



**YPSK İLE ASPARTAM İÇEREN
FARMASÖTİK PREPARATLARDAKİ
ASPARTAM MİKTARININ TAYİNİ
Yüksek Lisans**

Ekin AYDIN

**YPSK İLE ASPARTAM İÇEREN FARMASÖTİK PREPARATLARDAKİ
ASPARTAM MİKTARININ TAYİNİ**

Ekin AYDIN

YÜKSEK LİSANS

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Göksel ARLI

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Murat SOYSEVEN

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Temmuz 2023**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ekin AYDIN'ın “YPSK ile Aspartam İçeren Farmasötik Preparatlardaki Aspartam Miktarının Tayini” başlıklı tezi 28/07/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, Analitik Kimya Anabilim dalında Yüksek Lisans 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. Saime ÖNCE

Enstitü Müdürü

ÖZET

YPSK İLE ASPARTAM İÇEREN FARMASÖTİK PREPARATLARDAKİ ASPARTAM MİKTARININ TAYİNİ

Ekin AYDIN

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temmuz 2023

Danışman: Prof. Dr. Göksel ARLI

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

Aspartam çok yaygın bir şekilde kullanılan yapay bir tatlandırıcıdır. Bu çalışmada, çeşitli sıvı ve tablet numuneleri içerisinde bulunan aspartamın tayini için hızlı, ucuz, hassas, sağlam ve tekralanabilir YPSK-ELSD yöntemi geliştirilmiş ve doğrulanmıştır. Kromatografik ayırım izokratik olarak gerçekleştirilmiş olup C18 (4.6 x 150mm, 3.5 µm) özelliklerine sahip kolon kullanılmıştır. Mobil fazın bileşimi (Su: ACN):(80:20, v/v) oranlarına sahip organik karışımdan oluşmaktadır ve yöntemin akış hızı 1,00 mL dk⁻¹ olarak uygulanmıştır. ELSD sıcaklığı 50 °C'ye ayarlanmıştır. Kolon fırını sıcaklığı 30 °C ve enjeksiyon hacmi 10 µL olarak belirlenmiştir. YPSK-ELSD sisteminde Gain değeri: 7, Filtre değeri: 10 olarak ayarlanmıştır. Geliştirilen YPSK-ELSD yönteminde sırasıyla 0.69 ve 2.28 µg mL⁻¹ LOD ve LOQ değerleri olarak hesaplanmıştır. Geri kazanım değerlerinin %86.04 - %110.58 aralığında olduğu belirlenmiştir. Uygulanan YPSK-ELSD yönteminin %BSS değeri %1'in altında olduğu belirlenmiştir. ASP'nin alıkonma süresi 3.5 olarak raporlanmıştır. YPSK-ELSD yönteminde Analiz süresi 6 dk olarak belirlenmiştir. ELSD'de N₂ gaz basıncı 350 kPa'ya ayarlanmıştır. Bu çalışmada geliştirilen ve valide edilen YPSK-ELSD yönteminin rutin ASP tayinlerinde kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Aspartam, YPSK, Buharlaştırıcı Işık Saçılım Dedektörü (ELSD), Tablet

ABSTRACT

DETERMINATION OF ASPARTAM IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS CONTAINING ASPARTAM USING HPLC

Ekin AYDIN

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

Supervisor: Prof. Dr. Göksel ARLI

(Co-Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Murat SOYSEVEN)

Aspartame is a widely used artificial sweetener. In this study, a fast, inexpensive, sensitive, robust and reproducible YPSK-ELSD method was developed and validated for the determination of aspartame in various liquid and tablet samples. Chromatographic separation was performed isocratically and a column with C18 (4.6 x 150mm, 3.5 μ m) characteristics was used. The composition of the mobile phase consists of (Water: ACN):(80:20, v/v) organic mixture and the flow rate of the method was applied as 1.00 mL min⁻¹. The ELSD temperature is set to 50 °C. Column furnace temperature was determined as 30 °C and injection volume was determined as 10 μ L. In the YPSK-ELSD system, the Gain value is set to 7, the Filter value is set to 10. In the developed YPSK-ELSD method, LOD and LOQ values of 0.69 ve 2.28 μ g mL⁻¹ were obtained, respectively, and the recovery values were determined to be in the range of 86.04% - 110.58%. It was determined that the %BSS value of the applied YPSK-ELSD method was below 1%. The retention time of ASP was reported as 3.5. Analysis time was determined as 6 minutes in the YPSK-ELSD method. In ELSD, the N2 gas pressure is set to 350 kPa. It shows that the YPSK-ELSD method developed and validated in this study can be used in routine ASP determination.

Keywords: Aspartame, HPLC, Evaporative Light Scattering Detector (ELSD), Tablets

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sürecinde gösterdiği sabır, anlayış ve katkılarıyla birlikte beni yönlendiren çalışma hayatımda, tamamlamış olduğum bu yüksek lisans eğitimi ve tezimin her aşamasında bana destek olmuş olan ve her zaman örnek alacağım danışman hocam **Prof. Dr. Göksel ARLI**'ya,

Laboratuvarımda bana her imkânı sağlayan, eğitim hayatımdaki en büyük şansım olan yanında çalışmaktan çok mutlu olduğum, bilgisini ve sabrını benden esirgemeyen danışman hocam **Dr. Öğr. Üyesi Murat Soyseven**'e,

Her zaman sevgi ve güvenlerini hissettiğim, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen çalışmalarım sürecinde her zaman bana moral veren canım aileme,

Eğitimimin bu aşamasında bana sağladıkları değerli bilgi ve deneyimler sayesinde, kendimi daha da geliştirmeme ve hedeflerime ulaşma yolunda önemli adımlar atmama neden olan beni yüksek lisans programı boyunca destekleyen ve rehberlik eden tüm Analitik kimya akademik kadrosuna da teşekkür ederim.

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.

Ekin AYDIN

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
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. YAPAY TATLANDIRICILAR HAKKINDA GENEL BİLGİLER	3
2.1. ASP'ın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	4
2.1.1. ASP Tayini ile İlgili Literatürde Bulunan Bazı Çalışmalar	5
3. YÖNTEMLER	10
3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) ve Kullanılan Dedektörler.....	10
3.2. Buharlaştırıcı Işık Saçılım Dedektörü (ELSD)	10
4. MATERYAL VE METOT.....	11
4.1. Çalışma Kapsamında Kullanılan Kimyasal Malzemeler	11
4.2. Çalışma Kapsamında Kullanılan Cihazlar	11
4.3.Yöntem.....	12
4.3.1. YPSK-ELSD ile ASP tayini.....	12
4.3.1.1. Standart çözeltilerin hazırlanması.....	12
4.3.1.2. Mobil fazın hazırlanması.....	13
4.3.1.2. Numunelerin hazırlanması	13

4.3.2. YPSK-ELSD ile Tabletlerde bulunan ASP Tayin Yöntemi	
Geliştirilmesi.....	13
4.3.2.1. <i>Sistem uygunluk testleri (SUT)</i>	13
4.3.2.2. <i>Validasyon</i>	14
4.3.2.3. <i>Doğruluk</i>	14
4.3.2.4. <i>Kesinlik</i>	15
4.3.2.5. <i>Seçicilik</i>	15
4.3.2.6. <i>Doğrusallık</i>	15
4.3.2.7. <i>Tespit limiti ve tayin limiti (LOD ve LOQ)</i>	15
4.3.2.8. <i>Sağlamlık</i>	15
5. BULGULAR ve SONUÇLAR.....	16
5.1. YPSK-ELSD ile yapılan SUT çalışmaları.....	16
5.2.Sistem uygunluk testleri	19
5.2.1 Doğruluk ve kesinlik çalışmaları.....	20
5.2.2. Seçicilik çalışmaları	21
5.2.3. Doğrusallık, LOD ve LOQ	22
5.2.4.Sağlamlık çalışmaları	25
5.2.5. Numune sonuçları	25
6.SONUÇ VE TARTIŞMA	28
KAYNAKÇA	29
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	33

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Tatlandırıcıların incelenen verileri ve fizikokimyasal özellikleri	4
Tablo 3.1. YPSK da kullanılan dedektör tipleri	10
Tablo 4.1. YPSK-ELSD çalışmalarında kullanılan malzemeler listesi.....	11
Tablo 4.2. Çalışmalarda kullanılan malzemeler listesi	12
Tablo 4.3. SUT testleri için kullanılan parametreler ve formülleri.....	13
Tablo 5.1. Uygulanan YPSK-ELSD koşulları	19
Tablo 5.2. YPSK-ELSD kullanılarak yapılan 600 µg mL ⁻¹ ASP çözeltisi için elde edilen SUT sonuçları (n=5)	20
Tablo 5.3. Uygulanan YPSK-ELSD yönteminin doğruluk ve kesinlik sonuçları... ..	21
Tablo 5.4. YPSK-ELSD ile elde edilen kromatografik alan veri tablosu	22
Tablo 5.5. ASP için doğrusallık, LOD, LOQ, korelasyon katsayısı ve regresyon denklemleri verileri.....	25
Tablo 5.6. Geliştirilen YPSK-ELSD yönteminin sağlamlık sonuçları.....	25
Tablo 5.7. İncelenen numunelerin içerdikleri ASP miktarları	27

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Aspartamın molekül yapısı	4
Şekil 5.1. Mobil faz (%75:%25) (Su:ACN), Akış hızı 1ml dk ⁻¹ , Basınç:350 kPa, Gain: 7 Filter:10 ELSD sıcaklığı:50 °C koşullarında elde edilen ASP kromatogramı	17
Şekil 5.2. Mobil faz (%90:%10) (Su:ACN), Akış hızı 1ml dk ⁻¹ , Basınç:300 kPa, Gain: 5 Filter:10 ELSD sıcaklığı:50 °C koşullarında elde edilen ASP kromatogramı	17
Şekil 5.3. Mobil faz (%85:%15) (Su:ACN), Akış hızı 1ml dk ⁻¹ , Basınç:350 kPa, Gain: 7 Filter:10 ELSD sıcaklığı:50 °C koşullarında elde edilen ASP kromatogramı	18
Şekil 5.4. Mobil faz (%90:%10) (Su:ACN), Akış hızı 1ml dk ⁻¹ , Basınç:350 kPa, Gain: 5 Filter:10 ELSD sıcaklığı:40 °C koşullarında elde edilen ASP kromatogramı	18
Şekil 5.5. Optimize edilmiş koşullar altında YPSK-ELSD ile elde edilen ASP kromatogramı.....	19
Şekil 5.6. Gün içi-Günler arası elde edilen ASP kromatogramları.....	21
Şekil 5.7. YPSK-ELSD ile elde edilen 20-1000 µg mL ⁻¹ derişimlerine sahip standart ASP kromatogramları.....	23
Şekil 5.8. YPSK-ELSD ile elde edilen derişim – kromatografik alan eğrisi.....	24

Şekil 5.9. YPSK-ELSD ile elde edilen $\log[\text{derişim}] - \log[\text{kromatografik alan}]$ eğrisi.....24

Şekil 5.10. YPSK-ELSD ile elde edilen gargara örnek kromatogramı.....26

Şekil 5.11. YPSK-ELSD ile elde edilen Tablet 1 örnek kromatogramı.....26

Şekil 5.12. YPSK-ELSD ile elde edilen Tablet 2 örnek kromatogramı.....26



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACN	: Asetonitril
ALI	: Alitam
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 Dihidrokalbon
NEO	: Neotam
SCL	: Sükraloz
SUT	: Sistem Uygunluk Testleri
UV	: Ultraviyole
MeOH	: Metanol
ACE-K	: Asesulfam Potasyum
n	: Deney Sayısı
N ₂	: Nitrojen Gazı
YPSK	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Son yıllarda gıda ve ilaç sektöründeki ilerlemelerle birlikte, yapay tatlandırıcıların kullanımı büyük ölçüde artmıştır (Sezgin, 2016). Yapay tatlandırıcılar, şeker ihtiyacını karşılamak için sıkça kullanılan ve genellikle şekerin yerine geçen maddelerdir. Bu tatlandırıcılar, düşük kalorili veya kalorisiz oldukları için vücut ağırlığının ve insülin düzeyinin korunmasında önemli bir rol oynarlar. İnsan vücudu yapay tatlandırıcıları sindiremez ve bu tatlandırıcılar gıdalarda çok düşük miktarlarda bulunur, bu nedenle enerji kaynağı olarak kullanılamazlar. Aspartam (ASP) (N- (L- α -aspartil)-L-fenilalanin, 1-metil ester), yapay tatlandırıcılar arasında en yaygın kullanılanlardan biridir. (Lim vd., 2013; Küçükkaraca, 2014). ASP, basit şekerin 180 ila 200 katı kadar tatlıdır ve daha ekonomik bir seçenektir. Bu nedenle yapay tatlandırıcılar, yüksek tatlılıkta olmalarına rağmen besleyici değillerdir Sun vd.,2014; Liu vd.,2014).

ASP (L-alfa-aspartil-L-fenilalanin metil ester), çok çeşitli düşük kalorili yiyecekleri tatlandırmak ve düşük kalorili masa üstü tatlandırıcılar dahil kalorili yiyecek ve içecekleri azaltmak için kullanılan düşük kalorili bir tatlandırıcıdır. Sindirim üzerine ASP, daha sonra kana emilen ve normal vücut süreçlerinde kullanılan üç bileşene (aspartik asit, fenilalanin ve metanol (MeOH)) ayrılır. Ne ASP ne de bileşenleri vücutta birikmez. Bu bileşenler vücutta yaygın gıdalardan elde edildikleri zamanki gibi kullanılırlar. Butchko ve diğerleri 2002; Magnuson ve diğerleri. 2007).

Tüketiciler için, gıdaların içerdikleri maddelerin insan sağlığı üzerindeki etkileri önemlidir ve bu nedenle tatlandırıcılar gibi gıda katkı maddelerinin güvenliği konusunda bazı insanlar endişe duymaktadır. (Grembecka vd., 2014).

Tatlandırıcı tüketimi, diyabet gibi çeşitli sağlık sorunlarına sahip olan insanlar arasında artmaktadır. Bu nedenle, günlük olarak alınması gereken doz miktarını belirlemek için gıda ve farmasötik ürünlerdeki tatlandırıcı miktarlarının belirlenmesi önemlidir. ASP tek başına güvenilir olsa da çeşitli pH ve sıcaklıklar gibi çevresel etkenler, ASP'nin stabilitesini bozabilir ve dolayısıyla zararlı hale getirebilir. Bu nedenle, ASP'nin tayini için hassas, hızlı, güvenilir, basit ve ucuz bir yöntem geliştirmek önem arz etmektedir.

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 Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK), yapay tatlandırıcıların tayininde en verimli yöntem olarak kabul edilmiştir (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.

Buharlaştırıcı ışık saçılım dedektörü (Evaporative Light Scattering Detector-ELSD), oldukça hassas, geniş bir dinamik aralığa sahip, kullanımı kolay ve çeşitli alanlarda etkili analizler gerçekleştirebilen bir dedektördür. ELSD, mobil fazdan daha az uçucu olan herhangi bir maddeyi kolaylıkla tespit edebilir. Bu özellikleri sayesinde, ELSD, çeşitli uygulama alanlarında analizler için tercih edilen bir yöntemdir. (Soyseven vd., 2022 Li vd., 2023).

Bu çalışmada, bazı gargara ve efervesan tabletlerde bulunan ASP miktarının belirlenmesi için basit, hızlı ve sağlam bir YPSK-ELSD yöntemi geliştirilerek valide edilmiştir. Ayrıca geliştirilen YPSK-ELSD yönteminin ASP'nin rutin analizlerinde kolaylıkla kullanılabileceği gösterilmiştir.

2. YAPAY TATLANDIRICILAR HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Yapay tatlandırıcılar, gıda ve içecek ürünlerinde kullanılan sentetik bileşiklerdir. Tatlandırıcılar, şekerin yerini alabilen veya şekerin kullanımını azaltabilen düşük kalorili alternatifler olarak hizmet verirler. Yapay tatlandırıcılar, enerji içeriği düşük veya sıfır olan ürünler olarak pazarlanmaktadır. Bununla birlikte, bazı tüketiciler, yapay tatlandırıcıların sağlık açısından güvenilirliği konusunda endişelerini dile getirmişlerdir (Liu vd.,2021).

Yapay tatlandırıcıların en yaygın olarak kullanılanları ASP, sukraloz (SCL), sakkarin ve asesulfam potasyumdur (ACE-K). ASP, düşük kalorili ve tatlı bir lezzet verirken, SCL 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, şekerin yerine kullanıldığında kalori alımını azaltarak diyabet, obezite ve diğer sağlık sorunlarıyla ilişkili yüksek şeker tüketimini engelleyebilirler. Ancak, bazı araştırmalar, yapay tatlandırıcıların sağlık riskleriyle ilişkili

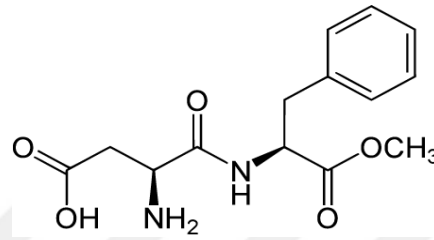
olabileceğini ileri sürmektedir (Li vd. 2023). Örneğin, ASP'nin beyin fonksiyonlarını etkileyebileceği ve bağırsak bakteri dengesini bozabileceği öne sürülmüştür. Bazı çalışmalar, yapay tatlandırıcıların kanser riskini artırabileceğini iddia etmektedir, ancak bu iddiaların çoğu tam olarak kanıtlanmamıştır ve genel olarak, yapay tatlandırıcıların düşük dozlarda kullanıldığında 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

Bugünlerde, ASP, dünya genelinde 200 milyondan fazla tüketici tarafından kullanılan bir tatlandırıcıdır. ASP, gazlı alkolsüz içecekler, sakız, şekerlemeler, dondurulmuş tatlılar, yoğurt ve hatta öksürük şurupları ve vitaminler gibi 6.000'den fazla beslenme ürünüde kullanılmaktadır (Arora vd, 2013). ASP'nin moleküler yapısı Şekil 2.1'de gösterilmektedir.



Şekil 2.1. Aspartam'ın molekül yapısı

ASP, (N- L - α -Aspartil)- L -fenilalanin ,1-metil ester olarak bilinen bir kapalı formüle sahiptir. Molekül ağırlığı 294,31 g/mol'dür. ASP, kokusuz, şeffaf ve kristal yapıya sahip bir maddedir. Tadı keskin, metalik veya kimyasal değildir. pH 3-5 aralığında asidik çözeltiler ASP'ye zarar vermez. ASP'nin tatlılık seviyesi, sükroza kıyasla 180 kat daha yüksektir. Kalori değeri yaklaşık olarak 1 gram başına 4 kcal (17 kj) olarak hesaplanır. JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), günlük olarak alınması gereken ASP miktarını vücut ağırlığı başına 40 mg/kg olarak belirlemiştir. ASP kuru haliyle nispeten stabil olsa da pH, sıcaklık ve zaman gibi faktörler, kuru formunu etkileyen önemli etmenlerdir (Sezgin, 2016; Arora vd, 2013).

2.1.1. ASP Tayini ile İlgili Literatürde Bulunan Bazı Çalışmalar

Sezgin vd., çeşitli matrislerde ACE-K, sakarin, ASP, alitam (ALI), neohesperidin dihidrokalkon, rebaudiosit-A ve neotamin (NEO) eş zamanlı tayini için yeni bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. YPSK yönteminde sabit faz olarak core-shell (yüzeysel olarak gözenekli) silika partikül kolonu ve ACN, fosfat tamponu ve sudan oluşan hareketli bir faz kullanmışlardır. Yöntem, %95,69–103,99 arasındaki geri kazanımlar ve %1,90'dan daha iyi kesinlik ile 0,03–1,12 mg L⁻¹ aralığında saptama limitleri olduğunu raporlamışlardır. Geliştirilen yöntem, basit çözündürme, seyreltme ve süzme gibi

adımları içeren, uygulaması kolay numune hazırlama uygulamaları kullanılarak 65 farklı ticari gıda maddesi ve farmasötik ürüne başarıyla uygulanmıştır. Analizi yapılan gıda numunelerinin hiçbirinin yasal limitleri aşmadığı ve kullanılmasına izin verilmeyen alıtam içermediği tespit edilmiştir. Sonuçların ürün etiket bilgilerine uygun olduğu ve gıdalar için sınır değerleri aşmadığı da belirtmişlerdir (Sezgin vd. 2021).

Pietra ve arkadaşları sentetik tatlandırıcılar ASP ve sakarin içeren farmasötik ve diyet formülasyonlarının güvenilir bir kalite kontrolü için uygun bir ters fazlı YPSK yöntemi geliştirilmiştir. Önerilen yöntem, asesülfam, ASP ve sakarini ve bunların 5-benzil-3,6-diokso-2-piperazineasetik asit (ASP'nin ana bozunma ürünü) ve 4-sülfamoilbenzoik asit, o- ve p- gibi safsızlıklarını ayırabilmektedir. Toluensülfonamidler (sakarinin sentez safsızlıkları). Potansiyel sakarin safsızlıklarının belirlenmesi için C-18 sorbent kullanan uygun bir katı faz özütlemesi (SPE) prosedürü de geliştirilmiştir (Pietra vd. 1990).

Idris vd., masa üstü tatlandırıcılarda aspartamın analizi için yeni, basit, normal fazlı, YPSK yöntemi geliştirilmiştir. Yöntem, aspartamın 2,4-dinitrofluorobenzen ile türetilmesine ve ardından 332 nm'de saptamaya dayanmaktadır. Ayırma, mobil faz olarak heksan:etil asetat (60:40, V/V) ile silika kolonu üzerinde gerçekleştirilmiştir (pH 4.5, %1 asetik asit ile). Ayırma akış hızıyla 1 ml/dk'ya ayarlanmıştır. Tespit sınırı (LOD) ve bu yöntemin ölçüm limiti (LOQ) sırasıyla 1 ng ve 4 ng olarak bulunmuştur. Yöntem 20-180 ng konsantrasyon aralığında lineer bulunmuştur. Bu yöntemin geri kazanım değerleri %97'den daha iyi bulunmuştur (Idris vd. 2012)

Fatibello-Filho ve arkadaşları sofralık tatlandırıcılarda ASP tayini için akış enjeksiyonlu spektrofotometrik yöntem geliştirmiştir. Numuneler, bir polyester reçine matrisi içinde immobilize edilmiş $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ ile doldurulmuş bir kolondan (13 cm x 2,0 mm) aktı ve Cu(II) iyonları katı faz reaktöründen Cu(II)(aspartam)₂ kompleksi oluşumuyla salındı. %0.02 (a/a) alizarin kırmızısı S ve oluşan Cu(II)±alizarin kırmızısı kompleksini içeren bir borat tampon çözeltisi (pH 9.0) akışıyla birleştirilen karışım 550 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. ASP için kalibrasyon grafiği, ASP'nin tespit sınırı $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ olan 20-80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyon aralığında doğrusal olarak bulunmuşlardır. 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ASP (n=10) içeren solüsyon için RSD %0,2 idi ve saatte 70 ölçüm alındı. Sütun, 25 °C'de en az 8 saat sürekli kullanım (500 enjeksiyon) için stabil olmuştur. Önerilen yöntem, sakarin, ACE-K ve CYC etkileşimi olmadan yedi ticari masa üstü tatlandırıcıda ASP'nin belirlenmesi için uygulanmıştır (Fatibello-Filho vd. 1999)

Matsumoto ve arkadaşları YPSK ile çeşitli gıdalarda üç yapay tatlandırıcının, NEO, ALI ve ASP'nin eş zamanlı tayini geliştirilmiştir. Homojenize edilmiş numuneler, %10 sodyum klorür içeren 0.01 mol L⁻¹ HCl içeren selüloz tüp içine paketlenildi ve 24-48 saat boyunca 0.01 mol L⁻¹ HCl ile diyaliz edilerek bir Oasis MCX kartuşundan geçirildi ve kartuş, su ve MeOH ile yıkandı. Daha sonra üç tatlandırıcı, 0.5 mol L⁻¹ amonyum klorür-ACN (3:2) karışımı ile kartuştan ayrıştırıldı. Tatlandırıcılar, 0.01 mol L⁻¹ fosfat tampon (pH 4.0)-ACN den oluşan bir mobil faz ile bir gradyan modu kullanılarak bir Cosmosil 5 C18-AR kolonu üzerinde ayrıldı ve 210 nm'de tespit edildi. 10 ve 100 µg g⁻¹ eklenmiş 8 çeşit gıdadan NEO, ALI ve ASP geri kazanımları sırasıyla %86-100 ve %89-104 olarak belirlemişlerdir. NEO, ALI ve ASP'in tespit limitleri numunelerde 1 µg g⁻¹ idi. Ayrıca, üç tatlandırıcı, tandem MS ile sıvı kromatografi kullanılarak başarıyla tanımlamışlardır (Matsumoto vd., 2008)

Tsang vd., ASP ve parçalanma ürünlerinin analizi için hızlı ve kolay bir yöntem üzerinde çalışılmıştır. Gazlı içeceklere ait örnekler, 22 ± 1 °C'de farklı süreler boyunca depolanmış ve daha sonra YPSK ve UV dedektörleri kullanılarak incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda dört farklı parçalanma ürünü ve oranları belirlenmiştir. ASP'in benzaldehit gibi bir ürün oluşturmadığı tespit edilmiştir. Elde edilen veriler, ASP'in karbonatlı içeceklerde uzun süreli depolama sırasında kararsız olduğunu ve parçalanma ürünlerinin hidroliz ve siklizasyon yoluyla oluştuğunu göstermiştir (Tsang vd., 1985).

Liu ve arkadaşları bu çalışma, içeceklerde bulunan CYC, ACE-K ve ASP gibi tatlandırıcıların aynı anda ayrılması ve tespiti için titanyum temelli ters fazlı YPSK yönteminin hızlı bir şekilde kurulmasını amaçlamışlardır. Kromatografik ayrılma titanyum Sachtopore-RP C18 kolonu (250 × 4.6 mm; 5 µm), mobil faz olarak %1 fosfat asit içeren su ve MeOH karışımı (hacimsel oranı 95:5), akış hızı 1.0 mL/dakika ve tespit dalga boyu 205 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. CYC ve ASP nin lineer aralıkları sırasıyla 0.02-8.0 mg/mL ve tespit limitleri (LOD) 16.35 ve 19.56 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Bunların saptama limitleri (LOQ) ise sırasıyla 55.50 ve 68.50 µg/mL'dir. CYC nin geri kazanımları %93.52 ile %103.54 arasında bulunmuştur. ASP nin geri kazanımları ise %93.31 ile %102.63 arasında raporlanmıştır. Ayrıca ACE-K lineer aralığı 0.125-50 µg/mL, LOD değeri 0.08 µg/mL ve LOQ değeri 0.25 µg/mL'dir. ACE-K geri kazanımları %94.34 ile %103.21 arasındadır. Tüm tespitlerin göreceli standart sapması (n=8) %0.72'den daha az olduğu belirlenmiştir (Liu vd.,2014).

Tran ve arkadaşları (2013) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, 24 ilaç, kişisel bakım ürünü, endokrin bozucu kimyasal ve yapay tatlandırıcıların aynı anda tespit edilebilmesi için yüksek verimli bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem, tek adımlı katı faz ekstraksiyonu ve yüksek performanslı sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi kullanılarak uygulanmıştır. Araştırmacılar, bu yöntemi ham atık su, yüzey suyu ve yeraltı suyu gibi su örneklerinde başarıyla test etmişlerdir. Bu geliştirilen yöntem, sucul ortamda bulunan ilaçlar ve kimyasal maddelerin varlığını, davranışını ve taşınımını araştırmak için kullanılabilir hale getirmektedir (Tran vd., 2013).

Croitoru ve arkadaşları üç tatlandırıcının konsantrasyonlarını ölçmek için doğrudan algılamalı (196 nm) basit bir ters fazlı (RP18) HPLC-UV yöntemi geliştirmiştir. Tespit sınırları CYC, ASP ve sakarin için sırasıyla 12 mg l⁻¹, 0,5 mg l⁻¹ ve 0,25 mg l⁻¹'den düşüktür. Konsantrasyonlar CYC durumunda 113,14–280,07 mg l⁻¹, sakarin için 17,96–50,94 mg l⁻¹ ve ASP için 9,94–296,82 mg l⁻¹ arasında olduğunu gözlemlemişlerdir. (Croitoru, vd. 2011).

Fernandes ve diğer araştırmacılar, bu çalışmada ASP, CYC, sakarin ve ACE-K gibi tatlandırıcıların aynı anda analiz edilebilmesi için yeni bir yöntem geliştirmiştir. Bu yöntem, kapiler zon elektroforezi aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. Elektrolit koşullarını optimize ederek, tatlandırıcıları başarılı bir şekilde ayırtırmayı başarmışlardır. Yöntemin doğruluğunu, hassasiyetini ve tespit limitlerini değerlendirmişlerdir. Ayrıca, ilgili yöntemi limonlu çay poşeti örnekleri üzerinde de başarılı bir şekilde uygulamışlardır (Fernandes vd, 2013).

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 ACN kullanılarak izokratik elüsyonu ile ayrılmasını içerir. İkinci yöntem, C18 kolonunda sodyum siklamatın MeOH 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).

Bergamo ve arkadaşları, ASP, CYC, sakarin ve ACE-K'nin ticari meşrubat numunelerinde ve masa üstü tatlandırıcı formülasyonlarında basit, hızlı ve eş zamanlı olarak belirlenmesi için kapasitif olarak birleştirilmiş temassız iletkenlik tespiti (C4D) ile kapiler elektroforez (CE) kullanmışlardır. Arka plan elektroliti (BGE) olarak 100 mmol L⁻¹ tris(hidroksimetil)aminometan (TRIS) ve 10 mmol L⁻¹ histidin (His) içeren bir tampon solüsyonu kullanıldı. Analitlerin ayrılması 6 dk'dan daha kısa sürmüştür. Tespit ve tayin limitleri (LOD ve LOQ), genellikle fotometrik tespit ile CE tarafından elde edilenlerden daha iyi olarak raporlanmıştır. Tatlandırıcıların standart çözeltileri eklenmiş numuneler için %94 ila %108 arasında değişen geri kazanımlar elde etmişlerdir. Örneklerin CE-C4D yöntemiyle analizi için göreceli standart sapma (RSD) %1,5 ila %6,5 aralığında değiştiğini gözlemlemişlerdir (Bergamo vd., 2011).

Lim ve arkadaşları ithal edilen gıdalarda bulunan 9 farklı yapay tatlandırıcının aynı anda tespit edilmesi için yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Yöntem, YPSK-MS/MS (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve tandem kütle spektrometrisi) olarak adlandırılan bir analitik teknik kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayıları (r^2 değerleri) 0.99'dan büyük olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, yapılan analizler sonucunda örneklerdeki tatlandırıcıların kurtarmaları %90.0 ile 107.5 aralığında ve varyasyon katsayıları %1.8 ila 8.6 aralığında bulunmuştur. Bu şekilde de yöntemin tekrarlanabilirliği ve doğruluğu açısından başarılı olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada saptama sınırı 0.001 ila 0.375 mg/mL arasında, ölçüm sınırı ise 0.003 ila 1.125 mg/mL arasında bulunmuştur. Sonuç olarak, bu geliştirilen YPSK-MS/MS yöntemi, ithal edilen gıdalarda bulunan 9 farklı yapay tatlandırıcının aynı anda tespit edilmesi için başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Lim vd., 2013).

Lee ve arkadaşları Kore'de kullanımına izin verilen dört yapay tatlandırıcıyı YPSK-ELSD yöntemi kullanarak incelemişlerdir. Bu çalışmada, Kore'deki 30 farklı gıda kategorisinde bulunan 900'den fazla ürünün tatlandırıcı içeriğini analiz etmişlerdir. Yapılan analizler sonucunda, tatlandırıcıların tüm örneklerde güvenli düzeyde olduğu belirlenmiştir (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 asitin, 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).

3. YÖNTEMLER

Bu tez çalışmasında ASP'nin tabletler içerisindeki miktarının bulunması için YPSK-ELSD yöntemi geliştirilerek valide edilmiştir. Geliştirilen yöntem eczanelerden temin edilen gargara ve tablet numunelerine uygulanmıştır.

3.1.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) ve Kullanılan Dedektörler

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).

4.MATERYAL VE METOT

4.1. Çalışma Kapsamında Kullanılan Kimyasal Malzemeler

ASP'nin > %99 saflıkta bulunan referans standardı Sigma-Aldrich'ten (Almanya) firmasından temin edildi. ACN, MeOH ve Merck'ten (Almanya) firmasından YPSK saflığında bulunan ultra saf su ise Stakpure (Almanya) cihazından temin edildi. Tüm analizlerde kullanılan nitrojen gazı (N₂) analitik saflıktaydı. Tüm standart çözeltilerinin ve numuneler YPSK enjeksiyonundan önce 13 mm iç çap ve 0.2 µm gözenek boyutuna sahip (PVDF) şırınga filtreleri (Orrange Scientific, Belçika) tüm standart çözeltilerin ve filtrasyonu için kullanıldı.

Tablo 4.1. YPSK-ELSD çalışmalarında kullanılan malzeme listesi

Kullanılan Kimyasal Malzeme Adı	Marka	Saflık derecesi
ASP	Sigma – Aldrich (Almanya)	Analitik saflık %98-100,5, pellet
MeOH	Sigma – Aldrich (Almanya) ve Carlo Erba (Fransa)	YPSK Saflık, ≥%99,9
Su	Stakpure (Almanya)	YPSK Saflık, ≥%99,9
İzoproril Alkol (IPA)	Carlo Erba (Fransa)	YPSK Saflık, ≥%99,0
ACN	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. Çalışma Kapsamında Kullanılan Cihazlar

Kromatografik ayırımlar, Shimadzu ELSD-LT-II Model dedektörüne (Japonya) bağlı bir ikili pompadan oluşan Shimadzu LC sistemi (Nexera-i LC-2040C 3D Model) kullanılarak gerçekleştirildi. YPSK cihazında bir otomatik örnekleyici, bir gaz giderici, bir termo-statü kolon bölmesi bulunmaktadır. LabSolution Shimadzu Corporation (Japonya) yazılımı tarafından elde edilen veriler izlendi. 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) kullanıldı. Çalışmalarda kullanılan cihazların marka ve modelleri **Tablo 4.2**'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Çalışmalarda kullanılan cihazların marka ve modelleri

Cihaz Adı	Marka/ Model
Yüksek performanslı 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

Bu çalışmada sıvı ve efervesan tablet formlarında bulunan ASP miktar tayini için yeni bir YPSK-ELSD yöntemi geliştirilmiştir. Literatürde ASP'nin analizi için sıklıkla HPLC kullanılmasına rağmen ELSD ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada 1 adet sıvı ve 2 adet efervesan tablet olacak şekilde toplam 3 farklı numune incelenerek içerdikleri ASP miktarı incelenmiştir.

4.3.1.YPSK-ELSD ile ASP tayini

4.3.1.1. Standart çözeltilerin hazırlanması

ASP'nin stok standart çözeltileri derişimi 1 mg mL⁻¹ olacak şekilde %100 YPSK saflıktaki su içerisinde hazırlanmıştır. Hazırlanan tüm stok çözeltiler -18 °C'de buzdolabında saklanmış olup bütün standart çözeltiler günlük olarak mobil faz (%20 ACN) ile seyreltilmiştir. Tüm hesaplamalarda seyreltme faktörü dikkate alınmıştır. Hazırlanan tüm standart ve numuneler en az 5 dk vortekslenerek 20 dk ultrasonik banyoda içerisinde sonikasyona tabi tutunmuştur. Enjeksiyondan önce 0.22 µm gözenek boyutuna sahip PVDF filtre ile süzölmüştür. Standart çözeltilerin stabilitesini korumak amacıyla günlük kullanımdan sonra 4 °C'de saklanmıştır ve 3-4 hafta'da bir gerekli olduğu durumlarda tekrar hazırlanmıştır.

4.3.1.2.Mobil fazın hazırlanması

YPSK-ELSD analizinde kullanılan mobil faz 100 mL ACN ile 400 mL YPSK saflıktaki suyun karıştırıldıktan sonra çözelti içerisinde herhangi bir hava kabarcığı kalmaması için 20 dk sonikatörde bekletilmiştir. Daha sonra hazırlanan çözelti 0.22 µm gözenek boyutuna sahip filtreden mobil faz süzme düzeneği yardımıyla geçirilerek YPSK-ELSD sistemine uygun hale getirilmiştir.

4.3.1.3. Numunelerin hazırlanması

Eskişehir’de bulunan eczanelerden farklı markalara ait 1 adet sıvı gargara, 2 adet efervesan tablet temin edilmiştir. Sıvı olan gargara numunesi YPSK-ELSD sistemine enjekte edilmeden önce PVDF filtreden süzölmüştür. Efervesan tabletlerden 10 adedi hassas bir şekilde tartıldıktan sonra havan içerisinde toz haline getirilmiş ve daha sonra ortalaması alınarak tablet 1’ in ağırlığı $1902 \pm 0,1$ mg, Tablet 2’nin ağırlığı ise $1690 \pm 0,1$ mg olarak raporlanmıştır. Tablet 1 numunesi 190 mL YPSK saflıktaki su içerisinde Tablet 2 ise 169 mL su içerisinde çözülerek vorteks ile 5 dk karıştırılmış ve daha sonra 20 dk sonikatörde bekletilmiştir. Daha sonra PVDF filtreden süzülerek YPSK vialine aktarılmıştır. Tüm hesaplamalarda seyreltme faktörü dikkate alınmıştır.

4.3.2. YPSK-ELSD ile Tabletlerde bulunan 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
	T : kuyruklama faktörü
Kuyruklama faktörü	$T = \frac{W_{0.05}}{2 * \alpha_{0.05}}$ $W_{0.05}$: pikin %5 yüksekliğindeki pik genişliği $\alpha_{0.05}$: pikin %5 yüksekliğindeki ilk yarısının pik genişliği

		R_s : ayırım gücü
Ayırım gücü	$R = 2 * \frac{t_R - t_{Rp}}{W + W_p}$	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 : <i>bağıl alıkonma zamanı</i> k'_1 : <i>birinci pikin kapasite faktörü</i> k'_2 : <i>ikinci pikin kapasite faktörü</i> t_1 : <i>birinci pikin alıkonma zamanı</i> t_2 : <i>ikinci pikin alıkonma zamanı</i> t_0 : <i>ölü zaman</i>
Teorik Tabaka Sayısı	$N = 16(t_R / W)^2$	t_R = <i>alıkonma zamanı</i> W = <i>ppik taban genişliği</i>
Asimetri Faktörü	$A_s = B / A$	A_s = <i>asimetri faktörü</i> <i>A ve B= Pik yüksekliğinin %10'una göre orta noktaya olan uzaklıkları</i>
Elde edilen pik alanını tekrar edilebilirliği	$\%BSS = SS / X_{ort} \times 100$	BSS : <i>Bağıl standart sapma</i> SS : <i>standart sapma</i> X_{ort} = <i>yapılan analiz ortalaması</i>

4.3.2.2. 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/L), 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 ASP'ın ölçülebilme yeteneğidir.

4.3.2.6. Doğrusallık

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

4.3.2.7. Tespit limiti ve tayin limiti (LOD ve LOQ)

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

$$LOD = 3 \times \sigma / m$$

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

$$LOQ = 10 \times \sigma / m$$

4.3.2.8. Sağlamlık

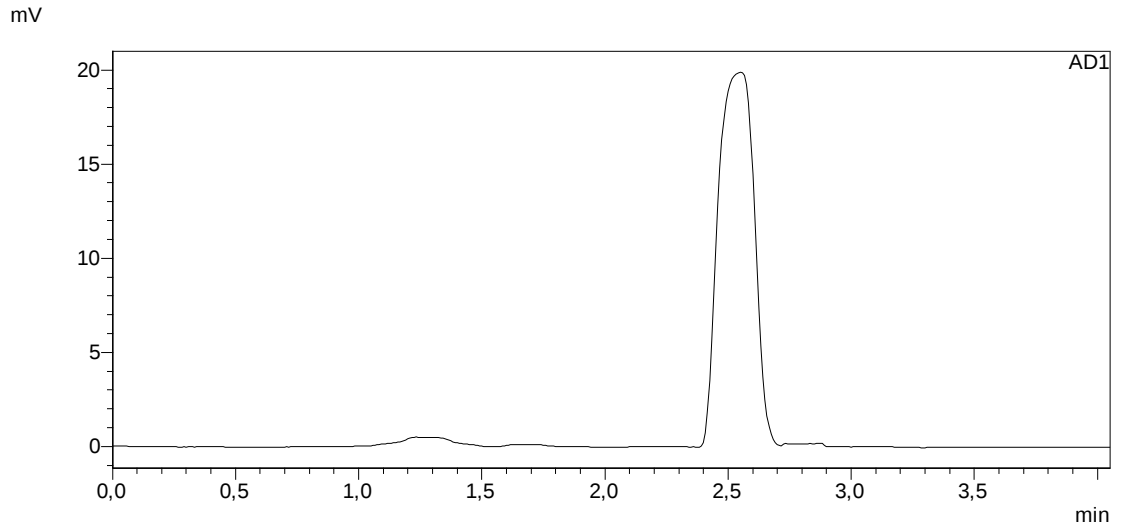
Metot parametrelerinde yapılan ufak değişikliklerden etkilenmeden kaldığının bir ölçüsüdür ve metodun güvenilirliğini gösterir.

5. BULGULAR ve SONUÇLAR

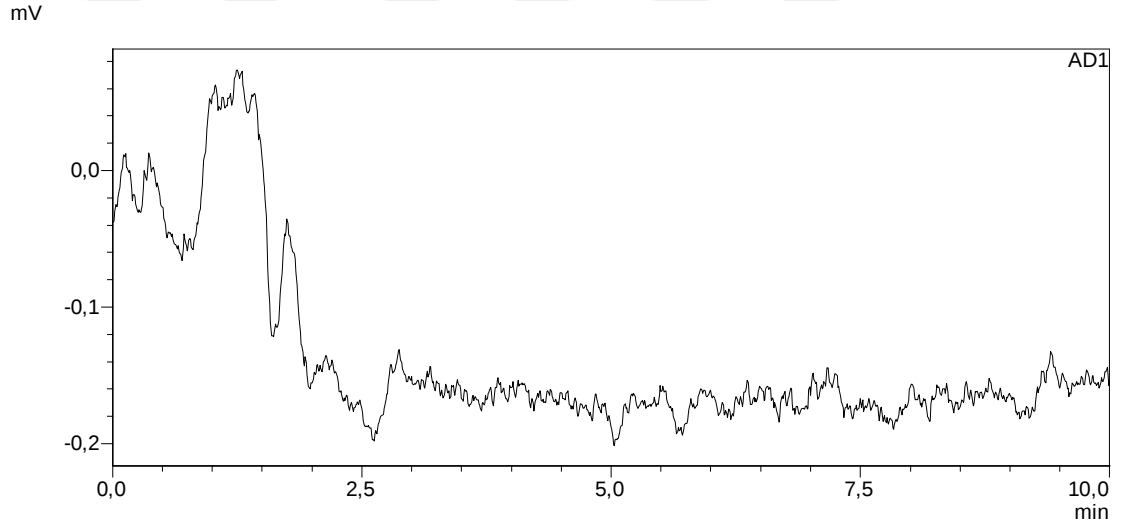
5.1.YPSK-ELSD ile yapılan SUT çalışmaları

Tabletler içerisinde bulunan ASP'nin miktarının YPSK-ELSD belirlenmesi için çeşitli ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırımdaki en iyi koşulları bulmak için organik faz yüzdesi (%), ELSD buharlaştırma sıcaklığı, mobil faz akış hızı, N₂ gaz akış hızı, Gain, Filter ve kolon sıcaklığı gibi çeşitli parametreler incelenerek değerlendirmeler yapılmıştır. En iyi kromatografik ayırımın elde edilmesi için belirlenen parametreler aynı kalırken, ELSD parametreleri de optimizasyon süreci boyunca değiştirilmiştir. 1000 µg mL⁻¹ derişimine sahip ASP çözeltisi, optimizasyon incelemelerinde YPSK-ELSD sistemine enjekte edilmiştir.

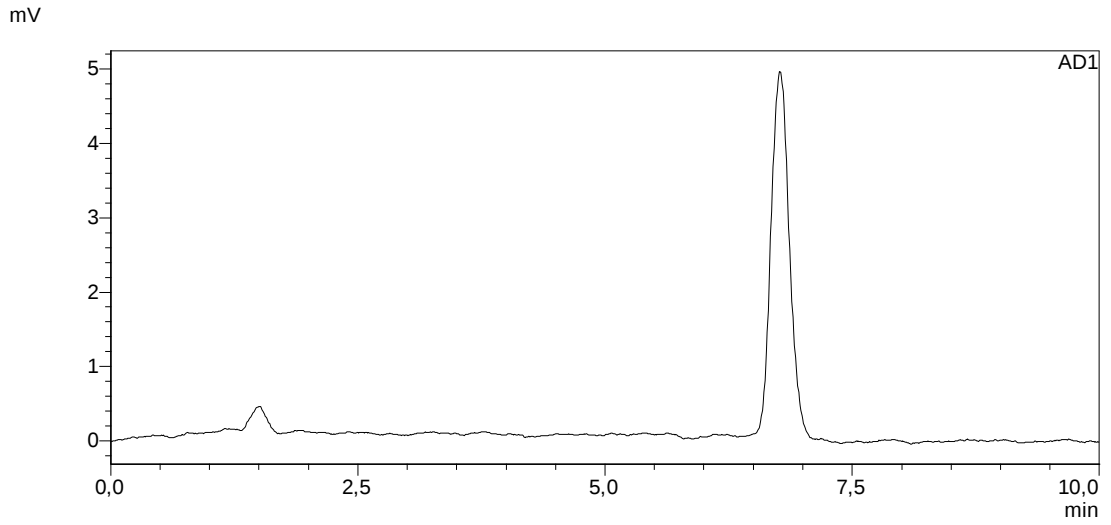
ACN-Su mobil fazının çeşitli oranları (%10,15,20,25) izokrotik olarak ASP davranışına olan etkileri incelenmiştir. Farklı ACN yüzdeleri içerisinde %10 ACN mobil fazında alıkonma süresinin uzun olduğu, %25 ACN kullanıldığında ise ASP'nin alıkonma süresinin çok erken olduğu raporlanmıştır. Numunelerdeki karışık matrixlerin girişim yapabileceği göz önüne alındığında en iyi mobil faz oranının (ACN:Su):(%20:%80) olduğuna karar verilmiştir. ELSD sıcaklığı üç farklı sıcaklıkta (45°C, 50°C ve 55°C) test edilmiştir. Pik morfolojileri göz önüne alındığında en iyi sıcaklığın 50°C derece olduğu gözlemlenmiştir. Gain ve Filter değerleride bu sıcaklığın seçiminde göz önünde bulundurulmuştur. Kolon sıcaklıkları 25, 30 ve 35°C arasında olacak şekilde değiştirilmiştir ve çok anlamlı bir fark gözlemlenmediğinden dolayı kolon sıcaklığı 30°C olarak belirlenmiştir. ELSD parametrelerinin en önemlilerinden biri olan N₂ gazı basıncını belirlemek için çeşitli incelemeler yapılmıştır. N₂ akışı 300, 350 ve 400 kPa aralığında değiştirilmiş ve en iyi kromatografik ayırım 350 kPa'da olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuç Shimadzu'nun önerilen değerleri ile uyumluluk göstermektedir. Optimizasyon çalışmalarında elde edilen bazı kromatogramlar **Şekil 5.1-Şekil 5.4'te** gösterilmiştir.



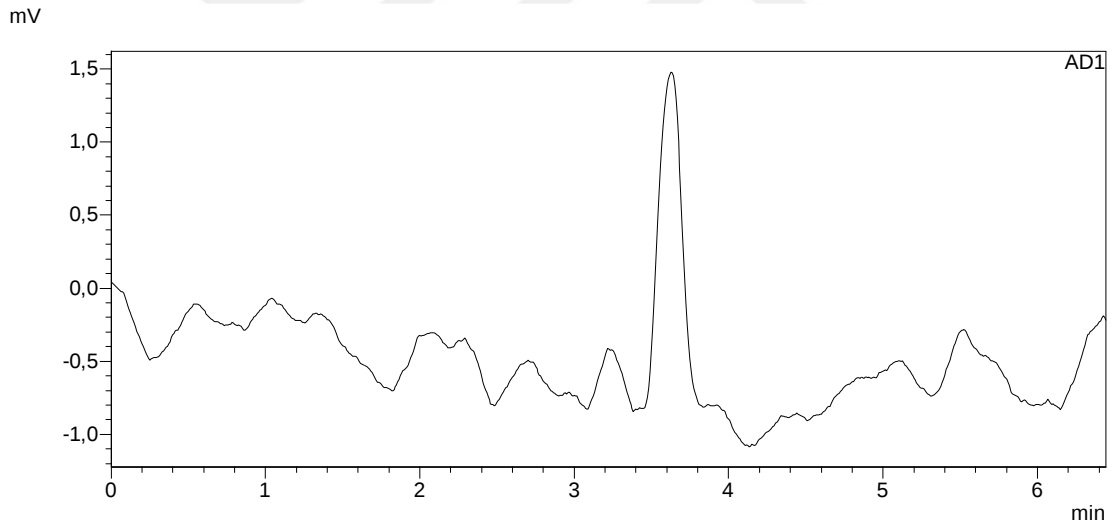
Şekil 5.1. Mobil faz (%75:%25) (Su:ACN), Akış hızı 1 ml dk^{-1} , Basınç:350 kPa, Gain: 7 Filter:10 ELSD sıcaklığı: 50 °C koşullarında elde edilen ASP kromatogramı



Şekil 5.2. Mobil faz (%90:%10) (Su:ACN), Akış hızı 1 ml dk^{-1} , Basınç:300 kPa, Gain: 5 Filter:10 ELSD sıcaklığı:50 °C koşullarında elde edilen ASP kromatogramı



Şekil 5.3. Mobil faz (%85:%15) (Su:ACN), Akış hızı 1 ml dk^{-1} , Basınç:350 kPa, Gain: 7 Filter:10 ELSD sıcaklığı:50 °C koşullarında elde edilen ASP kromatogramı



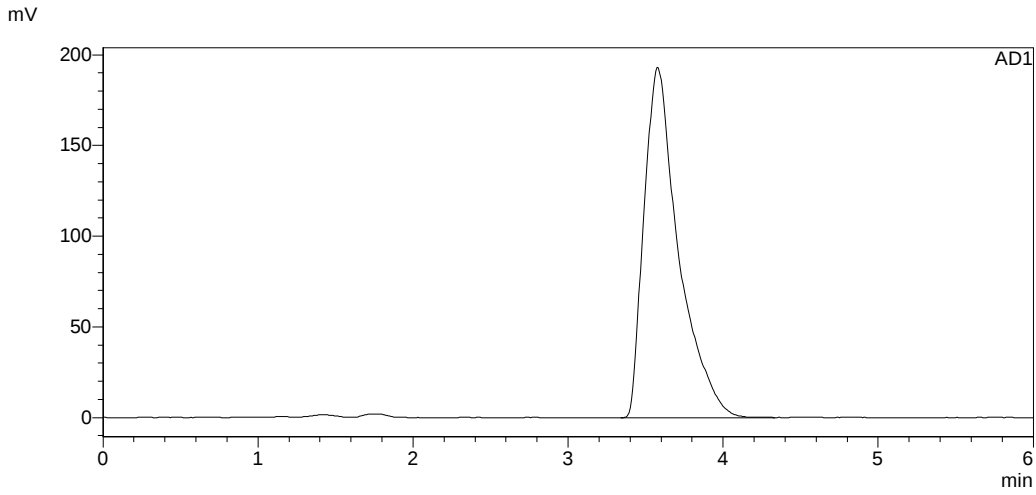
Şekil 5.4. Mobil faz (%90:%10) (Su:ACN), Akış hızı 1 ml dk^{-1} , Basınç:350 kPa, Gain: 5 Filter:10 ELSD sıcaklığı:40 °C koşullarında elde edilen ASP kromatogramı

Optimizasyon çalışmalarından elde edilen kromatogramlar incenerek YPSK-ELSD ile tabletlerde ASP analizi için en uygun koşulların Tablo 5.1’de gösterildiği gibi olmasına karar verilmiştir.

Tablo 5.1. Uygulanan YPSK-ELSD koşulları

Parametre	Değer
Mobil faz	ACN:Su(20:80, v/v)
Akış hızı	1 mL dk ⁻¹
Kolon	Phenomenex Luna NH ₂
İnjesiyon hacmi	10 µL
Kolon sıcaklığı	30 °C
Buharlaştırma sıcaklığı	50 °C
N ₂ basıncı	350 kPa
Gain	8
Filter	10

Yukarıda belirlenen koşullar altında ASP'nin alıkonma zamanı 3.5 dk olarak gözlemlenmiştir (Şekil 5.5). YPSK-ELSD yöntemin her bir analiz öncesinde kolonu yeniden şartlanması için analiz süresi 6 dk olarak ayarlanmıştır.



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

5.2. Sistem uygunluk testleri (SUT)

SUT çalışmaları sırasında $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ ASP çözeltisi kullanılmıştır (n=3). Elde edilen SUT sonuçları Tablo 5.2’de gösterilmiştir.

Tablo 5.2. YPSK-ELSD kullanılarak yapılan $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ ASP çözeltisi için elde edilen SUT sonuçları (n=5)

Parametreler	Gözlenen Değer	*Önerilen Değer
Alıkonma süresi (dk)	3,57	-----
Kuyruklanma faktörü (T)	1,65	$T < 2.00$
Kapasite faktörü (k)	2,09	$k > 2.00$
Teorik Tabaka Sayısı (N)	1345	$N > 2000$
Alıkonma zamanı %BSS	0,03	$\%BSS < 1.0$

5.2.1. Doğruluk ve kesinlik çalışmaları

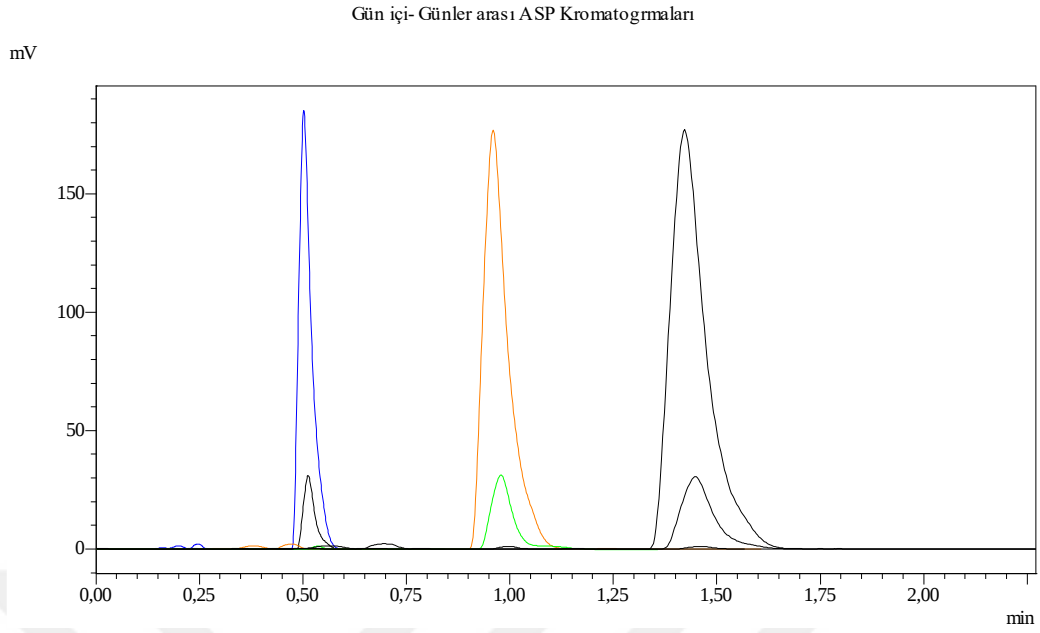
Numunelere düşük, orta ve yüksek olacak şekilde üç farklı derişimde bilinen konsantrasyonlarda 40, 200 ve $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ ASP ilavesi yapılmıştır. Doğrusal aralık dikkate alınarak ekleme işlemleri yapılmıştır.

Geri kazanım değerleri aşağıda verilen eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

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

Uygulanan YPSK-ELSD yönetimin geri kazanım sonuçları %86.04 - %110.58 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 $40, 200$ ve $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonlu üç ayrı ASP çözeltisi YPSK-ELSD sistemine enjeksiyonu yapılmıştır. (Şekil 5.6)



Şekil 5.6. *Gün içi-Günler arası elde edilen ASP kromatogramları*

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. *Uygulanan YPSK-ELSD yönteminin doğruluk ve kesinlik sonuçları*

Hedef bileşik	Miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Geri kazanım (%)				(%BSS)			
		1.	2.	3.	Ort.	Gün içi (n=3)			Günler arası (n=9)
						1.	2.	3.	
ASP	40	90,74	86,04	86,48	87,75	0,64	0,29	0,43	0,45
	200	110,58	110,71	108,96	110,09	0,06	0,12	0,12	0,10
	600	99,45	97,62	96,54	97,87	0,08	0,06	0,04	0,06

5.2.2. 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 ayırmanın olduğunu destekler niteliktedir (Snyder vd., 1996).

5.2.3. Doğrusallık, LOD ve LOQ

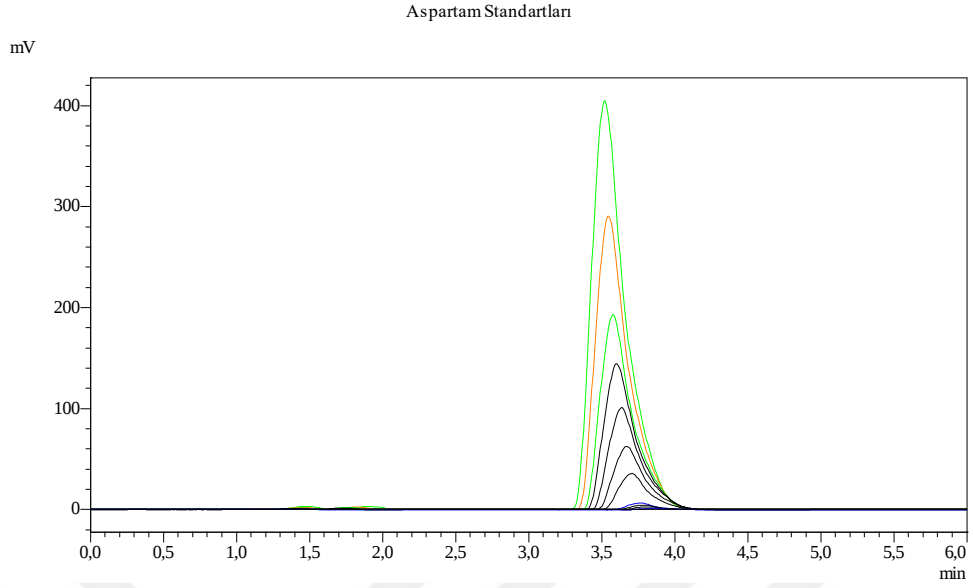
Geliştirilen YPSK-ELSD yöntemin doğrusallığının incelenmesi için on üç adet 20 ila 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aralığında değişen (20, 30, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 ve 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) farklı standart çözeltileri hazırlanmıştır. On üç noktalı kalibrasyon eğrileri ile doğrulanmıştır. Her bir standart numuden üçer set analiz yapılarak elde edilen alanları ortalamaları hesaplanmıştır.

LabSolution programından elde edilen kromatografik derişimler ve alan verileri Tablo 5.4’de gösterilmiştir.

Tablo 5.4 YPSK-ELSD ile elde edilen kromatografik alan veri tablosu

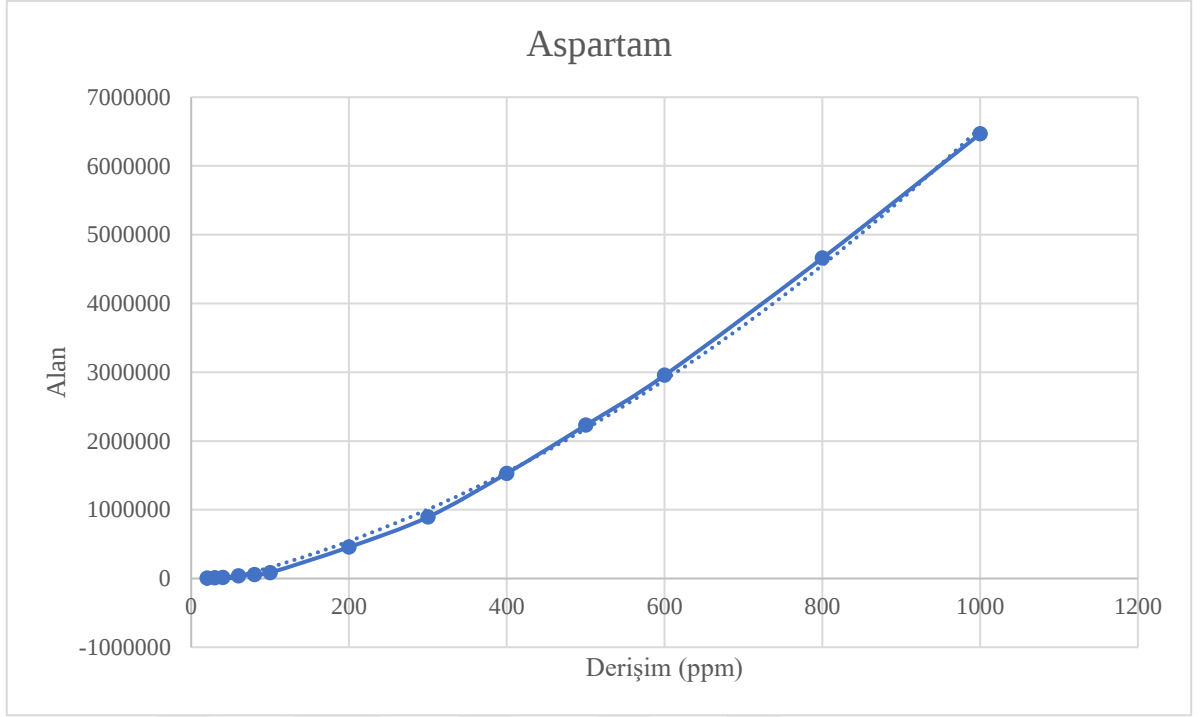
Derişim	Alan1	Alan2	Alan3	Ortalama Alan	Log(derişim)	log(ortalama alan)
20	5681	4370	4526	4859	1.301029996	3.686546899
30	10609	10830	9192	10210.33333	1.477121255	4.009039921
40	15150	17982	17358	16830	1.602059991	4.226084116
60	35222	36765	36311	36099.33333	1.77815125	4.557499182
80	55848	55656	55379	55627.66667	1.903089987	4.745290844
100	85374	85099	84335	84936	2	4.929091804
200	372966	507830	487830	456208.6667	2.301029996	5.659163531
300	828251	921189	931189	893543	2.477121255	5.951115457
400	1527911	1548030	1510377	1528772.667	2.602059991	6.184342909
500	2199082	2248551	2240621	2229418	2.698970004	6.348191503
600	2909954	2977932	2978853	2955579.667	2.77815125	6.47064267
800	4668456	4696389	4611996	4658947	2.903089987	6.66828777
1000	6497039	6430403	6468421	6465287.667	3	6.810587853

YPSK-ELSD ile elde edilen kromatogramların üst üste getirilerek elde edilen görüntüsü Şekil 5.7’de gösterilmiştir.

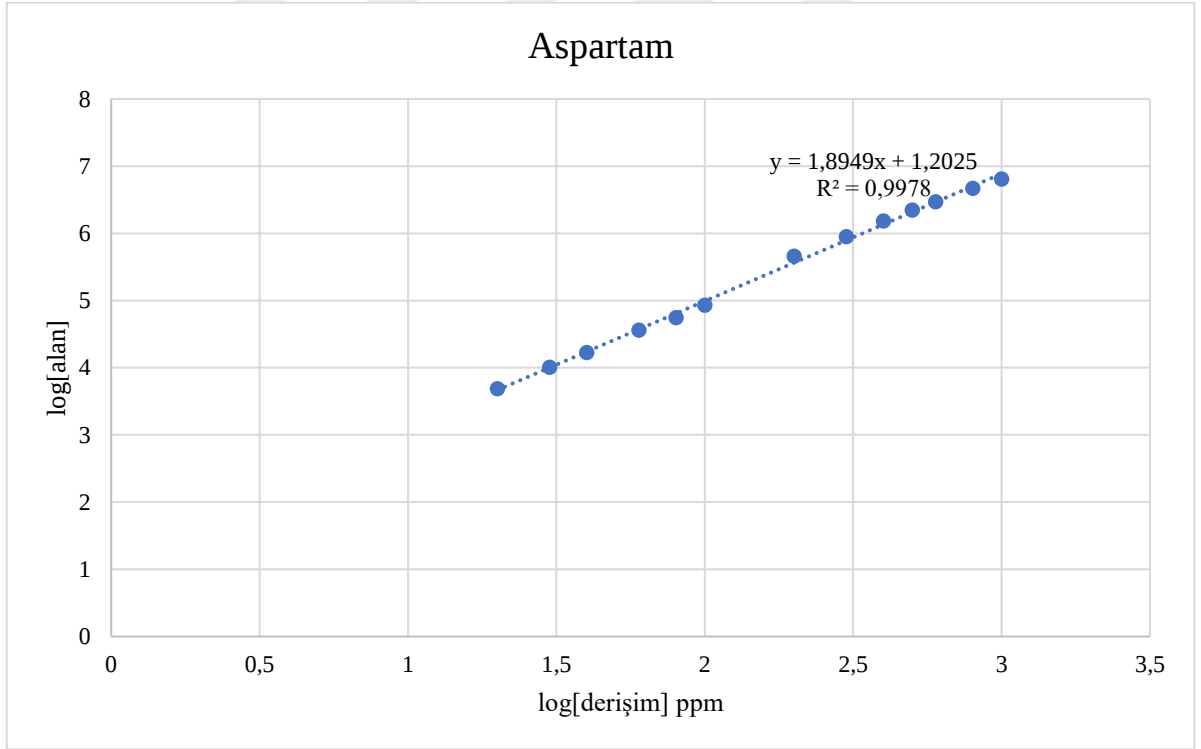


Şekil 5.7. YPSK-ELSD ile elde edilen 20-1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ derişimlerine sahip standart ASP kromatogramları

Geliştirilen YPSK-ELSD yöntemi için elde edilen kalibrasyon eğrisi, (Şekil 5.8) standart ASP konsantrasyonlarının elde edilen alanlarına karşı oluşturulmuştur. Ancak ELSD linear bir dedektör olmadığından dolayı elde edilen değerlerin logaritmalarına karşı (Şekil 5.9) bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Böylece lineer bir doğru elde edilmiştir. Kalibrasyon grafiği incelendiğinde $y = 1,8949x + 1,2025$ ($R^2 = 0,9978$), doğrusu elde edilmiştir. Yapılan tüm hesaplamalarda logaritmik değerlerde dikkate alınmıştır. Bu değerler İyi bir doğrusal ilişki olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu sonuçlar, ASP için doğrusal bir aralıkta doğru sonuçlar alabileceğimizi göstermiştir.



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



Şekil 5.9. YPSK-ELSD ile elde edilen log[derişim] – log[kromatografik alan] eğrisi

Geliştirilen YPSK-ELSD yönteminin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 3 ve 10 sinyal-gürültü oranı temel alınarak hesaplanmıştır. Elde edilen, aralık ve doğrusallık verileri Tablo 5.4’de gösterilmiştir.

Tablo 5.5. 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	20 - 1000	$y = 1,8949x + 1,2025$	0.9978	0,69	2,28

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

5.2.4. 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 değişiklikle test edildi (340, 350 ve 360kPa). Sağlamlık çalışmalarında 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ASP çözeltisi kullanıldı. % BSS ortalama değerleri %0,06 ile %0,45 arasında bulundu. Önemli bir değişiklik olmadığı gözlemlendi. Sağlamlık sonuçları Tablo 5.5 de gösterilmiştir.

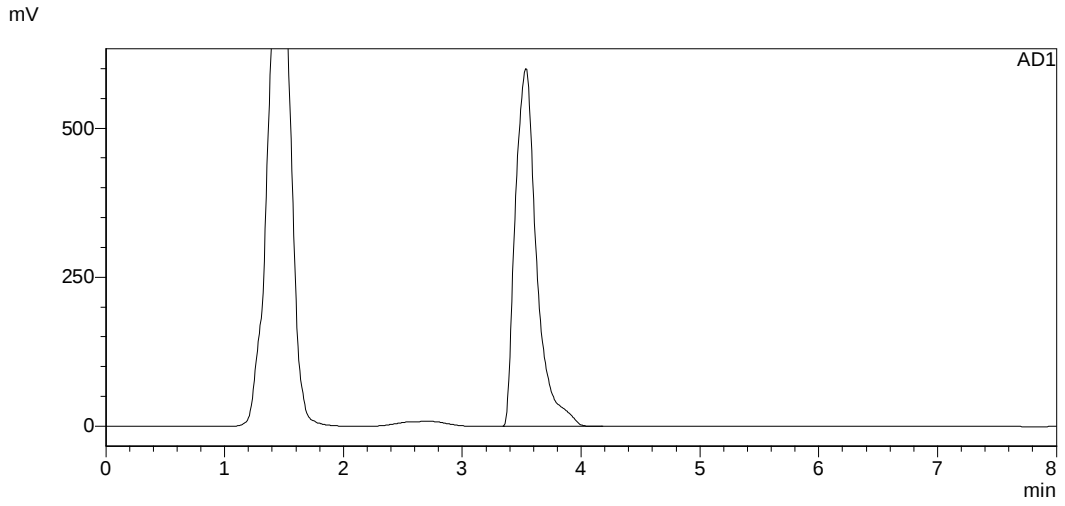
Tablo 5.6. Geliştirilen YPSK-ELSD yönteminin sağlamlık sonuçları (%BSS)

Tatlandırıcı	Kolon Sıcaklığı (°C)		Akış Hızı (mL dk ⁻¹)		N ₂ Basıncı (kPa)	
	29	31	0,9	1,1	340	360
ASP	0,02	0,01	2,14	1,90	1,86	1,02

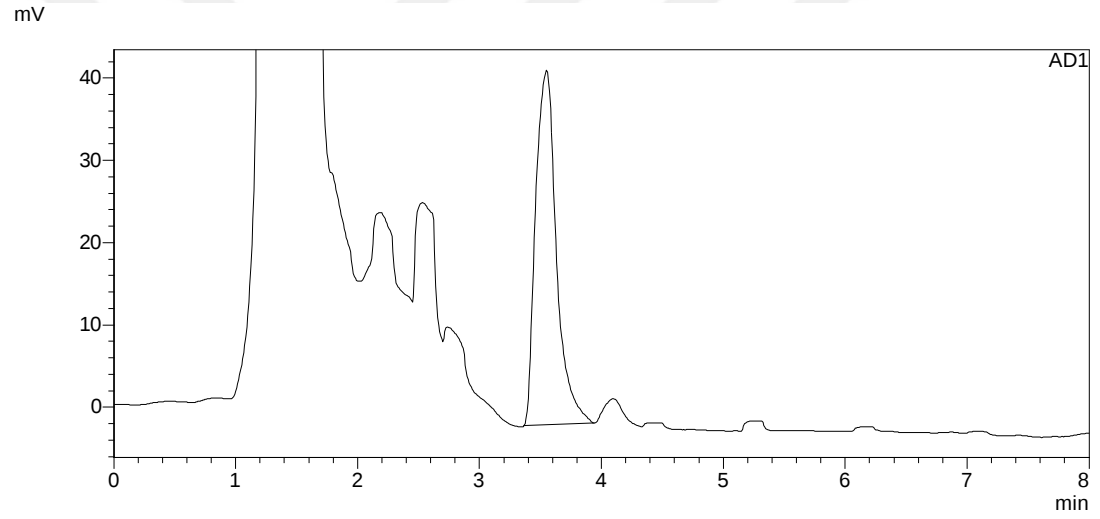
BSS: Bağıl standart sapma

5.2.5. Numune sonuçları

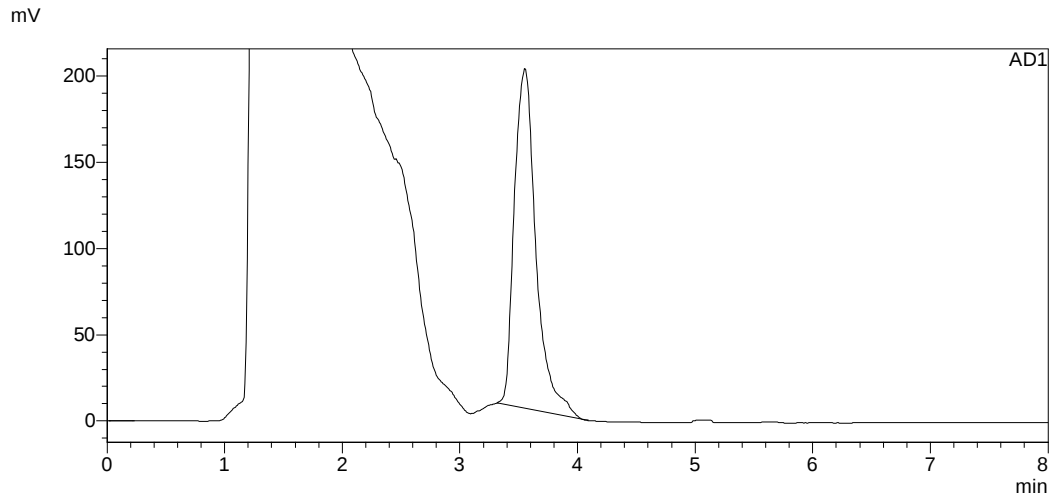
Geliştirilen ve valide edilen hızlı, sağlam, güvenilir, ucuz ve tekrarlanabilir YPSK-ELSD yöntemi ile tablet numuneleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde Gargara numunesinde 104,01 $\pm$ 4,05 mL/100 mL Efervesan tablet 1 numunesinde 2,36 $\pm$ 0,57 mg / 100 mg ve Efervesan tablet 2 numunesinde ise 5,37 $\pm$ 1,26 / 100 mg derişimlerine sahip ASP olduğu gözlemlenmiştir. YPSK-ELSD ile elde edilen numune kromatogramları Şekil 5.10 ila Şekil 5.24 arasında gösterilmiştir.



Şekil 5.10. YPSK-ELSD ile elde edilen gargara örnek kromatogramı



Şekil 5.11. YPSK-ELSD ile elde edilen Tablet 1 örnek kromatogramı



Şekil 5.12. YPSK-ELSD ile elde edilen Tablet 2 örnek kromatogramı

ASP içeren tablet örneklerinin miktarları Tablo 5.6.'de gösterilmektedir.

Tablo 5.7. *İncelenen numunelerin içerdikleri ASP miktarları*

Örnek no	Örnek adı	ASP içeriği [100 mg/mg ve 100mg/mL) $\pm$ SS (n=3)]
1	Gargara	104,01 $\pm$ 4,05 mL / 100 mL
2	Tablet 1	2,36 $\pm$ 0,57 mg / 100 mg
3	Tablet 2	5,37 $\pm$ 1,26 / 100 mg

6. SONUÇ VE TARTIŞMA

Son dönemlerde, ilaç ve gıda endüstrisinin gelişimiyle birlikte ASP tüketim miktarı büyük ölçüde artış göstermiştir. Gıdanın yanı sıra ilaçlar içerisinde de tatlandırıcı olarak sıklıkla kullanılan ASP miktarının belirlenmesi önem arz etmektedir. Tatlandırıcıların analizleri göz önüne alındığında en sık tercih edilen yöntemlerden biri yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemidir. İlaç sanayinde rutin etken madde analizlerinin yanı sıra yardımcı maddelerin analizleri de hızlı, hassas, güvenilir, ucuz, tekrarlanabilir olarak yapılması önem arz etmektedir. Bu çalışmada gargara ve efervesan tabletler içerisinde tatlandırıcı olarak kullanılan ASP'nin YPSK-ELSD ile analizi için bir yöntem geliştirilerek valide edilmiştir. Literatürde ASP'nin YPSK ile tayinini içeren çalışmalar ile kıyaslandığında ELSD dedektör kullanarak analizinin yapılması iyi bir alternatif olarak değerlendirilebilir. Ayrıca geliştirilen YPSK-ELSD yöntemi rutin ASP analizlerinde etkin bir şekilde kullanılabilir.

KAYNAKÇA

- Arora, S., Shendurse, A. M., Sharma, V., Wadhwa, B. K., & 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.
- Bergamo, A. B., Da Silva, J. A. F., & De Jesus, D. P. (2011). Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in soft drinks and tabletop sweetener formulations by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Food Chemistry*, 124(4), 1714-1717.
- Butchko HH, Stargel WW, Comer CP et al (2002) *Regul Toxicol Pharmacol* 35:S1
- Magnuson BA, Burdock GA, Doull J et al (2007) *Crit Rev Toxicol* 37:629
- Capello, C., Fischer, U., & 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., & Ferreira, I. C. (2017). XXI. yüzyılda gıda katkı maddesi olarak tatlandırıcılar: Bilinenlerin ve gelecek olanların gözden geçirilmesi. *Food and Chemical Toxicology*, 107, 302-317.
- Croitoru, M., Fülöp, I., Ajtay, M., Balogh, C., & Dogaru, M. (2011). Direct HPLC-UV determination of cyclamate, saccharine and aspartame from soft drinks. *Acta alimentaria*, 40(4), 459-465.
- Di Pietra, A. M., Cavrini, V., Bonazzi, D., & Benfenati, L. (1990). HPLC analysis of aspartame and saccharin in pharmaceutical and dietary formulations. *Chromatographia*, 30, 215-219.
- Fatibello-Filho, O., Marcolino-Junior, L. H., & Pereira, A. V. (1999). Solid-phase reactor with copper (II) phosphate for flow-injection spectrophotometric determination of aspartame in tabletop sweeteners. *Analytica chimica acta*, 384(2), 167-174.
- Fernandes, V. N. O., Fernandes, L. B., Vasconcellos, J. P., Jager, A. V., Tonin, F. G., & 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., & 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.
- Ibrahim, F. A., Elmansi, H., & 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.
- Idris, M., Varshney, K. M., Sudhakar, P., Shukla, S. K., & Baggi, T. R. (2012). HPLC determination of aspartame in tabletop sweeteners by precolumn derivatization using 2, 4-dinitrofluorobenzene. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(1), 522-527.
- 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., & 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 & Contaminants: Part A*, 34(5), 666-677.
- Li, D., Zheng, Q., Thomas, K. V., Dang, A. K., Binh, V. N., Anh, N. T. K., & 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., ... & Kim, S. H. (2013). HPLC-MS/MS analysis of 9 artificial sweeteners in imported foods. *Food Science and Biotechnology*, 22, 233-240.
- 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, 233-240.
- Liu, C. C., Ko, C. H., Wang, Y. N., Fu, L. M., & 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., & 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., & 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.
- 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.
- Ordoñez, E. Y., Rodil, R., Quintana, J. B., & 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., & 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 Gidaların Lezzetini Değiştirmek İçin Kullanılan Bazı Katkı Maddelerinin Eşzamanlı Analizi İşlenmiş Gidaların Lezzetini Değiştirmek İçin Kullanılan Bazı Katkı Maddelerinin Eşzamanlı Analizi* (Doctoral dissertation, Anadolu Üniversitesi (Türkiye)).
- Sezgin, B., Arlı, G., & Can, N. Ö. (2021). Simultaneous HPLC-DAD determination of seven intense sweeteners in foodstuffs and pharmaceuticals using a core-shell particle column. *Journal of Food Composition and Analysis*, 97, 103768.
- Shanmugavelan, P., Kim, S. Y., Kim, J. B., Kim, H. W., Cho, S. M., Kim, S. N., ... & 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 glutamatin çeşitli gıda maddelerinin içindeki miktarının tayini* (Doktora tezi, Anadolu Üniversitesi (Türkiye)).

- Soyseven, M., Sezgin, B. & 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.
- Tran, N. H., Hu, J., & 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., & 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.
- Zygler, A., Wasik, A., Kot-Wasik, A., & 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.