



PhD Research Article / Doktora Çalışması Araştırma Makalesi
HIGH-PERFORMANCE THIN-LAYER CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS
OF ASPARTAME AND SODIUM SACCHARIN IN FOODS

Muharrem YILMAZ^{*1}, Hüseyin AFŞAR²

¹*Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yıldız-İSTANBUL*

²*Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Esenler-İSTANBUL*

Received/Geliş: 08.12.2011 Accepted/Kabul: 15.02.2012

ABSTRACT

In this study, the qualitative and quantitative analyses of aspartame and saccharin investigated using Instrumental High Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC). Aspartame developed on HPTLC Silica Gel 60 plates, then quantified at 620 nm after derivitization with ninhydrine solution. The aspartam calibration plot was linear between 200 and 1200 ng/spot with a coefficient of determination (R^2) of 0.9955. When 10 repetition of 500 ng/spot aspartame processed, results were found between 95,7-107,4 %. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 36.73 and 111.31 ng/spot, respectively. % Recovery was found between 95.0 and 96.6 with different type of matrixes such as sugar syrup, flour, infant food and chocolate with sugar. Then the plate immersed to zinc nitrate solution to get stable and marked aspartame spot. % Recovery was determined between 96.5 and 103.0, and LOD and LOQ were 5.42 and 16.44 ng/spot, respectively at this condition.

Sodyum saccharin developed on HPTLC Silica Gel 60 F₂₅₄ plates, then quantified at 230 nm. The saccharin calibration plot was linear between 200 and 1200 ng/spot with a coefficient of determination (R^2) of 0.9974. When 10 repetition of 500 ng/spot aspartam processed, results were found between 96.5-102.7 %. LOD and LOQ were 8.81 and 26.68 ng/spot, respectively. % Recovery was found between 99.1 and 107.7 with different types of matrix.

Keywords: HPTLC, aspartame, sodium saccharin, foods.

GIDA ÜRÜNLERİNDE ASPARTAM VE SODYUM SAKARİNİN YÜKSEK-PERFORMANSLI İNCE TABAKA KROMATOGRAFİSİYLE ANALİZİ

ÖZET

Çalışmamızda, aspartam ve sakarinin enstrümantal Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisiyle (YPİTK) nitel ve nicel analizi incelenmiştir. Aspartam, HPTLC Silika Jel 60 plaka üzerinde yürütülmüş sonrasında ninhidrin çözeltisi ile türevlendirilerek 620 nm’de taratılmıştır. Bu şartlar altında aspartam kalibrasyon eğrisi 200-1200 ng/leke arasında doğrusal olup korelasyon katsayısı (R^2) değeri 0,9955’dir. 500 ng/leke aspartam uygulamasının 10 tekrarı sonucu % kazanım 95,7-107,4 arasında tespit edilmiştir. Tespit ve tayin edilebilirlik sınırı sırasıyla 111,31 ve 36,73 ng/leke’dir. Şekerli şurup, un karışımı, bebek maması ve şekerli çikolata gibi farklı matris türlerinde aspartamın % geri kazanımı 95,0-96,6 arasında tespit edilmiştir. Sonrasında plakanın çinko nitrat çözeltisine daldırılmasıyla kararlı ve belirgin aspartam lekeleri elde edilmiş ve % geri kazanım 96,5-103,0 arasında, tespit ve tayin edilebilirlik sınırı sırasıyla 16,44 ve 5,42 ng/leke olarak bulunmuştur.

Sodyum sakarin, HPTLC Silika Jel 60 F₂₅₄ plaka üzerinde yürütülerek 230 nm’de taratıldığında kalibrasyon eğrisi 200-1200 ng/leke arasında doğrusal olup korelasyon katsayısı (R^2) değeri 0,9974 tespit edilmiştir. 500 ng/leke sakarin uygulamasının 10 tekrarı sonucu % kazanım 96,5-102,7 arasında bulunmuştur. Tespit ve tayin edilebilirlik sınırı sırasıyla 26,68 ve 8,81 ng/leke’dir. Farklı matris türlerindeki % geri kazanımı 99,1-107,7 arasında tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: HPTLC(YPİTK), aspartam, sodyum sakarin, gıda.

* Corresponding Author/Sorumlu Yazar: e-mail/e-ileti: muharremy@gmail.com, tel: (212) 465 31 09
İstanbul Bölge Gümrük Laboratuvarı, Gıda Birimi, Bakırköy-İSTANBUL

1. GİRİŞ

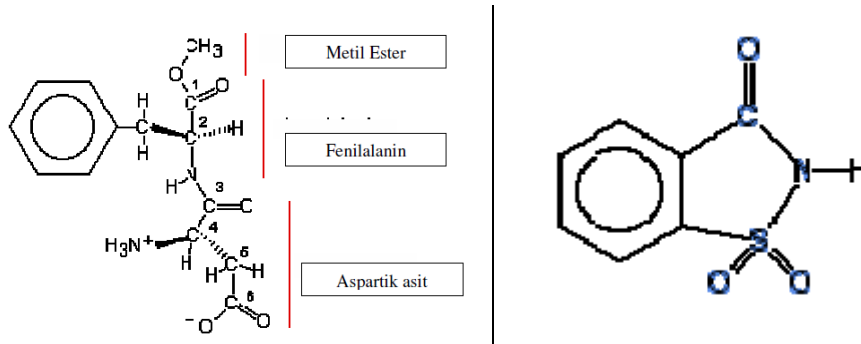
Gıda katkı maddeleri, gıdaların renk, görünüş, lezzet, koku gibi duyuşal özelliklerini düzenlemek, besleyici değerlerini korumak, dayanıklılıklarını arttırmak ve birtakım teknolojik işlemlere yardımcı olmak gibi amaçlarla ilave edilirler. Avrupa Birliğinin, 89/107/EEC nolu Avrupa Parlamentosu ve Konsey direktifinde; sadece teknik olarak kullanılmasına ihtiyaç duyulan katkı maddelerinin gıdaların üretiminde veya hazırlanmasında kullanılabileceği, bunların tüketiciyi aldatmaya yönelik olmaması ve tüketicinin sağlığına zarar vermemesinin gerektiği belirtilmiştir.

şeker içeren ürünlerin aşırı kalori içermeleri, porsiyon miktarlarındaki artış, hareketsiz yaşamın artması, şişmanlık, şeker hastalığı, hipertansiyon, ağız-diş sağlığı ve kalp-damar hastalıklarındaki hızlı artış gibi sebeplerden dolayı, katkı maddelerinin arasında tatlandırıcılar yiyecek, içecek ve ilaç endüstrisinde giderek artış gösteren yaygın bir kullanım alanına sahiptirler. Bu çalışmada yüksek yoğunluklu tatlandırıcılardan yaygın olarak kullanılan aspartam ve sakarin incelenmiştir.

Aspartam, 1965 yılında Schlatter adlı araştırıcı tarafından Searle araştırma laboratuvarında aminoasitlerden gastrik peptid sentezlenmesinde oluşan ara ürünlerin saflaştırılması sırasında elde edilen bir tatlandırıcıdır. 1 g'ı 4 kcal enerji verir. Tat karakteri sakkarozu benzer, hafif geç algılanır, ısıya dayanıksızdır.

Sakarin 1879 yılında keşfedilmiş ilk kalorisiz yapay tatlandırıcıdır. Uzun yıllar tek başına veya diğer tatlandırıcılar ile birlikte kullanılmıştır. Halen 90'ın üzerindeki ülkede kullanımına izin verilmektedir. Sakarin sakkaroz çözeltisinden 300 kat daha tatlıdır [1].

şekil 1'de aspartam ve sakarinin moleköl formülleri görölmektedir.



şekil 1. Aspartam ve sakarinin moleköl formülü

Aspartam gıdalarda sıvı kromatografisi (HPLC) [2], IR Spektroskopisi [3], Kapiler Elektroferez [4] ile; sakarin ise gıda ve ilaçlarda potansiyometre [5], IR Spektroskopisi [6], Gaz Kromatografisi (GC) [7], HPLC [2] ve iyon kromatografisiyle [8] analiz edilmektedir. İTK genellikle bu tür tatlandırıcıların kalitatif analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. İlaç ve bazı gıdalarda aspartam ve sakarinin farklı matris türlerinde İTK ile tespitine yönelik çalışmalar sınırlı sayıda bulunmaktadır [9, 10, 11].

Tatlandırıcıların, insan sağlığı üzerine süre gelen tartişmaları, mevcut tebliğ ve direktiflere uygunluğunun ve T.C. Başbakanlık Gümrük Müsteşarlığı bünyesine gelen numunelerin kontrolü göz önüne alındığında; geniş bir gıda matrisine uygulanabilirliği olan, kısa analiz süresine sahip, ekonomik, analiz ön hazırlığını en az düzeye indirebilen, aynı anda birden fazla numunenin analizine farklı tanı prensiplerinin uygulanabilirliğine izin veren bir yöntem ihtiyaç duyulduğundan tatlandırıcıların özellikle nicel analizlerinin YPİTK'de yapılması düşünölmüştür.

2. DENEYSSEL ÇALIŞMALAR

2.1. Deneysel Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Örnekler

Kullanılan kimyasal ve sarf maddelerden; çinko nitrat heksahidrat, bakır (II) nitrat trihidrat, amonyum hidroksit çözeltisi (% 28) ve n-butanol Sigma-Aldrich'ten, aspartam ve sodyum sakarin Supelco'dan, etil asetat, karbon tetraklorür, metanol, 20×10 HPTLC 60 F₂₅₄ ve 20×10 HPTLC 60 cam plaka, 20×20 TLC 60 F₂₅₄ alüminyum plaka Merck'ten temin edilmiş olup, tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

Analize tabi tutulan aspartam ve sodyum sakarinin kullanılabileceği gıdalara benzer, içinde aspartam ve sakarin bulunmayan ürünlerin ticari isimleri, matris türleri ve içerdikleri maddeler Çizelge 1'de gösterilmektedir.

Çizelge 1. Aspartam ve sodyum sakarin ilave edilerek yapılan çalışmada kullanılan gıda ürünleri ve özellikleri

Numune No	Numunenin Ticari Adı	Matris Türü	Numunenin İçeriği
1	Afrin üzüm pekmezi	Şekerli Şurup (Pekmez)	Üzüm suyu konsantresi
2	Mix Patisserie	Un ve nişasta	Mısır unu, mısır nişastası, gam
3	Bebelac Junior	Bebek Maması	Laktoz, yağlı alınmış süt, bitkisel yağlar, vitaminler
4	Toblerone	Şekerli Çikolata	Çikolata, sakkaroz, süt yağı, bal

2.2. Deneysel Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Sistemler

Çalışmanın deneysel kısmında kullanılan araç ve gereçler aşağıda verilmiştir:

- İTK Sistemi: CAMAG İTK Sistemi (ATS 4 oto örnekleyici, ADC 2 oto yürütücü, plaka daldırma cihazı, plaka püskürtme cihazı, plaka ısıtıcısı, Scanner 3 tarama cihazı ve winCATS yazılım)
- Deiyonize su cihazı (Human Zeneer UP 900)
- Homojenizatör (Retch Grindomix Gm 200)
- Ultrasonic Banyo (Elmasonic S 60)
- Etüv (MMM Medcenter)

2.3. Deneylerin Yapılışı

0,1 mg duyarlılıkla 100 mg aspartam tartılıp 100 mL'lik ölçü balonuna aktararak 1 g/L tatlandırıcı içeren stok çözelti hazırlanıp ayrı ayrı 1 mL ve 10 mL alınmak suretiyle 100 mL'ye seyreltilerek 10 ng/μL ve 100 ng/μL aspartam içeren çalışma çözeltileri elde edildi.

Standart sakarin çözeltileri de aynı şekilde hazırlandı.

Gerektiğinde öğütücülerle homojen hale getirilen değişik matris türlerindeki Çizelge 1'de belirtilen numunelerden 1 mg duyarlılıkta 1 g tartılıp , 80 ml metanol eklenerek 20 dak. 40 °C'deki ultrasonik su banyosunda tutuldu. Süre sonunda banyodan çıkarılarak oda sıcaklığına gelene kadar soğuması beklendi. Oda sıcaklığındaki çözeltiye toplam hacmi 100 ml olacak şekilde metanol ilave edilerek 0,45 μm' lik membran filtreden geçirilip analize hazır hale getirildi.

1 ml sulu doygun çinko nitrat çözeltisi hazırlanarak üzerine 0,2 mL % 10'luk nitrat asidi ilave edilip, toplam hacmi 100 mL olana dek % 95'lik etanol ilavesiyle çinko nitrat daldırma reaktif hazırlanmıştır.

2.4. Kromatografik Şartlar

Aspartam tayininde 20×10 cm silika jel 60 ve sakarin tayininde 20×10 cm silika jel 60 F₂₅₄ HPTLC plaka kullanıldı. Plakalar kullanılmadan önce sadece laboratuvar ortamından değil, plakaların muhafazası için sarıldıkları polimer filminden veya diğer safsızlıkların uzaklaştırılması amacıyla, metanol içine daldırılıp ve 3 dakika bekletildi. Daha sonra temizlenen plaka sıcaklığı 120 °C'ye ayarlanmış bir etüvde 20 dakika bekletilerek hem kurutulmuş hem de aktive edilmiştir.

Numune ve standart çözeltiler, oto örnekleyci (ATS 4) kullanılarak püskürtme tekniğiyle bant şeklinde 7 mm uzunluğunda, 10 mm s⁻¹ hızla uygulandı.

2.4.1. Aspartam İçin Yürütme ve Değerlendirme Koşulları

Yürütmenin yapılacağı çift oluklu tank, 10 dak. butanol:asetik asit:su (4:1:1) karışımından oluşan hareketli fazın buharıyla doyrulmuş, oto yürütücü (ADC 2) ile hareketli faz plaka üzerinde 70 mm kadar yürütülmüş ve plaka 5 dak. sıcak hava ile kurutulmuştur.

Lekelerin gözlemlenebilmesi için asetondaki % 0,2 ninhidrin çözeltisi, plakanın bu çözeltiye 3 saniye daldırılması suretiyle uygulandı ve CAMAG TLC Plaka ısıtıcısı kullanılarak 90°C'de 5 dak. bekletildi. CAMAG TLC Scanner kullanılarak plaka yüzeyi 620 nm'de taratıldı.

Sonrasında ninhidrin çözeltisiyle türevlendirilen aspartam lekelerinin yer aldığı plaka, CAMAG plaka daldırma cihazıyla 1 sn çinko nitrat çözeltisine daldırılıp, hemen % 25'lik amonyak çözeltisiyle doyrun hale getirilmiş çeker ocak altındaki çift oluklu tanka alındı. Tanktan alınan plaka CAMAG TLC ısıtıcısı kullanılarak 90 °C'de 5 dak. bekletildi ve son olarak yüzeyi 400 nm'de taratıldı.

2.4.2. Sakarin İçin Yürütme ve Değerlendirme Koşulları

Yürütmenin yapılacağı çift oluklu tank, 10 dak. etil asetat:karbon tetraklorür:asetik asit (3:4:0,5) karışımından oluşan hareketli fazın buharıyla doyruldu. ADC 2 ile hareketli faz plaka üzerinde 70 mm kadar yürütüldü ve plaka 5 dak. sıcak hava ile kurutuldu. Sonrasında CAMAG TLC Scanner kullanılarak 230 nm'de taratıldı.

Tüm analiz parametreleri winCATS yazılım programına girilerek hem tüm sistem kontrol edilmiş hem de kromatogram değerlendirilmiştir.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1. Aspartam Analizi İçin Yapılan Çalışmalar

Öncelikle aspartamın karakterize edilebilmesi ve değerlendirmenin ne suretle yapılacağıın tespiti için, 20×20 TLC 60 F₂₅₄ alüminyum plaka üzerine 5 µL 100 ppm'lik aspartam çözeltisi uygulandı. Aspartamın HPLC ile tayini için çalışma dalga boyunun 220 nm olduğu literatürde verilmiştir [2]. Aspartam uygulaması yapılan ancak herhangi bir yürütme işlemi yapılmayan plaka, bu veriler ışığında absorbands/reflaktans modunda 190-350 nm dalga boyu aralığında 5,0 nm aralıklarla taratıldığında aspartam lekelerinin 190-270 nm dalga boyları arasında absorbands yaptığı gözlemlendi.

Sonrasında plaka üzerine uygulanan aspartam, yürütücü faz ile 70 mm yüksekliğe kadar yürütüldü ve 110 °C'de etüvde 30 dakika bekletildiğinde elde edilen spektrumda herhangi bir absorbands gözlemlenmedi. Asetondaki % 0,2 ninhidrin çözeltisi plaka yüzeyine püskürtmeyle ve plakanın bu çözeltiye 3 saniye daldırılması suretiyle uygulanarak etüvde bekletildiğinde; aspartam lekeleri görüldü ve plakanın ninhidrin çözeltisine daldırılması suretiyle daha homojen bir yüzey elde edildiği sonucuna varıldı. Ancak, plaka zemininde görünür bölgede kızarıklık gözlemlenmiş ve bu zemin kirliliğinden ötürü istenen kromatogram elde edilememiştir.

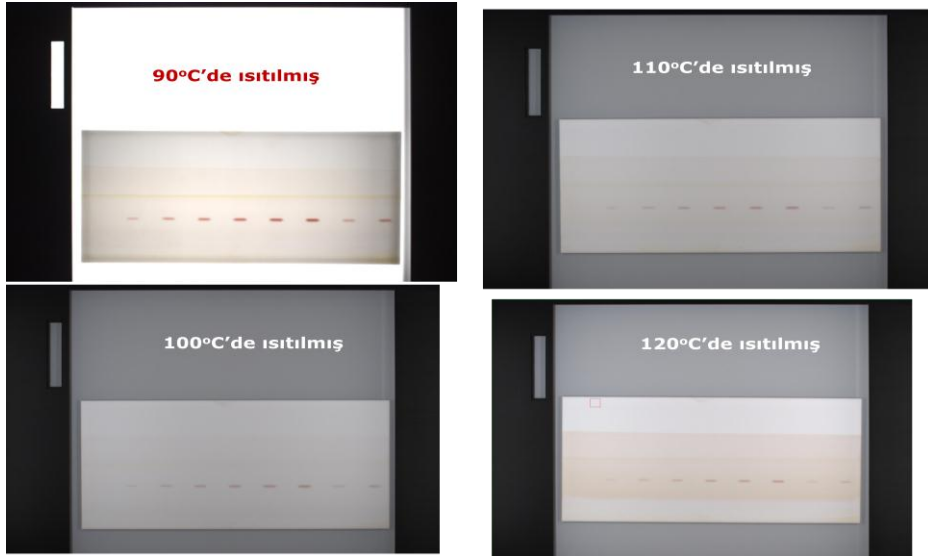
Zeminde gözlemlenen kızarıklıkla giderilmesi amacıyla aşağıdaki işlemler yapıldı:

a) Plakaya numune uygulanmasının ardından yürütücü fazla 70 mm yüksekliğe kadar yürütüldü, sonrasında plaka henüz ıslakken amonyak buharıyla doymun hale getirilmiş % 25'lik amonyak çözeltisinin yer aldığı çift oluklu tankta 5 dak. bekletilerek 100 °C'deki etüvde 30 dakika kurutulduktan sonra, ninhidrin çözeltine daldırıldı ve 120 °C'deki etüvde 10 dak. bekletildi. Bu işlemle plaka zemindeki kızarıklıkta azalma gözlemlenmiş ancak plaka yüzeyinde ninhidrinle türevlendirilen aspartam lekeleri tespit edilememiştir. Sonrasında lekelerin görünebilmesi amacıyla plaka yüzeyine seyreltik asetik asit püskürtülmüş ve sonuç alınamamıştır. Son olarak plaka yeniden ninhidrin içeren çözeltiye daldırılmış ve 100 °C'ye ayarlanmış etüvde 10 dak. bekletilmiştir. Aspartam lekeleri yine gözlemlenmemiş, sonrasında ısı tabancasıyla plaka yüzeyi yüksek sıcaklığa maruz bırakılmış, ancak bu uygulama sonucu lekeler gözlemlenmesine rağmen plaka zeminindeki kızarıklık ilk hale göre daha da artmıştır.

b) Plakaya yürütücü faz uygulanması sonrası 100 °C'deki etüvde 30 dak. bekletildi ve ninhidrin çözeltine daldırıldı. Plaka yüzeyi henüz ıslakken 5 dak. amonyak buharına maruz bırakıldı ve 100 °C'deki etüvde 10 dak. bekletildi. Bu işlemle aspartam lekeleri yine gözlemlenmiş ve plaka zeminindeki kızarıklık ilk hale göre daha da artmıştır.

Aspartam uygulaması yapılan silika jel bazlı ince tabaka (60 F₂₅₄) floresans indikatörü içermekteydi. Floresans indikatörü içermeyen Merck 60 Silika Jel 20×10 cm plaka üzerine aspartam uygulanarak deney tekrarlandığında belirli bir sıcaklığa kadar kızarıklığın azaldığı tespit edilmiştir.

Ayrıca, ninhidrin çözeltisine daldırılan ince tabakalar 90, 100, 110 ve 120 °C'ye kadar ısıtıldıklarında; 100 °C'den daha yüksek sıcaklıklarda plaka zemininde kızarıklığın arttığı tespit edilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Aynı şartlarda plaka zeminindeki kızarıklığın sıcaklıkla değişimi

Yapılan bu denemeler sonucunda Bölüm 2.4’de belirtilen çalışma parametreleri tespit edilmiştir.

3.1.1. Doğrusallık ve Doğrusallık Aralığı

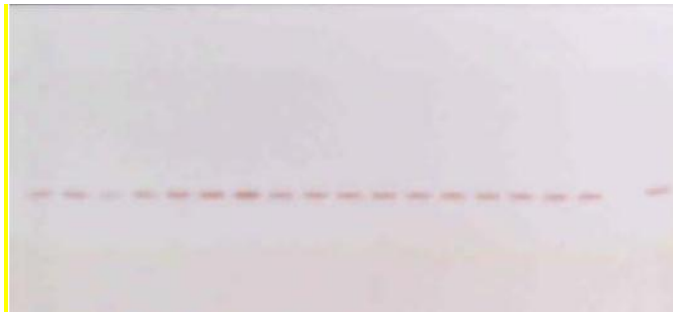
Ön denemeler sonucunda tespit edilen çalışma şartları altında plakaya 60-1200 ng/leke arasında aspartam uygulanmıştır. Aspartam miktarı ve plakanın taratılması sonucu elde edilen her bir konsantrasyona karşılık gelen alan değerleri alınarak sonuçların grafiği çizildiğinde aspartam miktarı aralığı ve elde edilen korelasyon katsayısı değerleri Çizelge 2’de yer almaktadır. Bu şartlar altında aspartam miktarı ile leke alanı arasındaki doğrusallığın en uygun 200-1200 ng/leke aralığı olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 2. Aspartam miktarı aralığı ve elde edilen korelasyon katsayısı değerleri

Aspartam Miktar Aralığı (ng/leke)	Korelasyon Katsayısı
60-1200	$R^2 = 0,9613$
60-1000	$R^2 = 0,9801$
80-1200	$R^2 = 0,9607$
80-1000	$R^2 = 0,9607$
100-1200	$R^2 = 0,9592$
100-1000	$R^2 = 0,982$
150-1200	$R^2 = 0,9618$
150-1000	$R^2 = 0,9883$
200-1200	$R^2 = 0,9955$
200-1000	$R^2 = 0,9942$

3.1.2.Sistem Kesinliği

Plaka üzerine 10 kez 500 ng/leke aspartam uygulandığındaki plaka görünümü Şekil 3’te ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3’te gösterilmiştir.



Şekil 3. Ninhidrinle türevlendirilen aspartam lekelerinin görünümü

Çizelge 3. 10 adet 500 ng/leke aspartam uygulaması sonucu tespit edilen sonuçlar

Sıra No	Bulunan Aspartam Miktarı	% Kazanım
1	496,63	99,3
2	478,48	95,7
3	497,92	99,6
4	484,00	96,8
5	510,99	102,2
6	484,40	96,9
7	505,67	101,1
8	514,08	102,8
9	537,12	107,4
10	533,59	106,7
Ortalama	504,29	100,9

3.1.3. Tespit ve Tayin Edilebilirlik Sınırı (Kalitatif Teşhis ve Kantitatif Tayin Sınırı)

Tespit ve tayin edilebilirlik sınırı, sonuçların standart sapması ve kalibrasyon eğrisinin eğimi ile belirlenmiştir (Eşitlik 7.1 ve 7.2) [12]. Elde edilen değerler Çizelge 4’de gösterilmektedir.

$$\text{Tespit edilebilirlik sınırı} = 3,3s/S \quad (1)$$

$$\text{Tayin edilebilirlik sınırı} = 10s/S \quad (2)$$

s= Sonuçların standart sapması (N=10), S= Kalibrasyon eğrisinin eğimi

Çizelge 4. Aspartamın tespit ve tayin edilebilirlik sınırı çalışmasında elde edilen veriler

Parametre	Bulunan Değer
SD	20,14
% RSD	3,99
Güven Aralığı*	12,48
LOD (ng/leke)	36,73
LOQ (ng/leke)	111,31

* %95 güven düzeyinde

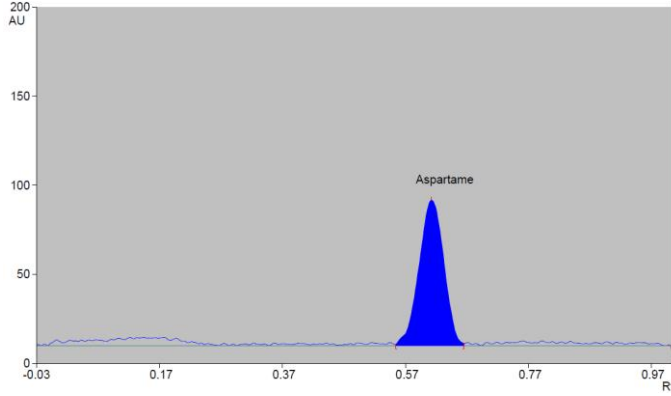
3.1.4. Doğruluk (% Geri Kazanım)

Farklı matris türlerinde standart eklenmesiyle yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar Çizelge 5’de yer almaktadır. Ayrıca elde edilen kromatogram Şekil 4’de gösterilmektedir.

Çizelge 5. Farklı matris türlerinde aspartamın % geri kazanımı

Matris	Aspartam Miktarı (ng/leke)					SD	% RSD	% Geri Kazanım	Güven Aralığı*
	Alınan Miktar	Bulunan Miktarlar							
		1	2	3	Ort.				
Şekerli Şurup (Pekmez)	500,00	494,43	469,78	460,80	475,00	17,41	3,67	95,0	19,7
Unlu Mamul	500,00	482,44	468,80	484,70	478,65	8,60	1,80	95,7	9,7
Bebek Maması	500,00	474,92	492,98	464,68	477,53	14,33	3,00	95,5	16,2
Şekerli Çikolata	500,00	491,33	485,40	472,82	483,18	9,45	1,96	96,6	10,7

* %95 güven düzeyi

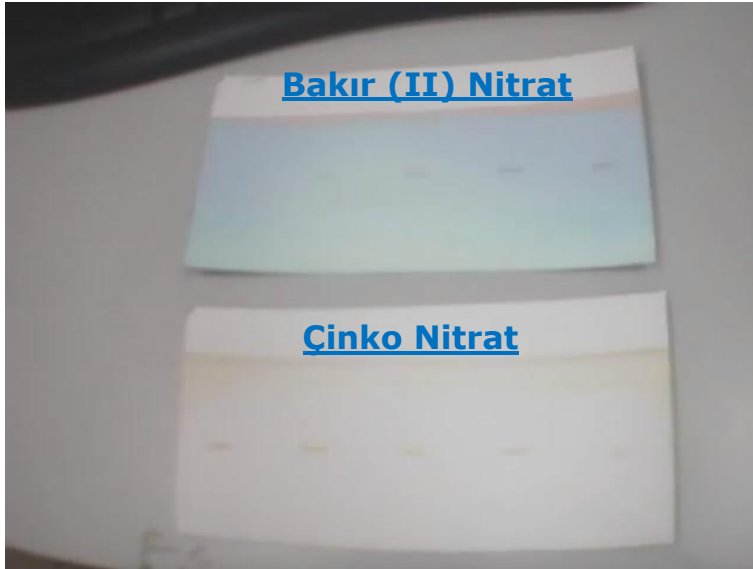


Şekil 4. Numenelerin analizi sonucu elde edilen aspartama ait kromatogram

3.1.5. Aspartam Lekelerinin Belirginleştirilmesi ve Kararlı Hale Getirilmesi

Ninhidrinle türevlendirilen aspartam lekeleri kısa bir süre kararlı halde kalmakta ve plaka üzerindeki rengi solmaktadır. Bu kararlılığın metal iyonlarıyla kompleks oluşturduğunda oldukça arttığı belirtilmektedir [13].

Bölüm 2.4.1’de belirtildiği gibi yapılan çalışmada Şekil 5’te görüldüğü üzere bakır (II) nitrat çözeltisine daldırılan plaka zemininde belirgin renklenme gözlemlenmiştir. Aynı işlem çinko nitrat çözeltisi ile denendiğinde, zeminde renklenmeye neden olmaksızın lekelerin daha belirginleştiği ve kararlı kaldığı gözlemlenmiştir.



Şekil 5. Ninhidrinle türevlendirilen aspartam lekelerinin çinko nitrat ve bakır (II) nitrat çözeltilerine daldırılması sonucu görünümlerinin karşılaştırılması

3.1.5.1. Çinko Nitrat Çözeltisine Daldırılmış Plakada Sistem Kesinliği

Plaka üzerine 10 defa uygulanan ve 500 ng/leke aspartam analizi sonucu % kazanım, 96,5-103,0 arasında tespit edilmiştir

3.1.5.2. Çinko Nitrat Çözeltisine Daldırılmış Plakada Tespit ve Tayin Edilebilirlik Sınırı

Bölüm 3.1.3'te belirtilen hesaplamalar yapıldığında bulunan değerler Çizelge 6'da gösterilmektedir.

Çizelge 6. Çinko nitrat çözeltisine daldırılan plakadaki aspartamın tespit ve tayin edilebilirlik sınırı çalışmasında elde edilen veriler

Parametre	Bulunan Değer
SD	10,36
% RSD	2,08
GÜVEN ARALIĞI*	6,42
LOD (ng/leke)	5,42
LOQ (ng/leke)	16,44

* % 95 güven düzeyi

Ninhidrinle türevlendirilerek 620 nm'de taratılma sonucu ile aynı plakanın ninhidrinle türevlendirme sonrası çinko nitrat çözeltisine daldırılması ve 400 nm'de yapılan taratılma sonuçlarının karşılaştırılması Çizelge 7'dedir.

Çizelge 7. Ninhidrinle türevlendirilen ile ninhidrinle türevlendirme sonrası çinko nitrat çözeltisine daldırılması sonuçlarının karşılaştırılması

Parametre	Bulunan Değer	
	Ninhidrinle türevlendirme-620 nm'de tarama	Çinko Nitrat çözeltisine daldırma-400 nm'de tarama
SD	20,14	10,36
% RSD	3,99	2,08
GÜVEN ARALIĞI*	12,48	6,42
LOD (ng/leke)	36,73	5,42
LOQ (ng/leke)	111,31	16,44

* % 95 güven düzeyi

3.2. Sakarin Analizi İçin Yapılan Çalışmalar

Öncelikle sodyum sakarinin karakterize edilebilmesi ve değerlendirilmenin ne suretle yapılacağıın tespiti için, silika plaka üzerine 5 µL 100 ppm'lik sodyum sakarin çözeltisi uygulanmıştır. Sakarin uygulaması yapılan ancak herhangi bir yürütme işlemi yapılmayan silika plaka, absorban/reflaktans modunda 190-350 nm dalga boyu aralığında 5,0 nm aralıklarla taratıldığında 190-270 nm dalga boyları arasında absorban yaptığı gözlemlenmiştir.

3.2.1. Doğrusallık ve Doğrusallık Aralığı

Bölüm 3.1.1'de belirtilen çalışma parametreleri kullanıldığında sakarin miktarı ile leke alanı arasında 200-1200 ng/leke aralığında doğrusallık tespit edilmiş ve elde edilen kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı (R^2) değeri de 0.9974 olduğu görülmüştür.

3.2.2. Sistem Kesinliği

Bölüm 3.1.2'de belirtilen çalışma parametreleri altında sakarin uygulaması sonucu elde edilen sonuçlar Çizelge 8'de gösterilmiştir.

Çizelge 8. 10 adet 500 ng/leke sakarin uygulanması sonucu elde edilen % miktar değerleri

Sıra No	Bulunan Sakarin Miktarı (ng/leke)	% Kazanım
1	513,65	102,7
2	499,56	99,9
3	500,56	100,1
4	506,56	101,3
5	510,87	102,2
6	502,50	100,5
7	494,85	99,0
8	505,94	101,2
9	490,50	98,1
10	482,31	96,5
Ortalama	500,73	100,1

3.2.3. Tespit ve Tayin Edilebilirlik Sınırı

Bölüm 3.1.3'de belirtilen çalışma parametrelerinin kullanımı ve hesaplamalar sonucu elde edilen değerler Çizelge 9'da gösterilmektedir.

Çizelge 9. Sakarin için tespit ve tayin edilebilirlik sınırı çalışmasında elde edilen veriler

Parametre	Bulunan Değer
SD	9,51
% RSD	1,90
Güven Aralığı*	5,90
LOD	8,81
LOQ	26,68

* % 95 güven düzeyi

3.2.4. Doğruluk (% Geri Kazanım)

Farklı matris türlerinde standart sakarin ekleyerek yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar Çizelge 10'da yer almaktadır.

Çizelge 10. Farklı matris türlerinde sakarinin % geri kazanımı

Matris	Aspartam Miktarı (ng/leke)					SD	% RSD	% Geri Kazanım	Güven Aralığı*
	Alınan Miktar	Bulunan Miktarlar							
		1	2	3	Ort.				
Şekerli Şurup (Pekmez)	500,00	553,21	547,84	515,16	538,74	20,59	3,82	107,7	23,3
Unlu Mamul	500,00	501,04	486,43	499,20	495,56	7,96	1,61	99,1	9,0
Bebek Maması	500,00	546,72	547,35	514,26	536,11	18,93	3,53	107,2	21,4
Şekerli Çikolata	500,00	506,58	489,00	491,87	495,82	9,43	1,90	99,2	10,7

* %95 güven düzeyi

Çalışmamızdaki YPİTK metotları basit, ekonomik bir yöntem olmakla beraber söz konusu metotlarda doğrusalılık, doğrusalılık aralığı, doğruluk (geri kazanım) ve sistem kesinliği parametreleri incelenmiştir. Ayrıca şeker, un ve nişasta, yağ, vitamin, kafein ve teobromin (kakaodan gelen alkaloidler) gibi maddeleri içeren farklı matris türlerinin bulunduğu ortamda ve bu şartlarda metotların spesifik olduğu görülmüştür. Sonuç olarak bu metotlar gıda sanayi için, özellikle iş yoğunluğu yüksek laboratuvarlarda kısa süreli ve güvenilir olup rutin analizlerde diğer yöntemlere göre (HPLC gibi) düşük-maliyetli alternatif yöntemlerdir.

REFERENCES / KAYNAKLAR

- [1] Yılmaz, N., Yapay Tatlandırıcılar ve Gıda Sanayinde Kullanımları, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, 2007.
- [2] TS EN 12856, Gıda Maddeleri-Asesulfam-K, Aspartam ve Sakarin tayini-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografik Yöntem, TSE, I. Baskı, Ankara, 2003.
- [3] Sergio A., Salvador G. ve Miguel G., FTIR Determination of Aspartame and Acesulfame-K in Tabletop Sweeteners, J. Agric. Food Chem., Vol. 52, No. 26, 2004
- [4] Aboul-Enein H. Y., Bakr S. A., Comparative Study of The Separation and Determination of Aspartame and Its Decomposition Products in Bulk Material and Diet Soft Drinks By HPLC and CE, J. LIQ. CHROM. & REL. TECHNOL., 20(9), 1437-1444, 1997.
- [5] Coppini D., Albasini A., Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. 59,239, 1968.
- [6] Conacher H.B.S., O'Brien R.C., J. AOAC Int. 53, 1117, 1970.
- [7] Zhu Y., Guo Y., Ye M., J. Chromatogr. A 1085, 143-146, 2005.
- [8] Yılmaz, N., Yapay Tatlandırıcılar ve Gıda Sanayinde Kullanımları, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, 2007.
- [9] Idris M., Srivastava S., Baggi T.R., ve Shukla S. K., High-Performance Thin-Layer Chromatography Analysis of Saccharin in Foods and Beverages, Journal of Planar Chromatography 23 5, 339-342, 2010.
- [10] Sherma J., Chapin S., Follenweiler J., Quantitative TLC determination of aspartame in beverages, Americ. Lab. 17, (3) 131-133 1985.
- [11] Cakar M., Gordana P., Determination of Saccharin in Pharmaceuticals by High Performance Thin Layer Chromatography, J. Serb. Chem. Soc., , 71 (6) 669-676, 2006.
- [12] <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>, [Erişim Tarihi; 23 Mart 2011].
- [13] Helmut J., Werner F., Walter F., Hans W., (1990). Thin-layer Chromatography Reagents and Dedection Methods, Volume 1a, VCH Verlagsgesellschaft rnbH, Almanya.