

**İÇECEKLER İÇERİSİNDEKİ NEOTAMİN YPSK KULLANARAK DAD
DEDEKTÖRLE TAYİNİ**

Selin CANBAZOĞLU KILINÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof Dr. Göksel ARLI

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

ÖZET

İÇECEKLER İÇERİSİNDEKİ NEOTAMIN YPSK KULLANARAK DAD DDEKTÖRLE TAYİNİ

Selin CANBAZOĞLU KILINÇ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağustos 2020

Danışman: Prof. Dr. Göksel ARLI

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) ile neotam içeren içeceklerdeki miktar tayini yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Türkiye’de satılan içeceklerde neotam miktarının belirlenmesi için YPSK yöntemi geliştirildi ve geçerlilik testleri yapıldı. Farklı mobil faz bileşenleri ve oranları ile neotam kromatogramları gözlemlendi. En iyi kromatogram Asetonitril (ACN):Fosfat tamponu:Su (35:50:15, *h/h/h*) bileşiminde 210 nm dalga boyunda tespit edildi. Yöntemde foto diyot dizisi (DAD) dedektör ve C₁₈ (150×4.6 mm, 2.7 µm) kolonu, 0.8 mL/dk akış hızı, 5µL enjeksiyon hacmi çalışma parametreleri kullanıldı. YPSK yönteminin metodu belirlendikten sonra doğrusallık, gün içi ve günler arası kesinlik, doğruluk ve çeşitli parametrelerdeki değişiklikler ile sağlamlık testleri ICH kurallarına göre uygulanmıştır.

2-100 mg/L derişim aralığında YPSK yönteminin doğrusallığı $R^2=0.9973$ olarak tespit edildi. Gün içi ve günler arası analizler sonucu kesinlik %BSS 0.1445, ortalama geri kazanım değeri %96.54 olarak bulundu. Geliştirilen YPSK yöntemi neotam içeren içecek ve 25 mg/L standart çözeltisine uygulandı.

İçeceklerde neotam miktar tayini içeren geliştirilen yöntem ve geçerlilik testleri başarı ile uygulandı.

Anahtar Kelimeler: Neotam, YPSK, İçecek.

ABSTRACT

Determination of Neotame in Beverages Using HPLC with DAD

Selin CANBAZOĞLU KILINÇ

Department of Analytical Chemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, August 2020

Supervisor: Prof. Dr. Göksel ARLI

It is aimed to develop the quantification method at the beverages which contain neotame with high performance liquid chromatography (HPLC).

In order to determine the quantity of neotame at the drinks which are sold in Turkey, the HPLC method was developed and the validation test of the method was made. The neotame chromatography was observed in different mobile phase components and rates. The best chromatography was determined in the components of Acetonitrile (ACN):Phosphate buffer:Water (35:50:15, v/v/v) during 210 nm wavelength. In the method, photo diode array (DAD) detector and C₁₈ column, 0.8 mL/min flow rate, 5 µL injection volume study parameters were used. After the determination of HPLC method, linearity, intra-day and inter-day precision accuracy and stability tests with the differences at the various parameters were applied according to ICH rules.

The linearity of the HPLC method is determined as $R^2=0.9973$ at 2-100 mg/L concentration range. It is found that the precision is %RSD 0.1445 and the average recovery value is %96.54 at the result of the intraday and inter day analyzes. The developed HPLC method is applied to the drinks containing neotame and the standard 25 mg/L situation.

The developed method and the validation test were applied to the drink which contains neotame successfully.

Key Words: HPLC, Neotame, Beverages.

ÖNSÖZ

Bilgi ve deneyimlerini akademisyen olarak değil, bir anne bir abla şefkatiyle olan yaklaşımları ile en iyi şekilde yetiştirmemiz için bizleri destekleyen, yüksek lisans çalışmaları sonucunda tezin hazırlanmasında emeği olan Danışman hocam Prof. Dr. Göksel ARLI'ya

Tez sürecindeki çalışmalarımda bana en yoğun zamanlarında dahi yardımcı olabilmek adına değerli vakitini bizlere harcayan Sayın Hocam Arş. Gör. Murat SOYSEVEN'e

Laboratuvar deneylerinde yardımını esirgemeyen değerli arkadaşım Yüksek Kimyager İpek ÇİLER'e

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan, desteklerini maddi ve manevi olarak hiçbir zaman esirgemeyen değerli aileme teşekkürler ederim.

01/07/2020

ETİK İLKE VE KURALLAR UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmanın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan ‘bilimsel intihal tespit programı’yla tarandığını ve hiçbir şekilde ‘intihal içermediğini’ beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Selin CANBAZOĞLU KILINÇ

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ÖZET	ii
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	iv
ETİK İLKE VE KURALLAR UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. LİTERATÜR.....	5
2.1. İçecekler ve Tatlandırıcılar	5
2.1.1. İçecekler.....	5
2.1.2. Tatlandırıcılar	8
2.2. Neotam	12
2.2.1. Fizikokimyasal özellikleri	13
2.2.2. Fizyolojik özellikleri	15
2.2.3. Duyusal özellikleri	17
2.3. Neotamın Kullanım Alanları.....	18
2.4. Neotam Tayini ile İlgili Çalışmalar	20
3. GEREÇLER.....	26
3.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	26
3.2. Cihazlar	26
4. YÖNTEM	27
4.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)	27
4.1.1. Mobil faz.....	28

4.1.2. Sabit faz	28
4.1.3. Dedektörler.....	28
4.1.3.1. Ultraviyole/Görünür bölge dedektörü (DAD)	29
4.2. YPSK'nın Avantaj ve Dezavantajları	29
4.3. YPSK'da Kullanılan Temel Parametreler	31
4.3.1. Alıkonma zamanı.....	31
4.3.2. Kapasite faktörü (k')	32
4.3.3. Teorik tabaka sayısı (N)	32
4.3.4. Kolon ayırma gücü (R_s)	32
4.3.5. Seçicilik faktörü (α)	32
4.3.6. Kuyruklanma faktörü (T) ve asimetri faktörü (A_s)	33
4.4. Kromatografik Koşullar	33
4.3. Yöntemin Validasyonu	33
4.3.1. Kesinlik.....	33
4.3.2. Doğruluk.....	34
4.3.3. Doğrusallık	34
4.3.4. Saptama sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ)	34
4.3.5. Özgünlük	35
4.3.6. Sağlamlık	35
5. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	36
5.1. Standart Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması	36
5.2. İçecek Numunelerinin Hazırlanması.....	36
5.3. YPSK Yöntem Geliştirme	36
5.4. Hareketli Faz Optimizasyonu	36
5.5. YPSK Yöntem Geçerlilik Testleri.....	37
5.5.1. Doğrusallık	37
5.5.2. Doğruluk.....	38

5.5.3. Kesinlik	39
5.5.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve miktar tayin alt sınırı (LOQ)	39
5.5.5. Sağlamlık	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	45
KAYNAKLAR	46



TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Yapay tatlandırıcıların özellikleri	10
Tablo 2.2. Bazı ürünlerde neotam dozu	18
Tablo 2.3. Bazı ürünlerde neotamın stabilite süresi	18
Tablo 5.1. Neotamın optimum koşullardaki şartları	37
Tablo 5.2. Optimum koşullarda gözlenen sistem uygunluk testi sonuçları	37
Tablo 5.3. Doğrusallık sonuçları	38
Tablo 5.4. Neotamın, YPSK yönteminde doğruluk değerleri	38
Tablo 5.5. YPSK yönteminin gün içi ve günler arası kesinlik değerleri.....	39
Tablo 5.6. Hareketli faz yüzdesi değişikliği sonucu sağlamlık sonuçları	40
Tablo 5.7. Akış hızı değişikliği sonucu sağlamlık sonuçları	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Neotamın yapısı.....	12
Şekil 2.2. Neotamın sudaki çözünürlüğü.....	14
Şekil 2.3. Neotamın bozulması.....	15
Şekil 2.4. Sudaki tanımlayıcı tat profili	17
Şekil 4.1. YPSK'nın kısımları	28
Şekil 4.2. Kromatografik metotların sınıflandırılması	31
Şekil 5.1. 25 mg/L derişimindeki standart neotam çözeltisinin YPSK kromatogramı ..	37
Şekil 5.2. 50 mg/L derişimindeki neotam içeren örneğin YPSK kromatogramı	39
Şekil 5.3. 25 mg/L standart çözeltinin %49 mobil fazdaki kromatogramı.....	40
Şekil 5.4. İçecek örneğinin %51 mobil fazdaki kromatogramı	41
Şekil 5.5. 25 mg/L standart neotam çözeltisinin 0,7 mL/dk'daki kromatogramı.....	41
Şekil 5.6. 0,9 mL/dk akış hızında 37 mg/L içecek örneğinin kromatogramı	42
Şekil 5.7. Asitli içecek örneğinden elde edilen kromatogram.....	42
Şekil 5.8. Soda örneğinden elde edilen kromatogram.....	43
Şekil 5.9. Enerji içeceğinden elde edilen kromatogram	43
Şekil 5.10. Su örneğinden elde edilen kromatogram.....	44

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Seçicilik Faktörü
ACN	: Asetonitril
Alitam	: ALI
APM	: Aspartam
As	: Asimetri Faktörü
BSS	: Bağlı Standart Sapma
BH	: Bağlı Hata
Bw	: Vücut ağırlığı
CE	: Kapiler Elektroforez
DAD	: Diyot dizisi dedektör
Dk	: Dakika
ELSD	: Evaporatif ışık saçılım dedektör
ESI	: Elektrosprey iyonizasyon
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FSA	: İngiltere'nin Gıda Standartları Ajansı
GC	: Gaz Kromatografi
ICH	: Uluslararası Uyumlandırma Konferansı
LC	: Sıvı kromatografi
LOD	: Saptama Sınırı
LOQ	: Tayin Sınırı
MS	: Kütle Spektrometri
N	: Teorik tabaka sayısı
NEO	: Neotam
k'	: Kapasite faktörü
PDVF	: Polivinilden florür
Pku	: Fenilketoüri (Kalıtsal bir hastalık)
Rs	: Ayırma gücü

RT	: Alıkonma Zamanı
PVDF	: Polivinilden florür
SPE	: Katı Faz Ekstraksiyonu
Ss	: Standart Sapma
SSNMR	: Katı nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
TLC	: İnce Tabaka Kromatografi
Tr	: Alıkonma zamanı
UV	: Mor Ötesi
YPSK	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
W	: Pik genişliği

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Aşırı şeker tüketimi, araştırmacıları bu yiyeceğe alternatifler aramaya itmiştir. Şekere alternatif olan, kalorisiz yapay tatlandırıcılardır. Bu tatlandırıcılar, normal şekerler yerine, yiyecek ve içeceklerde kullanılan kimyasal maddeler veya doğal yiyeceklerdir. Bu bileşenlerin tatlılığı, normal şekerin birkaç katı olduğundan, normal şekerden çok daha az kullanılabilir. Bu özellik, neotamı endüstriyel kullanım için daha uygun hale getirmiştir. Ek olarak, bu tatlandırıcılar normal şekerden çok daha az kaloriye sahiptir ve diyabeti olan kişilerde kan şekerini azaltmak veya yüksek kan şekerini önlemek için kullanılır. Yapay tatlandırıcılar, tatlı içecekler, hamur işleri, reçeller, konserve gıdalar ve hatta evde kullanılan yapay tatlandırıcılar gibi işlenmiş gıdalarda yaygın olarak kullanılır. Yapay tatlandırıcılar şeker hastaları için şeker iyi bir alternatif olabilir çünkü bunlar bir karbonhidrat kaynağı değildir. Neotam, her tüketici için güvenli olan bir şeker alternatifidir. İnsanlar şeker yerine neotamı güvenle kullanabilirler. Sentetik bir tatlandırıcı olarak bilinen neotam, bazı gıda ürünlerinde şeker yerine uygun bir yedek rolünü oynayabilir. Bu bakımdan, neotamı şeker alternatif bir tatlandırıcı olarak tanımlamak önemlidir (Cadena vd., 2013).

Neotam şeker alternatif bir tatlandırıcı olarak bilinmektedir. Şekerin vücuda birçok zararları vardır ve onun az tüketimi insanların sağlığı için önemlidir. Şekerin fiziksel sağlık üzerindeki olumsuz etkileri, çeşitli çalışmalarda belgelenmiştir. Bu yüzden insanların kilo almak ve çeşitli hastalıkların riskini azaltmak için şeker alımlarını azaltmaları gerekir (Edwards vd., 2016) .

Şekerin sağlık üzerindeki olumsuz etkilerinden biride cilt üzerindeki etkileridir. Vücutta bulunan fazla miktardaki şeker proteine bağlanarak proteinin yapısını denature olmasına sebep olur. Cildin en önemli bileşenlerinden kollojen ve elastin proteinleri bağlanma sonucu tahribata uğrayabiliyor. Cildin elastikliğini ve sıkılığını sağlayan elastin ile kollajenin şeker molekülleri tarafından hasar görmesi de ciltte sarkma, kırışıklık ve yüzeyde bozulmalara sebep olabiliyor (Edwards vd., 2016).

Çok fazla şeker tüketmek beyin kimyasal dengesizliklerine neden olur. Bu dengesizlik, depresyona neden olur ve hatta bazı kişilerde uzun vadeli zihinsel sorunların gelişme riskini artırabilir. 2017 yılında yapılan bir çalışma, her gün büyük miktarda şeker tüketen erkeklerin, beş yıl içinde depresyon gelişme ihtimalinin diğerlerine göre yüzde 23 daha fazla olduğunu göstermektedir. Çalışmanın erkekleri içermesine rağmen,

kadınlarda şeker ile depresyon arasındaki ilişki de belirgindir. Yapılan araştırmalarda eğer kan şekeri uzun süre normal değerlerin üzerinde olursa, normal bireylere nazaran beyin küçülme riskinin arttığı gözlemlendi. Fazla şeker tüketimi ayrıca öğrenme güçlüğü ve dikkat eksikliği üzerinde de etkisi olduğu bilinmektedir. Araştırmacılar beyindeki genlerin fruktozdan etkilenebileceğini buldular. Bu hafızayı ve öğrenmeyi etkileyebilir ve hatta Alzheimer hastalığına, diyabete ve kalp hastalığına yol açabilir. Amerikan diyetindeki temel fruktoz kaynağı, yüksek şeker fruktoz ve şeker pancarı şekeri ve mısır şurubu (Edwards vd., 2016).

Fazla şeker tüketimi hastalıklara karşı vücudun direncini zayıflatarak hastalıklara yakalanma riskini arttırmaktadır. Vücudun savunma sisteminin önemli parçalarından olan alyuvar hücreleri ve C vitamini şeker ile benzer molekül yapısına sahip olduğundan fazla tüketiminde bağışıklık hücreleri tarafından kullanılmıyor. Buda bağışıklık sisteminin direncini zayıflamasına sebep olmaktadır (Edwards vd., 2016).

Kanser riski şeker tüketen insanlarda daha fazladır. Amerika Diyet Rehberi'nin 2010 yılı raporlarında, şeker kullanımı ile ilgili 5 kronik hastalıkta etkili olduğundan söz edilmiş. Kanser bu hastalıkların en önemlilerinden biridir. Doğal olarak şeker içeren tahıllar, süt ve süt ürünleri, kurubaklagiller aynı zamanda kansere koruyucu olarak görev yapan vitamin, mineral, antioksidan ve fitokimyasallar gibi maddeler içeriyorlar. Bunun aksine sofraya şekerli boş kalori olmasının yanı sıra hiçbir koruyucu madde içermiyor. Meme kanseri gibi bazı kanserlerin şeker tüketiminden daha fazla etkilendiği belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda yüksek şeker tüketimi ile endometrium, meme, pankreas ve kolorektal kanserleri arasında pozitif ilişki tespit edilmiş (Edwards vd., 2016).

Neotamin birçok kullanım yeri vardır. Birçok ürününde özellikle, içeceklerde neotam ve şeker kullanılır ya da glikoz fruktoz şurubu ile birlikte kullanılır. Aynı şekilde neotamin diğer tatlandırıcılar ile birlikte yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Mitchell, 2008).

Neotaminin başka bir özelliği stabil ve kalıcı olmasıdır. Neotam yoğun tatlılığı nedeniyle, gıda ürünlerini tatlandırmak için az miktarda kullanılır. Neotam on altı hafta boyunca, düşük kalorili alkolsüz gazlı içeceklerde kalır, bu yüzden bu içecek türüyle tamamen uyumludur. Diğer ürünler yaklaşık 156 hafta boyunca stabil ve kalıcıdır. Neotam, 52 hafta boyunca içme tozlarında stabil ve kalıcı olmuştur. Neotam, kekler için

de etkiliydi çünkü 5 günlük depolama ve %60'lık bağıl nemden sonra, neotamin sadece %4'ü kek içinde kaybedilmiştir. Sakız kapsülleme durumunda, kapsülleme raf ömrünü arttırır ve 52 hafta boyunca bozulmaya karşı korur. Süt ürünlerinde de neotam başarılı olmuştur ve bu ürünlerin normal raf ömrü olan altıncı haftanın sonunda yoğurt gibi süt ürünlerinde, orijinal neotamin yaklaşık %98'i kalmıştır.

Neotam, besleyici olmayan bir tatlandırıcı olarak ticari pazarda yer almasının sebep olan beş özelliğe sahiptir. Bu beş özellik şunlardır: tat, çözünürlük, stabilite, güvenlik ve maliyet.

Neotam tadı güzel ve tatlıdır. Sükroz tadına çok benzer. Aynı zamanda aspartamdan 20-30 kat daha tatlı, sakarozdan 13.000-7.000 daha tatlıdır. Diğer yapay tatlandırıcılarda bulunan acı veya metalik bir tada sahip değildir (Bannwart vd., 2008) .

Neotamin çözünürlüğü sakarozdan yüzlerce kat daha yüksektir.

Neotam kuru koşullarda yüksek raf ömrüne sahiptir. Sulu sistemlerde ve asidik koşullar altında neotam, aspartam ile neredeyse aynı stabiliteye sahiptir ve bu nedenle, bu koşullar altında aspartam ile benzer kullanımlara sahiptir. Nötr pH aralığında neotam, aspartamdan anlamlı olarak daha stabildir. Yüksek sıcaklık koşullarında, ayrıca daha stabildir, bu da neotamin pişmiş ürünlerde güçlü olma yeteneğini ve geniş uygulanabilirliğini gösterir.

Çok düşük kullanımı nedeniyle, güvenlik değeri farmakokinetik özellikleri açısından arzu edilen bir materyal olarak kabul edilir. Aynı zamanda tedarik kolaylığı nedeniyle de güvenlidir (şaşırtıcı tatlandırma yeteneğine rağmen).

Neotam rekabetçi ve pazar da ilgi görmüştür zira aynı tatlılık düzeyindeki aspartam ve sukrozdan daha ucuzdur.

Neotam'ın birçok belirgin avantajı vardır. Örneğin, normal kullanım seviyelerinde kalorik olmayan bir tatlandırıcı olarak kabul edilebilir. Çok çeşitli yiyecekler ve diyet malzemeleri ile uyumludur. Örneğin, aspartamın aksine, indirgen şekerlerle (glukoz, fruktoz, yüksek fruktozlu mısır şurubu, maltoz, laktoz, vb.) Reaksiyona girme sorunu yoktur. Aynı zamanda aldehit bazlı aroma maddeleri (vanilin, etil vanilin, tarçın, tarnamaldehit ve sitrat gibi) ile hiçbir problemi yoktur ve eşsiz, mutajenik ve kanserojen olmayan aroma arttırıcı özelliklere sahiptir.

Burada neotamin özelliklerinden sadece birkaçı belirtilmiştir, ancak bu özellikler onu fonksiyonel gıda endüstrisinde bir seçenek haline getirmektedir. Neotamin benzersiz

özellikleri, gıda endüstrisi teknolojistlerinin yeni fonksiyonel yiyecekler ve içecekler üretmeleri için başka bir araç sağladı ve böylece şeker kalorisi olmayan tüketiciler için tatsız bir gıda talebi sağlamıştır.

Bu çalışmada içecekler içerisindeki neotamin YPSK kullanarak DAD dedektörle tayininin araştırılması yapılmıştır. İkinci bölümün amacı, neotamin özelliklerini incelemektir. Bu bölümde üç önemli bölüm vardır: içecekler ve tatlandırıcılar, neotamin özellikleri ve neotamin tayini konusunda yapılan çalışmalar. Üçüncü bölümde kullanılan yöntem hakkında bilgi verilmiştir. Araştırmanın deseni, veri toplama, YPSK yöntemi ve verilerin analizi bu bölümde anlatılmıştır. Bulgular, tartışma ve sonuç en son bölümlerde yer almaktadır. Bulgular bölümünde yapılan çalışmada elde edilen verilerin çözümlenmesi sonucunda ortaya çıkan bulgular ve bulguların yorumları yer almaktadır.

2. LİTERATÜR

2.1. İçecekler ve Tatlandırıcılar

2.1.1. İçecekler

Bu bölümde önce Türkiye’de ve dünyada içecek sektörü hakkında bilgi verilecektir ve sonra kitleler arasında şu anda popüler olan içeceklerin hakkında bilgi verilecektir.

İçecek tarihinin başlangıcının 17. yüzyıla kadar gittiği söylenebilir. 1676 yılında Fransa’nın Paris şehrinde üretilen De Lemonades isimli içecek su dışında tüketicilere sunulan ilk ürünlerden olmuştur. 1767 yılında karbondioksitin içeceklere dâhil edilmesi ile “gazlı içecek” olarak anılacak yeni bir ürün grubu oluşmuştur. 1830 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde Coca-Cola’nın ve 1898 yılında Pepsi’nin faaliyete başlaması ile ilk modern içecek markaları oluşmuştur. Amerika Birleşik Devletlerinde oluşan bu iki markanın ulusal büyüme ve genişleme göstermesi ile birlikte içecek sektörünün oluşmaya başladığı söylenebilir. Ulusal pazarda olgunluk aşamasına gelen sektörle birlikte 1977 yılında Coca-Cola’nın Hindistan pazarına açılması ile içecek sektörünün uluslararası alanda en önemli açılımı gerçekleşmiştir. Günümüzde yüzlerce içecek markası ulusal ve uluslararası pazarlarda operasyonlarını sürdürmektedir (Tuncer & Gökşen, 2016).

İnsan vücudu suyunu kaybedince, bize "susuzluk" dediğimiz bir duygu verir. Yani sıvı içme ihtiyacını hissetmek demektir. Sıcak yaz günlerinde, hepimizin serin bir içecek içme ihtiyacımız artar. Tabii ki susuzluk sıvı tüketmenin tek nedeni değildir. Ancak soğuk kış günlerinde veya yağlı bir yemekten sonra, uzmanlar yemekten hemen sonra veya boş bir mideyle su içmeyi tavsiye etmesede, bir fincan çay veya sıcak kahve çok iyi gelir (Schwartz vd., 2015).

Dünyanın dört bir yanındaki milyonlarca insan, güne çay veya kahve ile başlar ve bu popülerlik onu milyar dolar cirolu büyük bir endüstri haline getirmiştir. Milyarlarca insan güne su, bitkisel içecekler ve özellikle meyve suyu veya bir tür içki ile başlarlar. Bu arada soda ve kola gibi gazlı içeceklerin popülaritesi de hafife alınmamalıdır. Bu şekerli içeceklerin kullanımı o kadar artmıştır ki, beslenme uzmanları insanları, özellikle de çocukları, bu içecekleri kullanma konusunda ciddi şekilde uarmaktadır. Tıbbi tavsiyelere rağmen, gazlı içecek üreten büyük şirketler, öyle bir politika benimsemişler ki bu içeceklerin hayranlarının gün geçtikçe artmakta olduğu gözüküyor (Ancak, bu artan eğilim gelişmekte olan ülkelerde daha fazla görülüyor). Amerikan ve bazı Avrupa zincir restoranlarında, müşterilerin bir bardak gazlı içecek doldurması veya ikinci bir gazlı

içecek talep etmesi serbesttir; bu da daha fazla iemelerini teşvik eder. Araştırmalar ayrıca Coca-Cola ve Pepsi gibi gazlı içeceklerde olan kafeinin bağımlılık yaptığını göstermiştir. Ancak alkolsüz içecekler çay ve kahve veya şekerli ve zararlı içeceklerle sınırlı değıldir. Meyve suyu ayrıca içecek pazarında suyun yanı sıra önemli bir rol oynamaktadır (Schwartz, vd., 2015). Böylece fabrikalar faaliyete geçti, farklı meyve sularını şişelere ve zarflara döktüler, yetkili katkı maddeleri ve koruyucu maddeleri de ilave ettiler ve insanlara renkli paketlerde sundular. Bazen bu katkı maddeleri izin verilen seviyeyi aşar hatta doktorlar fabrika meyve sularında kullanılan şekerin de sağılığa zararlı olduğunu ve ieğin meyve kısmından daha çok esansıyla olduğuna syleselerde, bunların hiçbiri, bu içeceklerin popülaritesini ve artan tüketimini azaltmadı.

Grand View Research'in raporuna göre, Geçen yıl ki hazır çay ve kahve pazarının değerinin 2024 yılına kadar 116.13 milyar dolara ulaşacağını tahmin ediyordu. Raporda, ay ve kahvenin alkolsüz içecek endüstrisindeki büyüme eğilimine girdiğini belirtti. Bu içecekler sadece hızlı ve enerjik değil, bazı toplumlarda bir yaşam tarzıdır. Lezzetlerin eşitliliği ve bu içeceklerin özellikleri, ürün talebiyle doğrudan ilişkilidir. Bu ieeğe olan talebin artmasına katkıda bulunan bir diğer faktör, insanların zevklerindeki değişmedir. Çünkü kahve ve çayın acı tadı günümüzde popüler olmuş ve çoğu insan çay ve kahvelerini artık tatlandırmıyor (Grand View Research, 2017).

Her şeyden önce kahve herkesin seçimi gibi görünse de, dünyanın en popüler ieeği aydır. Sadece ABD'de çay tüketimi, 1990'lı yıllardan bu yana yüzde 400'den fazla arttı. Bugünlerde, şehrin her köşesinde en az bir kafe bulabilirsin ve bu tüm dünyada geçerlidir, yani kahvenin dünyanın en çok satan ürünlerinden biri olması şaşırtıcı değıldir. Tabloda en büyük 10 çay üreticisi ülkenin listesi listelenmiştir. Su ve aydan sonra dünyada en çok tüketilen nc içecek kahvedir. Yağdan sonra kahve, dünyada ticari olarak satılan ilk üründür. Her gün dünya çapında yaklaşık yarım trilyon fincan kahve tüketiliyor. Tabii ki, kahve çekirdeği içilmesi ve demlenmesi dışında başka kullanımları da var. Kahvede bulunan kafein, bazı işlemlerle bazı içecekler (Coca-Cola), ilaçlar ve kozmetikler için de kullanılır. Kahvenin farklı lezzetleri ve tadı vardır, ancak iki ana tür kahve ticari kullanım için ekilir. Biri dünyanın kahvesinin %70'ini sağlayan Arabica, diğeri ise Arabica'dan çok daha ucuz ve kolay yetiştirilen Robusta (Grand View Research, 2017).

Alkolsüz içecekler ve gazlı içeceklerde oldukça dünyada ilgi görmektedirler. Konsantre içeceklerin piyasa değeri 2013 yılında 255 milyon dolar olarak tahmin edildi

ve 2019 yılına kadar 34761 milyon dolara ulaşması bekleniyor. Yani, 2013 ve 2019 arasında yıllık büyüme oranı %5,4 olarak tahmin ediliyor. Konsantre içecek pazarının büyümesi, yiyecek ve içecek sektöründedir. Gelişmekte olan ülkelerde, insanların işlenmiş gıdalara ilgisi artıyor, bu da konsantre içeceklerin daha fazla kullanılmasına neden oluyor. Diyet alışkanlıklarına bağlı olarak sağlık sorunları da değişmiştir. İnsanlar besleyici yiyeceklere daha meyillidir ve bu nedenle konsantre içeceklerin tüketimi artmıştır. Gazsız içecek pazarına portakal, elma, meyve karışımı, üzüm, ananas, greyfurt, mango suları ve daha birçok şey hakimdir. 2013 yılında konsantre içecek pazarına Avrupa hakim oldu ve Kuzey Amerika'da ikinci oldu. Doğal ve sağlıklı içeceklerin ve işlenmiş ürünlerle sağlık sorunlarının artan popülaritesi, alkolsüz içecekler ve konsantre ürünler için gelişen pazarın ana nedenidir. Öte yandan, bugünlerde pek iyi olmayan gazlı içecekler var. Coca-Cola ve Pepsi'nin en meşhur içecek fabrikaları talebin azalmasından şikayetçiler. Çünkü dünyanın bir tarafında finansal bir kriz var, ancak insanlar şekerli ve gazlı içeceklerden uzak dururken, diğer taraftan bu içeceklerin nispeten yüksek fiyatı piyasayı eskisinden daha az müreffeh hale getirdi. Nüfus artışının dünya genelinde gıda arzı üzerinde büyük etkisi var. Bugünlerde tüm dünya beslenme ve gıda kalitesine çok dikkat ediyor. Çeşitli hükümetler ve özel sektörler, sağlıklı, saf ve besleyici gıda standartlarının karşılanmasında iyi adımlar attı. Gazlı olmayan içeceklerde farklı tatlar da tüketici talebini karşılar nitelikte. Son derece aromalı ve iştah açıcı ve farklı renklerde olan içecekler ayrıca ekonomik olarakta avantajlı hale geldi (Grand View Research, 2017).

Kitleler arasında şu anda popüler olan içeceklerin hakkında bilgi verilecektir. Şu anda genel tüketici popülasyonu tarafından tercih edilen 4 tür içecek listesi aşağıdadır. Bu çalışma içecekler içerisindeki neotamin, YPSK-DAD ile analizi olduğundan kısa da olsa içecekler konusunda bilgi vermekte fayda var. İçecekler dört türe sınıflandırılır, alkolsüz içecekler, enerji içecekleri, sağlıklı içecekler ve alkollü içecekler.

Alkolsüz içeceklerin tüm içecek türlerinin en popülerleri arasında olduğuna şüphe yoktur. Araştırmalara göre, gazlı alkolsüz içecekler Amerika Birleşik Devletleri'nde şişelenmiş sudan sonra en çok tüketilen içecek. Genel tüketici popülasyonu, hemen hemen her türlü amaç için tadını çıkarabileceğiniz tatlı tadımı iyiliği nedeniyle, diğer tüm içecekler içerisinde alkolsüz içecek olarak tercih edilmektedir. Özellikle restoranlarda bu tür içecekler fazlasıyla tüketiliyor (Haque, 2018).

Enerji içecekleri, tüm içecek türlerinde en tartışmalı ve en popüler olanlardan biridir. Enerji içecekleri ilk kez bilim adamı Dr. Enuf tarafından sunulmuştur. Enerji içecekleri vitamin ve şeker ile desteklenerek şekerli sodalara alternatif olarak sunulmuştur (Kayapınar & Özdemir, 2016). Potansiyel faydaları söz konusu olduğunda, enerji içecekleri, tüketicilere çeşitli görevleri yerine getirmeleri için ihtiyaç duydukları ek enerji, uyanıklık ve yoğunlaşmayı sağlayabilen inanılmaz derecede yararlı bir içecek türüdür. Ancak çok fazla miktarda enerji içeceği tüketimi, öncelikle içeceğin çok fazla şeker ve kafein içerdiği için sağlık komplikasyonlarına neden olabilir. İçki çoğunlukla iş sırasında ek saatlerini öğretmek zorunda kalan işçilerin yanı sıra yüksek düzeyde performans sergilemek isteyen sporcuların yanı sıra, kafeini seven genç tüketiciler arasında büyük bir taraftar grubuna sahiptir. Geniş bir tüketici tabanına sahip bir içecek türüdür ve özellikle gençler arasında çok tüketiliyor (Schwartz vd., 2015).

Yıllar geçtikçe, insanlar içtikleri içeceklerin türü konusunda bilinçlenmeye başlamaktadır. Şekerli içeceklerin aşırı tüketilmesinin sonucu insanlar daha sağlıklı içecekler tüketmesi konusunda bilgi sahibi oldu.

Genel tüketici popülasyonuna şekerli içeceklere sağlıklı bir alternatif sunmak için çeşitli içecekler sunulmuştur. Sağlıklı sıvı içecekler genç tüketiciler için popüler olmasada, yetişkinler arasında tüketilmektedir. Dikkat çeken sağlıklı içeceklerden bazıları matcha, yeşil çay ve nar suyudur.

Alkollü içecekler içmek, birçok kültürde yüzyıllardır bir temel olmuştur. Biralara, şaraplar ve alkollü içkiler tüketiciler tarafından çeşitli amaçlarla, ister kutlama, rahatlama, ister sadece rahat içki içmek için olsun kullanılmaktadırlar. Evlerde ve dairelerde, bar ve restoranlara, konser salonlarına ve spor stadyumlarında alkollü içecekler tüketilmektedir. Bazı tüketicilere göre, alkollü içecekler, damaklarını yumuşak bir şekilde tatmin edebilen benzersiz bir lezzet türü sunar. Alkollü içecekler zararlı tarafları olsada fazlasıyla toplumlarda tüketilmektedir (Broughton, Fairchild, & Morgan, 2016).

2.1.2. Tatlandırıcılar

Temel lezzetin bileşimi tatlı, ekşi, acı ve tuzlu olmak üzere bu dört sınıftan oluştuğu bilinmektedir. Birinci grup metallerinde en çok rastlanan lezzet tuzluluktur. Acılık gibi hemen hemen her kimyasal sınıfta olabilir Ekşilik ise protonik asitlerin özelliğidir (Özdemir, Başer, & Çakır, 2014).

Daha az kalori ile aynı miktardaki şekerden daha fazla tatlılığa sahip olan kimyasal maddelere tatlandırıcı denir (Özdemir, Başer, & Çakır, 2014).

Yapay ve doğal tatlandırıcı olmak üzere tatlandırıcılar iki sınıfta incelenmiştir. Tatlandırıcı kullanımına ilk olarak ekonominin kötüye gittiği zamanlarda gıda endüstrisinde maliyeti düşürmek için başlanmıştır. Zamanla tatlandırıcı kullanımı çeşitli sağlık sorunlarının olumsuz etkilerini azaltmak amacıyla gereksinim haline gelmiştir. Bu sağlık sorunlarından bazıları diş çürümesi, obezite ve şeker hastalığıdır. Kalorsiz veya kalorisi azaltılmış besinler tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Bal kullanılan ilk tatlandırıcıdır. Şeker kamışından elde edilen sakaroz daha sonraları balın yerine kullanılmaya başlanmıştır. Yıllar içinde doğal ve yapay tatlandırıcı olmak üzere tatlılık tadı veren birçok madde bulunmuştur. Günlük yaşamızda sıklıkla kullandığımız şeker türü sukroz sofralarımızda ve yiyeceklerimizdeki maddelerden biridir. Fruktoz ise meyvelerden elde edilen doğal şekerdir. İyi bir tatlandırıcıda olması gereken özelliklerin başında sukroz gibi hoş bir tatlı tadı vermesi, rensiz ve kokusuz olması aynı zamanda kalıcı bir lezzet bırakması istenmiştir. Stabilitesinde farklı ısı işlemlerde, asidik ve bazik ortamlarda koruyabilmesi ve suda kolaylıkla çözünbilmesi ideal tatlandırıcılarda istenilen özelliklerdendir. Sağlık açısından toksik olmamalı normal bir şekilde metabolize edilebilmelidir (Özdemir, Başer, & Çakır, 2014).

Yiyecek ve içeceklerde yaygın olarak bulunan iki tür tatlandırıcı vardır: kilojoul sağlayan şekerler ve az kilojoul veya hiç olmayan düşük kilojoul tatlandırıcılar veya başka bir deyim ile doğal tatlandırıcılar ve yapay tatlandırıcılar. Birçok insan tatlı olan yiyecek ve içecekleri sever, ancak kilosuna dikkat etmeye çalışan insanlar, genellikle besleyici olmayan tatlandırıcılar seçerler.

- Besleyici tatlandırıcılar (doğal tatlandırıcılar)

Sofra şekeri (sükroz) ve bal gibi tatlandırıcılar, enerji içeren karbonhidratlar olduğu için besleyici tatlandırıcılar olarak kabul edilir. Sükroz gram başına yaklaşık 17 kilojoule veya çay kaşığı başına 68 kilojoule içerir. Kilo yönetimi söz konusu olduğunda, kilogramlı içeceklerin de dahil olduğu yiyecek ve içeceklerden gelen her kilojelin sayıldığını hatırlamak önemlidir (İnanç & Çınar, 2009).

- Düşük kilojoule tatlandırıcılar (yapay tatlandırıcılar)

Düşük kilolu şekerli tatlandırıcılara bazen şeker ikameleri, besleyici olmayan tatlandırıcılar veya yoğun tatlandırıcılar denir, çünkü tatlılıkları çok güçlüdür - sakarozun

tatlılığının 200-600 katı arasındadır (sofra şekeri). Bu yüzden aspartam, sukraloz ve sakarin gibi tatlandırıcılar içeren yiyeceklerin tatlı tadabildiği, ancak az miktarda veya hiç kilojoule içermediği söylenebilir.

Düşük kilometreli tatlandırıcıları, özellikle de köpüklü içeceklerde bulunan ana tatlandırıcı olan aspartam hakkında çok bilgi kirliliği vardır. İçeceklerde kullanılan tatlandırıcılar hakkında daha fazla bilgi sahibi olmak, bilinçli kararlar almanıza ve içeceklerin mantıklı, dengeli bir diyet ve düzenli fiziksel aktivite içeren aktif, sağlıklı bir yaşamda oynayabilecekleri rolü daha iyi anlamana yardımcı olabilir (İnanç & Çınar, 2009).

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve İngiltere Gıda Standartları Ajansı (FSA) dâhil olmak üzere 200'den fazla bilimsel çalışma ve gıda düzenleme kurumu aspartamın bir besleyici tatlandırıcı olarak güvenliğini desteklemektedir. Şimdi yapay tatlandırıcılar olarak bilinen tatlandırıcılar tanıtılacaktır. Tablo 2.1'de bu tatlandırıcıların özellikleri görülmektedir.

Tablo 2.1. *Yapay tatlandırıcıların özellikleri*

Tatlandırıcı	FDA Onay Tarihi	Tatlılık	Kalori
Aspartam	1981	160-220 kat	4
Asesulfam K	1988	200 kat	0
Sukroloz	1999	600 kat	0
Neotam	2002	7000-13000 kat	0
Stevia	2008	250-300 kat	0
Sakarin	1958	200-700 kat	0

Zaten neotam hakkında gelecek bölümde detaylı bilgi verilecektir. Şimdi başka yapay tatlandırıcılar tanıtılacaktır.

1-aspartam

Aspartam, iki amino asit, aspartik asit ve fenilalanin'den oluşan, düşük kilolu bir tatlandırıcıdır. Bu amino asitlerin her ikisi de yumurta, et, balık, süt ürünleri ve fındık gibi protein içeren yiyeceklerde bulunur. Aspartam sofras şekeri (sakaroz) 'dan 180-200 kat daha tatlı olduğundan, yiyecekleri tatlandırmak için diyetine enerji katkısının ihmal edilebileceği kadar az miktarda gereklidir. Örneğin, yalnızca 190 miligram aspartam (yaklaşık dört kilojoule), 40 gram şeker (680 kilojoule) ile aynı tatlandırma gücüne sahiptir. Aspartam, equal ve nutrasweet markası altında masa üstü tatlandırıcı olarak mevcuttur. Alkolsüz yiyecek ve içecek ürünlerinde, alkolsüz içecekler ve sakızdan

jelatinlere, şekerleme, tatlılar, yoğurtlar ve şekersiz öksürük damlalarına kadar da kullanılır (İnanç & Çınar, 2009).

Aspartam fenilalanin içerir ve fenilketonüri (phenylketonuria) olarak adlandırılan nadir bir genetik bozukluğu olan kişiler tarafından tüketilmemelidir. Aspartam içeren yiyecek ve içecek ürünleri, bu durumdaki kişileri fenilalanin varlığına karşı uyaran etikette bir açıklama taşır. Ancak, nüfusun küçük bir kısmının bu nadir duruma sahip olması, aspartamın diğer tüketiciler için güvenli olmadığı anlamına gelmez.

2-asesülfam-k

1967'de keşfedilen asesulfame potasyum (asesulfame k olarak da bilinir) sükrozdan (sofra şekeri) yaklaşık 200 kat daha tatlı bir düşük kilojoullu tatlandırıcıdır. Temiz, tatlı bir tadı vardır ve genellikle alkolsüz içeceklerde hiç tadı yok. Asesülfam K içeren ürünler yaklaşık 90 farklı ülkede bulunabilir. Masa üstü tatlandırıcılar, tatlılar, pudingler, unlu mamuller, alkolsüz içecekler, şekerlemeler ve konserve yiyecekler dâhil binlerce yiyecek ve içekte kullanılmaktadır.

3-sukraloz

Sukraloz şekerden elde edilir ve sofraya şekline (sakaroz) göre 600 kat daha tatlıdır. Bu tatlandırıcı diyeti olan kişiler tarafından kullanılmaktadır. Sukraloz, çok çeşitli yiyecek ve içeceklerde bir bileşen olarak ve masa üstü bir tatlandırıcı olarak kullanılır.

4-Stevia

Stevia krizantem ailesinde Paraguay'a özgü bir bitkidir. Yaprağı yoğun, doğal bir tatlılık kaynağıdır. Aynı zamanda steviol glikozitler, rebiana veya rebaudiozit olarak da ifade edilebilir. Demleme çayına benzer bir işlemde, kurutulmuş stevia yaprakları, yaprakta bulunan en lezzetli, tatlı maddenin kilidini açmak için suya batırılır ve daha sonra saflaştırılır. Vanilya, badem, nane, antep fıstığı ve tarçın gibi pek çok başka doğal içerik de aynı şekilde elde edilir. Stevia'dan yapılan tatlandırıcılar doğal kökenlidir, sakarozdan (sofra şekeri) 200 kat daha tatlıdır ve sıfır kilojoule sahiptirler. Araştırmalar sonucu stevia, çeşitli yiyeceklerde ve masa üstü tatlandırıcı olarak kullanım için onaylanmıştır.

5- sakarin

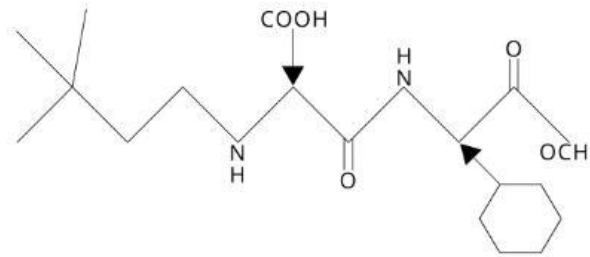
Sakarin, beyaz kristalleri olan sentetik bir şekerdir ve $C_7H_5N_3S$ kimyasal formülüne sentetik şeker de denir. Sakarinin tatlandırıcı oranı, şekerin yaklaşık 300 katı ve sükrozun 550 katıdır, ancak yüksek konsantrasyonlarda acı ya da metalik bir tadı vardır. Sakarin

doğal şekere kıyasla kalorisi yoktur ve kan şekeri arttırmaz. İnsan vücudunda sakarinin metabolizması, sindirim kanalından sindirim sistemi içerisinden geçeceği ve vücutta parçalanmadığı şeklindedir.

Sakarın diyabet, ilaç şurubu, şekerli içecekler olan insanlar için diyetler üretmek için kullanılır. Yapay tatlandırıcı türlerinden biridir. Sakarinin özellikleri kolay üretim ve ısı direnci olarak bilinmektedir. Sakarin, şekerden daha tatlı olmasına rağmen daha az kaloriye sahiptir. Sakarin suda hafif çözünür.

2.2. Neotam

1980'lerde ve 1990'larda aspartamın etkileyici bir ticari başarı olmasına rağmen, dünyadaki bazı araştırma grupları daha fazla tatlılık, daha fazla stabilite, iyi tatlılık profili ve daha düşük maliyetle üretilebilecek yeni nesil tatlandırıcılar araştırmışlardır (Nofre & Tinti, 2000). Neotam (n-(3,3-dimethylbutyl)-l-a-aspartyl-l-phenylalanine 1-methyl ester) bir dipeptidin alkillenmiş bir türevidir tatlandırıcı, aspartam ve yoğun tatlandırıcı potansiyeline sahiptir. Şekil 2.1.'de neotamın yapısı gösterilmiştir. Nofri ve Tinti tarafından keşfedilen neotam şu anda Nutrasweet şirketi tarafından geliştirilmektedir.



Şekil 2.1. Neotamın yapısı (Nofre & Tinti, 2000).

Neotame yakınlarda ABD Gıda ve İlaç İdaresi'ne genel kullanım tatlandırıcısı olarak onaylanmak üzere sunulmuştur. Yiyecek ve içeceklerde. Neotamın tatlılığı sükrozdan 8000 kat daha etkilidir ve tatlılık gücünün yaklaşık aspartamın 40 katıdır.

Bilinen en kararlı kristal formu ortam koşulları altında neotamin monohidratır. Susuz neotam yapabilen çeşitli polimorfik formlarda ve şekilsiz biçimdedir. Susuz polimorflar keşif sırasına göre alfabetik olarak adlandırılırlar. Monohidratın kurutulması üzerine 3 gün boyunca vakum altında (1 torr), ¹³C katı hal nükleer manyetik rezonans

spektroskopisi (SSNMR) ile çeşitli kristalli susuz neotam formları tespit edilmiştir. Yüksek nemde çevre, bu anhidratlar su alır ve monohidrata dönüştürülür.

Neotam ayrıca bir metanol solvat gibi solvatlar halinde bulunur. İlgili dipeptit, aspartam, iki olarak bulunur. Kristalin polimorfik hemihidratlar ve hidrasyon, dehidrasyon dahil termodinamik özellikleri olan kristalimsi bishemihidrat, polimorfik davranış ve katı hal kararlılığı kapsamlı çalışılmıştır (Nofre & Tinti, 2000).

Bir solvat, içinde katı bir katkı maddesi olarak tanımlanır. Çözücü molekülleri içine dahil edilmiştir kristal kafes. Birleştirilmiş çözücü ne zaman su, hidrat terimi kullanılır. Tipik bir yöntem hidratlar hazırlamak, farklı sıcaklıklarda sudan yeniden kristalleşmedir. Polimorfik için çözülme ürünü olan solvatlar (veya hidratlar) (veya dehidrasyon) yeni bir kristal form olarak ayrılır. Psödopolimorfik solvatlar (veya hidratlar) için, solvent kaybı, bir oluşumuna yol açmaz yeni polimorfdur (Mitchell, 2008).

Neotam, kontrollü salımı teşvik etmek, istikrarı artırmak ve gıda formasyonlarında uygulanmasını kolaylaştırmak için mikro kapsüllenebilir, çünkü yüksek tatlandırma gücünden dolayı formasyonlarda çok küçük bir miktar kullanılır. Maltodekstrin ve kapsülleyici ajanlar olarak arapça sakız ile püskürtülerek kurutulularak elde edilen neotam mikro kapsülleri, sakız içerisinde tatlandırılmıştır, bu da tatlandırıcının istikrarlarının artırılması ve kademeli olarak salınmasını teşvik eder (Yang & Chen, 2010).

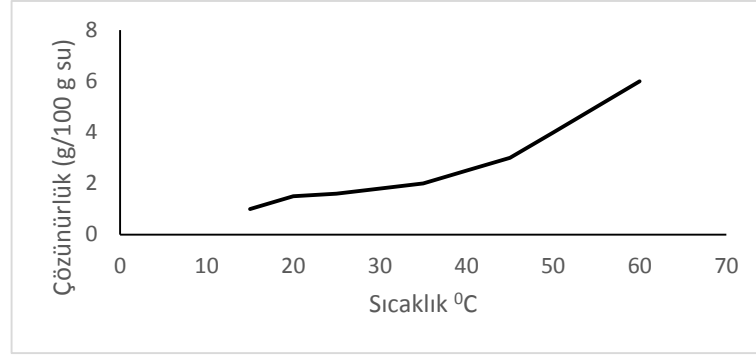
Bu çalışma kinetik analizini vurgulamaktadır. Çeşitli katı hal reaksiyon modellerine ve modelsiz kinetik izotermal tga verileri tedavisi uydurulur.

2.2.1. Fizikokimyasal özellikleri

Neotame erime noktası 80.9–83.4 °C olan beyaz / kirli beyaz bir kristal tozdur. Hem bazik hem de asit tuzları ve metal şelatlar oluşturabilir.

Çözünürlük

Neotam, sudaki aspartamdan biraz daha fazla çözünür ve bazı çözücülerde çok daha fazla çözünür (etanol). 25 °C'de sudaki çözünürlüğü %1.3 ağırlık/ağırlık ve bu sıcaklık arttıkça artar. Neotamın sudaki çözünürlüğüne ait grafik şekil 2.2.'de gösterilmiştir. Neotam tuzlarının oluşumunda çözünürlüğü artmaktadır. Ortak kullanım seviyelerinde sudaki çözünme oranı oldukça hızlıdır. Örnek 37 °C'de 900 ml'de 50 mg'ı 5 dakikada çözülür (Nofre & Tinti, 2000).



Şekil 1.2. Neotamın suda çözünürlüğü (Nofre & Tinti, 2000).

Neotamın kuru halde stabilitesi iyidir ve 5 yıldan fazladır. Kuru koşullarda, ana bozunma ürünü, esterleşmemiş neotamdır (metil esterin hidrolizi grubu ile oluşur)

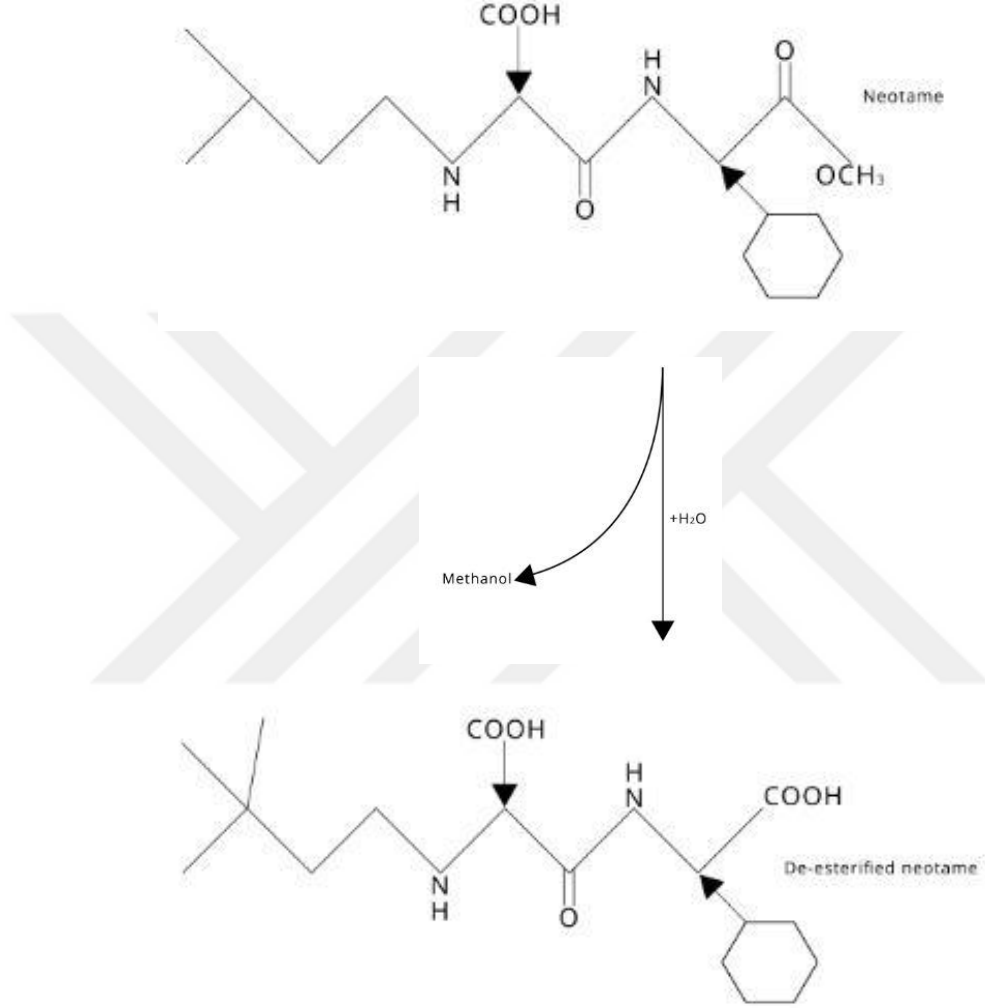
Neotam aspartam ile aynı stabiliteye sahiptir, ancak özellikle ısıtılmış ve süt ürünlerinde daha fazla stabiliteye sahiptir. Artan sıcaklık, nem veya pH kayıpları artırır ve neotamın stabilitesi göz önünde bulundurulacak gıdanın başlıca özelliklerindendir. Örneğin, orijinal neotamın yaklaşık %90'ı, pH 3.2 içeceklerde 8 haftalık depolama sonrasında kalır. Neotam, örneğin; glikoz veya malt dekstrin ve fruktoz gibi şekeri azaltan yiyeceklerde nispeten etkisizdir. Floresan aydınlatma ve polietilen ambalajın stabilite üzerinde bir etkisi yoktur. Neotam birçok üründe aspartam ile benzer stabiliteye sahiptir ve nötr pH koşullarında daha kararlıdır (yani fırınlanmış ve süt ürünlerinde).

Zaman içindeki stabilite, üç ana değişkene bağlıdır: pH, sıcaklık ve nem. Sıcaklık arttıkça stabilite azalır. pH stabilitesi çan şeklindeki bir eğriyi izler aspartama benzer ve maksimum stabilite için optimum pH 4.5'tür. İki değerli eklenmesi veya üç değerlikli katyonların ve beta-siklodekstrin'in stabiliteyi arttırdığı rapor edilmiştir (Nofre & Tinti, 2000).

Neotam degradasyonu dkp veya fenilalanin üretmez. Neotam kullanılan alkolsüz içeceklerde stabilite, aspartam ile aynı şekilde yönetilmelidir. İçecekler. Düşük pH değeri, optimum pH değerine yakın olan formülasyonla en aza indirilebilir. Stabilite (pH 4.5) olabildiğince düşük sıcaklıkta tutularak. Bir gösterge olarak, bir pH 3.2 ve 20 °C'de deneme formülasyonu, %89 neotam 8 hafta sonra kalmıştır (Mitchell, 2008).

2.2.2. Fizyolojik özellikleri

İn vivo olarak, in vitro olduğu gibi, neotamdan kaynaklanan ana bozunma ürünleri de-esterlenmiş neotam ve eşit mol miktarlarında metanoldür. Neotamın ana bozunma ürünleri şekil 2.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Neotamın bozulması (Nofre & Tinti, 2000)

Neotam kullanım düzeyi çok düşüktür ve bu nedenle üretilen metanol miktarı çok küçük ve güvenli olduğu düşünülen metanol seviyelerinin çok altında. Emilen neotam ve de esterlenmiş neotam, idrar ve dışkı ile atılır (Nofre & Tinti, 2000).

Fenilalanin, neotame hidrolizinin bir sonucu olarak üretilmez ve bu nedenle, pku hastaları için fenilalanin ifadeleri, neotame içeren ürünlerde gerekli değildir (Nofre & Tinti, 2000).

Neotam, onaylandığı pazarlardaki birçok uygulamada kullanılır. Pek çok ürün (özellikle alkolsüz içecekler) şeker veya yüksek fruktoz glukoz şurubu, aynı zamanda diğer yoğun tatlandırıcılar ile birlikte kullanılır (örneğin, sakarin ve sükraloza).

Meşrubatlarda, "tipik" bir alkolsüz meşrubatta (%9-12 sukroz) kullanım düzeyi %0.045-0.07 olabilir. Dolu bir şeker ürününde %30 şeker azaltılarak kullanılarak elde edilebilir %6.75–9.0 şeker ve %0.002-0.003 neotam içerir.

Neotamın sakızda kullanılması, genellikle diğer tatlandırıcılar ile kombinasyon halindedir; genellikle kapsüllenir. Sakız mayasındaki serbest neotamin kullanımının uzun ömürlü olduğu iddia edilir.

Neotam, alkolsüz ve düşük kalorili içeceklerde 16 hafta boyunca etkin kalır ve bu tür bir içeceklere mükemmel bir şekilde uyum sağlar. Masa üstü ürünler için yaklaşık 156 hafta boyunca bozulmadan kalmaya devam eder. İçecek tozları için ise 52 hafta içindeki dönemde etkinliğini ve tutarlılığını gösteren tatmin edici ve kabul edilebilir bir değerdir. Neotam, aynı zamanda kek içinde de etkili olmuştur, çünkü keke eklenen macunun %82'si 175 °C'dir. Bu arada, 25 °C'de 5 günlük depolamadan sonra, %60'lık bağıl nem, pastanın içindeki neotamin sadece %4'ü tahrip olur (Nofre & Tinti, 2000).

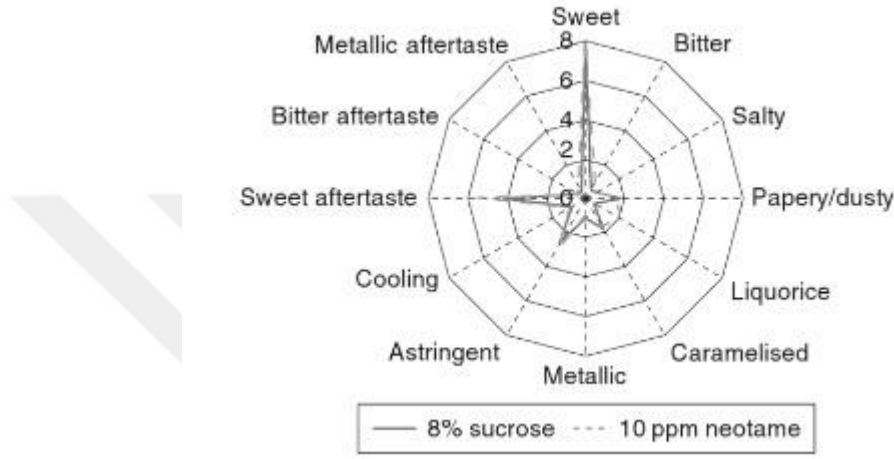
Şu anda neotamin kullanıldığı diğer gıdalar arasında sütlü içecekler, ortam sosları, şekerleme barları, sakız, taze nefes kapsülleri ve tuzlu atıştırmalıklar vardır. Neotam, çeşitli şekillerde hazırlanabilir - topaklanmış, kapsüllenmiş, şeker, asit veya bazik tuzlar, metal kompleksleri veya siklodekstrin kompleksleri ile birlikte kristalize edilir. Bu farklı hazırlıklar çok düşük seviyelerde kullanılan bir ürünün daha kolay kullanılmasını sağlayabilir.

Emniyet

Neotam, genel prensiplere göre sayısız güvenlik çalışmasına konu olmuştur. Nüfusta öngörülen tüketim seviyesinin 0,05 mg/kg bw olduğu tahmin edilmektedir. Kroniklik için gözlenemeyen etki düzeyi, toksisite ve kanserojenliğin sıçanlarda günde en az 1000 mg / kg bw olduğu tahmin edilmektedir ve köpeklerde günde 800 mg/kg bw. Hem neotamin hem de ana bozunma ürününün deesterifiye edilmiş neotamin mutajenik olmadığı ve yukarıda öngörüldüğü gibi kronik tüketim düzeylerinin iyi tolere edildiği gösterilmiştir.

2.2.3. Duyusal özellikleri

Neotaminin tatlılığı, sakarozun yaklaşık olarak 8000 katıdır ve temiz bir tatlı tadı vardır. Sukroza benzer bir tadı bulunmaktadır. Tatlılık olarak gittikçe artan bir şekilde farkedilebilen bir meyan kökü yan tadı vardır. Tatlılığı azaldıkça konsantrasyonu artmaktadır. Acı veya metalik yan tadı yoktur.



Şekil 2.4. Sudaki tanımlayıcı tat profili (Nofre & Tinti, 2000).

Maksimum tatlılık yoğunluğu %15.1 meydana gelir ve bu nedenle, bazı gıdalarda tek tatlandırıcı olarak kullanılır. Bununla birlikte, birçok gıdada meyan kökü yan tadı bunu engellemektedir. Neotaminin sudaki tanımlayıcı profili şekil 2.4.'de gösterilmiştir.

Neotaminin aspartam ve sukrozdan biraz daha yavaş bir başlangıç zamanı vardır ve benzer şekilde aspartam için, neotam biraz daha kalıcı bir tatlılığa sahiptir. Neotaminin başlangıç zamanı ve kalıcı tatlılığı tarafından değiştirildiği bildirildi. Tat vericileri, hidroksil amino asitler (örneğin, tirozin, serin) ve emülgatörlerin eklenmesi ile olur.

Neotam ile tatlılık sinerjisi biraz sınırlıdır. Sakarin ile bir miktar sinerji vardır. (%14–25) , ancak diğer tatlandırıcılar ile çok azdır. %48, %49 neotame meyan kökü diğer dökme ve yoğun tatlandırıcılar ile harmanlandığı zaman genellikle tadı azalır (Nofre & Tinti, 2000).

Neotam, bazı lezzet artırıcı modifikasyon özelliklerine sahiptir. Meyve, nane, cinnamik aldehit ve vanilya aromasını artırmak (kullanılan lezzet miktarı) ve ayrıca

ürünlerde algılanan asit seviyelerini koruyarak yeniden kullanılan seviyede bir azalma görülür.

Soya, vitamin ve mineral takviyesi ile neotamın eşik altı kullanım seviyelerinde bile bu tatları gizlediği söylenir. Bir ürünü formüle ederken, neotamın bu aroma modifikasyonu etkisi dikkate alınmalıdır, çünkü aromasında değişiklikler meydana getirebilir (Nofre & Tinti, 2000).

Neotam, insanlarda toksik etkilerden bazılarını neden olur, örneğin vücut ağırlığı ve yiyecek tüketimi, baş ağrısı ve yüksek dozlarda hepatotoksisite değişiklikleri göstermektedir (Nofre & Tinti, 2000).

2.3. Neotamın Kullanım Alanları

Meyve suyu, gazlı içecekler, katı içecek, süt ürünleri, şekerleme, sakız, jöle, kabartma ürünleri, ilaç, hayvan yemi, baharat, areca fındık, Supari, ağız tazeleyici, alkollü içecekler ve dondurma gibi ürünlerde neotam kullanılmaktadır.

Tablo 2.2. Bazı ürünlerde neotam dozu (Zhou vd., 2015).

Ürün	Doz
Şeker	1-200 ppm
Karbonatlı içecekler	2-50 ppm
Masa üstü tatlandırıcılar	800-4000 ppm
Yemek pişirme	6-130 ppm
Günlük kullanım ürünleri	5-50 ppm

Tablo 2.2’de bazı ürünlerde neotam dozu gösterilmiştir. Masa üstü tatlandırıcılarda en çok neotam kullanılmaktadır. Tablo 2.3’de bazı ürünlerde neotamının stabilite süresi gösterilmiştir. Şeker ürünlerinde neotamının stabilite süresi en fazladır.

Tablo 2.3. Bazı ürünlerde neotamın stabilite süresi (Zhou vd., 2015).

Ürün	Stabilite Süresi
Kek	5 gün
Karbonatlı içecekler	16 hafta
Katı içecek	52 hafta
Limon çayı	25 hafta
Şeker	156 hafta

Neotamın en çok kullanılan alanlardan biri, içeceklerde olduğu söylenebilir. Neotam E961 mükemmel bir stabiliteye sahiptir, ürünlerin 'lezzet', seri üretim sonrası renk, yüksek sıcaklıkta kısa süreli sterilizasyon ve aseptik çalışma gibi ürünlerini

etkilememektedir. Neotamın tatlılığı 4-5 ay kadar uzun süre kolalı gazlı içeceklerde saklanabilir, meyve suyu, sebze suyu ve düşük alkollü şaraplarda kullanılabilir, içeceklerin tadını iyileştirebilir, ayrıca katı bir tozlu içecek içinde de bulunabilir. Örneğin, limon çayı ve süt tozunda neotam kullanılmaktadır. Neotam E961 bu ürünlerde çok kararlıdır ve süresi içeceğin ömrü ile tutarlıdır. Bu arada, neotam içeriği %20'den fazla sitrik asidin yerini alabilir ve ekşi tatı aynı kalır. Neotame katı toz içeceklerde de kullanılmaktadır. Neotam, ürünlerin lezzetini değiştirmeyen %30 sukrozun yerine geçebilir ve üretim maliyetini düşürebilir, aynı zamanda tarifede etiket fenilalanin olmadan aspartamın yerini kullanılabilir (Zhou vd., 2015).

Neotamın günlük tüketilen ürünlerde de fazlaca kullanılmaktadır. Araştırmalar, bu tür ürünlerin raf ömrü sona erdiğinde, içindeki neotamın sadece %2 azaldığını gösteriyor.

Neotame E961, seri üretim, yüksek sıcaklıkta kısa süreli sterilizasyon ve aseptik işlem için uygundur; neotam içeren nihai ürünler, özellikle lezzetini arttırmak için neotam uygulayabilen yoğurt ürünlerinde kararlı bir konsantrasyon sağlamaktadır. Neotam, fermentasyona dâhil değildir, normal mantarın büyümesini etkilemez, bu nedenle yoğurt ve peynir gibi süt ürünlerinde yaygın olarak kullanılabilir. pH 4.0-4.5 durumunda kararlıdır. Fermantasyon sürecinde, neotam stabildir ve sukrozun değiştirilmesi ürünün kalorisini azaltır, besin değerini son arttırır (sütün sakroz hacminin bir kısmını değiştirir), Tüketici daha iyi ürünler alabilir (Zhou vd., 2015).

Neotamın nişasta, proteinli gıdalarda da kullanıldığı bilinmektedir. Neotam diğer beslenme ve beslenme dışı tatlandırıcılar ile karıştırılabilir. Neotamın kullanımı nişastanın bozulma süresini uzatabilir, böylece ürünlerin tüketim süresini uzatabilir. Ayrıca, protein denatürasyonuna direnç gösterebilir ve zengin proteinli gıdalarda iyi bir aroma ile muhafaza edebilir.

Neotamın tuzlu yiyeceklerde kullanılmaktadır. Neotam E961 ürün kodu ile patlamış mısır, kurabiye ve kek içeren yüksek sıcaklıkta kısa sürede pişen gıdalardaki ürünlere tercih edilebilir, çünkü ısıtma süresi çok azdır ve sadece neotam konsantrasyonu değişir.

Neotamın korunmuş meyvelerde ve diğer tatlı yiyeceklerde de oldukça fazla kullanılmaktadır. Neotam E961 korunmuş meyvelerde, şekerlenmiş meyvelerde, erikte ve diğer yüksek tatlı yiyeceklerde uygulandığında mükemmel bir şekilde işlevini yerine getirebilir, istenen tatlılığa herhangi bir acı tat olmadan kolayca ulaşılabilir. Araştırmalara

göre, neotam sakarin ve siklamat ile sinerjik tatlandırıcı etki gösterebilir. Neotamın diğer tatlandırıcılar ile uyumu ise yiyeceklerin lezzetini arttırabilir (Zhou vd., 2015).

Sakız ve diğer çocuk yiyecekleri neotamın başka bir kullanım alanıdır.

Neotamın şeker alkollü ürünlerle harmanlaması düşük maliyetli sağlıklı şekersiz yiyeceklerle, özellikle çocukların sevdiği şekerler, tadı etkileyici ürünlerde kullanılmaktadır. Neotaminin bir faydası diş çürümelerini önleyebilir olmasıdır. Ayrıca, ağızdan alınan insan mikrobiyal metabolizmasında asla yer almaz. Sindirilmediği için, dişlere iyi gelir, diş çürüklerini önleyebilir, neotam sakarozun yerini alabilir, şekersiz sakız yapımında uygulanabilir ve tatlılığını uzatabilir.

Neotame E961, obez hastalar, kardiyovasküler hastalığı olan hastalar ve yaşlılar ile kalori sebebiyle kilo vermeyi kontrol etmek isteyenler için uygundur. Vücudumuzda emilir; diyabet hastaları için kan şekeri dalgalanmalarına neden olmaz.

Masa üstü tatlandırıcılarda da neotamdan faydalanılmaktadır. Neotame E961 nem emmez, düşük enerjilidir, masa üstü tatlandırıcılar olarak çok uygundur. Yapılan son araştırmalarda, neotamın tatlılığının uzun süre saklanabileceğini gösterilmiştir (Zhou vd., 2015).

Korunmuş konserve ürünlerinde de neotam kullanılır. Neotame E961, asitli konserve yiyecekler için kullanılabilir, diğer tatlandırıcıların tatlılığının %30'unu değiştirmek konserve lezzetini önemli ölçüde artırabilir ve maliyetleri azaltabilir. Balıklara ve diğer protein yönünden zengin gıdalara anında neotam eklenmesi, protein denatürasyonunu engelleyebilir, lezzetini korur. Gıdalarda olduğu gibi, konserve meyve ürünlerinde, şurubun genel oranını azaltabilir, daha fazla meyve eklemeye gerek yoktur (Zhou vd., 2015).

2.4. Neotam Tayini ile İlgili Çalışmalar

Literatür taraması, YPSK yöntemlerinin, çeşitli gıda maddelerinde neotamın belirlenmesinde en yaygın kullanılan yöntem olduğunu ortaya çıkarmıştır (Jizhi, Jie, & Jinhua, 2009; Ji vd., 2009; Matsumoto vd., 2008; Yang & Chen, 2010; Zhao vd., 2011; Zhao vd., 2012; Zhao, vd., 2013; Kumari vd., 2016).

YPSK yönteminin kendine has avantaj ve dezavantajları var. YPSK veya HPLC yöntemi verdiği güvenilir sonuçlar ile bilinir. Aynı zamanda yüksek maliyeti her zaman bir olumsuz yönü olarak karşımıza çıkmaktadır.

Kısacası YPSK yönteminin avantajları:

- Hız
- Verimlilik
- Doğruluk

Aynı şekilde YPSK yönteminin dezavantajları:

- Maliyet
- Karmaşıklık

YPSK yöntemi birkaç alt yöneme sınıflandırılır, YPSK-ELSD ve YPSK-MS. Bu iki yöntemde çeşitli gıda maddelerinde neotamin belirlenmesinde yaygın bir şekilde kullanılmıştır.

YPSK-MS yöntemi daha çok kullanılmaktadır (Gan vd., 2013; Lim vd., 2013; Berset & Ochsenbein, 2012; Hu vd., 2013; Scheurer, Brauch, & Lange, 2009; Wu, 2010; Yang & Chen, 2009; Zygler, Wasik vd., 2011)

YPSK-ELSD yöntemi YPSK-MS yöntemi kadar olmasada neotamin belirlenmesinde kullanılmıştır (Wasik & Ulberth-Buchgraber, 2009; Wasik, McCourt, & Buchgraber, 2007).

Bu analitik yöntemler kapiler elektroforezden (CE) daha pahalıdır. CE, yüksek ayırma verimliliği, yüksek çok yönlülük, analiz hızı ve daha düşük çevresel etkiye neden olan düşük numune ve reaktif tüketimi nedeniyle YPSK'ya güçlü bir alternatiftir (Chankvetadze & Blaschke, 2001). Birkaç makale, birçok yapay tatlandırıcının ayrılması ve miktar tayini için ce uygulamalarını göstermiştir. Ancak, gıdadaki neotamin ce ile ayrılması ile ilgili tek bir çalışma var (Hu vd., 2013).

Bathinapatla heptakis 2.3.6-tri-o-metilbetasiklodekstrin yöntemi kullanılarak yeni bir yüksek yoğunluklu yapay tatlandırıcı olan neotamin kiral ayrılması için bir elektrokinetik kromatografik yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem ucuzdur ve küçük bir örneklem büyüklüğünde kullanımı kolaydır (Bathinapatla vd., 2014).

Yapılacak çalışmada da aynı şekilde bu başarılı yöntem kullanılacaktır. DAD dedektör kullanılarak YPSK yöntemi yoluyla neotamin tayini yapılacaktır.

Neotam, sukrozdan yaklaşık 7.000 - 13.000 ve aspartamdan 30-60 kat daha tatlı olan kalorisiz bir tatlandırıcıdır. Aspartamdan ise sukrozdan 200-300 kat daha tatlıdır. Neotam ve aspartam sahip oldukları kimyasal yapıdan dolayı, yoğun tatlandırıcılar olarak

kabul görünür ve gıda ürünlerini tatlandırmak için çok düşük bir miktarlarına ihtiyaç duyulur. Ayrıca, karmaşık gıda matrislerindeki bazı doğal gıda bileşenleri, bu tatlandırıcıların belirlenmesine engelleyici müdahalede bulunmaktadır. Dolayısıyla, HPLC veya YPSK yöntemleri, bu tatlandırıcıların gıda ürünlerinde belirlenmesi ve tanımlanması için en kabul edilebilir ve uygun analitik teknikler olarak kullanılmaktadır (Shilpashree, Kumari, & Singh, 2014). Burada, YPSK yöntemleri ile yapılan çalışmaların bir özeti sunulmuştur.

Ma ve arkadaşlar (2014) tarafından yürütülen araştırmada meyvede fruktoz, sorbitol, glukoz ve sukroz değerlerinin eş zamanlı optimize tespiti için ELSD içeren YPSK yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışmada, analizler izokratik asetonitril: su (82.5: 17.5, h/h) elüsyonuyla bir Phenomenex Luna 5u NH₂ 100A kolonunda (250 mm 4.60 mm, 5 mikron) gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, ELSD sisteminin drift tüp sıcaklığı 82 °C ve azot akış hızı 2.0 L/dk olarak ayarlanmıştır. Çalışmada, regresyon yöntemi ile test aralıklarında iyi doğrusal bir ilişki ($R = 0.9967-0.9989$) tespit edilmiştir. Değerlendirmeye alınan bu dört madde için (şeftali, elma, karpuz ve kiraz meyveleri) tespit ve nicelendirme (miktar belirlenmesi) sınırları sırasıyla 0.07-0.27 ve 0.22-0.91 mg/L arası olarak tanımlanmıştır. Önerilen YPSK-ELSD yöntemin doğruluğu, şeftali, elma, karpuz ve kiraz meyvelerindeki şekerlerin miktarının belirlenmesi esasınca değerlendirilmiş ve yeterli düzeyde sonuçlar elde edilmiştir. Araştırmanın bulgularına göre, dört şekerle ait miktar değerleri meyveler arasında değişiklik göstermektedir (Ma vd., 2014).

Başka bir çalışmada, içeceklerde ve özel beslenme ürünlerinde (spesifik popülasyon grupları için özel gıdalar) özel tatlandırıcılar olarak aspartam, asesülfam K, sodyum sakarin ve sodyum siklamatin ayrılması ve tayini için iki YPSK yöntemi kullanılmıştır. Her dört bileşik sulu çözeltilerde rahatlıkla bir DAD detektörlü YPSK yöntemi ile çözünebilir ve ayrışabilir özelliğe sahiptirler. İlk yöntemde, bir fosfat tamponu ve mobil faz olarak izokratik asetonitril elüsyonu ile aspartam, asesülfam K ve sodyum sakarinin C₁₈ kolonunun ayrılması sağlanmıştır. İkinci yöntemde ise, sodyum siklamatin bir C₁₈ kolonunda, metanol ve su mobil fazı ile ayrılması amaçlanmıştır. Optimum koşullar altında, her iki yöntemde doğrusallık, hassasiyet ve geri kazanım açısından iyi analitik performans göstermiştir. Dolayısıyla sonuçlara göre, içecekler ve özel beslenme ürünlerinin gerçek numunelerinin analizi için bu yöntemlerin başarıyla kullanılabileceği tespit edilmiştir (Serdar & Knezevic, 2011).

Çeşitli gıda matrislerinde tatlandırıcılar için analitik yöntem, gıda kalite kontrolü ve düzenleyici uygulamaları açısından çok önemlidir. Bu çalışma, sıvı kromatografisi / tandem kütle kromatografisi (LC-MS/MS) yöntemi esasınca eşzamanlı olarak belirlenmesi için basit ve hızlı bir yöntem çeşitli gıdalarda bulunan 10 tatlandırıcının [acesulfame potassium, aspartame, cyclamate, dulcin, glycyrrhizic acid, neotame, neohesperidin dihydrochalcone, saccharin, sucralose ve stevioside] ölçümlenmesi için geliştirilmiştir. Bu çalışmada, kromatografik ayırma bir Phenomenex Luna PhenylHexyl (5 µm, 4.6 mm × 150 mm) kolonunda, suda 10 mM amonyum asetat ve metanolda 10 mM amonyum asetat gradyan elüsyonu ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlara göre, 10 tatlandırıcının geri kazanımı %75 - 120 arasında tespit edilmiştir ve varyasyon katsayıları %20 altında bulunmuştur. Ölçüm limitleri neohesperidin dihydrochalcone ve sucralose için 0.5 µg/kg ve diğer tatlandırıcılar için ise 0.1 µg/kg olarak belirlenmiştir. Geleneksel yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemine kıyasla, LC-MS / MS yöntemi daha iyi hassasiyet, yüksek verim ve gelişmiş özgüllük ile sonuçlanabilir (Chang & Yeh, 2014).

Matsumoto ve arkadaşlarının (2008) yaptıkları çalışmada, YPSK yöntemi ile çeşitli gıdalarda üç yapay tatlandırıcının, neotam (NEO), alitam (ALI) ve aspartamın (APM) eş zamanlı belirlenmesini amaçlanmıştır. Bu çalışmada, kıyılmış veya homojenize edilmiş numuneler, %10 sodyum klorür içeren 0.01 mol/L hidroklorik asit ile selüloz boru içine paketlenerek, 24-48 saat boyunca bu aside karşı diyaliz edilmiştir. Diyalizat bir Oasis MCX kartuşundan geçirildi ve kartuş su ve metanol ile yıkandı. Daha sonra, üç tatlandırıcı kartuştan 0.5 mol/L amonyum klorür-asetonitril (3:2) karışımı ile elüt edilmiştir. Tatlandırıcılar, 0.01 mol/L fosfat tamponlu (pH 4.0) -asetonitril mobil fazlı bir gradyan modu kullanılarak bir Cosmosil 5C18-AR kolonunda ayrıldı ve 210 nm'de tespit edildi. NEO, AL ve APM'nin 10 ve 100 µg/g alkol ile karıştırılmış 8 çeşit gıdadan elde edilen geri kazanımları sırasıyla %86-100 ve %89-104 olarak elde edilmiştir. NEO, ALI ve APM'nin tespit limitleri numunelerde 1 µg/ g olarak uygulanmıştır. Ayrıca, bu çalışmada üç tatlandırıcı, tandem kütle spektrometrisi ile sıvı kromatografi kullanılarak başarıyla tanımlandığı görülmektedir (Matsumoto vd., 2008).

Bir başka çalışmada, dokuz yüksek yoğunluklu tatlandırıcının belirlenmesi için katı faz ekstraksiyonu¹ (SPE) ve yüksek performanslı sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi içeren analitik bir prosedür Avrupa Birliği tarafından geliştirilmiştir. Bu kapsamda,

¹ solid-phase extraction

asesülfam-K, aspartam, alitame, siklamat, dulcin, neohesperidin dihidrochalcone, neotam, sakarin ve sukraloz değerlerinin çeşitli yiyecek numuneleri (örneğin içecekler, süt ve balık ürünleri) içeriğinde incelenmesi amaçlanmıştır. Ultrasonik banyoda ve pH 4.5'te formik asit ve N, Ndiisopropylethylamine 'den oluşan bir tamponla ekstraksiyon yapıldıktan sonra, ekstraktlar Strata-X33 µm Polymeric SPE kolonu kullanılarak temizlenmiştir. Analitlerin ayrılması C₁₈ kolonunda gradyan elüsyon modu ile ve tespiti ise negatif iyon modunda bir elektrosprey kaynağıyla çalışan kütle spektrometresi yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Analitik yöntemin kullanım amacına uygun olduğunu doğrulamak için, doğrusalılık, tespit ve nicelendirme sınırları, doğruluk ve tekrarlanabilirlik gibi çeşitli doğrulama parametreleri ele alınmıştır. Kalibrasyon eğrileri, incelenen altı tatlandırıcı için (aspartame, alitame, cyclamate, dulcin, neohesperidin dihidrochalcone, neotame) çalışılan konsantrasyon aralığında ($r^2 \geq 0.999$) doğrusal olduğu tespit edilmiştir. Diğer üç bileşik (acesulfame-K, sakharin ve sucralose), incelenen konsantrasyon aralığında doğrusal olmayan bir etkilendirme göstermiştir. Metot saptama limitleri sinyal/gürültü oranının (S/N) 3'e karşılık gelmesi durumunda $<0.25 \mu\text{g/mL}$ ($\mu\text{g/g}$) olarak tespit edilmiştir. Ancak, metot kantitatif limitleri (S/N = 10), $<2.5 \mu\text{g/mL}$ ($\mu\text{g/g}$) şeklinde bulunmuştur.

Tüm tatlandırıcılar için test edilen konsantrasyonlardaki (%50, %100 ve maksimum kullanım dozunun %125'i) geri kazanım değerleri 84.2-106.7% arasında bulunmuştur. Ayrıca, sonuçlara göre, numune matriksinin türü (içecek, yoğurt ve balık ürünleri) ve alkol seviyesinden bağımsız olarak $<10\%$ nispi standart sapmalar tespit edilmiştir (Zygler vd., 2011).

Bir başka çalışmada, asesülfam-K, sakarin, siklamat, aspartam, sukraloz, alitame, neohesperidin dihidrochalcone, neotam ve beş ortak steviol glikozit (rebaudiozit A, rebaudiozit C, steviol, steviyosiyanit ve steviyosid) değerinin alkolü ve alkolsüz içeceklerde belirlenmesi için yüksek performanslı sıvı kromatografi ve elektrosprey iyonizasyonlu (HPLC-ESI-MS/MS) tandem kütle spektrometri yöntemleri kullanılmıştır. Bu analitik araştırmada bir ilk olarak, HPLC-ESI-MS/MS yöntemi ile AB'nin resmi onaylanmış olduğu yüksek etkili tatlandırıcıların aynı anda belirlenmesi sağlanmaktadır. Minimalist numune hazırlama prosedürü sadece iki işlemden oluşmuştur; seyreltme ve santrifüjleme. Doğrusallık, tespit ve nicelendirme sınırları, tekrarlanabilirlik ve yöntemin gerçekliği bu çalışmada değerlendirilmiştir. Test edilen üç konsantrasyon seviyesinde elde edilen geri kazanımlar, %4.1'den daha düşük olan nispi standart sapmalarla %97.0 -

105.7 aralığında değişmektedir. Önerilen yöntem, farklı alkolsüz ve alkollü içeceklerin 24 örneğinde tatlandırıcıların belirlenmesi için başarıyla uygulanabilmektedir (Kubica, Namiesnik, & Wasik, 2015).



3. GEREÇLER

3.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan neotam standart maddeleri, asetonitril ve su Sigma Aldrich'den, (Almanya) temin edildi. Çalışma sırasında kullanılan otomatik pipetler (10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL) part no: SN02522-P, mezür, deney tüpü, beher, balon joje Eskişehir Anadolu Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulundan temin edilmiştir.

3.2. Cihazlar

YPSK sistemi (Shimadzu Nexera-i LC-2040C 3D), Hassas Terazı (Ohaus PA214C), pH Metre (Ohaus Starter 3100), Vorteks Karıştırıcı (HEIDOLPH/BFC), Su Banyosu (Lab Companion BW-20H), Mobil Faz Süzme Düzenegi (BF-S2500), Kolon (Ultra AQ C18 2.7 µm 150 × 4.6 mm), Bilgisayar (Lenovo)

4. YÖNTEM

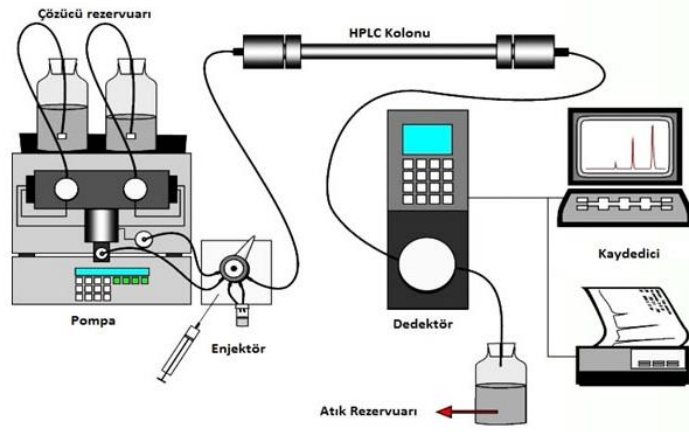
4.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)

Kromatografi bir maddesel karışımın içindeki fiziksel ve kimyasal özelliklere nazaran çözünerek ayırıştırarak tüm işlemler olarak tanımlanmaktadır. Kromatografi yöntemlerinde, moleküllerin adsorpsiyon, dağılma ve değiştirme benzeri özellikleri karar ve tercih sürecinde büyük önem taşımaktadır. Cihazların işleyişinde ve ya yöntem geliştirme aşamasında bazı faktörlerin etkin rolü bulunmaktadır. Dolayısıyla, söz konusu özellikler açısından kromatografik metotlar ayrılma mekanizmaları, uygulama tarzı ve faz tiplerine nazaran şekil 3.2’de verildiği gibi çeşitli kategorilerde sınıflandırılır (Eser & Dinçel, 2018).

Günümüzde kromatografi, ölçüm, ayırıştırma ve saflaştırma hedefiyle tıbbi Laboratuvar, gıda, ziraat, kimya benzeri birçok alanda yaygınlıkla kullanılmaktadır. Değişik bilimsel alanlarda en sık kullanılan ve en önemli kromatografi ise Likit Kromatografi esaslı üzere olan yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC-YPSK) ve Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometri (LC-MS/MS) cihazlarından ibarettir. Kromatografi, bir karışımın içinde bulunan maddeleri birbirinden ayırıp ve onları saflaştırma metodunu kapsamaktadır. Bu yöntemin temel amacı, numunenin ayrımını ve ölçümünü gerçekleştirmektir. Bu doğrultuda, farklı maddelerin hareket eden bir faz aracılığıyla, sabit bir faz üzerinde, değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri ile sağlanmaktadır.

Bu bağlamda, YPSK maddeleri kolondan çıkış zamanları (RT) bakımından değerlendirmektedir. Ancak, yine çok yaygınlıkla ele alınan LC-MS/MS yöntemi, molekülleri kütle/yük oranı ve de kolondan çıkış zamanları esasınca değerlendirilir.

Sıvı kromatografisindeki yöntemlerinin esasında sıklıkla kullanılan kavramların aşağıdaki şekil 4.1’de verildiği gibi anlaşılması gerekmektedir (Eser & Dinçel, 2018).



Şekil 4.1. YPSK'nın kısımları (Çetinkaya, 2015).

4.1.1. Mobil faz

Sabit faz (kolon) boyunca numuneyi taşıyan değişik ama amaca yönelik fiziksel – kimyasal özellikleri içeren çözücü karışımlarına mobil faz adı verilmektedir. Uygulamada kullanılması gereken mobil faz tercihlerinde, numunelerin oluştuğu maddelerin niteliği, sabit faz ve algılayıcıların temel özellikleri benzeri parametreleri incelemek gerekmektedir.

4.1.2. Sabit faz

Mobil fazla birlikte hareket eden numunenin oluştuğu maddelerin etkileşimde bulundukları ve malum düzeyde durduruldukları fazı tanımlamaktadır. Kolon sözcüğü ile de tanımlanan sabit faz, kromatografi yönteminin özelliklerine doğrultusunda tasarlanır. Ayrıca bu tasarımda çok çeşitli maddelerden ve çok farklı oranlarla üretilir. Gaz ve sıvı kromatografi yöntemlerinin ticari düzeyde farklı marka ve boyutlarda kolon imalatı gerçekleştirilmektedir.

4.1.3. Dedektörler

Dedektör tercihi yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde önemli kısımlardan biridir yöneme ve analizi yapılan maddenin bileşimine göre değişebilmektedir. Dedektörde bulunması gereken özelliklerinde başında geniş bir çalışma aralığı, metot parametrelerinin değişiminden etkilenmeme, duyarlılık, akış hızından bağımsız kısa sürede cevap verebilmeli, ekonomik ve kullanımı kolay olmalıdır. YPSK'da ELSD, DAD, fluoresans, iletkenlik gib dedektörler kullanılmaktadır.

Bu çalışmada ultraviyole/görünür bölge dedektörü kullanıldığından, sadece bu detektörden bahsedilcektir.

4.1.3.1. Ultraviyole/Görünür bölge dedektörü (DAD)

YPSK'da kullanılan detektörlerden çoğunluğunu oluşturmaktadır. Işığın şiddetini ölçerek absorbans değerini bulan detektörlerdir. Lambert-Beer kanunu geçerlidir. Geniş bir çalışma aralığına sahip olduğundan dolayı farklı dalga boylarında cevap oluşturma ve birden fazla dalga boyundaki maddelerin ölçümünü yapabilme özelliğine sahiptir. Mobil faz bileşenleri fotometrenin bulunduğu akış hücresinden geçirilir. Hücrelerin düzgün bir sonuç verebilmesi için basınç değerinin 600 psi'den fazla olmaması gerekir.

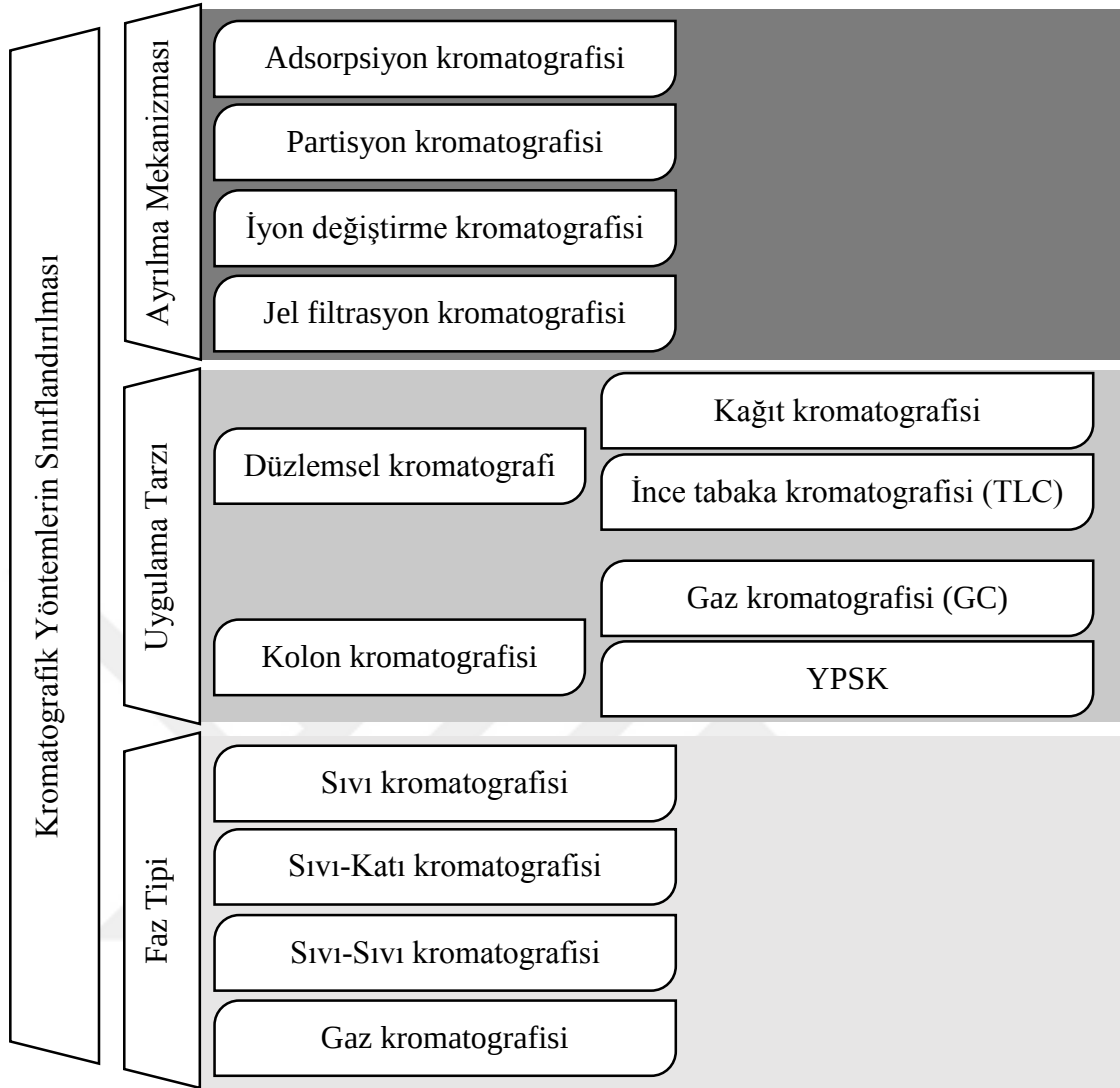
Analit bileşenleri gelen ışının bir kısmını absorblayarak bu absorsiyona bağlı bir cevap oluşturur. Bu oluşan sinyal analit derişiminin sonucuyla bağlantılıdır. Düşük dalga boylarında çalışılan maddelerde dikkat edilmesi gereken önemli hususlardan biri seçilen dalga boyunun çözücünün dalga boyu değerinin üstünde olması gereklidir. Ayrıca mobil fazın pH değeride tutunmada önemlidir. 254 nm'de sinyal oluşturan ve tek dalga boyunda çalışılan analitlerde ışık kaynağı Hg lambası iken, birden fazla dalga boyu ile çalışılan dedektörlerde ışık kaynağı döteryum lambasıdır. Diyod serili cihazlar en iyi ultroviyole detektörlerdendir. Analizin üç boyutlu grafik değerlerini verebilmekte ve miktar tayininde gerekli verilerin cevabını oluşturabilmektedir.

4.2. YPSK'nın Avantaj ve Dezavantajları

YPSK'nin en önemli avantajı ısıya dayanıklı ve uçucu olmayan bileşikler analiz edebilmesi olarak bilinmektedir. Bununla birlikte, yüksek basınç sayesinde analiz süresinin düşmesi, kesin sonuçların sağlanması, düşük hata payı, analizlerin oda sıcaklığında yapılması bu yöntemlerin büyük ehemmiyet taşıyan diğer avantajları arasında yer almaktadır. Ancak, bu yöntemlerin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bu kapsamda, yüksek basınç uygulamasından dolayı, diğer kromatografi cihazlarına nazaran daha yüksek maliyetli ve daha karışık olduğundan söz etmek gerekmektedir. Sade izokratik bir sistem az maliyetli olmaktadır ancak, mikroişlemci kontrollü, dereceli elüsyon özelliği bulunan, değişik dedektörleri bulunan bir sistemin maliyeti en az 40.000 £ den başlamaktadır (Çetinkaya, 2015).

Çeşitli araştırmalarda sıklıkla kullanılan farklı YPSK yöntemlerinin uygulama amacı ve türüne göre kendine özel avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Ancak genel anlamda YPSK yöntemlerinin avantajları aşağıdaki gibi özetlenebilir (Meyer, 2015).

- Kolon yapısı dayanıklı ve çeliktendir,
- Çok küçük parçacık boyutlarına kadar kolon kullanımına müsait olması (2,7 μm -10 μm),
- Geniş iç basınç seçeneği ve akış hızı olanağı,
- Çok fazla örneğe gerek duymadan doğru sonuçlar elde edebilme,
- Küçük miktarların analizde kullanılabilmesi,
- Otomasyona uygunluğu,
- Zaman açısından ekonomik oluşu ve yüksek ayırım



Şekil 4.2. Kromatografik metotların sınıflandırılması (Eser & Sepici Dınçel, 2018).

4.3. YPSK’da Kullanılan Temel Parametreler

4.3.1. Alıkonma zamanı

Bu prosedür, mobil faz ile taşınan, analizi planlanan numune bileşenlerinin sabit faz ile etkileşimi sağlayarak, malum düzeyde tutulması, yavaşlatılması ve dolayısıyla sabit fazdan daha geç bir sürede ayrılması şeklinde tanımlanmaktadır. Bu kapsamda kimyasal maddelerin belirli sabit analitik şartlarda parmak izi niteliğinde değerlendirilen alıkonma zamanı (RT) parametresi tanımlanmıştır. Kromatografinin temel kavramları olarak belirtilen sabit faz, mobil faz ve numuneyi oluşturan bileşenlerin arasındaki etkileşimin, yüzey tutunması / adsorpsiyon ve çözünürlük şeklinde sağlanabilmektedir.

4.3.2. Kapasite faktörü (k')

Tutunma süresinin uzun süre tekrar edilebilirliği ve kolonun performansı ile ilgili bir parametredir.

Kapasite faktörü maddeden maddeye ve seçmiş olduğumuz hareketli faz ile sabit faz karışımı için değişiklik gösterir. Her bir bileşenin için farklı kapasite faktörü hesaplaması yapılır. Alıkonma zamanı (t_r), (t_0) ölü zaman olarak geçmektedir.

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (4.1)$$

k' değerinin genel çalışmalarda 2-8, eser madde miktar analizlerinde 1-3, stabilite çalışmalarında $k' > 4$ olması beklenir.

4.3.3. Teorik tabaka sayısı (N)

İyi bir kromatogram için piklerin birbirinden iyi ayrılması akış hızı, sıcaklık, kolon kalitesi gibi faktörlere bağlıdır. Kolon etkinliğinin gücü tabaka sayısı (N) ile hesaplanır. Önerilen değer $N > 2000$ 'dir.

$$N = 16 \cdot \frac{t_r}{W} \quad (4.2)$$

W, Pik genişliği

t_r , alıkonma zamanıdır.

4.3.4. Kolon ayırma gücü (R_s)

Kolonun iki veya daha fazla analitin ayırma gücünün bir ölçüsüdür. Kolonun iyi bir ayırım gerçekleştirmiş olması için $R_s > 1.5$ olması gerekmektedir. $R_s = 2(t_2 - t_1) / (W_1 + W_2)$ formülünden hesaplanır.

4.3.5. Seçicilik faktörü (α)

İki analitin ayrımı söz konusu olan çalışmalarda kullanılır. Kullanılan kolonun analitleri iyi ayırma gücü olarak ifade edilir. $\alpha > 1$ olması istenir. Aşağıdaki formülünden hesaplama yapılır.

$$\alpha = \frac{t_2 - t_1}{t_1 - t_0} \quad (4.3)$$

t_1 : 1. Madenin alıkonma zamanı

t_2 : 2. Madenin alıkonma zamanı

t_0 : Hareketli fazın alıkonma zamanı

4.3.6. Kuyruklanma faktörü (T) ve asimetri faktörü (A_s)

Bu parametreler piklerin simetriliğinin bir göstergesidir. Pik simetrik olmadığı takdirde pik kuyruklanmaları, tekrarlanabilirliğin düşük olması, teorik tabaka sayısı iyi sonuç vermez. Asimetri faktöründe pik yüksekliğinin, pik tabanından %10'luk, kuyruklanma faktörü ise %5'lik kısmında hesaplama yapılır.

A_s 'nin 0.05-1.2 arasında; $T \leq 2$ olması istenir.

4.4. Kromatografik Koşullar

Hareketli faz olarak 0.5 mL fosforik asit içeren fosfat tamponu (0.025 M pH 3.08), ACN ve YPSK saflıktaki su (50:35:15, $h/h/h$) karışımı kullanılmış, tamponun hazırlanmasında 3500 mg sodyumfosfatdihidrat tartılıp 1000 mL YPSK saflıktaki su ile tamamlandıktan sonra 0.2 μ L gözenek boyutlu membran filitreden vakum altında süzülüp, 10 dk ultrasonik banyoda bekletilmiştir. 0.8 mL/dk akış hızında çalışılmıştır. Enjeksiyon 5 μ L hacminde, kolon sıcaklığı 30 °C ayarlanmıştır. Analiz 210 nm dalga boyunda gerçekleşmiştir.

4.3. Yöntemin Validasyonu

Bu tez çalışmasında validasyon parametreleri ICH (ICH Q2(R1), 2005) uygun olarak yapılmıştır. Doğruluk, doğrusalılık, kesinlik, sağlamlık, özgünlük, sapatama sınırı ve tayin sınırı parametreleri test edilmiştir.

4.3.1. Kesinlik

Gün içi ve günler arası yapılan ölçüm sonuçlarının birbirlerine yakınlığı ve tekrarlanabilirliği olarak ifade edilir. Herbiri 25 mg/L derişimindeki standart çözelti ile gün içersinde 4 enjeksiyon olacak şekilde, günler arası 4 set halinde tekrar edilebilirlik ile kesinlik çalışması yapılmıştır. Kesinlik, $\%BSS = \frac{\text{standart sapma (ss)}}{\text{derişimlerin ortalaması}} \times 100$ değerleri hesaplanmıştır.

4.3.2. Doğruluk

Doğruluk analiteki bilenen derişimle bulunan derişim değerlerinin birbirine yakınlığıdır. Analiz sonucu elde edilen değer ile gerçek değerın birbirine olan yakınlığı olarak tanımlanmaktadır. % Geri kazanım olarak gösterilir. İlave edilen analitin laboratuvar şartlarında hangi oranda geri alındığına bakılır. Yöntem olarak içeceklerle 37, 50, 57 mg/L neotam standart çözeltilerinden eklenerek 3 kez analiz edilmiştir.

4.3.3. Doğrusallık

Analit derişime karşılık gelen sinyalin grafikteki doğru üzerinde doğru orantılı olarak ve yakın olarak bulunmasıdır. Eğim (m), kesim (n) ve korrelasyon katsayısına bakılır (R). R² değeri 1'e ne kadar yakınsa yöntem o kadar iyidir. Doğrusallık çalışması için 7 değişik derişim içeren neotam çözeltilisine 3 gün ard arda gün içi 6 kez analiz edilmiştir. Daha sonra neotam çözelti derişimlerine karşılık gelen pik alanları grafiğı oluşturularak kalibrasyon eğrileri türetilmiştir. Eğim, kesim ve korelasyon katsayılarının ortalama değerleri hesaplanarak gösterilmiştir.

4.3.4. Saptama sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ)

LOD deneyler sonucu yapılan hesaplamalarda analitin ölçülen en küçük derişimidir. Deneyler sonucu sinyal/gürültü oranı 3 olarak hesaplanmıştır. Aşağıdaki formülle bulunabilir.

$$LOD=3\times\frac{SS}{m} \quad (4.4)$$

Bu förmülde SS= standart çözeltilerden elde edilen değerlerin kesiminin standart sapmasıdır. m ise eğim değeridir.

LOQ ise analitin kabul edilen miktarıdır. Doğrusallık sınırları içersinde yer almaz. Sinyal/gürültü oranı 10 olarak hesaplanmıştır. Aşağıdaki eşitlikten hesaplanabilir.

$$LOQ=10\times\frac{SS}{m} \quad (4.5)$$

4.3.5. Özgünlük

Örnekte girişim yapma ihtimali yüksek olan maddelere kıyasla analizi yapılan maddenin ölçülebilme kapasitesidir. Yöntemin özgünlüğü için 3 farklı kolon ile çalışılmıştır. Elde edilen kromotogramlar karşılaştırıldığında pozitif veya negatif girişim görülmemiştir.

4.3.6. Sağlamlık

Analiz esnasında laboratuvarından kaynaklanan çeşitli sapmaların sonuçları nasıl etkilediğini inceler. Metotta bazı parametrelerin değiştirilerek (mobil faz yüzdesi, akış hızı, sıcaklık, pH gibi) yapılan sağlamlık çalışmasında analiz sonucuna değişikliği az olmalıdır. Yapılan yöntemin güvenilirliğini gösterir. 25 mg/L standart çözelti ve 37 mg/L içecek örneği yöntemin sağlamlık çalışması için analiz edildi. Bu amaçla hareketli faz yüzdesi (%49-51), akış hızı (0.7-0.9 mL/dk) yapılarak, üçer kez tekrarlanmış derişimin, alıkonma zamanının ortalamaları, standart sapma değerleri ve %BSS değerleri hesaplanmıştır.

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

5.1. Standart Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması

Neotam stok çözeltisi için 10 mg standart madde hassas terazide tartılıp 10 mL (ACN:fosfat tamponu:su) (35:50:15, h/h/h) eklenerek çözülmesiyle 1000 mg/L derişiminde neotam stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stok çözeltiden (ACN:fosfat tamponu:su) ile gerekli seyreltmeler yapılarak 2, 5, 10, 25, 50, 75, 100 mg/L derişiminde standart çalışma çözeltileri hazırlandı.

5.2. İçecek Numunelerinin Hazırlanması

Neotam içerdği bilinen 4 farklı içecek Türkiye'deki marketlerden temin edilmiştir. Yapılan çalışmada 1 adet soda, 1 adet enerji içeceği, 1 adet gazlı içecek ve 1 adette suda hedef maddenin analizi gerçekleştirilmiştir.

İçecek numunelerinin analizinde 50 mL içecek 15 dk ultoronik banyoda bekletilmiştir. 3 ayrı vialle sırasıyla herbir örnekten 0.5 mL, 0.43 mL, 0.63 mL alınarak ACN:Fosfat tamponu:su (35:50:15, h/h/h) karışımı ile 1 mL'ye tamamlanmış ve 0.2 µm PVDF filitreden süzülerek analiz edilmiştir.

5.3. YPSK Yöntem Geliştirme

Yeterli ayırma gücüne sahip bir yöntem sıvı kromatografisi için önemlidir. Kromatografik koşullardan hareketli faz oranları, karışımı oluşturan çözünenler ve sabit faz ile olan etkileşimleri, pH gibi faktörler deneysel koşulların değiştirilip test edilmesiyle yönetilebilir.

5.4. Hareketli Faz Optimizasyonu

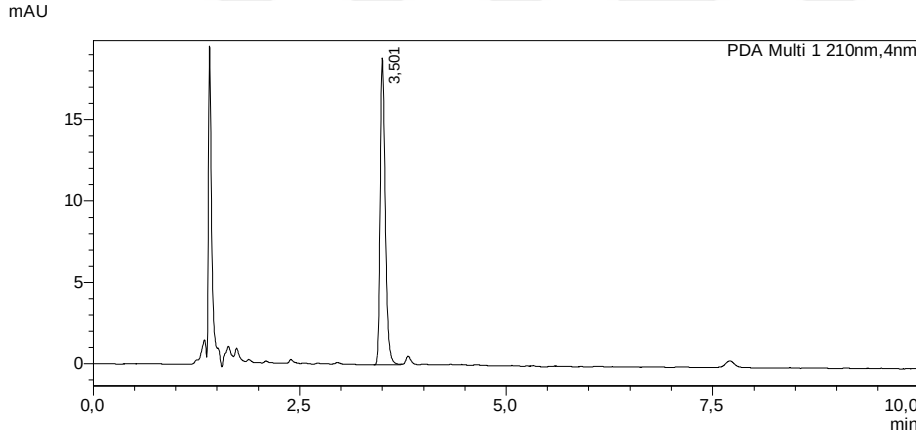
HPLC'de mobil faz seçimi kullanılan karışımın bileşimi, elüsyon gücü bileşiklerin tutunmasında önemli bir yere sahiptir. Bu çalışmada hareketli faz olarak ACN:su, metanol:su, asetat tamponu:ACN, fosfat tamponu:ACN:su karışımı uygun hareketli faz olarak seçildi. Doğru kromatografik ayırım için çeşitli hareketli faz oranları denendi, su:ACN 40:60, 25:75, 50:50 (h/h); su:metanol 50:50, 60:40, 90:10 (h/h); asetat tamponu:ACN 80:20 (h/h) test edildi. Elde edilen sonuçlar neticesinde ACN:fosfat tamponu:su 35:50:15 (h/h/h) olduğu değer optimum hareketli faz olarak seçildi

Tablo 5.1. Neotamın optimum koşullardaki şartları

Yöntem Şartları	Neotam
Kolon	C ₁₈ (150×4.6 mm, 2.7 µm)
Dedektör	UV
Dalga Boyu	210 nm
Hareketli Faz	Asetonitril: Fosfat tamponu (pH:3.08) :su (35:50:15)
Kolon Sıcaklığı	30 °C
Kolon Akış Hızı	0.8 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	5 µL

Tablo 5.2 Optimum koşullarda gözlenen sistem uygunluk testi sonuçları (n=12).

Parametre 25 mg/L (n=12)	Gözlenen Değer	Önerilen Değer
Alıkonma Zamanı (dk)	3.277	-
Kapasite Faktörü (k')	1.52	1-3
Kuyruklanma Faktörü (T)	1.30	≤ 2
Teorik Tabaka Sayısı (N)	16454	> 2000
Alıkonma Zamanı %BSS	0.02	< 1



Şekil 5.1. 25 mg/L derişimindeki standart neotam çözeltisinin YPSK kromotogramı

5.5. YPSK Yöntem Geçerlilik Testleri

5.5.1. Doğrusallık

2, 5, 10, 25, 50, 75, 100 mg/L derişimlerinde ki neotam çözeltilerinin gün içi 6 kez, günler arası 18 olmak üzere optimum koşullarda yapılan analizlerin kromatogramları alınarak pik alanları tespit edildi. Daha sonra neotam çözelti derişimlerine karşılık gelen pik alanları grafiklerinden regresyon katsayıları, ortalama eğim ve kesim değerleri hesaplandı., sonuçlar Tablo 5.3’de gösterilmiştir.

Tablo 5.3. Doğrusallık sonuçları

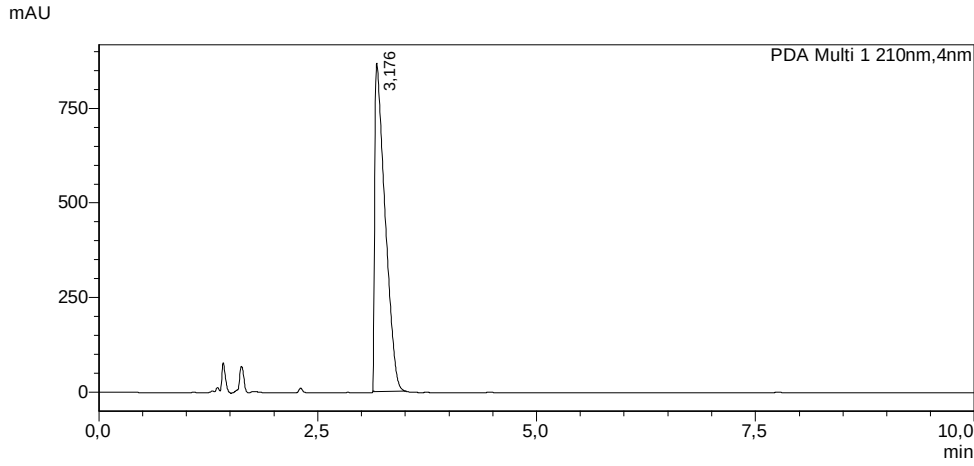
Parametre (2-100 mg/L)	Gün İçi			Günler Arası
	1. Gün (n=6)	2. Gün (n=6)	3. Gün (n=6)	Tüm Günler (n=18)
Eğim ± ss	15311±87.73	15328±103.13	15303±79.50	15314±90,12
Kesim ± ss	59112±50.20	58565±33.70	58592±61.53	58756±48.47
Tayin Katsayısı (r^2)	0.9972	0.9975	0,9972	0.9973
% 95 Güven Aralığı	15380-15241	15409-15246	15366-15240	15385-15243

5.5.2. Doğruluk

Neotamin kalibrasyon eğrisi aralığındaki üç farklı derişimi 37, 50, 57 mg/L 3 tekrarlı analizlerinin sonuçları kullanılarak %geri kazanım, %BSS derişimleri hesaplanmıştır. Hesaplamalar sonucunda %71 ile %116 arasında geri kazanım değerleri Tablo 5.4’de gösterilmiştir. Ayrıca elde edilen kromotogramlarda girişim yapan pike rastlanmamıştır. 50 mg/L neotam içeren optimum koşullardaki çözeltiye ait kromotogram şekil 5.2’de gösterilmiştir.

Tablo 5.4. Neotamin, YPSK yönteminde içecek örneklerindeki doğruluk değerleri (n=3)

İçecek Türü	λ nm	Eklenen (mg/L)	Bulunan±ss (mg/L)	% BSS	% Geri Kazanım	% Ortalama Geri Kazanım
A	210	37	40.15±0.12	0.2988	108.50	101.49
		50	46.83±0.57	1.2117	104.40	
		57	52.20±0.16	0.3065	91.57	
B	210	37	31.92±0.26	0.8145	86.27	83.78
		50	46.74±0.09	0.1926	93.48	
		57	40.85±0.08	0.1958	71.60	
C	210	37	40.50±0.24	0.5926	109.45	99.02
		50	48.50±0.38	0.7835	97.00	
		57	51.60±0.70	1.355	90.61	
D	210	37	42.95±0.38	0.8847	116.08	101.88
		50	47.37±0.55	1.161	94.74	
		57	54.05±0.39	0.7215	94.92	



Şekil 5.2. 50 mg/L derişiminde neotam içeren örneğin YPSK kromotogramı

5.5.3. Kesinlik

25 mg/L neotam standart çözeltisi ile yapılan analiz, aynı laboratuvar şartlarında bir günde 4 kez ve günler arası 3 günde 4 kez analiz edilerek kesinlik çalışması yapıldı. Analiz sonuçlarının ortalaması , standart sapması ve % BSS değerleri Tablo 5.5’de gösterilmiştir.

Tablo 5.5. YPSK yönteminin gün içi ve günler arası kesinlik değerleri

Parametre (25 mg/L)	Gün İçi			Günler Arası
	1. Gün (n=4)	2. Gün (n=4)	3. Gün (n=4)	Tüm Günler (n=12)
Bulunan NEO ortalama±ss	27.75±0.23	27.72±0,05	27.56±1.13	27.67±0.04
%BSS	0.8288	0.1883	4.100	0.1445

5.5.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve miktar tayin alt sınırı (LOQ)

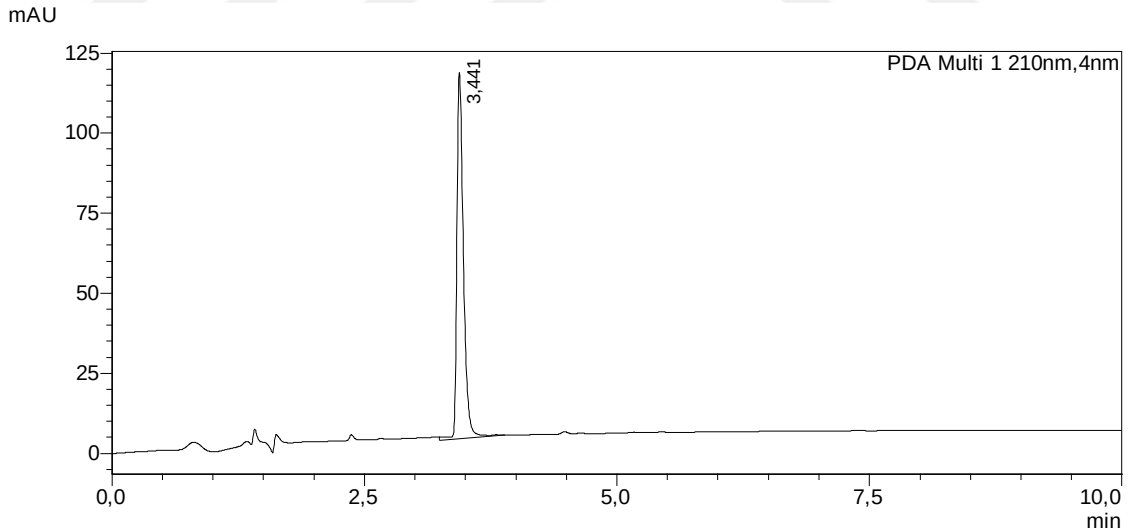
Neotam analizinde kesinlik ve doğruluk çalışmaları sonucunda en küçük derişimin standart sapma değerinden saptama sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) hesaplanmıştır. Neotam standart çözeltilerinden elde edilen kromotogramlardan sinyal/gürültü oranının 3 olduğu. LOD değerinin 10 olduğu tespit edildi. YPSK yönteminde LOQ değeri 0.0327 mg/L iken LOD değeri 0.0098mg/L ‘dir.

5.5.5. Sağlamlık

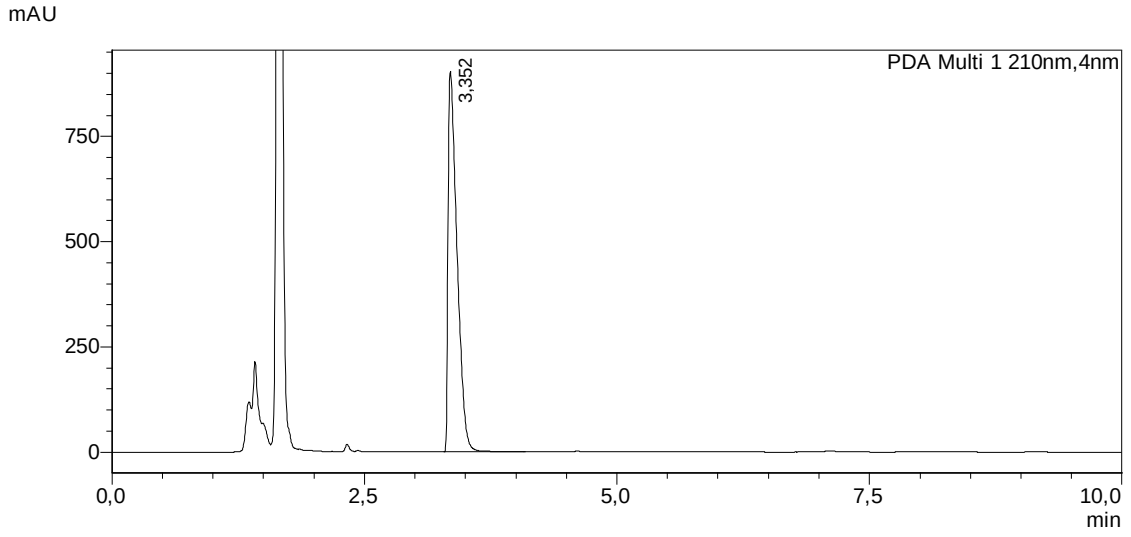
Yöntem parametrelerinden akış hızı ve mobil faz değişikliğinin 3 tekrarlı analizleri sonucunda derişim ortalama, alıkonma zamanı, standart sapma değerleri, %BSS değerleri hesaplanmıştır. Bulunan değerler yöntemin optimum koşullardaki sonuçlarıyla karşılaştırılmış ve değerlerin birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir. Bulunan sonuçlar Tablo 5.6 ve Tablo 5.7’de gösterilmiştir. Değiştirilen parametreler sonucunda elde edilen kromotogramlar şekil 5.3, şekil 5.4, şekil 5.5, şekil 5.6’da gösterilmiştir.

Tablo 5.6. Hareketli faz yüzdesi değişikliği sonucu sağlamlık sonucu

Parametre	Derişimin ortalaması±ss	Alıkonma zamanı(dk)	%BSS
Hareketli faz yüzdesi (%) 25 mg/L			
49	29.28±0.60	3.477±0.007	2.049
51	29.32±0.13	3.423±0.012	0.4433
Hareketli faz yüzdesi (%) 37 mg/L			
49	36.44±0.47	3.383±0.008	1.289
51	36.34±0.22	3.355±0.005	0.6053



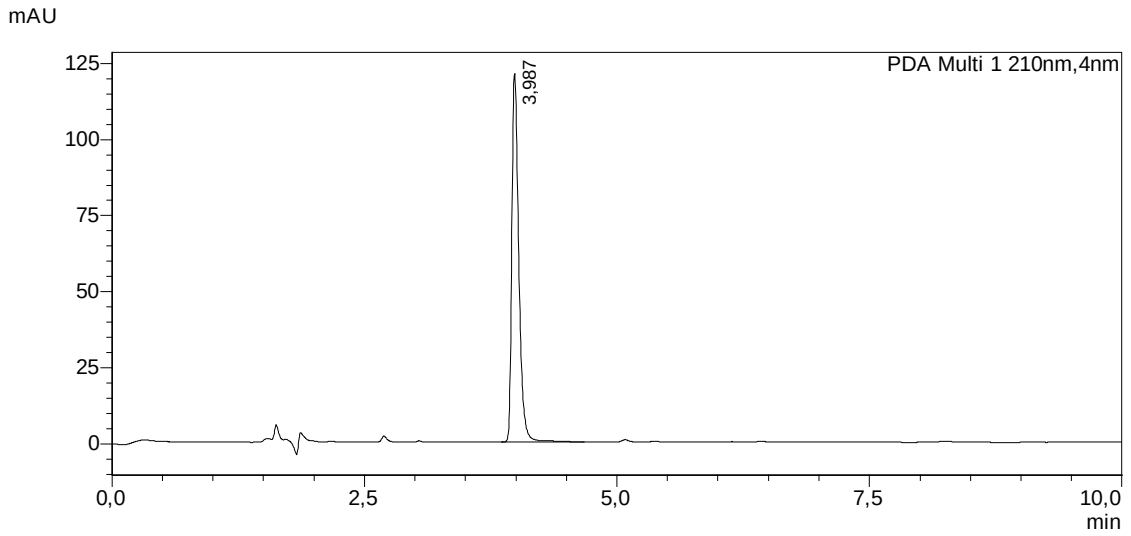
Şekil 5.3. 25 mg/L standart çözeltinin %49 mobil fazdaki kromotogramı



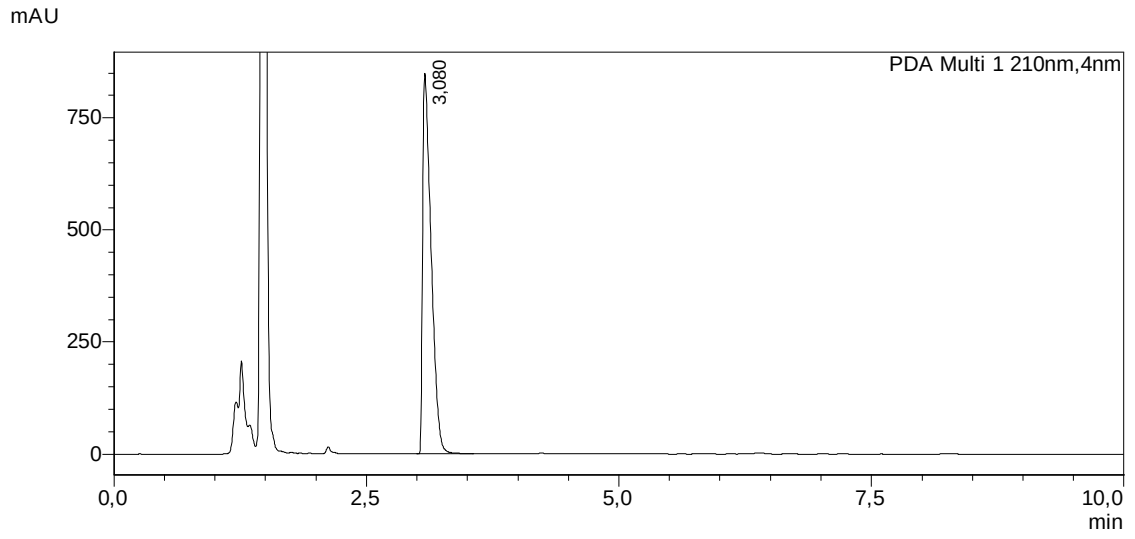
Şekil 5.4. İçecek örneğinin %51 mobil fazdaki kromotogramı

Tablo 5.7. Akış hızı değişikliği sonucu sağlamlık sonuçları

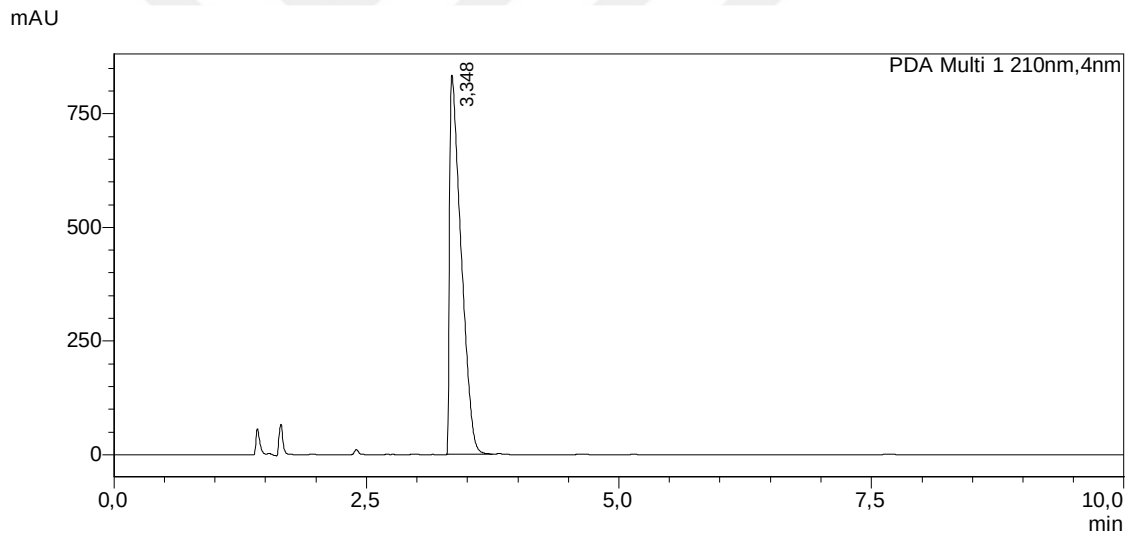
Parametre	Derişim ortalama $\pm$ ss	Alıkonma zamanı (dk)	% BSS
Akış hızı (mL/dk) 25 mg/L			
0.7	29.28 $\pm$ 0.16	3.996 $\pm$ 0.008	0.5464
0.9	25.62 $\pm$ 0.13	3.126 $\pm$ 0.008	0.5074
Akış hızı (mL/dk) 37 mg/L içecek örneği			
0.7	39.50 $\pm$ 0.30	3.904 $\pm$ 0.008	0.7594
0.9	32.79 $\pm$ 0.22	3.081 $\pm$ 0.005	0.6709



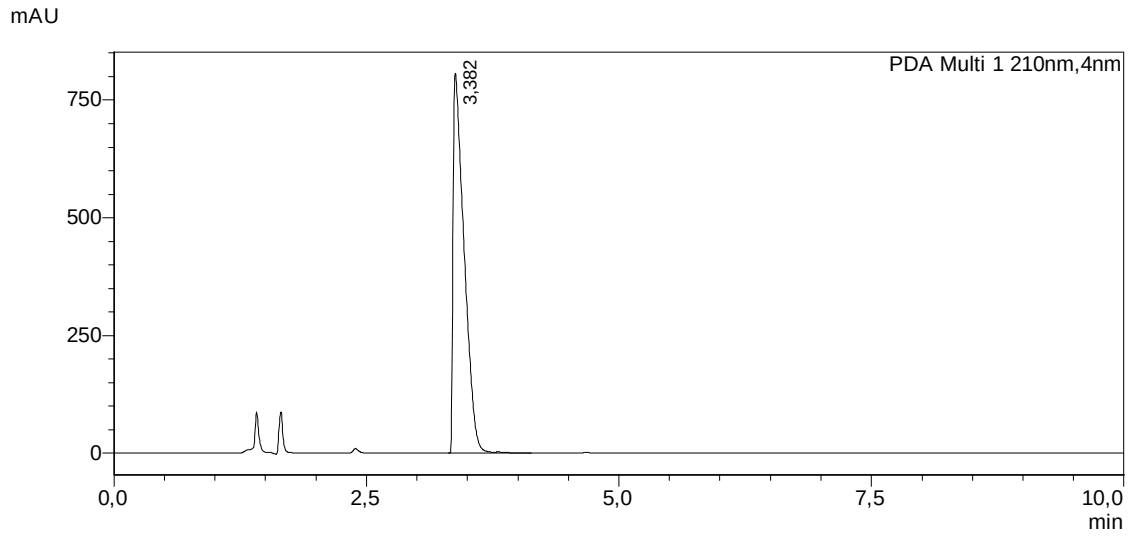
Şekil 5.5. 25 mg/L standart neotam çözeltisinin 0,7 mL/dk'daki kromotogramı



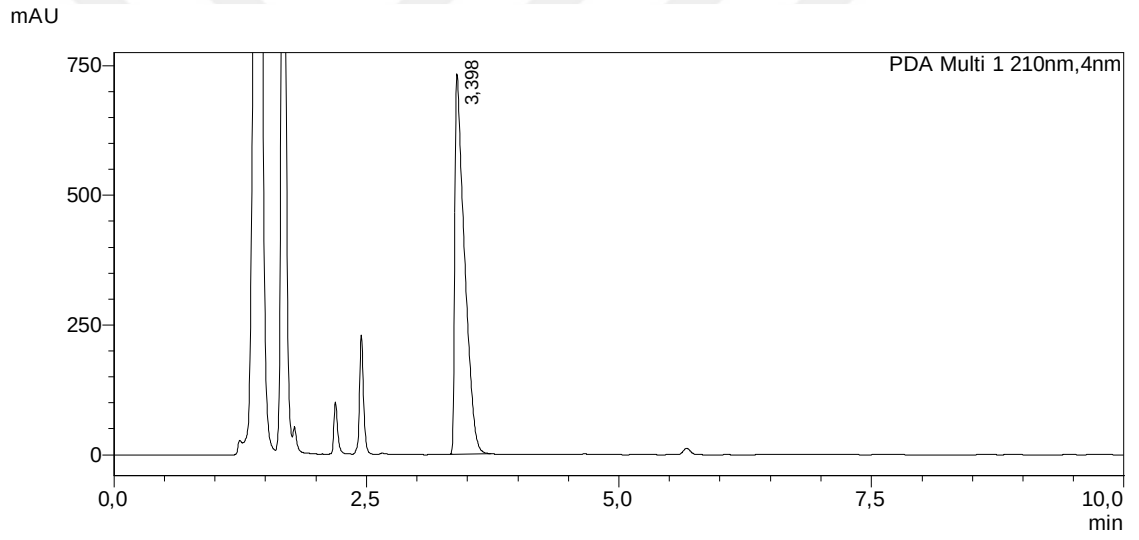
Şekil 5.6. 0,9 mL/dk akış hızında 37 mg/L içecek örneğinin kromatogramı



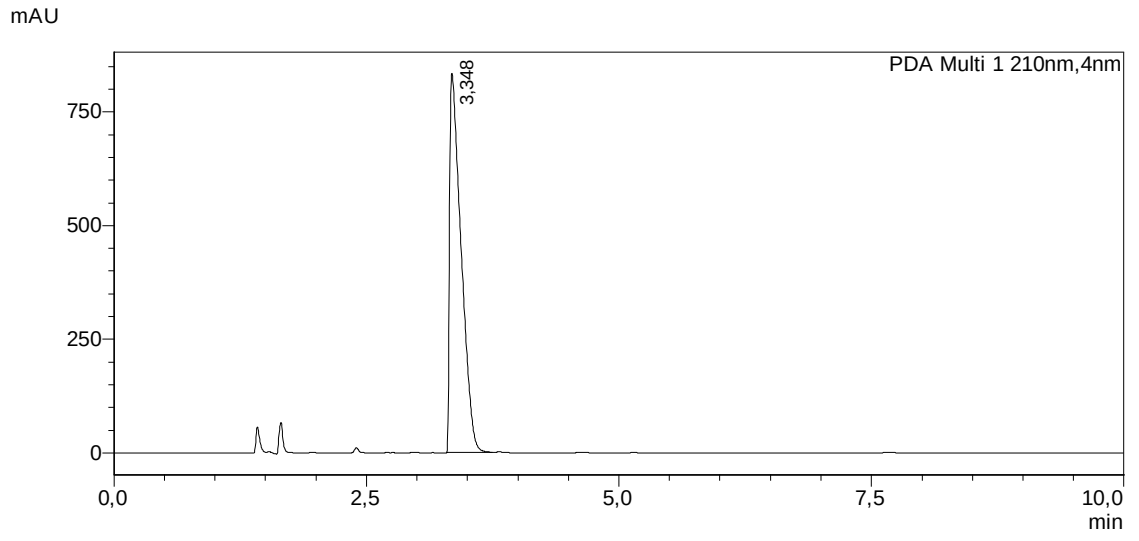
Şekil 5.7. Asitli içecek örneğinden elde edilen kromatogram



Şekil 5.8. Soda örneğinden elde edilen kromatogram



Şekil 5.9. Enerji içeceği örneğinden elde edilen kromatogram



Şekil 5.10. *Su örneğinden elde edilen kromatogram*

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sağlık açısından önem taşıyan ve kaliteli yaşamın bir parçası olan beslenme oldukça önemlidir. Günümüzde artan nüfusla birlikte, büyüyen gıda sektörü bir çok alternatif gıdayı hayatımıza dahil etmiştir. Bunun sonucunda birçok teknolojik yöntem ve bilimsel çalışmalar gıda içeriklerinin belirlenmesinde önemli bir rol üstlenmiştir.

Şekerin sağlık üzerindeki olumsuz etkilerinden olan kilo alma kaygıları, dental sorunlar, diyabet tanısı konulan hastalar sonucunda tatlandırıcı kullanımı artmıştır. Diyabet hastaları gibi günlük kullanım miktarı önemli olan tatlandırıcıların miktar tayinine yönelik birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu çalışmada amaç ELSD dedektör kullanarak neotamin tayinini gerçekleştirmekti, ancak ELSD dedektör ile herhangi bir sinyal gözlemlenemediğinden çalışmaya DAD dedektör ile devam edilmiştir. YPSK yöntemi küçük miktarların analizde dahi doğru sonuç vermesi, geniş bir kolon ve dedektör seçimine uygunluğu, zaman açısından ekonomikliğı gibi nedenlerden ötürü tercih edilmiş ve dedektör olarak DAD kullanılmıştır. Analizler C_{18} (150×4.6 mm, 2.7 μ m) kolonu kullanılarak yapılmıştır. Çeşitli hareketli faz yüzdeleri denemiş ve en iyi ayırım ACN:fosfat tamponu (pH: 3.08):su (35:50:15) (h/h/h) bileşenleri kullanıldığında gözlenmiştir.

Geliştirilen yöntemin geçerliliğini kanıtlamak amacıyla validasyon çalışmaları yapılmıştır. Doğruluk, kesinlik, doğrusalılık, geri kazanım vb. parametreleri incelenmiştir. Bulunan korelasyon katsayıları (R) ortalama olarak 0.9973 bulunmuş ve %BSS değerleri %2' den fazla değildir. Elde edilen sonuçlar neticesinde birçok üründe uygulanabilirliğı geçerli kılınmıştır.

KAYNAKLAR

- Administration, F. a. (2002). Food and drugfood additives permitted for direct addition to food for human consumption; neotame. ABD: Food and Drug Administration.
- Authority, E. F. (2007). *Neotame as a sweetener and flavour enhancer-scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food*. (5). UK: The EFSA Journal.
- Bannwart, G., Bolini, H., Toledo, M., & Siqueira, P. (2008). Application of neotame in catchup: quantitative descriptive and physicochemical analysis. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 18 (3), 241-251.
- Bathinapatla, A., Kanchi, S., Singh, P., Sabela, M., & Bisetty, K. (2014). Determination of neotame by high-performance capillary electrophoresis using β -cyclodextrin as a chiral selector. *Analytical Letters*, 47 (17), 2795-2812.
- Berset, J.-D., & Ochsenbein, N. (2012). Stability considerations of aspartame in the direct analysis of artificial sweeteners in water samples using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (hplc–ms/ms). *Chemosphere*, 88 (5), 563-569.
- Broughton, D., Fairchild, R., & Morgan, M. (2016). A survey of sports drinks consumption among adolescents. *British Dental Journal*, 220 (12), 639.
- Cadena, R., Cruz, A., Netto, R., Castro, W., Faria, J., & Bolini, H. (2013). Sensory profile and physicochemical characteristics of mango nectar sweetened with high intensity sweeteners throughout storage time. *Food Research*, 54 (2), 1670-1679.
- Chang, C.-S., & Yeh, T. (2014). Detection of 10 sweeteners in various foods by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22 (3), 318-328.
- Chankvetadze, B., & Blaschke, G. (2001). Enantioseparations in capillary electromigration techniques: recent developments and future trends. *Journal of Chromatography A*, 906 (1-2), 309-363.

- Çelik Kayapınar, F., & Özdemir, İ. (2016). Öğrencilerin enerji içeceği tüketim bilincinin ve alışkanlıklarının araştırılmasında bir meslek yüksekokulu örneği. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 15 (1), 1-12.
- Çetinkaya, E. (2015). *İnovatif Kimya Dergisi*. <https://inovatifkimyadergisi.com/hplc-ve-ilac-sanayinde-uygulamaları> (Erişim Tarihi: 4.11.2019) adresinden alındı.
- Edwards, C., Rossi, M., Corpe, C., Butterworth, P., & Ellis, P. (2016). The role of sugars and sweeteners in food, diet and health: Alternatives for the future. *Trends in Food Science & Technology*, 56, 158-166.
- Eser, B., & Dinçel, A. (2018). Kromatografiye giriş, yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanımında basit ipuçları. *Sağlık Hizmetleri ve Eğitimi Dergisi*, 2 (2), 51-57.
- Gan, Z., Sun, H., Wang, R., & Feng, B. (2013). A novel solid-phase extraction for the concentration of sweeteners in water and analysis by ion-pair liquid chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1274, 87-96.
- Haque, M. N. (2018). A Survey on Soft Drinks Intake Behaviour among University Going Students. *Doctoral dissertation, East West University*.
- Hu, F., Xu, L., Luan, F., Liu, H., & Gao, Y. (2013). Determination of neotame in non-alcoholic beverage by capillary zone electrophoresis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93 (13), 3334-3338.
- İnanç, L., & Çınar, İ. (2009). Alternatif doğal tatlandırıcı: stevia. *Gıda*, 34 (6), 411-420.
- Ji, C., Sun, Y., Li, X., Chu, X., & Chen, Z. (2009). Simultaneous determination of artificial sweeteners in beverage by ultra performance liquid chromatography. *Se pu= chinese journal of chromatography. Guangdong Chem. Ind.*, 27 (1), 111-113.
- Jizhi, C., Jie, L., & Jinhua, L. (2009). Determination of neotame in food by high performance liquid chromatography. *Guangdong Food Industry Institute*, 36, 176-188.
- Kayapınar, F., & Özdemir, İ. (2016). Öğrencilerin enerji içeceği tüketim bilincinin ve alışkanlıklarının. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi* (1), 1-12.

- Kubica, P., Namiesnik, J., & Wasik, A. (2015). Determination of eight artificial sweeteners and common *Stevia rebaudiana* glycosides in non-alcoholic and alcoholic beverages by reversed-phase liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407 (5), 1505-1512.
- Kumari, A., Arora, S., Singh, A., & Choudhary. (2016). Development of an analytical method for estimation of neotame in cake and ice cream. *Lwt-food Science and Technology*, 70, 142-147.
- Kumari, A., Choudhary, S., Arora, S., & Sharma, V. (2016). Stability of aspartame and neotame in pasteurized and in-bottle sterilized flavoured milk. *Food Chemistry*, 196, 533-538.
- Li, C.-h., Li, S.-j., An, J., & Li, J.-Z. (2009). Simultaneous determination of various kinds of synthetic sweeteners in foods by RPLC/MS/MS. *Science and Technology of Food Industry*, 8.
- Lim, H.-S., Park, S.-K., Kwak, I.-S., Kim, H.-I., Sung, J.-H., Jang, S.-J., . . . Kim, S.-H. (2013). HPLC-MS/MS analysis of 9 artificial sweeteners in imported foods. *Food Science and Biotechnology*, 22 (1), 233-240.
- Liu, L.-m., & Peng, J.-d. (2008). Simultaneous determination of five sweeteners by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Instrumental Analysis*, 5.
- Ma, C., Sun, Z., Chen, C., Zhang, L., & Zhu, S. (2014). Simultaneous separation and determination of fructose, sorbitol, glucose and sucrose in fruits by HPLC–ELSD. *Food Chemistry*, 145, 784-788.
- Matsumoto, H., Hirata, K., Sakamaki, N., Hagino, K., & Ushiyama, H. (2008). Simultaneous determination of neotame, alitame and aspartame in foods by HPLC. *Shokuhin Eiseigaku zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 49 (1), 31-36.
- Meyer, G. (2015). *Aletli analiz yöntemleri, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)*. <https://docplayer.biz.tr/> Erişim Tarihi: (4.11.2019) adresinden alındı

- Mitchell, H. (2008). Sweeteners and sugar alternatives in food technology. *John Wiley & Sons*. doi:10.1002/9780470996003.
- Nofre, C., & Tinti, J.-M. (2000). Neotame: discovery, properties, utility. *Food Chemistry*, 69(3), 245-257.
- Özdemir, D., Başer, H., & Çakır, B. (2014). Türkiye Klinikleri Journal of Endocrinology. 9 (2), 60-70.
- Prakash, I., Bishay, I., Desai, N., & Waters, D. (2001). Modifying the temporal profile of the high-potency sweetener neotame. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2), 786-789.
- Research, G. V. (2017). *Organic foods and beverages market analysis by product (fruits & vegetables, meat, fish & poultry, dairy products, frozen & processed food), organic beverages (non-dairy, coffee & tea, beer & wine), and segment forecasts*. The U.S: Consumer F&B.
- Scheurer, M., Brauch, H., & Lange, F. (2009). Analysis and occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water and surface water and in soil aquifer treatment (SAT). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394 (6), 1585-1594.
- Schwartz, D., Gilstad-Hayden, K., Carroll-Scott, A., Grilo, S., McCaslin, C., Schwartz, M., & Ickovics, J. (2015). Energy drinks and youth self-reported hyperactivity/inattention symptoms. *Academic Pediatrics*, 15 (3), 297-304.
- Serdar, M., & Knezevic, Z. (2011). Determination of Artificial Sweeteners in Beverages and Special Nutritional Products Using High Performance Liquid Chromatography. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 62 (2), 169-173.
- Shilpashree, B., Kumari, A., & Singh, V. (2014). Evaluation of neotame and aspartame in food products: A Review. *Indian Journal of Dairy Science*, 67 (3), 195-203.
- Tuncer, M., & Gökşen, H. (2016). İçecek Sektöründe Tüketici Etnosentrizmi: Türkiye-Hollanda Karşılaştırmalı Uygulaması. *International Review of Economics and Management*, 4 (1), 67-95.

- Wasik, A., & Ulberth-Buchgraber, M. (2009). Analysis of sweeteners in foodstuff. *Agro Food Industry Hi-tech*, 20 (3), 27-30.
- Wasik, A., McCourt, J., & Buchgraber, M. (2007). Simultaneous determination of nine intense sweeteners in foodstuffs by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection—development and single-laboratory validation. *Journal of Chromatography A*, 1157 (1-2), 187-196.
- Weihrauch, M., & Diehl, V. (2004). Artificial sweeteners—do they bear a carcinogenic risk ? *Annals of Oncology*, 15 (10), 1460-1465.
- Wu, C. (2010). Ultra-high pressure liquid chromatography–mass spectrometry method for simultaneous determination of six micro-sweeteners in distilled spirit. *Journal of Food Science and Biotechnology*.
- Yang, D., & Chen, B. (2009). Simultaneous determination of nonnutritive sweeteners in foods by hplc/esl-ms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (8), 3022-3027.
- Yang, D., & Chen, B. (2010). Determination of neotame in beverages, cakes and preserved fruits by column-switching high-performance liquid chromatography. Food additives and contaminants,. *Food Additives and Contaminants*, 27 (9), 1221-1225.
- Zhao, Y., Chen, X., Li, X., & Jin, M. (2011). Influences of ion-suppressors on retention behaviors of nine food additives in reversed-phase high performance liquid chromatographic separation. *Se pu= Chinese Journal of Chromatography*, 29 (10), 988-994.
- Zhao, Y.-G., Cai, M.-Q., Chen, X.-H., Pan, S.-D., Yao, S.-S., & Jin, M.-C. (2013). Analysis of nine food additives in wine by dispersive solid-phase extraction and reversed-phase high performance liquid chromatography. *Food Research International*, 52 (1), 350-358.
- Zhao, Y.-G., Chen, X.-H., Yao, S.-S., Pan, S.-D., Li, X.-P., & Jin, M.-C. (2012). Analysis of nine food additives in red wine by ion-suppression reversed-phase high-performance liquid chromatography using trifluoroacetic acid and ammonium acetate as ion-suppressors. *Analytical Sciences*, 28 (10), 967-971.

- Zhou, Y., Yu, X., Song, X., Ye, S., & Chen, X. (2015). Application of neotame in preserved greengages. *Journal of Food Safety and Quality*, 6 (3), 794-802.
- Zygler, A., Wasik, A., Wasik-Kot, A., & Namiesnik, J. (2011). Determination of nine high-intensity sweeteners in various foods by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400 (7), 2159-2172.



ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad : Selin CANBAZOĞLU KILINÇ
Yabancı Dil : İngilizce
Doğum Yeri ve Yılı : ADANA/Yüreğir 1990
E-Posta : selin9011@hotmail.com
Orcıd No : 0000-0002-6122-5540

Eğitim ve Mesleki Geçmiş:

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	KTÜ-Kimya Bölümü	2012
Lise	Manisa Cumhuriyet Lisesi	2008

İş Deneyimi:

Yıl	Yer	Görev
2017-2018	Eskişehir Bil Temel Lisesi	Kimya Öğretmeni
2018-2019	Eskişehir Fen Bilimleri Temel Lisesi	Kimya Öğretmeni
2019-	Eskişehir Doğa Koleji	Kimya Öğretmeni