

**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI GIDALARDA TARTRAZİN VE İNDİGOTİN'İN
YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMOTOGRAFİSİ
YÖNTEMİ İLE TAYİNİ**

**SÜLEYMAN SEYHAN
(Kimya Öğretmeni)**

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

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Güler YALÇIN
2. DANIŞMAN
Prof. Dr. Emre DÖLEN**

İSTANBUL - 2006

**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI GIDALARDA TARTRAZİN VE İNDİGOTİN'İN
YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ
YÖNTEMİ İLE TAYİNİ**

SÜLEYMAN SEYHAN

(Kimya Öğretmeni)

(141100120030290)

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

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Güler YALÇIN
2. DANIŞMAN
Prof. Dr. Emre DÖLEN**

İSTANBUL - 2006

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın ortaya çıkmasında büyük yardımını ve desteğini gördüğüm danışmanım Doç. Dr. Güler Yalçın'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Huzurlu bir ortamda çalışmamızı sağlayan ve her türlü sorunda desteğini esirgemeyen Fen Bilimleri Enstitü Müdürü Prof. Dr. Adnan Aydın ve Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Emre Dölen'e çok teşekkür ederim.

Çalışmamın her aşamasında bana çok yardımcı olan Marmara Üniversitesi Haydarpaşa Kampüsü Merkezi Araştırma Laboratuvarı sorumlusu Öğr. Gör. F. Nuray Yüktaş'a her türlü desteğinden dolayı çok teşekkür ederim.

İndigotin ve Tartrazin'in standartlarını temin etmemizde yardımcı olan İlsan İlaç Sanayi A.Ş. ve Soyiğit Baharat A.Ş.'ne teşekkür ederim.

Ayrıca tüm yaşamım boyunca desteklerini esirgemeyen aileme ve değerli arkadaşlarım İbrahim Hakkı ve Yusuf Taş'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	V
ABSTRACT	VI
SEMBOL LİSTESİ	VII
KISALTMALAR	VIII
ŞEKİL LİSTESİ	IX
TABLO LİSTESİ	X
BÖLÜM I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
I.1. GİRİŞ	1
I.2. AMAÇ	2
BÖLÜM II. GENEL BİLGİLER.....	3
II.1 TARTRAZİN.....	3
II.1.1 Özellikleri.....	3
II.1.2 Kullanım Alanları	4
II.2 İNDİGOTİN.....	4
II.2.1 Özellikleri	4
II.2.2 Kullanım Alanları	4
II.3 YÖNTEM DOĞRULAMASI	5
II.3.1 Özgünlük	5
II.3.2 Doğrusallık	6
II.3.3 Konsantrasyon Aralığı	6
II.3.4 Doğruluk	6
II.3.5 Kesinlik	7
II.3.6 Deteksiyon Limiti.....	7

II.3.7 Kantitatif Tayin Limiti	7
II.3.8 Sağlamlık	8
II.3.9 Sistem Uygunluk Testleri	8
II.4 PİK ÖZELLİKLERİ	8
II.4.1 Kapasite Faktörü	9
II.4.2 Kuyruklanma Faktörü	9
II.4.3 Ayırma Gücü	9
II.5 KULLANILAN İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER.....	10
II.5.1 Standart Sapma.....	10
II.5.2 Bağlı Standart Sapma.....	10
II.5.3 En Küçük Kareler Yöntemi.....	10
II.5.4 Ortalamanın Güven Aralığı.....	11
II.5.5 İki Ortalamanın Karşılaştırılması.....	11
BÖLÜM III. TEZ ÇALIŞMALARI	12
III.1 GEREÇ VE YÖNTEM	12
III.1.1 Kimyasal Maddeler.....	12
III.1.2 Gereçler.....	12
III.1.3 Çözeltiler	13
III.1.3.1 Hareketli Fazlar.....	13
III.1.3.2 Tampon Çözeltiler.....	14
III.1.3.3 Stok Çözeltiler.....	14
III.1.3.4 Örnek Hazırlama.....	14
III.1.3.5 Bozundurma Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler.....	15
III.1.4 Kromatografik Koşullar.....	15
III.2 BULGULAR.....	17
III.2.1 Ön Denemeler	17
III.2.1.1 Spektrofotometrik Çalışmalar.....	17
III.2.1.2 Kromatografik Çalışmalar.....	19
III.2.1.2.a Hareketli Faza Tetrabutyl Amonyumhidrojen sülfat ilavesi ile Yapılan Çalışmalar.....	22
III.2.1.2.b. Örnek (Enjeksiyon) Çözeltisinin Hazırlanması ve Pik Parametrelerinin Geliştirilmesi.....	25
III.3 GELİŞTİRİLEN TAYİN YÖNTEMİNİN DOĞRULANMASI.....	30
III.3.1 Yöntemin Özgünlüğünün Belirlenmesi.....	30
III.3.2 Yöntemin Doğrusallığının Belirlenmesi.....	32
III.3.2.1 İndigotin'in ölçü eğrisinin doğrusallığının belirlenmesi.....	32
III.3.2.2 Tartrazin'in ölçü eğrisinin doğrusallığının belirlenmesi.....	33
III.3.3 Yöntemin Çalışma Aralığının Belirlenmesi.....	35
III.3.4 Dedeksiyon Limiti ve Kantitatif Tayin Limiti.....	35
III.3.5 Yöntemin Doğruluğunun Belirlenmesi.....	35
III.3.6 İndigotin ve Tartrazin'in Üründen Miktar Tayini	36
III.3.7 Yöntemin Sağlamlığının Belirlenmesi.....	37
III.3.7.1 Hareketli Faz Bileşeninin pH'ında Yapılan Değişiklik.....	37
III.3.8 Sistem Uyumluluk Testleri	37

BÖLÜM IV. SONUÇ VE TARTIŞMA	38
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

BAZI GIDALARDA TARTRAZİN VE İNDİGOTİN'İN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

Bu çalışmada İndigotin ve Tartrazin için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve Diod dizi dedektör kullanarak miktar tayini yöntemi geliştirildi.

Kromatografik koşullar; hareketli faz : 6 mM Tetrabutyl amonyum hidrojen sülfat / ACN ; A / B: 57:43, Kolon: Phenomenex, Luna, ODS-2 RP- C18(2) (5µ m, 4.6 ×250 mm i.d.), Dedektör: Agilent 1100 Model DAD, λ:258 nm, İndigotin için λ:610 nm, Tartrazin için λ:427 nm (band genişliği: 4nm) izokritik elüsyon: A:57 B:43, Akış Hızı: 1 mL / dak., enjeksiyon hacmi : 50 µL, Basınç: 138 bar

İndigotin için konsantrasyon aralığı: $0,235-3,525 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $y = 561,01x + 5,5978$ ($r^2 = 0,9999$); dedeksiyon limiti $0,053 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, kantitatif tayin limiti $0,176 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$

Tartrazin için konsantrasyon aralığı: $0,71-7,14 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $y = 561,01x + 5,5978$ ($r^2 = 0,9997$); dedeksiyon limiti $0,205 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, kantitatif tayin limiti $0,682 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$

Geri kazanım İndigotin için % 81,49; Tartrazin için % 84,83 olarak bulunmuştur. İndigotin için 56,00 mg/kg, Tartrazin için 80,72 mg/kg olarak boya maddeleri tayin edilmiştir.

Ocak, 2006

Süleyman Seyhan

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF QUANTIFICATION METHOD FOR INDIGOTINE AND TARTRAZINE IN SOME COMMERCIAL FOODS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

A quantification method was developed for ingotone (I) and tartrazine (T) by high performance liquid chromatography and Diode array detector.

Chromatographic conditions; mobile phase: 6 mM tetrabutylammonium hydrogensulfate solution / ACN ; A / B: 57:43, Column: Phenomenex, Luna, ODS-2 RP- C18(2) (5 μ m, 4.6 $\times$ 250 mm i.d.), Dedector: Agilent 1100 Model DAD, λ :258 nm, for Indigotine λ :610 nm, for Tartrazine λ :427 nm (band width: 4nm), Flow rate: 1 mL / dak., injection volume: 50 μ L, Pressure: 138 bar

Concentration range for Ingotone: $0,235-3,525 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹, $y = 561,01x + 5,5978$ ($r^2 = 0,9999$); limit of detection: $0,053 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹, limit of quantification: $0,176 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹

Concentration range for Tartrazine: $0,71-7,14 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹, $y = 561,01x + 5,5978$ ($r^2 = 0,9997$); limit of detection: $0,205 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹, limit of quantification: $0,682 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹

The recovery was 81,49 % for Indigotine; 84,83 % for Tartrazine. In commercial food the amount of Indigotine was 56,00 mg/kg, the amount of Tartrazine was 80,72 mg/kg.

January, 2006

Suleyman Seyhan

SEMBOL LİSTESİ

SD	: Standart sapma
RSD	: Bağlı standart sapma
X_{ort.}	: Ortalama değer
t	: Zaman
r	: Korelasyon katsayısı
λ	: Dalga boyu
k'	: Kapasite faktörü
T_R	: Alıkonma zamanı
R	: Ayrılma faktörü
a	: Doğrunun kayım değeri
b	: Doğrunun eğim değeri

KISALTMALAR

I	: İndigotin
T	: Tartrazin
Ac	: Asetik asit
ACN	: Asetonitril
CTMAB	: Setiltrimetil amonyum bromür
DAD	: Diod dizi dedektör
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
NaAc	: Sodyum asetat
TBAHS	: Tetrabutilamonyum hidrojen sülfat
UV	: Ultraviyole
EtOH	: Etil alkol
C_I	: İndigotin'e ait konsantrasyon
C_T	: Tartrazin'e ait konsantrasyon
T_I	: İndigotin'e ait kuyruklanma faktörü
T_T	: Tartrazin'e ait kuyruklanma faktörü
R_{S/I}	: Safsızlık piki ile İndigotin piki arasındaki resolüsyon değeri
S	: Birinci safsızlık
A₀	: Alan değerlerinin ortalaması
IPA	: İyon çifti oluşturuucu madde

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA NO

Şekil II.1 Tartrazin'in Açık Formülü.....	3
Şekil II.2 İndigotin'in Açık Formülü.....	4
Şekil III.1 İngidotin'in (I) 0,3 M Asetik asit/Sodyum Asetat (pH:4.7) tamponundaki absorbsiyon spektrumu.....	17
Şekil III.2 Tartrazin'in (T) 0.3 M Asetik asit/Sodyum Asetat (pH:4.7) tamponundaki absorbsiyon spektrumu.....	17
Şekil III.3 0.3 M Asetik asit / Sodyum Asetat (pH:4.7) tamponundaki I'in sırasıyla birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü safsızlıklarına ait absorbsiyon spektrumu.....	18
Şekil III.4 Gıda Firmasından temin edilen I ve safsızlıklarına ilişkin kromatogram..	20
Şekil III.5 Gıda Firmasından temin edilen T'e ilişkin kromatogram.....	21
Şekil III.6 Gıda Firmasından temin edilen I ve safsızlıklarına ilişkin kromatogram..	21
Şekil III.7 Gıda Firmasından temin edilen T'e ilişkin kromatogram.....	22
Şekil III.8 Gıda Firmasından temin edilen I ve T'e ilişkin kromatogram.....	23
Şekil III.9 Gıda Firmasından temin edilen I ve T'e ilişkin kromatogram.....	24
Şekil III.10 Gıda Firmasından temin edilen I ve T'e ilişkin kromatogram.....	26
Şekil III.11 Gıda Firmasından temin edilen I'e ilişkin kromatogram.....	26
Şekil III.12 Gıda Firmasından temin edilen T'e ilişkin kromatogram.....	27
Şekil III.13 Standart I'e ilişkin kromatogram.....	27
Şekil III.14 Standart T'e ilişkin kromatogram.....	27
Şekil III.15 I'in kolona aşırı yüklenmesi ile elde edilen kromatogram.....	28
Şekil III.16 T'in kolona aşırı yüklenmesi ile elde edilen kromatogram.....	29
Şekil III.17 I ve T'in hızlandırılmış bozundurma çalışmalarından elde edilen kromatogramlar.....	31
Şekil III.18 İndigotin'e ilişkin dedektör sinyalinin konsantrasyona karşı grafiği....	33
Şekil III.19 Tartazin'e ilişkin dedektör sinyalinin konsantrasyona karşı grafiği.....	35

TABLO LİSTESİ

SAYFA NO

Tablo III.1. Hızlandırılmış bozundurma çalışmalarında uygulanan deney protokolü.....	16
Tablo III.2. Hareketli faz I ile dereceli elüsyon.....	20
Tablo III.3. Hareketli faz II' nin farklı oranlarında I ve birinci safsızlığı ile T'e ait k', T, R değerleri.....	23
Tablo III.4. Örnek I, II, III, IV'ün enjeksiyonundan alınan kromatogramlarda I ve birinci safsızlığı ile T'e ait k', T, R değerleri.....	25
Tablo III.5. I'e ilişkin ölçü eğrisinde elde edilen pik alan değerleri.....	32
Tablo III.6. I için ölçü eğrisinden elde edilen doğruların eğim, kayım ve r^2 değerleri.....	33
Tablo III.7. T'e ilişkin ölçü eğrisinde elde edilen pik alan değerleri.....	34
Tablo III.8. T için ölçü eğrisinden elde edilen doğruların eğim, kayım ve r^2 değerleri.....	34
Tablo III.9. I ve T İçeren karışımdan geri kazanım testi sonuçları.....	36
Tablo III.10. I ve T'in miktar tayini sonuçları.....	37
Tablo III.11. Tablo III.10'daki miktar tayini sonuçlarının geri kazanım ile tekrar değerlendirilmesi.....	37

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ

I.1. GİRİŞ

Gıdalara, çekici ve iştah açıcı hale getirmek için yüzyıllardır doğal ve sentetik boya maddeleri katılmaktadır. Her ne kadar son yıllarda gıda renklendiricilerinin kullanımı güvenilirlik nedenleri ile azaltılmış olsa da, çeşitli sentetik gıda renklendiricileri hala dünyanın birçok yerinde ucuz, etkili ve stabil olduğu için doğal boyalar yerine kullanılmaktadır. Çok sayıda sentetik boya potansiyel olarak zehirli olduğundan kullanımları resmi kurumlarca sınırlanmıştır. Bu boyalar tek başına ya da çoğunlukla farklı tonlar elde etmek için karışım halinde kullanılmaktadır.

Gün geçtikçe gerek boya maddelerinin izin verilen limitler içinde olup olmadığının kontrolü, gerekse yasaklananların bulunup bulunmadığının tayini için yüksek duyarlılıkta yöntemlere ihtiyaç artmaktadır. [1-2]

Tartrazin ve İndigotin için çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda ayrı ayrı ve diğer boyalarla birlikte miktar tayini yöntemleri ve çeşitli ticari ürünlerde tayinleri rapor edilmiştir.

Tartrazin ve İndigotin'in diğer boyalarla birlikte yanyana tayini için literatürde yalnızca bir HPLC yöntemi verilmiştir [1]. Buna karşın her ikisinin ayrı ayrı diğer boyalarla birlikte tayinine ilişkin çok sayıda miktar tayini yöntemi rapor edilmiştir. Bunlar Tartrazin için diğer boyalarla birlikte; 1. Türev ve Oran Spektrum-Zero Crossing Türev Yöntemi [3-4-5]; İndigotin için Vierordt's Metod ve Türev Spektrumu yöntemLeri [6]; Tartrazin ve İndigotin için ; 1. Türev ve Oran Spektrum-Zero Crossing Türev Yöntemi [7]; Kemometrik yöntemLerle: Tartrazine ve İndigotin diğer boyalarla birlikte Kısmi Küçük Kareler (PLS) ve Temel Bileşen

Regresyon (PCR) yöntemleri [8]; Tartrazin diğer bazı boyar maddelerle birlikte eş zamanlı olarak PLS ve PCR yöntemleri [9-10], Tartrazin, Sunset Yellow, Amaranth, Newcoccine [11]; Amaranth, İndigotin, New Red, Poncea 4R, Sunset Yellow, Tartrazin, AlluraRed Anyon Değiştirici HPLC [12] ile tayin edilmiştir. Buna karşın Türkiye’de konuya ilişkin çalışmalar çok sınırlıdır [6]. Bu sebeple gerek boya maddelerinin izin verilen limitler içinde olup olmadığının kontrolü, gerekse temel safsızlıklarının belirlenmesi açısından bu çalışma önem taşımaktadır.

Bu çalışmada yer alan Tartrazin (E102) renkli içecek, tatlı, reçel, tahıl, konserve ve hazır çorbalarda kullanılmaktadır. Çocuklarda kurdeşen, (FDA’nın tahmini 1/10.000) astım krizi ve hiperaktivite gibi bazı hastalıklara neden olduğu ileri sürülmektedir. Avrupa Birliği ülkelerinden Norveç ve Avusturya’da yasaklanmıştır. (www.foodag.com)

Öte yandan sentetik kömür katranı türevi olduğu bilinen İndigotin (E132) yaygın olarak tablet ve kapsüllere eklenmekte ve birçok gıdada renklendirici olarak kullanılmaktadır. İndigotin için bulantı, kusma, yüksek tansiyon, deri döküntüsü ve alerjik reaksiyonlar yan etki olarak bildirilmiştir.(www.foodag.com) İndigotin’in kullanımı Norveç ‘te yasaklanmıştır. Buna karşın, hayvan denemelerinde teratojenik ve karsinojenik etkisi saptanmamıştır. [13-14] Son zamanlarda yapılan bir çalışmada ise, P450 redüktaz ile reaksiyonu sonucu süperoksit radikal oluşturduğu ve bu radikalin lipid peroksidasyon nedeniyle yağ zarlarında hasara neden olabileceği bildirilmiştir. [15]

I.2. AMAÇ

Bu çalışmada Türkiye’de pazarda bulunan bazı gıdalarda boya olarak kullanılan Tartrazin E(102) ve İndigotin’in E(132) Ters Fazlı-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC) yöntemi ile Diod Dizi Dedektör kullanılarak tayini yapıp, kullanılan yöntem ve yöntemin doğrulanması (validasyon) konusunda deneyim kazanılması amaçlanmıştır.

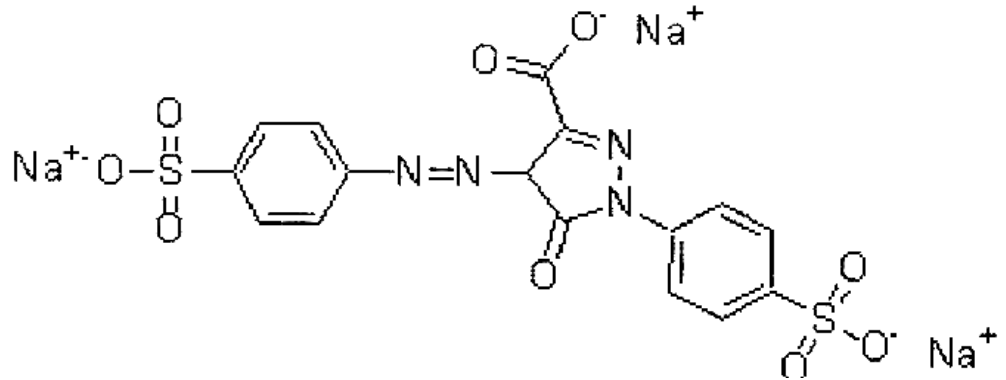
Bu çalışmada M. Gonzalez ve arkadaşlarının çalışması [1] temel alınarak, kullanılan yöntem kesinlik, doğruluk, özgünlük, sağlamlık ve geri kazanım açısından doğrulanacaktır. Pazarda bulunan bazı içeceklerde Tartrazin E(102) ve İndigotin’in E(132) Türk Gıda Tebliğinde belirtilen limitler içinde olup olmadığı saptanacaktır. [2]

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

II.1. TARTRAZİN

II.1.1. Özellikleri



Şekil II.1. Tartrazin'in açık formülü

Tartrazin : Trisodyum 5-hidroksi-1-(4-sülfanato-fenil)-4-(4-sülfanatofenilazo)-H-prizol-3-karboksilat (sodyum tuzu), E102, [16-17]

Kapalı formülü : $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$

Molekül Ağırlığı : 534,37 g / mol

λ_{max} : 425 nm suda

Erime Noktası : 300 °C

Rengi : Açık Turuncu

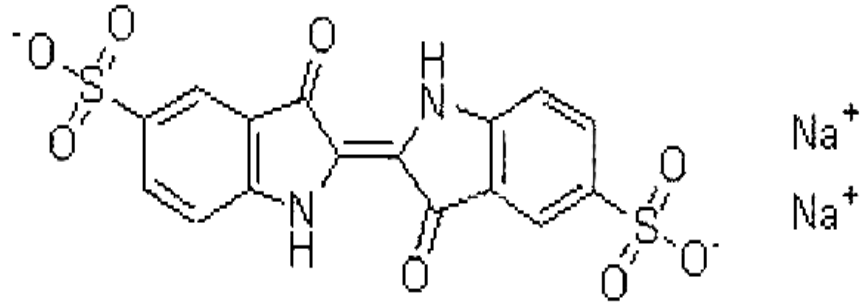
Çözünürlüğü : 300 mg /mL H_2O
0,8 mg /mL EtOH [16-17]

II.1.2. Kullanım Alanları

Yün, ipek, naylon, deri ve kağıt boyamada, mürekkep hazırlanmasında, sabun ve kazein plastik boyanmasında kullanılır. Yüksek saflıktaki formu gıda boyası olarak kullanılır. Ayrıca hayvan histolojisinde kontrast boya olarak kullanılır. [16-17]

II.2. İNDİGOTİN

II.2.1. Özellikleri



Şekil II.2. İndigotin'in açık formülü

İndigotin : 3,3' dioksi-2,2'bi-indoliliden-5,5'sodyum disülfonat
(di sülfonik asit sodyum tuzu) E132, İndigocarmine [16-17]

Kapalı formülü : $C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$

Molekül Ağırlığı : 466,36g / mol

λ_{max} : 608 nm suda

Erime Noktası : 325 °C

Rengi : Koyu Mavi

Çözünürlüğü : 3 mg /mL H₂O

3 mg /mL EtOH [16,17]

II.2.2. Kullanım Alanları

Tekstil boyası olarak yaygın bir şekilde kullanılmaz. Plazma için kontrast boyası olarak kullanılır. [16,17]

II.3. YÖNTEM DOĞRULAMASI (VALIDASYON)

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

Doğrulamanın yapılması gereken durumlar:

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

Analitik Yöntem Parametreleri:

- Özgünlük (Specificity)
- Doğrusallık (Linearity)
- Konsantrasyon aralığı (Range)
- Doğruluk (Accuracy)
- Kesinlik (Precision)
 - Gün içinde tekrarlanabilirlik (Repeatability)
 - Günler arası tekrarlanabilirlik (Intermediate Precision)
 - Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik (Reproducibility)
- Dedeksiyon limiti (Dedektion Limit –LOD)
- Kantitatif tayin limiti (Quantitation Limit-LOQ)
- Sağlamlık (Robustness)
- Sistem uygunluk testi (System Suitability Testing)

II.3.1. Özgünlük

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

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

II.3.2. Doğrusallık

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

II.3.3. Konsantrasyon Aralığı

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

II.3.4. Doğruluk

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

- a) Standart ile karşılaştırma: Analiz edilecek madde karışık bir matriks içinde değilse bu yöntemden yararlanılır. Saf standart madde sağlayan kuruluşlardan analiz maddesinin standardı satın alınır. Farklı tartımla hazırlanmış en az 3 farklı konsantrasyondaki çözeltilerden 3 defa ölçüm yapılır, çıkan sonuçlar başka bir yöntemle elde edilen sonuçlarla kıyaslanır ve rapor edilir.
- b) Geri kazanım: Analiz edilecek madde karışık bir matriks içinde ise bu yöntemden yararlanılır. Placebo hazırlanır ve etken maddesinin % 50, 75, 100, 125, 150 ‘ sini içeren konsantrasyonlarda çözelti hazırlanır ve geri kazanım hesaplanır.
- c) Standart katma yöntemi: Analiz edilecek madde karışık bir matriks içinde ise ve matriks hazırlamak imkansız ya da çok zorsa bu yöntem tercih edilir.

Sonuçlar % olarak veya belirli bir güven aralığında bulunan değer in gerçek değerden farkı şeklinde ifade edilir.

II.3.5. Kesinlik

Üçe ayrılır:

- a) Gün içi tekrarlanabilirlik: Metodun kısa bir zaman içerisinde aynı uygulama koşullarındaki kesinliğidir. %100 konsantrasyonda hazırlanan tek bir örneğin en az 10 defa enjeksiyonu yapılır veya yöntemin sınırları içerisinde alınan 3 konsantrasyondan 3'er enjeksiyon yapılır. Pik alanı veya pik yüksekliği değerlerinin bağıl standart sapması hesaplanır.
- b) Günler arası tekrarlanabilirlik: Yöntemin farklı analizciyle, farklı cihazda, farklı günlerde uygulanmasıdır.
- c) Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik: Farklı laboratuvarlarda yöntemin uygulanmasıdır.

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

II.3.6. Deteksiyon Limiti

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

- a) Görsel değerlendirmeye dayanan yöntem: Genellikle enstrümantal olmayan miktar tayini yönteminde kullanılır. Örneğin bilinen konsantrasyonları hazırlanır ve güvenilir bir şekilde ölçülebileceği minimum konsantrasyon bulunur.
- b) Sinyal/Gürültü oranına dayanan yöntem: Düşük konsantrasyonda hazırlanan örnek çözeltisiyle elde edilen sinyalin baseline gürültüsüne oranı 3:1 olmalıdır.
- c) Kalibrasyon eğrisinden yararlanarak istatistiksel hesaplamalara dayanan yöntem.

II.3.7. Kantitatif Tayin Limiti

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

- a) Görsel değerlendirmeye dayanan yöntem: Genellikle enstrümantal olmayan miktar tayini yönteminde kullanılır. Örneğin bilinen konsantrasyonları hazırlanır ve doğru ve kesin olarak tayin edilebildiği minimum konsantrasyon hesaplanır.
- b) Sinyal/Gürültü oranına dayanan yöntem: Düşük konsantrasyonda hazırlanan örnek çözeltisiyle elde edilen sinyalin baseline gürültüsüne oranı 10:1 olmalıdır.
- c) Kalibrasyon eğrisinden yararlanarak istatistiksel hesaplamalara dayanan yöntem

II.3.8. Sağlık

Yöntem parametreleri üzerinde kasıtlı olarak değişiklik yapıldığında, sonuçların ne kadar etkilendiğinin saptanması amacıyla yapılan testtir.

Sıvı kromatografi yönteminde aşağıdaki değişiklikler yapılabilir:

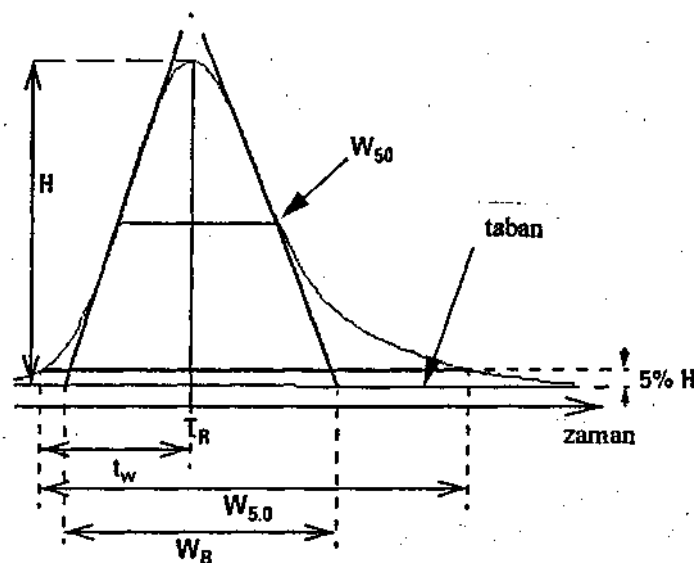
- Hareketli fazın pH'sı
- Hareketli faz bileşeni
- Farklı kolon (farklı lot numaralı veya farklı firmadan)
- Sıcaklık
- Akış hızı

II.3.9. Sistem Uygunluk Testleri

Bu testler, analiz edilecek örneğe, analitik uygulamaya, kullanılan cihaza bağlı olarak geliştirilen testlerdir. HPLC yönteminde USP 26'ya göre uygulanması gereken sistem uygunluk parametreleri kapasite faktörü (k'), kolon ayırma gücü (R), pik kuyruklanma faktörü (T), RSD tekrarlanan enjeksiyonların bağıl standart sapmasıdır. k' 1-5 arasında (18), $R > 2$ (19), $T = 1$ (20) $RSD \leq 20$ (20) olmalıdır.

II.4. PİK ÖZELLİKLERİNE İLİŞKİN PARAMETRELER

(20)



II.4.1. Kapasite Faktörü

k' : Kapasite faktörü, T_0 : Ölü zaman, T_R : Pik alıkonma zamanı olmak üzere,

$$k' = \frac{T_R - T_0}{T_0}$$

formülüyle hesaplanır.

II.4.2. Kuyruklanma Faktörü

T : Kuyruklanma faktörü, $W_{5,0}$: Ölçülen pik yüksekliği değerinin % 5'indeki pik genişliği (dk), t_w : Ölçülen pik yüksekliği değerinin % 5'inde, pik başlangıç zamanı ile alıkonma zamanı arasındaki fark olmak üzere,

$$T = \frac{W_{5,0}}{2t_w}$$

formülüyle hesaplanır.

II.4.3. Ayırma Gücü

R : Ayırma gücü, T_1 : 1. pike ait akkoruna zamanı, T_2 : 2. pike ait alıkonma zamanı, W_1 : 1. pike ait pik genişliği değerleri (dk), W_2 : 2. pike ait pik genişliği değerleri (dk) ve $T_1 < T_2$ olmak üzere,

$$R = \frac{2(T_2 - T_1)}{W_1 + W_2}$$

II.5. KULLANILAN İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER (21)

II.5.1. Standart Sapma (SD)

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

II.5.2. Bağlı Standart Sapma (Varyasyon Katsayısı, RSD)

$$RSD = 100 \frac{s}{\bar{x}}$$

II.5.3. En Küçük Kareler Yöntemi

Konsantrasyona karşı dedektör cevabı grafiği çizilerek hazırlanan ölçü eğrisinde en küçük kareler yöntemiyle elde edilen doğrunun denklemi aşağıdaki formüllerle hesaplanır:

Doğrunun eğimi
$$: b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

Doğrunun kayım değeri
$$: a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$y = ax + b$ denkleminde hesaplanan a ve b değerleri yerine koyularak doğru denklemi bulunur.

Korelasyon katsayısı :
$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\left\{ \left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{1/2}}$$

olarak hesaplanır.

II.5.4. Ortalamanın Güven Aralığı

$$\bar{x} \pm t_{n-1} \times s / \sqrt{n}$$

II.5.5. İki Ortalamanın Karşılaştırılması

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

BÖLÜM III

TEZ ÇALIŞMALARI

III.1. GEREÇ VE YÖNTEM

III.1.1. Kimyasal Maddeler

Indigocarmine [(3,3'dioksi-2,2'bi-indoliliden-5.5'sodyum disülfonat (disülfonik asit sodyum tuzu)], Tartrazine [(Trisodyum 5 -hidroksi- 1-(4-sülfanato-fenil)-4-(4-sulfanatofenilazo)-H-prizol-3-karboksilat (sodyum tuzu)] İlsan İlaç San A.Ş. ve Soyiğit Baharat A.Ş.'den temin edilmiştir. Asetonitril (HPLC saflıkta) Riedel-deHaen, Asetik asit Merck, TBAHS (Tetrabutylamonyum hidrojen sülfat) Sigma, CTMAB (Setiltrimetil amonyum bromür) Merck firmalarından satın alınmıştır.

III.1.2. Gereçler

HPLC sisteminde Agilent 1100 model pompa, Agilent 1100 model dedektör, Agilent 1100 model gaz uzaklaştırıcı, Rheodyne 7725i model enjeksiyon sistemi, 50µL'lik loop, Luna ODS-2 RP- C18(2) (5µ m, 4.6 ×250 mm i.d.) özellikte kolon kullanılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde Agilent Chemsitation bilgisayar sistemi kullanılmıştır. Hareketli fazın süzülmesi için AFO-0502 0.45µm, 45mm

naylon filtreler örneklerin sisteme enjeksiyonu için 500µL 'lık hamilton enjektör kullanılmıştır.

Tartımlar için Shimadzu AEX –220G terazi, pH ölçümleri için mettler Toledo MP 220 Ph metre ve elektrodu kullanılmıştır. pH metre kalibrasyonu için WTW pH:4,00 ve pH:7,00 tampon çözeltileri kullanılmıştır.

Spektrofotometrik ölçümler için Shimadzu 2100S model spektrofotometre, 1cm geçiş yollu kuartz küvetler kullanılmıştır. Genex beta 50µL ve Eppendorf 1000 µL'lik pipetler, LC 30 Model ultrasonic banyo, distile su için GFL 2004 ve Millipore Q-RG cihazları kullanılmıştır. Çözeltilerin hazırlanmasında Ikamag Rh magnetik karıştırıcı, gezi kazanım çalışmaları sırasında örneğin süzülmesi sırasında Watmann mavi bantlı süzgeç kağıdı kullanılmıştır. Volumetrik kaplar oda sıcaklığında distile su ile kalibre edildi.

III.1.3. Çözeltiler

III.1.3.1. Hareketli Fazlar

Hareketli Faz I

Çözücü A: 0.29 g CTMAB tartılıp 450mL ACN de çözülerek bidistile su ile 1 L ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda (Ikamag Rh) 15 dakika karıştırıldıktan sonra süzülerek hazır hale getirildi. Çözücü B: ACN

Hareketli Faz II

Çözücü A: 6 m mol TBAHS için 2.0372 g TBAHS tartılıp bidistile su ile 1 L ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda (Ikamag Rh) 15 dakika karıştırıldıktan sonra süzülerek hazır hale getirildi. Çözücü B: ACN (A/B : 60:40)

Hareketli Faz III

Çözücü A: 6 m mol TBAHS için 2.0372 g TBAHS tartılıp bidistile su ile 1 L ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda (Ikamag Rh) 15 dakika karıştırıldıktan sonra süzülerek hazır hale getirildi. Çözücü B: ACN (A/B : 57:43)

III.1.3.2. Tampon Çözeltiler

Tampon çözelti I

0.1 M Ac / NaAc tamponu (pH:4,7): 5.8 mL glacial asetik asit alınarak bidistile su ile 1 L ye tamamlandı. NaAc için 13.6 g NaAc tartılarak bidistile su ile 1 L ye tamamlandı. 440 mL asetik asit ve 560 mL sodyum asetat çözeltileri karıştırılarak pH: 4.7 olan tampon hazırlandı.

Tampon çözelti II

0.3 M Ac / NaAc tamponu (pH:4,7): 17.4 mL glacial asetik asit alınarak bidistile su ile 1 L ye tamamlandı. Sodyum asetat için 40.8 g sodyum asetat tartılarak bidistile su ile 1 L ye tamamlandı. 440 mL asetik asit ve 560 mL sodyum asetat çözeltileri karıştırılarak pH: 4.7 olan tampon hazırlandı.

III.1.3.3. Stok Çözeltiler

Her bir stok ve seyreltilmiş çözelti taze olarak hazırlanmıştır.

Stok çözeltiler: 0.011g Tartrazine ve 0,011 g İndigotin tartılarak ayrı ayrı 10 mL lik balon jodede su ile çözündürülmüştür.

III.1.3.4. Örnek Hazırlama

Örnek çözelti I:

1. Seyreltme: Stok çözeltilerinden alınan 2,5 mL Tartrazin ve 2.5 mL İndigotin ayrı ayrı 10 mL lik balon jojelere alınıp su ile seyreltilmiştir.
2. Seyreltme: 1mL Tartrazine ve 1mL İndigotin ayrı ayrı 10 mL lik balon jojelere alınarak 0.1 M Asetik asit / Sodyum Asetat (pH:4.7) tamponu ile hacmi 10 mL ye tamamlanmıştır.

Örnek çözelti II:

1. Seyreltme: Stok çözeltilerinden alınan 1 mL Tartrazin ve 1 mL İndigotine 10 mL lik balon jojeye alınıp su ile seyreltilmiştir.
2. Seyreltme: 1mL Tartrazine ve 1mL İndigotin alınarak 0.1 M Asetik asit / Sodyum Asetat (pH:4.7) tamponu ile hacmi 10 mL ye tamamlanmıştır

Örnek çözelti III:

1. Seyreltme: Stok çözeltilerinden alınan 1 mL Tartrazin ve 1 mL İndigotine 10 mL lik balon jojeye alınıp su ile seyreltilmiştir.
2. Seyreltme: 1mL Tartrazine ve 1mL İndigotin alınarak 0.3 M Asetik asit / Sodyum Asetat (pH:4.7) tamponu ile hacmi 10 mL ye tamamlanmıştır

III.1.3.5. Hızlandırılmış Bozundurma Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

İndigotin ve Tartrazin stok çözeltilerinden 5 mL alınarak üzerlerine Tablo. III.1 'de verilen test çözeltilerinden 5'er mL ilave edilir. Tabloda gösterilen deney protokolü uygulanır.

III.1.4. Kromatografik Koşullar

Kapasite faktörü hesaplamalarında kullanılmak üzere kolonda alıkonmayan madde olarak 0.3 M asetat tamponu çözelti piklerinden biri seçildi. HPLC sisteminde çalışma koşulları aşağıdaki gibidir.

Hareketli faz	: 6 mM TBAHS çözeltisi / ACN ; A / B
Kolon	: Luna ODS-2 RP- C18(2) (5µ m, 4.6 ×250 mm i.d.)
Dedektör	: DAD 258 nm (band genişliği: 4nm)
İzokritik elüsyon	: A:57 B:43
Akış Hızı	: 1 mL / dak.
Enjeksiyon hacmi	: 50 µL
Basınç	: 138 bar

Tablo III.1. Hızlandırılmış bozundurma çalışmalarında uygulanan deney protokolü

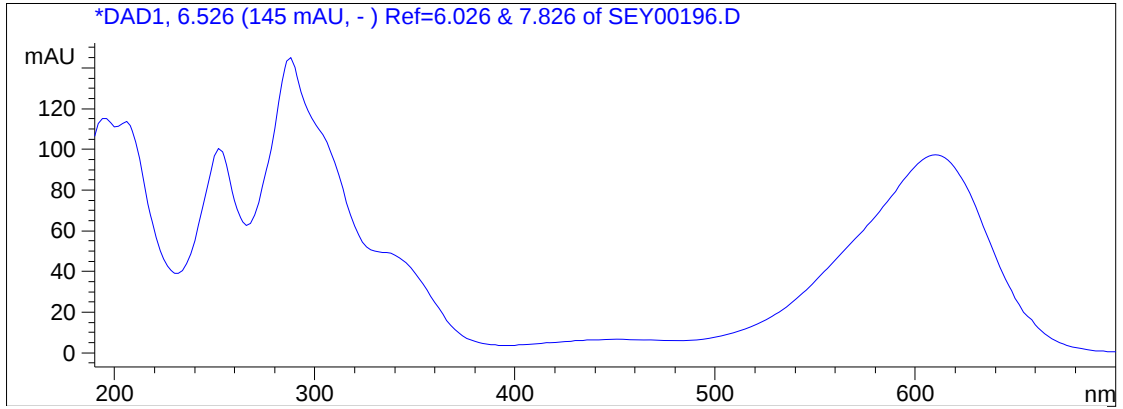
Deney No	Alınacak stok çözelti (mL)	Eklenecek test çözeltisi (5 mL)	Deney şartları	Deney Süresi (saat)	Deney sonrası uygulanan işlemler
1	5 mL	0,5 N HCl	80 °C' de ısıtma	4	4mL örnek alınır > Soğutulur > 2 mL NaOH ilave edilir > 0,3 M asetat tamponu ile 10 mL'ye tamamlanır.
2	5 mL	0,5 N NaOH	80 °C' de ısıtma	4	4mL örnek alınır > Soğutulur > 2 mL HCl ilave edilir > 0,3 M asetat tamponu ile 10 mL'ye tamamlanır.
3	5 mL	Su	80 °C' de ısıtma	4	4mL örnek alınır > Soğutulur > 0,3 M asetat tamponu ile 10 mL'ye tamamlanır.
4	5 mL	%3 H ₂ O ₂	80 °C' de ısıtma	4	4mL örnek alınır > Soğutulur > 0,3 M asetat tamponu ile 10 mL'ye tamamlanır.

III.2. BULGULAR

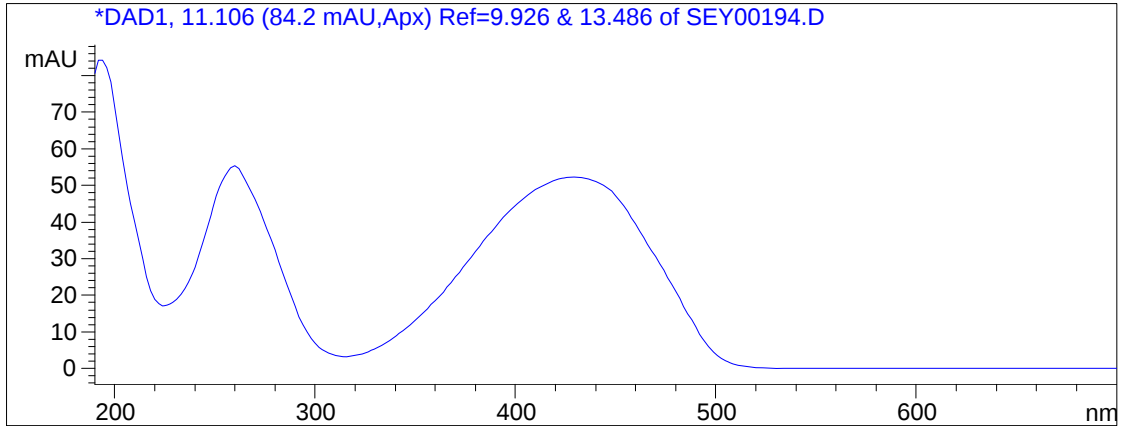
III.2.1. Ön Denemeler

III.2.1.1. Spektrofotometrik Çalışmalar

İndigotin ve Tartrazin'e ilişkin alınan spektrumlar Şekil III.1. ve Şekil III.2' de verilmiştir.

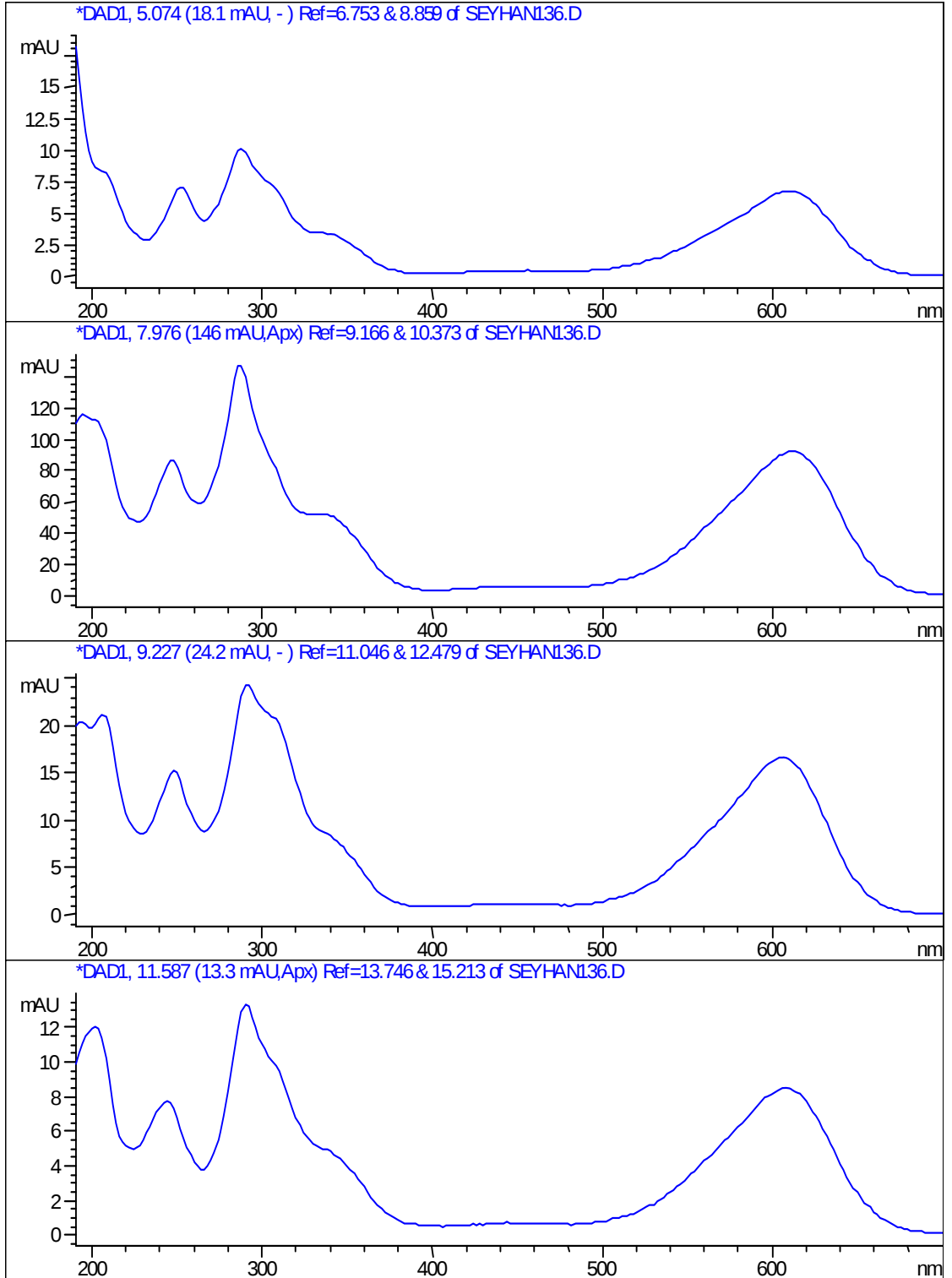


Şekil III.1. İngidotin'in (I) 0.3 M Asetik asit/Sodyum Asetat (pH:4.7) tamponundaki absorbsiyon spektrumu ($C_I = 2,35 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$)



Şekil III.2. Tartrazin'in (T) 0.3 M Asetik asit/Sodyum Asetat (pH:4.7) tamponundaki absorbsiyon spektrumu ($C_T = 2,05 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$)

I'nin safsızlıklarına ait spektrumlar Şekil III.3'de verilmiştir.



Şekil III.3. 0.3 M Asetik asit / Sodyum Asetat (pH:4.7) tamponundaki I'nin sırasıyla birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü safsızlıklarına ait absorpsiyon spektrumu ($C_1=2,35 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $\lambda=610 \text{ nm}$)

III.2.1.2. Kromatografik Çalışmalar

Kromatografik yöntemler seçicilik ve duyarlılık bakımından spektrofotometrik yöntemlerden üstündür. Ayrıca sentetik boya maddelerinin saflığının yüksek olmaması; ışık ve ısıya dayanıksızlıkları, toksik olmaları nedeniyle daha duyarlı yöntemlerle tayinleri son yıllarda önem kazanmıştır. İndigotin ve Tartrazin'in de aralarında bulunduğu çok sayıda doğal ve sentetik boyanın yan yana analizi Ön-Taramalı DAD-HPLC iyon çifti yöntemi ile tayin edilmiştir [1].

Başlangıç olarak M. Gonzalez ve arkadaşlarının çalışması [1] temel alınmıştır. Bu çalışmanın kromatografik koşulları aşağıda verilmiştir:

Hareketli Faz : Su (0,29g / L CTMAB) Orto fosforik asit ile pH = 5,5: ACN

Dedektör : SPD M6A UV-DAD

Kolon : Luna ODS-2 RP- C18 (5µ m, 15 cm × 4.6 mm i.d.)

Dereceli Elüsyon : ACN %45 - %65 (0 dak.-6,5 dak.)

Akış Hızı : 2 mL / dak.

M. Gonzalez ve arkadaşlarının çalışması [1] temel alınarak aşağıdaki koşullarda çalışılmıştır.

Kromatografik koşullar:

Hareketli faz : A: 0.29 g CTMAB 450 mL ACN' de çözöldü.550 mL su ilave edildi. B: ACN (Hareketli faz I)

Kolon : Luna ODS-2 RP- C18(2) (5µ m, 4.6 ×250 mm i.d.)

Dedektör : DAD (band genişliği: 4nm)

Dereceli Elüsyon : A: %60 B:%40 (5dak.-17dak.)

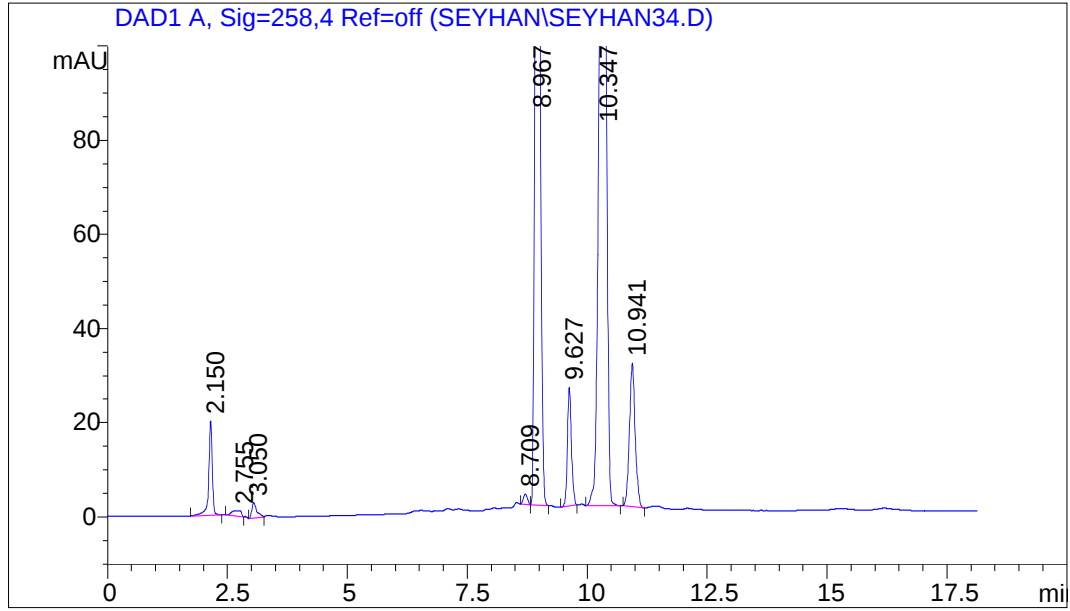
Akış Hızı : 1 mL / dak.

Bu koşullar altında yapılan ön denemeler sonucu çalışılan maddelerin alıkonma zamanlarının uzun olduğu gözlenmiştir. Bunun sebebinin kullanılan iyon çifti oluşturucu madde CTMAB 'nin uzun lipofilik zinciri olduğu düşünölmüştür. Ayrıca CTMAB ile C18 kolonun lipofilik zinciri arasında kurulması gereken denge 48 saatte bile kurulamamıştır. Tablo 2'de görölen dereceli elüsyon uygulamasına rağmen alıkonma zamanlarının uzun ve tekrarlanabilir sonuçlar alınmadığı gözlenmiştir.

Tablo III.2. Hareketli faz I ile dereceli elüsyon

Zaman (dk.)	% A	% B
0	60	0
5	60	40
17	60	40
18	60	0

Şekil III.4, Şekil III.5, Şekil III.6 ve Şekil III.7 incelendiğinde piyasada ürünü bulunan gıda firmasından temin edilen I ve T boyalarının 48 saat ara ile enjeksiyonundan elde edilen kromatogramlarda alıkonma zamanları arasındaki farklılıklar görülmektedir.



Şekil III.4. Gıda Firmasından temin edilen I ve safsızlıklarına ilişkin kromatogram $C_1: 5.896 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$

Kromatografik koşullar:

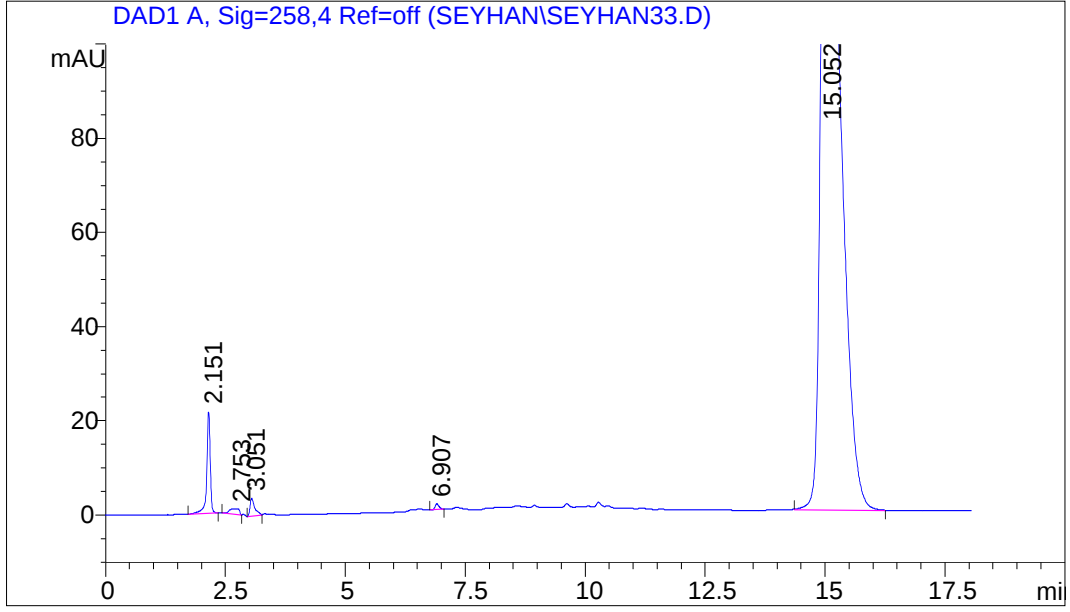
Hareketli faz : (0.29 g CTMAB 450 mL ACN +550 mL Su) / ACN; A/B

Kolon : Luna ODS-2 RP- C18(2) ($5\mu\text{m}$, $4.6 \times 250 \text{ mm i.d.}$)

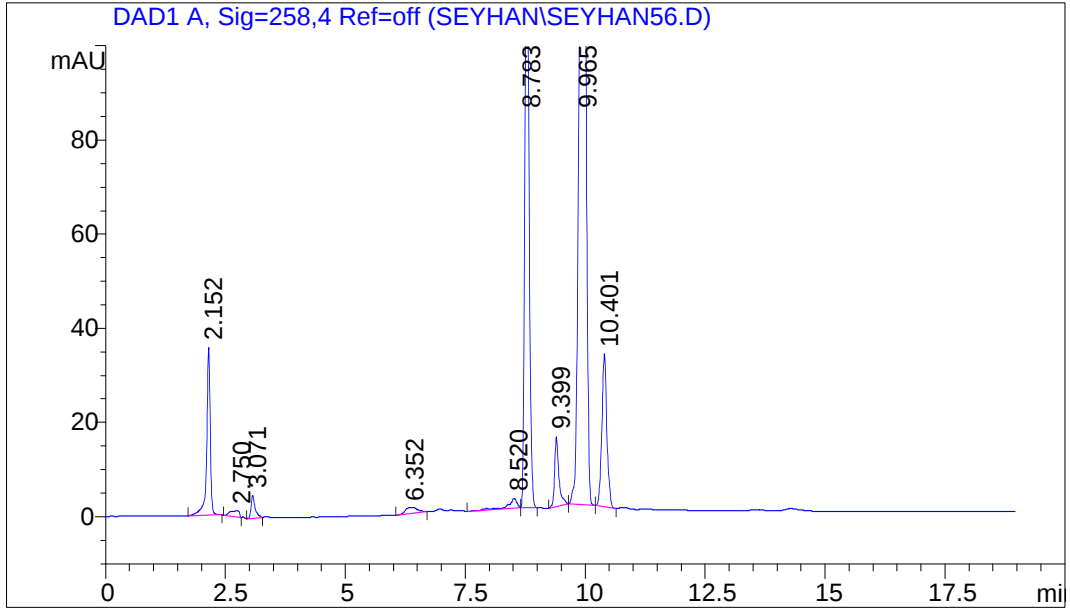
Dedektör : DAD 258 nm (band genişliği: 4nm)

Dereceli Elüsyon : A: %60 B:%40 (5dak.-17dak.)

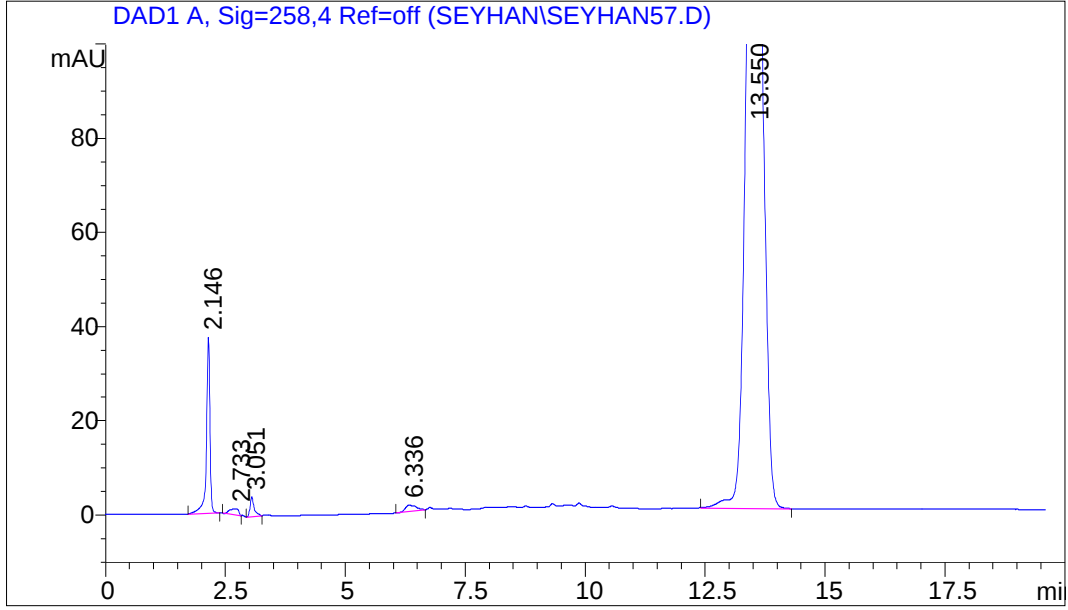
Akış Hızı : 1 mL / dak.



Şekil III.5.Gıda Firmasından temin edilen T'e ilişkin kromatogram $C_T : 5.125 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ Kromatografik koşullar Şekil III.4'deki gibidir.



Şekil III.6. Gıda Firmasından temin edilen I ve safsızlıklarına ilişkin kromatogram (48 saat sonra) $C_I : 5.896 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ Kromatografik koşullar, Şekil III.4'deki gibidir.



Şekil III.7. Gıda Firmasından temin edilen T'e ilişkin kromatogram (48 saat sonra) $C_T : 5.125 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ Kromatografik koşullar, Şekil III.4'deki gibidir.

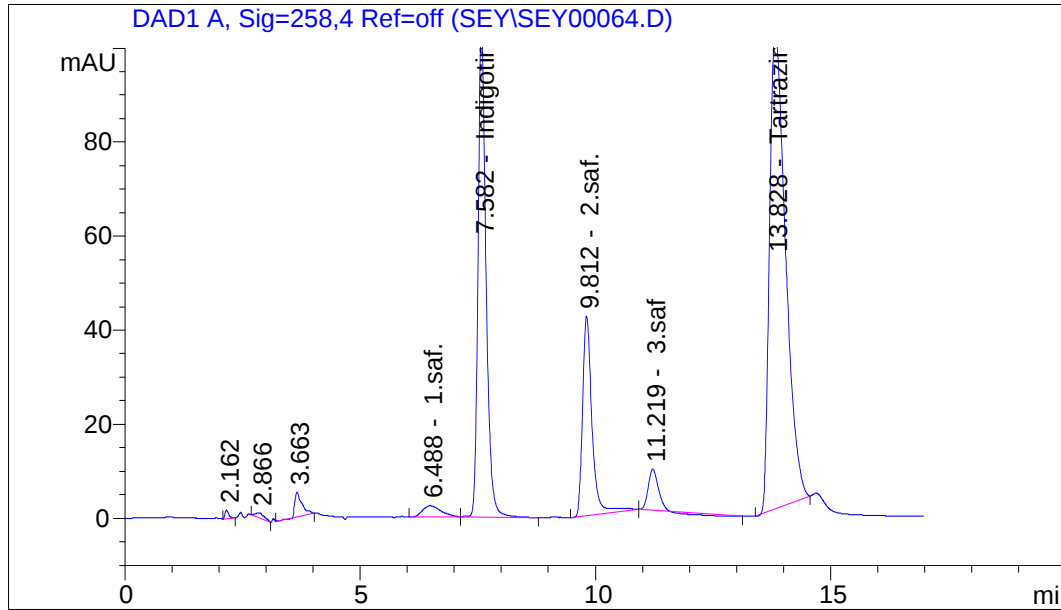
Şekil III.4, Şekil III.5, Şekil III.6, ve Şekil III.7 incelendiğinde;

- İndigotin'e ait birden fazla pik gözlenmiştir
- İndigotin piklerinin alıkonma zamanlarının uzun olması, kantitatif analiz için ayırma gücünün (resolusyon) düşük olması ve tekrarlanabilir olmaması açısından uygun değildir. (Şekil III.4 ve Şekil III.6)
- Tatrazine ait alıkonma zamanının uzun olduğu ve tekrarlanabilirlik sorunun devam ettiği gözlenmiştir. (Şekil III.5 ve Şekil III.7)

III.2.1.2.a. Hareketli Faza Tetrabutyl Amonyumhidrojensülfat ilavesi ile Yapılan Çalışmalar:

Elde edilen bu kromatogramlar yukarıda belirtilen nedenlerle istenilen sonuçları vermemiştir. M.Gonzalez ve arkadaşlarının çalışması terk edilerek başka bir iyon çifti oluşturmucu madde kullanılmıştır. Zincirinin daha kısa ve düz olmasının ayırma gücünü arttıracığı düşünülerek Tetrabutyl amonyumhidrojensülfat (TBAHS) seçildi. Hareketli faz olarak A : 6 mM TBAHS'ın sudaki çözeltisi ve B: ACN; A/B:60:40 oranında kullanıldı. (Hareketli faz II) Dereceli elüsyona gerek olmadan I ve safsızlıkların birbirinden etkin bir şekilde ayrıldığı gözlemlendi. Şekil-10'da bu koşullarda I ve T karışımının enjeksiyonundan elde edilen kromatogram görülmektedir. Toplam analiz süresi aynı olmakla birlikte

ana madde pikleri ve safsızlıklar birbirinden daha önceki sisteme göre daha iyi ayrılmıştır.



Şekil III.8. Gıda Firmasından temin edilen I ve T'e ilişkin kromatogram $C_I : 2,35 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $C_T : 2,05 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ Örnek Çözeltisi: 0.1 M Asetik asit / Sodyum Asetat (pH:4.7) tamponu

Kromatografik koşullar:

Hareketli faz : 6 mM TBAHS / ACN ; A / B

Kolon : Luna ODS-2 RP- C18(2) ($5\mu\text{m}$, $4.6 \times 250 \text{ mm i.d.}$)

Dedektör : DAD 258 nm (band genişliği: 4nm)

İzokritik elüsyon : A: 60 B:40 Akış Hızı : 1 mL / dak.

Alıkonma zamanlarını kısaltmak amacıyla hareketli faz II oranları Tablo III.3' deki gibi değiştirildi.

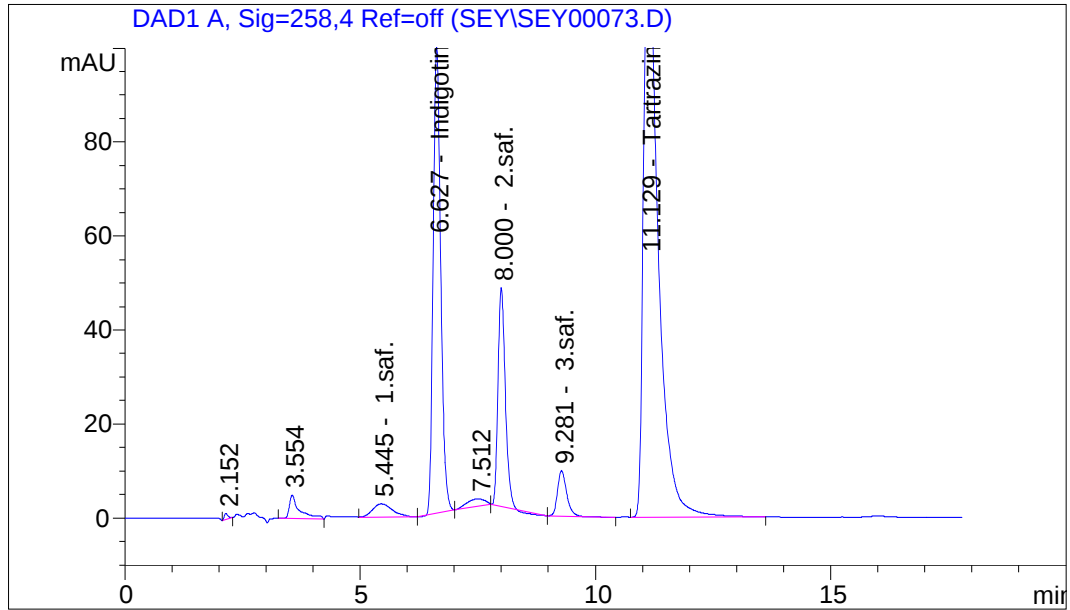
Tablo III.3. Hareketli faz II' nin farklı oranlarında I ve birinci safsızlığı ile T'e ait k' , T_R değerleri.

Hareketli Faz II Oranı	Birinci Safsızlık (S)			İndigotin (I)			$R^{(*)}$ S / I	Tartrazin (T)	
	k'	T_R	T	k'	T_R	T		k'	T_R
60:40	2.016	6.487	1.436	2.503	7.581	1.287	1.603	5.43	13.826
59:41	1.85	6.151	1.490	2.36	7.257	1.264	1.610	4.98	12.874
58:42	1,69	5.805	1.438	2.22	6.944	1.243	1.618	4.57	11.987
57:43	1.532	5.444	1.352	2.08	6.626	1.233	1.611	4.14	11.127
55:45	1.80	6.041		1.95	6.347	1.309	1.218	3.72	10.150

(*) İndigotin'e ait birinci safsızlık piki ile İndigotin ana pikinin resolüsyonuna ait değerler.

Tablo III.3 'deki sonuçlar incelendiğinde, çalışılan hareketli faz oranları arasında I'e ait birinci safsızlık ile I piki arasında ayrılma faktörü, kapasite faktörü değerleri açısından anlamlı bir fark yoktur. Analiz süresinin kısalığı bakımından optimum

hareketli faz 57:43 (hareketli faz III) seçilmiştir. Bu koşullarda alınan I ve safsızlıkları ile T'in birlikte enjeksiyonuna ait kromatogram Şekil III.9'da verilmiştir.



Şekil III.9. Gıda Firmasından temin edilen I ve T'e ilişkin kromatogram $C_I : 2,35 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $C_T : 2,05 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ Örnek Çözeltisi: 0.1 M Asetik asit / Sodyum Asetat (pH:4.7) tamponu

Kromatografik koşullar:

Hareketli faz : 6 mM TBAHS / ACN ; A / B
Kolon : Luna ODS-2 RP- C18(2) (5 μ m, 4.6 $\times$ 250 mm i.d.)
Dedektör : DAD 258 nm (band genişliği: 4nm)
İzokritik elüsyon : A: 57 B:43
Akış Hızı : 1 mL / dak.

Miktar tayini çalışmalarının gerçekleştirildiği kromatografik koşullar aşağıdaki gibidir.

Kromatografik koşullar:

Hareketli faz : 6 mM TBAHS / ACN ; A / B
Kolon : Luna ODS-2 RP- C18(2) (5 μ m, 4.6 $\times$ 250 mm i.d.)
Dedektör : DAD (band genişliği: 4nm)
İzokritik elüsyon : A: 57 B:43
Akış Hızı : 1 mL / dak

Bundan sonraki aşamada sadece örnek çözeltisinin (enjeksiyon çözeltisi) hazırlanmasında değişiklik yapılmıştır.

III.2.1.2.b. Örnek (Enjeksiyon) Çözeltilisinin Hazırlanması ve Pik Parametrelerinin Geliştirilmesi

Kantitatif analize uygun olmayan I'e ve T'e ait pik parametreleri aşağıda verilmiştir. (Tablo III.3)

I'e ait pik parametreleri

Kapasite faktörü (k') : 2.08

Kuyruklanma faktörü (T_I) : 1.233

Ayırma faktörü ($R_{S/I}$) : 1,611

T'e ait pik parametreleri

Kapasite faktörü (k') : 4.14

Kuyruklanma faktörü (T_I) : 1.858 ($R>2$ (19), $T=1$ (20))

Yukardaki değerleri kantitatif analize uygun duruma getirmek için II.1.3.4'de belirtilen 2. seyreltmelerde sırasıyla aşağıdaki çözücüler kullanılmıştır.

Örnek I : Çözücü: hareketli faz III

Örnek II : Çözücü: bidistile su

Örnek III : Çözücü: 0.1 M Ac / NaAc tamponu

Örnek IV : Çözücü: 0.3 M Ac / NaAc tamponu

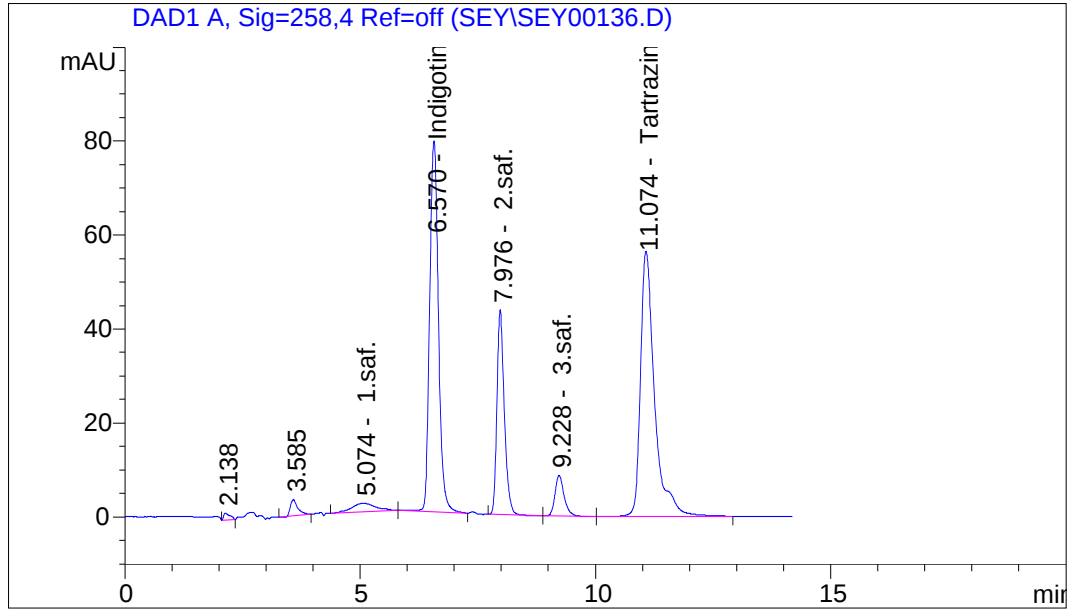
Tablo III.4. Örnek I, II, III, IV'ün enjeksiyonundan alınan kromatogramlarda I ve birinci safsızlığı ile T'e ait k' , T , R değerleri.

Örnek Çözeltilisi	Birinci Safsızlık (S)			İndigotin (I)			Tartrazin (T)			$R^{(*)}$ S / I
	k'	T_R	T	k'	T_R	T	k'	T_R	T	
Örnek I	-----	-----	-----	2.152	6.731	1.475	4.407	11.550	2.444	-----
Örnek II	-----	-----	-----	2.174	6.781	1.452	4.452	11.647	2.394	-----
Örnek III	1.532	5.444	1.352	2.081	6.626	1.233	4.142	11.127	1.858	1,611
Örnek IV	1.375	5.074	1.163	2.076	6.571	1.154	4.184	11.074	1.487	2.127

(*) İndigotin'e ait birinci safsızlık piki ile İndigotin ana pikinin resolüsyonuna ait değerler.

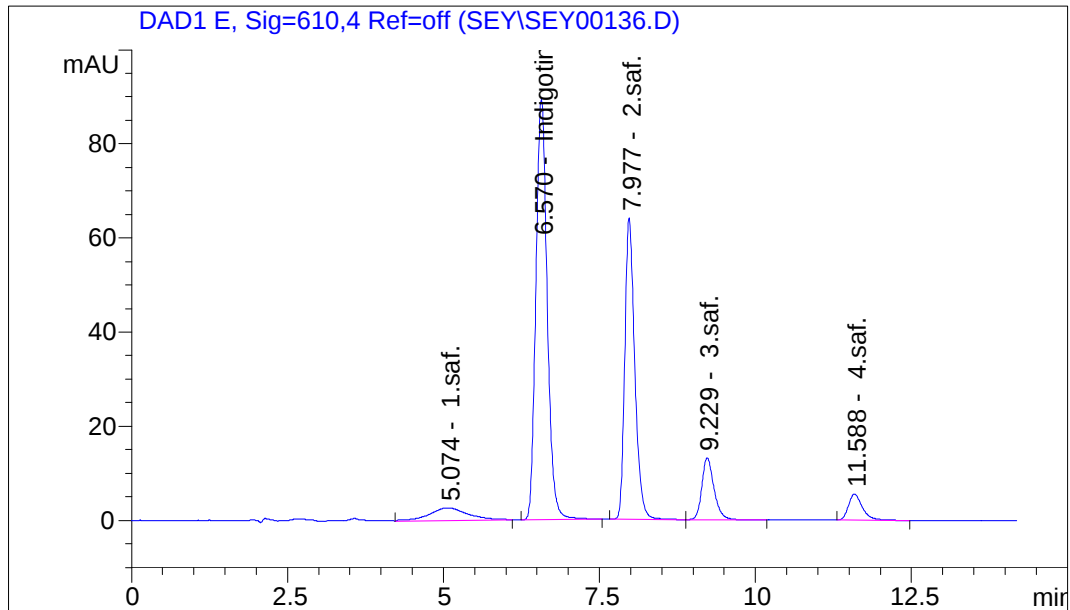
Tablo III.4'de görüldüğü gibi çözücüsü farklı örnek çözeltilerinin enjeksiyonu sonucunda ayırma faktörü ($R_{S/I}$) ve kuyruklanma faktörü (T_I) değerlerinde kalitatif analiz açısından anlamlı farklar gözlenmiştir. Örnek IV ile analiz için en uygun pik

parametreleri elde edilmiştir. Örnek IV çözeltisine ait gıda firmasından temin edilen I ve T'e ilişkin kromatogram Şekil III.10, Şekil III.11 ve Şekil III.12'de verilmiştir.

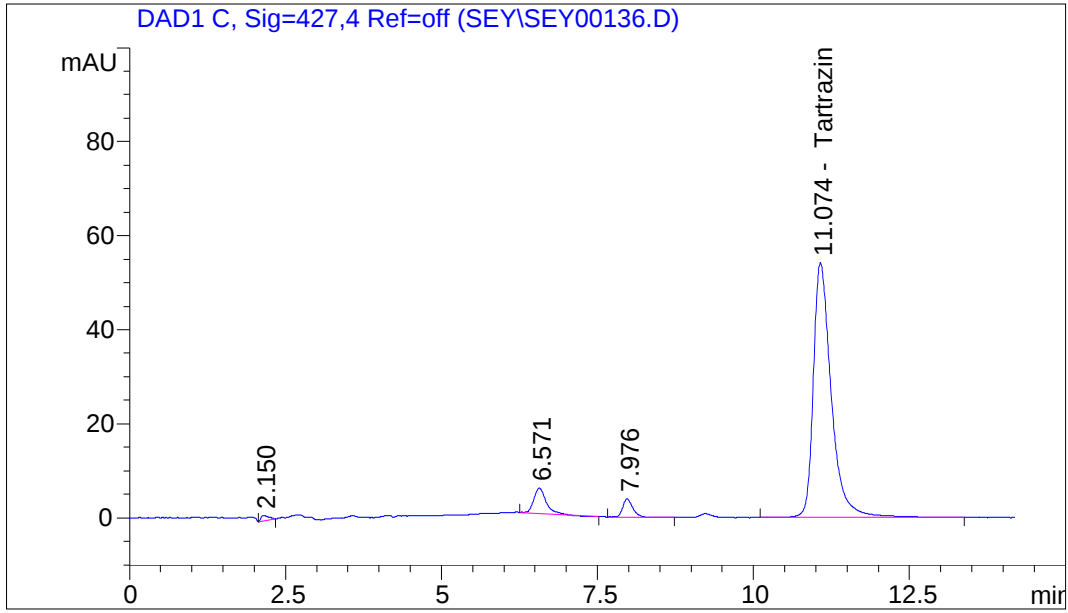


Şekil III.10. Gıda Firmasından temin edilen I ve T'e ilişkin kromatogram $C_I : 2,35 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $C_T : 2,05 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ Örnek Çözeltisi: 0.3 M Asetik asit / Sodyum Asetat (pH:4.7) tamponu Kromatografik koşullar:

Hareketli faz : 6 mM TBAHS / ACN ; A / B
Kolon : Luna ODS-2 RP- C18(2) ($5\mu\text{m}$, $4.6 \times 250 \text{ mm i.d.}$)
Dedektör : DAD 258 nm (band genişliği: 4nm)
İzokritik elüsyon : A: 57 B:43
Akış Hızı : 1 mL / dak.

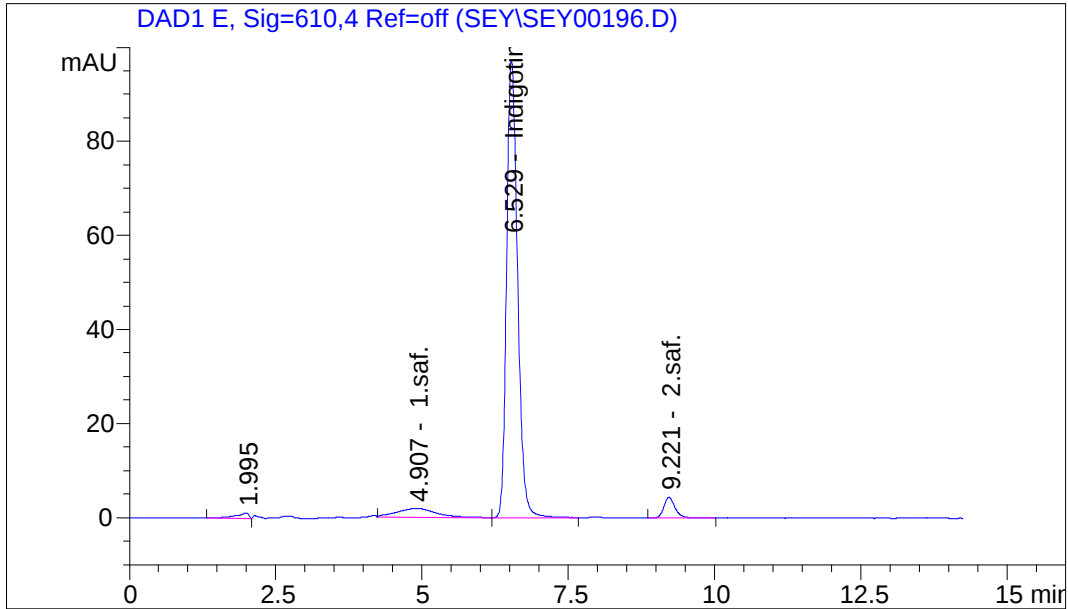


Şekil III.11. Gıda Firmasından temin edilen I'e ilişkin kromatogram $C_I : 2,35 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ Örnek Çözeltisi: 0.3 M Asetik asit / Sodyum Asetat (pH:4.7) tamponu Kromatografik koşullar Şekil III.10'daki gibidir. Kuyruklanma faktörü: 1,154 $\lambda = 610 \text{ nm}$ (band genişliği: 4nm)

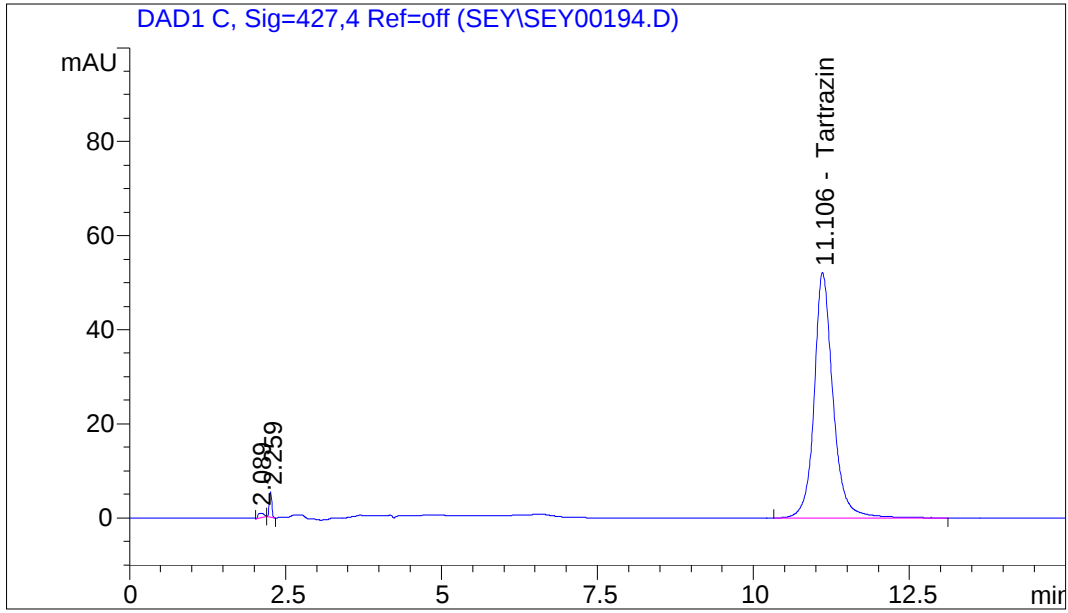


Şekil III.12. Gıda Firmasından temin edilen T'e ilişkin kromatogram $C_T : 2,05 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$
 Örnek Çözeltisi: 0.3 M Asetik asit / Sodyum Asetat (pH:4.7) tamponu
 Kromatografik koşullar Şekil III.10'daki gibidir. Kuyruklanma faktörü: 1,487
 $\lambda = 427 \text{ nm}$ (band genişliği: 4nm)

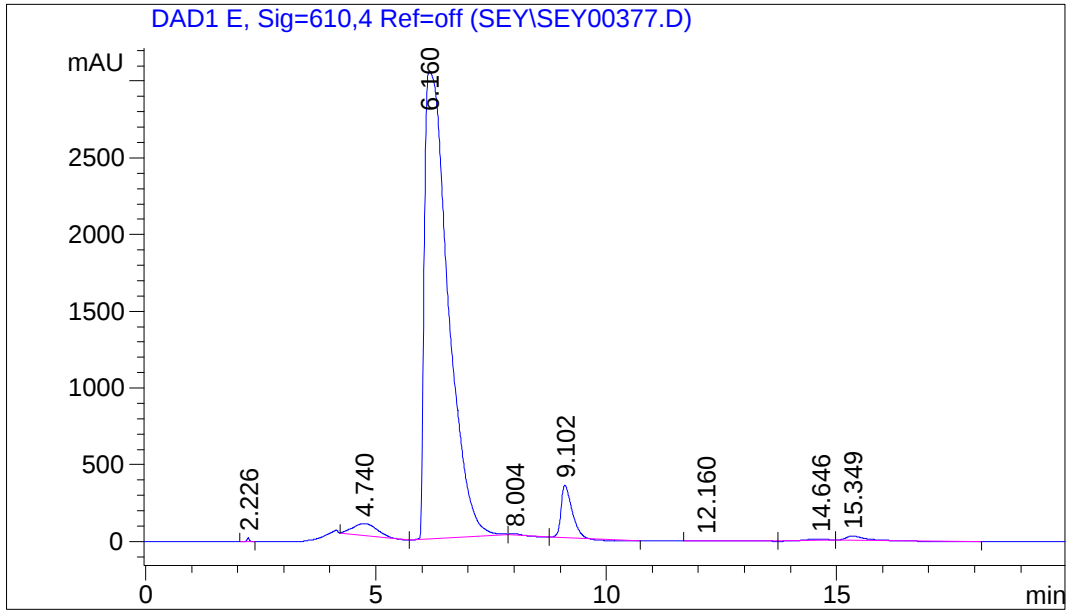
Indigotin ve Tartrazin'in standartlarına ilişkin kromatogram Şekil III.13, Şekil III.14' de sisteme aşırı miktarda yüklenen I ve T 'e ait kromatogram Şekil III.15 ve Şekil III.16 'da verilmiştir.



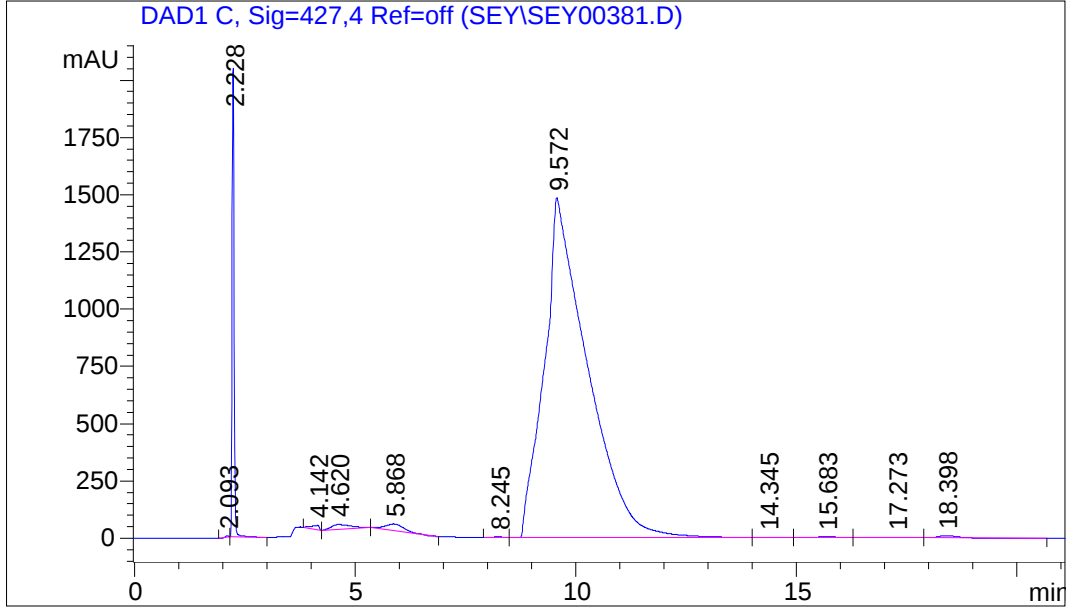
Şekil III.13. Standart I'e ilişkin kromatogram $C_I : 2,35 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$
 Örnek Çözeltisi: 0.3 M Asetik asit / Sodyum Asetat (pH:4.7) tamponu
 Kromatografik koşullar:
 Hareketli faz : 6 mM TBAHS / ACN; A / B
 Kolon : Luna ODS-2 RP- C18(2) ($5\mu\text{m}$, $4.6 \times 250 \text{ mm i.d.}$)
 Dedektör : DAD 610 nm (band genişliği: 4nm)
 İzokritik elüsyon : A: 57 B:43
 Akış Hızı : 1 mL / dak. Kuyruklanma faktörü: 1,246



Şekil III.14. Standart T'e ilişkin kromatogram $C_T : 2,05 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$
 Örnek Çözeltisi: 0.3 M Asetik asit / Sodyum Asetat (pH:4.7) tamponu
 Kromatografik koşullar Şekil III.13'deki gibidir. Kuyruklanma faktörü: 1,168
 $\lambda = 427 \text{ nm}$ (band genişliği: 4nm)



Şekil III.15. I'in kolona aşırı yüklenmesi ile elde edilen kromatogram $C_I : 2,35 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$
 Örnek Çözeltisi: 0.3 M Asetik asit / Sodyum Asetat (pH:4.7) tamponu
 Kromatografik koşullar Şekil III.13'deki gibidir.
 $\lambda = 610 \text{ nm}$ (band genişliği: 4nm)



Şekil III.16. T'in kolona aşırı yüklenmesi ile elde edilen kromatogram $C_1 : 2,05 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$
Örnek Çözeltisi: 0.3 M Asetik asit / Sodyum Asetat (pH:4.7) tamponu
Kromatografik koşullar Şekil III.13'deki gibidir.
 $\lambda = 427 \text{ nm}$ (band genişliği: 4nm)

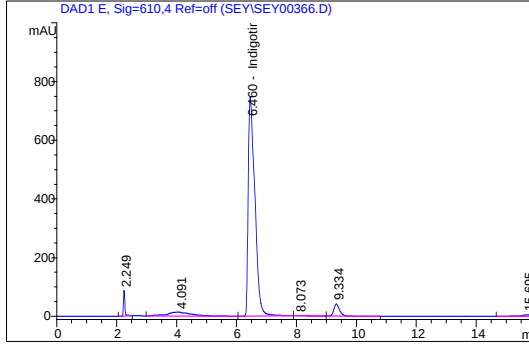
III.3. GELİŞTİRİLEN TAYİN YÖNTEMİNİN DOĞRULANMASI (VALİDASYONU)

Analitik yöntem doğrulama parametrelerinin gerektirdiği doğruluk, kesinlik (tekrarlanabilirlik), özgünlük, doğrusallık, konsantrasyon aralığı, sağlamlık ve sistem uygunluk testleri uygulandı.

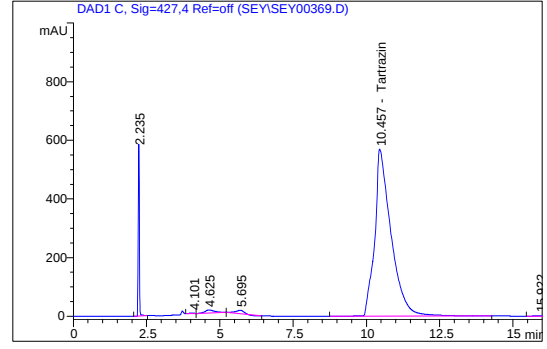
III.3.1. Yöntemin Özgünlüğünün Belirlenmesi

Şekil III.10, Şekil III.11, Şekil III.12’de İndigotin ve Tartrazin’in birlikte analizi ile safsızlıklarından kantitatif açıdan uygun olarak ayrıldığı gösterilmiştir. Bu sisteme ait k' , T, R değerleri Tablo III.4’de verilmiştir.

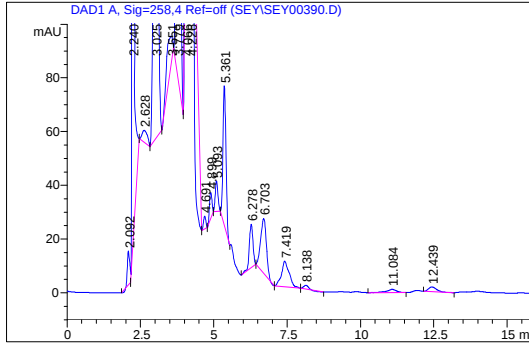
Bu test ayrıca hızlandırılmış bozunma çalışmaları ile desteklenmiştir. [22] Bu çalışmalarda indigotin ve Tartrazin’in stok çözelti kimyasal ve fiziksel stres koşullarına maruz bırakılmış [23] ve daha sonra mevcut HPLC sistemine enjekte edilerek oluşan bozunma ürünlerinin ana madde pikleri ile girişim yapıp yapmadığı, I ve safsızlıkları ile T piklerinin homojenitesi sisteme bağlı olan DAD de yardımıyla incelenmiştir. Bu çalışmalarda kullanılan deney protokolü Tablo III.1’de verilen yönteme göre hazırlanmıştır. Sonuçlar Şekil III.17’de verilmiştir.



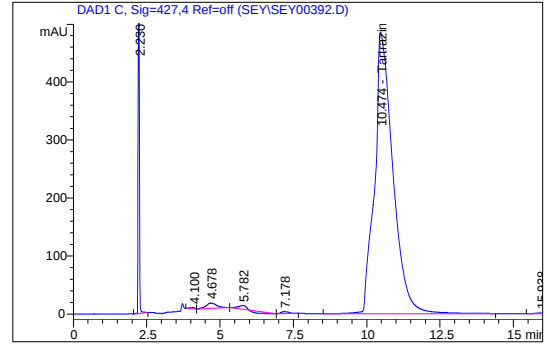
(a) HCl / 80 °C



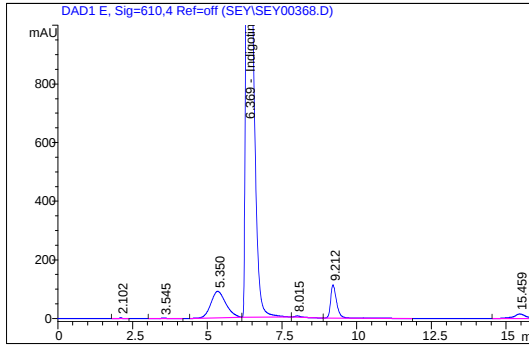
(b) HCl / 80 °C



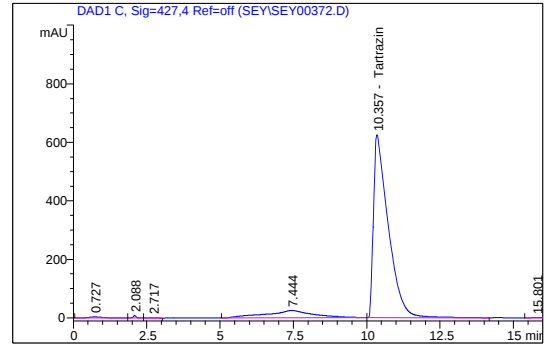
(c) NaOH / 80 °C



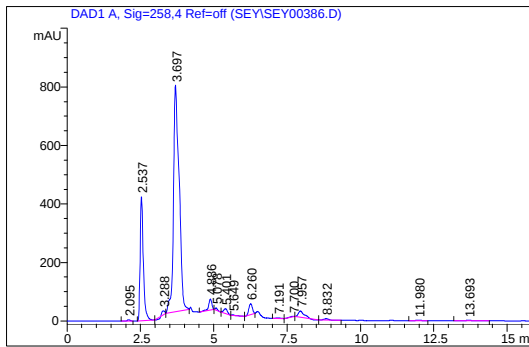
(d) NaOH / 80 °C



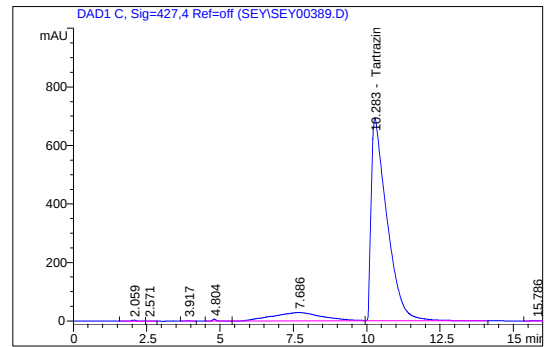
(e) Su / 80 °C



(f) Su / 80 °C



(g) H₂O₂ / 80 °C



(h) H₂O₂ / 80 °C

Şekil III.17. I ve T' in hızlandırılmış bozundurma çalışmalarından elde edilen kromatogramlar (Deney protokolü Tablo III.1'de verilmiştir.)

III.3.2. Yöntemin Doğrusallığının Belirlenmesi

III.3.2.1. İndigotin'in ölçü eğrisinin doğrusallığının belirlenmesi

Bölüm III.1.3.3' de anlatıldığı gibi hazırlanan İndigotin stok çözeltisinden ($C=2.35 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) 1 mL İndigotin alınarak 10 mL'lik balon jode su ile seyreltildi. Bu çözeltiden alınan 100, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 μL 10 mL'lik balon jojelere aktarıldı. Herbir balon joje hacmi 0.3 M Asetik asit / Sodyum Asetat (pH:4.7) tamponu ile 10 mL ye tamamlandı. Hazırlanan örnekler 3'er defa sisteme enjekte edildi. Her bir konsantrasyon değerine karşılık gelen İndigotin pik alan değerleri grafiğe geçirildi. Çalışma farklı günlerde 3 defa tekrarlandı.

A_1, A_2, A_3 : Her bir konsantrasyon için yapılan 3 enjeksiyondan elde edilen pik alanı değerlerinin ortalaması

A_0 : A değerlerinin ortalaması

Tablo III.5. İndigotin'e ilişkin ölçü eğrisinde elde edilen pik alan değerleri

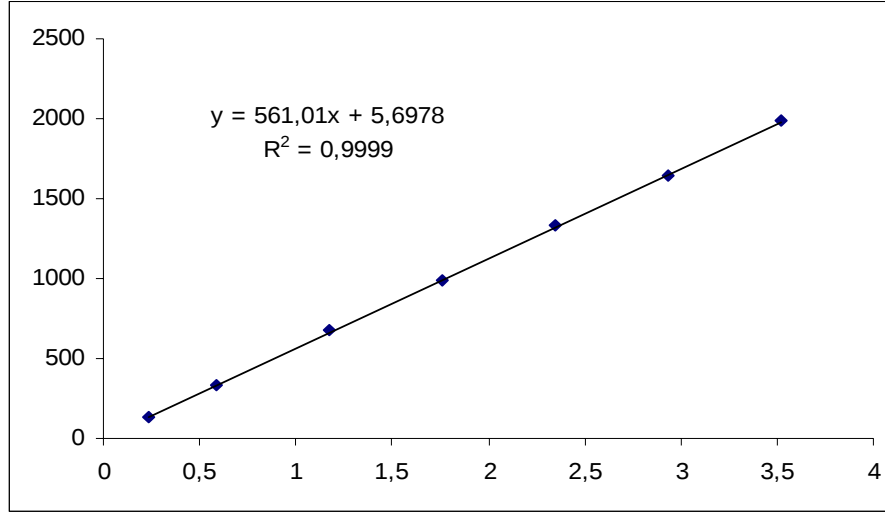
ÖRNEK NO	$C \times 10^{-5}$	A_1	A_2	A_3	A_0	SD	RSD
1	0,235	141,0818	130,22	134,2675	135,1898	4,48	3,31
2	0,5875	325,1973	319,068	331,0937	325,1137	4,9	1,51
3	1,175	683,4004	660,6373	680,8323	674,9567	10,17	1,5
4	1,7625	980,329	970,419	1009,043	986,5971	16,37	1,66
5	2,35	1339,813	1299,535	1352,745	1330,697	22,65	1,7
6	2,9375	1642,887	1620,528	1677,646	1643,02	23,58	1,43
7	3,525	1989,08	1984,839	1992,019	1988,646	2,94	0,14

En küçük kareler yöntemiyle elde edilen doğruların regresyon analizi yapıldı. Doğru denklemi $y = bx + a$ (a: kayım b: eğim), korelasyon katsayısının karesi r^2 olarak ifade edildi.

Tablo III.6. İndigotin için ölçü eğrisinden elde edilen doğruların eğim, kayım ve r^2 değerleri

	1	2	3	SD	RSD
a	6,4982	5,9183	6,003	0,3132	5,1011
b	561,25	550,54	567,56	8,6042	1,5370
r^2	0,9996	0,9999	0,9998		

Konsantrasyona karşı ortalama alan değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğru denklemi $y = 561,01x + 5,5978$, korelasyon katsayısının karesi $r^2 = 0,9999$ olarak bulundu.



Şekil III.18. İndigotin'e ilişkin dedektör sinyalinin konsantrasyona karşı grafiği

III.3.2.2. Tartrazin'in ölçü eğrisinin doğrusallığının belirlenmesi

Bölüm III.1.3.3' de anlatıldığı gibi hazırlanan Tartrazin stok çözeltisinden ($C=2.05 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) 1 mL Tartrazin alınarak 10 mL'lik balon jode su ile seyreltilti. Bu çözeltiden alınan 350, 1000, 1500, 2000, 2500, 3500 μL , 10 mL'lik balon jodelere aktarıldı. Herbir balon joje hacmi 0.3 M Asetik asit / Sodyum Asetat (pH:4.7) tamponu ile 10 mL ye tamamlandı. Hazırlanan örnekler 3'er defa sisteme enjekte edildi. Her bir konsantrasyon değerine karşılık gelen Tartrazin pik alan değerleri grafiğe geçirildi. Çalışma farklı günlerde 3 defa tekrarlandı.

Tablo III.7. Tartrazin'e ilişkin ölçü eğrisinde elde edilen pik alan değerleri

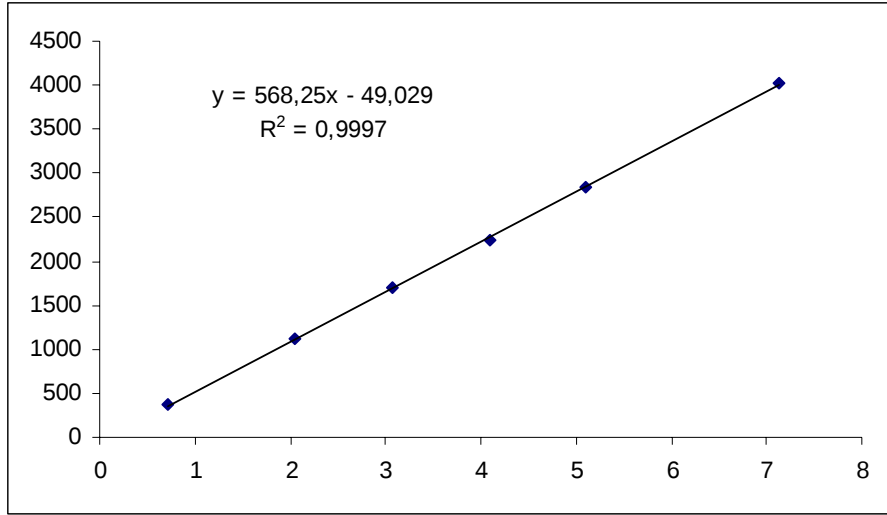
ÖRNEK NO	$C \times 10^{-5}$	A_1	A_2	A_3	A_0	SD	RSD
1	0,7175	355,5975	405,4096	394,5806	385,1959	22,8815	6,14
2	2,05	1081,256	1143,765	1146,686	1123,902	32,3695	2,88
3	3,075	1638,156	1701,971	1736,057	1692,061	43,9650	2,59
4	4,1	2213,176	2261,674	2268,149	2247,667	27,5634	1,22
5	5,1	2753,928	2845,051	2919,21	2839,396	72,3172	2,54
6	7,14	3899,504	4035,766	4163,757	4033,009	115,487	2,86

En küçük kareler yöntemiyle elde edilen doğruların regresyon analizi yapıldı. Doğru denklemi $y = bx + a$ (a: kayım b: eğim), korelasyon katsayısının karesi r^2 olarak ifade edildi.

Tablo III.8. Tartrazin için ölçü eğrisinden elde edilen doğruların eğim, kayım ve r^2 değerleri

	1	2	3	SD	RSD
a	-49,152	-45,153	-59,855	7,601	14,7
b	551,63	569,02	585,49	16,93	2,97
r^2	1	0,9997	0,9991		

Konsantrasyona karşı ortalama alan değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğru denklemi $y = 568,25x - 49,029$, korelasyon katsayısının karesi $r^2 = 0,9997$ olarak bulundu.



Şekil III.19. Tartrazin'e ilişkin dedektör sinyalinin konsantrasyona karşı grafiği

III.3.3. Yöntemin Çalışma Aralığının Belirlenmesi

İndigotin için $0,235 - 3,525 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ve Tartrazin için $0,71-7,14 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ konsantrasyon aralığında doğrusallık elde edilmiştir.

III.3.4. Dedeksiyon Limiti ve Kantitatif Tayin Limiti

İndigotin için dedeksiyon limiti $0,053 \times 10^{-5} \text{ M}$, kantitatif tayin limiti $0,176 \times 10^{-5} \text{ M}$, Tartrazin için dedeksiyon limiti $0,205 \times 10^{-5} \text{ M}$, kantitatif tayin limiti $0,682 \times 10^{-5} \text{ M}$ olarak bulunmuştur.

III.3.5. Yöntemin Doğruluğunun Belirlenmesi

Bu test geri kazanım çalışmaları ile gerçekleştirilmiştir. 137,478 g placebo ve 11mg İndigotin ile 11mg Tartrazin tartıldı ve porselen havanda homojen bir karışım oluncaya kadar karıştırıldı. Karışım 1000 mL'lik balon jöjeye alındı, 0.3 M Asetik asit / Sodyum Asetat (pH:4.7) tamponu ile hacme tamamlandı. 30 dak. magnetik karıştırıcıda karıştırıldı ve mavi bantlı süzgeç kağıdından vakumlu süzme ile iki kez süzüldü. Buradan alınan örnek kromatografik koşulları verilen sisteme enjekte edildi. Her enjeksiyon 3 defa tekrarlandı. 3 farklı tartım alınarak yapılan geri kazanım çalışmasına ait sonuçlar Tablo III.9'da verilmiştir.

Tablo III.9. I ve T İçeren karışımdan geri kazanım testi sonuçları

N	1.Analiz 11mg I ve 11mg T içeren karışımdan geri kazanım		2.Analiz 11mg I ve 11mg T içeren karışımdan geri kazanım		3.Analiz 11mg I ve 11mg T içeren karışımdan geri kazanım	
	% I	%T	% I	%T	% I	%T
1	79,14	84,09	81,02	84,05	84,33	86,36
I için $X_{ort.} : 81,49$ SD: 2,62 RSD: 3,21 T için $X_{ort.} : 84,83$ SD: 1,32 RSD: 1,56						

Sonuçlar incelendiğinde ortalama % geri kazanım değerleri İndigotin için % 79,1-84,3; Tartrazin için % 84,05-86,3 olarak bulunmuştur.

Geri kazanım testinin sonuçları % 95 güven sınırları içerisinde değerlendirildi.

$$X_{ort.} \pm t_{n-1} \times s / \sqrt{n}$$

formülünde $t_2=4,30$ alınarak güven sınırları hesaplandı.

İndigotin'in üç farklı analizi için;

$$81,49 \pm 4,30 \times 2,62 / \sqrt{3} = 81,49 \pm 6,51$$

Tartrazin'in üç farklı analizi için;

$$84,83 \pm 4,30 \times 1,32 / \sqrt{3} = 84,83 \pm 3,28$$

III.3.6. İndigotin ve Tartrazin'in Üründen Miktar Tayini

İndigotin ve Tartrazin'in birlikte bulunduğu üründen miktar tayini yapıldı. Bir miktar ürün alınarak porselen havanda toz haline getirildi. Buradan alınan 1,375g 10mL'lik balon jöjeye aktarıldı ve 0.3 M Asetik asit / Sodyum Asetat (pH:4.7) tamponu ile hacme tamamlandı. 30 dak. magnetik karıştırıcıda karıştırıldı ve mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü. Buradan alınan örnek kromatografik koşulları verilen sisteme enjekte edildi. Her enjeksiyon 3 defa tekrarlandı. 3 farklı tartım alınarak yapılan analiz sonuçları Tablo III.10'da verilmiştir.

Tablo III.10. I ve T'in miktar tayini sonuçları

	1. Analiz	2. Analiz	3. Analiz	X _{ort}
I	0,0630 mg	0,0621 mg	0,0646 mg	0,0632 mg
T	0,0948 mg	0,0950 mg	0,0945 mg	0,0947 mg

Doğruluk testinde 11 mg I üzerinden geri kazanım 8,96 mg, 11 mg T üzerinden geri kazanım 9,33 mg bulunduğu için Tablo III.10'daki bulgular geri kazanımla tekrar değerlendirilip Tablo III.11'da verilmiştir.

Tablo III.11. Tablo III.10'daki miktar tayini sonuçlarının geri kazanım ile tekrar değerlendirilmesi

	1. Analiz	2. Analiz	3. Analiz	X _{ort}
I	0,0773 mg	0,0762 mg	0,0792 mg	0,0775 mg
T	0,1117 mg	0,1119 mg	0,1113 mg	0,1116 mg

Tablo III.11 incelendiğinde 1,375g üründe 0,077 mg İndigotin ve 0,111 mg Tartrazin bulunmuştur. Bu değerler, İndigotin için 56,00 mg/kg, Tartrazin için 80,72 mg/kg olarak tayin edilmiştir.

III.3.7. Yöntemin Sağlamlığının Belirlenmesi

III.3.7.1. Hareketli Faz Bileşeninin pH sında Yapılan Değişiklik

6 mM T.B.A.H.S çözeltisi hazırlanışında çözeltinin pH sında ayarlama yapılmamış ve her hazırlanışta çözeltinin pH sınırının 2,25–2,35 (± 1) aralığında değiştiği ve sonuçların bu değişimden etkilenmediği saptanmıştır.

III.3.8. Sistem Uygunluk Testleri

USP XXVI'de verilen ayırma gücü (R),kuyruklanma faktörü (T), tekrarlanan enjeksiyonların bağıl standart sapması testleri metod geliştirme aşamasında kontrol altına alınmıştır.

BÖLÜM IV

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada İndigotin ve Tartrazin için iki her ikisinin birlikte kullanıldığı ürünlerde miktar tayinlerini yapmak, olası safsızlık ve katkı maddelerini saptamak üzere ters fazlı bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir.

HPLC sistemlerinde hareketli faza iyon çifti oluşturucu madde (IPA) eklenmesi analizin seçiciliği ve duyarlılığını artırmakta; ayrıca farklı IPA'lar kolayca değiştirilerek kullanılabildiği için üstünlük sağlamaktadır. Bu şekilde kolon değiştirerek yöntem geliştirme zorluğu da ortadan kalkabilmektedir. IPA içeren sistemlerde örnekle kromatografik sistem arasında iyonik etkileşimler yanısıra, apolar etkileşimler de rol oynamaktadır. Etkileşim türlerinin fazla olması seçiciliği artırmaktadır. Boyalar gibi safsızlığı ve katkı maddeleri çok olan karışımlar için tercih edilen kromatografik sistemlerdir.

Bu çalışmada IPA olarak 6 Mm TBHSO₄ kullanılmıştır. TBHSO₄'ün dallı zincirli olması muhtemelen ayırmanın etkinliğini artırmıştır. pH= 2.24 gibi düşük bir pH'da çalışılmıştır. Düşük pH bir yandan örneklerin olası oksidasyonu önlemiş; diğer yandan sülfonik asit gruplarının non-iyonize halde tutulmasını sağlamıştır.

Diod dizi dedektör görünür bölgedeki maksimum absorbansı 610 nm (I) olan I nin olası bozunma ürünleri ile girişim yapmadan tayinini mümkün kılmıştır. Nitekim, yaptığımız baz ve H₂O₂ ile yaptığımız hızlı bozundurma çalışmaları Indigotine ait 610 nm deki absorbansın çok düştüğünü (tezde verilmedi), buna karşın UV bölgede absorbansı olan ve pikleri gözlenen bozunma ürünlerinin oluştuğunu göstermiştir. (Şekil III.17 I. c ve g) Çalışmalar sonucunda I'ne ilişkin muhtemelen sentezinden gelen 2 safsızlık saptanmıştır. Bu maddeler İndigotinin yüksek konsantrasyonlarında bile bozundurma reaksiyonu sonucunda bir artış

göstermemektedir. (Şekil III.11 de 1. ve 3. safsızlık; Şekil III.13 de 1. ve 2. safsızlık olarak gösterilmiştir). Buna ilaveten Şekil III.11 de: “2. safsızlık ve 4. safsızlık” olarak belirtilen pikler ise standart boya maddesinde ve bozunma ürünlerinde gözlenmediği için katkı maddesi olduğu kanısına varılmıştır.

T için diod dizi dedektör kullanılması da girişimi büyük ölçüde bertaraf etmiştir. T’ne 258 nm de gözlenen girişim, (Şekil III.10 ve Şekil III.12) 427 nm’nin kullanması ile azalmıştır (Şekil III.3).

Indigotine ilişkin gerek safsızlık, gerek katkı maddelerinin absorpsiyon spektrumları birbirine çok benzerlik göstermektedir. Birbirine bu ölçüde yapısal benzerlik gösteren maddelerin ayrılması ancak HPLC ve IPA içeren bir sistemle sağlanabilmiştir (Şekil III.3).

Sonuç olarak, 24. sayfa Şekil III. 9 da belirtilen kromatografik koşullarda pik parametreleri iyileştirilmiş, safsızlık ve bozunma ürünleri gözönüne alınarak seçici bir ayrılma geliştirilmiştir. Buna karşın pik parametreleri kantitatif analize uygun bir hale getirilememiştir (Tablo III.3 ve Tablo III.4).

Bu çalışmada pik parametrelerinin geliştirilmesi için kolay ve pratik bir çözüm bulunmuştur. Enjeksiyon çözeltileri, farklı çözücü sistemleri ile seyreltilip sonuçlar gözlenmiştir. Bu çalışmaya ilişkin sonuçlar Tablo III.4 de verilmiştir (sayfa 25). Tablo incelendiğinde çözücüde yapılan değişikliğin pik parametreleri üzerine önemli bir etkisi olduğu görülecektir.

Enjeksiyon çözeltisinin son seyreltmesinde distile su ve hareketli faz kullanıldığında I’ne ilişkin 1. safsızlık kolonda tutunmakta; ancak 0.1 mol.L^{-1} sodyum asetat-asetik asit karışımı kullanıldığında (örnek III) elüe olmaktadır. Buna karşın aynı koşulda T’ye ilişkin kuyruklanma faktörü ise 1. 858 değeri ile analize elverişli değildir (Tablo III.4). Seyreltme çözücüsü olarak 0.3 mol.L^{-1} sodyum asetat-asetik asit karışımı (örnek IV) kullanıldığında ise; bu değer sürpriz bir şekilde 1,487 ye düşmektedir. Aynı koşulda I pikine ilişkin kuyruklanma faktörü 1,154 ; 1. safsızlık ile I arasındaki ayırma faktörü (R: S/I) ise 2,127 gibi kantitatif analize çok uygun bir değere gelmiştir (Tablo III.4).

IPA içeren ters-fazlı HPLC sistemlerde enjeksiyon çözeltisi çözücüsünün pik parametrelerine etkisi konusunda literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada bulunan sonuçlardan hareketle standart maddelerle sistematize çalışmalar yapılarak bazı genellemelere gitmek mümkün olabilir. Bu çalışmadan çıkarılacak sonucun, başka çalışmalarla da desteklenmesi gerekmektedir.

Kantitatif tayin sonuçlarına bakıldığında I ye ilişkin ölçü eğrisine ilişkin istatistiksel değerler, T ye ilişkin değerlerden daha analize daha elverişlidir (Tablo III. 6 ve Tablo III.8). Tartarazin ölçü eğrisi kayım değeri RSD si 14, 7 olması muhtemel bir safsızlık ve /veya alıkonma zamanının bağıl olarak uzun olması nedeniyle ortaya çıkan pik kuyruklanmasından kaynaklanmış olabilir.

Dedeksiyon limiti ve kantitatif tayin limitleri sırasıyla sinyal/ gürültü: 3/1 ve 10/1 oranları gözönüne alınarak saptanmıştır. Gürültünün az olması ve dolayısıyla tayin limitlerinin düşük olması yöntemin üstünlüğünü göstermektedir. Hareketli faza çok düşük bir konsantrasyonda (6 mM) TBHSO₄ 'dan başka maddenin katılmamış olması gürültüyü en az düzeye indirmiştir.

Geri kazanım sonuçlarının % 81,49 (I için) ve % 84,83 (T için) düzeylerinde çıkması analizini yaptığımız üründe gıdaya katılan boya maddesinin miktarının az olmasından (firmanın bildirdiği miktar) kaynaklanmıştır. Matriksten boyayı izole etme işlemi sırasında kayıplar olmuş, buna karşın sonuçlar tekrarlanabilir çıkmıştır (Tablo III.9).

Piyasada bulunan ürünün analizi sonucu iki farklı seride katkı maddeleri olan (2. safsızlık ve 4. safsızlık) ve olmayan iki farklı sonuç bulunmuştur.

Tezde verilen sonuçlar katkı maddelerine içermeyen seriye ilişkindir.

Gıda tüzüğünde izin verilen miktar 100 mg/L olarak bildirilmiştir. Bir bardakta 3 g ürün çözündürüldüğünü düşünürsek elde edilen sonuçlar I için 0,16 mg ve T için 0,24 mg değerine karşılık gelmektedir. Bulunan değerler Gıda tüzüğünde izin verilen miktarın altında olmakla birlikte, özellikle çocukların sıkça tükettiği içeceklerde bulunan bu boyaların yapısının tayini, safsızlık ve katkı maddelerine yönelik çalışmaların devam ettirilmesi, sağlık açısından etkilerinin ve tüketim miktarlarının belirlenmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Gonzalez, M.; Gallego, M.; Valcarcel, M.: Determination of Natural and Synthetic Colorants in Prescreened Dairy Samples Using Liquid Chromatography-Diode Array Detection, “*Analitica Chemistry Vol.75*” , Department of Analytical Chemistry, Campus De Rabanales, University of Cordoba, Cordoba, İspanya, **(2003)** , 685-693
- [2] Türk Gıda Kodeksi Gıdalarda Kullanılan Renklendiriciler Tebliği; “Tebliğ No: 2002/55” , Ankara, Türkiye, **(2002)**
- [3] Nevado, B.J.J.; Flores, J.R.; Llerena, M.J.V.: Simultaneous Determination of Tartrazine and Sunset Yellow by Derivative Spectrophotometry and Ratio Spectra Derivative, “*Talanta Vol.40*” , Department of Analytical Chemistry and Food Technology, University of Castilla-La Mancha, Real Ciudad, İspanya, **(1993)**, 1391-1396
- [4] Nevado, J.J.B.; Flores, J.R.; Cabanillas, C.G.; Llerena, M.J.V.; Salcedo, A.C.: Resolution of Ternary Mixtures of Tartrazine, Sunset Yellow and Ponceau 4R Derivative Spectrophotometric Ratio Spectrum-Zero Crossing Method in Commercial Foods, “*Talanta Vol.46*” , Department of Analytical Chemistry and Food Technology, University of Castilla-La Mancha, Real Ciudad, İspanya, **(1998)**, 933-942
- [5] Nevado, J.J.B.; Flores, J.R.; Llerena, M.J.V.; Farinas, N.R.: Spectrophotometric Resolution of Ternary Mixtures of Tartrazine, Patent Blue V and Indigo Carmine in Commercial Products, “*Analytica Chimica Acta Vol.391*” , Department of Analytical Chemistry and Food Technology, University of Castilla-La Mancha, Real Ciudad, İspanya, **(1999)**, 353-364
- [6] Altınöz, S.; Toptan, S.: Simultaneous Determination of Indigotin and Ponceau 4R in Food Samples by Using Vierordt’s Method, Ratio Spectra First Order Derivative and Derivative UV Spectrophotometry, “*Journal of Food Composition and Analysis Vol.16*” , Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, Türkiye, **(2003)**, 517-530
- [7] Beccero Dominguez F.; Gonzales Diego: “*Talanta Vol.37*” , Real Ciudad, İspanya, **(1990)**, 658-665
- [8] Nevado, J.J.B.; Flores, J.R.; Llerena, M.J.V.; Farinas, N.R.: Simultaneous Spectrophotometric Determination of Tartrazine, Patent Blue V and Indigo Carmine in Commercial Products by Partial Least Squares and Principal Component Regression Methods, “*Talanta Vol.48*” , Department of Analytical Chemistry and Food Technology, University of Castilla-La Mancha, Real Ciudad, İspanya, **(1999)**, 895-903

- [9] Ni, Y.; Gong, X.: Simultaneous Spectrophotometric Determination of Mixtures of Food Colorants, “*Analytica Chimica Acta Vol.354*”, Department of Chemistry and Department of Environmental Engineering, Nanchang University, Nanchang, Çin, **(1997)**, 163-171

- [10] Capitan-Vallvey, L.F.; Fernandez, M.D.; De Orde, L.; Avidad, R.: Simultaneous Determination of The Colorants Tartrazine, Ponceau 4R and Sunset Yellow FCF in Foodstuffs by Solid Phase Spectrophotometry Using Partial Least Squares Multivariate Calibration, “*Talanta Vol.47*” , Department of Chemistry, University of Granada, Granada, İspanya, **(1998)**, 861-868

- [11] Angelino, S.; Fell, A.F.: “*Journal of Choromatography A.*”, **(1998)**, 73-81

- [12] Chen, Q.; Mou, S.; Hou, X.; Ni, Z.: Determination of Eight Synthetic Food Colorants in Drinks by High-Performance Ion Choromatography, “*Journal of Choromatography A. Vol.827*” , Research Center For Eco-Environmental Sciences, Academia Sinica, Pekin, Çin, **(1998)**, 73-81

- [13] Borzelleca, J.F.; Goldenthal, E.I.; Wazeter, F.X.; Schardein, J.L.: Evaluation of Potential Teratogenicity of FD and C Blue No.2 in Rats and Rabbits, “*Food and Chemical Toxicology*” , **(1987)**, 495-497

- [14] Borzelleca, J.F.; Hogan, G.K.: Chronic Toxicity/Carcinogenicity Study of FD and C Blue No.2 in Mice, “*Food and Chemical Toxicology*”, **(1985)**, 719-722

- [15] Mahadevan, M.M.; Weitzman, G.A.; Hogan, S.; Breckinridge, S.; Miller, M.M.: Methylene Blue But Not Indigo Carmine Is Toxic To Human Luteal Cells in Vitro, “*Reproductive Toxicology*”, **(1993)**, 631-633

- [16] Merck & CO., INC. “*The Merck Index, Thirteenth Edition*” , WhiteHouse Station, NJ, USA, **(2001)** , 1165

- [17] Floyd, J.G.: “*The Sigma-Aldrich Hand Book of Stains, Dyes and Indicators*”, Sigma-Aldrich CO., Second Printing, USA, **(1991)**

- [18] Skoog, D.A.; Leary J.J: “*Principles of Instrumental Analysis, Fourth Edition*”, Saunders College Publishing, USA, **(1992)**, 584

- [19] Synder, L.R.; Kirkland, J.J.; Glajch, J.L.: “*Practical HPLC Method Development, Second Edition*”, Wiley-Interscience Publication, USA, **(1997)**, 13-14, 685-713

- [20] “*USP 26 (The United States Pharmacopedia)*”, Taunton MA, USA, **(2003)**

- [21] Miller, J.N; Miller, J.C: “*Statistics and Chemometrics For Analytical Chemistry*”, Fourth Edition, **(2000)**

- [22] ICH-Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology International Conference On Harmonization of Technical Requirements For Registration of Pharmaceuticals For Human Use, Geneva, Switzerland, **(1996)**
- [23] Lambropoulos, J.; Spanos, G.A; Lazaridis, N.V: “*Development and Validation of An HPLC Assay For Fentanyl and Related Substances in Fentanyl Citrate Injection*”, USP, J.Pharm.Biomed.Anal, **(1999)**, 705-716

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Konya/Ereğli’de doğdum. 1998-2003 yılları arasında Marmara Üniversitesi Atatürk Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliğinde lisans öğrenimini tamamladım. 2003 yılında Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programında yüksek lisansa başladım. 2003 yılından itibaren özel öğretim kurumlarında Kimya Öğretmeni olarak görev yapmaktayım.