayıda teknik olmasına rağmen YPSK tekniği hızlı ve güvenilir sonuçlar vermesi, geniş kolon ve dedektör seçeneği sunması, hemen hemen tüm gıda kontrol laboratuvarlarında bulunması nedeni ile tercih edilmiştir. Geliştirilen YPSK yöntemi ucuz ve genel hareketli fazlar, çözme, seyreltme ve süzme gibi basamakları içeren basit numune hazırlama teknikleri kullanılarak çeşitli gıda örneklerine uygulanmıştır.

Tayini için yöntem geliştirilen bu tatlandırıcılar çalışmamızda analizi gerçekleştirilememiş birçok gıda grubunda ve farmasötik üründe de kullanılmaktadır. Çalışmada yer verilmeyen diğer gıda gruplarının tatlandırıcı içeriklerinin belirlenmesinde geliştirilen yöntemin uygulanabilirliğinin araştırılması ve yöntemin geniş çaplı bir uygulama alanı bularak ülkemizdeki gıdalarda ve farmasötik ürünlerde tatlandırıcı kullanım profilinin çıkarılması çalışmanın devamı niteliğinde önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Aksu, M., Tip 1 Diyabetli Çocuklarda ve Adölesanlarda Tatlandırıcılar ve Şekerli Besinlerin Tüketimi, Yüksek Lisans Tezi, Haliç Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye (2012).
- Altuğ, T., Elmacı, Y., Tatlandırıcılar, Gıda Katkı Maddeleri, T. Altuğ (Ed.), Meta Basım Mat., İzmir, 201-223 (2006).
- Altuğ, T., Gıda Katkı Maddeleri, Gıda Katkı Maddeleri, T. Altuğ (Ed.), Meta Basım Mat., İzmir, 1-15 (2006).
- Altuğ, T., Gıda Katkı Maddeleri, Gıda Katkı Maddeleri, T. Altuğ (Ed.), Meta Basım Mat., İzmir, 17-30,113-124 (2009).
- Anonim, Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği, Resmî Gazete, Sayı: 2869 (2013).
- Arbeláez, P., Borrull, F., Pocurull, E., Marcé, R.M., Determination of high-intensity sweeteners in river water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1393, 106–114 (2015).
- Arslan, G., Gıda Katkı Maddeleri ve Yeni Yapılan Dioksimlerin Gıda Katkı Maddesi Olarak Kullanılabilirliğinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, Türkiye (2011).
- Barclay A., Brand-Miller J., The Australian Paradox: A Substantial Decline in Sugars Intake over the Same Timeframe that Overweight and Obesity Have Increased, *Nutrients*, 3(4), 491-504 (2011).
- Bazylak, G., Reversed-phase high-performance liquid chromatography of the stereoisomers of some sweetener peptides with a helical nickel(II) chelate in the mobile phase, *J. Chromatogr. A*, 668, 519-527 (1994).
- Beier, R.C., Natural pesticides and bioactive components in foods, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 133, 47- 123 (1990).
- Bililign, T., Moore, J.C., Tan, S., Leeks A.T., Development and validation of a reversed-phase high-performance liquid chromatography method for routine identification and purity assessment of high-purity steviol glycoside sweeteners, *J. Agric. Food Chem.*, 62, 1384–1389 (2014).
- Borrego, F., Canales, I. and Lindley, M.G., Neohesperidine dihydrochalcone: state of knowledge review, *Z. Lebensm. Unters. Forsch*, 200, 32-37 (1995).
- Bright, G., Low-calorie Sweeteners-From Molecules to Mass Markets, World Conference on Low-Calorie Sweeteners, 25-28 April, Barcelona, 3-8 (1999).
- Buchgraber, M., Wasik, A., Determination of Nine Intense Sweeteners in Foodstuffs by High-Performance Liquid Chromatography and Evaporative Light Scattering Detection: Interlaboratory Study, *J. of AOAC Int.*, 92 (1), 208-222 (2009).
- Butchko, H.H., Stargel, W.W., Aspartame: Scientific evaluation in the Postmarketing period, *Regul. Toxicol. Pharmacol*, 34(3), 221-233 (2001).

- Büyükgöz, G.G., Bozkurt, A.G., Akgül, N.B., U.T., Boyacı, İ.H., Spectroscopic detection of aspartame in soft drinks by surface-enhanced Raman spectroscopy, *Eur Food Res. Technol.*, 240, 567–575 (2015).
- Castellar, M. R., Iborra, J. L., Canales, I., Analysis of Commercial Neohesperidin Dihydrochalcone by High Performance Liquid Chromatography, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 20(13), 2063-2073 (1997).
- Chang, C., Yeh, T.S., Detection of 10 sweeteners in various foods by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *JFDA*, 22, 318-328 (2014).
- Chen, Q., Mou, S., Liu, K., Yang, Z., Ni, Z., Separation and determination of four artificial sweeteners and citric acid by high-performance anion-exchange chromatography, *J. Chrom. A*, 771, 135-143 (1997).
- Çalışır, Z. E., Çalışkan, D., Gıda Katkı Maddeleri ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri, *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 32(3), 193-206 (2003).
- Dejaegher, B., Vander Heyden, Y., Ruggedness and robustness testing, *J. Chrom. A*, 1158 (1), 138-157 (2007).
- Demiralay, E.Ç., Özkan, G., Guzel-Seydim, Z., Isocratic Separation of Some Food Additives by Reversed Phase Liquid Chromatography, *Chromatographia*, 63, 91-96 (2006).
- Deroco, P.B., Medeiros, R.A., Rocha-Filho, R.C., Fatibello-Filho, O., Simultaneous voltammetric determination of aspartame and acesulfame-K in food products using an anodically pretreated boron-doped diamond electrode, *Anal. Methods*, 7, 2135-2140 (2015).
- Dossi, N., Toniolo, R., Susmel, S., Pizzariello, A., Bontempelli, G., Simultaneous RP-LC Determination of Additives in Soft Drinks, *Chromatographia*, 63, 557-562 (2006).
- Drewnowski, A., Intense sweeteners and energy density of foods: implications for weight control, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 53, 757-763 (1999).
- Ferrer, I., Thurman, E.M., Analysis of sucralose and other sweeteners in water and beverage samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 1217, 4127-4134 (2010).
- Grembecka, M., Baran, P., Blazewicz, A., Fijalek, Z., Szefer, P., Simultaneous determination of aspartame, acesulfame-K, saccharin, citric acid and sodium benzoate in various food products using HPLC–CAD–UV/DAD, *Eur. Food. Res. Technol.*, 238, 357–365 (2014).
- Hannisdal, A., Analysis of acesulfame-K, saccharin and preservatives in beverages and jams by HPLC, *Z. Lebensm. Unters Forsch*, 194, 517-519 (1992).
- Hayakawa, K., Schilpp, T., Imai, K., Higuchi, T., Wong, O.S., Determination of aspartic acid, phenylalanine, and aspartylphenylalanine in aspartame-containing samples using a precolumn derivatization HPLC method, *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1256-1260 (1990).

- Heitkemper, D.T., Jackson, D.S., Kaine, L.A., Mulligan, K.A., Wolnik, K.A., Determination of saccharin in shrimp by ion chromatography and capillary gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 671, 323-329 (1994).
- Hou, X., Ma, J., He, X., Chen, L., Wang, S., He, L., A stop-flow two-dimensional liquid chromatography method for determination of food additives in yogurt, *Anal. Methods*, 7, 2141–2148 (2015).
- Hu, F., Xu, L., Luan, F., Liua, H., Gaob, Y., Determination of neotame in non-alcoholic beverage by capillary zone electrophoresis, *J. Sci. Food Agric.*, 93, 3334-3338 (2013).
- Huang, Z., Ma, J., Chen, B., Zhang, Y., Yao, S., Determination of cyclamate in foods by high performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 555, 233-237 (2006).
- ICH Steering Committee, Validation of Analytical Procedures:Text and Methodology Q2 (R1), Harmonised Tripartite Guideline (2005).
- Just, T., Pau, H.W., Engel, U., Hummel, T., Cephalic phase insulin release in healthy humans after taste stimulation?, *Appetite* 51(3), 622-627 (2008).
- Gardana, C., Scaglianti, M., Simonetti, P., Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 1217, 1463–1470 (2010).
- George, V., Arora, S., Wadhwa, B.K., Singth, A.K., Analysis of multiple sweeteners and their degradation products in lassi by HPLC and HPTLC plates, *J. Food Sci. Technol.*, 47 (4), 408-413 (2010).
- Gürcan, T., Gıda Maddelerinin Toksikolojik Açından Değerlendirilmesi, *Gıda Sanayi Dergisi*, 7(2), 29 (1993).
- Kokotou, M.G., Thomaidis, N.S., Determination of eight artificial sweeteners in wastewater by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Methods*, 5, 3825-3833 (2013).
- Kroger, M., Meister, K., Kava, R., *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety*, 5, 35-47 (2006).
- Kubica, P., Namieśnik, J., Wasik, A., Determination of eight artificial sweeteners and common *Stevia rebaudiana* glycosides in non-alcoholic and alcoholic beverages by reversed-phase liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.*, 407, 1505–1512 (2015).
- Lim, H.S., Park, S.K., Kwak, I.K., Kim, H.I., Sung, J.H., Jang, S.J., Byun, M.Y., Kim, S.H., HPLC-MS/MS analysis of 9 artificial sweeteners in imported foods, *Food Sci. Biotechnol.*, 22(S), 233-240 (2013).
- Lindemann, B., Receptors and Transduction in Taste, *Nature*, 413, 219-225, (2001).
- Liu, T., Jiang, Z.T., Li, R., Tan, J., Simultaneous determination of cyclamate, acesulfame and aspartame in beverages by titania-based RP-HPLC, *Food Anal. Methods*, 7, 1400-1406 (2014).

- Lorenzo, R.A., Pena, M.T., Fernandez, P., Gonzalez, P., Carro, A.M., Artificial sweeteners in beverages by ultra performance liquid chromatography with photodiode array and liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Food Control* 47, 43-52 (2015).
- Pierini, G.D., Llamas, N.E., Fragoso, W.D., Lemos, S.G., Di Nezio, M.S., Centurión, M.E., Simultaneous determination of acesulfame-K and aspartame using linear sweep voltammetry and multivariate calibration, *Microchemical Journal*, 106, 347-350 (2013).
- Pinheiro, M.V.S., Oliveira, M.N., Penna, A.L.B., Tamime A.Y., The effect of different sweeteners in low-calorie yogurts - a review, *Int. J. Dairy Tech.*, 58 (4), 193-199 (2005).
- Prakash, I., DuBois, G.E., Clos, J.F., Wilkens, K.L., Fosdick, L.E., Development of Rebiana, a Natural, Non-Caloric Sweetener, *Food Chem. Toxicol.*, 46, 75-82 (2008).
- Ma, J., Zhang, B., Wang, Y., Hou, X., Comparison of six sample preparation methods for analysis of food additives in milk powder, *Food Anal. Methods*, 7, 1345-1352 (2014).
- Matheis, G., *Flavour Modifiers, Flavourings*, H. Ziegler (Ed.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, 351-372 (2007).
- Meyers, B., Brewer M. S., Sweet Taste in Man: A Review, *J. Food Sci.*, 73(6), 81-90 (2008).
- Midey, A.J., Camacho, A., Sampathkumaran, J., Krueger, C.A., Osgood, M.A., Wu, C., High-performance ion mobility spectrometry with direct electrospray ionization (ESI-HPIMS) for the detection of additives and contaminants in food, *Analytica Chimica Acta*, 804, 197-206 (2013).
- Moein, M.M., Javanbakht, M., Karimi, M., Akbari-adergani, B., Fabrication of a novel electrospun molecularly imprinted nanomembrane coupled with high-performance liquid chromatography for the selective separation and determination of acesulfame, *J. Sep. Sci.*, 38, 1372-1379 (2015).
- Morlock, G.E., Meyer, S., Zimmermann, B.F., Roussel, J., High-performance thin-layer chromatography analysis of steviolglycosides in Stevia formulations and sugar-free food products, and benchmarking with (ultra) high-performance liquid chromatography, *J. Chrom. A*, 1350, 102-111 (2014).
- Nabors, L.B., *Alternative Sweeteners*, Vol. 3, Food Trade Press Ltd., USA, 1-5 (2001).
- Nofre, C.C., Tinti, J.M., Neotame: discovery, properties utility, *Food Chem.*, 69(3), 245-257 (2000).
- Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang Y., Ryba, N. J. P. and Zuker C. S., Mammalian Sweet Taste Receptors, *Cell*, 106, 381-390 (2001).
- Nollet. L.M.L., *Handbook of food analysis and other food component analysis*, Vol. 2, Marcel Dekker Inc., New York, 1646-1647 (2004).

- Ordoñez, E.Y., Rodil, R., Quintana, J.B., Cela, R., Determination of artificial sweeteners in beverages with green mobile phases and high temperature liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Food Chem.*, 169, 162–168 (2015).
- Serdar, M., Knežević, Z., Determination of artificial sweeteners in beverages and special nutritional products using high performance liquid chromatography, *Arth. Hig. Rada. Toksikol.*, 62, 169-173 (2011).
- Shah, R., Farris, S., De Jager, L.S., Begley, T.H., A novel method for the simultaneous determination of 14 sweeteners of regulatory interest using UHPLC-MS/MS, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32 (2), 141–151 (2015).
- Tran, N.H., Hu, J., Ong, S.O., Simultaneous determination of PPCPs, EDCs, and artificial sweeteners in environmental water samples using a single-step SPE coupled with HPLC-MS/MS and isotope dilution, *Talanta*, 113, 82-92 (2013).
- Tsuruda, S., Sakamoto, T., Akaki, K., Simultaneous determination of twelve sweeteners and nine preservatives in foods by solid-phase extraction and LC-MS/MS, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 54 (3), 204-212 (2013).
- Turak, F., Özgür, M.U., Validated spectrophotometric methods for simultaneous determination of food colorants and sweeteners, *J. Chem.*, 2013, 1-9 (2013).
- USP, The United States Pharmacopeia 30, National Formulary 25, System Suitability, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 2287-2288 (2006).
- Vistuba, J.P., Dolzan, M.D., Vitali, L., Leal de Oliveira, M.A., Micke, G.A., Sub-minute method for simultaneous determination of aspartame, cyclamate, acesulfame-K and saccharin in food and pharmaceutical samples by capillary zone electrophoresis, *J. Chrom. A*, 1396, 148–152 (2015).
- Yang, D., Chen, B., Simultaneous determination of nonnutritive sweeteners in foods by HPLC/ESI-MS, *J. Agric. Food Chem.*, 57, 3022-3027 (2009).
- Yetük, G., Gıda Katkı Maddesi Sodyum Benzoatın İnsan Eritrositleri Üzerine In vitro Toksik Etkisi ve Kateşin ve Kuersetinin Koruyucu Rolü, Yüksek Lisans Tezi, Bozok Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yozgat, Türkiye (2013).
- Yılmaz, N., Yapay Tatlandırıcılar ve Gıda Sanayinde Kullanımları, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, Türkiye (2001).
- Yurttagül M., Ayaz A., Katkı maddeleri; Yanlışlar ve Doğrular, Sağlık Bakanlığı Yayınları No:727, Ankara, 7-31 (2008).
- Wallin, H., Steviol glycosides chemical and technical assessment, *JECFA*, 1-7 (2007).
- Wasik, A., McCourt, J., Buchgraber, M., Simultaneous determination of nine intense sweeteners in foodstuffs by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection-Development and single-laboratory validation, *J. Chrom. A*, 1157, 187-196 (2007).
- Whitehouse, C.R., Boullata, J., McCauley, L.A., The potential toxicity of artificial sweeteners, *AAOHN Journal*, 56(6) 251-25. (2008).

Wu, M., Qian, Y., Boyd, J.M., Hrudey, S.E., Le, X.C., Li, X., Direct large volume injection ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of artificial sweeteners sucralose and acesulfame in well water, *J. Chrom. A*, 1359, 156–161 (2014).

Zanini Rde V, Araújo CL, Martínez-Mesa J., Use of diet sweeteners by adults in Pelotas, Rio Grande do Sul State, Brazil: a population-based study, *Cad Saude Publica.*, 27(5), 924-34 (2011).

Zeliger, H. I., Human toxicology of chemical mixtures: toxic consequences beyond the impact of one-component product and environmental exposures, Elsevier Inc., Oxford, 1-5 (2011).

Zhao, Y.G., Cai, M.Q., Chen, X.H., Pan, S.D., Yao, S.S., Jin, M.C., Analysis of nine food additives in wine by dispersive solid-phase extraction and reversed-phase high performance liquid chromatography, *Food Res. Int.*, 52, 350-358 (2013).

Zygler, A., Wasik, A., Namiesnik, J., Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs, *Trends Ana. Chem.*, 28 (9), 1082-1102 (2009).

Zygler, A., Wasik, A., Kot-Wasik, A., Namiesnik, J., Determination of nine high-intensity sweeteners in various foods by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection, *Anal. Bioanal. Chem.*, 400 (7), 2159-2172 (2011).

EK 2 SAC standart maddesi analiz sertifikasi

Certificate of Analysis

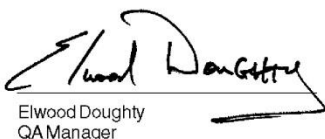
DESCRIPTION: Sodium saccharin
SYNONYM: *
MFG. DATE: Mar 2012
CATALOG NO.: 47839 (1)
LOT NO.: LB90987V
EXP. DATE: Mar 2015
CAS NUMBER: 82385-42-0
MOLECULAR FORMULA: C₇H₄NNaO₃S.xH₂O
MOLECULAR WEIGHT: 205.17

PHYSICAL PROPERTIES ASSAY

Appearance OFF-WHITE CRYSTALS
% moisture 14.10%
Purity (2) 99.9% (a)

Note: Supelco guarantees the purity of this chemical standard +/- 0.5% deviation prior to the expiration date shown on the label. This guarantee is exclusive of any contamination caused by the customer.

- (1) This product is packaged from R474790 Lot number LB85033.
(2) Determined by GC-FID unless otherwise noted.
(a) Thin Layer Chromatography


Elwood Doughty
QA Manager

Supelco warrants that its products conform to the information contained in this publication. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. Please see the latest catalog or order invoice and packing slip for additional terms and conditions of sale.

 **SUPELCO**
Analytical
595 North Harrison Road
Deltolorte, PA 16823-0048 USA
Phone (814) 359-3441

EK 3 ASP standart maddesi analiz sertifikasi

Certificate of Analysis

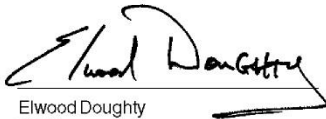
DESCRIPTION: Aspartame
SYNONYM: ASP-PHE METHYL ESTER
MFG. DATE: Apr 2012
CATALOG NO.: 47135 (1)
LOT NO.: LB91771V
EXP. DATE: Apr 2015
CAS NUMBER: 22839-47-0
MOLECULAR FORMULA: C14H18N2O5
MOLECULAR WEIGHT: 294

PHYSICAL PROPERTIES ASSAY

Appearance WHITE POWDER
Purity (2) 99.0% (a)

Note: Supelco guarantees the purity of this chemical standard +/- 0.5% deviation prior to the expiration date shown on the label. This guarantee is exclusive of any contamination caused by the customer.

- (1) This product is packaged from R474775 Lot number LB64940.
- (2) Determined by GC-FID unless otherwise noted.
 - (a) Thin Layer Chromatography



Elwood Doughty
QA Manager


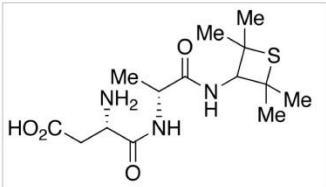

Supelco warrants that its products conform to the information contained in this publication. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. Please see the latest catalog or order invoice and packing slip for additional terms and conditions of sale.

 **SUPELCO**
Analytical
595 North Harrison Road
Bellefonte, PA 16823-0048 USA
Phone (814) 359-3441

EK 4 ALI standart maddesi analiz sertifikası

21.10.2015

TRC | CofA - 18-ABY-66-1-PFZ

| | |
|---|---|
|  <p>CERTIFICATE OF ANALYSIS 2 Brisbane Road, North York, ON, M3J2J8, CANADA Tel: (416) 665-9696, Fax: (416) 665-4439 Email: orders@trc-canada.com Website: www.trc-canada.com</p> | |
| 1. Identification | |
| CAS Number: 80863-62-3 | Cat. Number: A536500 |
| Product: Alitame | Synonym: L- α -Aspartyl-N-(2,2,4,4-tetramethyl-3-thietanyl)-D-alaninamide; CP 54802; |
| Structure:  | Molecular Formula: C ₁₄ H ₂₅ N ₃ O ₄ S Molecular weight: 331.43 Source of Product: |
| 2. Analytical Information | |
| Lot Number: 18-ABY-66-1-PFZ | Boiling Point: N/A |
| Melting Point: 132-137°C | Atmosphere: Air |
| Appearance: White Solid | Solubility: DMSO, Methanol |
| Method for Determining Identity: 1H NMR (CD ₂ OD & DMSO-d ₆) Spectroscopic and Mass Spectrometry | Stability: Not determined |
| Purity: 98% | Long Term Storage Condition: Refrigerator |
| Additional Info.: 0 | |
|  Philip Chan, Head of Quality Assurance | QC Test Date: July 6, 2012 (MM/DD/YYYY) Retest Date: July 6, 2015 (MM/DD/YYYY) |

EK 5 NHDC standart maddesi analiz sertifikası

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

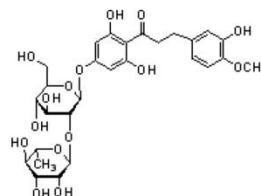
Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:

Neohesperidin dihydrochalcone $\geq 95\%$ (HPLC), from citrus fruit, crystalline

Product Number: N8757
Lot Number: 031M1834V
Brand: SIGMA
CAS Number: 20702-77-6
MDL Number: MFCD00017711
Formula: C₂₈H₃₆O₁₅
Formula Weight: 612.58 g/mol
Storage Temperature: Store at -20 °C
Quality Release Date: 16 MAR 2011



| Test | Specification | Result |
|------------------------------|------------------------|-----------|
| Appearance (Color) | White to Off-White | Off-White |
| Appearance (Form) | Powder | Powder |
| Solubility (Color) | Yellow | Yellow |
| 50 mg per ml in water | | |
| Solubility (Turbidity) | Clear to Slightly Hazy | Clear |
| Proton NMR spectrum | Conforms to Structure | Conforms |
| ¹³ C NMR Spectrum | Conforms to Structure | Conforms |
| Water (by Karl Fischer) | $\leq 12\%$ | 12% |
| Carbon (anhydrous) | 53.5 - 55.8% | 55.3% |
| Purity (HPLC) | $\geq 95\%$ | 97% |

Rodney Burbach, Manager
Analytical Services
St. Louis, Missouri US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1

Page 1 of 1

EK 6 RBA standart maddesi analiz sertifikası

SIGMA-ALDRICH

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
Website: www.sigmaaldrich.com
Email USA techserv@sial.com
Outside USA eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name: REBAUDIOSIDE A
>= 96 % HPLC
Product Number: 01432
Product Brand: Sigma
Molecular Formula: C₄₄H₇₀O₂₃
Molecular Mass: 967.01
CAS Number: 58543-16-1

| TEST | SPECIFICATION | LOT BCBH7316V RESULTS |
|--------------------------|-----------------------|-------------------------|
| APPEARANCE (COLOR) | WHITE | WHITE |
| APPEARANCE (FORM) | POWDER | POWDER |
| PURITY (HPLC AREA %) | ≥96 % | 96 % |
| SPECIFIC ROTATION (20/D) | -33.0 ± 3.0 DEGREES | -31.4 DEGREES |
| CONCENTRATION | -- | C=1 IN H ₂ O |
| CARBON CONTENT | 52.0 - 56.8 % | 52.9 % |
| INFRARED SPECTRUM | CONFORMS TO STRUCTURE | CONFORMS |

QUALITY RELEASE DATE 03 APR 2012



Dr. Claudia Geitner
Manager Quality Control
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants, that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice for additional terms and conditions of sale. The values given on the 'Certificate of Analysis' are the results determined at the time of analysis.

EK 7 NEO standart maddesi analiz sertifikası

SIGMA-ALDRICH

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
Website: www.sigmaldrich.com
Email USA techserv@sial.com
Outside USA eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name: NEOTAME
-
Product Number: 49777
Product Brand: Fluka
Molecular Formula: $C_{20}H_{30}N_2O_5$
Molecular Mass: 378.46
CAS Number: 165450-17-9

| TEST | SPECIFICATION | LOT BCBG6240V RESULTS |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------|
| APPEARANCE (COLOR) | WHITE | WHITE |
| APPEARANCE (FORM) | POWDER | POWDER |
| PURITY (HPLC AREA %) | ≥ 98.0 % | 99.5 % |
| SPECIFIC ROTATION (20/D) | -41.0 ±3.0 DEGREES | -41.0 DEGREES |
| CONCENTRATION | -- | C=0.5 IN H2O |
| PROTON NMR SPECTRUM | CONFORMS TO STRUCTURE | CONFORMS |
| EXPIRATION DATE | -- | SEP/13 |
| QUALITY RELEASE DATE | 08/NOV/11 | |



Dr. Claudia Geitner
Manager Quality Control
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich guarantees the 'Sales-Specification' values only, additional lot specific tests may be included for further information. The current 'Sales-Specifications' sheet is available on request. For further inquiries, please contact our Technical Service. Sigma-Aldrich warrants, that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice for additional terms and conditions of sale. The values given on the 'Certificate of Analysis' are the results determined at the time of analysis.

EK 8 Ascentis® Express C₁₈ kolonu performans raporu



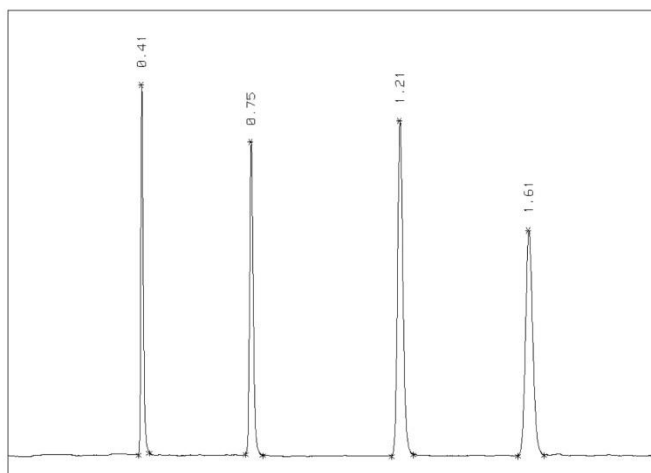
595 North Harrison Road
 Bellefonte, PA 16823-0048 USA
 Telephone 800-247-6628 • 814-359-3441
 Fax 800-447-3044 • 814-359-3044
 email: supelco@sial.com
 sigma-aldrich.com/supelco

SERIAL NO.: USPY006661
 COLUMN: Ascentis Express C18 10cm x 4.6mm
 PART NO.: 53827-U
 PACKING LOT NO.: S13101

TEST CONDITIONS:
 MOBILE PHASE = 60/40 ACETONITRILE/WATER
 PRESSURE = 230 bar
 FLOW = 1.80 mL/min
 TEMPERATURE = AMBIENT
 UV DETECTOR = 254 nm

PERFORMANCE RESULTS FOR TOLUENE (K' = 2.88)

| PARAMETER | SPECIFICATION | COLUMN USPY006661 |
|--------------------|--------------------|-------------------|
| THEORETICAL PLATES | MIN: 22000 | 28207 |
| USP TAILING FACTOR | MAX: 1.25 | 1.15 |
| SELECTIVITY | RANGE: 1.37 - 1.57 | 1.50 |



QC Sample: (2.0 µL injection)
 Uracil (20 µg/ml)
 Acetophenone (30 µg/ml)
 4-Cl-Nitrobenzene (80 µg/ml)
 Toluene (2.40 mg/ml)

EK 9 Ascentis® Express Phenyl-Hexyl kolonu performans raporu



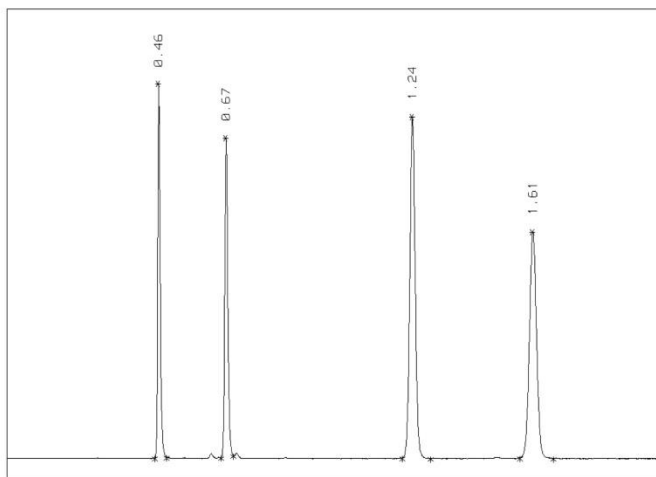
595 North Harrison Road
 Bellefonte, PA 16823-0048 USA
 Telephone 800-247-6628 • 814-359-3441
 Fax 800-447-3044 • 814-359-3044
 email: supelco@sial.com
 sigma-aldrich.com/supelco

SERIAL NO.: USRT001358
 COLUMN: Ascentis Express Phenyl-Hexyl 10cm x 4.6mm
 PART NO.: 53352-U
 PACKING LOT NO.: S11045

TEST CONDITIONS:
 MOBILE PHASE = 60/40 ACETONITRILE/WATER
 PRESSURE = 200 bar
 FLOW = 1.8 mL/min
 LINEAR VELOCITY = 0.360 cm/sec
 TEMPERATURE = AMBIENT

PERFORMANCE RESULTS FOR NAPHTHALENE (K' = 2.46)

| PARAMETER | SPECIFICATION | COLUMN USRT001358 |
|--------------------|--------------------|-------------------|
| THEORETICAL PLATES | MIN: 22000 | 28277 |
| USP TAILING FACTOR | MAX: 1.25 | 1.05 |
| SELECTIVITY | RANGE: 1.40 - 1.60 | 1.48 |



QC Sample:
 Uracil (30 µg/ml)
 Phenol (500 µg/ml)
 4-Cl-Nitrobenzene (120 µg/ml)
 Naphthalene (200 µg/ml)

EK 10 Ascentis® Express F5 kolonu performans raporu



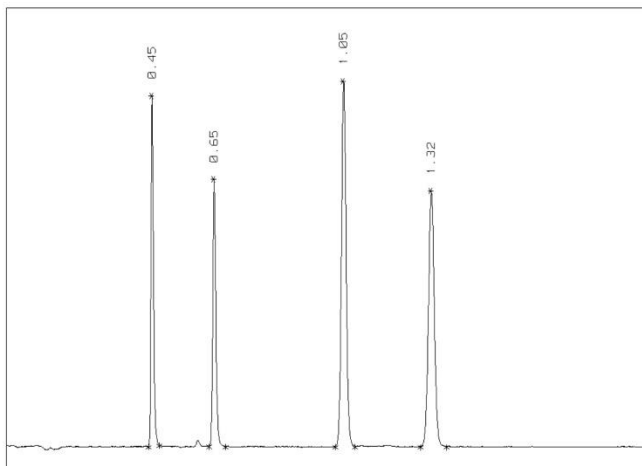
595 North Harrison Road
 Bellefonte, PA 16823-0048 USA
 Telephone 800-247-6628 • 814-359-3441
 Fax 800-447-3044 • 814-359-3044
 email: supelco@sial.com
 sigma-aldrich.com/supelco

SERIAL NO.: USBN001316
 COLUMN: Ascentis Express F5 10cm x 4.6mm
 PART NO.: 53590-U
 PACKING LOT NO.: S11006

TEST CONDITIONS:
 MOBILE PHASE = 60/40 ACETONITRILE/WATER
 PRESSURE = 200 bar
 FLOW = 1.8 mL/min
 LINEAR VELOCITY = 0.370 cm/sec
 TEMPERATURE = AMBIENT

PERFORMANCE RESULTS FOR NAPHTHALENE (K' = 1.91)

| PARAMETER | SPECIFICATION | COLUMN USBN001316 |
|--------------------|--------------------|-------------------|
| THEORETICAL PLATES | MIN: 22000 | 28827 |
| USP TAILING FACTOR | MAX: 1.25 | 1.09 |
| SELECTIVITY | RANGE: 1.40 - 1.60 | 1.46 |



QC Sample:
 Uracil (30 µg/ml)
 Phenol (500 µg/ml)
 4-Cl-Nitrobenzene (120 µg/ml)
 Naphthalene (200 µg/ml)