

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**HEADSPACE GAZ KROMATOĞRAFI KÜTLE SPEKTROMETRESİ
KULLANARAK PEDİYATRİK ŞURUP VE SÜT ÖRNEKLERİNDE BENZOİK
ASİT TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Neslihan MÜDERRİSOĞLU KEFELİ

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

HAZİRAN 2022

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**HEADSPACE GAZ KROMATOĞRAFI KÜTLE SPEKTROMETRESİ
KULLANARAK PEDİYATRİK ŞURUP VE SÜT ÖRNEKLERİNDE BENZOİK
ASİT TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Neslihan MÜDERRİSOĞLU KEFELİ
509181321**

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN
Eş Danışman: Dr. Orhan DESTANOĞLU**

HAZİRAN 2022

İTÜ, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün 509181321 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Neslihan MÜDERRİSOĞLU KEFELİ, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “HEADSPACE GAZ KROMATOĞRAFİ KÜTLE SPEKTROMETRESİ KULLANARAK PEDIYATRİK ŞURUP VE SÜT ÖRNEKLERİNDE BENZOİK ASİT TAYİNİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Eş Danışman : **Öğr. Görevlisi Dr. Orhan DESTANOĞLU**
İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Zafer Ömer ÖZDEMİR
Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Şerif CANSEVER
İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa

Teslim Tarihi : 3 Haziran 2022
Savunma Tarihi : 23 Haziran 2022





Eşime ve aileme,



ÖNSÖZ

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren ve destek olan değerli danışmanım Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN ve araştırmalarım ve deneylerim esnasında yardımlarını esirgemeyen değerli eş danışmanım Dr. Orhan DESTANOĞLU'na,

Her zaman yanımda olan, verdikleri desteklerle bugünlere gelmemi sağlayan annem Aynur MÜDERRİSOĞLU, babam Mustafa MÜDERRİSOĞLU ve abim Kenan MÜDERRİSOĞLU'na ve manevi olarak tüm sabrı ve sevgisiyle her zaman yanımda olan sevgili arkadaşım Senem Deniz BOLAT'a,

Son olarak, yüksek lisans hayatıma başlarken tanıştığım ve şimdi hayat arkadaşım olarak devam eden sevgili eşim Sezer KEFELİ'ye benden her koşulda desteğini esirgemediği için ve tüm samimiyetiyle yanımda olduğu için çok teşekkür ederim.

Haziran 2022

Neslihan MÜDERRİSOĞLU KEFELİ
Kimyager



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xvii
SUMMARY	xxi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Literatür Çalışmaları	2
2. KATKI MADDELERİ HAKKINDA BİLGİLER.....	5
2.1. Gıda Katkı Maddelerinin Kullanım Amaçları.....	5
2.2. Gıdalara Kullanılan GKM Miktarlarının ve Güvenilirliğinin Araştırılması	6
2.3. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması.....	7
2.3.1. Koruyucu maddeler	7
2.3.2. Gıdanın kullanım özelliklerini iyileştiren maddeler.....	7
2.3.3. Aroma ve renk sağlayan maddeler	8
2.3.4. Besin değerini koruyup, geliştiren maddeler.....	8
2.4. Koruyucuların Özellikleri ve Etki Mekanizmaları	8
2.5. Gıdalarda Kullanılan Koruyucular Maddeler.....	10
2.5.1. Benzoik Asit ve Türevleri	10
2.6. E-Kodu	12
2.7. Gıda Katkı Maddelerinin İnsan Sağlığı Üzerine Etkisi.....	12
2.8. Şuruplarda Kullanılan Koruyucu Maddeler	13
3. KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLER	15
3.1. Kolon Kromatografisi	16
3.2. İyon Değişim Kromatografisi.....	16
3.3. Afinite Kromatografisi	17
3.4. Kağıt Kromatografisi.....	17
3.5. İnce Tabaka Kromatografisi.....	17
3.6. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	18
3.7. Gaz Kromatografisi (GC).....	18
3.7.1. Kolon Çeşitleri	20
3.7.2. Dedektör Çeşitleri	21
3.7.3. Headspace Çalışma Prensipleri	23
3.7.4. İç Standart Yöntemi	25
4. DENEYSEL KISIM	27
4.1. Türevlendirme İşlemi	27
4.2. Gerçek Örnekler	27
4.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	28
4.4. Optimizasyonlar	28

4.4.1. Sıcaklık optimizasyon aşamaları	28
4.4.2. Asit konsantrasyonunun optimizasyon aşamaları	33
4.4.3. Çözelti hacimlerinin optimizasyon aşamaları	36
4.5. Kromatografik Koşullar.....	37
4.6. Standart ve Numune Hazırlıkları.....	38
4.7. Metot Validasyon Aşamaları.....	38
4.7.1. Doğrusallık parametresi	39
4.7.2. LOD & LOQ belirleme	40
4.7.3. Kesinlik parametresi.....	40
4.7.3.1. Tekrarlanabilirlik.....	40
4.7.3.2. Ara kesinlik	41
4.7.4. Geri kazanım parametresi.....	42
4.7.5. Metot validasyon parametrelerinin değerlendirilmesi.....	43
5. SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME	45
5.1. Süt Örneklerinde Benzoik Asit Konsantrasyonları	45
5.2. Şurup Örneklerinde Benzoik Asit Konsantrasyonları	46
5.3. Sonuçların Değerlendirilmesi	47
5.4. Metodun Yeşil Kimya Üzerine Değerlendirilmesi.....	47
6. TARTIŞMA.....	49
KAYNAKLAR.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	55

KISALTMALAR

ADI	: Acceptable Daily Intake (Günlük Alınabilecek Miktar)
AOAC	: Association of Official Analytical Collaboration (Resmi Analitik İşbirliği Derneği)
BA	: Benzoik Asit
EC	: European Community (Avrupa Birliği)
FAO	: Food and Agriculture Organization (Gıda ve Tarım Örgütü)
FDA	: U.S. Food and Drug Administration (ABD Gıda ve İlaç Dairesi)
FFAP	: Fatty Acids and Phenols (Yağ Asidi ve Fenoller)
FID	: Flame Ionization Detection (Alev İyonlaştırma Dedektörü)
GKM	: Gıda Katkı Maddesi
GKMY	: Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği
GMP	: Good Manufacturing Practice (İyi Üretim Uygulamaları)
HS-GC-MS	: Headspace-Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi
LD	: Lethal Doz
LOD	: Limit of Detection (Gözlenebilme Sınırı)
LOQ	: Limit of Quantification (Tayin Sınırı)
N	: Noise (Gürültü)
NIST	: National Institute of Standards and Technology (Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü)
H₂SO₄	: Sülfürik Asit
IS	: Internal Standard (İç Standart)
JECFA	: Joint Expert Committee on Food Additives (Gıda Katkı Maddeleri Uzmanlar Kurulu)
MeOH	: Metanol
NOAEL	: No Observed Adverse Effect Level (Etkisiz Doz)
PEG	: Poli Etilen Glikol
PTFE	: Poli-Tetra-Floro-Etilen
RSD	: Relative Standard Deviation (Bağıl Standart Sapma)
RT	: Retention Time (Alıkonma Zamanı)
S	: Signal (Sinyal)

SA	: Salisilik Asit
SD	: Standard Deviation (Standart Sapma)
SIR	: Selected Ion Recorder (Seçilmiş İyon Kaydedici)
TIC	: Total Ion Chromatogram (Toplam İyon Kromatogram)
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1: Benzoik asit özellikleri.....	11
Çizelge 2.2: Sodyum benzoatın genel özellikleri.	11
Çizelge 4.1: Kullanılan materyallerin kullanım süreleri.....	28
Çizelge 4.2: Kromatografik koşullar.	38
Çizelge 4.3: Kalibrasyon çözeltilerinin konsantrasyonları ve BA/SA alanları oranları.	39
Çizelge 4.4: LOD ve LOQ değerleri.	40
Çizelge 4.5: Tekrarlanabilirlik analizlerinin sonuçları.	41
Çizelge 4.6: 3 numaralı süt numunesinde BA alanlarının ara kesinlik sonuçları.....	41
Çizelge 4.7: 1 numaralı şurup numunesinde BA alanlarının ara kesinlik sonuçları..	42
Çizelge 4.8: 3 numaralı süt numunesinin geri kazanım sonuçları.	42
Çizelge 4.9: 1 numaralı şurup numunesinin geri kazanım sonuçları.....	42



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: Benzoik asitin yapısal formülü.	11
Şekil 2.2: Sodyum benzoatın yapısal formülü.	12
Şekil 3.1: Headspace Gaz Kromatografi Kütle Spektrometresi.	19
Şekil 3.2: Çapraz bağlı carbowax-PEG yapısına sahip FFAP GC kolonu.	21
Şekil 3.3: NIST kütüphanesinde görüntülenen benzoik asit kütle spektrumu.	22
Şekil 3.4: NIST kütüphanesinde görüntülenen salisilik asit kütle spektrumu.	22
Şekil 3.5: 20 mL HS vial örnekleri.	23
Şekil 3.6: Karusel (Headspace vial bölümü).	24
Şekil 4.1: Benzoik asitin türevlendirme tepkimesi.	27
Şekil 4.2: 50 µL BA, 50 µL SA, 200 µL 5 M H ₂ SO ₄ çözeltisi içeren viallerin HS fırınında 140 °C sıcaklıkta yapılan 15, 30 ve 45 dk inkübasyon süreleri sonunda elde edilen kromatogramlar.	29
Şekil 4.3: 50 µL BA, 50 µL SA, 200 µL 5 M H ₂ SO ₄ çözeltisi içeren viallerin HS fırınında 130 °C sıcaklıkta yapılan 15, 30 ve 45 dk inkübasyon süreleri sonunda elde edilen kromatogramlar.	30
Şekil 4.4: 50 µL BA, 50 µL SA, 200 µL 5 M H ₂ SO ₄ çözeltisi içeren viallerin HS fırınında 120 °C sıcaklıkta yapılan 15, 30 ve 45 dk inkübasyon süreleri sonunda elde edilen kromatogramlar.	31
Şekil 4.5: 50 µL BA, 50 µL SA, 200 µL 5 M H ₂ SO ₄ çözeltisi içeren viallerin HS fırınında 110 °C sıcaklıkta 5, 15, 30, 45 ve 60 dk inkübasyon süreleri sonunda elde edilen kromatogramlar.	31
Şekil 4.6: 50 µL BA, 50 µL SA, 200 µL 5 M H ₂ SO ₄ çözeltisi içeren viallerin HS fırınında 110, 120, 130 ve 140 °C sıcaklıkta yapılan 15 dk inkübasyon süresi sonunda elde edilen kromatogramlar.	32
Şekil 4.7: 50 µL BA, 50 µL SA, 200 µL 5 M H ₂ SO ₄ çözeltisi içeren viallerin HS fırınında 110, 120, 130 ve 140 °C sıcaklıkta yapılan 30 dk inkübasyon süresi sonunda elde edilen kromatogramlar.	32
Şekil 4.8: 50 µL BA, 50 µL SA, 200 µL 5 M H ₂ SO ₄ çözeltisi içeren viallerin HS fırınında 110, 120, 130 ve 140 °C sıcaklıkta yapılan 45 dk inkübasyon süresi sonunda elde edilen kromatogramlar.	33
Şekil 4.9: Değişen asit konsantrasyonlarının BA ve SA alanına etkisi ile elde edilen kromatogramlar.	34
Şekil 4.10: %10 hacmindeki asit konsantrasyonuna eklenen 180, 250 ve 300 µL MeOH ile elde edilen kromatogramlar.	35
Şekil 4.11: 5 M H ₂ SO ₄ çözeltisi ile %25 hacmindeki MeOH ile seyreltilmiş H ₂ SO ₄ çözeltisi ile elde edilen kromatogramlar.	36
Şekil 4.12: Sırasıyla, BA, SA ve 5 M H ₂ SO ₄ çözeltilerinin vialdeki hacimlerinin (µL) BA ve SA piklerine etkisi ile elde edilen kromatogramlar.	37
Şekil 4.13: Lineer kalibrasyon grafiği.	40
Şekil 5.1: Süt örneklerindeki benzoik asit konsantrasyonları (mg/L).	45
Şekil 5.2: 6 numaralı süt numunesi analizindeki kromatogram örneği.	46

Şekil 5.3: Şurup örneklerindeki benzoik asit konsantrasyonları (mg/L).	46
Şekil 5.4: 2 numaralı şurup numunesi analizindeki kromatogram örneği.	47



HEADSPACE GAZ KROMATOĞRAFİ KÜTLE SPEKTROMETRESİ KULLANARAK PEDİYATRİK ŞURUP VE SÜT ÖRNEKLERİNDE BENZOİK ASİT TAYİNİ

ÖZET

Çok uzun yıllardır gıdaların bozulmasını önlemek için organik bir asit olan benzoik asit (BA) kullanılmaktadır. Günümüzde de sıklıkla kullandığımız tarçın, karanfil gibi baharatlarda, kuru erik gibi meyvelerde doğal olarak bulunur. BA kendi formunda da sodyum benzoat gibi çeşitli gıda ve ilaçlarda koruyucu madde olarak kullanılır. BA'in aktif bileşeni ayrışmamış asittir ve maya ve küf gibi istenmeyen mikroorganizmaların üremesine engel olur. Her gün sıklıkla tüketilen asitli ve asitsiz içeceklerde ve çok geniş yelpazede gıdalarda kullanılır. Hazır gıdaların ambalajları üzerinde, gıda katkı maddelerinin (GKM) kullanım amaçlarına göre kategoriler mevcuttur ve Avrupa Birliği ülkelerinde GKM için "E" harfi ve bir sayı sistemi ile mevcuttur. Örneğin, renklendiriciler E harfinde 100-180 sayıları arasında kodlanmaktadır. Koruyuculara bakıldığında E harfinde 200-297 sayıları arasında, antioksidanlar E harfinde 300-321 sayıları arasında, emülgatörler ile stabilizatörler E harfinde 222-500 sayıları arasında, asit-baz düzenleyicileri E harfinde 500-578 sayıları arasında, tatlandırıcılar ve kokular ise E harfinde 620-637 sayıları arasında kodlanmaktadır. BA ise koruyucular grubundan E210 kodlu kimyasal bir maddedir.

Günümüzde tüketiciler, gıdaların yıl boyunca hazır bulunmasını, gıda kaynaklı patojenlerden uzak olmasını ve yeterli ölçüde uzun raf ömrüne sahip olmasını beklemektedir. Yiyeceklerin üretildiği andan tüketilene kadar birkaç gün, aylar ve hatta yıllar geçebilir. Böyle bir sistem için gerekli olan uzun vadeli raf ömrünü elde etmek için, çoğu zaman birden fazla etkili koruma yöntemi gerekir. Bu nedenle, gıdaların hem kimyasal hem de biyolojik olarak bozulmasını önlemek veya geciktirmek için koruyucular kullanılmaktadır. Gıda katkı maddeleri 4 ana başlıkta incelenmektedir. Bunlardan ilki, koruyucu maddeler; ikincisi, gıdanın kullanım özelliklerini iyileştiren maddeler; üçüncüsü, aroma ve renk sağlayan maddeler ve son olarak dördüncüsü, besin değerini koruyucu ve geliştirici maddelerdir.

Gıdalarda kullanılan koruyucular 6 grupta toplanmaktadır. Organik asitler en çok kullanılan grup olmakla beraber, kükürtdioksit ve sülfidler, nitrit ve nitratlar, dimetil dikarbonat, koruyucu gazlar ve antibiyotikler de diğer grupları oluşturmaktadır. Mikrobiyal inhibisyon için BA pH 4'ün altındayken en etkin haldedir. BA'in koruyucu yanının olmasının sebebi, mikroorganizmalardaki hücre duvarı ve enzimleri etkisiz hale getirebilmesidir.

BA maddesinin izin verilen konsantrasyon limitleri üzerinde kullanılması zehirleyici olması sebebiyle tehlikelidir. Kullanım miktarının artması kilo kaybı, ishal, iç kanama, felç gibi bazı sağlık sorunlarına ve hatta ölüme dahi sebep olabilmektedir. Bu sebeple gıdalarda bulunan koruyucu maddelerin miktarlarına dikkat edilmelidir.

Bu çalışmada, pediatrik şurup ve süt örneklerinde BA tayini için yeni bir Headspace Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi (HS-GC-MS) yöntemi geliştirmeyi amaçladık.

BA, HS-GC-MS ile doğrudan ölçülemediğinden metil benzoat esterine türevlendirilmiştir. Hem tam türevlendirme hem de güvenilir sonuçlar elde etmek için optimum sıcaklık ve inkübasyon süresi değerleri bulunmaya çalışıldı. HS sıcaklık değerinin artırılmasına bağlı olarak analit ve iç standarta ait pik alanlarının da arttığı tespit edildi, fakat, 120 °C, 130 °C ve 140 °C'de de BA de iç standart olarak kullanılan salisilik asit (SA) pikinde de çatallanmalar görüldü. 110 °C'de yapılan çalışmalarda ise piklerde çatallanmanın görülmeyişi belirlendi. Bu sıcaklıkta yapılan termostat süresindeki çalışmalar sonucunda headspace fırınında vial içinde esterleşme reaksiyonunun başarıyla meydana geldiği ve piklerde çatallanmanın görülmeyişi optimum koşullar 110 °C ve 30 dakika olarak belirlenmiştir. HS fırınının sıcaklık ve süre optimizasyon çalışmalarının ardından son olarak esterleşme reaksiyonunu katalizleyen asit miktarının optimizasyonu yapıldı. Bu noktada ise en uygun çözeltinin 5 M H₂SO₄ olduğu belirlenmiştir. BA ve iç standart olarak kullanılan SA optimize edilmiş headspace koşulları altında metil esterine türevlendirildikten sonra ölçüldüler. Esterlerin sentez yöntemi, karboksilik asit ve alkollerin asit katalizli bir ortamda reaksiyon vermesidir.

Örnek hazırlama kısmında, numuneler önce metanol ile seyreltildi. Daha sonra 50 µL seyreltilmiş numune, 50 µL 10 mg/L SA (metanol içinde) ve 200 µL 5 M H₂SO₄, 20 mL'lik bir HS viali içine konuldu. HS viali, politetrafloroetilen (PTFE) kaplı kauçuk septumlu ve alüminyum kıvrımlı kapaklarla sıkıca kapatıldı ve HS otoörnekleyiciye yüklendi. Numunelerin analizi, bir Turbomatrix HS40 otoörnekleme cihazı ile donatılmış bir Perkin Elmer Clarus 500 GC-MS sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırmalar, çapraz bağlı bir carbowax-PEG yapısına sahip bir Perkin Elmer FFAP GC kolonu (30 m x 0,25 mm i.d. x 0,50 µm df.) kullanılarak sağlandı.

Geliştirilen yeni yöntemin seçicilik, doğruluk, tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ), kesinlik ve doğruluk parametreleri de incelendi. Sonuç olarak, şurup ve süt numunelerinde BA tayini için oldukça doğru, kesin ve güvenilir bir HS-GC-MS yöntemi geliştirilmiştir. BA doğrudan ölçülemediğinden metil esterine türevlendirildi. Doğruluk aralığı belirlenerek kalibrasyon grafiği çizildi. Gözlenebilen ve tayin edilebilen minimum değerler bulundu. Daha sonra süt ve şurup numunelerinden 6'şar örnek hazırlanarak tekrarlanabilirlik parametresine bakıldı. Son olarak, geliştirilen metodun validasyon parametreleri tamamlanıp numunelerin konsantrasyonları hesaplandı.

Tez kapsamında ilk bölümde tezde amaçlanan koruyucu madde analizleri ve HS-GC-MS metotları hakkında genel bilgiler ve daha önce yapılmış çalışmalar hakkında bilgiler mevcuttur. Ardından ikinci bölümde gıda katkı maddeleri tanıtılmıştır. Gıda katkı maddelerinin kullanım amaçları, gıdalara katılacak gıda katkı maddelerinin belirlenme şartları ve belirleyen komiteler, gıda katkı maddelerinin sınıflandırılması, antimikrobiyal katkı maddeleri, koruyucuların genel özellikleri ve etki mekanizmaları, gıdalarda kullanılan koruyucu maddeler ve gıda katkı maddelerinin insan sağlığı üzerine etkilerinden literatürden yararlanılarak anlatılmıştır. Daha sonra üçüncü bölümde, tezde kullanılan HS-GC-MS cihazı hakkında kapsamlı bilgiler verilmiştir. Dördüncü bölümde, kullanılan kimyasallar, optimizasyonlar, kromatografik koşullar, metot validasyon parametreleri ve numune hazırlıkları anlatılmıştır. Son olarak beşinci bölümde ise oluşturulan metot ve yöntem kullanılarak sütlerde ve çocuk şuruplarında bulunan BA konsantrasyonlarının sonuçları, örnek kromatogramları ve değerlendirilmesi verilmiştir.

JECKA'ya göre bir insanın günlük alabileceği maksimum miktar, 5 mg/kg (vücut ağırlığı başında) olarak belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, sütlerde BA eser miktarda, şuruplarda ise bulunan konsantrasyon süte göre daha fazla ancak günlük alım limitine göre oldukça düşük kalmaktadır. Bu da verilen bilgilere göre sağlık açısından bir tehlike oluşturmadığını göstermektedir.

Son olarak, bir yöntemin yeşil kimyaya uygun olması ve çevreye zarar vermemesi günümüzde en önemli konulardan birisidir. O yüzden geliştirdiğimiz yöntemin evre dostluğunu objektif değerlendirmek için bazı literatür bilgileri ile karşılaştırarak bu yöntemin yeşil kimya açısından zararsız ve basit bir yöntem olduğu konusunda değerlendirmeler yapıldı.





DETERMINATION OF BENZOIC ACID IN PEDIATRIC SYRUP AND MILK SAMPLES BY HEADSPACE GAS CHROMATOGRAPHY MASS SPECTROMETER

SUMMARY

For many years, benzoic acid (BA), an organic acid, has been used to prevent food spoilage. It is found in its natural form in spices such as cinnamon and cloves, and in fruits such as prunes, which we frequently use today. In its own form, BA is used as a preservative in various foods and medicines, such as sodium benzoate. The active component of benzoic acid is undissociated acid and prevents the growth of unwanted microorganisms such as yeast and mold. It is used in acidic and non-acidic beverages that are frequently consumed every day and in a wide range of foods. There are categories on the packages of ready-made foods according to the purpose of use of food additives, and in European Union countries, food additives are made with the letter "E" and a number system. For example, colorants are encoded in the letter E between the numbers 100-180. Preservatives are between the numbers 200-297 in the letter E, the antioxidants between the numbers 300-321 in the letter E, the emulsifiers and stabilizers between the numbers 222-500 in the letter E, the acid-base suppliers between the numbers 500-578 in the letter E, the sweeteners and fragrances between the numbers 620-637 in the letter E are coded. BA, on the other hand, is a chemical substance with the code E210 from the group of preservatives.

Consumers today expect food to be available year-round, free from foodborne pathogens, and have a sufficiently long shelf life. It can take several days, months or even years from the time food is produced to consumption. To achieve the long-term shelf life required for such a system, more than one effective preservation method is often required. Therefore, preservatives are used to prevent or delay the deterioration of food, both chemically and biologically. Food additives are examined under 4 main headings. The first of these is preservatives; secondly, substance that improve the use properties of food; the third is the substances that provide flavor and color, and lastly, the substances that protect and improve the nutritional value.

Preservatives used in foods are grouped into 6 groups. Although organic acids are the most used group, they are sulfur dioxide and sulfites, nitrites and nitrates, dimethyl dicarbonate, shielding gases and antibiotics. Benzoic acid is most effective below pH 4 for microbial inhibition. The reason why benzoic acid has a protective side is that it can inactivate the cell wall and enzymes in living things.

The use of benzoic acid above the permissible concentration limits is dangerous because it is toxic. Increasing the amount of use can cause some health problems such as weight loss, diarrhea, internal bleeding, paralysis and even death. For this reason, attention should be paid to the amount of preservatives in foods.

In this study, we aimed to develop a new Headspace Gas Chromatography-Mass Spectrometer (HS-GC-MS) method for the determination of benzoic acid in pediatric syrup and milk samples. BA is derivatized to methyl ester as it cannot be measured directly by HS-GC-MS. Optimum temperature and incubation time values were tried to be found in order to obtain both full derivatization and reliable results. It was determined that the peak areas of the analyte and internal standard increased depending

on the increase in the headspace temperature value, but bifurcations were also observed in the salicylic acid (SA) peak used as the internal standard in BA at 120 °C, 130 °C and 140 °C. In the studies carried out at 110 °C, it was determined that no bifurcation was observed in the peaks. As a result of the studies carried out at this temperature during the thermostat period, the optimum conditions were determined as 110 °C and 30 minutes, in which the esterification reaction occurred successfully in the vial in the headspace furnace and no bifurcation was observed in the peaks. After the temperature and time optimization studies of the HS furnace, the amount of acid that catalyzes the esterification reaction was finally optimized. At this point it was determined that the most suitable solution was 5 M H₂SO₄. BA and SA used as internal standard were measured after derivatization to its methyl ester under optimized headspace conditions.

The common synthesis method of esters is the formation of a carboxylic acid and an alcohol as a result of the hydrolysis reaction in an acid-catalyzed occurrence.

In the sample preparation part, the samples were diluted with methanol. Then, 50 µL of diluted sample, 50 µL of 10 mg/L SA (in methanol) and 200 µL of 5.00 M H₂SO₄ were placed in a 20 mL vial of HS. The HS vial was tightly closed with polytetrafluoroethylene (PTFE) coated rubber septum and aluminum crimp caps and loaded into the HS autosampler. Analysis of samples was performed with a Perkin Elmer Clarus 500 GC-MS equipped with a Turbomatrix HS40 autosampler. Chromatographic separations were achieved using a Perkin Elmer FFAP GC column (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.50 µm df.) with a cross-linked carbowax-PEG construct.

In this thesis, 1000 mg/L stock solutions were prepared by taking 25 mg of BA and SA standards and dissolving them with methanol in a 25 mL flask for preparation of the standard and samples. Then Standard calibration solutions of 0.05, 0.50, 1.00, 2.50, 5.00, 10.00, 20.00, 40.00, 60.00, 80.00 mg/L were prepared using a micropipette by diluting the benzoic acid stock solution. After that, SA, which is the internal standard solution, was diluted to 10 mg/L from a 1000 mg/L stock solution in a flask with methanol. The samples were diluted 1/5 in methanol. The acid medium was prepared as 5M by diluting 10.7 mL of sulfuric acid to 40 mL with distilled water. For quantitation, the standards were first given to the device by vials in volumes of 50 µL BA, 50 µL 10 mg/L SA and 200 µL 5 M H₂SO₄. Then, 50 µL was taken from the samples and 50 µL of 10 mg/L SA and 200.00 µL of 5 M H₂SO₄ volumes of internal standard and acid solution were added to them and given to the device. The common synthesis method of esters is the formation of a carboxylic acid and an alcohol as a result of the condensation reaction in an acid-catalyzed environment. Since benzoic acid is not seen in its own form, measurements were made under optimized conditions by derivatizing it to methyl benzoate ester using methanol and sulfuric acid concentrations.

Selectivity, linearity, limit of detection (LOD) and limit of qualification (LOQ), precision and accuracy parameters of the developed new method were also investigated. As a result, a highly accurate, precise and reliable HS-GC-MS method was developed for the determination of BA in syrup and milk samples. Since BA could not be measured directly, it was derivatized to its methyl ester. The linearity range is the concentration range in which the developed method yields results with acceptable sensitivity and repeatability. In order to show this linear relationship, mixtures containing different concentrations of BA were prepared and analyzed concentrations versus peak areas obtained from chromatograms.

The BA concentration values prepared for the calibration chart and the BA and SA ratios taken in SIR mode were used. By using this parameter, the minimum values that can be seen and determined were calculated. The concentrations of the prepared samples were found by using the equation of the graph obtained. Then, 6 samples were prepared from milk and syrup samples and the reproducibility parameters were checked. This part was repeated 3 days and calculated relative standard deviation between these days. In addition, accuracy analyzes were done in milk and syrup samples according to 3 different concentrations. Finally, the validation parameters of the developed method were completed and the concentrations of the samples were calculated.

Within the scope of the thesis, in the first part of the thesis, there are general information about the preservative analyzes and HS-GC-MS methods aimed in the thesis and information about the previous studies. Then, in the second part, food additives were introduced. The purpose of use of food additives, the conditions of determination of food additives to be added to foods and the determining committees, classification of food additives, antimicrobial additives, general properties and mechanisms of action of preservatives, preservatives used in food and the effects of food additives on human health are explained using the literature. Then, in the third chapter, comprehensive information about the HS-GC-MS device used in the thesis is given. In the fourth chapter, the chemicals used, optimizations, chromatographic conditions, method validation parameters and sample preparation are explained. Finally, in the fifth chapter, the results, sample chromatograms and evaluation of BA concentrations in milk and pediatric syrups are given using the new generated method.

According to JECKA, the maximum amount a person can take daily is 5 mg/kg (per body weight). According to the data obtained, BA is found in trace amounts in milk, and the concentration in syrups is higher than milk, but it is quite low compared to the daily intake limit. This shows that it does not pose a health hazard according to the information given.

Finally, one of the most important issues today is that a method is suitable for green chemistry and does not harm the environment. Therefore, in order to objectively evaluate the environmental friendliness of the method we developed, the values obtained by subjecting it to some measurements were examined and this method can be accepted as a harmless and simple method in terms of green chemistry.

One of the most important issues today is that a method is suitable for green chemistry and does not harm the environment. That's why we looked at the values obtained by subjecting the method we developed to some measurements in order to evaluate the environmental friendliness objectively. Generally recommended environmentally friendly solvents are water, alcohol and some ethers. In our study, water and methyl alcohol were used as solvents. BA, SA and sulfuric acid used as chemical reagents are odorless and not hazardous. During the analyses, 25 mg of benzoic acid, 25 mg of salicylic acid and 10.70 mL of sulfuric acid were used. Since HS-GC-MS is used, the waste product of these chemicals, which are used in very small amounts, is very low. Contrary to the mobile phases used in HPLC, the device uses inert gas as carrier gas and the use of He gas in this analysis has a very harmless effect on the environment. Considering that the daily electricity consumption of the HS-GC-MS device is ≤ 1.50 kW/h, this method can be accepted as a harmless and simple method in terms of green chemistry.



1. GİRİŞ

Benzoik asit (BA), uzun yıllardır gıdalarda ve ilaçlarda koruyucu olarak kullanılan organik bir asit çeşididir. Tarçın ve karanfil gibi baharatlarda, kuru erik gibi meyvelerde doğal olarak bulunur. BA, sodyum benzoata göre suda daha az çözündüğü için, genellikle sodyum benzoat formu koruyucu olarak kullanılmaktadır. BA de kendi formunda çeşitli gıdalarda kullanılabilir. BA, asitli ve asitsiz içeceklerde, çok çeşitli gıdalarda kullanılır. Hazır gıdaların ambalajları üzerinde, gıda katkı maddelerinin kullanım amaçlarına göre kategoriler mevcuttur ve Avrupa Birliği ülkelerinde gıda katkı maddeleri (GKM) için "E" harfi ve bir sayı sistemi ile yapılmaktadır. Örneğin, renklendiriciler E harfinde 100-180 sayıları arasında kodlanmaktadır. Koruyuculara bakıldığında E harfinde 200-297 sayıları arasında, antioksidanlar E harfinde 300-321 sayıları arasında, emülgatörler ile stabilizatörler E harfinde 222-500 sayıları arasında, asit-baz tedarikçileri E harfinde 500-578 sayıları arasında, tatlandırıcılar ve kokular ise E harfinde 620-637 sayıları arasında olacak şekilde kodlanmaktadır. BA ise koruyucular grubundan E210 kodlu kimyasal bir maddedir [1].

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'ne göre GKM, ham madde ya da yardımcı madde olarak kullanılamaz. Hiçbirinin yalnız başına besin değeri yoktur ve bu yüzden besin olarak tek başına tüketilemez. GKM, besinler üretilirken kullanılan teknoloji sebebiyle var olabilir, gıdaları yetiştirme, kullanıma hazır hale getirme, paketlenme, nakliye etme ve depolama sırasında da kullanılabilir. Gıda maddesinin tadını ve kokusunu korumak, görünüş ve yapısını iyileştirmek ve istenmeyen olumsuzluklara engel olmak amacıyla kullanılmaktadır. GKM ile ilgili düzenlemeler, bütün dünyada, Birleşmiş Milletler'e bağlı WHO ve FAO birlikteliğiyle sağlanmaktadır. Katkı maddelerinin insan sağlığı üzerine etkileriyle ve günlük kullanım limitinin belirlenmesinde bu kuruluşlar ilgilienmektedir [1].

Daha önce yapılmış gıdalardaki koruyucuların belirlenmesine yönelik çalışmalarda yaygın analitik yöntemler arasında Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) [2, 3, 4], Gaz Kromatografisi (GC) [5] ve kapiler elektroforez (CE) [6, 7]

bulunmaktadır. Kullanılan bu yöntemler, analizden önce izolasyon gerektirir ve sonrasında bazı zorlukları meydana getirir. Bu problemlerin üstesinden gelmek için, katı faz mikro ekstraksiyon (SPME) ve karıştırma çubuğu emici ekstraksiyon (SBSE) gibi organik solventsiz yöntemler geliştirilmiştir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve katı faz ekstraksiyonu gibi geleneksel teknikler zaman alıcıdır ve genellikle insan sağlığı ve çevre için tehlikeli olan yüksek hacimlerde organik çözücülerin kullanımını içerir [5].

1.1. Literatür Çalışmaları

BA analizi için yaygın olarak HPLC cihazı tercih edilmekle birlikte, GC ve elektroforez yöntemleri de uygulanmaktadır. Bu bölümde, literatürde yer alan BA çalışmalarına yer verilmiştir.

İran'da yapılan bir çalışmada, meşrubat, ultra yüksek sıcaklıktaki sütlerde, ketçap sosunda ve ekmekte UV dedektörlü HPLC cihazı kullanılarak BA ve sorbik asit analizi yapılmıştır. Analiz sırasında, metanol, asetronitril, potasyum sorbat, sodyum benzoat, kloroform, karbon tetraklorür, hidrojen klorür, sodyum klorür gibi kimyasal maddeler kullanılmıştır. Kromatografik analiz için, K-1000 pompası, UV dedektörü, Degasser Biotech model 2003, Knauer HPLC sistemi, oda sıcaklığında RP 18 kolonu, 20 µL enjeksiyon hacminde ve 1 mL/dk akış hızında izokratik mobil faz olarak 40:60 (v/v) oranında asetronitril ve 5 M amonyum asetat kullanılmıştır. Numune hazırlıkları sırasında santrifüj, DLLME (Dispersif sıvı sıvı mikroekstraksiyon), süzme işlemleri, tekrar çözme ve çöktürme işlemleri uygulanmıştır. Sonuç olarak, 54 gıda numunesinden % 92,50'sinde 3,50 – 1520 mg/kg aralığında BA bulunurken, % 50,30'ünde 0,80 – 2305 mg/kg sorbik asit bulunmuştur. LOD ve LOQ sırasıyla BA için 0,1 ve 0,5 mg/kg ve sorbik asit için 0,08 ve 0,30 mg/kg bulunmuştur. Sonuçlar, İran'da gıda ürünlerinde yaygın olarak benzoik ve sorbik asit bulunduğunu göstermiştir [4].

Bir diğer örnek ise GC-FID (Gaz kromatografi-Alev iyonlaştırma dedektörü) ile süt örneklerinde BA analizi çalışmasıdır. Kullanılan kimyasallar, potasyum heksasiyanoferrat (III), çinko asetat, sodyum klorür, sodyum hidroksit, aseton, 1-oktanal, hidroklorik asit ve asetik asittir.

Varian model CP-3800 gaz kromatografi, FID dedektörü, silika kapiler kolon, Hettich Universal 320 R santrifüj cihazı kullanılmıştır. Taşıyıcı gaz helyum, enjektör ve

dedektör sıcaklıkları sırasıyla 260 °C ve 270 °C olmuştur. GC sıcaklık program önce 2 dk 150 °C'lik bir başlangıç sıcaklığı daha sonra dakikada 10 °C artarak 240 °C'ye yükselmektedir.

Numune hazırlığı sırasında DLLME prosedürü uygulanmıştır. Kısa ekstraksiyon süresi ve matris müdahalesinin olmaması önerilen yöntemin avantajlarıydı. En iyi DLLME için deneysel koşullar 475 µL dispersif çözücü aseton, 60 µL (1-oktanol) ekstraksiyon çözücüsüydu, pH 2,5 ve 2 g sodyum klorür olarak belirlenmiştir. Süt ürünlerinde sorbik ve BA'lerin tayininde başarıyla uygulanmıştır. Düşük solvent tüketimi, düşük maliyet, kısa ekstraksiyon süresi yöntemin avantajlarıdır. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla, sorbat için 0,15 ve 0,50 mg/kg ve benzoat için 0,14 ve 0,47 mg/kg olarak bulunmuştur [5].

Bir kapiler elektroforez ile BA analizinde kullanılan kimyasal maddeler: Tetrabutilamonyum bromür, hidroksibenzoik asit, benzoik asit, sorbik asit ve p-hidroksibenzoik asit, heksametilen tetramin, setiltrimetilamonyum bromür, sodyum tetraborat, sodyum hidroksit, hidroklorik asit, etanol, metanol, asetonitril ve tetradeciltrimetilamonyum bromür.

Kullanılan yöntem, benzoik asit ve sorbik asiti belirlemek için bir elektroozmotik pompa, beş solenoid valf ve el yapımı katı faz ekstraksiyon (SPE) ünitesinden oluşan kapiler bölge elektroforezi (CZE) ile birleştirilmiş bir elektrokinetik akış analiz sistemi (EFA) dir. Önerilen EFA–SPE–CZE yöntemini değerlendirmek için sütlü içeceklerde, soya soslarında ve meyve reçellerinde benzoik asit ve sorbik asit analiz edilmiştir. Benzoik asit için LOD değeri 0,02 mg/kg, sorbik asit için ise 0,01 mg/kg bulunmuştur [7].

Bu tez çalışmasında ise, HS-GC-MS cihazı ile BA analizi için yeşil kimyaya uygun yeni bir yöntem geliştirilerek İstanbul'daki süper marketlerden ve eczanelerden satın alınan ve özellikle çocukların yaygın olarak tükettiği süt örnekleri ve pediyatrik şurup örneklerinde uygulandı. Süt ve şurup örneklerinde kullanılan benzoik asitin yasal sınırları hakkında bilgiler, ayrıca ürün etiketinde belirtilmediği ve kullanımı gerekli olmadığı halde bilerek veya bilmeyerek kullanılması ve vücutta birikmesi ile de günlük alınabilir limitlerinin maksimum miktardan fazla olup olmadıkları değerlendirilmiştir.



2. KATKI MADDELERİ HAKKINDA BİLGİLER

Bu bölümde gıda katkı maddeleri hakkında bilgiler, bu maddelerin etki mekanizmaları, kullanım şartları, literatürde yer alan kodları ve insan sağlığı üzerine etkilerinden bahsedilmektedir.

2.1. Gıda Katkı Maddelerinin Kullanım Amaçları

Kurutma, soğuk, fermentasyon ve ısıtma, gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatmak için her zaman kullanılan başlıca yöntemler olmuştur. Bununla birlikte, tarih öncesi zamanlardan beri, taze hasat edilmiş gıdaları daha sonra kullanmak üzere korumak için tuz gibi bazı kimyasallar eklenmiştir. Tuz, nitritler ve süfitler gibi belirli kimyasal gıda koruyucuları uzun yıllar kullanılsa da, diğer gıda koruyucuların çoğu ancak son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlandı. Kimyasal koruyucuların kullanımının artmasının nedenlerinden biri, gıdaların üretilme ve pazarlanma şekillerindeki değişiklik olmasıdır. Günümüzde tüketiciler, gıdaların yıl boyunca hazır bulunmasını, gıda kaynaklı patojenlerden uzak olmasını ve yeterli ölçüde uzun raf ömrüne sahip olmasını beklemektedir. Gıdaları korumak için paketleme ve işleme uygulaması kullanılarak birçok iyileştirme yapılmış olsa da, antimikrobiyaller tüketicileri erken gıda kaybından ve olası gıda kaynaklı hastalık etmenlerinden korumada önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin, gıdalarda bulunan C vitamini çevresel koşullardan kolay etkilenen bir madde olduğu için, değerlerinin korunması amacıyla antioksidanlardan yararlanılmaktadır [7]. Gıdaların daha küresel bir sisteme pazarlanmasındaki değişiklikler nedeniyle, ürünler eskiden olduğu gibi nadiren yerel olarak yetiştirilir ve satılır. Bugün, bir coğrafi bölgede üretilen gıdalar, genellikle işlenmek üzere başka bir bölgeye ve dağıtım için birkaç başka alana gönderilmektedir. Yiyeceklerin üretildiği andan tüketilene kadar birkaç gün, aylar ve hatta yıllar geçebilir. Böyle bir sistem için gerekli olan uzun vadeli raf ömrünü elde etmek için, çoğu zaman birden fazla etkili koruma yöntemi gereklidir. Bu nedenle, gıdaların hem kimyasal hem de biyolojik olarak bozulmasını önlemek veya geciktirmek için koruyucular kullanılmaktadır [8].

Tüm dünyada 20.000 kadar katkı maddesinin besin endüstrisinde kullanıldığı tahmin edilmektedir [9].

2.2. Gıdalara Kullanılan GKM Miktarlarının ve Güvenilirliğinin Araştırılması

Gıdalarda kullanılan katkı maddeleri, bazı toksikolojik testlerle hesaplanır. Bu testler sonucunda canlının günlük alabileceği maksimum miktar belirlenir. Bu miktar günlük alınabilir maksimum miktar olarak belirlenir ve ADI (Acceptable Daily Intake) kısaltmasıyla tanımlanır [10]. Bu katkı maddeleri gelişigüzel miktarlarda ve tüzük dışı kullanıldığında tüketici açısından zararlı olabilir. Bu amaçla hayvanlar üzerinde deneyler yapılarak doz-cevap ilişkisi araştırılır. Yapılan toksikolojik testlerden biri, deney hayvanlarına öldürücü dozda katkı maddesi verilerek gözlem yapılır. Ardından verilen doz miktarı azaltılarak katkı maddesinin emilimi, metabolizması ve atımı incelenir. Deney hayvanlarının yaşamsal fonksiyonları incelenir ve etkileri araştırılır. Çalışmalar sonuçlandığında eğer katkı maddesinin hiçbir yan etkisinin tespit edilemediği bir doz miktarı bulunamazsa bu katkı maddesinin gıdalara katılmasına müsaade edilmez. Eğer deney hayvanları bu testlerden hiçbir olumsuz etki göstermezse, kullanılan bu doz “etkisiz doz” veya NOAEL olarak adlandırılır. NOAEL dozu belirlendikten sonra yaşam süresini % 85’ini alacak süreye bağlı olarak deney hayvanlarıyla çalışmaya devam edilir. Ancak belirlenen doz miktarı deney hayvanının vücut ağırlığının kilogramı başına mg olarak hesaplanmıştır. Belirnen bu dozun insandaki etkileri bilinmemektedir. İnsanlar üzerinde deney yapmak etik olmadığı için bu sebeple hesaplamalarda güvenlik faktörü kullanılır. Bu faktör literatürde 100 kabul edilir. Deney hayvanında herhangi bir etki göstermeyen doz miktarının 1/100’ü insanlar için kabul edilir. ($ADI = NOAEL / 100$). Hesaplama yapılacak olduğunda, insanlar için günlük alınabilecek miktar insanın vücut ağırlığının kilogramı başına mg olacak şekilde belirlenir. Formülle anlatılmak istenirse kısaca, “maksimum alım = $ADI \times \text{vücut ağırlığı}$ ” şeklinde hesaplanır [11].

Gıdaya katılacak katkı maddesinin doz miktarının belirlenmesinde en önemli ikinci etken GMP’dir. GMP kuralları gereği belirlenen miktar ADI değerinin üstüne çıkıyorsa o katkı maddesinin kullanılmasına izin verilmemektedir. Eğer, ADI değeri GMP değeri ile maksimum miktarın üzerine çıkılmıyorsa o katkı maddesinin

kullanımına izin verilmektedir. İzin verilen katkı maddesinin kaç tane ürüne ekleneceği ve o ürünün tüketim miktarı bilinmesi gereken 2 önemli durumdur [10].

JECFA, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ile Gıda ve Tarım Örgütü ile birlikte çalışan üyelerinden oluşan bir gruptur. Bu grup kendi alanlarında gıda katkı maddelerinin toksikolojik testleriyle ilgilenen üyelerden oluşmaktadır. JECFA, test sonuçlarını değerlendirir, GKM'nin spesifikasyonlarını inceler, analiz yöntemleri belirler ve daha sonra bütün verileri uluslararası Gıda Kodeksi Komisyonuna iletir. GKM'leri ile ilgili gruplamalar hazırlanır. ADI değeri belirlenen maddeler A grubunda, belirsizliği olan ve testleri devam eden grup B ve son grup olan C ise olumsuz bakılan maddeleri içermektedir. C grubu olan katkı maddelerinin besinlere katılmasına müsaade edilmemektedir. GKM ile yapılan testler ve elde edilen sonuçlar süreklilik özelliği taşır. ADI değeri, özenle ve kurallar çerçevesinde yapılmasına rağmen zamanla değişebilmektedir. Güncel araştırmalara ve çalışmalara göre bu değer azaltılıp artırılabilir [10, 12].

2.3. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması

Gıda katkı maddeleri kullanım amaçlarına göre kaliteyi koruyarak raf ömrünü uzatanlar, gıdanın dokusunu, hazırlanma ve pişme özelliğini iyileştirenler, aromayı ve rengi geliştirenler ve besin değerini koruyucu ve geliştiriciler olmak üzere 4 grupta incelenmektedir [11].

2.3.1. Koruyucu maddeler

Gıdaların yapısını koruyan ve kullanım ömrünü uzatan antimikrobiyaller (nitrit, nitrat, BA, sorbik asit, kükürt dioksit) ve antioksidanlar (butillenmiş hidrosiyanozil, butillenmiş hidroksitoluen) günümüzde kullanılan başlıca koruyucu maddelerdendir.

2.3.2. Gıdanın kullanım özelliklerini iyileştiren maddeler

Gıdaların işlem görmesi sırasında yapısının bozulmaması, pişme ayarının ayarlanması gibi sebeplerle kullanılan gıda katkı maddelerinden olan asidite düzenleyiciler, gıdanın asit-baz dengesini ayarlamak amacıyla kullanılır. Kullanım amacı, pH değeri ile oynayarak bakteriler gibi gıdayı bozabilecek mikroorganizmaları etkisiz hale getirmek. Silikat, magnezyum oksit, magnezyum karbonat gibi bileşikler gıdanın işlem sırasında topaklanmasını önlemek amacıyla kullanılır. Tuz, şeker gibi toz

karişımların akışkan bir şekilde gıdaya homojen dağılmasını sağlarlar. Lesitin, mono ve digliseritler yuzyey gerilimini azaltıcı yuende etkiye sahiptirler. Emuľgatuor de denen bu maddeler birbirlerine karişmayan mamddelerin homojen dağılmasını sağlar. Kıvam arttırıcı ve tatlandırıcı maddeler, stabilizatouorler olarak adlandırılır. Bu maddeler gıdaya katılan ouzelliklerin sabitlenmesini ve eski hale duonmemesine yardımcı olur. Ouzellikle unlu mamuellerde kullanılan ve mayalanmayı suresini azaltmak, pişme miktarını arttırmak ve yine ueruon kalitesine katkıda bulunmak amacıyla mayalanmayı sağlayan fermentler kullanılmaktadır. Bunlar dışında gıdanın nemini ayarlayan, ham maddeleri olgunlaştıran, rengini ačan, parlatan ouzellikteki maddeler de kullanılmaktadır.

2.3.3. Aroma ve renk sağlayan maddeler

Bir gıdanın lezzeti belirlenirken en ounemli 2 faktuor tat ve kokudur. Aroma veren maddeler tat ve koku duyusuna katkı sağlarken, renk veren maddeler gıdanın guorsel olarak ukekici olmasını sağlar. Aroma ve renklendirici maddeler ekstra lezzet ve koku sağlarken, maddenin kendine has tadı ve kokusunu kaybettirmeden yaparlar. Gıdalar mutfakta hazırlık, pişme, paketlenme gibi aşamalarda rengini kaybedebilirler. Bu sebeple de kullanılan bu maddeler tuuketıcının guormeyi beklediği ueruon rengini duoğal hale getirme sebebiyle kullanılırlar. Monosodyum glutamat, guunumuizde en yaygın kullanılan lezzet veren katkı maddesidir. Tartrazin, indigotin ise en sık kullanılan renk veren maddelerdir. Aspartam ve sakkarin de suni tatlandırıcılara ournektir.

2.3.4. Besin değerini koruyup, geliştiren maddeler

Gıdanın işlem guorduğu sırada kaybolan besleyici değerlerini yerine koyan ve diyettede eksik olabilecek besin maddelerini eklemek amacıyla kullanılır. Bu maddelere ounek: A, D, B1, B2 vitaminleri ve niasin verilebilir.

2.4. Koruyucuların Ouzellikleri ve Etki Mekanizmaları

Esansiyel yağlar, bitkisel ueruonlerden ekstraksiyonla elde edilen duoğal ueruonlardır. Antibikrobiyal ve antioksidan ouzellikleri sebebiyle tercih edilen en yaygın gıda katkı maddelerindendir [13]. Kullanılan GKM'nin uesit ve miktarına bağlı olarak gıdada tat, koku gibi değişimlere sebep olabilmektedirler. Ounek verilecek olursa, az miktarda kullanılmasına rağmen, BA'ler ağıza acımsı bir tat bırakmaktadır [14]. Gıda koruyucu maddeleri sadece yeni ve istenmeyen mikrobik oluşumları engellemekle kalmayıp,

Çevresel faktörler sebebiyle gıdaya bulaşan herhangi bir parazitin çoğalmasına engel de olmaktadır [15].

Mikroorganizmaların çoğalmasını durdurmak ya da onları ortadan kaldırmak için antimikrobiyal maddeler kullanılmaktadır. Kullanılan bu maddeler bazı zamanlarda mikroorganizmalar tarafından çok az miktarları besin olarak kullanılmaktadır. Ancak bu miktarlar diğer mikroorganizmaların yaşamsal faaliyetlerini engelleyebilmektedir [12]. Antimikrobiyal bileşenin özellikleri, gıda üzerine etkisi bakımından önemlidir Polaritesi, sudaki çözünürlüğü, kaynama noktasına etkisi, iyonizasyonu, yüklü veya ntrl olması, hidrofilik özelliklerinin yanısıra lipofilik özelliklere de sahip olması, etki değerini arttırmaktadır. Lipofilik zellik, antimikrobiyalin hidrofobik hücre zarını etkileyebilmesi için önemlidir. Kaynama noktası üzerine etkisi, pişirilen gıdaların devamlılığı açısından avantaj sağlamaktadır. Antimikrobiyal bileşenin iyonize olması, gıdanın pH'ına bağlı olarak aktivitesini etkilemektedir. Mikroorganizma üzerinde etkili olabilmesi ve hücre duvarına rahatça girebilmesi için ise yüksüz veya ntrl olması büyük avantaj sağlamaktadır [12].

Koruyucu maddeler gıdayı oluşturan bileşenlerle tepkimeye girdikçe koruyucu maddenin etkinliğinde azalma meydana gelmektedir. Koruyucu maddenin gıda ile tepkimeye girme oranına bağlı olarak gıdanın yapısında beklenmeyen değişimler meydana gelebilir. Koruyucu maddeler dışında gıdanın içeriğinde de antimikrobiyal ve antifungal özelliğe sahip doğal bileşikler meydana gelebilmektedir [12]. Gıdanın asiditesi arttıa koruyucu maddenin etkinliği buna bağlı olarak artmaktadır. Sorbik asit ve BA'ler düşük pH koşullarında etkindirler. Çünkü düşük pH'da ayrışmamış formdadırlar. Bu sebeple hücre zarından içeriye rahatlıkla nüfuz edebilirler [16]. Koruyucu maddeler mikroorganizmalarla sıvı gıdalarda daha iyi etkileşime geçebilirler. Koruyucu maddelerin katı parçacıklı gıdalarla etkileşime girme kabiliyeti düşük olmalarından dolayı mikroorganizmalar üzerinde daha az etkilidirler [12]. Gıdanın maruz kaldığı sıcaklığın artırılması, mikroorganizmaların kimyasal maddeyle etkileşime girme ihtimalini arttırmaktadır. Besinin sahip olduğu sıcaklığı optimum değere ulaşmasıyla birlikte koruyucu maddenin besin üzerine etkinliği minimum değere ulaşır. Besin sıcaklığının optimum değerinin üzerine çıkması durumunda besinin kimyasal yapısının bozulması kaynaklı koruyucu etkinliği artmaktadır [12].

Kimyasal maddelerin mikroorganizmalarla etkileşime girmesinde süre önemli bir faktördür. Bazı mikroorganizmalar besinlerle çok kısa sürede tepkimeye girebilirken, bazı mikroorganizmalar ise besinlerle daha uzun sürede tepkime girerler. Koruyucuların artan zamana bağlı etkinliklerinin artmasından ötürü uzun sürede tepkimeye giren mikroorganizmalar üzerinde etkilidir [12].

2.5. Gıdalarda Kullanılan Koruyucular Maddeler

Kükürt dioksit ve sülfidler, nitrit ve nitratlar, dimetil dikarbonat, koruyucu gazlar, antibiyotikler ve organik asitler, gıdalarda kullanılan 6 gruptan oluşan koruyucu maddelerdir.

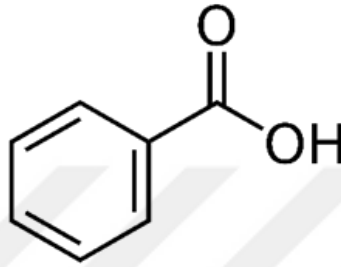
Organik asit ve esterlerine meyvelerde sıklıkla rastlanmaktadır. Bu maddeler fermente et, süt ve sebze ürünlerinde mikrobiyal metabolizmanın ara ya da son ürünü olarak oluşmaktadırlar. Bunlar arasında asetat ve asetik asitler, sorbik asit ve tuzları, BA ve tuzları, parabenler bulunmaktadır. Bu grupta yer alan koruyucular genellikle asit tuzları şeklinde kullanılırlar. Çünkü sulu çözeltilerdeki çözünürlükleri, orijinal hallerine göre daha fazladır. Kullanılan koruyucularının etkileri kullanılan ürünün pH'ına bağlı olarak değişmektedir [17].

2.5.1. Benzoik Asit ve Türevleri

Yıllar önce gıdaların bozulmasını önlemek için organik bir asit olan BA, kullanılmaktaydı. Günümüzde de sıklıkla kullandığımız tarçın, karanfil gibi baharatlarda, kuru erik gibi meyvelerde doğal formunda bulunur. BA çeşitli gıda ve ilaçlarda koruyucu madde olarak kullanılır. BA'in aktif bileşeni ayrışmamış asittir ve maya ve küf gibi istenmeyen mikroorganizmaların üremesine engel olur. Her gün sıklıkla tüketilen asitli ve asitsiz içeceklerde, pasta kremalarında, hazır reçellerde, jölelerde, hazır paket kıyma ve turşu gibi çok çeşitli gıdalarda kullanılır [1]. Mikrobiyal inhibisyon için BA pH 4'ün altında en etkin haldedir. BA'in mikroorganizmalar üzerindeki etkisi, hücre duvarını ve hücredeki bazı enzimleri inaktive etmesiyle gerçekleşir [18]. **Şekil 2.1'**de BA'in yapısal formülü ve **Çizelge 2.1'**de BA'e ait bazı bilgiler verilmektedir.

Çizelge 2.1: Benzoik asit özellikleri.

Diğer Adı	Benzen Karboksilik Asit
Molekül Formülü	C_6H_5COOH
CAS No	65-85-0
Fiziksel Görünüm	Beyaz kristal veya toz
Erime Noktası	122 °C
Kaynama Noktası	249 °C

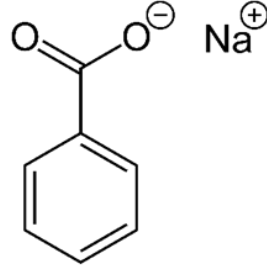


Şekil 2.1: Benzoik asitin yapısal formülü.

BA, sodyum benzoata göre suda daha az çözündüğü için genellikle sodyum benzoat formu gıdalarda koruyucu olarak kullanılmaktadır. Benzenkarboksilik asit sodyum tuzu ve fenilkarboksilikasit sodyum tuzu olarak bilinen sodyum benzoat, küflere karşı etkili değil fakat maya ve bakterilere karşı etkili bir bileşendir. Sodyum benzoatın yapısal formülü **Şekil 2.2**'de gösterilmiştir. Sodyum benzoat 25 °C'de 100 mL suda maksimum 50 g çözünmektedir. BA ise 100 mL suda 0,34 g çözünmektedir. Benzoik asidin mantar ve bakterilere karşı etkisinin maksimum olduğu pH aralığı 2,50 – 4,00 arasındadır. Bu özelliği nedeni ile de sodyum benzoat daha çok karbonatlı içecekler, meyve suları, reçel, marmelat, meyve kokteylleri ve turşular gibi asit veya kolayca asitlendirilebilen gıdalarda kullanılır. Bunların dışında tuzlu margarin ve pastalarda da kullanılabilir [19]. **Çizelge 2.2**'de sodyum benzoata ait genel bilgiler verilmiştir.

Çizelge 2.2: Sodyum benzoatın genel özellikleri.

Diğer Adı	Sodyum Benzoik Asit
Molekül Formülü	C_6H_5COONa
CAS No	532-32-1
Fiziksel Görünüm	Beyaz Toz



Şekil 2.2: Sodyum benzoatın yapısal formülü.

2.6. E-Kodu

Hazır gıdaların ambalajları üzerinde, gıda katkı maddelerinin kullanım amaçlarına göre kategoriler mevcuttur ve Avrupa Birliği ülkelerinde GKM için "E" harfi ve bir sayı sistemi ile yapılmaktadır. Örneğin, renklendiriciler E harfinde 100-180 sayıları arasında kodlanmaktadır. Koruyuculara bakıldığında E harfinde 200-297 sayıları arasında, antioksidanlar E harfinde 300-321 sayıları arasında, emülgatörler ile stabilizatörler E harfinde 222-500 sayıları arasında, asit-baz tedarikçileri E harfinde 500-578 sayıları arasında, tatlandırıcılar ve kokular ise E harfinde 620-637 sayıları arasında olacak şekilde kodlanmaktadır. Örneğin, askorbik asit E300, sorbik asit E200, BA ise koruyucular grubundan E210 kodlu kimyasal bir maddedir [1].

2.7. Gıda Katkı Maddelerinin İnsan Sağlığı Üzerine Etkisi

GKM'lerinin bazı sağlık sıkıntılarına neden olduğu düşünülmektedir. Örneğin, dikkat eksikliği, hiperaktivite gibi zihinsel problemler olduğu üzerine 1970 yıllarında yaygın bir inanıştı. Ancak, genetik çeşitlilik ve alışkanlık faktörlerine bakılmaksızın yapılan deneysel çalışmalar sonucunda gıda renklendiricilerin çocuklarda hiperaktiviteye ya da dikkat eksikliğine sebep olmadığı görülmüştür. Ancak bazı GKM'leri, alerji, cilt problemleri, davranış bozuklukları, baş ağrısı, astım, migren, uyku problemlerine neden olduğu fark edilmiştir [20]. Gıda katkı maddesi olarak kullanılan nitrit ve nitratlar, nitrozaminleri meydana getirmektedir. Bu maddeler de kanser yapıcı özellik taşımakla birlikte kanın oksijen taşıma kapasitesini de azaltmaktadır. Bilinen bütün olumsuzluklara rağmen bu maddelerin GKM olarak kullanılmaya devam etmesi insanların beslenmesinde büyük yer tutan et ürünlerini piyasada tutulamayacağı düşünülmektedir. Çünkü nitrit kullanımı, sucuk, salam gibi işlenmiş et ürünlerini korumaktadır. Eğer nitrit kullanmadan et ürünü piyasaya çıkarılırsa etin renginin kötü ve lezzetsiz olacağı, kullanım süresinin azalacağı ve bu

sebeple toksik etki yaratacağına dair endişeler mevcuttur. Bu endişeleri azaltmak için nitrit kalıntısını ve nitrozamin oluşmasını en aza indirecek araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmalar sonucunda tokoferoller, askorbik asit ve laktik asit ile bazı bakterilerin nitrozamin oluşumunu engellediği ortaya çıkmıştır. Koruyucu katkı maddelerinden olan BA de astım, cilt problemleri ve hiperaktiviteye neden olmaktadır. Bu sebeple kullanımı sınırlandırılmıştır. Ancak bu sınırlara zaman zaman uyulmamaktadır. Örneğin, Türkiye'de üretilen bazı meyve sularında BA miktarının izin verilen değerin üzerine çıktığı raporlanmıştır [20]. Sodyum meta bi sülfid ise bisküvi, gofret, kek, kurabiye, patates cipsi ve sirkede bulunur. Sebep olabileceği sağlık sorunları arasında, astımlı hastalara astım atağı, bakterilerde mutasyon ve tiamine zarar vermesi yer almaktadır. Sodyum guanilat ve sodyum inosinat, et ürünleri, et suyu tabletleri, soya ürünleri ve hazır çorbalarda bulunur. Tüketildiği takdirde gutu şiddetlendirebilir. Son olarak mono sodyum glutamat, hazır çorbalarda, et ürünlerinde, çerezlerde, patates cipsi ve soslarda bulunur. Günlük alım miktarını aşma durumunda baş dönmesi ve çarpıntı gibi sağlık sorunlarına neden olur [21].

2.8. Şuruplarda Kullanılan Koruyucu Maddeler

Koruyucular, mikrobiyal büyümeyi en aza indirmek için şurup ürünlerine yaygın olarak eklenir. Konsantrasyon, pH, tat, koku ve çözünürlük gibi özelliklerine göre bir koruyucu seçilir. Şuruplar hazırlanırken ve depolama süresi belirlenirken koruyucu maddelerin etkinlik analizleri yapılır.

Şuruplar çevresel koşullardan kolay etkilenebildiği için tüketim süreleri kısadır. Şurupların korunması için bozulmalarına sebep olan mikroorganizmalara karşı koruyucu maddeler kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan koruyucu madde nipa esterleridir. Bunun dışında gliserin, BA ve türevleri de koruyucu olarak kullanılmaktadır.

Kullanılan koruyucu maddeler gıdalardakine benzerlik göstermektedir. Koruyucuların çeşitleri, etki mekanizmaları, insan sağlığı üzerinde etkileri önceki başlıklarda anlatıldığı gibidir [22].



3. KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLER

Kromatografi ilk kez Rus botanikçi Mikhail Tsvett (1903) tarafından geliştirilmiştir. Tsvett, bitki pigmentlerinin renkli bileşenlerini (klorofil A, klorofil B ve ksantofil) ayırmak için bu yöntemi kullanmıştır. Kullanmış olduğu kolonda renkli bandlar oluştuğu için bu ayırma yöntemine kromatografi adını vermiştir. Kromatografinin kelime anlamı renk yazımıdır. Yunanca'da chromatus: renk ve graphein: yazmak anlamına gelmektedir [23].

Önceleri, bitkisel pigmentlerde olduğu gibi, maddeleri renklerine göre ayırmak için kromatografik teknikler kullanılmıştır. Zamanla uygulama alanı oldukça genişlemiştir. Günümüzde kromatografi son derece hassas ve etkili bir ayırma yöntemi olarak kabul edilmektedir. Kolon kromatografisi yararlı ayırma ve belirleme yöntemlerinden biridir.

Durağan faz, hareketli faz ve karışımın içerdiği maddeler arasındaki etkileşim türü, moleküllerin birbirinden ayrılmasında etkili olan temel bileşendir. Bölünmeye dayalı kromatografi yöntemleri, amino asitler, karbohidratlar ve yağ asitleri gibi küçük moleküllerin ayrılmasında ve tanımlanmasında çok etkilidir. Ancak afinite kromatografileri (yani iyon değişim kromatografisi), makromoleküllerin nükleik asitler ve proteinler olarak ayrılmasında daha etkilidir. Kağıt kromatografisi proteinlerin ayrıştırılmasında ve protein sentezi ile ilgili çalışmalarda kullanılmaktadır; gaz-sıvı kromatografisi alkol, ester, lipid ve amino gruplarının ayrılmasında ve enzimatik etkileşimlerin gözlemlenmesinde kullanılırken, moleküler elek kromatografisi özellikle proteinlerin moleküler ağırlıklarının belirlenmesinde kullanılır. Agaroz-jel kromatografisi RNA, DNA partikülleri ve virüslerin saflaştırılması için kullanılır [24].

Kromatografide durağan faz, bir katı fazın yüzeyi üzerine kaplanmış bir katı faz veya bir sıvı fazdır. Sabit fazın üzerinden akan hareketli faz, gaz veya sıvı fazdır. Hareketli faz sıvı ise sıvı kromatografisi (LC), gaz ise gaz kromatografisi (GC) olarak adlandırılır. Gaz kromatografisi, gazlar ve uçucu sıvıların ve katı maddelerin karışımları için uygulanır. Sıvı kromatografisi özellikle termal olarak kararsız ve uçucu olmayan numuneler için kullanılır [25].

Ayırma dışında bir nicel analiz yöntemi olarak kullanılan kromatografinin uygulanmasındaki amaç, uygun bir zaman aralığında tatmin edici bir ayırma elde etmektir. Bu amaçla çeşitli kromatografi yöntemleri geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları kolon kromatografisi, ince tabaka kromatografisi (TLC), kağıt kromatografisi, gaz kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve afinite kromatografisini içerir [26].

3.1. Kolon Kromatografisi

Proteinlerin büyüklük, şekil, net yük, kullanılan durağan faz ve bağlanma kapasitesi gibi farklı karakteristik özellikleri olduğundan, bu karakteristik bileşenlerin her biri kromatografik yöntemlerle saflaştırılabilir. Bu yöntemler arasında en sık olarak kolon kromatografisi uygulanmaktadır. Bu teknik, biyomoleküllerin saflaştırılması için kullanılır. Bir kolona (sabit faz) önce ayrılacak numune, ardından yıkama tamponu (mobil faz) uygulanır. Fiberglas destek üzerine yerleştirilen kolon içi malzeme ile akışları sağlanır. Numuneler zaman ve hacme bağlı olarak cihazın alt kısmında toplanır [27].

3.2. İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişim kromatografisi, yüklü protein grupları ile katı destek malzemesi arasındaki elektrostatik etkileşimlere dayanır. Matriks, ayrılacak proteininkine zıt bir iyon yüküne sahiptir ve proteinin kolona afinitesi iyonik bağlarla sağlanır. Proteinler, pH, iyon tuzlarının konsantrasyonu veya tampon çözeltisinin iyonik kuvveti değiştirilerek kolondan ayrılır [28]. Pozitif yüklü iyon değişim matrislerine anyon değişim matrisleri denir ve negatif yüklü proteinleri adsorbe eder. Negatif yüklü gruplarla bağlı matrisler ise katyon değişim matrisleri olarak bilinir ve pozitif yüklü proteinleri adsorbe eder.

Bu yöntemin temel prensibi, makromolekülleri moleküler boyutlardaki farklılıklarına göre ayırmak için dekstran içeren materyaller kullanmaktır. Bu prosedür temel olarak proteinlerin moleküler ağırlıklarını belirlemek ve protein çözeltilerinin tuz konsantrasyonlarını azaltmak için kullanılır [29]. Bir jel-geçirgenlik kolonunda durağan faz, küçük gözenekli inert moleküllerden oluşur. Farklı boyutlarda moleküller içeren çözelti, kolondan sabit bir akış hızıyla sürekli olarak geçirilir. Gözeneklerden daha büyük moleküller jel partiküllerine nüfuz edemezler ve sınırlı bir alanda

partiküller arasında tutulurlar. Daha büyük moleküller, gözenekli parçacıklar arasındaki boşluklardan geçer ve kolonun içinde hızla hareket eder. Gözeneklerden daha küçük moleküller gözeneklere difüze olur ve moleküller küçüldükçe kolondan orantılı olarak daha uzun tutma süreleriyle ayrılırlar [30]. Sephadex G tipi en sık kullanılan kolon malzemesidir. Ayrıca kolon malzemesi olarak dekstran, agoroz, poliakrilamid de kullanılmaktadır [31].

3.3. Afinite Kromatografisi

Bu kromatografi tekniği enzimlerin, hormonların, antikorların, nükleik asitlerin ve spesifik proteinlerin saflaştırılması için kullanılır [32]. Spesifik protein (dekstran, poliakrilamid, selüloz vb.) ile kompleks oluşturabilen bir ligand, kolonun dolgu maddesine bağlanır. Ligand ile kompleks oluşturan spesifik protein, katı desteğe (matris) bağlanır ve kolonda tutulur, serbest proteinler ise kolonu terk eder. Daha sonra bağlı protein, pH'ın değiştirilmesi veya bir tuz çözeltisinin eklenmesi yoluyla iyonik gücünü değiştirerek kolonu terk eder [33].

3.4. Kağıt Kromatografisi

Kağıt kromatografisinde destek malzemesi, suyla yüksek oranda doymuş bir selüloz tabakasından oluşur. Bu yöntemde, desteği kalın bir filtre kağıdı oluşturunca ve gözeneklerine yerleşen su damlaları, sabit "sıvı fazı" oluşturunca. Mobil faz, bir geliştirme tankına yerleştirilen uygun bir sıvıdan oluşur. Kağıt kromatografisi bir "sıvı-sıvı" kromatografisidir [34].

3.5. İnce Tabaka Kromatografisi

İnce tabaka kromatografisi, bir "katı-sıvı adsorpsiyon" kromatografisidir. Bu yöntemde sabit faz, cam plakalar üzerine kaplanmış katı bir adsorban maddedir. Adsorban malzeme olarak tüm katı maddeler kullanılmıştır. kolon kromatografisinde (alümina, silika jel, selüloz) kullanılabilir. Bu yöntemde, hareketli faz, sabit faz boyunca yukarı doğru hareket eder. Çözücü, kapiler etki yoluyla, çözücü ile ıslatılmış ince plaka üzerinde yukarı doğru hareket eder. Bu işlem sırasında ayrıca daha önce plakanın alt kısımlarına damlatılan karışımı bir pipet ile farklı akış hızlarıyla yukarı

doğru iter. Böylece analitlerin ayrılması sağlanır. Bu yukarı doğru hareket hızı, malzemenin, katı fazın ve çözücünün polaritesine bağlıdır [35].

Numunenin moleküllerinin renksiz olduğu durumlarda, floresans, radyoaktivite veya belirli bir kimyasal madde, kromatogram üzerindeki konumlarını belirlemek için görünür renkli bir reaktif ürün üretmek için kullanılabilir. Oda ışığı veya UV ışığı altında görünür bir renk oluşumu gözlemlenebilir. Karışımındaki her molekülün konumu, molekül ve çözücü tarafından kat edilen mesafeler arasındaki oran hesaplanarak ölçülebilir. Bu ölçüm değerine bağlı hareketlilik denir ve Rf sembolü ile ifade edilir. Rf değeri, moleküllerin nitel olarak tanımlanması için kullanılır [36].

3.6. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Bu kromatografi tekniği ile kısa sürede birçok molekülün yapısal ve fonksiyonel analizi ve saflaştırılması yapılabilmektedir. Biyolojik olarak aktif moleküller, HPLC'de mobil faz yardımıyla, kolonlardan 10-400 atmosfer basıncı altında ve yüksek (0,1-5 cm/sn) akış hızıyla geçer. Bu teknikte küçük partiküllerin kullanılması ve solvent akış hızına yüksek basınç uygulanması HPLC'nin ayırma gücünü artırır ve analiz kısa sürede tamamlanır.

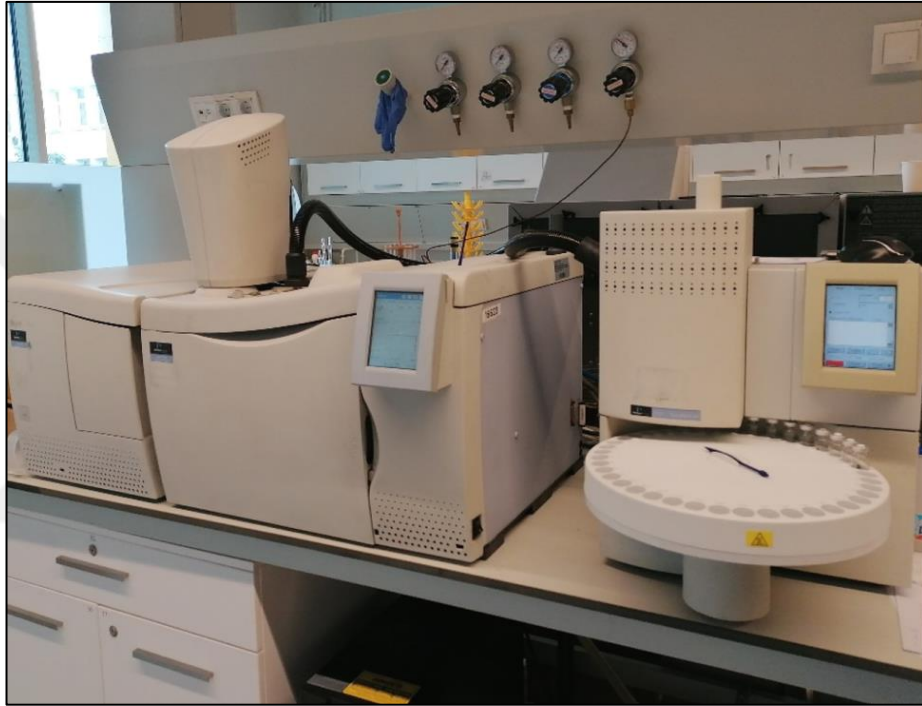
Bir HPLC cihazının temel bileşenleri solvent deposu, yüksek basınç pompası, ticari olarak hazırlanmış kolon, dedektör ve kaydedicidir. Ayırma süresi bilgisayarlı bir sistem yardımıyla kontrol edilir ve malzeme tahakkuk ettirilir [37].

3.7. Gaz Kromatografisi (GC)

Gaz kromatografisi bir "gaz-sıvı" kromatografisidir. GC, bir karışımda gaz halinde bulunan veya kolayca buharlaştırılabilen bileşenlerin tespiti ve tayini için kullanılan bir yöntemdir [38]. Bir gaz kromatografisinin ana hatlarıyla çalışma prensibi, numunenin sisteme verilmeden ısıtılmış olan bir giriş yerinde uçucu hale getirilmesi, karışımın bileşenlerinin daha verimli ayrılması için uygun ve özel olarak hazırlanmış bir kolonda ayrılması ve uçucu her bir bileşenin seçilmiş uygun bir dedektör tarafından saptanması ve tanımlanmasını içerir.

Numuneyi enjektörden kolona ve ardından dedektöre ulaştırmak için kullanılan helyum gibi inert bir taşıyıcı gaz, gaz kromatografisinin önemli özelliğinden biridir. Ayırma amacıyla kullanılan kolon veya kolon dolgusu, sabit bir faz kaplaması içerir.

Numunedeki bileşenlerin ayrılması, her bileşenin taşıyıcı gaz (hareketli faz) ile sabit faz arasındaki alıkonma süresi ile belirlenir. Sabit fazda az zaman harcayan numunedeki herhangi bir bileşen hızlı bir şekilde kolondan ayrılacaktır. GC analizi, buharlaştığında bozunmayan maddeler için kullanıma uygundur. Bu nedenle gaz kromatografleri cihazları, transfer hatlarını ısıtan ve kolonun programlı sıcaklık kontrolünü sağlayan, numunenin enjektörde verilerek, dedektöründe saptanan sistemlerdir [39]. **Şekil 3.1**'de laboratuvarımızda kullanılan bir headspace gaz kromatografi kütle spektrometresi örneği gösterilmektedir.



Şekil 3.1: Headspace Gaz Kromatografi Kütle Spektrometresi.

Farklı kaynama noktalarına, polariteye ve adsorpsiyon özelliklerine sahip bileşenler, dağılım sabitleri arasındaki farka bağlı olarak GC kolonunda etkin bir şekilde ayrılabilirler [40].

Analizler sırasında GC kullanmak numunedeki uçucu bileşiklerin tespit ve tayini için oldukça kolay ve verimli bir yöntemdir. Bu cihaz ile ppm ve ppb derecesinde hassas ölçümler yapılmakla beraber kullanılan numune miktarı μL seviyesindedir. Analiz süresi diğer yöntemlere göre kısa ve güvenilirdir. Hareketli faz olarak gaz kullanılması ve numuneler hazırlanırken kimyasallardan çok az miktarlarda kullanılması maliyetinin de uygun olmasını sağlamaktadır [41].

GC, sadece uçucu veya uçucu hale getirilebilen maddeler için uygulanabilmektedir. Termal olarak kararsız numuneler için analiz yapmak zordur. Bileşiklerin yapısal özelliklerini belirleyebilmek için ise MS gibi spektroskopik yöntemler gerekebilir. GC cihazının kullanım alanları oldukça yaygındır. En başta ilaç sanayide tercih edilmektedir. Çünkü kalite kontrol bölümünde, hammadde ve bitmiş ürün laboratuvarında, organik çözücülerin atıklarının analizinde, çevresel analizlerde uçucu bileşenlerin varlığı oldukça fazladır. Gıda sanayide aroma ve tatlandırıcı analizlerinde, adli tıpta toksikoloji laboratuvarında, petrol sanayi firmalarında, kimyasal ve endüstriyel üretim tesislerinde ve çevre ile ilgili analizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır [41].

3.7.1. Kolon Çeşitleri

Bir gaz kromatografisinde, sabit bir faz içeren ısıtılmış içi boş bir tüp (kolon) içinde ayırma meydana gelir [42]. Hazırlanan numune önce headspace'de buharlaştırılır daha sonra hareketli faz olarak bilinen taşıyıcı gaz ile sisteme verilir. Taşıyıcı gaz, içinde sabit fazın bulunduğu kolondan geçen numuneyi alır [40]. Hareketli faz, inert olmalıdır ve numune bileşenlerini etkilemeden numuneyi sabit faza getirerek bağıl buhar basınçlarına ve afinitelerine bağlı olarak sırayla kolondan ayrılırlar [40].

GC'de kullanılan kolonlar ilk yıllarda, bakır, paslanmaz çelik, camdan veya alüminyumdan yapılmış ince sabit faz tabakası ile kaplanmış inert katı parçalarla doldurulmuştur. Bunlara dolgu kolon adı verilir. Uzunluğu genellikle 2 – 3 m olmakla beraber iç çapı da 2 – 4 mm arasındadır [42].

Açık borulu kolonlara kapiler kolonlar denir. Günümüzde yaygın kullanılan kapiler kolonlar, diğer kolonlara göre daha düşük gaz akış direncine, daha küçük iç çapa ve daha uzun tüp boyuna sahip olmasından dolayı daha yüksek ayırma verimliliğine sahiptirler. Kapiler kolonlar yapılış şekillerine ve içeriklerine göre 3 gruba ayrılır. Kolonun içinin ince sıvı bir film ile kaplı olması WCOT (Wall Coated Open Tubular) modelini oluşturur. WCOT kolonunun yeni versiyonuna da FSOT (Fused Silica Open Tubular) adı verilir. Bu kolonun içi erimiş silika jel ile kaplı olup diğerlerine göre esneklik özelliği vardır. SCOT (Support Coated Open Tubular) kolonu ise önce iç destek materyali ile kaplanıp daha sonra sabit faz ile doldurulmuştur [40]. **Şekil 3.2'**de bu çalışmada kullanılan çapraz bağlı carbowax-PEG yapısına sahip bir FFAP GC kolonu gösterilmektedir.



Şekil 3.2: Çapraz bağlı carbowax-PEG yapısına sahip FFAP GC kolonu.

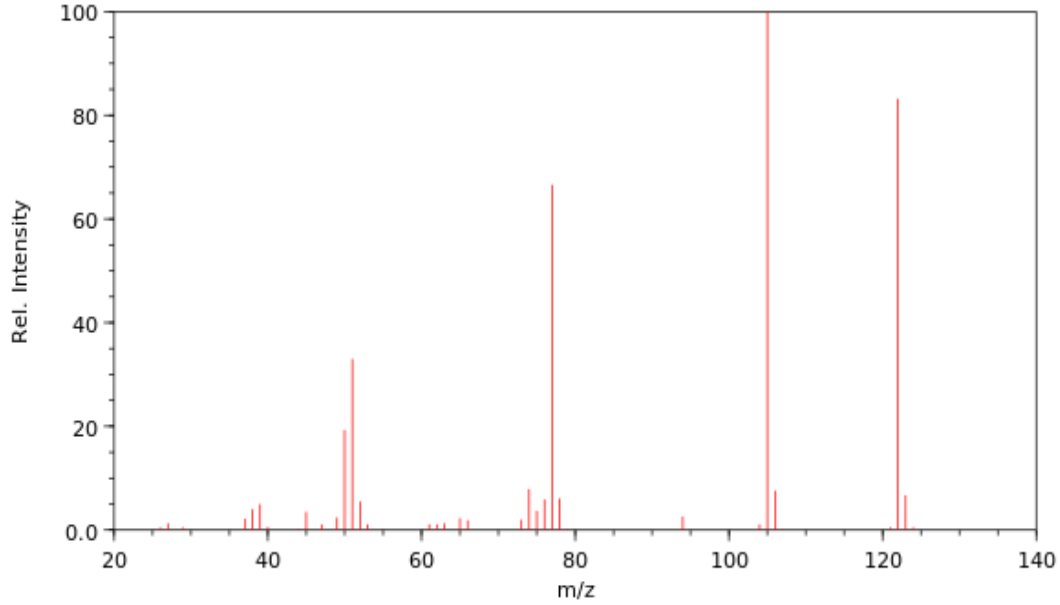
3.7.2. Dedektör Çeşitleri

Numune karışım maddeleri, GC kolonundan ayrıldıktan sonra sinyallerin kaydedildiği dedektöre ulaşırlar [40]. Dedektör, ayrılan maddeleri algılayıp, zamanın bir fonksiyonu olacak şekilde sonuç verirler. Bu aşamalarda dedektörün duyarlılığının yüksek olması, gaz akış hızından etkilenmemesi için önem arz eder [43]. Gaz kromatografisinde en sık kullanılan dedektörler [44, 45]:

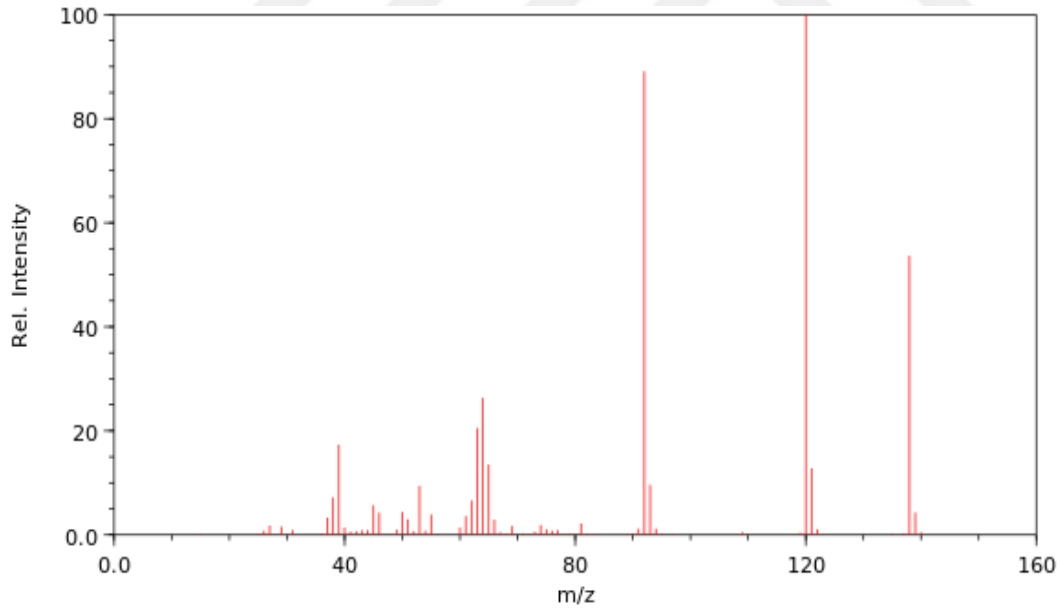
- a) Kütle Spektrometresi (MS)
- b) Alev İyonlaştırıcı Dedektörü (FID)
- c) Fotoiyonlaşma Dedektörü (PID)
- d) Elektron Yakalama Dedektörü (ECD)

MS dedektörleri, yüksek tanımlama gücü ve artırılmış seçicilik sunan, karmaşık numunelerin analizinde eşsiz çözünürlük sağlayan cihazlardır. Bu aynı zamanda veri toplama ve yorumlamanın çok daha karmaşık olmasına ve doğru tanımlamayı sağlamak için doğrulanmış bir kütüphanenin gereksinimine neden olur [46]. MS, gaz fazındaki her iyonik türün boyutunu ve iyonların kütle/yük oranını (m/z) ölçmesini sağlayan bir araçtır. Ölçüm, bilinen m/z iyonlarına karşı kalibre edilmektedir [39]. GC/MS'de kalibre edilen birim Dalton veya atomik kütle birimidir ve bu nedenle yük her zaman 1 kabul edilir. Tüm kütle spektrometreleri, yüklü parçacıklar üzerindeki elektrik veya manyetik alanların etkileşimi ile çalışır ve bir vakum ortamında gaz fazı

iyonlarını ayırır [39]. NIST (National Institute of Standards and Technology) kütüphanesine ait BA ve SA spektrum örnekleri **Şekil 3.3** ve **Şekil 3.4**'te verilmektedir.



Şekil 3.3: NIST kütüphanesinde görüntülenen benzoik asit kütle spektrumu.



Şekil 3.4: NIST kütüphanesinde görüntülenen salisilik asit kütle spektrumu.

MS, karmaşık numunelerdeki düşük konsantrasyonlardaki hedef bileşiklerin analizi için uygundur ve gaz kromatografisinin araştırma laboratuvarlarının yanı sıra rutin analiz laboratuvarlarında hızla benimsenmesine önemli ölçüde katkıda bulunmuştur [47].

GC-MS, düşük moleküler ağırlıklı ve uçucu bileşiklerin tespitinde ve ayrıca termal olarak kararsız veya uçucu olmayan bileşikleri, metabolit kapsamlı amino asitler, organik asitler, şekerler (monosakkaritler ve disakkaritler), aminler, alkoller ve amitler gibi nispeten polar bileşikleri türevlendirdikten sonra analiz edebilmektedir.

Elektron çarpma iyonizasyon (EI) kaynağının kullanılması, GC-MS için güçlü bir avantaj sağlar [48]. Kütle spektrometresi, ayrılmış bileşikleri iyonize parçalara ayırarak, kütle/yük oranıyla tespit ederek moleküler tanımlar. Her bileşiğe özgü spektrumlar elde edilirken, cihaza ait kütüphane bu bileşikleri tanımlar [49]. Elde edilen bu veriler, gaz kromatografi kütle spektrumu olarak adlandırılır ve orjinal numuneyi oluşturan her bileşiğin bağlı bolluğu hakkında bilgi verir [50].

3.7.3. Headspace Çalışma Prensibi

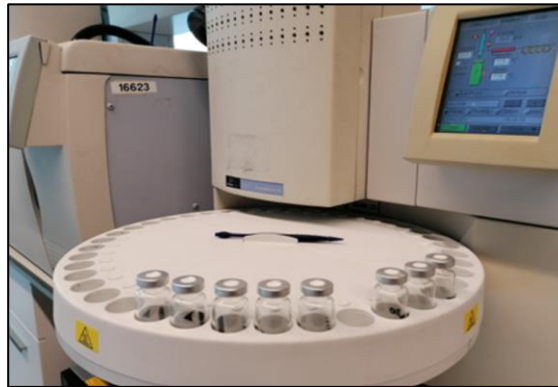
Headspace GC sistemi, katı, sıvı ve gaz örneklerinde uçucu ve yarı uçucu organikleri kalitatif ve kantitatif olarak analiz etmek için kullanılır. Headspace analizinde numuneler

Şekil 3.5'te görülen viallere konulur. Ağız sızdırmaz bir şekilde doğru kapak ve septa seçilip vialler kapatılır. Hazırlanan vialler **Şekil 3.6**'te görülen karusel denilen bölmeye yerleştirilir. HS cihazının analizi ise manuel veya otomatik araçlar kullanılarak gerçekleştirilebilir. HS sisteminde analitin gaz fazına geçmesi için ısıtma işleminde bekleme süresi oldukça önemlidir. Genellikle 15 dk olarak belirlenen bu süre metot optimizasyonu sırasında değişiklik gösterebilmektedir [51]. HS fırınındaki analizinde mevcut sistemin 4 temel dikkat edilmesi gereken bölümü vardır. Bunlar, gaz geçirmez şırıngalar, bir şırınganın içini kaplayan elyaf, zaman kontrolü ve dengeli basınç sistemidir. Her bölüm, analizi yapılacak ürün için optimize edilmeli veya ürünün yapısına göre seçilmelidir [51].



Şekil 3.5: 20 mL HS vial örnekleri.

Tipik bir modern cihazın termostatının sırayla analiz edilecek bir dizi numune vialini tutabildiği kaydedilmiştir. Daha eski tasarımlarda, bu vialler aynı anda termostata yüklenmiş ve bu nedenle daha sonra numuneler gereğinden fazla ısıtılmasına neden olmuştu. Genel olarak, gerçek termostatlama süresi belirtilen süreden daha uzunsa, analitik sonuçları değişmeyecektir. Dengeleme için gereken süre, bazı numuneler için uzun süreli ısıtmaya duyarlı olabileceğinden, aşırı uzun termostatlama dan kaçınılmalıdır. Diğer olasılık, bir viali analiz etmek ve hemen bir başkasını yerleştirmektir. İkinci numunenin dengelenmesini başlatmayı, birincinin analizinin tamamlanmasına kadar ertelemek, gereksiz bir zaman ve numune verimi kaybına neden olacaktır. Bu sorun, sabit termostatlama modu ile çözülür. Karusele yerleştirilen şişeler, aynı süre boyunca ısıtılmaları için önceden belirlenmiş bir zamanda otomatik olarak termostata yüklenir. Bu çalışma modu oldukça önemlidir. Bazen uzun dengeleme süresi olan HS-GC'nin en aza indirir. Bir dizi numunede, yalnızca ilki tüm dengeleme süresini beklemek zorundayken, sonraki vialler kromatografik döngü süresine eşit bir zaman gecikmesiyle sırayla termostata aktarılır. Birçok vial böylece termostatlama süresinin döngü süresine oranına bağlı olarak termostatta aynı anda mevcut olabilir. Birinci vialin analizi bittiğinde, ikinci vialin analizi hemen başlar. Bu nedenle, uzun dengeleme süreleri, bir dizi numunenin otomatik çalışmasında numune verimini etkilemez. Bu çalışma modu ayrıca tüm numuneler için sabit bir dengeleme süresi sağlar. Bu, koşulların mümkün olduğunca yakın bir şekilde yeniden oluşturulması gereken, daha uzun bir süre boyunca yeterince kararlı olmayan numuneler için önemlidir. Farklı numuneler söz konusu olduğunda, en uzun termostatlama süresi ayarlanabilir, ancak sadece termostatlama süresinin en azından dengeye ulaşması için minimum süre kadar uzun olması önemlidir [51].



Şekil 3.6: Karusel (Headspace vial bölümü).

HS analizleri özellikle doğrudan sıvı olarak verilemeyecek biyolojik veya çevre numuneleri için kullanılmaktadır. Atık su ve kontamine arazi örneklerinde, ambalaj malzemeleri, tekstil, plastik ürünler ve ilaçta kalıntı solvent analizlerinde, kan alkolü ve toksikoloji taramasında, yiyecek ve içeceklerden aroma bileşenleri ve yağlardan tanısız gaz analizi gibi çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [51].

3.7.4. İç Standart Yöntemi

Kromatografik analizlerde yaygın olarak uygulanan kalibrasyon yöntemi, iç standart yöntemidir. İç standart seçilirken numunede bulunmamasına dikkat edilir. Seçilen iç standart kimyasal özelliği analitle benzer olmalıdır. Aynı kromatografik koşullarda benzer tepkiler vermelidir. Ama verdiği sinyal ile analit sinyali çakışmamalıdır. Bu yüzden alıkonma zamanı ve m/z değerlerine dikkat edilmelidir [52].

Yapılan analizlerde bilinen konsantrasyonda hazırlanan iç standart, numuneye, şahit çözeltisine ve standart çözeltilerine aynı oranda eklenir. Kalibrasyon standart çözeltilerinden elde edilen analit sinyali iç standart sinyaline oranlanıp, analitin bilinen ve hazırlanmış konsantrasyonuna karşı kalibrasyon grafiği çizilir. Grafikten elde edilen denklemden yararlanarak da analit derişimi belirlenir. İç standart, değişen ortam şartlarından numune gibi etkileneceği için bu durum, alınan sonuçlardaki sistemsel ve rastgele hataları en aza indirmektedir [52] .

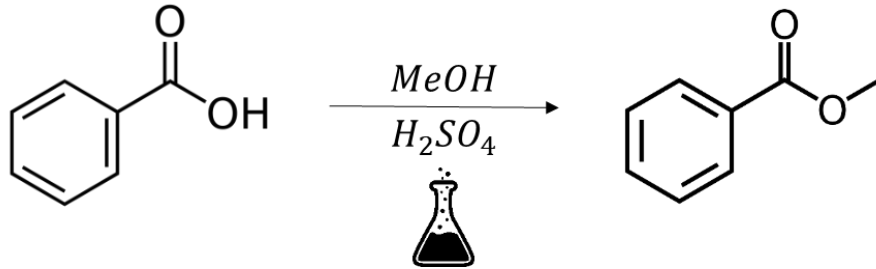


4. DENEYSEL KISIM

Bu bölümde analizlerde kullanılan materyaller, kimyasallar, HS-GC-MS cihazında metot geliştirilmesi sırasında uygulanan sıcaklık ve asit konsantrasyonu ile ilgili optimizasyonlar, kromatografik bilgiler, standart ve numune hazırlıkları ve metot validasyon parametreleri yer almaktadır.

4.1. Türevlendirme İşlemi

Analitik çalışmalarda, çoğu zaman analitin yapısı kullanılacak analitik yöntemeye uygun olmayabilir. Analize uygun özelliklere sahip yeni bir bileşik oluşturmak için, analitin yapısı uygun reaktifler ile değiştirilebilmektedir. Bu süreç "türevlendirme" olarak adlandırılır. BA bu yöntemle doğrudan tayin edilemediği için metanol ve sülfürik asit katalizörü kullanılarak metil benzoat esterine türevlendirilerek optimize edilen koşullarda ölçümler yapılmıştır. Türevlendirme tepkimesi **Şekil 4.1**'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1: Benzoik asitin türevlendirme tepkimesi.

4.2. Gerçek Örnekler

Bu çalışmada araştırma materyalini İstanbul'da marketlerde satışa sunulan ticari hazır paket çocuk devam sütleri, hazır paket sütler ve pediatrik şuruplar oluşturmuştur. Ele alınan 3 tane devam sütü, 6 tane kutu süt örneğinde ve 2 tane pediatrik şurup örneğinde

geliştirilen yöntemle BA tayini yapılmıştır. **Çizelge 4.1**'de analiz sırasında kullanılan süt ve şurup örneklerinin son kullanma tarihleri ile ilgili bilgiler gösterilmiştir.

Çizelge 4.1: Kullanılan materyallerin kullanım süreleri.

Ürün Adı / No.	Son Kullanma Tarihi
Çocuk Devam Sütü	
1. Örnek	09.2022
2. Örnek	09.2022
3. Örnek	05.2022
Normal Süt	
1. Örnek	08.2022
2. Örnek	09.2022
3. Örnek	07.2022
4. Örnek	08.2022
5. Örnek	09.2022
6. Örnek	08.2022
Pediatrik Şurup	
1. Örnek	08.2023
2. Örnek	09.2025

4.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Yüksek saflıkta BA (Sigma Aldrich, saflık %99,90) ve SA standartları ile çalışılmış olup standart ve numuneleri seyreltmek için metanol (Sigma Aldrich), asit dengesini sağlamak için sülfürik asit (Fisher, saflık %95) tercih edilmiştir. Sülfürik asit çözeltisi hazırlığında kullanılan saf su Millipore Milli-Q su saflaştırma cihazından temin edilmiştir.

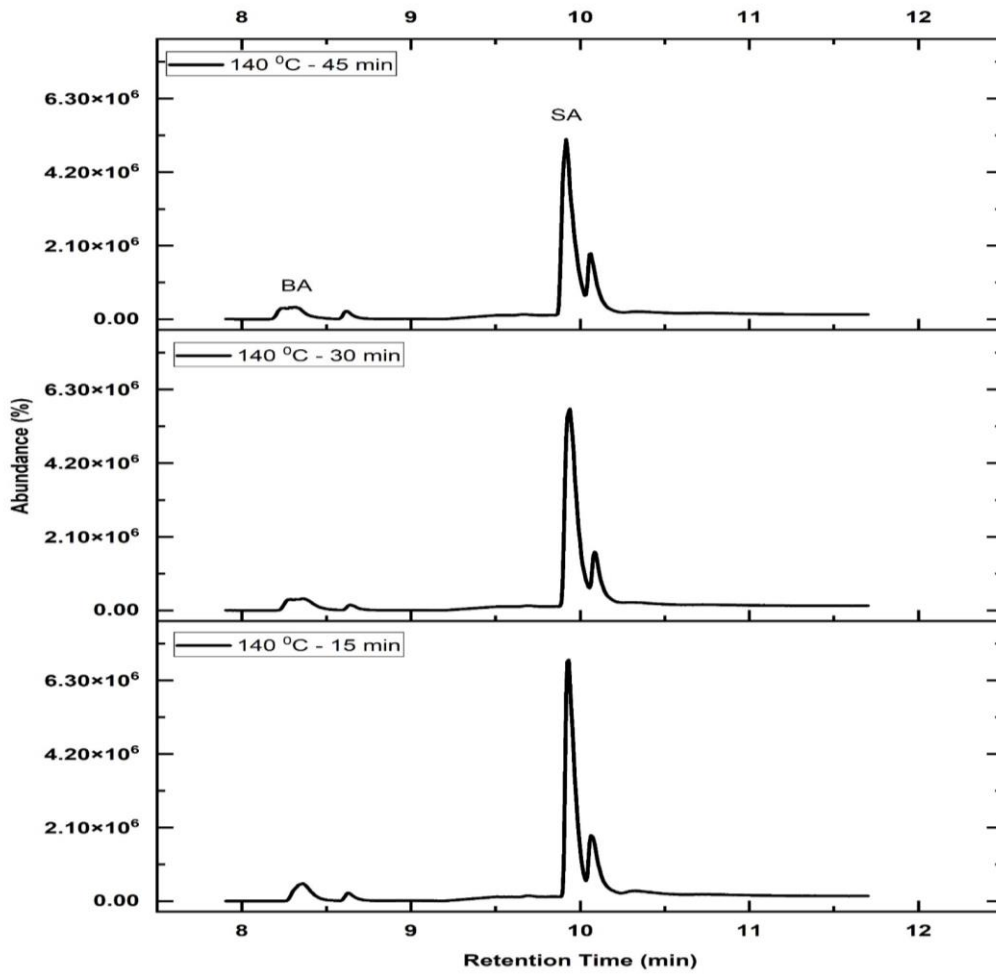
4.4. Optimizasyonlar

Bu bölümde HS fırın sıcaklığı ve numunenin ısınma süresinin optimizasyonu, kullanılan asit konsantrasyonunun optimizasyonu ve kullanılan kimyasalların ve vialdeki numune hacmi miktarlarının optimizasyonunun grafikler yardımıyla anlatımı mevcuttur.

4.4.1. Sıcaklık optimizasyon aşamaları

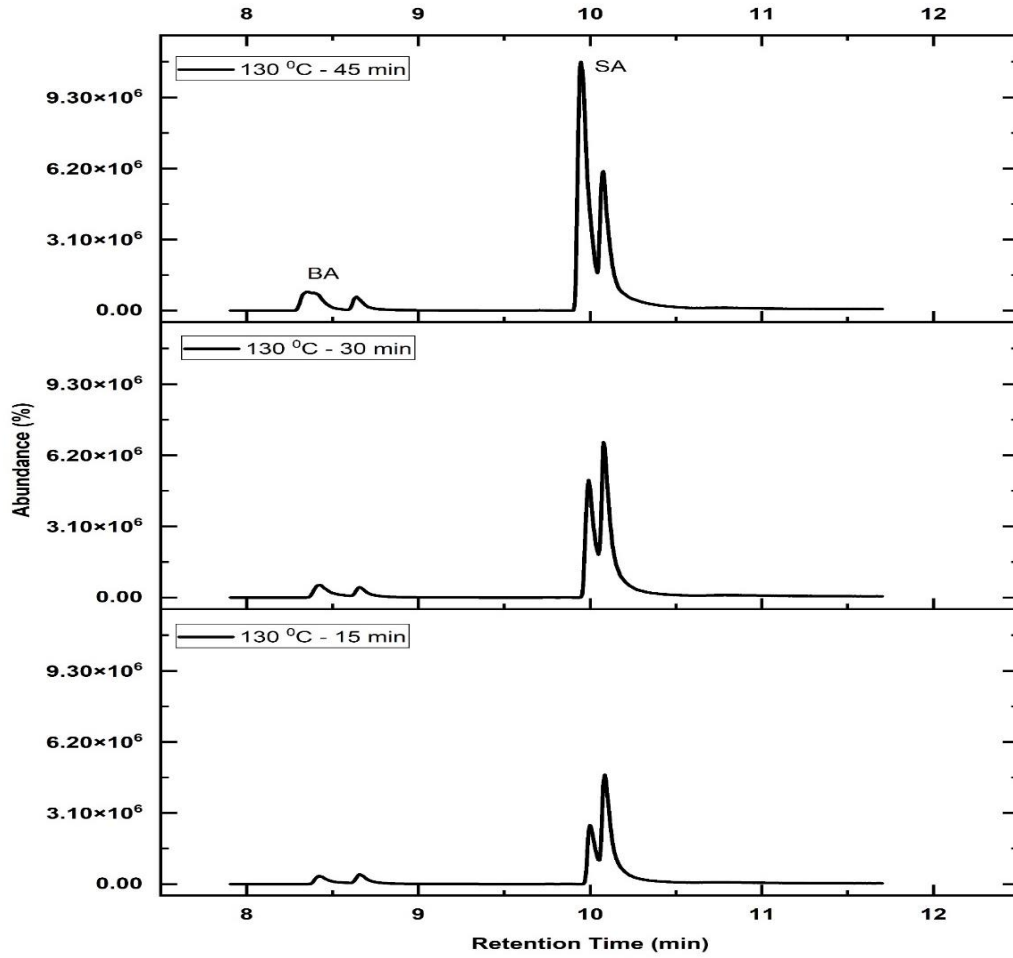
Analiz sırasında viallerde BA için türevlendirme işlemi gerçekleştirilmektedir. Bu işlem sırasında HS bölümünde vialler belli bir süre ısıtılmakta ve buhar haline gelerek GC bölümüne geçmektedir. Kolonda ayrımı gerçekleşen bileşenler önce MS dedektörüne ulaşır daha sonra bilgisayar sisteminde kromatogram olarak sonuç vermektedir. İlk

ıkan sonuçlara bakıldığında piklerde çatallanmalar görülmektedir. Güvenilir bir konsantrasyon elde edebilmek için BA ve SA piklerinin çatallanma yapmaması gerekmektedir. Bu sebeple önce HS sıcaklık optimizasyonu gerçekleştirildi. 50 µL BA, 50 µL SA, 200 µL 5 M H₂SO₄ zltisi içeren viallerin HS fırınında 140 C sıcaklıkta yapılan 15, 30 ve 45 dk inkübasyon süreleri boyunca sırasıyla analizleri yapıldı. Analiz sonunda elde edilen kromatogramlar **şekil 4.2**'de gösterilmiştir. BA ve SA piklerinin çatallı olduğu görülmektedir. Piklerdeki atallanmaların giderilmesi için daha sonra aynı şekilde hazırlanan zltiler 130 C HS fırın sıcaklığında 15, 30 ve 45 dk ısıtma süreleriyle sırasıyla analizler yapıldı.



şekil 4.2: 50 µL BA, 50 µL SA, 200 µL 5 M H₂SO₄ zltisi içeren viallerin HS fırınında 140 C sıcaklıkta yapılan 15, 30 ve 45 dk inkübasyon süreleri sonunda elde edilen kromatogramlar.

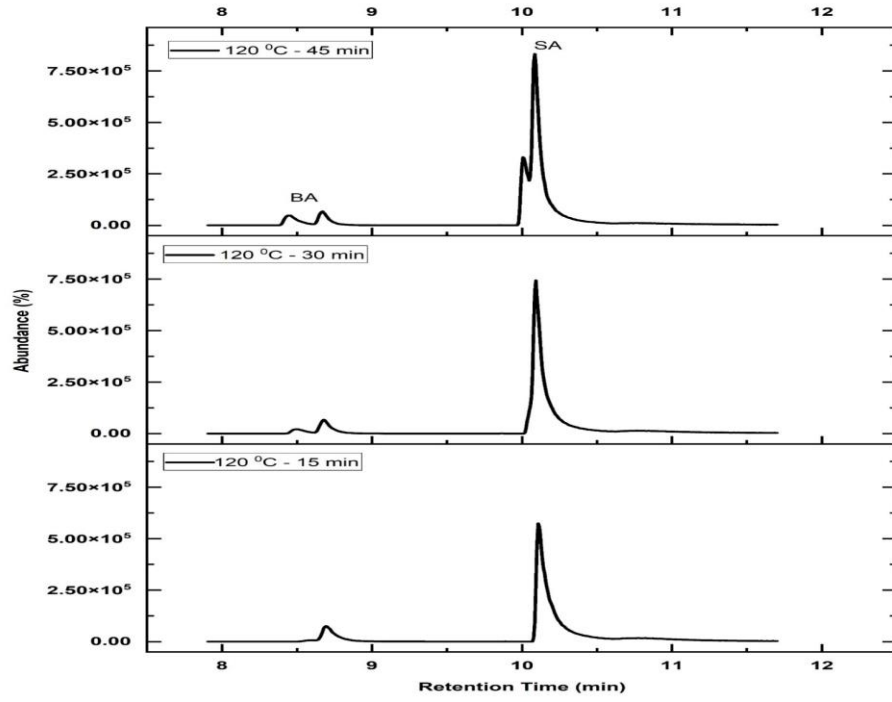
şekil 4.3'de yapılan çalışmada grldğu gibi 130 C sıcaklık değerinde de çatallanmalar görülmektedir. Daha sonra yine aynı şekilde hazırlanan zltiler ile 120 C HS fırın sıcaklığında 15, 30 ve 45 dk ısıtma süreleriyle sırasıyla analizler yapıldı.



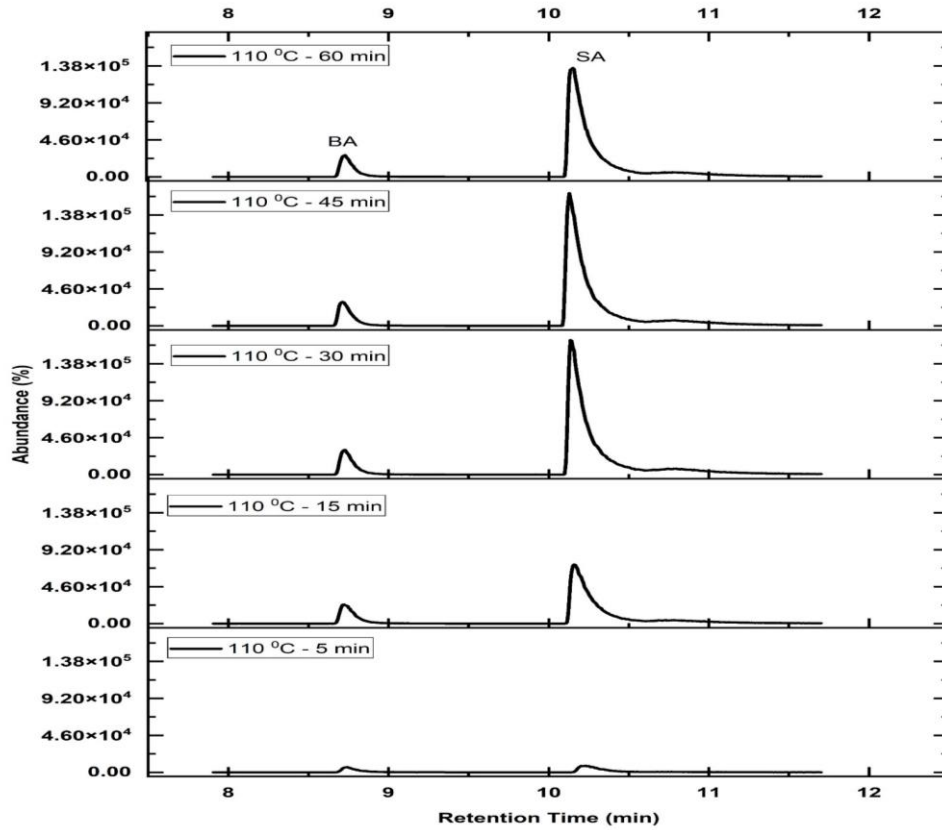
Şekil 4.3: 50 µL BA, 50 µL SA, 200 µL 5 M H₂SO₄ çözeltisi içeren viallerin HS fırınında 130 °C sıcaklıkta yapılan 15, 30 ve 45 dk inkübasyon süreleri sonunda elde edilen kromatogramlar.

Şekil 4.4'te çatallanmanın değişmediği fakat azaldığı görülmektedir. Gözlemlenen piklerde çatallanmaların olması analizlerin henüz istenilen güvenilirlikte olmadığı ve düzgün pikler elde edilemediği ortaya çıkarmaktadır. Daha sonra aynı hacimlerde hazırlanan çözeltiler 110 °C HS fırın sıcaklığında 15, 30 ve 45 dk ısıtma süreleriyle sırasıyla analizleri verildi. Çıkan sonuçlarda çatallanmaya rastlanmadı. Ardından, en güvenilir ve ideal değer elde edebilmek adına 110 °C HS fırın sıcaklığında 5 ve 60 dk denemeleri de ayrıca yapıldı.

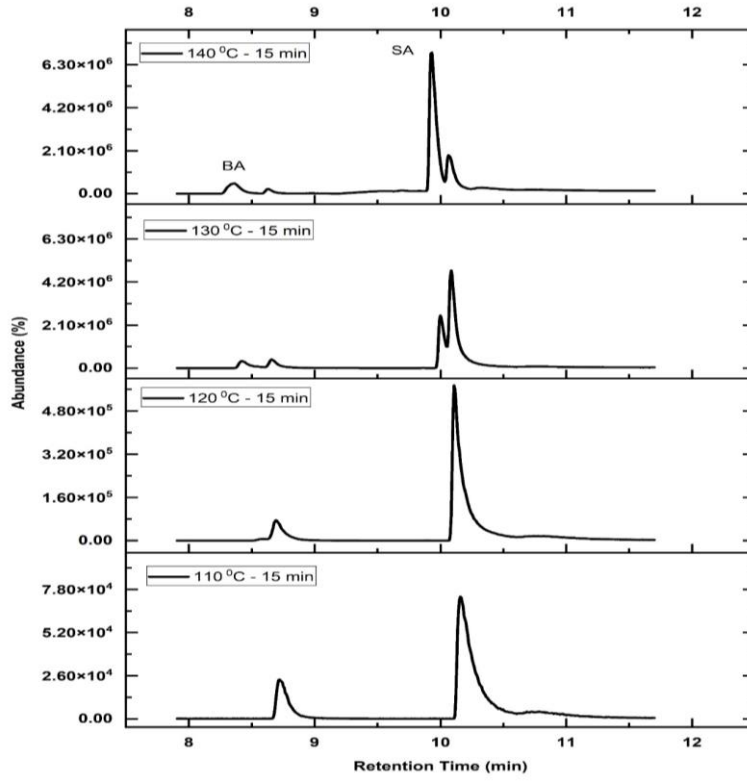
Şekil 4.5'te 110 °C HS fırın sıcaklığında ve 30 dk termostat süresinin maksimum ve düzgün bir pik vermesinden dolayı bu değer analizlerde kullanılmak üzere seçildi. Her sıcaklık değerinde sırasıyla Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8'de ayrı ayrı 15, 30 ve 45 dk süreleri incelendiğinde ise 110 °C HS fırın sıcaklığında BA pikinin diğer sıcaklıklara göre çatalsız pik verdiği de görülmektedir.



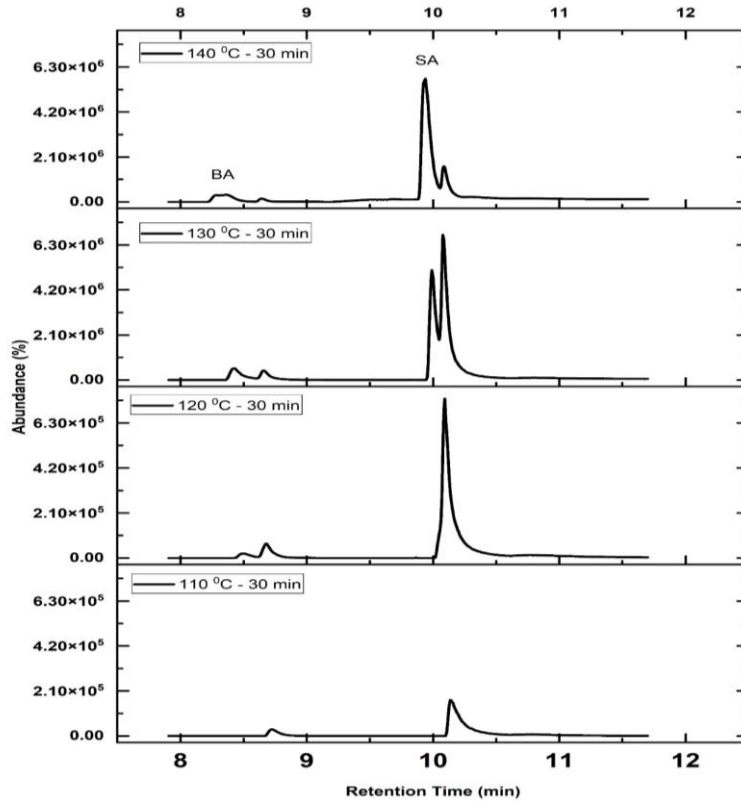
Şekil 4.4: 50 μ L BA, 50 μ L SA, 200 μ L 5 M H_2SO_4 çözeltisi içeren viallerin HS fırınında 120 °C sıcaklıkta yapılan 15, 30 ve 45 dk inkübasyon süreleri sonunda elde edilen kromatogramlar.



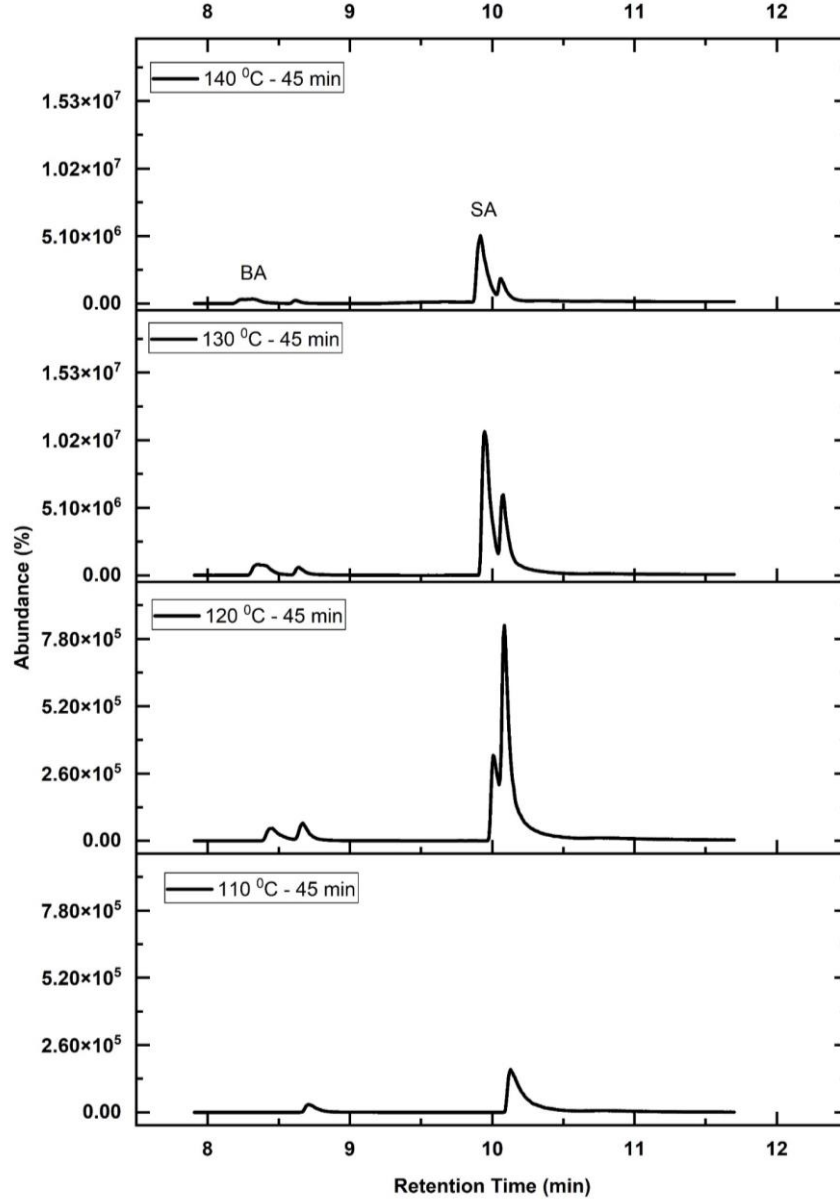
Şekil 4.5: 50 μ L BA, 50 μ L SA, 200 μ L 5 M H_2SO_4 çözeltisi içeren viallerin HS fırınında 110 °C sıcaklıkta 5, 15, 30, 45 ve 60 dk inkübasyon süreleri sonunda elde edilen kromatogramlar.



Şekil 4.6: 50 µL BA, 50 µL SA, 200 µL 5 M H₂SO₄ çözeltisi içeren viallerin HS fırınında 110, 120, 130 ve 140 °C sıcaklıkta yapılan 15 dk inkübasyon süresi sonunda elde edilen kromatogramlar.



Şekil 4.7: 50 µL BA, 50 µL SA, 200 µL 5 M H₂SO₄ çözeltisi içeren viallerin HS fırınında 110, 120, 130 ve 140 °C sıcaklıkta yapılan 30 dk inkübasyon süresi sonunda elde edilen kromatogramlar.

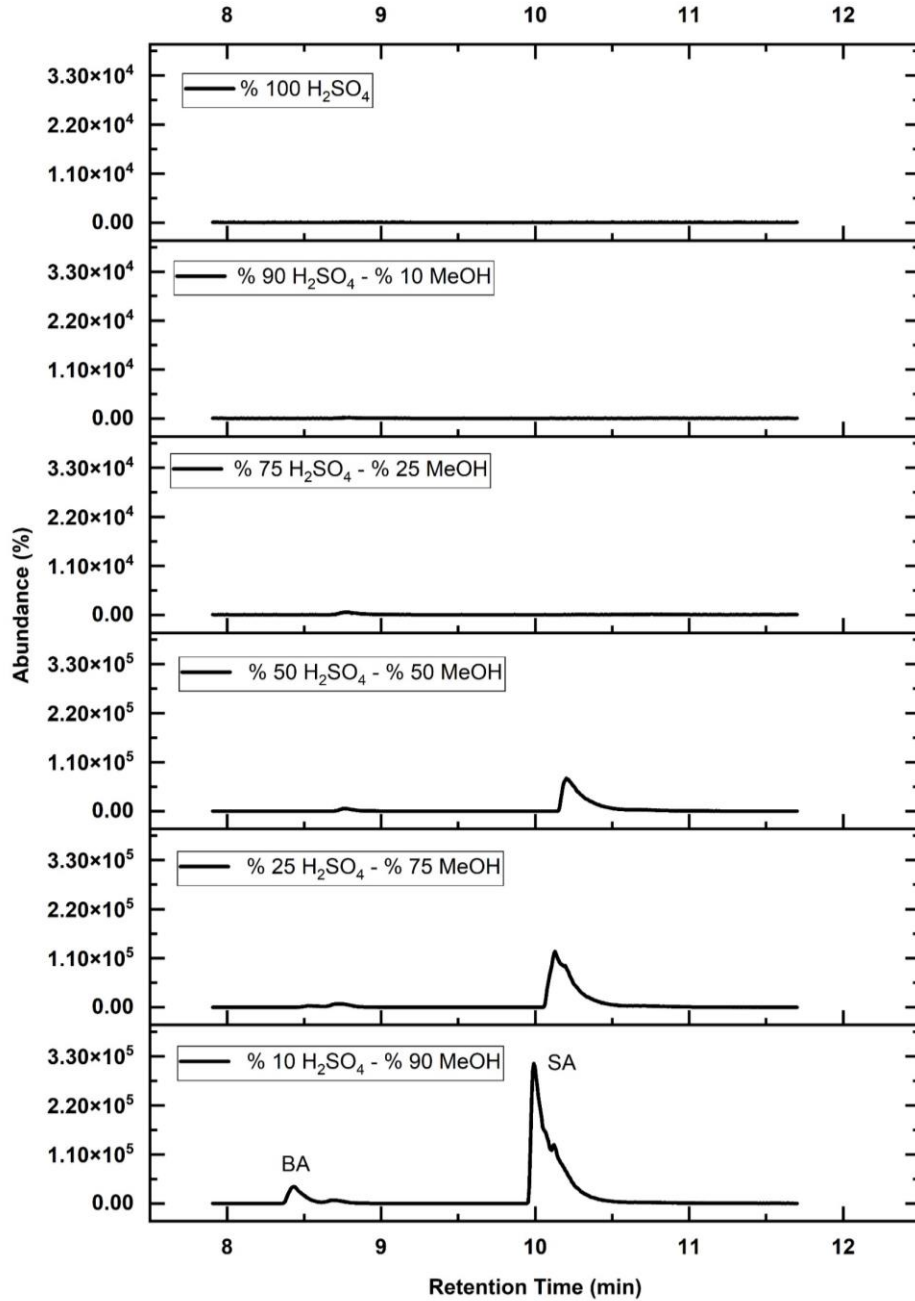


Şekil 4.8: 50 μL BA, 50 μL SA, 200 μL 5 M H_2SO_4 çözeltisi içeren viallerin HS fırınında 110, 120, 130 ve 140 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta yapılan 45 dk inkübasyon süresi sonunda elde edilen kromatogramlar.

4.4.2. Asit konsantrasyonunun optimizasyon aşamaları

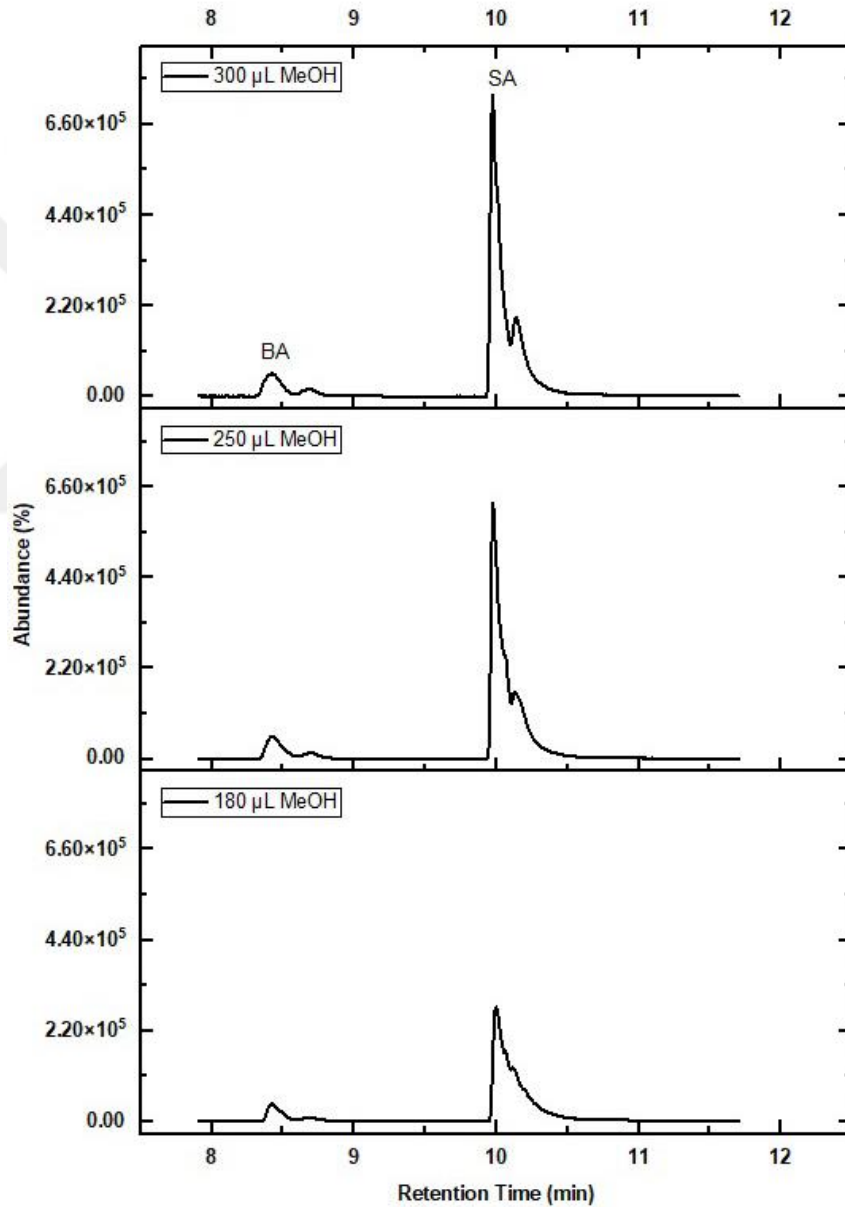
Bu çalışmada BA doğrudan ölçülemediğinden metil benzoata türevlendirilebilmesi için esterleşme reaksiyonu gerçekleştirildi. Esterleşme reaksiyonunda da katalizör olarak H_2SO_4 kullanıldı. Sıcaklık optimizasyonu belirlendikten sonra asit miktarı için optimizasyonlara başlandı. Öncelikle %10, 25, 50, 75, 90 ve 100 hacminde (h/h) H_2SO_4 çözeltileri MeOH ile hazırlandıktan sonra bunların her birinden 200 μL alınarak, 50 μL seyreltilmiş numune ve 50 μL iç standart üzerine eklenerek vortex

yardımıyla karıştırıldı. Elde edilen değerler **Şekil 4.9**'de görüldüğü üzere alkol miktarı arttıkça pik alanı artmaktadır. Sadece asit olduğunda ise pik gözükmemektedir. Ancak piklerde çatallanmalar olduğu için elde edilen değerler ideallik sağlamamaktadır. Bu yüzden en yüksek değer olan % 10 hacminde H_2SO_4 çözeltisinden 20 μL alınarak sırasıyla 180, 250 ve 300 μL MeOH ekleyerek, alkolün piklerde çatallanma üzerine bir etkisi olup olmadığına bakıldı.

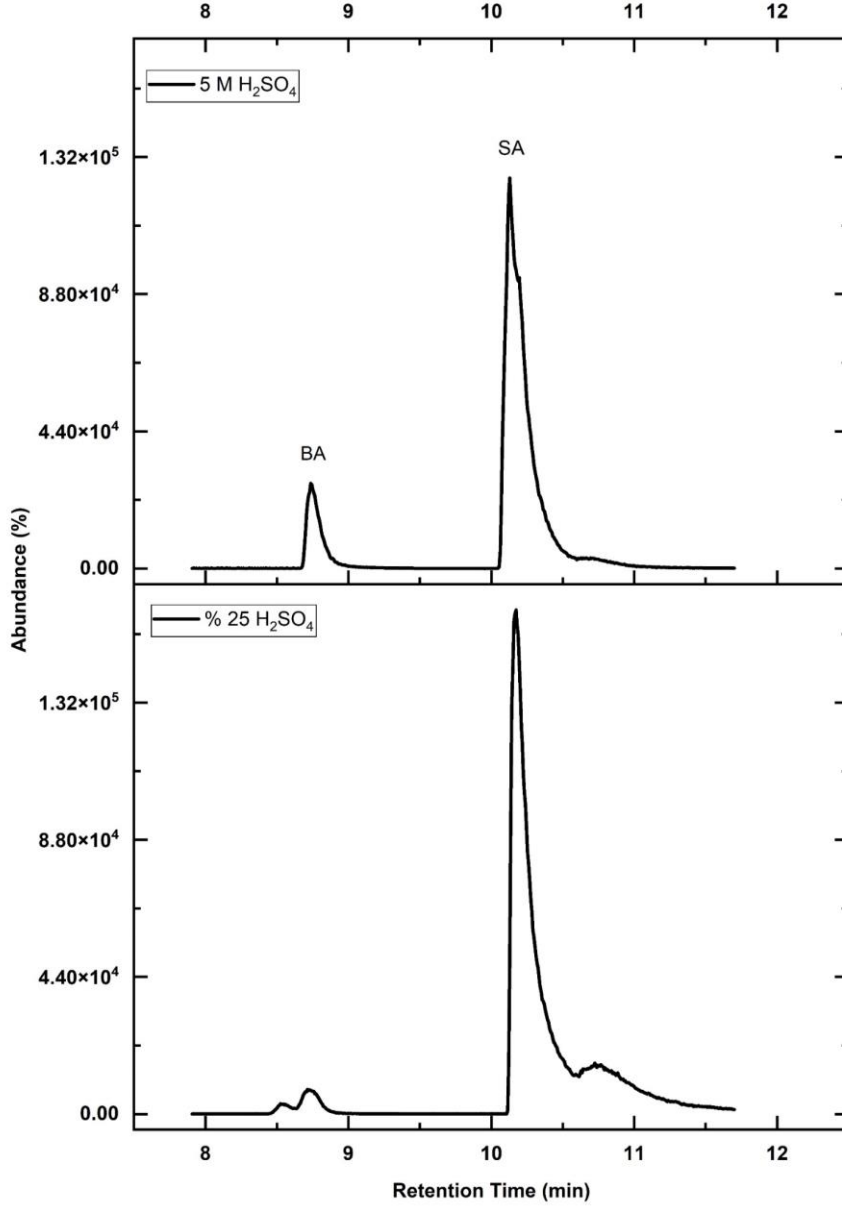


Şekil 4.9: Değişen asit konsantrasyonlarının BA ve SA alanına etkisi ile elde edilen kromatogramlar.

Şekil 4.10'da verilen sonuçlara bakıldığında alkolün piklerde çatallanmaya sebep olduğu düşünülmektedir. Sorunun ortadan kalkması ve alkol ile piklerde çatallanmanın ilişkisini incelemek için 5 M H₂SO₄ ve hacimce %25 H₂SO₄ – %75 MeOH olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanarak, deneme verildi. Sonuçlar **Şekil 4.11**'da gösterilmiştir. 5 M H₂SO₄ denemesinde piklerde çatallanma gözlenmezken pik verirken, %25 denemesi 3 kat büyük pik vermesine rağmen çatallanmalar gözükmemektedir. Bu sebeple MeOH ile karışım yapmak yerine 5 M H₂SO₄, su ortamında hazırlanarak kullanılması uygun bulunmuştur.



Şekil 4.10: %10 hacmindeki asit konsantrasyonuna eklenen 180, 250 ve 300 µL MeOH ile elde edilen kromatogramlar.

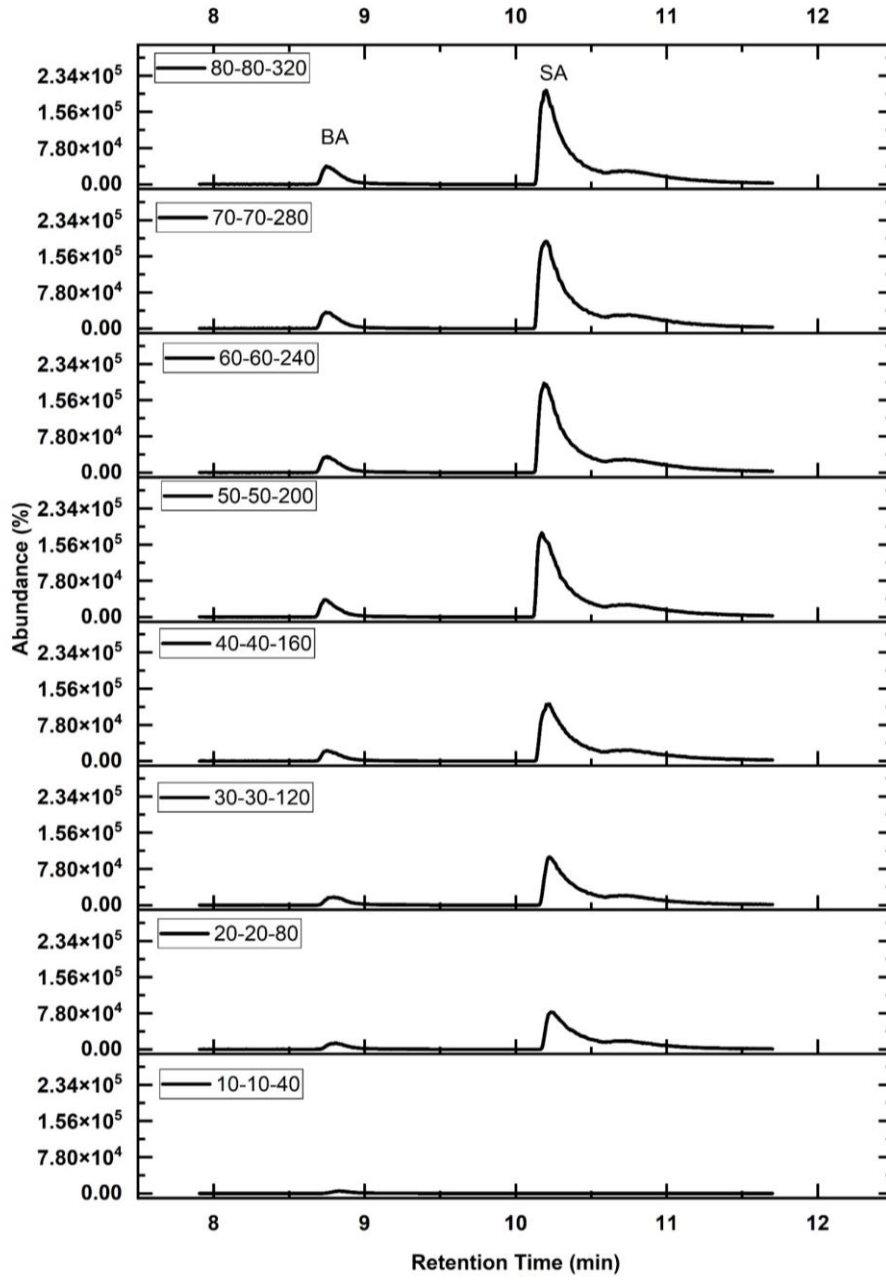


Şekil 4.11: 5 M H₂SO₄ çözeltisi ile %25 hacmindeki MeOH ile seyreltilmiş H₂SO₄ çözeltisi ile elde edilen kromatogramlar.

4.4.3. Çözelti hacimlerinin optimizasyon aşamaları

Bu çalışmada MeOH çözücüsü ile hazırlanan BA ve SA standart çözeltileri ve saf su ile hazırlanan 5 M H₂SO₄ çözeltisi vialer alınırken hangi hacimlerin daha ideal sonuç verebileceği araştırıldı. Hacimleri aynı oranlarda artacak 1 mg/kg BA, 10 mg/kg SA ve 5 M H₂SO₄ çözeltileri sırasıyla, I) 10-10-40, II) 20-20-80, III) 30-30-120, IV) 40-40-160, V) 50-50-200, VI) 60-60-240, VII) 70-70-280, VIII) 80-80-320 (µL-µL-µL şeklinde karıştırıldı. Elde edilen kromatogramlar **Şekil 4.12**'de verilmiştir. Sonuçlara

bakıldığında en düşük reaktif hacminde optimum alan/konsantrasyon sonuçları elde edilen ve en ideal pik görünümü 50-50-200 (μL) hacimlerinde bulunmuştur.



Şekil 4.12: Sırasıyla, BA, SA ve 5 M H_2SO_4 çözeltilerinin vialdeki hacimlerinin (μL) BA ve SA piklerine etkisi ile elde edilen kromatogramlar.

4.5. Kromatografik Koşullar

Analizler, Perkin Elmer Clarus 500 HS-GC-MS cihazında gerçekleştirilmiştir. Numuneler 20 mL cam vialler PTFE kaplı kauçuk septumlu ve alüminyum kıvrımlı kapaklarla kapatılarak analize verilmiştir. Kromatografik koşullar **Çizelge 4.2**'de

gösterilmiştir. BA'ın kromatografik ayrımı için Perkin Elmer çapraz bağlı carbowax-PEG yapısına sahip FFAP GC kolonu (30 m x 0,25 mm i.d. x 0,5 µm df.) kullanılmıştır. HS koşulları, fırın sıcaklığı 110 °C ve numune ısıtma süresi 30 dk olarak optimize edilmiştir.

Çizelge 4.2: Kromatografik koşullar.

Headspace (HS)		Gaz Kromatografi (GC)		Kütle Spektrometresi (MS)			
Fırın Sıcaklığı	110 °C	Fırın Sıcaklığı	100 °C	Giriş Hattı Sıcaklığı	200 °C		
Zaman	30 dk	He Akış Hızı	1 mL/dk	Kaynak Sıcaklığı	180 °C		
Enjektör Sıcaklığı	113 °C	6 dk → 110 °C, 20 °C/dk → 220 °C, 8 dk tutuş süresi		Tarama Modu	TIC	SIR	
Enjeksiyon Zamanı	0,06 dk	Split Ayarı	1:1	Tarama Aralığı	15- 300 m/z (1- 26 dk)	BA m/z	SA 120 m/z
T Hattı Sıcaklığı	115 °C	Kolon: Perkin Elmer çapraz bağlı carbowax-PEG yapısına sahip FFAP GC kolonu (30 m x 0,25mm i.d. x 0,5 µm df.)		İyonlaşma	El+		
He Gaz Basıncı	30 psi			İyonlaşma Enerjisi	70 eV		

*Analiz süresi: 26 dakika. BA için m/z değeri 105, SA için m/z değeri 120.

4.6. Standart ve Numune Hazırlıkları

BA ve SA standartlarından 25'er mg alınarak 25 mL balon jodede metanol ile çözülerek 1000 mg/L'lik stok çözeltiler hazırlanmıştır. BA'ın stok çözeltisinden MeOH ile seyreltmek usulüyle 0,05, 0,50, 1, 2,50, 5, 10, 20, 40, 60, 80 mg/L'lik standart kalibrasyon çözeltileri mikropipet yardımıyla hazırlanmıştır. İç standart çözeltisi olan SAH ise 10 mg/L olacak şekilde 1000 mg/L'lik stok çözeltiden MeOH ile balon jodede seyreltilmiştir. Numuneler 1/5 oranında MeOH ile seyreltilmiştir. Asit ortamı 10,70 mL H₂SO₄, 40 mL'e saf su ile seyreltilerek 5 M olarak hazırlanmıştır. Kantitasyon için öncelikle standartlar 50 µL BA, 50 µL 10 mg/L SA ve 200 µL 5 M H₂SO₄ hacimlerinde viallenerek cihaza verilmiştir. Daha sonra numune çözeltilerinden 50 µL alınarak üzerlerine 50 µL 10 mg/L SA ve 200 µL 5 M H₂SO₄ hacimlerinde iç standart ve asit çözeltisi eklenerek cihaza yüklenmiştir.

4.7. Metot Validasyon Aşamaları

Oluşturulan yeni bir metodun işlevini ve doğruluğunu değerlendirmek için bazı parametreler uygulanmaktadır. Doğrusallık parametresi, standartın geniş konsantrasyon aralığında hazırlanan çözeltilerin sisteme verilmesiyle

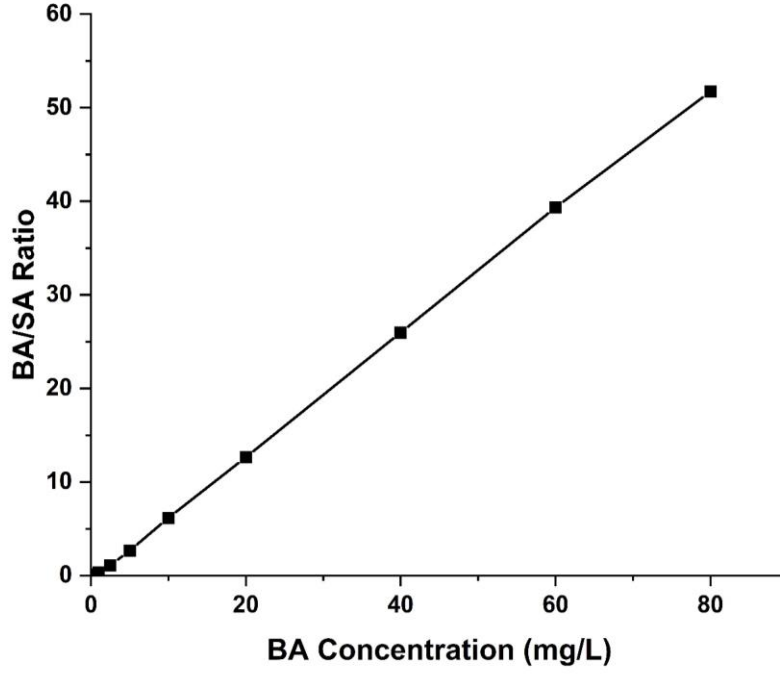
gerçekleşmektedir. Okumalar sonunda hem doğrusallık (kalibrasyon) grafiği çizilir hem de LOD ve LOQ parametresinin değerleri elde edilmektedir. Yani, analitin görüldüğü ve tespit edilebildiği noktalar tayin edilmektedir. Bir diğer parametre ise, kesinliktir. Bu bölümde, hazırlanan numuneler belli bir sayıda üst üste verilerek cihazın okuduğu tekrarlanabilirlik değerleri kalibrasyon grafiğindeki denklemde yerine konularak konsantrasyon değerleri belirlenmektedir. Bu değerler arasındaki benzerlik ne kadar yakınsa, metodun kesinliği de o kadar fazla olmaktadır. Yakınlık derecesine de bağlı standart sapma ile bakılmaktadır. Farklı günlerde yapılan tekrarlanabilirlik analizleri de kendi arasında kıyaslanmaktadır. Bulunan bağlı standart sapma yüzdesi değerlendirilmektedir. Son olarak, numunelerde geri kazanım hesabı yapılmaktadır. Bunun için, konsantrasyonu belirlenmiş numunenin yarısı, kendisi ve iki katı konsantrasyonda BA standartları hazırlanarak analizler gerçekleştirilmektedir. Yapılan bütün validasyon parametreleri ve sonuçların değerlendirilmesi "AOAC International" referans alınarak karşılaştırılmıştır [38].

4.7.1. Doğrusallık parametresi

Kalibrasyon grafiği için hazırlanan BA konsantrasyon değerleri ve SIR modunda alınan BA ve SA alanlarının oranları **Çizelge 4.3**'te gösterilmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafiği **Şekil 4.13**'te yer almaktadır. Elde edilen denklem ve determinasyon katsayısı sırasıyla, $y = 0,641x - 0,3275$ ve $R^2 = 0,999$ olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.3: Kalibrasyon çözeltilerinin konsantrasyonları ve BA/SA alanları oranları.

Konsantrasyon (mg/L)	BA/SA Alanları Oranı
0,05	0,03
0,10	0,03
0,25	0,05
0,50	0,10
1,00	0,33
2,50	1,08
5,00	2,66
10,00	5,15
20,00	12,66
40,00	25,95
60,00	37,34
80,00	51,32



Şekil 4.13: Lineer kalibrasyon grafiği.

4.7.2. LOD & LOQ belirleme

Sinyal/gürültü oranı 3 olacak şekilde yapılan hesaptan BA için tespit sınırı (LOD) değeri 0,02 mg/L bulunmuştur. Daha sonra tayin sınırı (LOQ) değerini belirlemek için sinyal/gürültü oranı 10 olacak şekilde hesaplamadan 0,05 mg/L bulunmuştur. Elde edilen değerler Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4: LOD ve LOQ değerleri.

Metot Parametreleri		mg/L
Gözlenebilme Sınırı	LOD (S/N 3)	0,02
Tayin Sınırı	LOQ (S/N 10)	0,05

4.7.3. Kesinlik parametresi

Bu parametrede tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik analizleri yer almaktadır.

4.7.3.1. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik analizi için 3 numaralı süt ve 1 numaralı şurup örneklerinden 6 tane numune geliştirilen yöntem ile aynı gün içinde analizlendiler. Bulunan sonuçlar

konsantrasyon hesabı üzerinden bağıl standart sapma hesaplamaları yorumlandı. Elde edilen sonuçlar **Çizelge 4.5**'te verilmiştir.

Çizelge 4.5: Tekrarlanabilirlik analizlerinin sonuçları.

Okumalar	3 Numaralı Sütteki BA Konsantrasyonu (mg/L)	1 Numaralı Şuruptaki BA Konsantrasyonu (mg/L)
1	2,70	65,11
2	2,69	69,84
3	2,70	63,82
4	2,73	68,40
5	2,73	67,05
6	2,72	64,66
Ortalama	2,71	66,48
SD	0,02	2,35
% RSD	0,69	3,53

AOAC'ye göre % RSD değeri 1 mg/L için en çok % 11 olmalıdır [53].

AOAC'ye göre % RSD değeri 100 mg/L için en çok % 5,30 olmalıdır [53].

4.7.3.2.Ara kesinlik

Ara kesinlik parametresinde, farklı üç günde aynı cihaz ve kimyasallar kullanılarak aynı analist tarafından hazırlanan 3 numaralı sütün 6 adet ve 1 numaralı şuruptan 6 adet numuneler optimize edilen koşullarda analizlendiler. Elde edilen süt numunelerinin BA konsantrasyonu sonuçları **Çizelge 4.6**'da verilmiştir. Elde edilen pediyatrik şurup numunelerinin BA konsantrasyonu sonuçları **Çizelge 4.7**'de verilmiştir.

Çizelge 4.6: 3 numaralı süt numunesinde BA analizlerinin ara kesinlik sonuçları.

Okumalar	Birinci Gün Süt Örnekleri (mg/L)	İkinci Gün Süt Örnekleri (mg/L)	Üçüncü Gün Süt Örnekleri (mg/L)
1	2,70	2,63	2,58
2	2,69	2,63	2,61
3	2,70	2,64	2,65
4	2,73	2,64	2,63
5	2,73	2,64	2,59
6	2,72	2,63	2,66
Ortalama	2,71	2,64	2,62
SD	0,02	0,01	0,03
% RSD	0,69	0,21	1,23
% RSD (3 gün için)		1,71	

AOAC'ye göre % RSD değeri 1 mg/L için en çok % 11 olmalıdır [53].

Çizelge 4.7: 1 numaralı şurup numunesinde BA analizlerinin ara kesinlik sonuçları.

Okumalar	Birinci Gün Şurup Örnekleri (mg/L)	İkinci Gün Şurup Örnekleri (mg/L)	Üçüncü Gün Şurup Örnekleri (mg/L)
1	65,11	66,35	67,56
2	69,84	68,30	68,45
3	63,82	70,85	67,41
4	68,40	66,11	65,04
5	67,05	69,74	66,21
6	64,66	61,43	67,98
Ortalama	66,48	67,13	67,11
SD	2,35	3,35	1,26
% RSD	3,53	4,99	1,88
% RSD (3 gün için)		3,50	

AOAC'ye göre % RSD değeri 100 mg/L için en çok % 5,30 olmalıdır [53].

4.7.4. Geri kazanım parametresi

Bu parametrede, seçilen 3 numaralı süt ve 1 numaralı şurup numunelerinin bulunan konsantrasyonlarına yarısı, kendisi ve 2 katı olacak şekilde BA standartı ilaveleri yapıldı.

Çizelge 4.8: 3 numaralı süt numunesinin geri kazanım sonuçları.

Konsantrasyon (mg/L)	İlave Edilen (mg/L)	Ölçülen (mg/L)	Geri Kazanım (%)
	0,20	0,75	100,80
0,54	0,50	1,04	100,12
	1,00	1,55	100,96

Ortalama Geri Kazanım 100,63 ve % RSD = 0,44

AOAC'ye göre % GK değeri 1 mg/L için % 80-110 arası olmalıdır [53].

Çizelge 4.9: 1 numaralı şurup numunesinin geri kazanım sonuçları.

Konsantrasyon (mg/L)	İlave Edilen (mg/L)	Ölçülen (mg/L)	Geri Kazanım (%)
	3,00	9,68	99,04
6,71	6,00	12,75	100,69
	12,00	19,02	102,57

Ortalama Geri Kazanım 100,76 ve % RSD = 1,75

AOAC'ye göre % GK değeri 100 mg/L için % 90-107 arası olmalıdır [53].

Elde edilen 3 numaralı süt numunelerindeki geri kazanım sonuçları **Çizelge 4.8**'de, 1 numaralı pediyatrik şurup numunelerindeki geri kazanım sonuçları **Çizelge 4.9**'da verilmiştir.

4.7.5. Metot validasyon parametrelerinin değerlendirilmesi

AOAC kuruluşuna göre belirlenen metot validasyon parametreleri sonuçları ile yapılan validasyon sonuçları şu şekildedir: Doğrusallık parametresinde R^2 değeri istenilen değer olan 0,999 olarak bulundu. Kesinlik parametresinde tekrarlanabilirlik % RSD değerleri 1 mg/L için maksimum % 11, 100 mg/L için maksimum % 5,30 olması istenirken süt numunelerinin konsantrasyonları için bu değer % 0,69 bulunurken, pediyatrik şurup için % 3,53 bulundu. 3 gün ayrı ayrı yapılan tekrarlanabilirlik ara kesinlik değerlerinin % RSD değerleri sırasıyla, % 1,71 ve % 3,50 bulundu. Son olarak geri kazanım çalışması uygulandı. Bu bölümde de limitler 1 mg/L için geri kazanım yüzdesi % 80-110 arası bulunması gerekirken; 100 mg/L için geri kazanım yüzdesi % 90-107 arası bulunması gerekiyordu. Çalışmada elde edilen 3 numaralı süt numuneleri konsantrasyonları için geri kazanım ortalaması % 100,63 bulunurken, 1 numaralı pediyatrik şurup numunelerinde % 100,76 olarak bulundu. Elde edilen bütün değerler AOAC'nin belirlediği sınırlar içinde bulunmuştur [53].

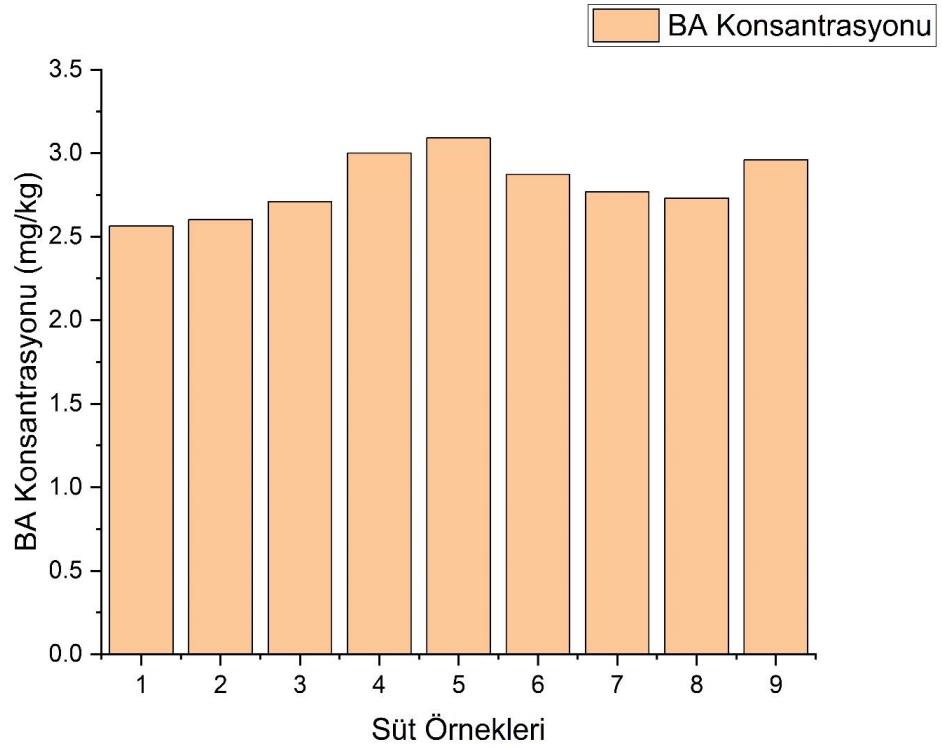


5. SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME

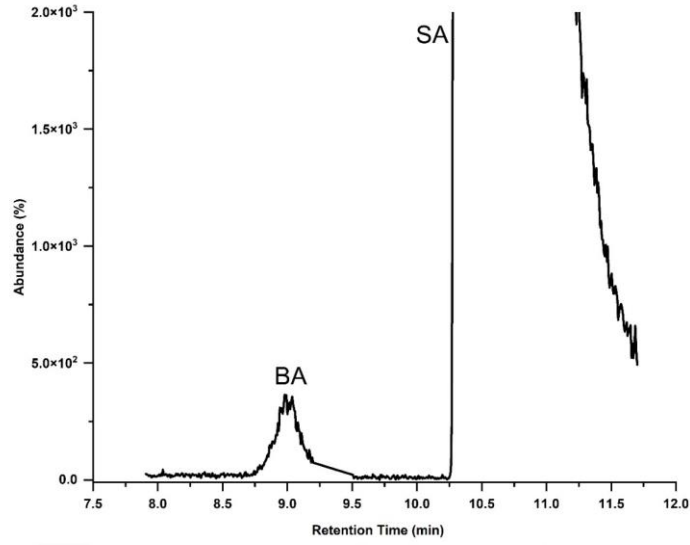
MS dedektörü ile kantitatif analiz sonucunda konsantrasyonlar ölçüldü. Standartların pik verdiği zamanlar BA için 8,65, SA için 10,21 dakika olarak tespit edilmiştir.

5.1. Süt Örneklerinde Benzoik Asit Konsantrasyonları

İstanbul marketlerinden alınan kutu süt örneklerinin BA analizi yapılmıştır. **Şekil 5.1**'de görülen ilk 3 örnek çocuk devam sütlerinden oluşmaktadır. Diğer 6 örnek ise normal kutu sütlerdir. Toplam 9 örnekteki BA miktarları sırasıyla: 2,56, 2,60, 2,71, 3,00, 3,09, 2,87, 2,77, 2,73 ve 2,96 mg/L olarak bulunmuştur. 6 numaralı süt numunesinin analizindeki kromatogram örneği **Şekil 5.2**'de gösterilmiştir.



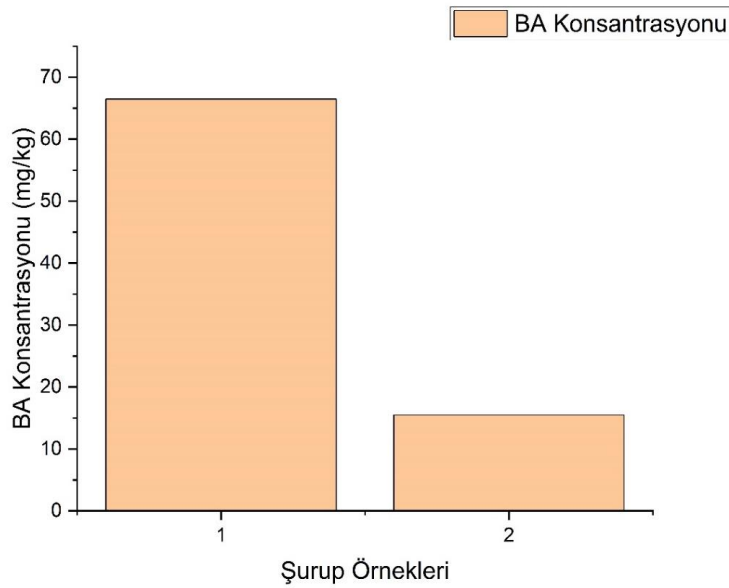
Şekil 5.1: Süt örneklerindeki benzoik asit konsantrasyonları (mg/L).



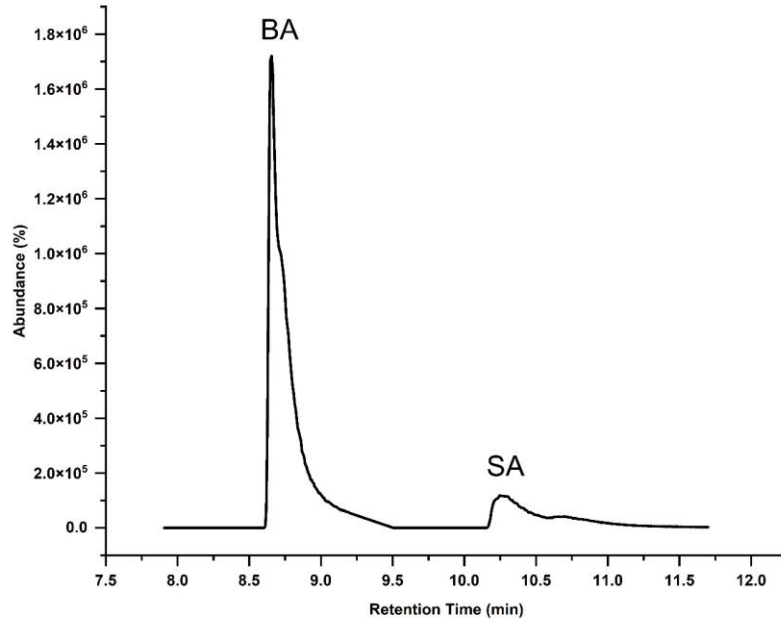
Şekil 5.2: 6 numaralı süt numunesi analizindeki kromatogram örneği.

5.2. Şurup Örneklerinde Benzoik Asit Konsantrasyonları

İstanbul'daki eczanelerden alınan ve içinde koruyucu madde olarak sadece BA ve sodyum benzoat bulunan pediatrik şuruplarda yapılan BA analiz sonuçları Şekil 5.3'te verilmiştir. 1 numaralı örnekte 66,48 mg/L, 2 numaralı örnekte 15,46 mg/L bulunmuştur. 2 numaralı şurup numunesinin analizindeki kromatogram örneği Şekil 5.4'te gösterilmiştir.



Şekil 5.3: Şurup örneklerindeki benzoik asit konsantrasyonları (mg/L).



Şekil 5.4: 2 numaralı şurup numunesi analizindeki kromatogram örneği.

5.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

JECKA'ya göre günlük alınması gereken konsantrasyon, 5 mg/kg (vücut ağırlığı) olarak belirlenmiştir. Bu değer en yüksek güvenli doz miktarıdır. Elde edilen verilere süt örneklerinde BA konsantrasyonu 2 – 3 mg/L aralığında bulunmuştur. Şuruplarda ise BA konsantrasyonları 15,46 mg/L ve 66,48 mg/L olarak bulunmuştur. 20 kg ağırlığında bir çocuğun günlük tüketebileceği süt ve şurup konsantrasyonuna bakılmak istendiğinde şöyle bir örnekle açıklanabilir. Günlük alabileceği maksimum konsantrasyon 5 mg/kg (vücut ağırlığı) olduğuna göre bu çocuk günlük maksimum 100 mg BA alabilir. Daha fazlası sağlık problemlerine yol açabilir. Günde 500 ml süt ve 1 ölçek (5 mL) şurup içen bir çocuk düşünüldüğünde, toplamda 1,83 (< 5) mg BAe maruz kalmaktadır. Bu da verilen bilgilere dayanarak süt ve pediatrik şuruplarda BA konsantrasyonlarının sağlık açısından bir tehlike oluşturmadığını göstermektedir.

5.4. Metodun Yeşil Kimya Üzerine Değerlendirilmesi

Bir yöntemin yeşil kimyaya uygun olması ve çevreye zarar vermemesi günümüzün en önemli konularından birisidir. Bu sebeple geliştirdiğimiz yöntemin çevre dostluğunu objektif değerlendirmek için literatürde yapılan çalışmalarla karşılaştırıp kimyasal

maddeler, numune hazırlığı, atık maddeler, analiz süresi gibi konuların yorumlanmasıyla incelenmiştir.

Genellikle çevre dostu olarak tavsiye edilen çözücüler su, alkol ve bazı eterlerdir. Bizim çalışmamızda ise çözücü olarak su ve metil alkol kullanılmıştır. Kimyasal reaktif olarak kullanılan H_2SO_4 ve SA kokusuz ve tehlikeli boyutta değildir. Sülfürik asit ise asit örnekleri içerisinde yeşil bölgede (az tehlikeli) yer almaktadır [19]. Analizler sırasında 25 mg BA, 25 mg SA 10,70 mL sülfürik asit kullanıldı. HS-GC-MS ile çalışıldığından oldukça az miktarlarda kullanılan bu kimyasalların oluşturduğu atık ürün oldukça az miktardadır. Cihazın, HPLC analizlerinde kullanılan mobil fazların aksine taşıyıcı gaz olarak inert gaz kullanması ve bu analizde helyum gazı kullanılması çevre açısından oldukça zararsız etkiye sahiptir. HPLC analizlerinde ise dakikada kullanılan mobil faz miktarı GC analizlerinde kullanılan inert gaz ile kıyaslandığında oldukça fark yaratan atık kimyasal söz konusudur. HS-GC-MS cihazının günlük kullandığı elektrik miktar ise $\leq 1,50$ kW/sa olduğu ve analiz süresinin de kısa olması göz önüne alınırsa, bu yöntem yeşil kimya açısından zararsız ve basit bir yöntem olarak kabul görebilmektedir [54, 55].

6. TARTIŞMA

BA yıllardan beri yiyecek, içecek ve ilaçlarda koruyucu madde olarak kullanılmaktadır. Bu maddelerde kullanılan BA konsantrasyonu, sağlık kuruluşları tarafından sınırlandırılmakta ve günlük maksimum alım miktarları belirlenmektedir. Eğer günlük alım miktarı aşılsa insan sağlığı açısından tehlike oluşturmaktadır. O yüzden BA konsantrasyonunu belirlemek adına birçok yöntem geliştirilmiştir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarla çeşitli yiyeceklerde, içeceklerde ve şuruplarda BA konsantrasyonunun tayini gerçekleştirilebilmektedir. Günümüzde sadece analizlerin yapılması değil aynı zamanda, özellikle kullanılan kimyasal maddeler açısından ve analizler sırasında ortaya çıkan atık maddeler önem arz etmektedir. Analiste ve çevreye verilen zararlar da göz önünde bulundurularak daha çevreye ve insana duyarlı analizler bulmak amaçlanmıştır. Bütün bunlar yapılırken gezegenimizin sağlığını insan sağlığı kadar önemsemek ve gelecek yeni nesiller için sağlıklı bir çevre bırakmak konusunda hassas olmak gerekmektedir.

Bu tezde, BA tüketiminin özellikle çocuklar için tehlike oluşturup oluşturmadığı araştırıldı ve bu araştırma için pratik, güvenilir, uygulaması kolay, hassas ve daha çevreci bir HS-GC-MS metodu geliştirildi. Bu metot BA analizlerinde kullanılabilmekteyken parabenlerin analizinde kullanılamamaktadır. Yapılan optimizasyonlarda HS sıcaklık değerini piklerdeki çatallanmaların giderilmesi için 110 °C olarak ayarlandı. Bu da parabenler için düşük bir sıcaklık olduğundan, paraben analizi için uygun bir metot değildir. Ancak BA için oldukça güvenilirdir. Geliştirilen metotun önce HS sıcaklık optimizasyonlarını yapıldı. Daha sonra, BA doğrudan ölçülemediği için esterleşme tepkimesinde katalizör olarak kullandığımız asit konsantrasyonunun optimizasyonunu yapıldı. En uygun HS koşulları 110 °C ve 30 dk termostat süresi olarak optimize edildi. Katalizör olarak kullanılan sülfürik asit konsantrasyonu ise 5 M olarak optimize edildi. Uygun şartların sağlanması, BA ve SA piklerindeki çatallanmaların ortadan kalkması ile son buldu. Daha sonra oluşturulan metotun validasyonu gerçekleştirildi. AOAC kuruluşuna göre belirlenen metot validasyon parametreleri sonuçları ile yapılan validasyon sonuçları şu şekildedir:

Doğrusallık parametresinde R^2 değeri istenilen değer olan 0,999 olarak bulundu. Kesinlik parametresinde tekrarlanabilirlik % RSD değerleri 1 mg/L için maksimum % 11; 100 mg/L için maksimum % 5,30 olması istenirken süt numunelerinin konsantrasyonları için bu değer % 0,69 bulunurken, pediyatrik şurup için % 3,53 bulundu. 3 gün ayrı ayrı yapılan tekrarlanabilirlik ara kesinlik değerlerinin % RSD değerleri sırasıyla, % 1,71 ve % 3,50 bulundu. Son olarak geri kazanım parametresi uygulandı. Bu bölümde de limitler 1 mg/L için geri kazanım yüzdesi % 80-110 arası beklenirken; 100 mg/L için geri kazanım yüzdesi % 90-107 arası bekleniyordu. Çalışmada elde edilen süt numuneleri konsantrasyonları için geri kazanım ortalaması % 100,63 bulunurken, pediyatrik şurup numunelerinde % 100,76 olarak bulundu. Elde edilen bütün değerler AOAC'ye göre limit içindedir.

İstanbul süpermarketlerinden alınan 9 adet süt numunesinde ve eczanelerden alınan 2 adet pediyatrik şurup numunesinde BA analizleri yapıldı. Süt numunelerinde bulunan BA konsantrasyonu sonuçları 2,56- 3,09 mg/L arasında, pediyatrik şuruplarda bulunan BA konsantrasyonları ise 15,46 ve 66,48 mg/L olarak bulunmuştur.

Çalışma sonunda oluşturulan metot, yeşil kimya açısından incelendiğinde, daha önce yapılan çalışmalara göre kimyasal madde kullanımının en az, numune hazırlama süresinin oldukça kısa ve pratik olduğu görüldü. Numunelerde bulunan BA konsantrasyonlarının da günlük alınabilen miktarın oldukça altında kaldığı ve bu sonucun çocuklar için hiçbir sağlık sorunu teşkil etmediği sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

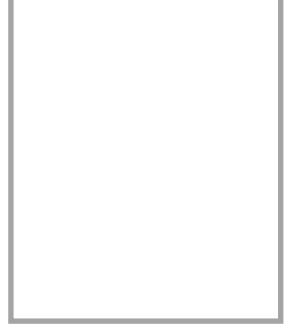
- [1] **Altuğ, T.** (2009). "Gıda Katkı Maddeleri," İzmir, Sıdaş Medya Ltd. Şti., (pp. 112-114).
- [2] **Saad, B., Baria, M., Saleha, M. I., Mohd, K. A. & Talibb, K. M.** (2005). "Simultaneous Determination of Preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in Foodstuffs using High-Performance Liquid Chromatography," *Journal of Chromatography A*, Vols. 1-2, no. 1073, (pp. 393-397).
- [3] **Kamankesh, M., Mohammadi, A., Tehrani, Z. M., Ferdowsi, R. & Hosseini, H.** (2013). "Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Followed by High-Performance Liquid Chromatography for Determination of Benzoate and Sorbate in Yogurt Drinks and Method Optimization by Central Composite Design," *Talanta*, no. 109, (pp. 46-51).
- [4] **Javanmardi, F., Nemati, M., Ansarin, M. & Arefhosseini, S. R.** (2015). "Benzoic and Sorbic Acid in Soft Drink, Milk, Ketchup Sauce and Bread by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Coupled with HPLC," *Food Additive & Contaminants*, vol. 8, (pp. 32-39).
- [5] **Abedi, A. S., Mohammadi, A., Azadnia, E., Mortazavian, A. M. & Khaksar, R.** (2014). "Simultaneous Determination of Sorbic and Benzoic Acids in Milk Products Using an Optimized Microextraction Technique Followed by Gas Chromatography," *Food Additives & Contaminants*, no. 31, (pp. 21-28).
- [6] **Tang, Y. & Wu, M.** (2005). "A Quick Method for the Simultaneous Determination of Ascorbic Acid and Sorbic Acid in Fruit Juices by Capillary Zone Electrophoresis," *Talanta*, vol. 3, no. 65, (pp. 794-798).
- [7] **Han, F., He, Y.-Z., Li, L., Fu, G.-N., Xie, H.-Y. & Gan, W.-E.** (2008). "Determination of Benzoic Acid and Sorbic Acid in Food Products Using Electrokinetic Flow Analysis–Ion Pair Solid Phase Extraction–Capillary Zone Electrophoresis," in *Analytica Chimica Acta*, Elsevier, (pp. 79-85).
- [8] **Davidson, P. M., Taylor, T. M., & David, J. R. D.** (2021). *Antimicrobials in Food*, 6000 Broken Sound Parkway NW: Taylor & Francis Group, LLC.
- [9] **Yılmaz, Ö. ve Türктаş, İ.** (2003). "Besin Katkı Madde Reaksiyonları, T Klin J Allerji-Astım," (pp. 91-95).
- [10] **Benford, D.** (2000). *The Acceptable Daily Intake. A Tool For Ensuring Food Safety*, Belgium: ILSI Press.

- [11] **Yurttagül, M. ve Ayaz, A.** (2008). *Katkı Maddeleri: Yanlışlar ve Doğrular*, Ankara: Sağlık Bakanlığı.
- [12] **Altuğ, T.** (2001). "Gıda Katkı Maddeleri," İzmir, p. 286s.
- [13] **Bagamboula, C., Uyttendaele, M. & Debevere, J.** (2004). "Inhibitory Effect of Tyme and Sweet Basil Essential Oils, Carvacrol, Thymol, Estragol, Linalool and P-cymene Towards *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*," *Food Microbiology*, (pp. 33-42).
- [14] **Otero-Losada, M.** (2003). "Differential Changes in Taste Perception Induced by Benzoic Acid Prickling," in *Physiology & Behavior*, (pp. 415-425).
- [15] **Russell, N. & Gould, G.** (1991). "Food Preservatives," London, Blackie and Son Ltd., p. 197.
- [16] **Hussain, I., Zeb, A. & Ayub, M.** (2010). "Quality Attributes of Apple and Apricot Blend Juice Preserved with Potassium Sorbate during Storage at Low Temperature," in *Internal Journal of Food Safety*, (pp. 80-86).
- [17] **Luck E. & J. M.** (1995). "Antimicrobial Food Additives-Characteristics, Uses, Effects," Berlin, p. 260.
- [18] **Rangan, C. & Barceloux, D. G.** (2009). *Food additives and sensitivities*, Elsevier.
- [19] **Kalyoncu, F.** (2008). "Gıda Sanayide Sıklıkla Kullanılan Antifungal Katkı Maddeleri," in *e-Journal of New World Sciences Academy*, (pp. 465-473).
- [20] **Boğa, A. ve Binokay, S.** (2010). "Gıda Katkı Maddeleri ve Sağlığımıza Etkileri," Adana.
- [21] **Çalışkan Z. ve Çalışır D. E.,** (2003). "Gıda Katkı Maddeleri ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkisi," *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, (pp. 207-206).
- [22] **Swarbrick, J. & Boylan, J. C.** "Supplement," in *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, New York, Marcel Dekker.
- [23] **Tizard, I. A.** (1984). "Immunology: An Introduction, Holy-Saunders Japan, Saunders College Publishing", (pp. 80-104).
- [24] **Gerberding, S. J. & Byers, C.** (1998). "Preparative Ion-Exchange Chromatography of Protein From Dairy Whey," *J. Chromatogr A*, no. 808, (pp. 51-141).
- [25] **Lampman, G. M., Kritz, G. S. & Engel, R. G.** (2006). "Introduction to Organic Laboratory Techniques," in *Thomson Brooks/Cole*, (pp. 797-817).
- [26] **Harwood, L. M. & Moody, C. J.** (1989). "Experimental Organic Chemistry: Principles and Practice," Oxford:Blackwell Science, (pp. 5-180).
- [27] **Das, M. & Dasgupta, D. P.** (1998). "Affinity Column Chromatography Based Rapid Purification Procedure For T7 RNA Polymerase," in *Prep Biochem Biotechnol.*, (pp. 48-339).
- [28] **Karlsson, E., Ryden, L. & Brewer, J.** (1998). "Protein Purification. Principles, High Resolution Methods and Applications," in *Ion Exchange Chromatography*, New York, Wiley.
- [29] **Walls, D. & Loughran, S. T.** (2011). "Ion Exchange Chromatography: Methods, Protocols, Methods in Molecular Biology", p. 681.

- [30] **Helmut, D.** (1969). "Gel Chromatography, Gel Filtration, Gel Permeation, Molecular Sieves," in *A Laboratory Hand Book*, Springer-Verlag.
- [31] **Determann, H.** (2012). "Gel Chromatography Gel Filtration, Gel Permeation, Molecular Sieves," in *A Laboratory Handbook*.
- [32] **Wilchek, M. & Chaiken, I.** (2000). "An Overview of Affinity Chromatography in Affinity Chromatography," in *Methods and Protocols*, (pp. 1-6).
- [33] **Firer, M. A.** (2001). "Efficient Elution of Functional Proteins in Affinity Chromatography," *J Biochem Biophys Methods*, vol. 49, (pp. 42-433).
- [34] **Stoddard, J. M., Nguyen, L., Mata-Chavez H. & Nguyen, K.** (2007). "TLC Plates as a Convenient Platform for Solvent-Free Reactions," *Chem Commun*, (pp. 12-1240).
- [35] **Sherman, J., Fried, B. & Dekker, M.** (1991). "Handbook of Thin-Layer Chromatography," New York.
- [36] **Donald, P. L., Lampman, G. M., Kritz, G. S. & Randall, G.** (2006). "Introduction to Organic Laboratory Techniques," Thomson Brooks, (pp. 797-817).
- [37] **Regnier, F. E.** (1983). "High-Performance Liquid Chromatography of Biopolimers," in *Science*, (pp. 52-245).
- [38] **Blumberg & L. M.** (2012). "Theory of Gas Chromatography," in *Theory of Gas Chromatography*, Elsevier, (pp. 19-78).
- [39] **Kitson, F. G., Larsen, B. S. & McEwen, C. N.** (1996). "What is GC/MS?," in *Gas Chromatography and Mass Spectrometry*, Elsevier, (pp. 3-23).
- [40] **Han, Y., Zhang, Y. & Liu, H.** (2017). "Gas Chromatography: Principles," in *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*.
- [41] **McNair, H. M., Miller, J. M. & Snow, N. H.** (2019). *Basic Gas Chromatography*.
- [42] **Sparkman, O. D., Penton Z. E. & Kitson, F. G.** (2011). "Gas Chromatography," in *Gas Chromatography and Mass Spectrometry*, (pp. 15-83).
- [43] **Url** <http://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/75976/mod_resource/content/0/GK.pdf>, erişim tarihi 2021.
- [44] **Cavalcante, R. M., Andrade, M. V. F. de, Marins, R. V. & Oliveira, L. D. M.** (2010). "Development of a Headspace-Gas Chromatography (HS-GC-PID-FID) Method for the Determination of VOCs in Environmental Aqueous Matrices: Optimization, Verification and Elimination of Matrix Effect and VOC Distribution on the Fortaleza Coast, Brazil," in *Microchemical Journal*, (pp. 337-343).
- [45] **Mesarchaki, E., Yassaa, N., Hein, D., Lutterbeck, H. E., Zindler, C. & Williams, J.** (2014). "A Novel Method for the Measurement of VOCs in Seawater Using Needle Trap Devices and GC-MS.", (pp. 1-8).

- [46] **Bruderer, T., Gaisl, T., Gaugg, M. T., Nowak, N., Streckenback, B., Müller, S., Moeller, A., Kohler, M. & Zenobi, R.** (2019). "On-Line Analysis of Exhaled Breath," in *Chemical Reviews*, (pp. 10803-10828).
- [47] **Jennings, W. G. & Poole, C. F.** (2012). "Milestones in the Development of Gas Chromatography," in *Gas Chromatography*, (pp. 1-17).
- [48] **Mastrangelo, A., Ferrarini, A., Rey-Stolle, F., Garcia, A. & Barbas, C.** (2015). "From Sample Treatment to Biomarker Discovery: A tutorial for Untargeted Metabolomics Based on GC-(EI)-Q-MS," in *Analytica Chimica Acta*, 21-35.
- [49] **Halket, J. M., Waterman, D., Przyborowska, A. M., Patel, R. K., Fraser, P. D. & Bramley, P. M.** (2004). "Chemical Derivatization and Mass Spectral Libraries in Metabolic Profiling Metabolic Profiling" in *Journey of Experimental Botany*, (pp. 219-243).
- [50] **M. J. Noonan, H. V. Tinnesand & C. D. Buesching,** "Normalizing Gas-Chromatography–Mass Spectrometry Data: Method Choice can Alter Biological Inference," in *BioEssays*, 2018.
- [51] **Kolb, B. & Ettre, L. S.** (2006). *Static Headspace-Gas Chromatography*, New Jersey: Wiley Interscience.
- [52] **Kutnink, M. A., Hawkes, W. C., Schaus E. E. & Omaye S. T.** (1987). "An Internal Standard Method for the Unattended High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Ascorbic Acid in Blood Components," in *Analytical Biochemistry*, Elsevier, (pp. 424-430).
- [53] **Bonfini, L., Bulcke, M. H., Mazzara, M., Ben, E. & Patak, A.** (2012). "AOAC Official Methods of Analysis," in *Guidelines for Standard Method Performance Requirements*, (pp. 1-17).
- [54] **Galuszka, A., Konieczka, P., Migaszewski, Z. & Namiesnik, J.** (2012). "Analytical Eco-Scale for Assessing the Greenness of Analytical Procedures," in *Trends in Analytical Chemistry*, (pp. 61-72).
- [55] **Tobiszewski, M.** (2016). "Metrics for Green Analytical Chemistry," *Analytical Methods*, (pp. 80-233).

ÖZGEÇMİŞ



Ad-Soyad

: Neslihan MÜDERRİSOĞLU KEFELİ



ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2018, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü
- **Yüksek Lisans** : 2022, İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, Kimya Programı

ULUSLARARASI BİLDİRİ VE SUNUM

- **Müderrişoğlu Kefeli, N., & Destanoğlu, O., & Özcan, M. (2022).** Determination of Benzoic Acid in Pediatric Syrup and Milk Samples by Headspace Gas Chromatography Mass Spectrometer. International Scientific Research Congress Dedicated to the 30th Anniversary of Baku Eurasia University, (173-179).

