



**TATLANDIRICI OLARAK KULLANILAN
ASPARTAMIN ÇEŞİTLİ GIDA
ÖRNEKLERİNDEKİ MİKTARININ YPSK
YÖNTEMİ İLE TAYİNİ**

**Yüksek Lisans
Ebrar ACAR
Eskişehir 2023**

**TATLANDIRICI OLARAK KULLANILAN ASPARTAMIN ÇEŞİTLİ GIDA
ÖRNEKLERİNDEKİ MİKTARININ YPSK YÖNTEMİ İLE TAYİNİ**

Ebrar ACAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Göksel ARLI

(İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Murat SOYSEVEN)

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Temmuz 2023

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından kabul edilen 2204S035 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ebrar ACAR'ın “Tatlandırıcı Olarak Kullanılan Aspartamın Çeşitli Gıda Örneklerindeki Miktarının YPSK Yöntemi ile Tayini” başlıklı tezi 07/07/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, Analitik Kimya Anabilim dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Göksel ARLI	
Üye	: Doç. Dr. Rüstem KEÇİLİ	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Burcu SEZGİN	

Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ
Enstitü Müdürü

ÖZET

TATLANDIRICI OLARAK KULLANILAN ASPARTAMIN ÇEŞİTLİ GIDA ÖRNEKLERİNDEKİ MİKTARININ YPSK YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

Ebrar ACAR

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temmuz 2023

Danışman: Prof. Dr. Göksel ARLI

(İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Murat SOYSEVEN)

Aspartam, çeşitli sağlık yan etkilerine sahip olmasına rağmen, yüksek performansı ve düşük maliyeti nedeniyle çok yaygın bir yapay tatlandırıcıdır. Bu çalışmada, çeşitli içecekler ve şekerlemelerde aspartam tespiti için yeşil, çevre dostu, ucuz, hızlı ve sağlam bir YPSK-ELSD yöntemi geliştirilmiş ve doğrulanmıştır. Ayırma işlemi, C18 (4.6 x 150mm, 3.5 µm) kolonda izokratik olarak gerçekleştirilmiş olup, mobil fazın bileşimi, yeşil çözücüler olarak kullanılan (Su: EtOH):(80:20, v/v)'den oluşmaktadır ve akış hızı 1.00 mL dk⁻¹ dır. Kolon fırın sıcaklığı 30 °C'ye, ELSD'nin drift tüpü sıcaklığı 50 °C'ye ayarlanmıştır. Enjeksiyon hacmi 10 µL dir. YPSK-ELSD sisteminde Gain değeri: 7, Filtre değeri: 10 olarak belirlenmiştir. Geliştirilen YPSK-ELSD yönteminde sırasıyla 0.33 ve 0.99 LOD ve LOQ değerleri sağlanmıştır ve geri kazanım değerlerinin %98.67-102.88 aralığında olduğu belirlenmiştir. Yöntemin %BSS değeri %1'in altındadır. Toplam 8 dakikalık izokratik elüsyon uygulanmıştır. YPSK-ELSD yönteminde N₂ gaz basıncı 350 kPa'ya ayarlanmıştır. Kromatografik ayrımın her bir analiz basamağında sadece 6.4 mL su ve 1.6 mL etanol kullanarak aspartamın 8 dakika içinde eş zamanlı olarak belirlenmesine olanak sağlamıştır. Bu çalışma, geliştirilen YPSK -ELSD yönteminin gıda endüstrisinde rutin analizlerde kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Aspartam, YPSK, Buharlaştırıcı Işık Saçılım Dedektörü (ELSD), Yeşil kimya, İçecekler

ABSTRACT

DETERMINATION OF ASPARTAME USED AS SWEETENER IN VARIOUS FOOD SAMPLES BY HPLC METHOD

Ebrar ACAR

Department of Analytical Chemistry
Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, July 2023

Supervisor: Prof. Dr. Göksel ARLI

(Co-Supervisor: Asst. Prof. Üyesi Murat SOYSEVEN)

Aspartame is a widely used artificial sweetener due to its high performance and low cost, despite having various health side effects. In this study, a green, eco-friendly, cheap, fast, and robust HPLC-ELSD method was developed and validated for the determination of aspartame in various beverages and candies. The separation process was performed isocratically on a C18 column (4.6 x 150mm, 3.5 μ m), with the mobile phase composed of a (water:EtOH):(80:20, v/v) mixture, which served as green solvents, and a flow rate of 1.00 mL min⁻¹. The column oven temperature was set to 30 °C, and the drift tube temperature of the ELSD was adjusted to 50 °C. The injection volume was 10 μ L. In the HPLC-ELSD system, the Gain value was set to 7, and the Filter value was set to 10. The developed HPLC-ELSD method achieved LOD and LOQ values of 0.33 and 0.99 respectively, with recovery rates ranging from 98.67% to 102.88%. The precision of the method, expressed as RSD%, was below 1%. The total elution time using isocratic elution was 8 min. In the HPLC-ELSD method, the N₂ gas pressure was adjusted to 350 kPa. The HPLC-ELSD method allowed for simultaneous determination of aspartame within 8 min using only 6.4 mL of water and 1.6 mL of ethanol. This study demonstrates that the developed HPLC-ELSD method can be used for routine analysis in the food industry.

Keywords: Aspartame, HPLC, Evaporative Light Scattering Detector (ELSD), Green chemistry, Beverages

TEŞEKKÜR

Araştırma süresince benden maddi manevi yardımını esirgemeyen, bana rehberlik eden, bana elinden geldiği her imkanı sağlamaya çalışan sayın hocam **Prof. Dr. Göksel ARLI**'ya

Bu çalışma boyunca bilgisini ve tecrübelerini benden eksik etmeyen, herhangi bir sorunla karşılaştığımda yanımda olup çözüm üretmeye çalışan ve yine bu süreçte bana karşı oldukça sabırlı olan sayın hocalarım **Dr. Öğr. Üyesi Murat SOYSEVEN**'e ve **Dr. Öğr. Üyesi Burcu SEZGİN**'e,

Bu uzun ve zorlu süreçte her zaman destekçim olan ve sevgisini bana her daim hissettiren canım annem Betül ÖZEN, babam Hasan Basri ÖZEN ve ablam Hilal YAZICI' ya,

Son olarak çalışmamın son dönemlerinde bana oldukça destek olan sevgili eşim Mert ACAR' a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel 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.

Ebrar ACAR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
GÖRSELLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. TATLANDIRICILAR	3
2.1. ASP'ın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	4
2.1.1.ASP Analizleri ile İlgili Yapılmış Çalışmalar	5
2.2. Yeşil Kimya	8
3. YÖNTEMLER	9
3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)	9
3.2. Buharlaştırıcı Işık Saçılım Dedektörü.....	10
4. MATERYAL VE METOT.....	11
4.1. ASP Analizinde Kullanılan Kimyasal Malzemeler	11
4.2. ASP Analizinde Kullanılan Cihazlar	11
4.3.Yöntem.....	12

4.3.1.YPSK-ELSD tayini.....	12
4.3.1.1.Standart çözeltilerin hazırlanması.....	12
4.3.1.2.Mobil fazın hazırlanması.....	13
4.3.1.3.Numunelerin hazırlanması	13
4.3.2. YPSK-ELSD İle Tayin Yöntemi Geliştirilmesi	13
4.3.2.1. Sistem uygunluk testleri	13
4.3.2.2. Yöntem geçerliliğinin tespiti (Validasyon)	15
4.3.2.3. Doğruluk.....	15
4.3.2.4. Kesinlik.....	15
4.3.2.5. Seçicilik.....	15
4.3.2.6. Doğrusallık, LOD, LOQ.....	15
4.3.2.7. Sağlamlık	15
5. BULGULAR.....	16
5.1. YPSK-ELSD ile yapılan SUT çalışmaları.....	16
5.2. Sistem uygunluk testleri	19
5.2.1. YPSK- ELSD ile yapılan doğruluk ve kesinlik çalışmaları.....	19
5.2.2.YPSK- ELSD ile yapılan seçicilik çalışmaları.....	20
5.2.3.YPSK- ELSD ile yapılan doğrusallık, LOD, LOQ çalışmaları.....	20
5.2.4.YPSK- ELSD ile yapılan sağlamlık çalışmaları	22
5.2.5.Gıda örnekleri sonuçları.....	23
6. SONUÇ VE TARTIŞMA	28
KAYNAKÇA	29
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Tatlandırıcıların incelenen verileri ve fizikokimyasal özellikleri	4
Tablo 3.1. YPSK da kullanılan dedektör tipleri	9
Tablo 4.1. Çalışmalarda kullanılan malzemeler listesi	11
Tablo 4.2. Çalışmalarda kullanılan cihazların marka ve modelleri.....	12
Tablo 4.3. SUT testleri için kullanılan parametreler ve formülleri	14
Tablo 5.1. YPSK-ELSD uygulama koşulları	18
Tablo 5.2. YPSK-ELSD kullanılarak yapılan 200 µg mL ⁻¹ ASP analizinin sistem uygunluk test sonuçları (n=5)	19
Tablo 5.3. Geliştirilen YPSK-ELSD yönteminin doğruluk ve kesinlik sonuçları ...	20
Tablo 5.4. ASP için doğrusallık, LOD, LOQ, korelasyon katsayısı ve regresyon denklemleri verileri	22
Tablo 5.5. Geliştirilen YPSK-ELSD yönteminin sağlamlık sonuçları.....	22
Tablo 5.6. İçecek ve şekerlemelerin içerdikleri ASP miktarları	27

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Aspartamın molekül yapısı	5
Şekil 5.1. Mobil faz (%80:%20)(Su:MeOH), Akış hızı 1ml dk ⁻¹ , Basınç:350 kPa, Gain:5 Filter:10 ELSD sıcaklığı:50 °C koşullarında elde edilen ASP kromatogramı.....	16
Şekil 5.2. Mobil faz (%80:%30)(Su:ACN), Akış hızı 1ml dk ⁻¹ , Basınç:224 kPa, Gain:7 Filter:10 ELSD sıcaklığı:30 °C koşullarında elde edilen ASP kromatogramı.....	17
Şekil 5.3. Mobil faz (%80:%20)(Su:MeOH), Akış hızı 1ml dk ⁻¹ , Basınç:265 kPa, Gain:7 Filter:10 ELSD sıcaklığı:30 °C koşullarında elde edilen ASP kromatogramı.....	17
Şekil 5.4. Mobil faz (%80:%20)(Su:ACN), Akış hızı 1ml dk ⁻¹ , Basınç:224 kPa, Gain:7 Filter:10 ELSD sıcaklığı:50 °C koşullarında elde edilen ASP kromatogramı.....	17
Şekil 5.5. Optimize edilmiş koşullar altında elde edilen YPSK-ELSD ASP kromatogramı	18
Şekil 5.6. Analizler için yeşillik varyansı(Su/EtOH)	19
Şekil 5.7. 10-1000 µg mL ⁻¹ derişimlerine sahip standart ASP kromatogramları	21
Şekil 5.8. YPSK-ELSD ile elde edilen derişim-alan grafiğı kalibrasyon eğrisi	21
Şekil 5.9. YPSK-ELSD ile elde edilen log[derişim]–log[alan] kalibrasyon eğrisi ...	22
Şekil 5.10. YPSK-ELSD ile elde edilen içecek 1 örnek kromatogramı	23
Şekil 5.11. YPSK-ELSD ile elde edilen içecek 2 örnek kromatogramı	23
Şekil 5.12. YPSK-ELSD ile elde edilen içecek 3 örnek kromatogramı	23

Şekil 5.13. YPSK-ELSD ile elde edilen içecek 4 örnek kromatogramı	24
Şekil 5.14. YPSK-ELSD ile elde edilen içecek 5 örnek kromatogramı	24
Şekil 5.15. YPSK-ELSD ile elde edilen içecek 6 örnek kromatogramı	24
Şekil 5.16. YPSK-ELSD ile elde edilen içecek 7 örnek kromatogramı	24
Şekil 5.17. YPSK-ELSD ile elde edilen içecek 8 örnek kromatogramı	25
Şekil 5.18. YPSK-ELSD ile elde edilen içecek 9 örnek kromatogramı	25
Şekil 5.19. YPSK-ELSD ile elde edilen içecek 10 örnek kromatogramı	25
Şekil 5.20. YPSK-ELSD ile elde edilen içecek 11 örnek kromatogramı	25
Şekil 5.21. YPSK-ELSD ile elde edilen şekerleme 1 örnek kromatogramı	26
Şekil 5.22. YPSK-ELSD ile elde edilen şekerleme 2 örnek kromatogramı	26
Şekil 5.23. YPSK-ELSD ile elde edilen şekerleme 3 örnek kromatogramı	26
Şekil 5.24. YPSK-ELSD ile elde edilen reçel örnek kromatogramı	26

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 3.1. Analizlerde kullanılan YPSK-ELSD sistemi.....	10
--	----



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACN	: Asetonitril
ALI	: Alitam
ACE-K	: Asesülfam Potasyum
ASP	: Aspartam
BSS	: Bağlı Standart Sapma
CYC	: Siklamat
ELSD	: Buharlaştırıcı Işık Saçılım Dedektörü
JECFA	: Joint Expert Committee in Food Additives and Contaminants
LOD	: Dedeksiyon alt sınırı
LOQ	: Tayin alt sınırı
NHDC	: Neohespiridin dihidrokalkon
NEO	: Neotam
SCL	: Sükraloz
SUT	: Sistem Uygunluk Testleri
UV	: Ultraviyole
YPSK	: Yüksek performanslı Sıvı Kromatografisi

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde, gıda sektörünün gelişmesi ile birlikte yapay tatlandırıcıların kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır (Soyseven, 2018). Yapay tatlandırıcılar şeker ihtiyacını gideren ve sıklıkla şeker yerine kullanılan maddelerdir. Bu tatlandırıcılar kalorisiz veya oldukça az kalorili olduğu için vücut ağırlığının ve insülin dengesinin korunmasında önemli rol oynarlar (Lim vd., 2013). İnsan vücudu yapay tatlandırıcıları sindiremez ve bu tatlandırıcılar gıdalarda çok düşük miktarlarda bulunduğu için enerji kaynağı olarak kullanılamazlar. Tatlandırıcılardan en yaygın kullanılanlarından biri olan Aspartam (N - (L - α -Aspartil)- L -fenilalanin ,1-metil ester, ASP), hemen hemen gıda sektörünün gelişmesinden beri düşük kalorili yiyecekler, içecekler, sofrata tatlandırıcıları, soslar, çorbalar ,hardal, şekerlemeler ve sakızlar gibi bir çok gıda ürününde kullanılmaktadır.(Lim vd., 2013; Küçükkaraca, 2014). ASP, basit şekerin 180 ila 200 katı kadar tatlıdır ve daha uygun maliyetlidir. Bu nedenle yapay tatlandırıcılar yüksek tatlılıkta olup besleyici değildirler (Liu vd., 2014; Sun vd., 2014).

Gıdaların insan sağlığı üzerine etkileri tüketiciler için önemli olmakla birlikte bazı insanlar tatlandırıcılar gibi çeşitli gıda katkı maddelerinin güvenliği konusunda endişe duymaktadır (Grembecka vd., 2014). Aynı zamanda diyabet gibi çeşitli sağlık sorunları nedeniyle tatlandırıcı tüketimi artmakta olup günlük alınması gereken doz miktarının bilinmesi için gıda ve farmasötik ürünlerdeki miktarlarının belirlenmesi gerekmektedir. ASP, yalnız başına güvenli olsa da, farklı pH seviyeleri ve sıcaklıklar gibi çevresel faktörler onun istikrarını bozabilir ve potansiyel olarak zararlı hale getirebilir. Bu nedenle ASP'nin analizinde hassas, hızlı ve doğa dostu bir metot geliştirmek oldukça önemlidir.

ASP'nin tayini için genellikle, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, iyon kromatografisi, gaz kromatografisi, ince tabaka kromatografisi, kılcal elektroforez, akış-enjeksiyon analizi, elektroanaliz ve spektroskopi gibi tekniklere başvurulmaktadır (Liu vd., 2021). Özellikle yakın bir zamanda Yüksek Fazlı Sıvı Kromatografisi (YPSK), yapay tatlandırıcıların tayininde en verimli yöntem olarak kabul edilmiştir (Shanmugavelan vd., 2010; Grembecka vd.,2014; Ibrahim vd., 2019). Yapılan çalışmalar sonucu literatürde genellikle YPSK-UV detektör kullanılarak yapılan çalışmalar çok sayıda mevcut olmakla birlikte YPSK-ELSD yöntemiyle yapılan çalışmalar oldukça az sayıda bulunmaktadır.

ELSD, oldukça hassas, geniş dinamik aralığa sahip, kolay kullanımlı, çok çeşitli alanlarda daha etkili analizler gerçekleştirebilen bir detektördür. ELSD, mobil fazdan daha az uçucu olan herhangi bir maddeyi kolayca tespit edebilir (Li vd., 2023).

Yeşil Analitik Kimya, insanların veya çevrenin güvenliği için zararlı olan bileşiklerin tüketiminin veya üretiminin, analitik süreçlerden tehlikeli kimyasalları ortadan kaldırılarak veya azalttırılarak kimyasal tekniklerin kullanılmasıdır (Capello vd., 2007). Yeşil Analitik Kimyaya, çevresel etkileri aza indirmek ve analistlerin güvenliklerini ve sağlıklarını korumak amacı ile başvurulmaktadır ve araştırmacılar tarafından büyük bir ilgi görmektedir (Yabre vd., 2020; Mansour vd., 2021).

Bu çalışmada, çeşitli içeceklerde ve şekerlemelerde ASP tayini için YPSK-ELSD kullanan yeşil, çevre dostu, basit, hızlı ve sağlam bir yaklaşım geliştirilerek yöntem valide edilmiştir. Analizde yeşil alternatif olarak sadece su ve etanol kullanılmıştır. Mobil faz, toksik çözücü veya katkı maddelerinden tamamen arındırılmıştır. Geliştirilmiş ve onaylanmış YPSK-ELSD yönteminde, 8 dakikanın altında analize ulaşılmış ve yalnızca 1,6 mL EtOH tüketilmiştir.

2. TATLANDIRICILAR

Yapay tatlandırıcılar, yiyecek ve içeceklerde tatlandırıcı olarak kullanılan yapay maddelerdir. Tatlandırıcılar, şekerin yerini alabilen veya şekerin kullanımını azaltabilen düşük kalorili alternatiflerdir. Yapay tatlandırıcılar, sıfır veya düşük kalorili seçenekler olarak pazarlanırken, bazı tüketiciler tarafından sağlık açısından güvenilirlikleri hakkında endişeler dile getirilmiştir (Liu vd., 2021).

Yapay tatlandırıcıların en yaygın olarak kullanılanları ASP, sukraloz, sakkarin ve ACE-K'dır. ASP, düşük kalorili ve tatlı bir lezzet verirken, sukraloz şekerden 600 kat daha tatlıdır ve birçok ülkede sıfır kalori şeklinde satılmaktadır. Sakarin, düşük kalorili bir tatlandırıcıdır ve ACE-K, çok yüksek sıcaklıklara dayanabilen bir yapay tatlandırıcıdır (Sezgin, 2016).

Yapay tatlandırıcılar, şeker yerine kullanıldığında kalori alımını azaltabilir ve diyabet, obezite ve diğer sağlık sorunları ile ilişkili olabilecek yüksek şeker tüketimini önleyebilirler. Ancak bazı araştırmalar, yapay tatlandırıcıların sağlık risklerine neden olabileceğini öne sürmektedir (Li vd., 2023). Örneğin, ASP'nin beyin fonksiyonlarını etkileyebileceği ve bağırsak bakterilerinin dengesini bozabileceği öne sürülmüştür. Bazı çalışmalar, yapay tatlandırıcıların kanser riskini artırabileceğini iddia etmektedir, ancak bu iddiaların çoğu tam olarak kanıtlanmamıştır ve düşük dozlarda kullanıldığı takdirde yapay tatlandırıcıların genel olarak güvenli olduğu kabul edilmektedir. Yapay tatlandırıcıların genel özellikleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Tatlandırıcıların incelenen verileri ve fizikokimyasal özellikleri
(Carocho vd. 2017;Ordenez vd.,2015)

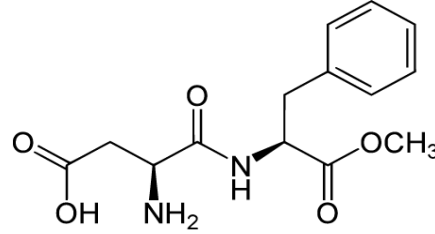
Bileşik	E Kodu	Formül	pKa	Log P	M.W. (Da)	Tatlılık oranı (Sükroza göre)	Günlük alım miktarı (mg/kg bw/gün)
ACE-K	950	C ₄ H ₄ NO ₄ SK	- 0.28	-1.33	201.24	150-200	9
CYC	952	C ₆ H ₁₃ NO ₃ S	- 8.66	1.03	179.24	30-80	11
SCL	955	C ₁₂ H ₁₉ NCl ₃ O ₈	12.5	0.23	397.63	400-800	5
ASP	951	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅	3.71 7.55	0.54	294.31	200	40
ALI	956	C ₁₄ H ₂₅ N ₃ O ₄ S	3.71 7.64	1.51	331.43	2000	1
NHDC	959	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₅	6.85	0.21	612.58	1500-2000	5
NEO	961	C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₅	3.68 8.33	3.83	378.47	7000-13000	2

2.1. ASP'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri

ASP'nin (N- L - α -Aspartil)- L -fenilalanin ,1-metil ester, ASP) kapalı formülü C₁₄H₁₈N₂O₅ dir. ASPın molekül ağırlığı 294,31 g/mol'dür. ASP, kokusu olmayan, şeffaf ve kristal yapıda bulunan bir maddedir. ASP'nin tadı, keskin, metalik veya kimyasal değildir. pH 3-5 aralığında asidik çözeltiler ASP ye zarar vermez. ASP'nin tatlılık seviyesi sükrozdan 180 kat kadar daha fazladır. Kalori değeri 1 gram başına 4 kcal (17 kj) civarındadır. JECFA'nın kararlaştırdığı günlük alınması gereken ASP miktarı vücut ağırlığı başına 40 mg/kg olmalıdır. ASP kuru haliyle nispeten kararlı olmasına rağmen, pH, sıcaklık ve zaman, kuru formunu etkileyen çok önemli faktörlerdir(Arora vd., 2013; Sezgin. 2016).

Günümüzde ASP, dünya çapında 200 milyondan fazla tüketici tarafından kullanılmaktadır ve gazlı alkolsüz içecekler, sakız, şekerlemeler, dondurulmuş tatlılar, yoğurt ve hatta öksürük şurupları ve vitaminler gibi bazı ilaçlarda dahil olmak üzere

6.000'den fazla beslenme ürününde kullanılmaktadır (Arora vd., 2013). ASP'nin molekül yapısı Şekil 2.1'de gösterilmektedir.



Şekil 2.1. ASP'nin molekül yapısı

2.1.1.ASP ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

Tsang ve vd., gazlı içeceklerde bulunan ASP ve parçalanma ürünlerinin analizi için hızlı ve kolay bir yöntem üzerinde çalışmışlardır. Örnekleri farklı süreler boyunca 22 ± 1 °C'de depolandıktan sonra, YPSK ve UV dedektör ile incelemişlerdir. Dört farklı parçalanma ürünü ve oranlarını belirlemişlerdir. ASP'nin benzaldehit gibi bir ürün oluşturmadığını tespit etmişlerdir. Veriler, ASP'nin karbonatlı içeceklerde uzun süreli depolama sırasında kararsız olduğunu ve parçalanma ürünlerinin hidroliz ve siklizasyon yoluyla oluştuğunu göstermişlerdir (Tsang vd., 1985).

Liu vd., bu çalışmalarında içeceklerdeki tatlandırıcıları (siklamat, ACE-K ve ASP) hızlı bir şekilde ayırma ve tespit etme yöntemini tanıtmaktadırlar. Yöntem olarak titanya bazlı ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanmışlardır. Yöntemde, su ve metanol karışımından oluşan mobil faz kullanmışlardır ve tespit dalga boyu 205 nm'dir. Bu yöntemle siklamat ve ASP'nin lineer aralıkları $0.02-8.0 \text{ mg mL}^{-1}$ ve ölçüm sınırları sırasıyla 16.35 ve 19.56 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Ayrıca, ACE-K lineer aralığı $0.125-50 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ve LOD'u $0.08 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak tespit etmişlerdir. Yöntemdeki geri kazanımların tümü %93 ile %103 arasındadır ve göreceli standart sapma tüm ölçümler için %0.72'den az olarak belirlemişlerdir (Liu vd., 2014).

Fernandes vd., bu çalışmada, ASP, siklamat, sakarin ve ACE-K gibi tatlandırıcıların aynı anda analizi için bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem, kapiler zon elektroforezi kullanarak yapılmıştır. Elektrolit koşullarını optimize etmiş ve bu sayede tatlandırıcıları doğru bir şekilde ayırtmışlardır. Bu yöntemin doğruluğu, hassasiyeti ve tespit limitlerini ölçmüş ve uygun sonuçlar elde etmişlerdir. Bu yöntemi, tatlandırıcıların bulunduğu limonlu çay poşeti örneklerinde de başarıyla uygulamışlardır (Fernandes vd., 2013).

Hsieh ve Chen, bu çalışmalarında ASP'nin farklı pH ve sıcaklık koşullarında ve zaman süresi boyunca hidrolize edilmesinin etkilerini incelemişlerdir. Hidroliz sonucunda oluşan fenilalaninin miktarı ve optik saflığı, bir floresan reaktifle işlevlendirildikten sonra YPSK analizi ile ölçmüşlerdir. Sonuçlar olarak düşük pH koşullarının ve yüksek sıcaklığın veya uzun zaman dilimlerinin hidrolizi arttırdığını ve ASP içeren gıdaların bu koşullarda depolanması durumunda fenilketonüri hastaları için risk oluşturabileceğini belirtmişlerdir (Hsieh ve Chen, 2006).

Lim vd., bu çalışmada ithal edilen gıdalarda bulunan 9 farklı yapay tatlandırıcının (asesülfam-K, siklamat, sodyum sakarin, aspartam alitam, neotam, sukraloz, dulcin ve neohesperidin dihidrokalkon) aynı anda tespit edilmesi için YPSK-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde kullanılan kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayılarını (r^2)>0.99 olarak belirlemişlerdir. Yaptıkları analizler sonucunda, örneklerdeki tatlandırıcıların kurtarmaları %90.0-107.5 aralığında ve varyasyon katsayılarını %1.8-8.6 aralığında tespit etmişlerdir. Saptama sınırı ve ölçüm sınırını ise sırasıyla 0.001 ila 0.375 mg mL⁻¹ ve 0.003 ila 1.125 mg mL⁻¹ arasında olarak bulmuşlardır. Bu yöntemi başarıyla çeşitli gıdalarda kullanarak, tatlandırıcıların aynı anda tespit edilmesini sağlamışlardır (Lim vd., 2013).

Lee vd., bu çalışmalarında Kore'de kullanımına izin verilen dört yapay tatlandırıcıyı YPSK-ELSD yöntemi ile incelemişlerdir. Bu tatlandırıcıları, Kore'deki 30 farklı gıda kategorisindeki 900'den fazla üründe tespit etmişlerdir. Yaptıkları analizler sonucunda, tatlandırıcıların tüm örneklerde güvenli düzeyde olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak, sodyum sakarini yalnızca alkol içeren bir içecekte bulmuşlardır ve diğer içeceklerde tespit edememişlerdir. Bu sonuçların, Kore halkının yapay tatlandırıcılara yönelik tüketimlerinin güvenli olduğunu gösterdiğini belirtmişlerdir (Lee vd., 2017).

Grembecka vd., bu çalışmalarında, farklı diyet takviyeleri ve alkolsüz içeceklerde ASP, ACE-K, sakarin, sitrik asit ve sodyum benzoatın aynı anda tayin edilmesi için bir yöntem geliştirmişlerdir. Yaptıkları analizlere göre, 100 mL gazlı içecekler ortalama 5,50 mg ASP, 6,38 mg sakarin, 8,94 mg ACE-K, 9,05 mg sodyum benzoat ve 111 mg sitrik asit içermektedir. Sitrik asidin, tüm örneklerde en yaygın katkı maddesi olup, diyet takviyelerinde en yüksek konsantrasyona sahip olduğunu belirtmişlerdir (347 mg/g). Tüm katkı maddelerinin uygun günlük alımın gerçekleştirilme yüzdesinin, izotonik içeceklerde sodyum benzoat hariç (%10,1) olmak üzere %10'un altında olarak tespit

etmişlerdir. Yöntemleri doğrulanmış ve doğrusalılık, hassasiyet ve doğruluk açısından tatmin edici sonuçlar vermiştir (Grembecka vd., 2014).

Silva vd., bu çalışmalarında Portekiz'de en çok tüketilen gazlı içeceklerin şeker ve besin değeri olmayan tatlandırıcı içeriğini araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlar, son on yılda gazlı içeceklerdeki şeker içeriğinde bir azalma olduğunu, ancak bu azaltmanın besin değeri olmayan tatlandırıcılar eklenerek gerçekleştirildiğini göstermiştir. Besin değeri olmayan tatlandırıcıları, özellikle siklamat, ASP ve ACE-K, çoğu örnekte tespit etmişlerdir ve günlük önerilen dozun üzerine çıkabildiğini belirtmişlerdir. Bu nedenle, reformülasyonların tatlı tad yoğunluğunu azaltmaya yönelik herhangi bir girişim olmaksızın yapıldığı sonucuna varmışlardır (Silva vd., 2021).

Serdar ve Kneževı, bu çalışmalarında ASP, ACE-K, sodyum sakarin ve sodyum siklamat gibi yapay tatlandırıcıların içecekler ve özel besin ürünlerindeki varlığını ayırmak ve belirlemek için kullanılan iki YPSK-DAD yöntemini kullanmışlardır. İlk yöntem, C18 kolonunda ASP, ACE-K ve sodyum sakarinin fosfat tamponu ve asetonitril kullanılarak izokratik elüsyonu ile ayrılmasını içerir. İkinci yöntem, C18 kolonunda sodyum siklamatin metanol ve su mobil fazı kullanılarak ayrılmasını sağlar. Her iki yöntemde de optimum koşullarda çizgisellik, hassasiyet ve geri kazanım gibi iyi analitik performans göstermiş olduğunu belirtmişlerdir. Bu yöntemlerin, gazlı içecekler ve özel besin ürünlerinin gerçek örneklerinin analizinde başarıyla kullanıldığını göstermişlerdir (Serdar ve Kneževı, 2011).

Sun vd., bu çalışmalarında ASP ve dört bozunma ürünü olan aspartik asit, fenilalanin, aspartil-fenilalanin ve 5-benzil-3,6-diokso-2-piperazinasetik asit, su ve diyet gazlı içeceklerde aynı anda analiz edilebilecek bir yöntem geliştirilmişlerdir. YPSK-tepkisel kütle spektrometrisi kullanılarak yapılan bu analiz yönteminde, ASP ve dört bozunma ürününün miktarını belirlemek için mükemmel korelasyon katsayılarına sahip bir matrisle eşleştirilmiş harici standart kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır. Yöntemin algılama sınırı, 0.16–5.8 mg mL⁻¹ aralığında değişmektedir ve yaygın yöntemlere göre daha yüksek bir duyarlılığa sahiptir. Bu yöntemi aynı zamanda ASP farklı pH ve sıcaklık koşullarında bozunma çalışmalarında da kullanmışlardır. Sonuçlar, ASP'nin güçlü asidik veya bazik koşullarda kısmen bozunduğunu ve bozunma derecesinin sıcaklık arttıkça arttığını göstermektedir. Kısacası, geliştirdikleri bu analiz yöntemi, ASP ve bozunma ürünlerini hassas, hızlı ve etkili bir şekilde tespit edebilme özelliğine sahiptir (Sun vd., 2014).

2.1. Yeşil Analitik Kimya

Yeşil analitik kimya, analitik kimyanın çevre dostu ve sürdürülebilir uygulamalarını araştıran bir dalıdır. Analitik kimya uygulamalarında çevre dostu olma düşüncesi her zaman benimsenmişti, ancak 1990'ların ortalarında yeşil analitik kimya yaklaşımı daha belirgin hale gelmiştir. 2010'dan sonra, yeşil analitik kimya süreci yeşil sertifikalar, akıllı telefon tabanlı yöntemler ve cihazların oluşturulması yönünde ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu alanda, analitik kimyanın temel ilkeleri çevreye duyarlılığı artırmak ve kimyasal atıkların miktarını azaltmak için uyarlanmıştır. Yeşil analitik kimya, aşağıdaki prensipler üzerine odaklanır:

- 1) Ön işlem adımlarını azaltmak ve doğrudan yöntemler kullanmak
- 2) Yerinde analiz yöntemleri kullanmak
- 3) Numune miktarını ve sayısını azaltmak
- 4) Minimizasyon ve otomasyonu arttırmak
- 5) Analitik işlemleri birleştirmek
- 6) Daha az enerji tüketmek
- 7) Reaktifleri ve atıkları azaltmak
- 8) Çoklu analitlerin eşzamanlı tespitini teşvik etmek
- 9) Güvenliği artırmak
- 10) Türevlendirme işlemlerinden kaçınmak
- 11) Toksik kimyasallardan kaçınmak ve yenilenebilir reaktifler kullanmak
- 12) Kataliz(Anastas ve Warner, 1998).

3. YÖNTEMLER

3.1.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (YPSK), bir analitik kimya tekniğidir ve bileşenlerin ayrılması, tanımlanması ve miktarının ölçülmesi için kullanılır. YPSK, bir çözücü ve bir mobil faz aracılığıyla çalışır. YPSK, analiz edilen bileşenlerin polaritesine, boyutuna, yüklü olup olmamasına, kimyasal reaktivitesine ve diğer özelliklerine bağlı olarak çalışır (Snyder vd., 1996; Soyseven, 2018).

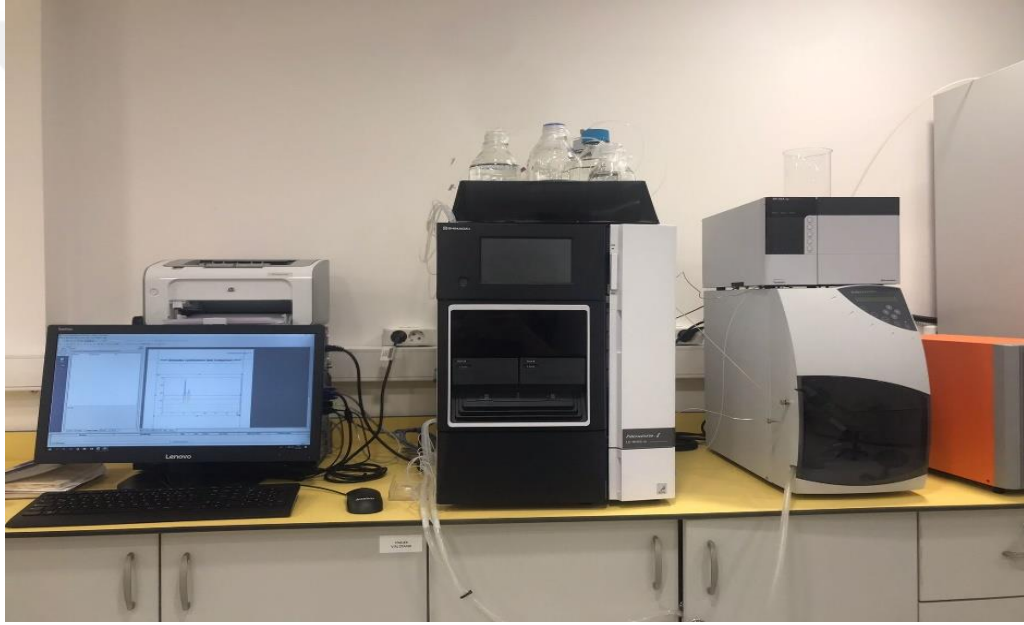
YPSK’de kullanılan dedektörler Tablo 3.1. de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. *YPSK kullanılan Dedektör tipleri*

-Ultraviyole/görünür (UV/VİS)
-Refraktif İndeks (RI)
-Floresans
-Elektrokimyasal
*Amperometrik
*Kondüktif
-Radyoaktivite
-Işık Saçılım
*Çok – Açılı Lazer Işık Saçılımı
(MALLS)
*Evaporatif Işık Saçılım (ELSD)
-Kütle Spektroskopisi

3.2. Buharlaştırıcı Işık Saçılım Dedektörü (ELSD)

ELSD, analitlerin optik özelliklerine bağlı olmaksızın, mobil fazdan daha az uçucu olan bileşiklerin çoğunu tespit edebilir. YPSK yönteminde ELSD dedektörünün kullanılması, bitkilerden, yiyeceklerden ve içecek ürünlerinden alınan karbonhidratların değerlendirilmesinde iyi bir metot olarak önerilmiştir. ELSD, olağanüstü hassasiyet, geniş dinamik aralık, kolay kullanım, çok çeşitli alanlarında daha etkili analiz ile genel amaçlı evrensel bir detektördür. ELSD, mobil fazdan daha az uçucu olan herhangi bir maddeyi kolayca tespit edebilir (Soyseven, 2018).



Görsel 3.1. *Analizlerde kullanılan YPSK-ELSD sistemi*

4.MATERYAL VE METOT

4.1. ASP Analizinde Kullanılan Kimyasal Malzemeler

ASP Standardı (> %99) Sigma-Aldrich'ten (Almanya) temin edilmiştir. YPSK saflığında saf su ve Etanol (EtOH), Merck'ten (Almanya) temin edilmiştir. N₂ gazı analitik saflıktaydı. YPSK enjeksiyonundan önce, (PVDF) şırınga filtreleri (13 mm iç çap ve 0.2 µm gözenek boyutu, Orrange Scientific, Belçika) tüm standart çözeltilerin ve numune çözeltilerinin filtrasyonu için kullanıldı.

Tablo 4.1. Çalışmalarda kullanılan malzeme listesi

Kullanılan Kimyasal Malzeme Adı	Marka	Saflık derecesi
ASP	Sigma – Aldrich (Almanya)	Analitik saflık %98-100,5, pellet
Metanol	Sigma – Aldrich (Almanya) ve Carlo Erba (Fransa)	YPSK Saflık, ≥%99,9
Su	Stakpure (Almanya)	YPSK Saflık, ≥%99,9
İzopröril Alkol (IPA)	Carlo Erba (Fransa)	YPSK Saflık, ≥%99,0
Etanol CHROMASOLV®,	Sigma – Aldrich (Almanya)	YPSK Saflık, ≥%99,8
Asetonitril	Sigma – Aldrich (Almanya) ve Carlo Erba (Fransa)	YPSK Saflık, ≥%99,9
CHROMAFIL kullan at membran filtreler 0,22 µm, 25 mm	MN	Selüloz asetat porlu
Falkon tüpler	Isolab	-

4.2. ASP Analizinde Kullanılan Cihazlar

Kromatografik ayırma, bir otomatik örnekleyici, bir gaz giderici, bir termo-statü kolon bölmesi, Shimadzu ELSD-LT-II Model dedektörüne (Japonya) bağlı bir ikili pompadan oluşan Shimadzu LC sistemi (Nexera-i LC-2040C 3D Model) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm sistem süreci ve verileri LabSolution Shimadzu Corporation (Japonya) yazılımı tarafından izlenmiştir. Sonikasyon için LabCompanion CS-10 ultrasonik banyo (Kore), vorteksleme için Heidolph Vortex (Almanya) ve numune ve çözeltilerin hazırlanması için Ohaus marka analitik terazi sistemi (ABD) kullanılmıştır.

Tablo 4.2. Çalışmalarda kullanılan cihazların marka ve modelleri

Cihaz Adı	Marka/ Model
Yüksek basınçlı sıvı kromatografi cihazı	Marka: Shimadzu (Japonya) Model: Nexera – i (LC – 2040C 3D) (Japonya) Liquid Chromatograph
Evaporatif Işık Saçılım Dedektörü (ELSD)	Marka: Shimadzu (Japonya) Model: ELSD LT – II Low Temperature Evaporate Ligth Scattering Dedector
Hassas terazi	Model: Ohaus PA214C
pH Metre	Model: Ohaus Starter 3100
Su banyosu	Model: Lab companion BW – 20 H
Vortex cihazı	Model: HEIDOLPH
Mobil faz süzme düzeneği	Marka: BFC Model: BF – S2500 vakum cihazına ile bütünleşik mobil faz süzme düzenek sistemi
Şırınga ve uçları	Part No: SN02522 - P

4.3.Yöntem

Gıdalarda bulunan ASP miktar tayini için yeşil kimya bakış açısıyla yeni bir YPSK-ELSD yöntemi geliştirilmiştir. Literatürde ASP'nin analizi için sıklıkla HPLC kullanılmasına rağmen ELSD ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Buna ek olarak yeşil kimya bakışı açısı ile çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada 15 tane içecek, 4 adet şekerleme ve bir adet reçel olacak şekilde toplam 20 adet numunenin ASP içerikleri incelenmiştir ve literatürde bulunan sonuçlarla kıyaslanmıştır.

4.3.1.YPSK-ELSD tayini

4.3.1.1. Standart çözeltilerin hazırlanması

ASP'nin stok standart çözeltileri konsantrasyon 1 mg mL⁻¹ olacak şekilde mobil fazda (%20 EtOH) hazırlanmıştır. Stok çözeltiler -18 °C'de buzdolabında saklanmış olup bütün çalışma solüsyonları günlük olarak mobil faz ile seyreltilmiştir. Tüm hesaplamalar, seyreltme faktörleri dikkate alınarak yapılmıştır. ASP çözeltileri 2 dakika

vortekslendikten sonra 10 dk ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Enjeksiyondan önce 0.22 µm filtre ile süzölmüştür. Standart çözeltilerin stabilitesi 4 °C'de minimum 3-4 haftadır.

4.3.1.2. Mobil fazın hazırlanması

800 mL YPSK saflığında bulunan suyun üzerine 200 mL EtOH ilave edilmiştir. Karışım 10 dk sonikatörde bekletildikten sonra hazırlanan çözelti 0.22 µm PVDF filtreden süzölerek YPSK-ELSD sistemine enjeksiyonu sağlanmıştır.

4.3.1.3. Numunelerin hazırlanması

Eskişehirde bulunan süpermarketlerden (gazlı içecekler, enerji içecekleri, limonata, tonik, şekerlemeler ve sakızlar dahil olmak üzere) toplam 20 örnek toplanmıştır. Şekerlemeler, EtOH içerisinde bir gece bekletildikten sonra 30 dakika sonikasyona tabi tutulup doğrudan 0.22 µm filtre ile süzölüp enjeksiyona hazırlanmıştır. İçecekler ise doğrudan 0.22 µm filtre ile süzöldükten sonra vorteks aracılığı ile 30 saniye boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra YPSK-ELSD analizi için vialle aktarılmıştır.

4.3.2. YPSK-ELSD ile ASP Tayin Yöntemi Geliştirilmesi

4.3.2.1. Sistem uygunluk testleri

Sistem uygunluk testi (SUT), analitik yöntem geliştirme ve doğrulamanın önemli bir parçasıdır. SUT, ayırma için en uygun koşulları belirlemek için değerlendirilip dikkate alınmıştır. Bu amaca ulaşmak için kapasite faktörü (k), kuyruk faktörü (T), asimetri faktörü ve teorik plaka numarası (N) ve tutma süresinin %BSS'si incelenmiştir.

Tablo 4.3. Sistem uygunluk testleri için kullanılan parametreler ve formülleri

Parametre	Eşitlik	
Kuyruklama faktörü	$T = \frac{W_{0.05}}{2 * \alpha_{0.05}}$	T: kuyruklama faktörü $W_{0.05}$: pikin %5 yüksekliğindeki pik genişliği $\alpha_{0.05}$: pikin %5 yüksekliğindeki ilk yarısının pik genişliği
Ayrım gücü	$R = 2 * \frac{t_R - t_{Rp}}{W + W_p}$	R_s: ayırım gücü t_R : alıkonma zamanı t_{Rp}: önceki pikin alıkonma zamanı W: pik genişliği W_p : önceki pikin pik genişliği
Bağıl alıkonma zamanı	$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0}$	α : bağıl alıkonma zamanı k'_1 : birinci pikin kapasite faktörü k'_2 : ikinci pikin kapasite faktörü t_1 : birinci pikin alıkonma zamanı t_2 : ikinci pikin alıkonma zamanı t_0 : ölü zaman
Teorik Tabaka Sayısı	$N = 16(t_R / W)^2$	t_R = alıkonma zamanı W= ppik taban genişliği
Asimetri Faktörü	$A_s = B / A$	A_s = asimetri faktörü A ve B= Pik yüksekliğinin %10'una göre orta noktaya olan uzaklıkları
Elde edilen pik alanını tekrar edilebilirliği	$\%BSS = SS / X_{ort} \times 100$	BSS: Bağıl standart sapma SS: standart sapma X_{ort}=yapılan analiz ortalaması

4.3.2.2. Yöntem geçerliliğinin tespiti (Validasyon)

Yöntemin validasyonu için Uluslararası Harmonizasyon Konferansı'nın (ICH) kılavuzunda da belirtildiği gibi doğruluk, kesinlik, seçicilik, doğrusallık ve sağlamlık gibi sistem uygunluk testleri yapılmıştır (ICH Q2(R1), 2005).

4.3.2.3. Doğruluk

Doğruluk, ölçülen verilerin sistemik hatalar veya yöntemsel sapmalar nedeniyle gerçek değerden ne kadar uzaklaşabileceği hakkında bilgi sağlar. Yani, doğruluk, elde edilen verilerin ne kadar güvenilir olduğunu belirlemek için kullanılır.

$$\% \text{ Geri kazanım} = \text{hesaplanan miktar} / \text{eklenen miktar} \times 100$$

4.3.2.4. Kesinlik

Analiz için geliştirilen YPSK yöntemi ile elde edilen sonuçlar arasındaki uygunluk derecesi olarak tanımlanır. ASP için gün içi ve günler arası, ortalama derişim (mg mL^{-1}), SS, %BSS, güven aralığı ($\alpha = 0.05$) değerleri hesaplanarak yöntemin kesinliği belirlenmiştir

4.3.2.5. Seçicilik

YPSK yönteminin seçiciliği esas madde ile girişim yapabilecek diğer bileşenlerin yanında analiz edilmek istenen maddenin yani ASPın ölçülebilme yeteneğidir.

4.3.2.6. Doğrusallık, LOD, LOQ

Analitik bir metodun doğrusallığı, numunedeki madde derişimi ile orantılı olarak test cevabının alınabilmesidir. Çalışmada, 4 farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltiler analiz edilmiştir.

LOD (Belirleme Sınırı) bir maddenin en düşük konsantrasyon değerini gösterir. Standart sapmanın 3 katının ortalamaya bölünmesiyle elde edilen değer kullanılmıştır.

$$\text{LOD} = 3 \times \sigma / m$$

LOQ (Nicelik Sınırı) numunedeki bileşenin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikle tayin edilebilen en küçük konsantrasyon değeridir.

$$\text{LOQ} = 10 \times \sigma / m$$

4.3.2.7. Sağlamlık

Metot parametrelerinde yapılan ufak değişikliklerden etkilenmeden kaldığının bir ölçüsüdür ve metodun güvenilirliğini gösterir.

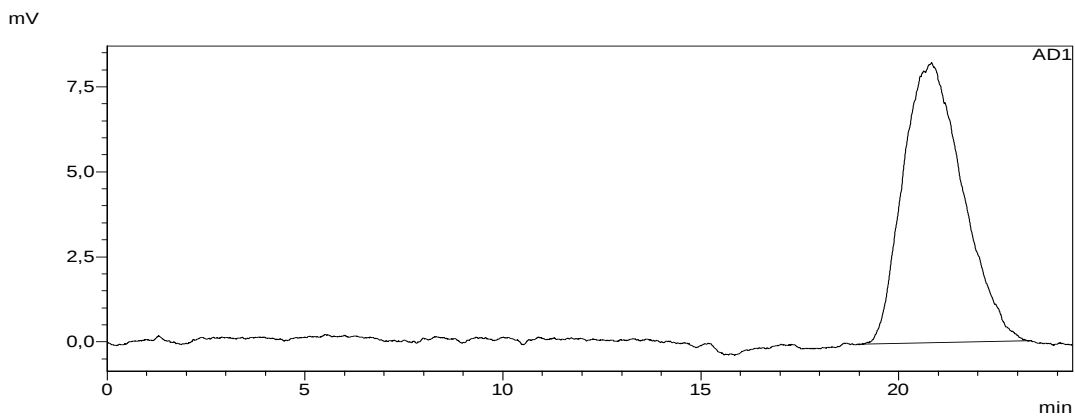
5. BULGULAR ve SONUÇLAR

5.1.YPSK-ELSD ile ASP tayini

YPSK-ELSD yöntemi için en iyi koşulları bulmak için bazı ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Mobil faz bileşimi, akış hızı, kolon sıcaklığı, drift tüpü sıcaklığı ve azot gazı basıncı gibi birçok parametre incelenmiş olup en iyi kromatografik ayırımın elde edilmesi için belirlenen parametreler aynı kalırken, ELSD parametreleri optimizasyon süreci boyunca değiştirilmiştir. 200 µg mL⁻¹ konsantrasyondaki bir ASP çözeltisi, yeşil çözücüler olarak sınıflandırılan su ve EtOH ile yapılan optimizasyon testlerinde YPSK-ELSD sistemine enjekte edilmiştir.

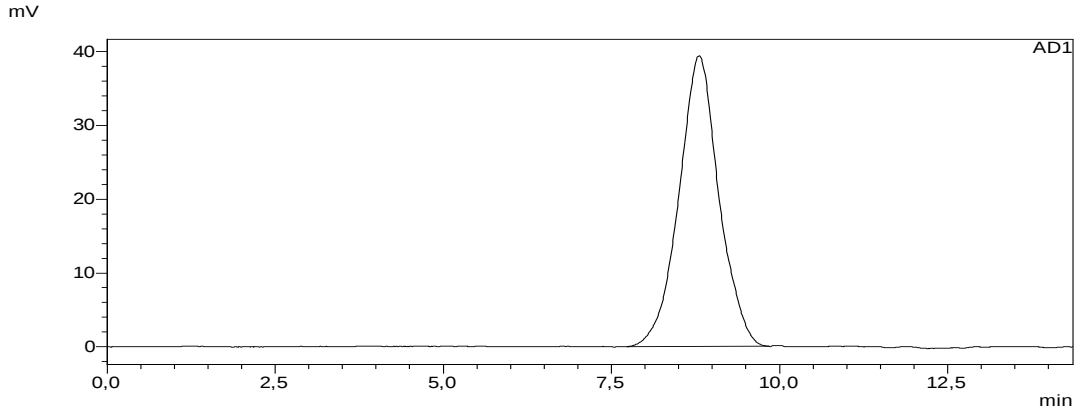
EtOH-Su çözeltilerinin farklı oranları, izokratik olarak ASP davranışını araştırmak için kullanılmıştır. Kolon sıcaklıkları 25 ve 35°C arasında olacak şekilde denenmiştir. Ancak önemli farklılıklar gözlemlenmediği için kolon sıcaklığı 30°C olarak belirlenmiştir. Ayrıca, drift tüpü üç farklı sıcaklıkta (45°C, 50°C ve 55°C) test edilmiştir. Sonuçlarına göre, en iyi pik morfolojisi 50°C'de bulunmuştur. Bu, kabul edilebilir düzeyde gürültü sinyali olan en düşük sıcaklıktır.

N₂ gazı basıncı 300 ila 400 kPa aralığında değiştirilmiş ve en iyi kromatografik ayırım 350 kPa'de bulunmuştur. Bu sonuç Shimadzu'nun önerilen değerleri ile uyumluluk göstermektedir. Optimizasyon çalışmalarında elde edilen kromatogramlar Şekil 5.1-Şekil 5.4'te gösterilmiştir.

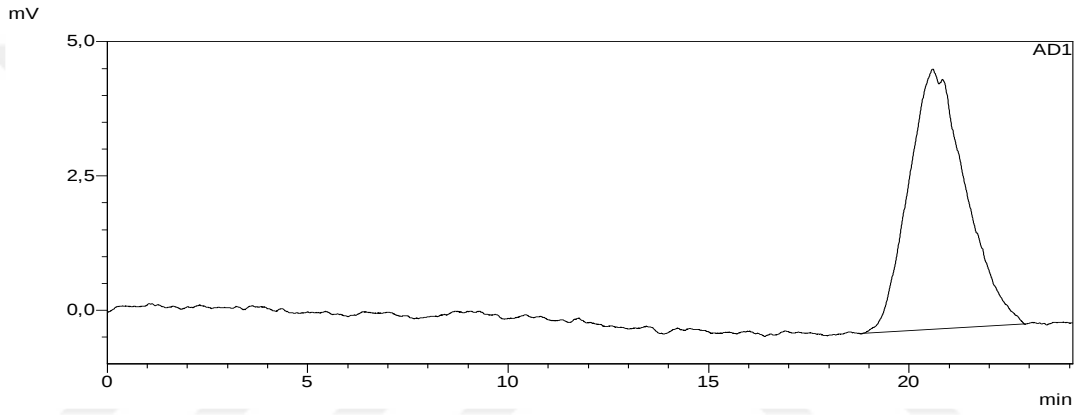


Şekil 5.1. Mobil faz (%80:%20)(Su:MeOH), Akış hızı 1ml dk⁻¹, Basıncı:350 kPa,

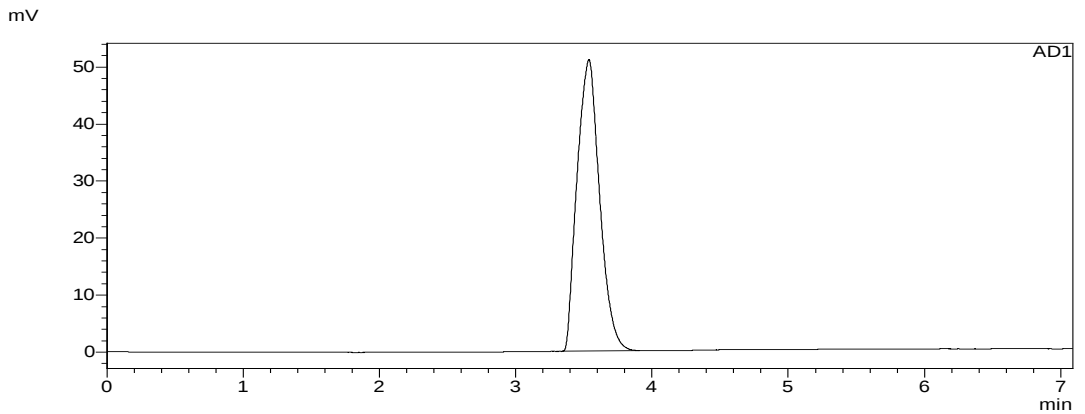
Gain:5 Filter:10 ELSD sıcaklığı:50 °C koşullarında elde edilen ASP kromatogramı



Şekil 5.2. Mobil faz (%80:%30)(Su:ACN), Akış hızı 1 ml dk^{-1} , Basınç:224 kPa,
Gain:7 Filter:10 ELSD sıcaklığı:30 °C koşullarında elde edilen ASP kromatogramı



Şekil 5.3. Mobil faz (%80:%20)(Su:MeOH), Akış hızı 1 ml dk^{-1} , Basınç:265 kPa,
Gain:5 Filter:10 ELSD sıcaklığı:30 °C koşullarında elde edilen ASP kromatogramı



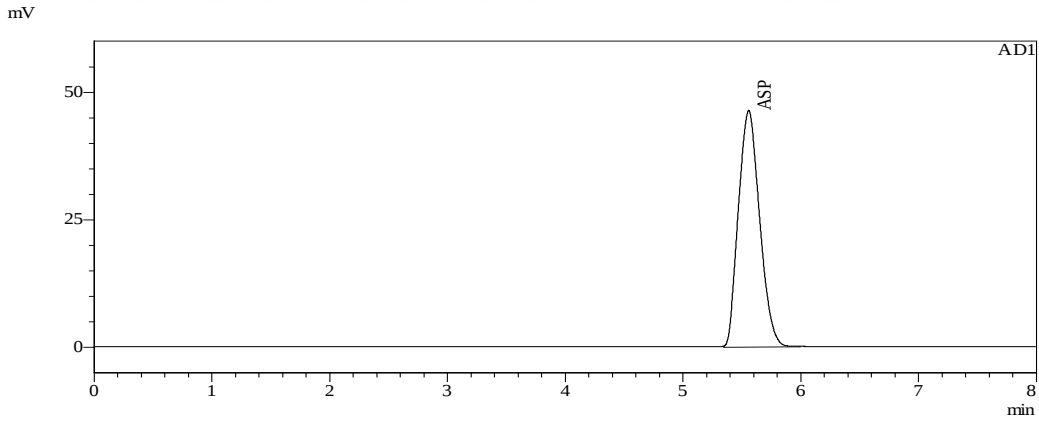
Şekil 5.4. Mobil faz (%80:%20)(Su:ACN), Akış hızı 1 ml dk^{-1} , Basınç:224 kPa,
Gain:5 Filter:10 ELSD sıcaklığı:50 °C koşullarında elde edilen ASP kromatogramı

Sonuçlar incelendiğinde YPSK-ELSD ile ASP analizi yeşil kimya bakış açısı ile değerlendirildiğinde en uygun koşulların Tablo 5.1’de gösterildiği gibi olmasına karar verilmiştir.

Tablo 5.1. YPSK-ELSD uygulama koşulları

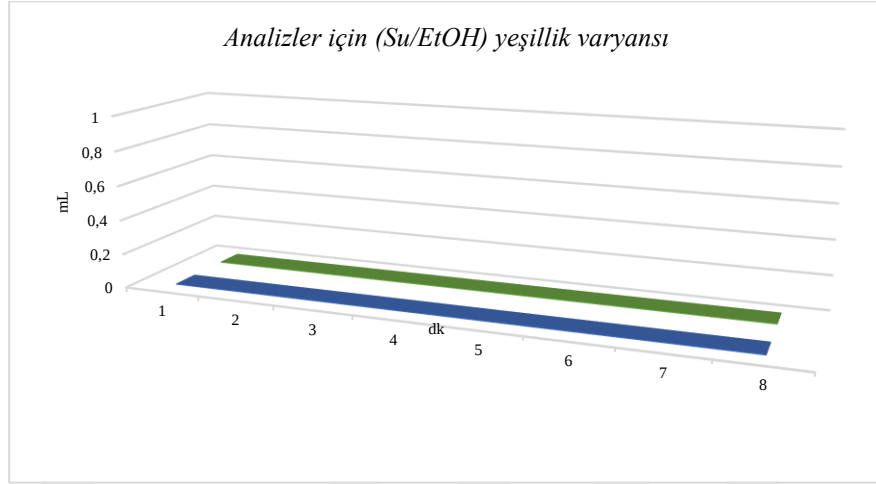
Parametre	Değer
Mobile faz	EtOH:Su(20:80, v/v)
Akış hızı	1 mL min ⁻¹
Kolon	Phenomenex Luna NH ₂
İnjesiyon hacmi	10 µL
Kolon sıcaklığı	30°C
Buharkıştırma sıcaklığı	50°C
N ₂ basıncı	350 kPa
Gain	7
Filter	10

ASP, bu koşullar altında alıkonma zamanı 5.7 dakika olarak gözlemlenmiştir (Şekil 5.5). Önerilen yeşil HPLC-ELSD yöntemi, kolonu yeniden dengelemeyi de içeren 8 dakika altında analiz yapmayı ve sadece 1.6 mL EtOH ve 6.4 mL su tüketmeyi sağlamıştır.



Şekil 5.5. Optimize edilmiş koşullar altında elde edilen YPSK-ELSD ASP kromatogram

HPLC analizinde analiz başına su/EtOH oranındaki değişkenlik Şekil 5.6’ da gösterilmiştir.



Şekil 5.6. Analizler için yeşillik varyansı (Su/EtOH)

5.2. Sistem uygunluk testleri

SUT çalışmaları sırasında 400 g mL⁻¹ ASP çözeltisi kullanılmıştır. Elde edilen SUT sonuçları Tablo 5.2’de gösterilmiştir.

Tablo 5.2. YPSK-ELSD kullanılarak yapılan 200 µg mL⁻¹ ASP analizinin sistem uygunluk test sonuçları (n=5)

Parametreler	Gözlenen Değer	*Önerilen Değer
Alıkonma süresi (dk)	5.57	-----
Kuyruklanma faktörü (T)	1.17	T < 2.00
Kapasite faktörü (k)	2.90	k > 2.00
Asimetri faktörü (A _s)	1.12	A _s = 0.95-1.20
Teorik Tabaka Sayısı (N)	4110	N > 2000
Alıkonma zamanı %BSS	0.10	%BSS < 1.0

5.2.1. YPSK- ELSD ile yapılan doğruluk ve kesinlik çalışmaları

İncelenen numunelere (düşük, orta ve yüksek) bilinen konsantrasyonlarda 80, 200 ve 600 g mL⁻¹ ASP eklenmiştir. Doğrusal aralık dikkate alınarak ekleme işlemleri yapılmıştır. Geri kazanım değerleri aşağıda verilen eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Geri kazanım} = \frac{\text{hesaplanan miktar}}{\text{eklenen miktar}} \times 100$$

Geliştirilen HPLC-ELSD yönetimin geri kazanım sonuçları %98.67 - %102.88 aralığında bulunmuştur.

"Kesinlik" terimi, bir dizi ölçümün sonuçlarının birbiriyle karşılaştırılabilir olma derecesini ifade eder. Genel tabirle, hem gün içi hem de günler arası kesinlik olarak adlandırılmaktadır. Art arda üç gün boyunca 80, 200 ve 600 g mL⁻¹ konsantrasyonlu üç ayrı ASP çözeltisi HPLC-ELSD sistemine enjeksiyonu yapılmıştır. Elde edilen % BSS değerleri (< %1), yöntemin hassasiyetinin iyi olduğunu gösterir niteliktedir. Elde edilen doğruluk ve kesinlik sonuçları Tablo 5.3'te verilmiştir.

Tablo 5.3. Geliştirilen YPSK-ELSD yönteminin doğruluk ve kesinlik sonuçları

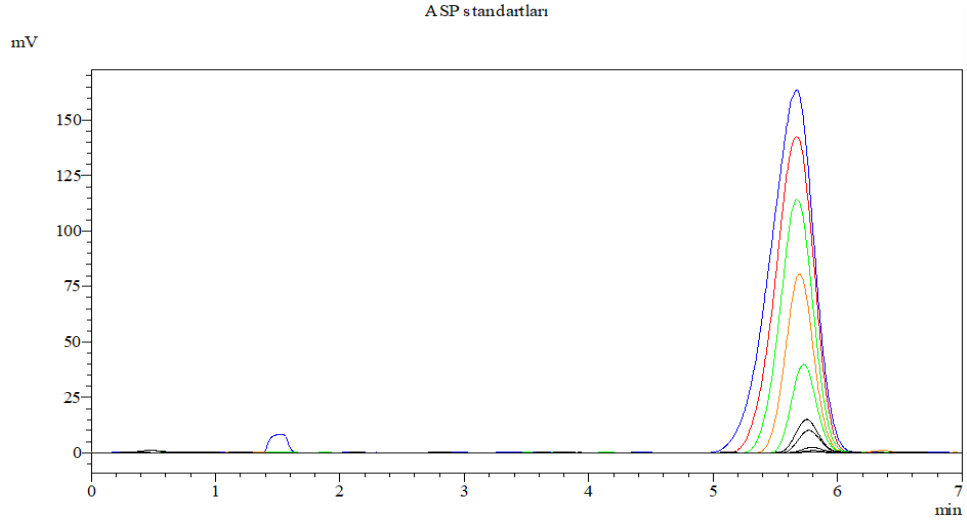
Tatlandırıcı	Miktar (µg mL ⁻¹)	Geri kazanım (%)				(%BSS)			
		1.	2.	3.	Ort.	Gün içi (n=3)			Günler arası (n=9)
						1.	2.	3.	
ASP	80	102.64	102.63	101.96	102.41	0.03	0.04	0.12	0.04
	200	102.92	102.88	102.64	102.81	0.18	0.03	0.07	0.01
	600	98.67	99.99	99.73	99.47	0.08	0.04	0.06	0.06

5.2.2. YPSK- ELSD ile yapılan seçicilik çalışmaları

Seçicilik terimi, bir YPSK işleminin analitleri birbirinden doğru şekilde ayırma kapasitesini tanımlamak için kullanılır. Herhangi bir pikin girişim yapmadığı gözlemlenmiştir. Bu durum iyi bir kromatografik ayırımın olduğunu destekler niteliktedir (Snyder vd., 1996).

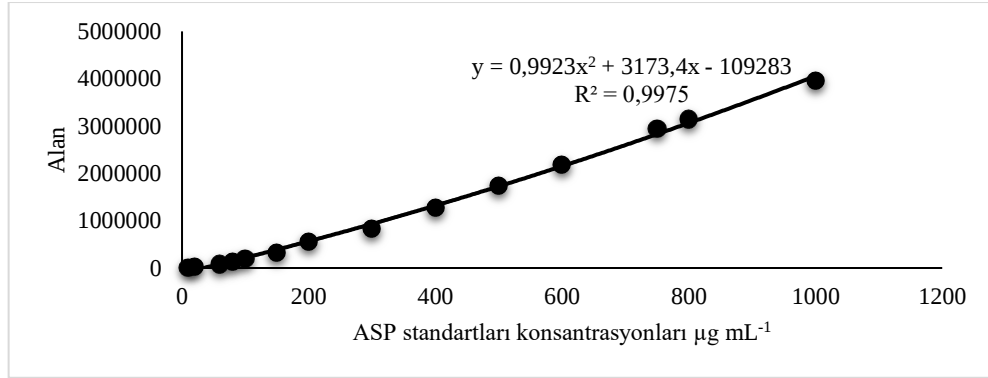
5.2.3. YPSK- ELSD ile yapılan doğrusallık, LOD, LOQ çalışmaları

Yöntemin doğrusallığı, on noktalı kalibrasyon eğrileri ile doğrulanmıştır. Üç set ASP kalibrasyon solüsyonu hazırlanmış ve her set üçer kez test edilmiştir. YPSK-ELSD ile elde edilen kromatogramları Şekil 5.7'de gösterilmiştir.

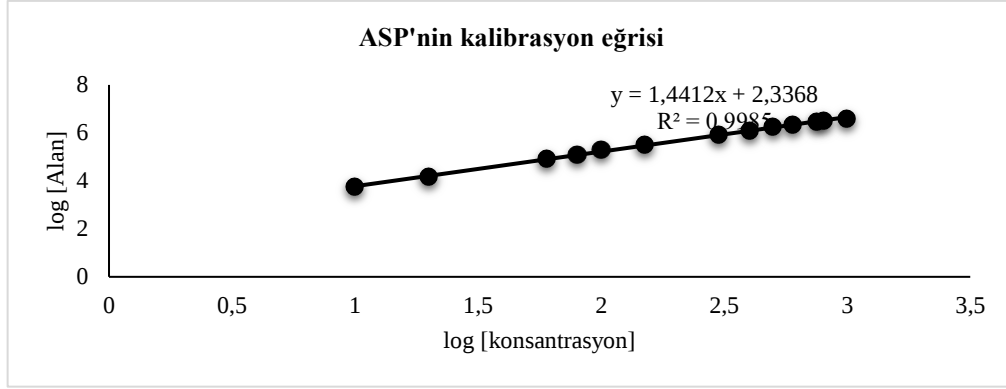


Şekil 5.7. 10-1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ derişimlerine sahip standart ASP kromatogramları

Yeni önerilen yeşil YPSK-ELSD yaklaşımı için kalibrasyon eğrisi, (Şekil 5.8) standart çözeltilerdeki ASP konsantrasyonunun logaritmasına karşı kromatogram pik alanlarının logaritmasının grafiğı çizilerek oluşturulmuştur (Şekil 5.9.) Bu, iki değişken arasında düz bir çizgi oluşturmayı mümkün kılmıştır. Regresyon denklemi ($R^2=0.9985$), ASP ile test aralıkları arasında iyi bir doğrusal ilişki olduğunu göstermiştir. Sonuçlar, ASP için doğrusal bir aralıkta doğru sonuçlar alabileceğimizi göstermiştir.



Şekil 5.8. YPSK-ELSD ile elde edilen derişim – alan grafiğı kalibrasyon eğrisi



Şekil 5.9. YPSK-ELSD ile elde edilen $\log[\text{derişim}] - \log[\text{alan}]$ grafiği kalibrasyon eğrisi

Geliştirilen yeşil HPLC-ELSD yönteminin LOD ve LOQ'su sırasıyla 3 ve 10 sinyal-gürültü oranı temel alınarak hesaplanmıştır. Elde edilen, aralık ve doğrusallık verileri Tablo 5.4'de gösterilmiştir.

Tablo 5.4. ASP için doğrusallık, LOD, LOQ, korelasyon katsayısı ve regresyon denklemi verileri

Tatlandırıcı bileşik	Doğrusal aralık ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Regresyon denklemi	R^2	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
ASP	10 - 1000	$y = 1.4412x + 2.3368$	0.9985	0.33	0.99

R^2 : determinasyon katsayısı, LOD: limit of detection, LOQ: limit of quantification

5.2.4. YPSK- ELSD ile yapılan sağlamlık çalışmaları

Geliştirilen yönteminin sağlamlığını araştırmak için akış hızında (0.9, 1.0 ve 1.1 mL dk⁻¹), kolon sıcaklığında (29, 30 ve 31°C) ve N₂ gaz basıncında bir dizi küçük değişikliklerle test edildi (340, 350 ve 360 kPa). Sağlamlık çalışmalarında 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ASP çözeltisi kullanıldı. % BSS değerleri %0,09 ile %2,90 arasında bulundu. Önemli bir değişiklik olmadığı gözlemlendi. Sağlamlık sonuçları Tablo 5.5 de gösterilmiştir.

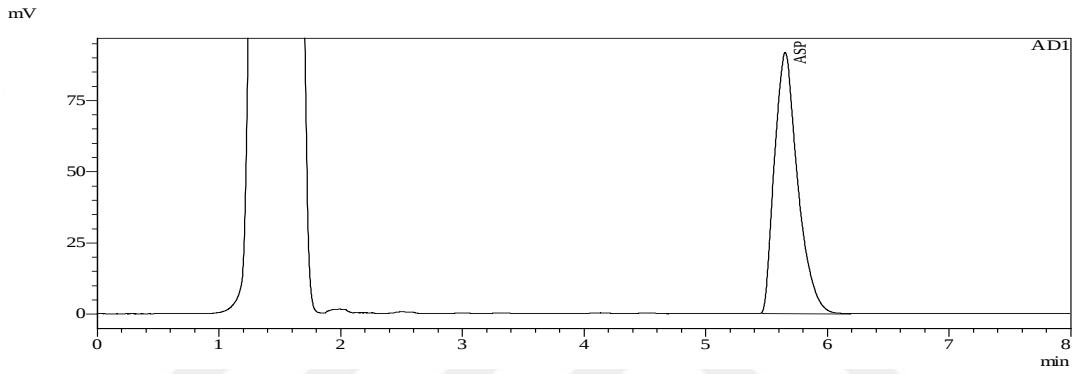
Tablo 5.5. Geliştirilen YPSK-ELSD yönteminin sağlamlık sonuçları BSS%

Tatlandırıcı	Kolon Sıcaklığı (°C)		Akış Hızı (mL dk ⁻¹)		N ₂ Basıncı (kPa)	
	29	31	0.9	1.1	340	360
ASP	0.09	0.79	1.12	2.90	1.70	0.46

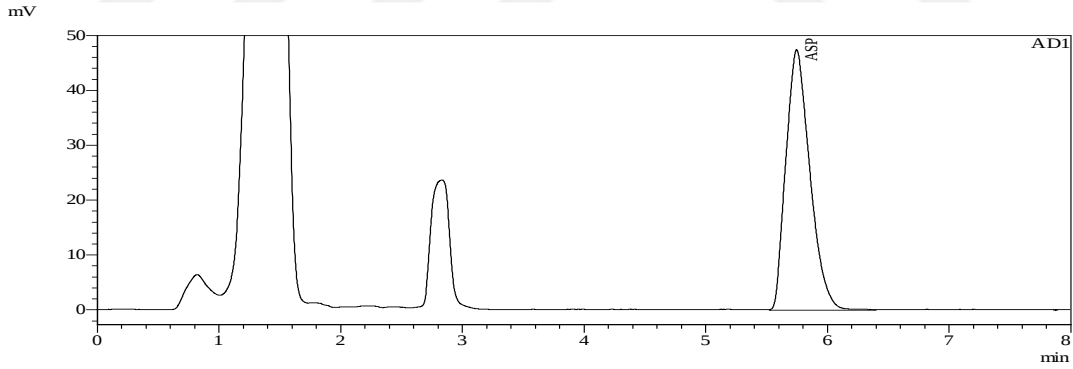
BSS: Bağıl standart sapma

5.2.5. Gıda örnekleri sonuçları

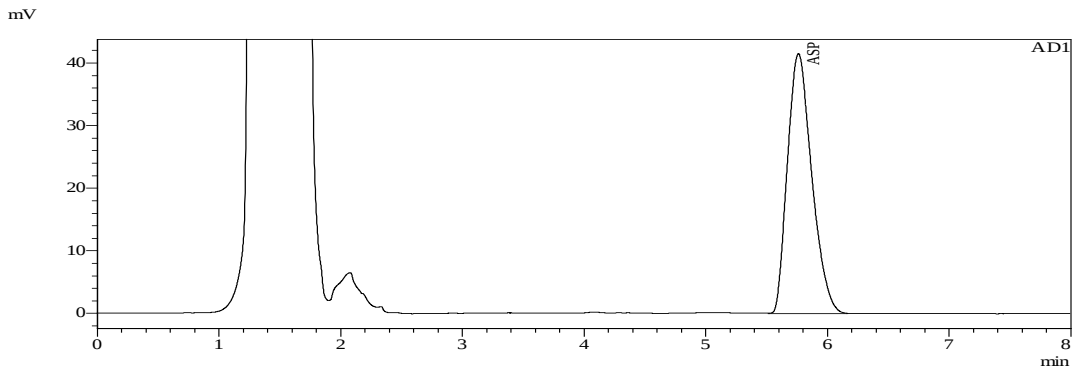
Geliştirilen ve doğrulanan yeşil, çevre dostu YPSK-ELSD yöntemi çeşitli gıda örnekleri üzerinde başarıyla uygulanmıştır. İçecek örneklerinde ASP miktarı, 87.45 ± 1.61 - 347.17 ± 1.66 mg L⁻¹ arasında bulundu. Gazlı içecekler için, ASP miktarı 102.45 ± 2.35 - 134.24 ± 1.36 mg L⁻¹, limonata örneği için 8.25 ± 1.67 - 146.45 ± 0.9 mg L⁻¹, enerji içecekleri için 209.29 ± 4.37 - 634.47 ± 3.51 mg L⁻¹, şekerleme örnekleri için 91.85 ± 1.23 - 2424.02 ± 1.53 mg L⁻¹ olarak bulundu. Dikkat çekici bir sonuç olarak, bir limonata içeceğinde, etiketinde ASP içeriği belirtilmesine rağmen ASP tespit edilmedi. Elde edilen kromatogramlar Şekil 5.10 ila Şekil 5.24 arasında gösterilmiştir



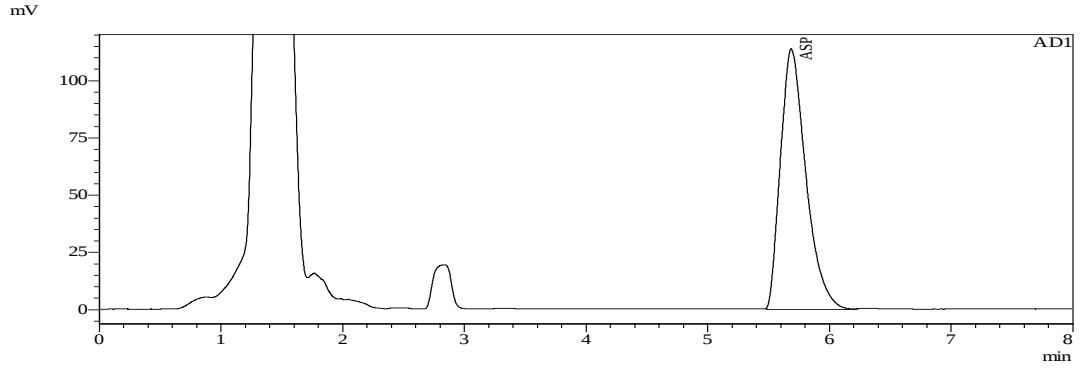
Şekil 5.10. YPSK-ELSD ile elde edilen içecek 1 örnek kromatogramı



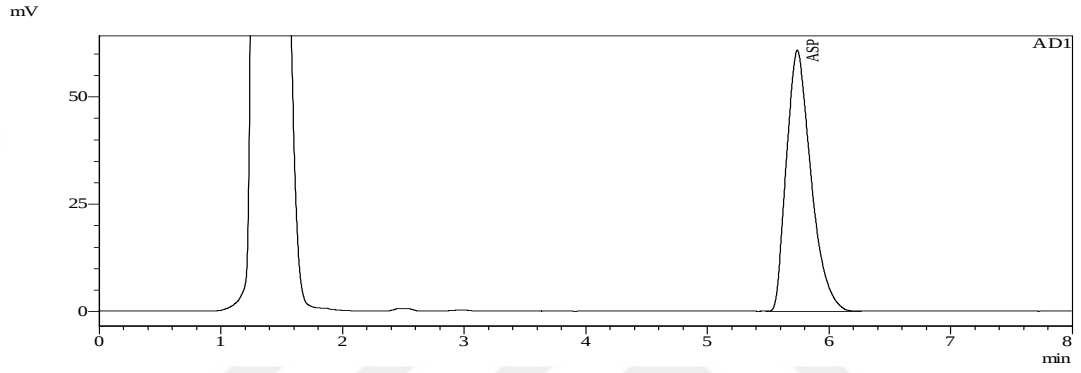
Şekil 5.11. YPSK-ELSD ile elde edilen içecek 2 örnek kromatogramı



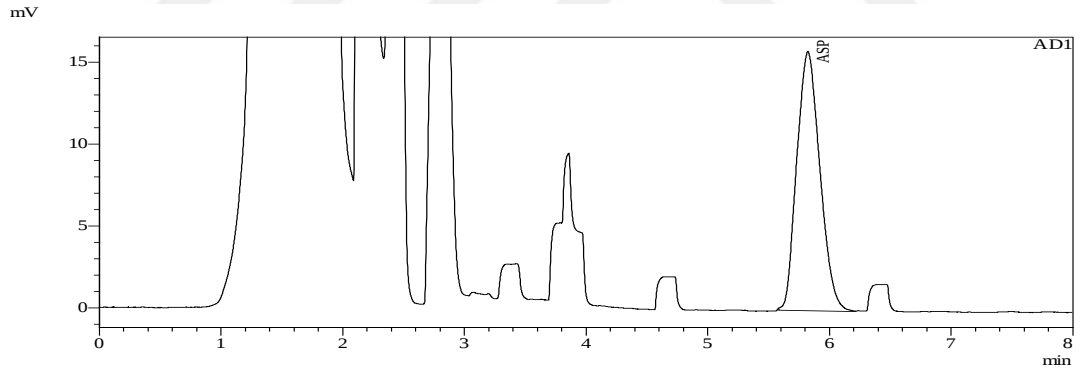
Şekil 5.12. YPSK-ELSD ile elde edilen içecek 3 örnek kromatogramı



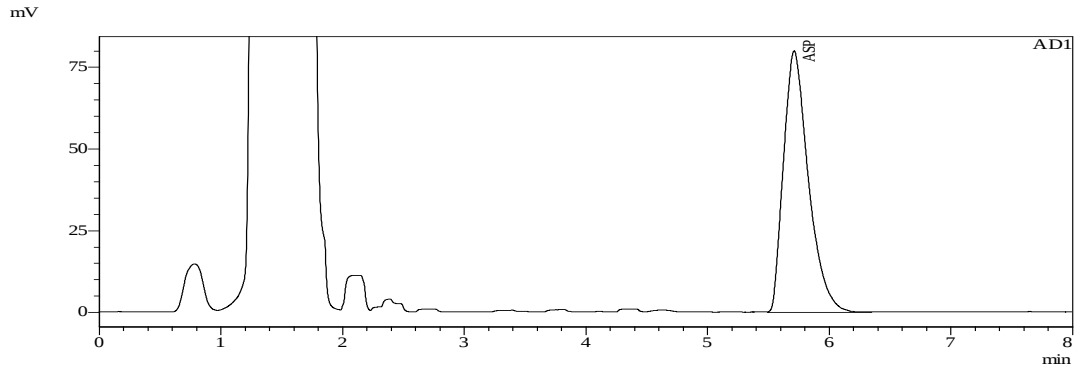
Şekil 5.13. YPSK-ELSD ile elde edilen içecek 4 örnek kromatogramı



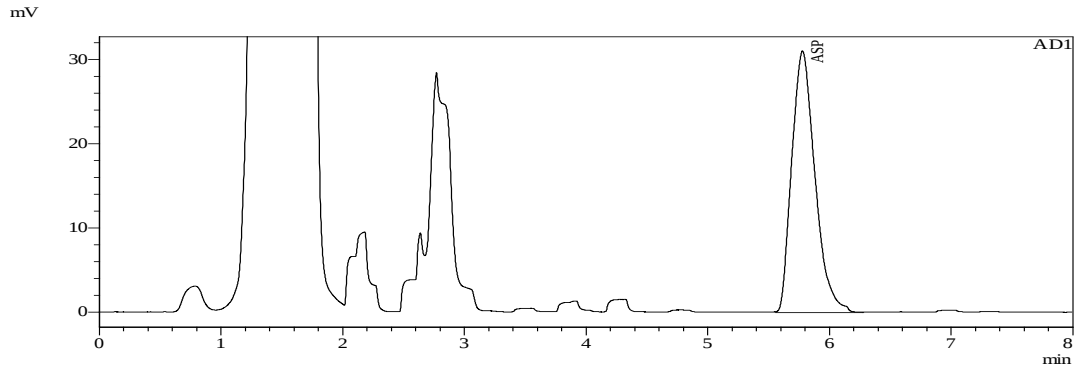
Şekil 5.14. YPSK-ELSD ile elde edilen içecek 5 örnek kromatogramı



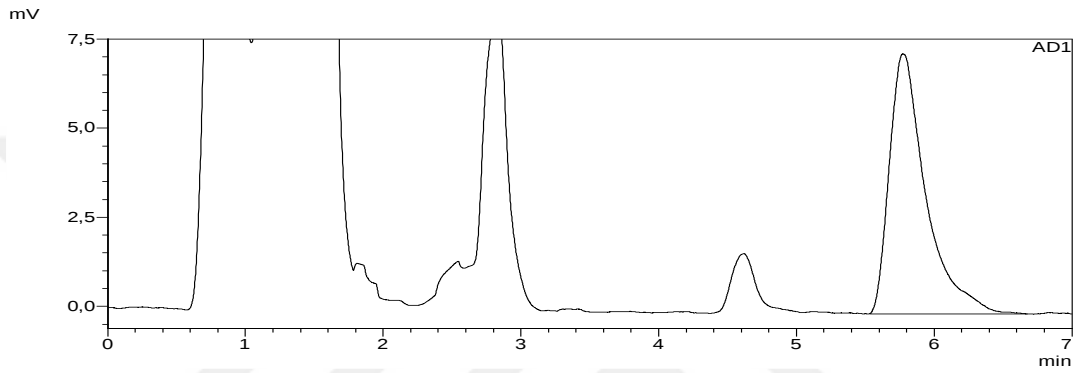
Şekil 5.15. YPSK-ELSD ile elde edilen içecek 6 örnek kromatogramı



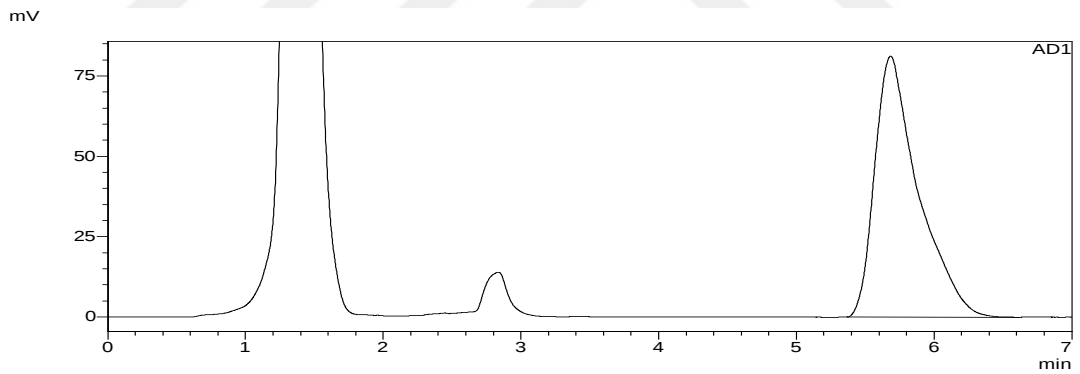
Şekil 5.16. YPSK-ELSD ile elde edilen içecek 7 örnek kromatogramı



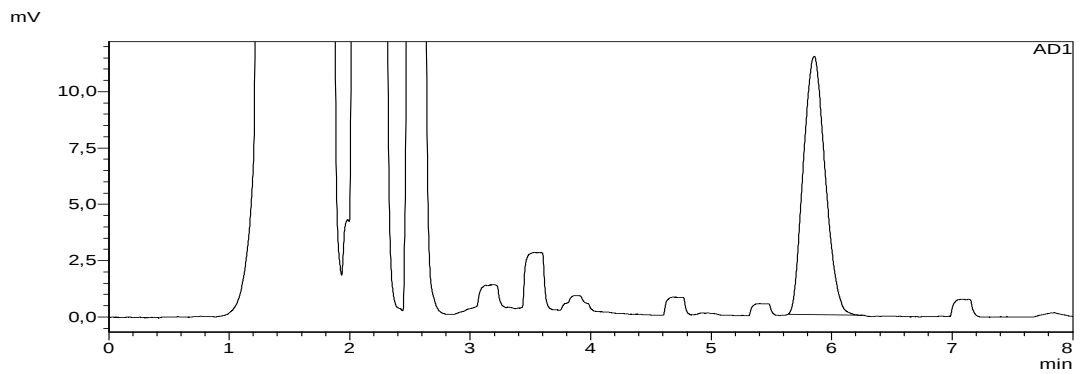
Şekil 5.17. YPSK-ELSD ile elde edilen içecek 8 örnek kromatogramı



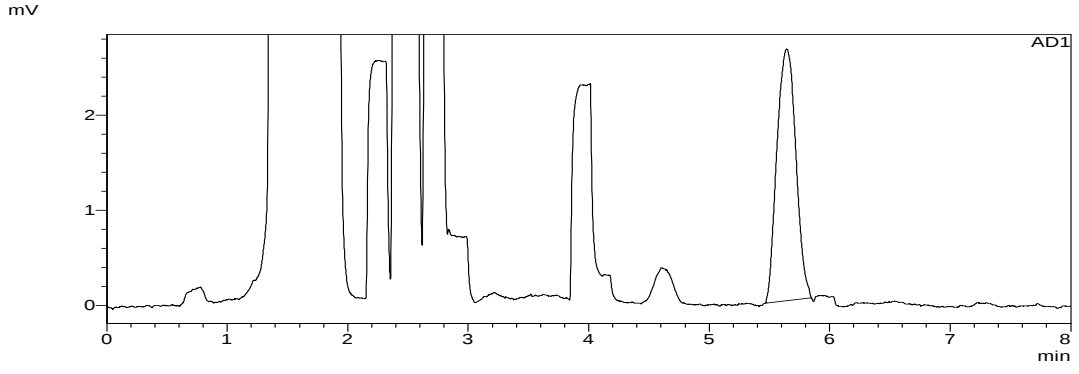
Şekil 5.18. YPSK-ELSD ile elde edilen içecek 9 örnek kromatogramı



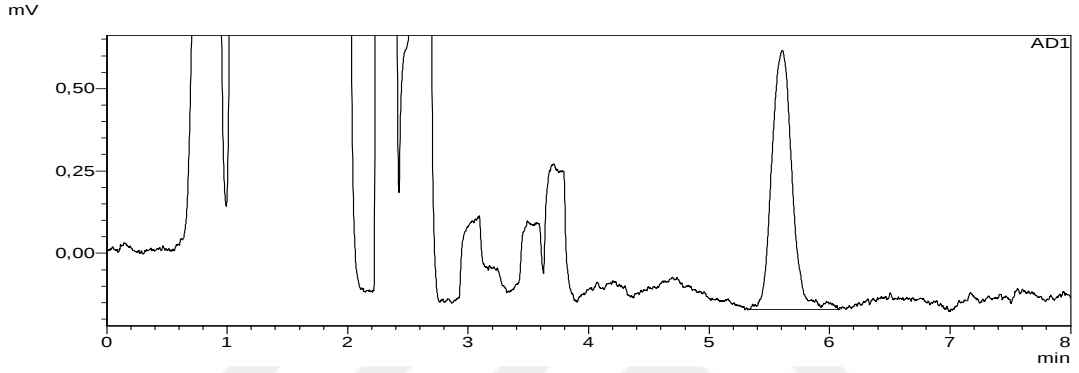
Şekil 5.19. YPSK-ELSD ile elde edilen içecek 10 örnek kromatogramı



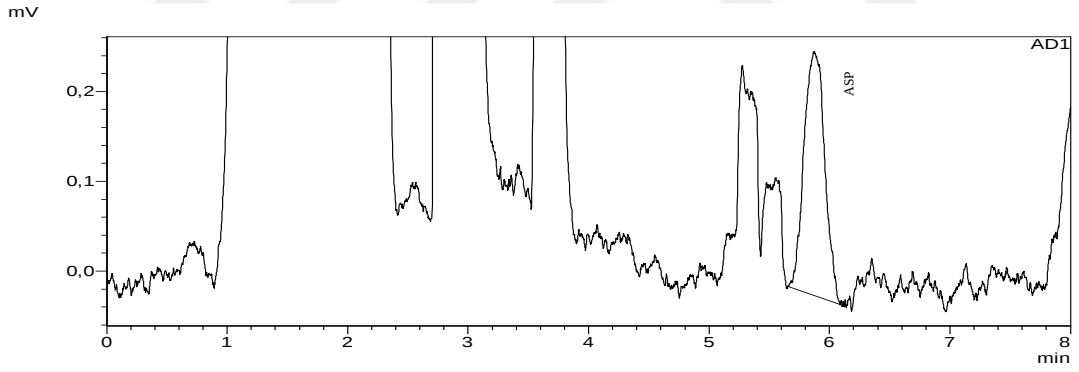
Şekil 5.20. YPSK-ELSD ile elde edilen içecek 11 örnek kromatogramı



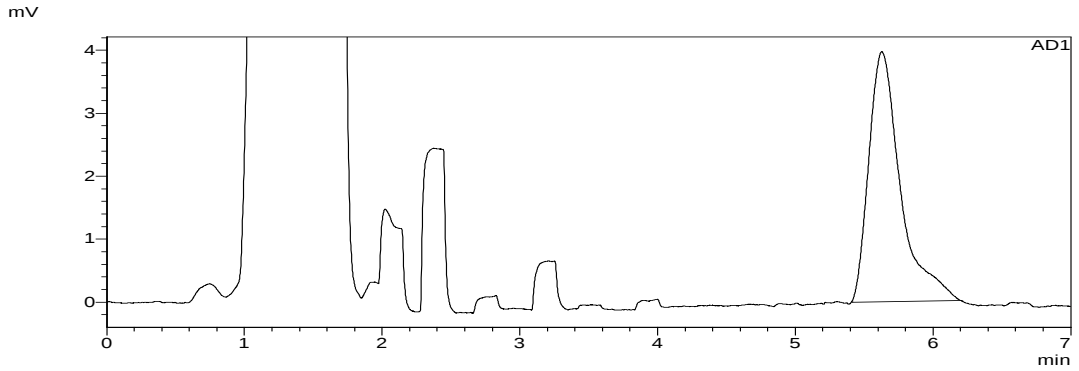
Şekil 5.21. YPSK-ELSD ile elde edilen şekerleme 1 örnek kromatogramı



Şekil 5.22. YPSK-ELSD ile elde edilen şekerleme 2 örnek kromatogramı



Şekil 5.23. YPSK-ELSD ile elde edilen şekerleme 3 örnek kromatogramı



Şekil 5.24. YPSK-ELSD ile elde edilen reçel örnek kromatogramı

ASP içeren içecek örneklerinin miktarları Tablo 5.6.'da gösterilmektedir.

Tablo 5.6. *İçecek ve şekerlemelerin içerdikleri ASP miktarları*

Örnek no	Örnek adı	ASP içeriği [$\mu\text{g mL}^{-1} \pm \text{SS } (n=3)$]
1	İçecek 1	256.5 $\pm$ 0.6
2	İçecek 2	236.3 $\pm$ 0.6
3	İçecek 3	485.4 $\pm$ 5.3
4	İçecek 4	384.3 $\pm$ 2.2
5	İçecek 5	312.5 $\pm$ 1.3
6	İçecek 6	90.5 $\pm$ 0.4
7	İçecek 7	86.0 $\pm$ 0.3
8	İçecek 8	518.8 $\pm$ 1.5
9	İçecek 9	429.8 $\pm$ 1.5
10	İçecek 10	124.2 $\pm$ 1.3
11	İçecek 11	189.7 $\pm$ 1.0
12	İçecek 12	115.0 $\pm$ 2.0
13	İçecek 13	188.6 $\pm$ 1.2
14	Limonata 1	376.7 $\pm$ 3.1
15	Limonata 2	T.E
16	Şeker	11.19 $\pm$ 2.4
17	Şeker	14.73 $\pm$ 0.2
18	Şeker	8.1 $\pm$ 2.7
19	Şeker	65.8 $\pm$ 1.9
20	Reçel	17.09 $\pm$ 2.2

6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Son dönemlerde, gıda endüstrisinin gelişimiyle birlikte tüketim miktarı büyük ölçüde artış göstermiştir. Bu artan gıda tüketiminin doğurduğu çeşitli sağlık sorunları ise yapay tatlandırıcı kullanımının da yaygınlaşmasına yol açmıştır. Bu nedenle, yapay tatlandırıcıların güvenliği konusunda güvenilir bilgilere ulaşmak son derece önem arz etmektedir.

ASP, en sık kullanılan yapay tatlandırıcılardan biri olup, çeşitli gıda ürünlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. ASP'nin analizinde ise YPSK yöntemi en sık tercih edilen yöntemlerden biridir.

Rutin YPSK analizlerinde zararlı ve toksik çözücülerin azaltılması önem kazanmaktadır, çünkü çoğu kimyasal çözücü çevre için oldukça zararlıdır. YPSK uygulamalarında su, EtOH gibi daha çevre dostu çözücülerin kullanılması önemli bir kavram karşımıza çıkmaktadır.

Bu çalışmada yerel marketlerde satılan çeşitli içecek ve şekerleme örneklerinde ASP'nin belirlenmesi için yeşil, sağlam, basit ve çevre dostu bir YPSK-ELSD yöntemi geliştirilmiştir ve bu yöntem valide edilmiştir. Geliştirilen ve valide edilen YPSK-ELSD yöntemi karbonatlı içecekler, enerji içeceği, tonik ve limonata dahil olmak üzere 15 içecek örneği ve 5 adet şekerleme üzerinde başarıyla uygulanmıştır. Literatürdeki diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında, bu yöntem sınırlı sayıda ELSD çalışmasına iyi bir yeşil alternatif olarak görülebilir. Ayrıca, sunulan yöntem, içecek örneklerinde ASP'nin rutin analizi için verimli bir şekilde uygulanabileceğini göstermiştir.

KAYNAKÇA

- Anastas, P. T., and Warner, J. C. (1998). Green chemistry. *Frontiers*, 640, 1998.
- Arora, S., Shendurse, A. M., Sharma, V., Wadhwa, B. K., and Singh, A. K. (2013). Assessment of stability of binary sweetener blend (aspartame x acesulfame-K) during storage in whey lemon beverage. *Journal of food science and technology*, 50, 770-776.
- Capello, C., Fischer, U., and Hungerbühler, K. (2007). What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chemistry*, 9(9), 927-934.
- Carocho, M., Morales, P., and Ferreira, I. C. (2017). XXI. yüzyılda gıda katkı maddesi olarak tatlandırıcılar: Bilinenlerin ve gelecek olanların gözden geçirilmesi. *Food and Chemical Toxicology*, 107, 302-317.
- Fernandes, V. N. O., Fernandes, L. B., Vasconcellos, J. P., Jager, A. V., Tonin, F. G., and de Oliveira, M. A. L. (2013). Simultaneous analysis of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K by CZE under UV detection. *Analytical Methods*, 5(6), 1524-1532.
- Grembecka, M., Baran, P., Błażewicz, A., Fijałek, Z., and Szefer, P. (2014). Simultaneous determination of aspartame, acesulfame-K, saccharin, citric acid and sodium benzoate in various food products using HPLC–CAD–UV/DAD. *European Food Research and Technology*, 238, 357-365.
- Hsien, T. J., and Chen, S. (2007). A facile HPLC method for optical purity and quantitative measurements of phenylalanine from the hydrolyzed aspartame under different pH and temperature after its derivatization with a fluorescent reagent. *Amino acids*, 33(1), 123-128.
- Ibrahim, F. A., Elmansi, H., and Fathy, M. E. (2019). Green RP-HPLC method for simultaneous determination of moxifloxacin combinations: investigation of the greenness for the proposed method. *Microchemical Journal*, 148, 151-161.
- ICH Steering Committee. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). Harmonised Tripartite Guideline.
- Küçükkaraca Yıldırım, D. (2014). *Gıda katkı maddelerinin HPLC ile analizi ve validasyonu*. (Doktora tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi).
- Lee, Y., Do, B., Lee, G., Lim, H. S., Yun, S. S., and Kwon, H. (2017). Simultaneous determination of sodium saccharin, aspartame, acesulfame-K and sucralose in

- food consumed in Korea using high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detection. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 34(5), 666-677.
- Li, D., Zheng, Q., Thomas, K. V., Dang, A. K., Binh, V. N., Anh, N. T. K., and Thai, P. K. (2023). Use of artificial sweeteners and caffeine in a population of Hanoi: An assessment by wastewater-based epidemiology. *Science of The Total Environment*, 161515.
- Lim, H. S., Park, S. K., Kwak, I. S., Kim, H. I., Sung, J. H., Jang, S. J., ... and Kim, S. H. (2013). HPLC-MS/MS analysis of 9 artificial sweeteners in imported foods. *Food Science and Biotechnology*, 22, 233-240.
- Liu, C. C., Ko, C. H., Wang, Y. N., Fu, L. M., and Lee, S. Z. (2021). Rapid detection of artificial sweeteners in food using microfluidic chromatography detection system. *Chemical Engineering Journal*, 425, 131528.
- Liu, T., Jiang, Z. T., Li, R., and Tan, J. (2014). Simultaneous determination of cyclamate, acesulfame, and aspartame in beverages by titania-based RP-HPLC. *Food analytical methods*, 7, 1400-1406.
- Mansour, N. M., El-Sherbiny, D. T., Ibrahim, F. A., and El Subbagh, H. I. (2021). Development of an Inexpensive, sensitive and green HPLC method for the simultaneous determination of brivaracetam, piracetam and carbamazepine; application to pharmaceuticals and human plasma. *Microchemical Journal*, 163, 105863.
- Ordoñez, E. Y., Rodil, R., Quintana, J. B., and Cela, R. (2015). Determination of artificial sweeteners in beverages with green mobile phases and high temperature liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food chemistry*, 169, 162-168.
- Serdar, M., and Knežević, 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
- Sezgin, B. (2016). *İşlenmiş Gıdaların Lezzetini Değiştirmek İçin Kullanılan Bazı Katkı Maddelerinin Eşzamanlı Analizi İşlenmiş Gıdaların Lezzetini Değiştirmek İçin Kullanılan Bazı Katkı Maddelerinin Eşzamanlı Analizi* (Doctoral dissertation, Anadolu Üniversitesi (Türkiye)).
- Silva, P. D., Cruz, R., and Casal, S. (2021). Sugars and artificial sweeteners in soft drinks: a decade of evolution in Portugal. *Food Control*, 120, 107481.

- Shanmugavelan, P., Kim, S. Y., Kim, J. B., Kim, H. W., Cho, S. M., Kim, S. N., ... and Kim, H. R. (2013). Evaluation of sugar content and composition in commonly consumed Korean vegetables, fruits, cereals, seed plants, and leaves by HPLC-ELSD. *Carbohydrate Research*, 380, 112-117.
- Soyseven, M. (2018). *Gıda katkı maddesi olarak kullanılan monosodyum glutamatın çeşitli gıda maddelerinin içindeki miktarının tayini* (Doctoral dissertation, Anadolu University (Turkey)).
- Soyseven, M., Sezgin, B. and Arli, G. (2022). A novel, rapid and robust HPLC-ELSD method for simultaneous determination of fructose, glucose and sucrose in various food samples: Method development and validation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 107, 104400.
- Sun, J. P., Han, Q., Zhang, X. Q., and Ding, M. Y. (2014). Investigations on the degradation of aspartame using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Chinese Chemical Letters*, 25(9), 1259-1264.
- Tran, N. H., Hu, J., and Ong, S. L. (2013). Simultaneous determination of PPCPs, EDCs, and artificial sweeteners in environmental water samples using a single-step SPE coupled with HPLC–MS/MS and isotope dilution. *Talanta*, 113, 82-92.
- Tsang, W. S., Clarke, M. A., and Parrish, F. W. (1985). Determination of aspartame and its breakdown products in soft drinks by reverse-phase chromatography with UV detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(4), 734-738.
- Wang, W., Wang, Y., Chen, F., and Zheng, F. (2021). Comparison of determination of sugar-PMP derivatives by two different stationary phases and two HPLC detectors: C18 vs. amide columns and DAD vs. ELSD. *Journal of Food Composition and Analysis*, 96, 103715.
- Yabré, M., Ferey, L., Somé, T. I., Sivadier, G., and Gaudin, K. (2020). Development of a green HPLC method for the analysis of artesunate and amodiaquine impurities using Quality by Design. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 190, 113507.
- Žiak, L. U., Májek, P., Hroboňová, K., Čacho, F., and Sádecká, J. (2014). Simultaneous determination of caffeine, caramel and riboflavin in cola-type and energy drinks by synchronous fluorescence technique coupled with partial least squares. *Food chemistry*, 159, 282-286.

Zygler, A., Wasik, A., Kot-Wasik, A., and Namieśnik, 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, 2159-2172.

İnternet kaynakları

<http://www.shimadzu.com>. (Erişim tarihi: 2018). Principles and practical applications of Shimadzu's ELSD- LT– II evaporative light scattering detector, Technical Report. Vol 6.



ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Ebrar Acar

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

Eğitim:

- Yüksek Lisans : 2023, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı.
- Lisans : 2019, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Kimya Öğretmenliği.
- Lise : 2014, Büyükçekmece Çakmaklı Cumhuriyet Anadolu Lisesi.
- İlk ve Orta Öğretim: 2010, Ergenekon İlköğretim Okulu.

Mesleki Geçmiş:

- 2019, Kimya Öğretmeni, Bahçeşehir Atatürk Anadolu Lisesi
- 2020, Kimya Öğretmeni, Halil Akkanat Çok Programlı Anadolu Lisesi

Yayınları ve Bilimsel Faaliyetleri:

- Soyseven, M., Sezgin, B., Acar, E. and Arli, G. (2023). Green, Rapid, Robust Determination of Aspartame in Various Beverages by High Performance Liquid Chromatography-Evaporative Light Scattering Detection (HPLC-ELSD): Method Development and Validation. *Analytical Letters*, 56 (11), 1773-1783.