



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**TİCARİ ENERJİ İÇECEKLERİNDEKİ
BİLEŞENLERİN KANTİTATİF ANALİZLERİ İÇİN
KEMOMETRİK OPTİMİZASYON METODOLOJİSİ
KULLANILARAK AŞIRI YÜKSEK PERFORMANSLI
SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Nazangül ÜNAL

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Erdal DİNÇ**

**ANKARA
2023**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TİCARİ ENERJİ İÇECEKLERİNDEKİ
BİLEŞENLERİN KANTİTATİF ANALİZLERİ İÇİN
KEMOMETRİK OPTİMİZASYON METODOLOJİSİ
KULLANILARAK AŞIRI YÜKSEK PERFORMANSLI
SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Nazangül ÜNAL

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Erdal DİNÇ**

**Bu Araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Müdürlüğü'nün
22L0237001 Proje Numarası ile Desteklenmiştir.**

**ANKARA
2023**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Ticari Enerji İçeceklerindeki Bileşenlerin Kantitatif Analizleri İçin Kemometrik Optimizasyon Metodolojisi Kullanılarak Aşırı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemlerinin Geliştirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı : Nazangül ÜNAL

Tarih :

İmza :

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalında Nazangül ÜNAL tarafından hazırlanan “Ticari Enerji İçeceklerindeki Bileşenlerin Kantitatif Analizleri için Kemometrik Optimizasyon Metodolojisi Kullanılarak Aşırı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemlerinin Geliştirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:22/06/2023

Prof. Dr. Sacide ALTINÖZ

Başkent Üniversitesi

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Erdal DİNÇ
Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Zehra YAZAN
Ankara Üniversitesi

Doç. Dr. Özgür ÜSTÜNDAĞ
Ankara Üniversitesi

Doç. Dr. Eda BIYIK
Gazi Üniversitesi
Raportör

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Bileşiklerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	6
1.1.1. Niasin (B3 Vitamini)	6
1.1.2. Kafein	8
1.1.3. Sodyum Benzoat	11
1.1.4. Potasyum Sorbat	13
1.2. Bileşiklerin Etkinlikleri	15
1.2.1. Niasin (B3 Vitamini)	15
1.2.2. Kafein	18
1.2.3. Sodyum Benzoat	21
1.2.4. Potasyum Sorbat	25
1.3. Bileşiklerin Kantitatif Analizi	27
1.3.1. Niasinin Kantitatif Analizi	27
1.3.2. Kafeinin Kantitatif Analizi	41
1.3.3. Sodyum Bezoatın Kantitatif Analizi	57
1.3.4. Potasyum Sorbatın Kantitatif Analizi	68
2. GEREÇ ve YÖNTEM	82
2.1. Gereçler	82
2.1.1. Kullanılan Cihaz ve Gereçler	82
2.1.2. Kullanılan Bilgisayar Yazılımları	83
2.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	83
2.1.4. Ticari Enerji İçecekleri	83
2.2. Yöntem	84
2.2.1. Kromatografik Yöntemler	84
2.2.2. Kemometri	101
Deneyisel Tasarım ve Optimizasyon Metodolojisi	103
3. BULGULAR	117
3.1. Ticari Enerji İçeceği (I)'de İki Bileşen Analizi	117
3.1.1. İki Bileşen Analizi için Deneyisel Tasarım ve Optimizasyon ile UPLC Yönteminin Geliştirilmesi	117
3.1.2. UPLC Yöntemiyle Ticari Enerji İçeceği (I)'in Analizi	127
3.2. Ticari Enerji İçeceği (II)'de Dört Bileşen Analizi	146
3.2.1. Dört Bileşen Analizi için Deneyisel Tasarım ve Optimizasyon ile UPLC Yönteminin Geliştirilmesi	146

3.2.2. UPLC Yöntemiyle Ticari Enerji İçeceği (II)'nin Analizi	156
4. TARTIŞMA	175
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	179
ÖZET	180
SUMMARY	182
KAYNAKLAR	184
ÖZGEÇMİŞ	207



ÖNSÖZ

Bu doktora tez çalışmasında, bileşenlerin kantitatif tayinleri için yeni aşırı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (ultra high performance liquid chromatography → UPLC) yöntemleri geliştirilmiştir. UPLC yönteminin geliştirilmesinde kemometrik deneysel tasarım optimizasyon yöntemi kullanılmıştır. Optimum kromatografik koşulların belirlenmesi için değişik parametreler üzerinde çalışılmış (sıcaklık, hareketli faz akış hızı ve hareketli faz içerisindeki tampon yüzdesi) ve bu parametrelerin kromatografik ayırma cevabı üzerine etkileri araştırılmıştır. Deneysel tasarım optimizasyon metodolojisiyle belirlenen optimum deneysel şartlarda yöntem üzerine validasyon çalışmaları yapılmış ve bu yolla yöntemlerin geçerlilikleri kanıtlanmıştır. Daha sonra, optimize ve valide edilerek geliştirilen yöntemler iki farklı ticari enerji içeceklerindeki bileşenlerin analizine başarıyla uygulanmıştır.

Bu doktora tez çalışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Müdürlüğü'nün 22L0237001 nolu projesi ile desteklenmiştir. Bu çalışmanın gerçekleşmesinde maddi imkan sağlayan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine ve bu süreçte bizimle yakından ilgilenen BAP birimi personellerine katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmalarımın planlanması ve yürülmesinde, mesleki bilgi ve tecrübesiyle her zaman destek olan, cesaret veren, yol gösteren, her zaman öğrencisi olmakla gurur duyduğum, mesleki bilgi ve tecrübesine hayran olduğum, kutup yıldızım, çok değerli danışmanım Prof. Dr. Erdal DİNÇ'e bana kattıkları ve sabrı için sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Doktora tezimde, tez izleme komitemde yer alarak, değerli görüşleri ile tezime katkı sağlayan çok kıymetli hocam Prof. Dr. Zehra YAZAN'a çok teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmalarımın yürütülmesi süresince, bilgi ve deneyimleriyle destek

sağlayan tez izleme komitesi üyesi hocam Doç Dr. Özgür ÜSTÜNDAĞ'a teşekkür ederim.

Laboratuvara girdiğim ilk andan itibaren yanımda olan, desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşım Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda Dr. Arş. Gör. Zehra Ceren ERTEKİN ÖZKAN'a, laboratuvarda birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım ve bana kendimi şanslı hissettiren kıymetli arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Asiye ÜÇER'e hoşgörüsü, verdiği destek ve cesaret için teşekkür ederim.

Doktora eğitimimi sürdürmemde bana destek olan ve yakın ilgisini esirgemeyen Eşme Meslek Yüksekokulu Müdürü Öğr. Gör. Salih SEZER'e; her ihtiyaç duyduğumda yanımda olan, bana kendimi değerli hissettiren, ilgisini esirgemeyen kıymetli arkadaşım Öğr. Gör. Mustafa ATALAN'a bana olan inancı ve desteği için teşekkür ederim. Tanıdığım ilk günden beri yanımda olan, benden sevgi ve şefkatlerini esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan dolayı kendimi şanslı hissettiğim başta Öğr. Gör. Nuray PÜTKÜL olmak üzere Uşak Üniversitesi Eşme Meslek Yüksekokulu'nda görev yapan tüm değerli mesai arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Dünyaya gözümü açtığım ilk günden beri beni koşulsuz seven, verdiğim her kararın arkasında fedakârca duran ve benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bana inanan annem, babam ve abime; her zaman yanımda olan, benden sevgisini, şefkatini ve hoşgörüsünü esirgemeyen, dostum ve aynı zamanda yengem olan Gönül ÜNAL'a; varlığıyla dünyamı güzelleştiren, anlamlı hale getiren, yaşantıma renk katan, yaşama sevincim, biricik yeğenim Mehmet Ali ÜNAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Hazırlamış olduğum bu tezi iyi ve kötü günümde her daim yanımda olan başta ailem olmak üzere tüm güzel insanlara ithaf ediyorum.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADI	Kabul Edilebilir Günlük Alım Miktarı
ADME	Adsorpsiyon, Dağılım, Metabolizma, Boşaltım
ADP	Adenozin Trifosfat
AK47	AK47 Enerji İçeceği
ANOVA	Varyans Analizi
ATP	Adenozin Trifosfat
BA	Benzoik Asit
BBD	Box-Behnken Tasarımı
BEH	Etilen Köprülü Hybrid
BGS	Burn Gold Spark Enerji İçeceği
BSS	Bağıl Standart Sapma
B1	Tiyamin
B2	Riboflavin
B3	B3 Vitamini
B5	Pantotenik Asit
B6	Piridoksin
B8	Biyotin
B9	Folik Asit
B12	Siyanokobalamin
CAF	Caffeine
CCD	Merkezi Bileşenli Tasarım
CE	Kapiler Elektroforez
C ₁₈	Oktadesilsilan
EC	Avrupa Parlamentosu
EDO	Deneysel Tasarım Optimizasyon
ESFA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
ESI	Elektrosprey İyonizasyon
E210	Benzoik Asit
E211	Sodyum Benzoat
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü

FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FFD	Tam Faktöriyel Tasarım
FrFD	Kesirli Faktöriyel Tasarım
FSH	Folikül uyarıcı Hormon
FT-NIR	Yakın İnfrared Spektroskopisi
GRAS	Genellikle Güvenli Olarak Kabul Edilmiştir
h	Pik Yüksekliği
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
H ₃ PO ₄	Fosforik Asit
ICRF	Kromatografik Cevap Faktörü
IEC	İyon Değiştirme Kromatografisi
IS	İç Standart
JECFA	Gıda Katkı Maddeleri Ortak Komitesi
KAF	Kafein
KCF	Kromatografik Cevap Fonksiyonu
LC	Sıvı Kromatografisi
LC-MS	Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometresi
LDA	Doğrusal Diskriminant Analizi
LD50	Ölümcül Doz
LH	Lüteinleştirici Hormon
LLOD	Alt Gözlenebilme Sınırı
LOD	Gözlenebilme Sınırı
LOQ	Tayin Sınırı
MEECK	Mikroemülsiyon Elektrokinetik Kromatografi
MeOH	Metanol
MSPE	Magnetik Katı Faz Ekstraksiyon
N	Teorik Tabaka Sayısı
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADP	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NF	Normal Faz
(NH ₄) ₂ CO ₃	Amonyum Karbonat

NIRS	Yakın Kızılötesi Yansıma Spektroskopisi
PBD	Plackett-Burman Tasarımı
PCA	Temel Bileşenler Analizi
PDA	Fotodiyot Dizisi Dedektörü
PLC	En Küçük Kareler Yöntemi
PLSR	Kısmi En Küçük Kareler Regresyonu
PPT	Protein Çöktürme Tekniği
PS	Potasyum Sorbat
R	Ayırıcılık
RDA	Günlük Besin Alım Miktarı
RMS	Cevap Yüzey Metodolojisi
SA	Sorbik Asit
SB	Sodyum Benzoat
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SÇV	Suda Çözünen Vitaminler
SPE	Katı Faz Ekstraksiyonu
SS	Standart Sapma
T	Kuyruklanma
TD	Taguchi Tasarımı
TEA	Trietilamin
t_R	Alıkonma Zamanı
t_0	Ölü Zaman
UFLC	Ultra Hızlı Sıvı Kromatografisi
UPLC	Aşırı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
UV	Ultraviyole
UV-GB	Ultraviyole- Görünür Bölge
w	Taban Genişliği
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
α	Seçicilik

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Niasinin kimyasal yapısı	6
Şekil 1.2. Niasinin (15 µg/mL), 0,1 M HCl çözeltisi içerisindeki UV spektrumu	7
Şekil 1.3. Kafeinin kimyasal yapısı	9
Şekil 1.4. Kafeinin (15 µg/mL), 0,1 M HCl çözeltisi içerisindeki UV spektrumu	10
Şekil 1.5. Sodyum benzoatın kimyasal yapısı	11
Şekil 1.6. Sodyum benzoatın (15 µg/mL), 0,1 M HCl çözeltisi içerisindeki UV spektrumu	12
Şekil 1.7. Potasyum sorbatın kimyasal yapısı	13
Şekil 1.8. Potasyum sorbatın (15 µg/mL), 0,1 M HCl çözeltisi içerisindeki UV spektrumu	14
Şekil 2.1. Kromatografinin sınıflandırılması	85
Şekil 2.2. Kromatografik yöntemler	86
Şekil 2.3. X, Y ve Z bileşiklerinin UPLC ile kromatografik olarak ayrılması	93
Şekil 2.4. UPLC Cihazının şematik gösterimi	94
Şekil 2.5. İki bileşenli bir numuneye ait kromatogram	96
Şekil 2.6. X ve Y maddelerine ait pikleri gösteren kromatogram	99
Şekil 2.7. Piklerin ayrılmasını gösteren kromatogramlar	100
Şekil 2.8. Pik simetrisini gösteren kromatogram	101
Şekil 2.9. Bir deneyde bir faktöre ait seviyelerin eksen üzerinde gösterimi	107
Şekil 2.10. Deneysel tasarımın şematik gösterimi	108
Şekil 2.11. Carle'in Q kriter hesaplamasındaki parametreleri gösteren kromatogram	115
Şekil 3.1. Ticari enerji içeceği (I) numunesine uygulanan ve şartları deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojisi kullanılarak oluşturulan 27 farklı kromatografik şarta sahip deneyin 284 nm'deki dedeksiyonla elde edilen kromatogramları	122
Şekil 3.2. 3D yüzey cevap metodolojileri ve bunlara ait eş yükselti eğrileri	126
Şekil 3.3. Bileşenlerin UV spektrumları ve kromatogramları	129
Şekil 3.4. Ticari enerji içeceği (I)'in içeriğinde bulunan KAF ve PS'nin kalibrasyon çözeltileri için elde edilen kromatogramlar	131
Şekil 3.5. UPLC yönteminin ticari enerji içeceği (I) numunesine uygulanması ile elde edilen kromatogramlar	143

Şekil 3.6. B3, SB, PS ve KAF'nin sentetik karışımlarına uygulanan ve şartları deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojisi kullanılarak oluşturulan 27 farklı kromatografik şarta sahip deneyin 230 nm'deki dedeksiyonla elde edilen kromatogramları	150
Şekil 3.7. 3D cevap yüzey metodolojileri ve bunlara ait eş yükselti eğrileri	155
Şekil 3.8. B3, SB, PS ve KAF bileşiklerine ait UV spektrumları ve kromatogramları	159
Şekil 3.9. B3, SB, PS ve KAF içeren kalibrasyon çözeltilerinin kromatogramları	161
Şekil 3.10. UPLC yönteminin ticari enerji içeceği (II) numunesine uygulanmasıyla B3, SB, PS ve KAF bileşenlerinin kromatogramları	172



ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. Enerji içeceği (I)'in deneysel tasarımı için UPLC yönteminin uygulanmasıyla belirlenen faktörler, çalışma aralıkları ve seviyeler	119
Çizelge 3.2. Tam faktöriyel tasarım metodolojinin enerji içeceği (I) numunesine uygulanması ile hesaplanan kromatografik cevap faktörü (KFC) değerleri	120
Çizelge 3.3. Enerji içeceği (I) numunesinin modelleme çalışması ile edilen İkinci dereceden polinomial fonksiyonun istatistiksel P testi sonuçları	124
Çizelge 3.4. Enerji içeceği (I)'de bulunan KAF ve PS için elde edilen doğrusal regresyon analizi ve istatistiksel analiz sonuçları	133
Çizelge 3.5. KAF ve PS'nin miktar tayinleri için geliştirilen UPLC yönteminin validasyon çalışmalarından elde edilen istatistiksel veriler	136
Çizelge 3.6. Gün içi ve günler arası çözeltilerinin deney verileri	138
Çizelge 3.7. UPLC yönteminin standart ekleme numunelerine uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar	140
Çizelge 3.8. UPLC yöntemiyle KAF ve PS analizinde elde edilen system uygunluk değerleri	141
Çizelge 3.9. UPLC yönteminin enerji içeceği (I) numunesinde KAF ve PS'nin eş zamanlı miktar analizlerine uygulanmasıyla elde edilen istatistiksel sonuçlar	145
Çizelge 3.10. Enerji içeceği (II)'in deneysel tasarımı için UPLC yönteminin uygulanmasıyla belirlenen faktörler, çalışma aralıkları ve seviyeler	147
Çizelge 3.11. Ticari enerji içeceği (II)'ye tam faktöriyel tasarım uygulanmasıyla hesaplanan KCF değerleri	151
Çizelge 3.12. İkinci dereceden polinomial fonksiyon için bulunan istatistiki t- ve F-testlerinin sonuçları	153
Çizelge 3.13. Doğrusal regresyon analizi ve istatistiksel analiz sonuçları	163
Çizelge 3.14. Geliştirilen UPLC yöntemi ile B3, SB, PS ve KAF'ın miktar tayini için gerçekleştirilen validasyon çalışmasının istatistiksel sonuçları	165
Çizelge 3.15. UPLC yönteminin gün içi ve günler arası çözeltilerine uygulanması ile elde edilen istatistiksel veriler	167
Çizelge 3.16. UPLC yönteminin standart ekleme numunelerine uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar	169
Çizelge 3.17. B3, SB, PS ve KAF karışımının analizi için geliştirilen UPLC yöntemlerine ait sistem uygunluk testi sonuçları	170

Çizelge 3.18. UPLC yönteminin ticari enerji içeceği (II) numunesine uygulanmasıyla numunede bulunan B3, SB, PS ve KAF miktarları

174



1. GİRİŞ

Enerji içecekleri, vücudumuzda fizyolojik etkileri olan, bir veya daha fazla fonksiyonel madde içeren ve özel olarak tasarlanmış ürünlerdir (Hu ve ark., 2018; Ruyi ve Chenggang, 2016). Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının 2017/4 sayılı Enerji İçecekleri Tebliği, enerji içeceklerini, “Kafein içeren, taurin, glukoronolakton, inositol, karbonhidrat, aminoasitler, vitaminler, mineraller ve diğer gıda ve bileşenlerini içerebilen, aromalandırılmış alkolsüz içecekler” olarak tanımlamıştır (Türk Gıda Kodeksi Enerji İçecekleri Tebliği, 2017).

Enerji içecekleri" ilk olarak 1960'lı yıllarda Avrupa ve Asya'da ortaya çıkmış olsa da, ürün çeşitliliğinin hızla artması ve insanlar, özellikle de gençler ve ergenler tarafından yaygın bir biçimde kullanılmaya başlanması, "Red Bull"un 1987'de Avusturya'da ve 1997'de ABD'de piyasaya sürülmesi ile gerçekleşmiştir (Reissig ve ark., 2009). Türkiye’de enerji içecekleri tüketimi ilk kez 1990’lı yılların sonuna doğru, tek ürün olan Red Bull ile başlamış ve bugün 40’ın üzerinde ürün çeşidi ile artmaya devam etmiştir (Avcı, 2017).

Asya-Pasifik, Kuzey Amerika, Batı Avrupa, Güney Amerika, Doğu Avrupa, Orta Doğu ve Afrika’yı kapsayan bir rapora göre küresel enerji içecekleri pazarının, 2022'de 58,48 milyar dolardan 2023'te %7,5 bileşik yıllık büyüme oranıyla (CAGR) 62,89 milyar dolara yükseldiği ifade edilmektedir. Yine aynı rapora göre bu oranın devam ederek büyümesi beklenmektedir. Enerji içecekleri tüketiminin her geçen gün artması ve buna bağlı olarak artan vaka raporları, zehir kontrol merkezlerine yapılan çağrılar, acil servis başvurularındaki artış, ülkelerin otoritelerini bu içeceklerin içerikleri konusunda yasal düzenlemeler yapmaya zorlanmıştır (Gurley ve ark., 2015; Seifert ve ark., 2013). Enerji içeceklerinin içeriğinin düzenlenmesi, ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir (Heckman ve ark., 2010; Research and Markets, 2023).

Örneğin; ABD’de enerji içeceklerindeki kafein miktarına dair bir sınırlama bulunmazken (Heckman ve ark., 2010), Türkiye’de 2017/4 sayılı Türk Gıda Kodeksi

Enerji İçecekleri Tebliği'ne göre bir enerji içeceğinde bulunabilecek maksimum kafein miktarı 150 mg/L'dir. Türk Gıda kodeksinde enerji içeceklerinde bulunan diğer bileşenlere ait sınırlama ise şu şekildedir: glukoronolakton 20 mg/L, inositol 100 mg/L ve taurin 800 mg/L (Türk Gıda Kodeksi Enerji İçecekleri Tebliği, 2017).

Piyasada benzer içeriğe sahip çok çeşitli enerji içeceği bulunmaktadır. Bu içecekler temelde ortak olarak kafein ve taurin içerirler fakat içeceklerdeki bu maddelere ek olarak şekerler (şekersiz markalar da mevcuttur), vitaminler, koruyucu maddeler, renklendiriciler, guarana, vb. pek çok madde de eklenmiştir. Enerji içecekleri pazar payının, her geçen gün artması üreticiler arasında rekabete neden olmuş ve bunun sonucu olarak da üreticiler yeni müşteriler çekmek, satışlarını arttırmak ve rekabette üstünlük elde edebilmek için enerji içeceklerine yeni tatlar katmışlardır. Türkiye'de ticari enerji içecekleri pazarında yer alan çok sayıda değişik içeriklere sahip ürünler bulunmaktadır.

Enerji içecekleri, yutulduktan sonra, gastrointestinal sistem tarafından hızlıca ve tamamen emilerek vücuda dağılırlar (Nadeem ve ark., 2021). Enerji içeceği üreticileri, ürünlerin raf ömrünü uzatmak, tatlandırmak ve daha fonksiyonel hale getirmek için ürünlerinin içeriğini zenginleştirirler (Hu ve ark., 2018; Ruyi ve Chenggang, 2016). Enerji içeceklerinin içerisine bu amaçla vitaminler (niasin, piridoksin gibi suda çözünen vitaminler), koruyucular (sıklıkla benzoik ve sorbik asitler ve bunların tuzları), tatlandırıcılar (asesülfam-K, sorbitol, vb.), renklendiriciler (allura red, brilliant mavisi), kafein, glukuronik asit, taurin ve bitki ekstraktları eklenir. Enerji içeceklerinde bulunan bu maddelerin her birinin insan vücudunda farklı etki mekanizmaları bulunmaktadır. Örneğin; kafein beyinde norepinefrin, dopamin ve serotonin salınımına ve dolaşımdaki katekolaminlerin artmasına neden olan adenozin reseptörlerinin antagonizması olarak etki eder (Nadeem ve ark., 2021). Niasin, kandaki yüksek yoğunluklu lipoprotein düzeylerini arttırarak kardiyovasküler hastalık riskini azaltır. Ayrıca, vücudun adrenal bezlerde ve vücudun diğer kısımlarında cinsiyet ve stresle ilgili çeşitli hormonlar üretmesine yardımcı olur (Ameta ve Singh, 2014).

Son yıllarda insanların iş temposunun artması ve kişilerin bu tempoya ayak uydurabilmek amacıyla daha fazla enerjiye ihtiyaç duyması, enerji içeceği tüketiminin de artmasına neden olmuştur. İnsanları bu içecekleri kullanmaya yönelten diğer nedenlerden bazıları ise; fiziksel dayanıklılığı, konsantrasyon düzeyini ve psikomotor işlevlerin düzeyini arttırmak, uykudan kaçınmak, susuzluğu gidermek ve metabolizmayı uyarmaktır (Aydın ve Dede, 2016; Chita ve ark., 2010; Medina ve ark., 2020; Zielinska ve ark., 2022).

Ticari enerji içeceklerinin olumlu etkilerinin yanı sıra; uykusuzluk, stress, depresif ruh hali, sinirlilik, karaciğer ve sinir hasarı, gastrointestinal hastalıklar gibi olumsuz etkileri de bulunmaktadır (Nadeem ve ark., 2021; Wolk ve ark., 2012). Ayrıca insan sağlığı açısından ciddi riskler barındırmaktadır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, bu risklere neden olan maddeler arasında taurin, kafein ve şeker başta gelmektedir (Zielinska ve ark., 2022). Bu etkiler enerji içeceğinin içerisinde bulunan bileşiklerin miktarına göre farklılık göstermektedir ve bu olumsuz etkilere genellikle aşırı tüketim durumunda rastlanmaktadır. Özellikle genç nüfusu hedef alan bu içeceklerin denetlenmesi ve takibi oldukça zordur. Denetimin yeterli düzeyde olmaması, bu ürünlerin sayısının ve çeşidinin her geçen gün kontrolsüz bir biçimde artmasına neden olmaktadır.

Ticari enerji içeceklerinin içeriğindeki maddelerin insan sağlığı açısından hayati öneme sahip olması, bu içeceklerin kalite kontrollerinin yapılmasını ve güvenilirliklerinin araştırılmasını zorunlu hale getirmiştir. Bu amaçla, pek çok analiz yöntemi geliştirilmiştir. Fakat bu içeceklerin ürün içeriğinin sürekli güncellenerek değişmesi ve zenginleşmesi, geliştirilmiş olan analiz yöntemlerinin pek çoğunun da etkisiz hale gelmesine neden olmuştur. Bu durum ticari içeceklerinin kalite kontrol ve rutin analizleri için yeni analiz yöntemlerinin geliştirilmesi zaruriyetini doğurmuştur. Ticari enerji içecekleri gibi kompleks yapıları numune analizlerinde, numunede bulunan bileşiklerin benzer kimyasal yapıda olmaları, piklerin örtüşmesi, numune matrisinin analiz üzerine girişimde bulunması gibi pek çok nedenlerden dolayı klasik analiz yöntemleri ile numunedeki istenen bileşen(ler)in analizi zorlaşmaktadır. Çoğu zaman klasik analiz yöntemlerinde bir numunedeki bileşiği

analiz etmek için ekstra ön işlemler gerçekleştirilir. Bu durum analiz süresinin uzamasına, daha fazla iş gücüne ve daha fazla madde harcanarak analizin daha da maliyetli olmasına neden olur. Ayrıca ön işlem basamaklarının artması analizin doğruluğunun ve seçiciliğinin azalmasına da neden olur. Tüm bu yöntemlerin getirmiş olduğu dezavantajların üstesinden gelmek için araştırmacılar bu yöntemlere alternatif olarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (high performance liquid chromatography → HPLC) yöntemini tercih etmişlerdir. HPLC yöntemi, numunedeki bileşiklerin farklı kimyasal yapıda ve polaritede olmaları sebebiyle herhangi bir ön işleme ihtiyaç duyulmadan, daha doğru ve seçici bir biçimde, daha az çözücü kullanarak, kısa sürede analizlerin gerçekleşmesini sağlamaktadır. Bu avantajlarından dolayı özellikle gıda ve ilaç endüstrisinde yaygın bir biçimde kullanılmaktadır (Dönmez ve ark., 2020).

Enerji içecekleri gibi kompleks yapılı ürün analizlerinde kullanılan yöntemlerin daha seçici ve güvenilir hale getirilmesi için deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojilerine sıklıkla başvurulmaktadır. Optimizasyon, bir deney için sistematik olarak optimum koşulların bulunması için kimyada en yaygın kullanılan uygulamalardan biridir. Bir analiz metodunun geliştirilmesinde en önemli adım olan optimizasyon çalışmaları ile; en doğru, en kesin, en hassas, en güvenilir, düşük maliyetli ve hızlı analiz sonuçlarının elde edilebileceği analiz koşullarının belirlenmesi hedeflenir. Optimizasyon çalışmalarında bir veya daha fazla değişkenin deney üzerindeki etkileri araştırılır. Bunun için, değişkenler dışındaki tüm deneysel şartlar sabit tutulur ve seçilen değişkenlerin farklı değerleri ile deneyler tasarlanır ve bu değişkenlerin farklı seviyeleri (düşük (-1), orta (0) ve yüksek (+1)) ile oluşturulan deneylerin her birinin cevap yüzey metodolojileri incelenerek deneylerin analitik cevap faktörü hesaplanır ve bu şekilde analiz için en uygun deney şartları belirlenmiş olur. Deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojisi ile hem her bir değişkenin deney üzerindeki etkisi tek tek belirlenmiş olur hem de değişkenler arasındaki ilişki bir bütün halinde gözler önüne serilir.

Bu doktora tez çalışmasında Türkiye piyasasında bulunan değişik bileşimlere sahip iki farklı ticari içeceği seçilmiştir. Bu iki farklı ticari içeceklerindeki bileşenlerin miktar tayinleri için kemometrik optimizasyon metodolojisi kullanılarak yeni UPLC yöntemleri geliştirilmiştir.

Bu doktora tezinde yapılan çalışmalarda iki farklı endüstriyel ticari içeceklerinin kantitatif analizleri için yeni geliştirilen UPLC yöntemlerinin optimal deneysel koşulların belirlenmesi tam faktöriyel tasarım (full factorial design → FFD) ve optimizasyon işlemiyle gerçekleştirilmiştir. Kemometrik optimizasyon işleminde sıcaklık, akış hızı ve hareketli fazdaki tampon yüzdesi faktörleri ve geliştirilmiş kromatografik cevap fonksiyonu (KCF) (function of improved chromatographic response → ICRF) kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında yararlanılan deneysel tasarım optimizasyon (Experimental design and optimization → EDO) tekniği ile optimize edilerek geliştirilen UPLC yöntemleri ile ticari enerji içeceğine ait birinci ticari içecek ürününde kafein (KAF) ve potasyum sorbatın (PS); ikincisinde ise B3 Vitamini (B3), sodyum benzoat (SB), PS ve KAF'ın eş zamanlı kantitatif analizleri gerçekleştirilmiştir. Kaynak taramalarından bu güne kadar yapılmış olan çalışmalar incelendiğinde, bu doktora tezinin de konusu olan bileşenlerin enerji içecekleri gibi kompleks yapılı ürünlerin analizleri için ilk kez EDO tekniği ile geliştirilen UPLC yöntemleriyle belirlenmiştir. Bu nedenle, geliştirilen yöntemlerin, gıda endüstrisinde ürünlerin kalite kontrol ve rutin analizleri için alternatif yöntemlerdir. Geliştirilen yöntemler, doğru, güvenilir, hızlı, kolay uygulanabilir ve çevre dostu yöntemler olmaları nedeniyle oldukça büyük avantajlara sahiptirler. Ayrıca, bu çalışma ile elde edilen çıktılar, gıda endüstrisinde ticari içeceklerinin analizlerinde kullanılabileceklerdir.

Dolayısıyla, bu doktora tez araştırmasının amacı, hem enerji içecekleri hem de gıda endüstrisinde gıdaların üretim ve kalite kontrol aşamalarında kullanılabilecek yeni kromatografik yöntemlerin geliştirilmesidir. Çalışmada kompleks içerikli ticari enerji içeceklerindeki analitlerin analizlerinin EDO tekniği ile geliştirilen UPLC yöntemleri sayesinde sınırlı bir deneysel çalışmayla kısa alıkonma süresi (short

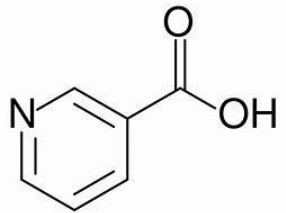
retention time) ve yüksek ayırma gücü (high resolution) ile yapılabileceği ispat edilmiştir.

1.1. Bileşiklerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Bu doktora tez çalışmasında farklı içeriğe sahip iki ayrı ticari enerji içeceği (ticari enerji içeceği (I), ticari enerji içeceği (II)) numunesi içerisinde yer alan ve tayin sınırları içerisine giren bileşenlerin deneysel tasarım ve optimizasyon medolojilerinden tam faktöriyel tasarım ile şartları belirlenen UPLC yöntemleri ile eş zamanlı miktar tayinleri gerçekleştirildi. Üretici firmalar, ticari enerji içeceklerine doğal bitki ekstraktlarının yanında bir takım bileşikler de eklemişlerdir. Aşağıda ticari enerji içeceği (I) içerisinde yer alan KAF ve PS ve ticari enerji içeceği (II) numunesinde bulunan B3, SB, PS ve KAF hakkında ayrıntılı bilgi sunulmaktadır

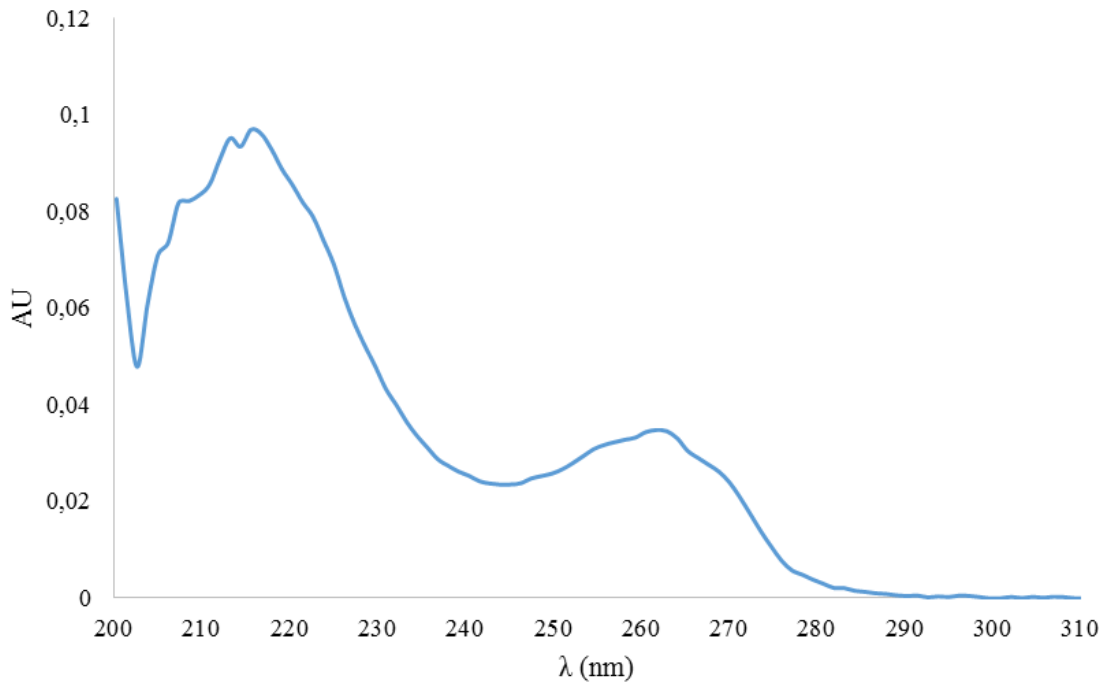
1.1.1. Niasin (B3 Vitamini)

1912 yılında Kazimierz Funk, pirinç kepeğinde Vitamin ararken Nikotinik asidi (niasin) keşfetmiştir. B3 vitamini, nikotinik asit veya PP vitamini olarak da bilinen Niasin (B3), suda çözünen bir B-kompleksi vitaminidir. Niasin, $C_6H_5NO_2$ kimyasal yapısına sahip (Şekil 1.1), piridin beta karboksilik asittir. Literatürlerde nikotinik asit/nikotinamid terimleri yaygın olarak kullanılırken, tıpta daha çok niasin/niasinamid terimleri tercih edilmektedir (Aguilera, 2012; Brody, 1998; Panda, 2003).



Şekil 1.1. Niasinin kimyasal yapısı.

IUPAC ismi	: Piridin-3-karboksilik asit
Kapalı formülü	: $C_6H_5NO_2$
Molekül ağırlığı	: 123,11 g/mol
pKa	: pKa ₁ : 2,07, pKa ₂ : 4,81 (Wysoczanska ve ark., 2020) : 2,20 (Vallez-Gomis ve ark., 2021) : 4,87 (da Silva ve ark., 2013)
Log P	: 0,219
Erime noktası	: 234-237 °C
Çözünürlük	:Sudaki çözünürlüğü: 0,018 g/mL, organik çözücülerde çözünmez veya çok az çözünür (Vallez-Gomis ve ark., 2021; Wysoczanska ve ark., 2020)
UV-GB Spektrumu	: Niasinin UV spektrumu Şekil 1.2’de verilmiştir.



Şekil 1.2. Niasinin (15 µg/mL), 0,1 M HCl çözeltisi içerisindeki UV spektrumu.

Niasin suda çözünürlüğü yüksek olan beyaz kristal bir maddedir. Nikotinik asit çift-iyon (zwitteriyonik) karakterli bir maddedir; yüksek pH'ta karboksilik fonksiyonda negatif olarak yüklenirken, düşük pH'ta piridinil nitrojende pozitif

olarak yüklenir. Bu nedenle amfoterik bir molekül olarak kabul edilir çünkü bazların yanı sıra asitlerle de tuzlar oluşturur. Nikotinik asit kuru formda oldukça kararlıdır (Aguilera, 2012; Brody, 1998; Panda, 2003). B3 vitamini asidik ve bazik çözeltilerde ve havaya maruz bırakıldığında tüm vitaminler arasında en kararl olmas nedeniyle enerji içeceklerinde en çok tercih edilen vitamindir (Pencheva ve Georgieva, 2014).

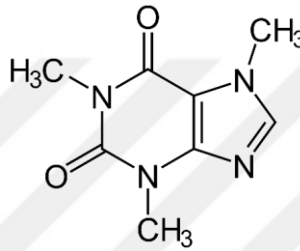
Niasin, NH_2 radikali eklendiğinde veya ağızdan alındığında vücutta nikotinamide dönüşür. Niasin, klasik rolü redoks reaksiyonlarına katılmak olan koenzimler olan nikotinamid adenin dinükleotide (NAD) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfatın (NADP) öncüsüdür. NADP, NAD'nin fosforile edilmiş bir formudur. Bu bileşikler, enerji üretimi için kritik olan hücresel oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarına katılır. NAD, karbonhidratların, yağ asitlerinin, keton cisimlerinin, amino asitlerin ve alkolün parçalanmasını içeren katabolik reaksiyonlarda bir elektron alıcısı olma eğilimindedir ve enerji üreten reaksiyonlarda kullanılır (Aguilera, 2012; Brody, 1998; Panda, 2003).

1.1.2. Kafein

Eski çağlardan beri insanlar alkaloid içeren bitkilerden ilaç, çay ve iksir şeklinde faydalanmaktadırlar. Alkaloidler, bitkilerde doğal olarak bulunan, çeşitli farmakolojik ve farmakodinamik etkilere sahip olan, yapılarında halka içerisinde bir veya daha fazla azot içeren, bazik karakterli maddelerdir. Alkaloidler genellikle 5 veya 6 üyeli azot halkaları şeklinde bulunurlar. Doymamış azotlu altılı halkalı olanına piridin, doymuş olanına ise piperidin adı verilir. Piridin türevi çok sayıda alkaloid bulunmaktadır: konin, pelletierin, konisein gibi. Lobelia türlerinin alkaloidleri, lobelanin, lobelin, lobelanidin piperidin türevi alkaloidlerdir. Ksantinin okso formunun metilli türevleri kafein, teobromin (3,7-dimetilksantin) ve teofilin (1,3- dimetilksantin) gibi alkaloidleri meydana getirmektedir. Bu maddeler bitkilerin farklı kısımlarında farklı miktarlarda bulunurlar. Bitkilerde alkaloidlerin en fazla olduğu kısımlar kök, kabuk, yaprak, meyve ve tohumlardır. Alkaloidler analjezik, antiseptik, antienflamatuar, antifungal, antibakteriyel, antiviral, antioksidan,

antimutajenik, sedatif ve stomatik etkiler göstermektedir. Alkaloitlerin çoğu renksizdir ve tadları acıdır, bazıları ise renklidir (sanguinarin kırmızı, berberin sarı) (Tanker ve Tanker, 2003; Skoog ve ark., 2007). Bu doktora tez çalışmasında, ticari enerji içeceklerinin insan sağlığı açısından tehdit oluşturmasının en önemli unsurlarından biri olan kafein alkoidi ele alınmıştır.

Kafein (KAF), kimyasal formülü $C_8H_{10}N_4O_2$ olan ve 1,3,7-trimetilksantin olarak da bilinen metilksantin alkaloidi olan bir pürindir. (Şekil 1.3).

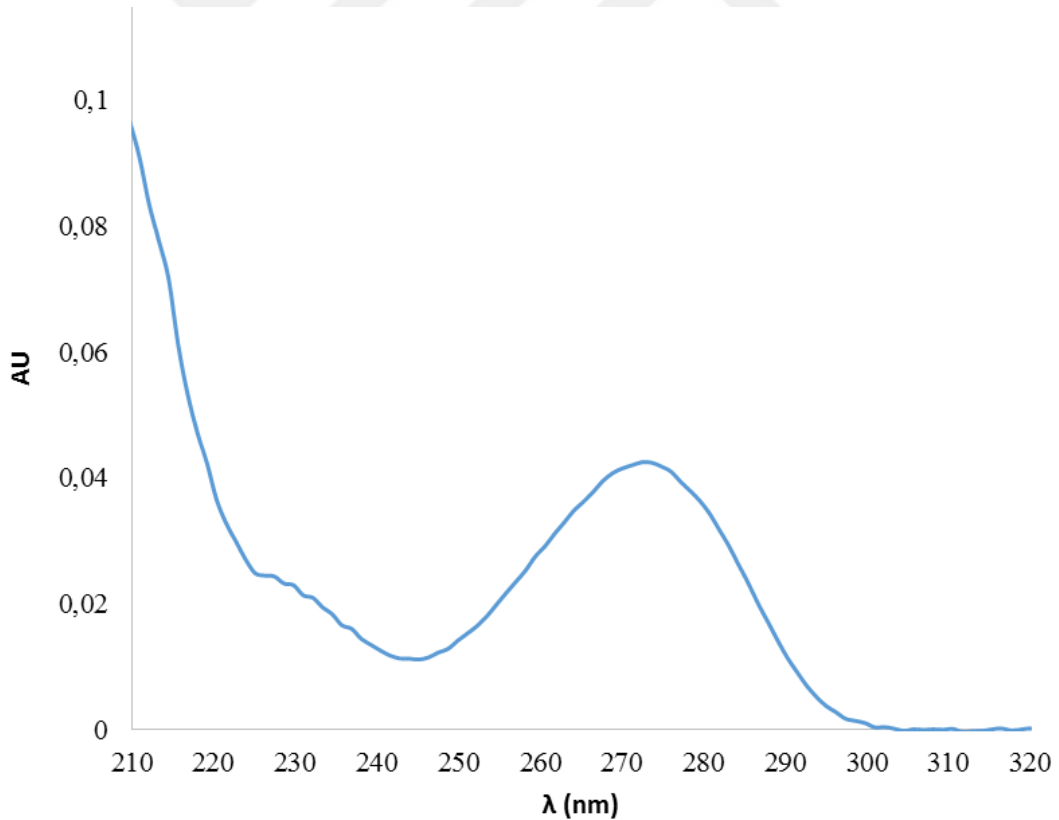


Şekil 1.3. Kafeinin kimyasal yapısı.

IUPAC ismi	: 1,3,7-trimetilksantin
Kapalı formülü	: $C_8H_{10}N_4O_2$
Fiziksel özellikleri	: Beyaz kristal toz formunda, tadı acı ve kokusuzdur
Molekül ağırlığı	: 194,19 g/mol
Yoğunluk	: 1,2 g/cm ³
pKa	: 0,6 (Halka ve ark., 2010) : 1,0 (Wang ve Lau, 1998) : 14 (Halka ve ark., 2010; Wang ve Lau, 1998)
Kaynama Noktası	: 178 °C
Erime Noktası	: 238 °C (susuz)
Suda Çözünürlüğü	: 21,7 mg/mL (25 °C) : 180 mg/mL (80 °C) (Nonthakaew ve ark., 2015).
UV-GB Spektrumu	: Kafeinin UV spektrumu Şekil 1.4’de verilmiştir.

Kafein, organik çözücüler kullanılarak ekstrakte edilmektedir. Etanolde çözünürlüğü 1,5 g/100 mL'dir ve eterde az çözünür. Kafein molekülleri, hidrojen bağları ile bir arada tutulur ve hafif bazik yapıya sahip aşiral bir moleküldür (Vijayakumar ve ark., 2014).

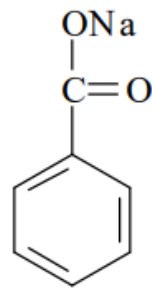
Kafein, bir pirimidindion ve imidazol olmak üzere iki halka içerir. Pirimidindion halkası, iki amid fonksiyonel grubu içerir ve bu halka içindeki altı atomun tümü sp^2 hibritleşmesi yapmıştır. İmidazol halkası da yapısında iki azot bulundurur ve rezonans bir yapıya sahiptir. Kafein vücuda alındıktan sonra metabolitleri olan paraksantin (%84), teobromin (%12) ve teofiline (%4) dönüşür. Bu metabolitler arasında en az toksisiteye sahip olan madde paraksantindir. Bu metabolitlerin her biri metabolize edildikten sonra idrar yoluyla vücuttan atılır (Gramza Michalowska, 2014; Gressner ve ark., 2009).



Şekil 1.4. Kafeinin (15 µg/mL), 0,1 M HCl çözeltisi içerisindeki UV spektrumu.

1.1.3. Sodyum Benzoat

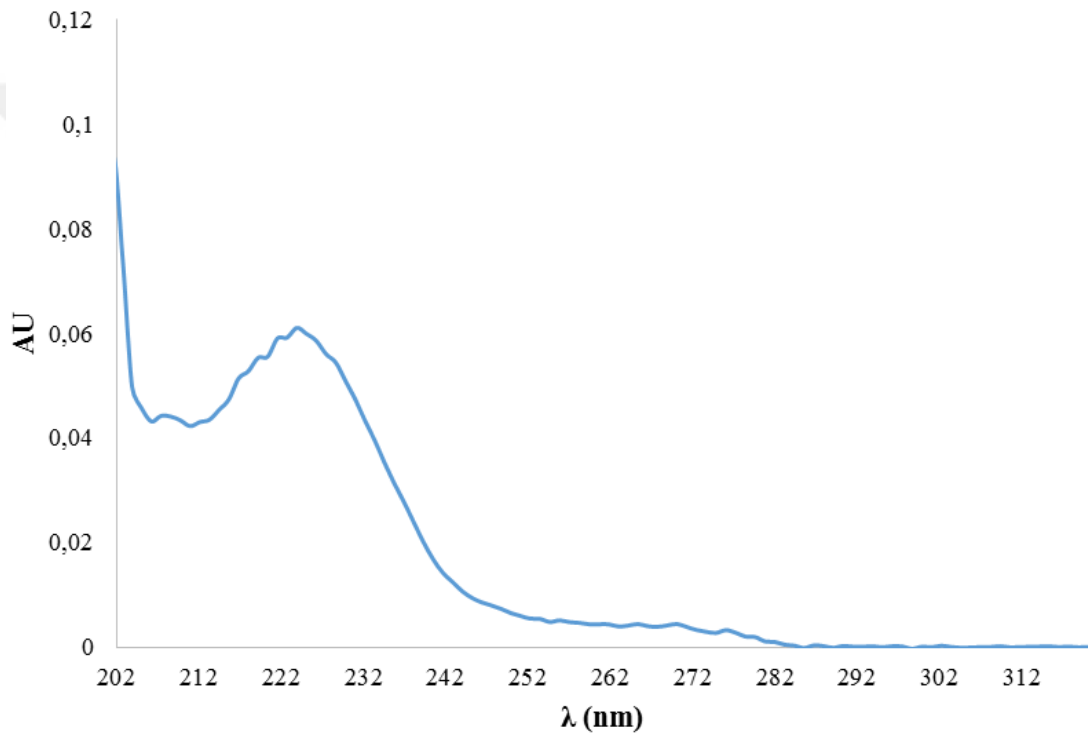
Benzoik asit (BA), suda az çözünen beyaz bir katıdır (Hamzah ve ark., 2011). Pek çok organik maddenin sentezinde ön madde olarak görev alan, gıda, ilaç ve kozmetik ürünlerinde ürün kalitesini korumak, raf ömrünü uzatmak ve mikrobiyal bozulmayı önlemek için sıklıkla kullanılan karboksilik asit ailesinin en basit üyesi olan zayıf bir asittir (Hong ve ark., 2009; Yerlikaya ve ark., 2021). Benzoik asidin bir tuzu olan sodyum benzoate (SB) ise benzoik asidin sodyum hidroksit ile nötrleştirilmesiyle oluşur. Benzoik asit (E210) ve sodyum benzoat (E211), balık ve et ürünleri, soslar (mayonez, hardal), alkolsüz içecekler, yumurta ürünleri, meyve bazlı gıdalar, sebzeler vb. birçok gıda üründe kullanılmaktadırlar. Benzoik, sorbik ve propiyonik asitler gibi antimikrobiyal bileşikler, pH değerleri 2,5 – 4,0 olan ortamlarda, küf, maya ve geniş spektrumlu bakterilere karşı etkilidir. Bu maddeler sadece gıdalarda değil aynı zamanda kozmetik ve farmasötik ürünlerde de aynı amaçla ve sıklıkla kullanılırlar. (Gören ve ark., 2015; Hamzah ve ark., 2011; Heshmati ve ark., 2017; Tfouni ve Toledo., 2002; Yerlikaya ve ark., 2021). Benzoik asit ve tuzları, Avrupa Parlamentosu ve Konsey Direktifi No. 95/2/EC tarafından gıda koruyucuları sınıfına alınmıştır (Iammarino ve ark., 2011). Sodyum benzoatın kimyasal yapısı (Şekil 1.5) ve fiziksel ve kimyasal özellikleri aşağıda verilmiştir.



Şekil 1.5. Sodyum benzoatın kimyasal yapısı.

IUPAC ismi	: Sodyum benzoat
Kapalı formülü	: C ₇ H ₅ O ₂ Na
Molekül ağırlığı	: 144,11 g/mol

Fiziksel özellikler : Beyaz, kokusuz, buruk bir tada sahip kristal toz veya granüller
pKa : 4,08
Erime noktası : 300 °C
Çözünürlük : Suda çözünürlüğü oldukça yüksek (550-630 g/L, 20 °C). Etanol, methanol ve etilen glikolde çözünebilir.
Yoğunluk : 1,44 g/cm³
UV-GB Spektrumu : Sodyum benzoatın UV spektrumu Şekil 1.6'da sunulmuştur.

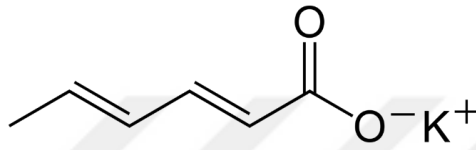


Şekil 1.6. Sodyum benzoatın (15 µg/mL), 0,1 M HCl çözeltisi içerisindeki UV spektrumu.

Gıda ürünlerinde benzoik asit yerine daha çok sodyum benzoat tercih edilmektedir, bunun nedeni sodyum benzoatın benzoik asitten yaklaşık 200 kat daha iyi çözünür olmasıdır. Ayrıca sodyum benzoat, aerobik koşullar altında biyolojik olarak kolayca parçalanabilen bir maddedir. Gıda ürünlerinde kullanımları açısından tek dezavantajı ise tatsız olmalarıdır (WHO, 2000).

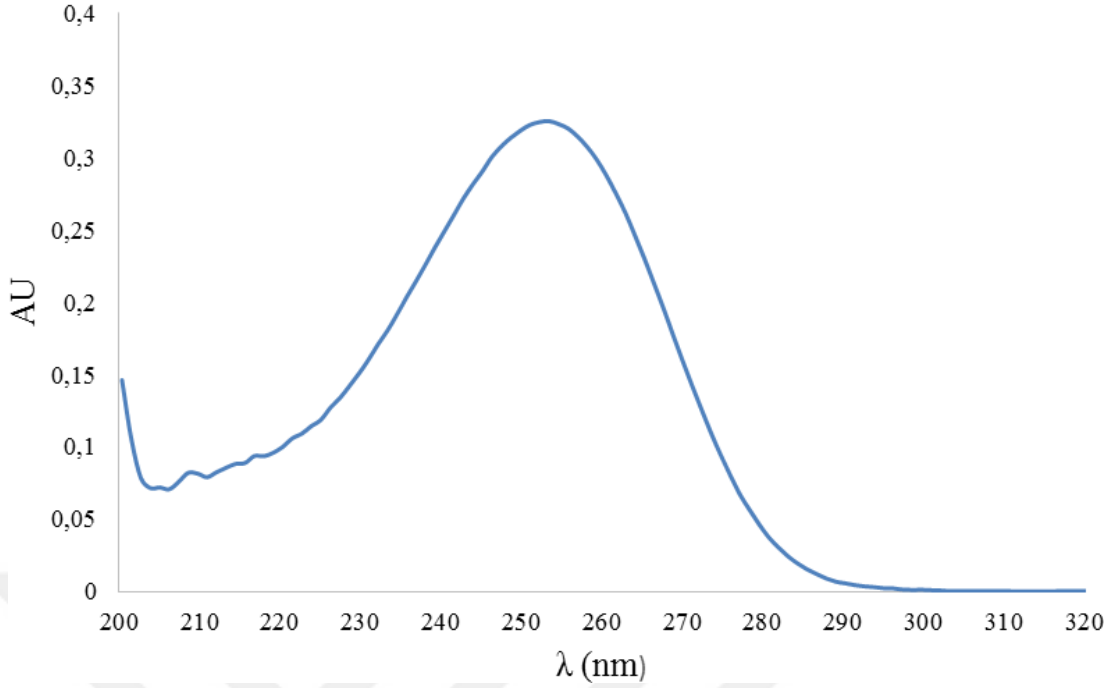
1.1.4. Potasyum Sorbat

Potasyum sorbat (PS), doğal olarak oluşan ve gıdalarda en çok tercih edilen bir doymamış yağ asididir (Alrabadi ve ark., 2013). (Şekil 1.7). PS, sorbik asidin potasyum hidroksit ile nötrleştirilmesi yoluyla oluşan ve sorbitol, potasyum ve sorbik aside parçalanabilen sentetik bir gıda katkı maddesidir (Dehnhan ve ark., 2018; Pylypiw ve Grether, 2000).



Şekil 1.7. Potasyum sorbatın kimyasal yapısı.

Kodu	: E202
IUPAC ismi	: Trans-2,4-hekzadienoik asidin potasyum tuzu : Potasyum (2,4-hekza-2,4-dienoat)
Kapalı formülü	: C ₆ H ₇ KO ₂
Molekül ağırlığı	: 150,22 g/mol
Fiziksel Özellikler	: Granül veya toz halinde beyaz, kokusuz ve kristalimsi bir maddedir
pKa	: pH 4,4
Erime noktası	: 270 °C (518 °F; 543 K)
Çözünürlük	: Etanol ve asetonda güçlükle çözünür ve suda (100 °C'de 58,5 g/100 mL), kloroformda kolayca çözünürken benzende çözünmez
Kararlılık	: Gıdadaki sıcaklık, pH, gıda kombinasyonu, su aktivitesi, çeşitli metaller ve diğer katkı maddeleri gibi parametreler PS kararlılığını etkiler.
UV-GB Spektrumu	: Potasyum Sorbatın UV spektrumu Şekil 1.8'de verilmiştir.



Şekil 1.8. Potasyum sorbatın (15 µg/mL), 0,1 M HCl çözeltisi içerisindeki UV spektrumu.

Sorbik asit (SA) (E200) ve tuzları; potasyum (E202) ve kalsiyum (E203) sorbat suda çözünürlüklerinin iyi olması nedeniyle pek çok sayıda işlenmiş gıdada koruyucu madde olarak kullanılmaktadır. Sorbik asit ve tuzları küf, maya ve çok çeşitli bakterilerin büyümesini engelleyerek ürünün raf ömrünün uzamasını ve ürünün taze kalmasını sağlar. Potasyum sorbatın sıklıkla kullanıldığı gıdalar arasında margarin, çeşitli meyve konserveleri ve tatlılar, şaraplar ve diğer içecekler, peynirler, vb. bulunmaktadır. Bunların dışında kozmetik alanında, tütün, pestisit içerisinde de yaygın bir biçimde kullanılmaktadır (Ferrand ve ark., 2000a; Ferrand ve ark., 2000b; Ruyi ve Chenggang, 2016).

Sorbat nispeten kararsızdır ve gıda sistemlerinin sulu modelinde bozunur ve 30 °C'de üç aylık depolamadan sonra %35'i kaybeder ve orta nemli gıdalarda 40 gün sonra %25'ten azı 35 °C'de kalır. Gıda maddelerinde PS stabilitesinin pH oranı ve su aktivitesi, sıcaklık, gıda kombinasyonu, metal iyonları, paketlenme ve diğer gıdaların varlığı gibi pek çok faktörden etkilendiği bilinmektedir (Dehnhhan ve ark., 2018).

Gıda ürünlerindeki sorbatın ikincil aminler, askorbik asit ve demir tuzları ile reaksiyona girebildiği ve yüksek sıcaklıklarda farklı adüktler oluşturabildiği ve bunun da gıdanın esmerleşmesine yol açtığı ifade edilmektedir. Ancak glukonat, sitrat ve ferrik gibi demir tuzlarının varlığında sorbatın güçlü reaktivitesi, toksik bileşiklerin oluşumuna yol açabilir. Sorbik asit ayrıca nitrit ile reaksiyona girebilir ve geniş bir pH aralığında stabil olan mutajenik 1,4-dinitro-2 metilpirol bileşiği üretebilir (Dehnhan ve ark., 2018).

1.2. Bileşiklerin Etkinlikleri

1.2.1. Niasin (B3 Vitamini)

Vitaminler, insanlarda gelişme, normal büyüme ve vücut fonksiyonlarının sağlıklı bir biçimde devam ettirilmesi, enerji üretimi, bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi ve hücre oluşumu gibi insan metabolizması için gerekli olan pek çok hayati fizyolojik fonksiyonda temel rol oynayan organik moleküllerdir. Vitaminler çözünürlüklerine göre suda ve yağda çözünenler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Suda çözünenler, B grubu vitaminleri (tiamin (B1), riboflavin (B2), niasin (B3), pantotenik asit (B5), piridoksin (B6), biyotin (B8), folik asit (B9), siyanokobalamin (B12) ve C vitamininden (askorbik asit) oluşmaktadır (Melfi ve ark., 2018; Wang ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2018). Yağda çözünen vitaminler ise A vitamin (retinol), E vitamini (tokoferol), D vitamini (kalsiferol) ve K vitaminidir (filokinon) (Melfi ve ark., 2018). D vitamini dışındaki diğer tüm vitaminler vücut tarafından üretilemedikleri için, bunları yiyeceklerden veya farmasötik preparatlardan almak gerekmektedir (Wang ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2018). Vitaminler neredeyse tüm gıdalarda, vitamin takviyelerinde, ilaçlarda ve vitamin açısından zenginleştirilmiş içecekler gibi farklı preparatlarda bulunurlar. Vitaminlerin çoğu kararsızdırlar, bunlar, ortamın pH değerine, sıcaklığa, ışığa, neme, ortamda bulunan metal iyonu konsantrasyonu ve oksitleyici ajan miktarına bağlı olarak degradasyona uğrarlar (Ciulu ve ark., 2011; Pencheva ve Georgieva, 2014; Ribeiro ve ark., 2011).

Suda çözünen vitaminler, genel olarak karbonhidratların, lipitlerin ve proteinlerin metabolizmalarında ve önemli metabolik süreçlerde önemli rol oynarlar ve bu önemli görevleri yerine getirmek için koenzimler olarak işlev görürler (Melfi ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2018). Suda çözünen vitaminler (SCV) grubunda yer alan B grubu vitaminleri, insan sağlığı için gerekli olan her biri farklı kimyasal yapıda olan ve biyolojik rollere sahip olan bileşiklerden oluşmaktadır. B vitaminlerinin eksikliği ariboflavinoz, pellagra, anemi, kardiyovasküler risk, bilişsel bozukluk ve nöral tüp defekti vb. hastalıklara yol açar ve günlük beslenmede bu vitaminlerin yeterli miktarda alınması gerekir. B-vitaminleri vücudumuzda ne biyolojik olarak sentezlenebilirler ne de depolanabilirler (B12 hariç) ve bunların yiyeceklerden veya farmasötik preparatlardan alınması şarttır (Shetty ve ark., 2020). B grubu vitaminleri tüketiminin zihinsel uyanıklığı ve konsantrasyonu arttırması bunların sıklıkla ticari enerji içeceklerinde kullanılmalarına neden olmuştur (Hu ve ark., 2018).

B grubu vitaminlerinin bir üyesi olan ve aynı gruptaki vitaminler arasında kararlılığı en yüksek olan niasin, enerji metabolizması için gerekli olan enzimin bir parçasıdır ve merkezi sinir sistemi sağlığı, cilt sağlığı ve sindirim sistemi sağlığı üzerinde önemli rolleri bulunmaktadır (Shetty ve ark., 2020; Zhang ve ark., 2018).

Niasin, gıdalarda bulunan ve bir aminoasit olan triptofandan üretilir. Genel olarak, fıstık ezmesi, sebzeler (özellikle yeşil yapraklı sebzeler, kuşkonmaz ve mantar), zenginleştirilmiş veya kepekli tahıllar ve ekmekler, balık, kümes hayvanları, vb. bulunur (Panda, 2003; Zhang ve ark., 2018). Her gün diyet proteinleri şeklinde tüketilen triptofan, niasin oluşturmak üzere parçalanır. Genel olarak 60 mg diyet triptofanın 1,0 mg niasine eşdeğer olduğu kabul edilmiştir. Süt proteini triptofan bakımından yüksektir ve bu nedenle aslında iyi bir niasin kaynağıdır (Body, 1998; Panda, 2003). Yetişkinler için önerilen günlük besin alım miktarı (RDA), erkekler için 16 mg/gün ve kadınlar için 14 mg/gün niasin eşdeğeridir (Aguilera, 2012). Brody ise bu miktarın yetişkin erkekler için 19 mg/gün olduğunu ifade etmiştir (Brody, 1998).

Vücudumuzda niasin, hücreden hücreye hidrojen taşınmasında yer alan bir ko-hidrojenaz görevi görür. Böylece tüm karbonhidratların metabolizmasında önemli bir rol oynar. Koenzim 1-difosforidin nükleotidin (DPN) ve ko-enzim-II trifosfopiridin nükleotidin (TPN) bir parçasını oluşturur ve böylece doku solunumuna yardımcı olur. Niasin'in kan kolesterolünü düşürmede dikkate değer bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca, niasin vücutta kofaktör nikotinamid adenine dinükleotide (NAD) ve bunun fosforile edilmiş formu olan nikotinamid adenine dinükleotit fosfata (NADP) dönüşür. NAD ve NADP, DNA onarımı, kalsiyum mobilizasyonu ve deasetilasyon gibi adenozin difosfat (ADP)-ribosilasyon reaksiyonlarında etkin rol oynar (Aguilera, 2012; Brody, 1998; Panda, 2003).

Niasin hem mideden hem de bağırsaklardan emilir ve tüm dokularda koenzimi olarak depolanır. Absorpsiyon ve depolamadan sonra nikotinik asit böbrekler yoluyla kısmen N-metil nikotinamid olarak atılır. Günlük alımımızın yaklaşık %90'ına eşdeğer bir miktarda niasin, N-metil-2-piridon-5-karboksamid (kısaca piridon) ve N-metil-nikotinamid formlarında atılır (Brody, 1998; Panda, 2003).

Niasinin yetersiz alınması durumunda, şiddetli dermatit, çatlamış kabuklanmalar, ishal, zihinsel depresyon ve ölüm ile kendini gösteren pellagra hastalığı ortaya çıkar. Niasin bu hastalığın tedavisinde oldukça etkilidir. Niasin bu hastalık dışında, ateroskleroz, tromboembolik-vasküler hastalık, anjina pectoris, serebral arterioskleroz, meniere hastalığı, migren, beslenme psikozları, alkol zehirlenmesi, duygusal rahatsızlıklar, baş ağrısı, kornea ülserleri, Raynaud hastalığı, gibi hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır (Brody, 1998; Panda, 2003).

Bir insanın vücudunda çeşitli nedenlere bağlı olarak niasin eksikliği görülmektedir. Bu nedenler arasında; emilimin yetersiz olması (sindirim bozuklukları, ishal, dizanteri vb.), hamilelik, büyüme ve yüksek ateşli enfeksiyonlar sonucu niasine duyulan aşırı talep, tüberküloz, aşırı lüsin kullanımı, tümörler, Hartnup hastalığı (kalıcı pellagra), vb. Niasinin eksik olması durumunda diyet yöntemleri uygulanarak, niasince zengin gıdalar tüketilerek tedavi edilebilir. Ayrıca

niasin eksikliğinden muzdarip hastalara 100-500 mg sentetik nikotinik asit verilebilmektedir (Panda, 2003).

Niasinin aşırı kullanımı ise karaciğer fonksiyonlarında değişikliklere neden olur ve serum ürik asit değerini yükseltir, bilateral ambliyopi ve parasantral skotomlar geliştirir (Panda, 2003).

1.2.2. Kafein

Kafein, kahve çekirdekleri, çay yaprakları, guarana, kola fıstığı ve kakao kabukları dahil 60'tan fazla bitkide bulunan doğal bir ksantin alkaloididir (de Mejia ve Ramirez-Mares, 2014; Saimaiti ve ark., 2022; Vijayakumar ve ark., 2014). Organizmada birikmez ve tüketildikten sonra vücuttan uzaklaştırılması için birkaç saat yeterlidir (Gramza Michalowska, 2014).

1959'da Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA → Food and Drug Administration) kolalı içeceklerdeki kafeini "Genel Olarak Güvenli Olarak Kabul Edildi" (Generally Recognized as Safe - GRAS) olarak tanımlamıştır. FDA, kafeinin çocuklar da dahil olmak üzere tüm tüketiciler için güvenli olduğunu belirtmektedir. Ancak, 140'tan fazla ülke, kafeinin güvenliğini dikkate alarak, içeceklerdeki kullanımına şartlı olarak izin vermişlerdir. Her ülkede içecek şirketleri, ürünlerinde kafein miktarını yasal düzenlemelere uygun olarak belirtmektedirler. 2000/13/EC Direktifine göre, bir gıda maddesinin üretiminde veya hazırlanmasında tatlandırıcı olarak kullanılan kinin ve kafein, içindikiler listesinde "aroma verici" teriminden hemen sonra ismen belirtilmelidir. Ayrıca, 18 Temmuz 2002 tarih ve 2002/67/EC Direktifine göre, 150 mg/L'den fazla kafein içeren içecekler, etikette bir uyarı mesajı ve ardından kafein içeriğine ilişkin şu şekilde bir açıklama bulundurmalıdır: "Yüksek kafein içeriği (X mg/100 mL)" (Trandafir ve ark., 2009).

Antioksidan, analjezik, antiinflamatuar, anti-anksiyete, antidepresyon aktivitelere sahip bir biyoaktif madde olan kafein en yaygın tüketilen psikotrop

ilaçlar arasında yer almaktadır (de Mejia ve Ramirez Mares, 2014; Saimaiti ve ark., 2022). Kafein, merkezi sinir sistemi üzerinde uyarıcı etkiye sahiptir (de Mejia ve Ramirez Mares, 2014; Gramza Michalowska, 2014). Ayrıca, az miktarda tüketilen kafeinin insan sağlığı üzerinde olumlu etkilerinin de olduğu belirlenmiştir. Bunlardan bazıları; kişilerde uyanıklık kapasitesini yükseltmesi ve odaklanmanın artması, Parkinson ve Alzheimer hastalık risklerini azaltması, karaciğer fonksiyonlarını ve kilo vermeyi olumlu yönde desteklemesi (metabolizma hızını arttırması, enerji harcaması, lipid oksidasyonu ve lipolitik ve termojenik aktiviteler) ve belirli kanser türlerinin (endometrial, prostatik, kolorektal, karaciğer) oluşumunu, diyabet riskini, obeziteyi ve damar sertliği riskini azaltması, oksidatif stresi önlemesi, toksik maddelerin vücuttan atılımını hızlandırması, idrar söktürücü olması, vb... (de Mejia ve Ramirez Mares, 2014; Gramza Michalowska, 2014; Saimaiti ve ark., 2022; Vijayakumar ve ark., 2014).

Buna karşın, kafeinin uzun süreli ve aşırı miktarda tüketilmesi; kafein bağımlılığı, uykusuzluk, migren, damar daralması, tansiyon yüksekliği, anksiyete, baş ağrısı, mide bulantısı, hipertansiyon ve huzursuzluk gibi olumsuz durumlara neden olmaktadır (Bucher ve ark., 2019; de Mejia ve Ramirez Mares, 2014; Saimaiti ve ark., 2022; Vijayakumar ve ark., 2014). Çalışmalar, hamile kadınların, günde 300 mg kafein alımı ile zayıf fetal büyüme ve spontan düşük riskinin artması nedeniyle kafein alımlarını kısıtlamaları gerektiğini göstermiştir. Kafeinin olumsuz etkileri kişinin kilosuna, cinsiyetine, yaşına ve duyarlılık farklılıklarına bağlı olarak değişmektedir. Kafein bağımlısı olan kişilerde ise, kafein içeren yiyecek veya içeceklerin aniden kesilmesi kişilerde yoksunluk belirtilerinin (baş ağrısı, uyuşukluk ve sinirlilik) ortaya çıkmasına neden olmaktadır (de Mejia ve Ramirez Mares, 2014).

Çocuklar, ergenler, hamile kadınlar ve kafeine duyarlı kişilerin potansiyel yan etkilerden kaçınmak için tüketimi kısıtlamaları/azaltmaları önerilmelidir. Migren hastaları için günlük kafein alımı 200 mg'ı geçmemelidir. Genetik olarak glokom riski yüksek olan kişiler kafein alımını azaltmalı/ kaçınmalıdır. Kafein, hamilelikte fetal beyin gelişimini etkileyebilir ve bilişsel hasara neden olabilir veya üreme gelişiminin tüm aşamalarını etkileyebilir. Bu nedenle gebelikte kafein alımı

kısıtlanmalı/ azaltılmalıdır. Çocuk ve ergenlerde kafein alımını sınırlamak çok önemlidir. Yüksek kafein alımı çocukların büyümesi ve gelişmesi üzerinde zararlı etkilere sahip olabilir ve hamile kadınların yavrularında bilişsel bozulmaya neden olabilir ve yetişkinlikte hastalıklara karşı duyarlılıklarını artırabilir (Saimaiti ve ark., 2022).

Genel olarak, kahve veya çaydan makul miktarda kafein (1-2 fincan) tüketmek kardiyovasküler hastalık riskini azaltabilir, insülin seviyelerini ve insülin direncini artırabilir, hafızayı ve bilişsel işlevi iyileştirir ve Alzheimer hastalığını (AD), dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğunu (DEHB), Parkinson hastalığını (PD) ve diğer nöropatik hastalıkları önler (Saimaiti ve ark., 2022).

Kafein, gıda takviye ürünlerinde ve ilaçlarda sıklıkla kullanılmaktadır. Kafeinin ilaçlara eklenme sebebi analjezik etkiyi arttırmaktır. Gıda takviyelerine ise, yağın ayrışmasını hızlandırması ve lipid birikimini engelleyebilmesi sebebiyle daha iyi yağ yakımını sağlayabilecek ürünler ortaya koymak için eklenmektedir. (Saimaiti ve ark., 2022). Kahvede, çayda, alkolsüz içeceklerde, enerji içeceklerinde, çikolata ürünlerinde, bazı ilaçlarda (baş ağrısı tedavileri ve ağrı kesiciler) ve gıda takviyelerinde farklı miktarlarda kafein bulunmaktadır. İnsanlar için maksimum kafein oral dozu yaklaşık 150-200 mg/kg vücut ağırlığı olarak belirtilmiştir (Gramza Michalowska, 2014). Çocuklar (6-12 yaş) 45-85 mg/gün ve ergenler 100-175 mg/gün tüketebilirler (de Mejia ve Ramirez Mares, 2014).

Kafein vücuda alındıktan sonra emilir ve metabolize edilerek paraksantin (1,7-dimetilksantin), teofilin ve teobromin dahil olmak üzere üç farklı metabolite dönüşür. Burada majör metabolit toksisitesi en düşük olan paraksantindir. Bu nedenle insan organizması kafeini belirgin bir toksik etki göstermeden paraksantine çevirir. Ancak, diğer ilaçlarla birlikte alındığında kafeinin toksik etkisi artar (Gramza Michalowska, 2014). Kafeinin diğer bileşenlerle kombinasyonu, çeşitli kanser hücrelerinin büyümesini engellemede daha etkilidir (Kafeinin Metformin, 5-fluorourasil, Rekombinant metiyonin ve atorvastatin ile kombinasyonları) (Saimaiti, ve ark., 2022).

Kafeinin uyarıcı ve odaklanmayı arttırıcı özellik göstermesi bu maddenin enerji içeceklerinde kullanılmasına neden olmuştur. Ergenler enerji içecekleri ile günlük 83,2 mg kafein almaktadırlar ve bu miktar ergenler için günlük önerilen dozun altındadır (40-70 kg vücut ağırlığına bağlı olarak 2,5 mg/kg vücut ağırlığı/gün veya 100-175 mg/gün).

Enerji içeceklerindeki kafein, alkol alımıyla ilişkili uyuşukluğu maskeleyebilir, bu da kişilerin farkında olmadan yaralanmasına neden olabilir. Bu nedenle enerji içecekleri içerisinde bulunan kafein nedeniyle bu içecekler alkol ile birlikte tüketilmemelidir. Kalp sorunu olan kişiler, kafein ve alkolü karıştırma konusunda özellikle dikkatli olmalıdır; her iki bileşik de kalp atış hızını artırır ve birlikte alındığında kardiyak aritmilere neden olabilir (de Mejia ve Ramirez Mares, 2014). Ayrıca, bazı insanlar enerji içeceklerindeki çeşitli bileşenlere (taurin, glukuronolakton, ginseng, ginkgo biloba, yeşil çay özü) karşı artan bir duyarlılığa sahip olabilir ve bu nedenle, özellikle kan basıncında ve kalp atış hızında bir artış olmak üzere akut bir fizyolojik tepki gösterebilirler. Yüksek tansiyonu veya düzensiz kalp ritmi olan kişiler kafeini sınırlamalıdır (de Mejia ve Ramirez Mares, 2014).

1.2.3. Sodyum Benzoat

Gıdalarda, kozmetik ve farmasötik ürünlerde ürünlerin bozulmasını engellemek ve raf ömrünü uzatmak amacıyla tuz veya şeker gibi doğal koruyucuların yanı sıra kimyasal koruyuculara da başvurulmaktadır. Kimyasal koruyucular ile ürünlerin çok daha uzun süreli saklanması sağlanmaktadır. Bu amaçla kullanılan koruyucular; sodyum benzoat, күкүрт dioksit, sorbik asit, propiyonik asit, potasyum sorbat, sodyum ve potasyum nitratlar ve nitritlerdir (Linke ve ark., 2018). Bu tez çalışmasında çalışılan ticari enerji içecekleri içerisinde sodyum benzoat ve potasyum sorbat bulunduğundan, bu iki koruyucu üzerinde durulacaktır.

Sodyum benzoat, aerobik koşullar altında biyolojik olarak kolayca parçalanabilen bir maddedir (WHO, 2000). Margarinlerin, sosların, marmelatların,

jelatinlerin, likörlerin, meyve sularının, alkolsüz içeceklerinin, reçellerin, turşuların, vb. pek çok ürünün muhafazasında kullanılan sodyum benzoat (E211) tarçın, mantar, kızılçık, yaban mersini ve karanfilde doğal olarak bulunur (Linke ve ark., 2018; Walczak-Nowicka ve Herbet, 2022). Gıda ürünlerinde kullanımları açısından tek dezavantajı tatsız olmalarıdır.

Antimikrobiyal, antioksidan, antienflamatuar ve tampon özelliklere sahip olan sodyum benzoat (E211) gıdalarda maya ve küf oluşumunu engelleyerek bu ürünlerin bozulmasını önler. Gıdalarda, kozmetik ve farmasötik ürünlerinde sıklıkla kullanılan sodyum benzoat, pH 4,5'un altındaki asidik ortamlarda etkilidir (Gören ve ark., 2015; Tfouni ve Toledo, 2002; Walczak-Nowicka ve Herbet, 2022).

Benzoik asit ve tuzları, Avrupa Parlamentosu ve Konsey Direktifi No. 95/2/EC tarafından gıda koruyucuları sınıfına alınmıştır (Iammarino ve ark., 2011) ve Avrupa mevzuatı, benzoik asit ve tuzlarının gıda ürünlerinde kullanımı için belirli sınırlamalar getirmiştir. FAO/WHO Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (JECFA), katkı maddelerinin kontrolü için “Kabul Edilebilir Günlük Alım Miktarı (ADI)” sistemini geliştirmişlerdir. Bu sisteme göre ADI, “dünya çapında, bir katkı maddesinin, bir kişinin yaşamı boyunca herhangi bir sağlık riski olmaksızın, günlük olarak tüketebileceği maddenin dozu” olarak ifade edilmiştir. JECFA düzenlemelerine göre, benzoik asit ve sodyum benzoat için kabul edilebilir günlük alım miktarı (ADI) 0-5 mg/kg'dır (Heshmati ve ark., 2017; Iammarino ve ark., 2011; Yerlikaya ve ark., 2021). ADI'ya göre SB'nin 5 mg/kg üzerindeki tüketimi hiperaktiviteye ve alerjik reaksiyonlara neden olmaktadır. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi'ne (EFSA) göre bu koruyucunun ölümcül dozu (LD50) 2000 mg/kg olarak ifade edilmiştir (EFSA, 2017). FDA ise sodyum benzoatın güvenli olduğunu kabul ederek, bu maddenin kullanımı ile ilgili hiçbir sınırlama getirmemiştir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki; sodyum benzoatın, günde 5 mg/kg vücut ağırlığının altındaki miktarlarda tüketimi güvenli olarak kabul edilmektedir (Linke ve ark., 2018; Walczak-Nowicka ve Herbet, 2022).

Tüm bu düzenlemelere ek olarak, her bir ülke de katkı maddelerinin gıda ürünlerinde kullanımına ilişkin kendilerine has yasal düzenlemeler getirmişlerdir. Pek çok ülkede olduğu gibi Türkiye'de de yoğurt, peynir, salça ve soslarda, meyve sularında, çikolatalarda, kuru çorbalarda ve cipslerde benzoik asit ve tuzlarının kullanılması yasaktır (Yerlikaya ve ark., 2021). Diğer gıda ürünlerinde bu katkı maddelerinin zararsız olduğu düşünüldüğünden yüksek miktarlarda gıda içerisinde kullanılmaktadırlar (alkolsüz içecekler için 150 mg/L ile yumurta ürünleri için 5000 mg/kg arasında değişmektedir) (Iammarino ve ark., 2011). Sodyum benzoatın, meyve sularında ve fonksiyonel içecekler içerisinde koruyucu olarak kullanılmasına sınırlamalar getirilerek izin verilmiştir. Bu koruyucu maddenin içeceklerdeki miktarının %0,1'i geçmemesi şartı bulunmaktadır (Pylypiw ve Grether, 2000). Benzoatların içeceklerdeki miktarının 150 mg/L aşmaması beklenmektedir (Ogunleye ve ark., 2017). Sodyum benzoat, farmasötik ürünlerde koruma amacıyla (sıvı ilaçlarda %1,0'a kadar) ve üre döngüsü enzimopatisi olan hastaların tedavisinde kullanılır (WHO, 2000).

Benzoik asit ve tuzları, oksoglutarat dehidrojenaz ve süksinat dehidrojenaz gibi bazı Krebs döngüsü enzimlerini inhibe ederek antimikrobiyal bir aktivite sergilerler (Iammarino ve ark., 2011). Sodyum benzoat vücuda alındıktan sonra, gastrointestinal sistem tarafından hızla emilir ve mitokondriyal matrikste meydana gelen bir reaksiyonda karaciğer ve böbrekte hippurat oluşturmak üzere glisin ile konjuge edilir. Bu dönüşüm mitokondride iki aşamada gerçekleşir; Birinci aşamada, SB hücreye girdikten sonra, bir Adenozin Trifosfat (ATP) -bağımlı asit vasıtasıyla benzoil-CoA'ya dönüştürülür. İkinci aşamada ise, CoA, glisin N-asiltransferaz (hippurat) aracılığıyla piruvata dönüştürülür. Mitokondride SB, ATP, glisin ve koenzim A'nın tüketimine neden olur. Bu koruyucunun alınması, serumda benzoat ve piruvat artışına neden olur. Bu koruyucu vücutta birikmez ve üriner sistem yoluyla vücuttan dışarı atılır. SB'nin alımıyla oluşan hippurik asit ilk 6 saat içinde vücuttan idrarla hızlı bir biçimde atılır ve kalan doz ise 2-3 gün içinde tamamen elimine edilir (Linke ve ark., 2018; Walczak-Nowicka ve Herbet, 2022).

Sodyum benzoat, anti-enflamatuar ve antioksidan etkiye sahiptir. İlaç endüstrisinde üre döngüsü bozuklukları, karaciğer hastalıkları ve multipl skleroz gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Çalışmalar, SB'nin aynı zamanda, depresyon, majör depresif bozukluklar (MDB), ağrı, şizofreni, otizm spektrum bozuklukları ve nörodejeneratif hastalıklar gibi durumların tedavisinde kullanılabileceğini de göstermektedir. SB'nin kolesterol düşürücü etkisi de bulunmaktadır. Sodyum benzoat bir amino asit oksidaz (D-AAO) inhibitörüdür. Sodyum benzoat, D-AAO'yu inhibe ederek, NMDA reseptörünün koagonisti olan sinaptik D-serin seviyesini de artırır. Düşük D-serin seviyeleri sıklıkla şizofreni ile ilişkilidir. Bu nedenle bu koruyucunun şizofreni, panik atak, demans ve Parkinson gibi hastalıklarda da etkili olduğu bilinmektedir (Walczak-Nowicka ve Herbet, 2022).

Benzoik asit teratojenik veya kanserojen aktiviteye sahip değildir fakat benzoik asit ve tuzuna oral, dermal veya inhalasyon yoluyla maruz kalmanın, hassas kişilerde bazen düşük dozlarda bile immünolojik olmayan kontakt reaksiyonlarına (psödoalerji), astım gibi alerjik reaksiyonlara, istemsiz kasılmalara, metabolik asidoza ve hatta anafilaktik şoka sebep olduğu bildirilmiştir (Dzieciol ve ark., 2010; Heshmati ve ark., 2017; Tfouni ve Toledo, 2002; Yerlikaya ve ark., 2021).

Sodyum benzoatın aşırı tüketimi genotoksik, klastojenik ve nörotoksik etkilere sebebiyet verebilir. Çocuklarda ise hiperaktiviteye, ürtikere ve DNA hasarına yol açmaktadır. SB'nin aynı zamanda mutajenik etkilere neden olduğu, oksidatif stres oluşturduğu, bağışıklık sistemini, karaciğeri ve böbrekleri olumsuz etkilediği, hormonları bozduğu ve doğurganlığı azalttığı da belirlenmiştir. Hücrelerin SB ile etkileşmesinden sonra, lipid peroksidasyonunda artışa ve süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon S-transferaz gibi antioksidan enzimlerin seviyelerinin de azalmasına neden olduğu belirtilmiştir. Yapılan çalışmalar, bu koruyucunun, erkek üreme sistemini etkileyerek sperm sayısında %50 azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Benzer bir biçimde, folikül uyarıcı hormone (FSH), lüteinleştirici hormone (LH) ve testosteron düzeylerinde de azalma olduğu belirtilmiştir. Karaciğer üzerindeki olumsuz etkisi ise, serum karaciğer enzimlerinde (alkalen fosfataz,

aspartat aminotransferazda (AST)) artışa neden olarak toksik etki göstermesidir (Linke ve ark., 2018; Walczak-Nowicka ve Herbet, 2022).

Sodyum benzoat gayabeksin şurup, andolor şurup, sudafed şurup ve flurend %0,25 gargara gibi farmasötik ürünlerde de olumlu etkilerinden dolayı kullanılmaktadır. SB'nin C vitamini ile birlikte alınması, koruyucunun bu vitamin ile reaksiyona girerek benzen oluşumuna neden olmaktadır. Buna, C vitamininin O_2 ve H_2O_2 ile indirgeme sonucu oluşan hidroksil radikalının neden olduğu düşünülmektedir. Oluşan benzen, yüksek toksik, mutajenik ve teratojenik etkiye sahiptir (Walczak-Nowicka ve Herbet, 2022).

Bu tez çalışmasında çalışılan ticari enerji içecekleri içerisinde sodyum benzoat ve potasyum sorbat bulunduğundan, bu iki koruyucu üzerinde durulacaktır.

1.2.4. Potasyum Sorbat

Gıdaların bozulmalarının ana nedeni, mikroorganizmaların aktivitesi veya enzimatik reaksiyonlardır. Bu nedenle, ürünlerin bozulmasını engellemek, ürünün raf ömrünü uzatmak, istenmeyen mikrobiyolojik, enzimatik veya kimyasal değişiklikleri durdurmak veya geciktirmek için koruyucu maddeler kullanılır (Esfandiari ve ark., 2013). Koruyucular, günlük diyetin önemli bir parçası olsalar da, gıda güvenliği sorunları nedeniyle kullanımları ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kısıtlanmıştır (Dehnhan ve ark., 2018) Örneğin; sodyum benzoat, meyve sularında koruyucu olarak kullanılabilir, ancak kullanımı içecekte %0,1'i geçmemelidir, potasyum sorbat ise %0,1-0,2 düzeylerinde kullanılabilir (Pylypiw ve Grether, 2000). Pek çok ülkede sentetik gıda katkı maddelerinin limitleri belirlenmiş ve bunların kullanımları yasal düzenlemelerle kontrol altına alınmıştır.

Potasyum sorbat, Avrupa Birliği ve ABD tarafından genel olarak güvenli (GRAS) kabul edilen, çeşitli gıda (örn; meyve suyu, soda, soya sosu, enerji içecekleri, ketçap vb.), kozmetik (diş macunları vb.) ve farmasötik ürünlerde (Pesido

şurup, andolor şurup, fucidin %2 krem, solian 100 mg/mL oral çözelti, vb.) yaygın bir şekilde kullanılan koruyucudur. PS, işlenmiş gıdalarda küf oluşumunu, bozulmayı engeller ve ürünlerin tazeliğini korunmasına yardımcı olur. PS, sorbik asit ve farklı koruyucuların antimikrobiyal aktivitesi, yapılarında karboksil grubunun (-COOH) bulunmasından ve karbon atomlarının sayısından kaynaklanmaktadır. Sodyum asetat ve PS gibi daha kısa karbon zincirleri, uzun karbon zincirlerine sahip katkı maddelerine kıyasla daha fazla antibakteriyel aktiviteye sahiptirler (Dehnhan ve ark., 2018). Bu koruyucu, sağlık açısından tamamen güvenlidir ve tüm gıda koruyucuları arasında en düşük alerjenik etkiye sahiptir (Alrabadi ve ark., 2013). Sorbik asit ve tuzları, asidik ortamda oldukça etkilidirler fakat nötr pH ortamında etkisizdirler (Gören ve ark., 2015; Tfouni ve Toledo., 2002). Alkali gıda maddelerinde PS kullanımı önerilmez (Dehnhan ve ark., 2018).

FAO/WHO uzman komitesi (JECFA), PS limitini 0–25 mg/kg olarak tavsiye etmiştir. JECFA'ya göre insanlarda kabul edilebilir günlük PS miktarı 12,5 mg/kg'dır. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından belirlenen bu değer 3 mg/kg'dır. PS'nin içeceklerde izin verilen miktarı 250 -300 mg/L olarak ifade edilmiştir (Ogunleye ve ark., 2017). İlaç endüstrisinde ve kozmetik ürünlerinde maksimum PS konsantrasyonu %5 olarak belirlenmiştir. JECFA'ya göre sorbik asidin insan için toksisitesi (LD50) 500 mg/kg'dır (Chaleshtori ve ark., 2018; Dehnhan ve ark., 2018). Mikrobiyal büyümeyi engellemek için gereken minimum sorbik asit ve tuzlarının konsantrasyonları türlere, yapıya, substratın pH'ına ve diğer faktörlere bağlı olarak değişebilir (Tfouni ve Toledo, 2002).

Sorbatlar, in vitro olarak çeşitli enzimlerin, özellikle sülfidril içeren enzimlerin (SE) bir aktivite inhibitörü olarak bilinirler (Dehnhan ve ark., 2018). Sorbatlar tarafından inhibisyon veya azaltılmış yapısal büyüme mekanizması, mikrobiyal türlere, tiplere, suşlara, yapısal özelliklere ve çeşitli çevresel faktörlere bağlıdır. Sorbatlar, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium sporogenes*, gibi bakterilerin büyüme hızı üzerinde yüksek etkiye sahiptir. Laktik asit bakterileri gibi bazı mikrobiyal suşlar sorbatlara karşı dirençlidir ve hatta bu maddeyi belirli koşullar

altında metabolize ederler. PS, çeşitli küf türleri tarafından üretilen mikotoksinleri inhibe eder.

Metabolik çalışmaların sonuçları, PS'nin oral uygulamadan sonra tamamen emildiğini ve ardından vücutta dağıldığını göstermiştir. PS midede bir difüzyon süreci ile emilir ve metabolize edilerek bileşenlerine (potasyum ve sorbat) ayrışabilir ve ince bağırsakta sorbik asit formunda emilebilir. İnsan vücudunda metabolize olup karbondioksit (CO₂) ve H₂O benzeri heksanoik aside oksitlenebilir. Bunun %80-86'sı akciğerler yoluyla CO₂ olarak dışarı atılır ve PS'nin %2-10'u idrar yoluyla üre olarak ve daha düşük konsantrasyonlarda mukonik ve sorbik asit olarak atılır. Uygulamadan 10 saat sonra akciğer yoluyla atılım tamamlanır (Dehnhan ve ark., 2018). Sorbatların metabolik yıkımı, koenzim A ile aktivasyon, krotonaz ile bir β-hidroksi aside hidrasyon, bir β-keto asit için dehidrasyon ve β-keto-tiyolaz ile parçalanmayı içerir (Dehnhan ve ark., 2018).

1.3. Bileşiklerin Kantitatif Analizi

1.3.1. Niasinin Kantitatif Analizi

Spektroskopik Yöntemler

Chanda ve arkadaşları, farmasötik dozaj formülasyonundaki niasin miktarını belirlemek için etanolün çözücü olarak kullanıldığı yeni bir UV Spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu çalışmada niasin 1-19 µg/mL konsantrasyon aralığında ve 262 nm dalga boyunda analiz edilmiştir. Önerilen yöntem, doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) göstermek için istatistiksel olarak doğrulanmıştır. Bu çalışmada, niasinin regresyon katsayısı $R^2 = 0,9991$, geri kazanım %99,15-99,66, LOD 0,64 µg/mL ve LOQ 1,94 µg/mL olarak bulunmuştur (Chanda ve ark., 2017).

2012 yılında, Kazemipour ve arkadaşları, bir ilaç formülasyonunda bulunan niasin ve levostatinin miktar tayinlerini, H noktası standart ekleme yöntemi (HPSAM) tekniği kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Bu yöntem, bir numune içerisinde, büyük ölçüde veya tamamen örtüşen spektrumlara sahip türlerin belirlenebildiği ve numunedeki istenmeyen bileşiklerin doğrudan girişim yapmasından kaynaklanan hataların ortadan kaldırılabilirdiği bir yöntemdir. Niasin ve levostatinin miktar tayinleri, bu bileşiklerin birinci ve üçüncü türev sinyallerinin ölçümü ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, niasin ve levostadinin birinci ve üçüncü türev spektrumları sırasıyla 261 ve 273 nm'de (standart niasin çözeltileri eklendiğinde) ve 245 ve 249 nm'de (standart Levostadin çözeltileri eklendiğinde) hesaplanmıştır. Önerilen bu yöntem ile levostadinin gözlenebilme sınırı 0,03 mg/L, niasinin gözlenebilme sınırı ise 0,32 mg/L olarak bulunmuştur. Bu maddelere ait tayin sınırı ise levostadin için 0,09 mg/L, niasin için 0,78 mg/L olarak verilmiştir. Yöntemin gerçek numune analizinde de başarılı sonuçlar verdiği tespit edilmiştir (Kazemipour ve ark., 2012).

Kompany-Zareh ve Mirzaei'nin birlikte yapmış oldukları bir çalışmada, psödoefedrin hidroklorür (PSU), dekstrometorfan hidrobromür (DXT) ve sodyum benzoatın (BNZ) üçlü karışımlarının spektrofotometrik tayini için yeni bir faktör tabanlı çok değişkenli kalibrasyon tekniği olarak hibrit doğrusal analiz (HLA) uygulamışlardır. Bu çalışmada, HLA uygulanmasının sebebi, HLA'nın net analit sinyali (NAS) regresyon grafiği metodolojisine daha kolay uyum sağlayabilmesi ve kısmi en küçük karelerden (PLS) daha az faktör kullanmasıdır. Absorpsiyon ölçümleri, 1,00 cm'lik bir kuvars hücre kullanılarak bir Pharmacia UltroSpec 4300 spektrometre üzerinden gerçekleştirilmiştir. PSU için 0–7500 µmol/L, DXT için 0–300 µmol/L ve BNZ için 0–1400 µmol/L konsantrasyon aralıklarında kalibrasyon ve tahmin setlerinin oluşturulması için ortogonal bir dizi tasarımı uygulanmıştır. Seçilen dalga boylarında, daha düşük faktör sayısı kullanılarak, PSU, DXT ve BNZ için elde edilen bağıl standart tahmin hatası sırasıyla %5,24, %8,67 ve %5,48'den %2,19, %5,21 ve %3,62'ye yükseltilmiştir. Yöntem, öksürük kesici şurup örneklerinde PSU, DXT ve BNZ tayini için uygulanmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Kompany-Zareh ve Mirzaei, 2004).

Xiao ve arkadaşları, besin değeri yüksek ve azot kaynağı görevi gören önemli bir hammadde olan Mısır dik liköründe (CSL) bulunan B2 (VB2), B3 (VB3), B6 (VB6) ve B7 (VB7) vitaminlerinin miktar tayinleri için yeni bir spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem, yakın kızılötesi spektroskopi (NIR) ölçümleri ile 66 CSL numunesinin (22 grup) kısmi en küçük kareler regresyonu (PLSR) kullanılarak tayin edilmesini sağlamıştır. CSL'de bulunan vitaminleri ölçmek için hızlı, çok yönlü, ucuz ve çevre açısından güvenli olan NIR yöntemi ile, geliştirilen çok değişkenli modeller, VB2, VB3, VB6 ve VB7 için iyi sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır. Bu çalışmada, CSL'de düşük içerikli oldukları için VB2, VB3 ve VB6'yı belirlemek için bir HPLC-MS/MS yöntemi kullanılmıştır. Kromatografik ayırma bir Agilent SB- C₁₈ kolonunda (2,1 mm×100 mm, 3,5 µm) ve bir C₁₈ ön kolonunda (4 mm×5 mm) gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı 30°C, akış hızı 0,4 mL/dk. Kromatografik çalışma gradient elüsyon ile ayırım gerçekleştirilmiştir. NIR spektroskopisi ve PLS yöntemi ile elde edilen çok değişkenli regresyon modelleri, iyi korelasyon katsayılarına ve düşük tahmin hatalarına sahiptir. Her bir bileşen için R² değeri 0,95'ten yüksektir (Xiao ve ark., 2012).

Asfaram ve arkadaşları tarafından, HKUST-1 metal organik çerçeve (MOF) tabanlı moleküler baskılı polimer (MIP) ile nikotinamidin ekstraksiyonu ve zenginleştirilmesi için UV-vis spektrofotometre tarafından takip edilen ultrason destekli dispersif katı faz mikroekstraksiyonu (UA-DSPME-UV-Vis) tasarlanmıştır. Oluşturulan yeni malzeme, FTIR ve FE-SEM teknikleri ile karakterize edilmiştir. Ön Plackett-Burman tasarımı tarama ve daha sonra merkezi bileşik tasarım oluşturmak için kullanılmıştır. Bu HKUST-1 MOF-NA-MIP kütlesi, sonikasyon süresi, sıcaklık, eluent hacmi, pH ve vorteks süresi gibi değişkenlerin bireysel ve işbirlikçi katkısını veren matematiksel denklemin önemli ve olası yapısını doğrulamıştır. Buna göre optimum koşul olarak 2,0 mg HKUST-1 metal organik kafes yapılı (MOF)-nikotinamid (NA) moleküler baskılı polimer (MIP) (MOF-NA-MIP) (200 µL eluent ve merkez noktalarda 5,0 dakika (dk) sonikasyon süresi olarak ayarlanmıştır. UA-DSPME-UV-vis yöntemi ile elde edilen sonuçlar şu şekildedir; doğrusal konsantrasyon aralığı 10-5000 µg/L, R² 0,99, LOD 1,96 ng/mL ve LOQ

6,53 µg/L. İdrar, süt ve su numunelerinden ekstrakte edilen nikotinamidin ortalama mutlak geri kazanımları ise %95,85-101,27 idi (Asfaram ve ark., 2017).

Muchlisyam 2021 yılında yapmış olduğu bir çalışma ile ortalama merkezleme oranı (MCR) yöntemi ve çoklu dalga boyu yöntemi (MWM) kullanarak multivitamin içerikli şurupta vitamin B1, B2, B6 ve niasinin eş zamanlı tayini için bir spektroskopik yöntem geliştirmiştir. Bu çalışma, ortalama merkezleme oranı yönteminde bölen faktörünün kullanımını belirlemeyi ve çoklu dalga boylarını ölçmek için beş farklı dalga boyunu kullanmayı amaçlamaktadır. Bu çalışmada çözücü olarak metanol-su karışımı, MCR yöntemi için üçlü bölen ve MWM için ise beş farklı dalga boyu kullanılmıştır. Multivitamin şurubunda vitamin B1, B2, B6 ve niasin düzeylerinin MCR yöntemi için tayini sırasıyla $101,44 \pm 4,35$, $100,19 \pm 4,09$, $98,75 \pm 0,47$ ve $100,75 \pm 1,06$ 'dır, çoklu dalga boyu yönteminde ise bu miktarlar sırası ile $98,05 \pm 1,28$, $99,04 \pm 1,17$, $99,02 \pm 1,00$, and $99,61 \pm 1,17$. Bu yöntemlerin multivitamin içerikli şuruplarda B1, B2, B6 ve niacin analizi için kullanılabilir yöntemler olduğu görülmektedir (Muchlisyam, 2021).

Ali ve arkadaşları, yohimbin, alfa tokoferil asetat, niasin ve kafeinden oluşan bir farmasötik formülasyona ön ayırma işlemi uygulamadan eş zamanlı olarak oran spektrumlarının ortalama merkezlenmesi (MCR) ve üçlü bölen (TD) spektrofotometrik yöntemler kullanarak tayin etmişlerdir. Yohimbin, alfa-tokorefol, niasin ve kafein için konsantrasyon aralıkları sırası ile 1-15 µg/mL, 3-15 µg/mL, 1-20 µg/mL ve 3-15 µg/mL'dir ve bu maddelerin spektrumları 215-300 nm dalga boyu aralığında ölçülmüştür. Ortalama merkezli üçüncü oran spektrumlarının büyüklükleri, yohimbin ve alfa tokoferol için sırasıyla 250 nm ve 268 nm'de ve niasin ve kafein için ise sırasıyla pikten pike 272–273 ve 262–263 nm'de ölçülmüştür. Yohimbin, alfa tokoferil asetat, niasin ve kafeinin MCR ile analizi ile tespit edilen geri kazanım değerleri sırasıyla $100,53 \pm 0,477$, $100,56 \pm 0,608$, $100,40 \pm 0,812$ ve $100,24 \pm 0,328$, TD analizi ile hesaplanan geri kazanım değerleri ise sırasıyla $100,91 \pm 0,835$, $100,51 \pm 1,408$, $100,26 \pm 1,333$ ve $100,78 \pm 1,029$ 'dur. Geliştirilen yöntemler birbirleriyle ve bildirilen yöntemlerle istatistiksel olarak karşılaştırılmış; öğrenci t-testi, F-testi ve tek yönlü ANOVA kullanılarak, deneyde

doğruluk ve kesinlik açısından anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir (Ali ve ark., 2016).

Kromatografik Yöntemler

Pfuhl ve arkadaşları niasinin (NA) ve niasinin ana metabolitleri olan niasinamid (NAM) ve nikotinürik asidin (NUR) insan plazmasındaki miktarlarını HPLC/MS yöntemi ile belirlemişlerdir. Bu çalışmada, analitlerin ve iç standardın (chinolin-3-karboksilik asit) insan plazmasından ayrılması için katı faz ekstraksiyonu gibi bir takım önlemler uygulanmıştır. Bu şekilde ekstrakte edilen numuneler, pozitif elektrosprey iyonizasyon (ESI) ile ve seçilmiş iyon izleme (SIM) tarama modunda, HPLC/MS ile analiz edilmiştir. Analitlerin 0,2 mL/dk akış hızında sıvı ayrımı için bir Grom Hypersil CPS kolonu 5m (250 x 2 mm) kullanılmıştır. Çalışmada hareketli faz olarak asetonitril: metanol: su: formik asit (700/190/110/1, v/v/v/v) karışımı kullanılmıştır. Analitlerin kalibrasyon eğrilerini oluşturmak için çalışılan konsantrasyon aralığı 50,0 ve 750 ng/mL'dir. Yöntemin geri kazanımı B3 vitaminin üç formu (niasin, niasinamid ve nikotinürik asit) için de % 86-89 arasında değişmiştir. 1 mL plazmada her üç analitin de LOQ 50,0 ng/mL olarak belirlenmiştir. Analizde enjeksiyonlar arasındaki toplam çalışma süresi ise 7 dk olarak belirtilmiştir (Pfuhl ve 2005).

Liu ve arkadaşları tarafından insan plazmasında niasin (NA) ve niasinin üç ana metaboliti olan nikotinamid (NAM), nikotinürik asit (NUA) ve N-metil-2 piridon-5-karboksamidinin (2-Pyr) eş zamanlı tayinleri için bir LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiştir. Çalışmada analitlerin insan plazmasından ekstraksiyonu için, protein çöktürme (PPT) tekniğinden yararlanılmıştır. Bu çalışmada analitlerin doğrusal konsantrasyon aralıkları; NA için 2,0–3000 ng/mL, NAM için 10,0–1600 ng/mL, NUA için 2,0–3000 ng/mL ve 2-Pyr için 50,0–5000 ng/mL olarak belirlenmiş ve her bir analit için 0,9975 üzeri regresyon katsayı (r) değerleri elde edilmiştir. Analitlerin kromatografik ayrımı için bir C₁₈ koruma kolonu (AQ, 4,0 mm × 2,0 mm i.d., 5 µm) ile birlikte, bileşenlerin ayrımının yapıldığı bir C₁₈ kolonu (Synergi Hydro-RP 80A,

150 mm × 2,0 mm i.d., 4 µm) kullanılmıştır. Bu çalışmada izokratik bir elüsyon gerçekleştirilmiş ve metanol ve %0,1 formik asitten (5:95, v/v) oluşan bir hareketli faz sistemi kullanılmıştır. Kromatografik sistemde akış hızı 0,25 mL/dk ve kolon sıcaklığı ise 35°C'dır. Tüm analitlerin tamamen ayrılması 9 dk'da gerçekleşmiştir. Analitlerin miktarı, pozitif elektrosprey iyonizasyon (ESI) modunda, her bir analitin ayrı ayrı parçalanma geçişlerini (NA için 124,1→80,1, NAM için 123,1→80,0, NUA için 181,0→79,0 ve 2-Pyr için 153,1→110,2) kullanan çoklu reaksiyon izleme (MRM) yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre analitlere ait alt tayin sınırları NA için 2,0 ng/mL, NAM için 10,0 ng/ mL, NUA için 2,0 ng/mL ve 2-Pyr için 50,0 ng/mL olarak belirlenmiştir (Liu ve ark., 2012).

Lahély ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, gıda ürünlerindeki niasin miktarının belirlenmesi için floresans dedektörüne sahip bir RP-HPLC yöntemi önerilmiştir. Önerilen bu yöntem, numunenin HCl ile hidrolizini, vitaminlerin (NAD, NADP, nikotinamid ve nikotinik asit) kolon öncesi alkalın hidrolizi ile nikotinik aside dönüştürülmesini, bir C₁₈ kolonunda ayırmayı, bakır (II) iyonları ve hidrojen peroksit varlığında UV spektroskopi ile kolon sonrası türevlendirmeyi ve son olarak florimetrik deteksiyonu içermektedir. Yöntem pek çok ön işlem içermesi bakımından oldukça yorucu bir yöntemdir. Floresan dedektörü ile, 322 nm'lik bir ekzitasyon dalga boyunda ve 380 nm'lik bir emisyon dalga boyunda çalışılmıştır. Tüm analizler için, bir koruma kolonu RP C₁₈ (4 mm iç çap x 4 mm; oktadesilsilil; 5 mm parçacık boyutu) ile birlikte uç kapaklı bir Lichrospher 100 RP 18 (5 mm iç çap x 250 mm; oktadesilsilil; 5 mm parçacık boyutu; Merck) ayırma kolonu kullanılmıştır. Ayırma, izokratik elüsyon ile oda sıcaklığında ve 1 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz 0,07 M potasyum dihidrojen fosfat, 0,075 M hidrojen peroksit ve 5x10⁻⁶ M bakır(II) sülfat içeren bir çözeltiden oluşturulmuştur. Enjeksiyon hacmi 20 µL ve konsantrasyon aralığı 0,01±8 mg/mL'dir. Bu konsantrasyon aralığında doğrusal bir kalibrasyon eğrisi (R²=0,9994) elde edilmiştir. Önerilen yöntemin geri kazanımı %90-107 ve niasinin tayin sınırı 0,2 mg/g olarak bulunmuştur. Tüm gıdalarda nikotinik asidin alıkonma süresi 8,5 dk olarak belirtilmiştir (Lahély ve ark., 1999).

Nwanisobi ve Ukoha, niasinin 2,3-dikloro-5,6- disiyno-1,4-benzokinon ile yük transfer kompleksleştirme reaksiyonuna dayanan bir spektroskopik yöntem geliştirmişlerdir. Bu çalışmada niasinin doğrusal konsantrasyon aralığı 5-130 µg/mL'dir ve bu yöntem ile oluşturulan renkli kompleks 464 nm'de ölçülerek niasinin miktar tayini yapılmıştır. Önerilen yöntem ile niasinin gözlenebilme sınırı 1,78 ve tayin sınırı 5,4 olarak rapor edilmiştir. Yöntem, %97,82'lik ortalama geri kazanım ve <1'lik düşük bağıl standart sapma ile saf ve ticari formlardaki niasin tayinine uygulanmıştır (Nwanisobi ve Ukoha, 2016).

Krishnan ve arkadaşları kolon sonrası türevlendirme ile birlikte floresan ve spektroskopik analiz sistemlerini de kullanarak yeni bir HPLC tekniği geliştirilmişlerdir. Niasinin florimetrik analizinde dalga boyları eksitasyon için 435 nm ve emisyon için 525 nm olarak belirlenmiştir. UV spektroskopisinde ise çalışılan dalga boyu 420 nm'dir. Geliştirilen yöntem ile hazır ticari tahıl ürünlerinde niasin miktarı belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar referans bir HPLC yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Önerilen yöntem ile sekiz hazır ticari tahıl örneğinden altısı için elde edilen sonuçlarla referans yöntemle elde edilen sonuçlar karşılaştırılmış ve yöntemler arasında anlamlı bir farklılık görülmediği tespit edilmiştir. Niasin, polimerik bir kolon taşıyan HPLC sistemi ile 0,33 M sodyum asetat ve 0,2 M asetik asit içeren bir hareketli faz ile ve izokratik bir elüsyonla kromatografik olarak analiz edilmiştir. Niasinin kolonda tutulma süresi 6,6 dk olarak kaydedilmiştir. Çalışmada niasinin alt gözlenebilme sınırı ve ortalama geri kazanım değerleri sırası ile %3,6 ve %99,43 olarak rapor edilmiştir (Krishnan ve ark., 1999).

Ciulu ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, beş farklı suda çözünen vitaminin (B2; B3; B5; B9; ve C vitamini) eşzamanlı olarak belirlenmesi için bir RP-HPLC yöntemi önermişlerdir. Yöntem 12 farklı botanik kökene sahip 28 bal örneğine uygulanmıştır. Önerilen yöntem ile tüm analitler 17 dk içinde tamamen elüe edilmiş ve tüm kromatografik çalışma 22 dk içinde tamamlanmıştır. Bu çalışmada, UV dedektörüne ve ters faz kolona (C₁₈) sahip olan bir HPLC sistemi kullanılarak ve gradient elüsyondan yararlanılarak vitaminler tayin edilmiştir. Çalışmada gradient

sisteminin kullanılması hem analiz süresinin uzamasına hem de aşırı rekatif kullanımına sebep olmuştur (Ciulu ve ark., 2011).

Melfi ve arkadaşları, tiamin, riboflavin, niasin, piridoksin, folik asit, askorbik asit, retinol, γ -tokoferol, filokinon, likopen ve β karotenin eşzamanlı analizi için UV ile birleştirilmiş bir LC yöntemi kullanmışlardır. Numunelerde analitlerin analizleri için önayırma işlem basamakları bulunmaktadır, ayrıca kromatografik analizde gradient elüsyon kullanılmıştır. Çalışmada polar ve lipofilik fazlar için farklı ekstraksiyon adımları uygulanmıştır. Her analit farklı çözünürlüklere sahip olduğu için, bu analitler farklı çözücülerde çözünmüşler. Kromatografik ayırmalar, UV-VIS dedektörüne sahip HPLC sistemi kullanılarak yapılmış ve niasin piki 247 nm'de $2, \pm 0,07$ dk'da gelmiştir (Melfi ve ark., 2018).

Shetty ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, yüksek performanslı sıvı kromatografisi kütle spektrometrisi/seçilmiş reaksiyon izleme (monitoring) (UPHPLC–MS/SRM) yöntemleri kullanılarak 50 farklı süt numunesinde (B vitaminlerinin (B3, B1, B2, B4, B5, B6, B9, B8 ve B12) analizi gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen analizde, sütteki B vitaminlerini analiz etmek için önce soğuk metanolle sütteki proteinler çöktürülmüş, ardından numuneye, santrifüjleme, yıkama, kurutma gibi pek çok işlem basamakları uygulanmıştır. Tüm bu işlemler analiz süresinin uzamasına, fazla reaktif kullanımına ve analizin oldukça yorucu bir hale dönüşmesine neden olmuştur. Ayrıca çalışmada gradient elüsyona başvurulması, B vitaminlerinin analiz süresinin uzun olması yöntemin dezavantajları arasındadır (Shetty ve ark., 2020).

Pencheva ve Georgieva yapmış oldukları çalışmada, takviye gıdaların içerisinde yer alan suda çözünen vitaminlerin (tiamin, piridoksin, riboflavin, niasinamid ve folik asit) analizi için HPLC /UV yöntemini kullanmışlardır. Bu çalışmada her bir vitamin için farklı izokratik üç kromatografik şart kullanılmıştır. İzokratik ayırma ile niasinamid tayini yapılmış ve bu şartta niasinin kolonda tutulma süresi 4,48 dk olarak verilmiştir (Pencheva ve Georgieva, 2014).

Monferrer-Pons ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, misel ters-faz sıvı kromatografisi kullanılarak beş farklı vitaminin (nikotinamid (B3), tiamin (B1), Riboflavin (B2), Piridoksin ve Piridoksamin (B6)) ticari ilaçlarda (kapsül, şurup ve haplarda) eş zamanlı kantitatif analizi yapılmıştır. Tüm vitaminlerin kromatografik analizi pH-3 te tek bir hareketli faz (%1 M SDS – 4% (v/v) pentanol) kullanılarak, 45 °C’de, akış hızı 1,0 mL/min (0-6 dk arasında) ve kromatogramın sonuna doğru 2 mL/min izokratik modda, C₁₈ kolonu ile UV ile 270, 290 ve 325 nm’de, gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışmada numunelere herhangi bir ön işlem uygulanmamıştır. Toplam analiz süresi 22 dk’dır, vitaminlerin kolonda alıkonma süreleri riboflavin için 1,9 dk, nikotinamid için 3,4 dk, piridoksin için 5,2 dk, piridoksamin için 17,6 dk ve tiamin için 19,8 dk’dır (Monferrer-Pons ve ark., 2003).

Hu ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, beş farklı enerji içeceğinde bulunan dokuz farklı B-grubu vitamini (tiamin, riboflavin, nikotinik asit, nikotinamid, D-pantotenik asit, piridoksin, biotin, folik asit ve siyanocobalamin) aynı anda sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi (LC-MS) ile analiz edilmiştir. Bu çalışmada dönüşümlü üç-boyutlu ayırma ATLD ve APTLD algoritmalarına dayalı ikinci dereceden kalibrasyon yöntemleriyle LC-MS'nin üç yollu veri dizisini modelleyen bir yöntem kullanılmıştır. Önerilen yöntem ile kromatografik ayırım 4,5 dk’da gerçekleştirilmiştir. Çalışmada B grubu vitaminini ayırmak ve elüsyon süresini kısaltmak için bir gradient elüsyon tekniği kullanılmıştır. Elüsyon sırası ise: B1, B3, B6, B5, B9, B12, B2 ve B7’dir (Hu ve ark., 2018).

Woollard ve arkadaşlarının çalışmasına göre, takviye edilmiş bebek formüllerinde B1, B2, B3 ve B6 vitaminlerinin eş zamanlı tayini, asitleştirilmiş bir metanol-su hareketli fazı ile ters faz, iyon çifti kromatografisi analizi ile proteini alınmış tek bir numune ekstraktından geliştirilmiştir. Bu çalışmada niasinamid için UV spektrumundan, B6 için ise floresan spektrumundan yararlanılmıştır. Çalışmada, ters fazlı LC sistemi Class-VP yazılımı tarafından kontrol edilen, pompa, otomatik örnekleyici ve seri halinde programlanabilir UV ve floresan dedektörlerinden oluşan 5 µm’lik, uç başlıklı, polimerik bir C₁₈ Luna Prodigy ODS (3) kolonu (150 x 4,6 mm, %15,5 karbon içeriği) ve koruma kolonu kullanılmıştır.

Çalışmada pH'ı 2,8 olan hareketli faz kullanılmıştır. LC sistemi ve kolon, 10-15 dk boyunca 2 mL/dk'da uygun hareketli faz ile rutin olarak dengelenmiştir (Woollard ve Indyk, 2002).

Çatak 10 çeşit hayvansal gıda ve 10 farklı bitki bazlı gıda örneğinde B3 vitamin miktarını belirlemek için bir HPLC ile kolon sonrası UV türevlendirme sistemi geliştirmiştir. Ürünler kolon sonrası türevlendirme sistemi kullanılarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile incelenmiştir. Et örneklerinde nikotinik asit ve nikotinamid bulunma oranları, tahıl ve baklagil örneklerinde sırasıyla %30 ve %70 ve %87 ve %13'tür. Hububat ve baklagiller gibi bitkisel kaynaklı besinlerde %87 oranında nikotinik asit bulunduğu belirlenmiştir. En iyi nikotinik asit kaynağı tahıllar ve baklagillerdir. Türevlendirme sistemi 20 m uzunluğunda ve 0,5 mm çapında teflon borunun 60 cm uzunluğundaki UV-A lambasına sarılmasıyla yapılmıştır. Sistem, analitik kolon ve floresan dedektörü arasına bağlanmıştır. B3 vitamini, floresan dedektörle donatılmış HPLC ile belirlenmiştir. Çalışmada, 1,0 mL/dk akış hızında, Zorbax eclipse X08- C₁₈ kolonu (5 µm, 4,6 x 150 mm) kolonu kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 25 °C, enjeksiyon hacmi 20 uL ve analiz süresi ise 40 dk olarak belirtilmiştir. Floresans dedektörü sırasıyla 322 nm eksitasyon dalga boyuna ve 380 nm emisyon dalga boyuna ayarlanmıştır (Çatak, 2019).

LaCroix ve arkadaşlarının çalışmalarına göre bebek ve süt ürünlerinde bulunan niasin miktarı çeşitli analitik sıvı kromatografisi (LC) yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışmada bir fotodiyot dizi dedektörü (PDA) ve bir Vydac 201TP C₁₈ ters fazlı LC kolonu (150 x 4,6 mm, parçacık boyutu 5) ile donatılmış bir LC sistemi kullanılmıştır. Nikotinamid, demineralize su ile 1,0 L'ye seyreltilmiş ve potasyum hidroksit (KOH) ile pH 2,7-2,9'a ayarlanmış metanol (250 mL) ve formik asidin (10 mL) hareketli fazı kullanılarak 260 nm'de tayin edilmiştir. Dioktil sülfosüksinat (1,0 g) hareketli faz çözeltisine bir iyon eşleştirme maddesi olarak eklenmiştir. Hareketli fazın akış hızı 0,6 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 100 µL olarak belirlenmiştir. Tahılda bulunan bağlanmamış niasin, 0,6 M tri-kloroasetik asit ile özümlemiş ve %75 metanol ve sudan (pH 2,8, formik asit ile) oluşan bir hareketli faz ve bir iyon eşleştirme ajanı olarak sodyum dioktilsülfosüksinat (%0,1)

kullanılarak kromatografik olarak tayin edilmiştir. Nikotinamid standardı ve LC pikinin benzerlik indeksi spektral eşleşmeleri analiz üzerine müdahalelerin olmadığını göstermektedir. Bu çalışmada niasinin geri kazanım değerleri %90-103 olarak belirlenmiştir (LaCroix ve ark., 2005).

León-Ruiz ve arkadaşları, balda bulunan suda çözünen vitaminlerin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için izokratik bir RP-HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Sulu bir sülfürik asit çözeltisi olan hareketli faz ile analiz, eş zamanlı olarak UV ve floresan ile gerçekleştirilmiştir. Bu koşullarda C vitamini, B1, B3N (nikotinamid), B3H (nikotinik asit), B5 ve B6 vitaminlerinin ayrılması 15 dk'da gerçekleşmiştir. Hareketli faza %2 v/v metanol eklenmesi bu vitaminlerin analiz süresinden 10 dk kazanç sağlanmasına, katyonik yüzey aktif madde heksadesiltrimetilamonyum bromür (CTAB) eklenmesi ise analiz süresinin 6 dk olmasına neden olmuştur. Hareketli faza %2 v/v metanol eklenmesi ile oluşturulan hareketli faz ile B1, B3N (nicotinamide), B3H (nicotinic acid), B5 and B6 için LOD değerleri sırasıyla 0,055 mg/L, 0,067 mg/L, 0,048 mg/L, 0,037 mg/L ve 0,063 mg/L; LOQ değerleri ise sırasıyla 0,182 mg/L, 0,222 mg/L, 0,160 mg/L, 0,124 mg/L ve 0,209 mg/L olarak bulunmuştur. Hareketli faza CTAB eklenmesi durumunda ise C vitamin, B2, B3N (nicotinamide) ve B3H (nicotinic acid) için LOD değerleri sırasıyla 0,64 mg/L, 0,43 mg/L, 0,63 mg/L, 0,38 mg/L; LOQ değerleri ise sırasıyla 2,13 mg/L, 1,42 mg/L, 2,11 mg/L, 0,127 mg/L olarak bulunmuştur. Her iki hareketli fazı kullanan analitik yöntemler de, yüksek hassasiyet ve düşük gözlenebilme sınırı açısından iyi sonuçlar elde edilmesini sağlamışlardır (León-Ruiz ve ark., 2013).

Rudenko ve Kartsova'nın gerçekleştirdiği çalışmada, çeşitli gıdalarda (kombine yemlerde, biyolojik olarak aktif olan takviyelerde ve premikslerde) bulunan suda çözünen vitaminlerin (nikotinik asit (B3 veya PP), nikotinamid (B3 veya PP), piridoksin hidroklorür (B6), riboflavin (B2) ve tiamin hidroklorür (B1) ve C vitamini) belirlenmesi için bir iyon çifti reaktifi (sodyum heptansülfonat) içeren ters fazlı bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Kromatografik analiz için UV dedektörüne sahip bir Supelco C₁₈ kromatografik kolonu (250 x 4,6 mm, adsorban

parçacık boyutu 5 µm) kullanılmıştır. Deneyler bir gradyan elüsyon modunda ve 260 nm ve 280 nm’de gerçekleştirilmiştir. Çalışmada hareketli faz olarak hacimce %4 asetonitril ve 10,5 mM sodyum heptansülfonat (bileşen A) ve asetonitril (bileşen B) karışımı içeren 11,0 mM fosfat tampon çözeltisi (pH 2,5) kullanılmıştır ve hareketli fazın akış hızı 1 mL/dk’dır. Premikslerde, kombine yemlerde ve biyolojik olarak aktif takviyelerdeki vitaminlerin belirlenmesinde, numuneler 25 mL 0,01 M hidroklorik asit çözeltisi ile 40°C’de 10 dk süreyle ekstrakte edilmiştir. Vitaminlerin Adsorban SepPak C₁₈ üzerindeki geri kazanım oranları nikotinik asit için 0,77 ± 0,04; nikotinamid için 0,86 ±0,05; piridoksin için 0,75 ±0,04; tiamin için 0,86 ±0,05 ve riboflavin için 0,94 ±0,03’tür (Rudenko ve Kartsova, 2010).

Elektroforetik Yöntemler

Ward ve arkadaşları tarafından konsantre sürülebilir mayalarda toplam niasin miktarının belirlenmesi için yeni bir kılcal elektroforetik yöntem geliştirilmiştir. Bu işlem için ilk olarak gıda ürününden nikotinik asidi serbest burakmak için numune sulu kalsiyum hidroksit çözeltisi içinde otoklavlanmıştır. Numune, aktive edilmiş bir C₁₈ Sep-Pak kartuşundan geçirilmiş ve ardından numuneye, SCX kolonları kullanılarak katyon değiştirme kromatografisi uygulanmıştır. Bu işlemlerin ardından nikotinik asit, 1:1 oranında hazırlanmış 0,02 M sodyum tetraborat ve 0,02 M disodyum hidrojen ortofosfat (pH 9,2) karışımından oluşan bir tampon içeren 75 cm x75 µm kaplanmamış, erimiş silika kapiler kolondan geçirilerek analiz edilmiştir. Hesaplamalarda pik alanlarından yararlanılmıştır. Bu çalışmada iç standart olarak sakkarin (40 pg/mL) kullanılmıştır. Nikotinik asidin lineer konsantrasyon aralığı 1-15 pg/mL’dir. Ayırmalar 20 kV’da ve 30 °C’de yapılmıştır. Bileşikler, vakum altında (vat. seviye 2, 25 kPa/s) yüklenmiş ve UV’de 254 nm’de tayin edilmiştir (Ward ve ark., 1997).

Ward ve Trenerry yapmış oldukları bir çalışma ile tahıl, et, balık, maya, fıstık ezmesi, kabuklu gıdalar, ayçiçeği tohumu ve diğer bazı gıdalarda bulunan niasin miktarını belirlemek için bir kapiler elektroforez (CE) yöntemi geliştirmişlerdir. Bu

yöntem ile uzunluğu 50 cm olan C₁₈ kolonundan %15 asetonitril ve %85 oranında 1:1 0,02 M potasyum dihidrojen ortofosfat ve 0,02 M disodyum hidrojen ortofosfat pH 7 karışımı içeren bir tampon sistemi geçirilmiştir. Çalışmada iç standart olarak sakkarin kullanılmıştır. Ayırmalar, +20 kV ve 30°C'de gerçekleştirilmiştir. CE metodu ile belirlenen niasin miktarını karşılaştırmak için referans bir yöntem olarak HPLC yöntemi kullanılmıştır. Karşılaştırma neticesinde her iki yöntem arasında da anlamlı bir farklılığın olmadığı belirlenmiştir. HPLC analizi, içerisinde 0,005M PIC A reaktifi bulunan %15 metanol, %85 deiyonize su karışımı içeren bir hareketli fazın kullanıldığı bir C₁₈ ön kolonu ile donatılmış bir 4-µm C₈ (8 mm x 100 mm) kolonu ve UV detektörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. HPLC analizi için iç standart kullanılmamıştır. HPLC sisteminde akış hızı 1,5 mL/dk ve niasinin detekte edildiği dalga boyu 254 nm olarak tespit edilmiştir. Niasinin CE'ye göre göç süresinin (Isco ve Hewlett-Packard cihazları için sırasıyla 8,5 ve 12,5 dk), HPLC'ye göre tutma süresine (10 dk) benzer olduğu rapor edilmiştir (Ward ve Trenerry, 1997).

Elektrokimyasal Yöntemler

Abdoon ve arkadaşları tarafından nikotinamidin (NA) potansiyometrik tayini için hassas ve seçici elektrokimyasal sensörler dizyn edilmiştir. Yazarlar, bu amaçla, plastikleştirici (o-nitrofeniloktil eter (o-NPOE)) ve polimerik matris polivinil klorür kullanarak dört çeşit NA sensörü geliştirmişlerdir. Kullanılan sensörler; sensör I ve II, elektroaktif malzeme nikotinamid-fosfomolibdat (NA-PM) ile hazırlanan kaplı tel tipindedir ve sensör II iyonofor 2-hidroksipropil b siklodekstrin kullanılarak modifiye edilmiştir. Sensör III ve IV, karbon pasta tipi sensörlerdir ve nikotinamid-fosfotungstat (NA-PT) kullanılarak üretilmişlerdir ve sensör IV için karbon nanotüpler kullanılmıştır. Çalışmada sensörlerin karakteristik performansları incelenmiş ve her bir sensörün 25 °C'de Nernstian yanıtları (sensör I için $51,7 \pm 0,4$ mV/dekat, sensör II için $54,6 \pm 0,8$ mV/dekat, sensör III için $56,9 \pm 0,5$ mV/dekat ve sensör IV için $59,7 \pm 0,2$ mV/dekat) belirlenmiştir. Bu sensörlerin alt gözlenebilme sınırları (LLOD) ise şu şekildedir; sensör I için $4,4 \times 10^{-7}$ mol/L, sensör II için $2,4 \times 10^{-7}$ mol/L, sensör III için $2,5 \times 10^{-7}$ mol/L ve sensör IV için $2,6 \times 10^{-8}$ mol/L olarak

belirlenmiştir. Elde edilen sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve daha önce yayınlanmış diğer yöntemlerden elde edilen verilerle karşılaştırılmıştır (Abdoon ve ark., 2015).

Parshina ve arkadaşları, karboksil ve sülfö grupları ile karbon nanotüpler (CNT) tarafından modifiye edilen perflorosülfonik asit membranlarını MF-4SC, farmasötik çözeltilerde nikotinik asidin belirlenmesi için potansiyometrik çapraz duyarlı sensörler için malzeme olarak ele almışlardır. Bu yöntem ile sulu çözeltilerde nikotinik asit iyonlarının LOD değeri $1,0 \times 10^{-5}$ M olarak bulunmuştur. Tabletlerde nikotinik asit iyonlarının tayinindeki bağıl hata ve BSS değerleri ise sırasıyla %0,8–1,3 ve %5'tir. Enjeksiyonlarda nikotinik asit tayininde bağıl hata ve BSS sırasıyla %3 ve %0,9 olarak tespit edilmiştir (Parshina ve ark., 2022).

Parshina ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, MF-4SC perflorosülfonik asit membranlarına dayalı hibrit malzemeler, sulu çözeltilerde ve farmasötiklerde nikotinik asidin tayini için potansiyometrik sensör malzemeleri olarak incelenmiştir. Hibrit membranlar, 3-aminopropil (MF-4SC/SiO₂-(CH₂)₃-NH₃⁺) ile modifiye edilmiş silika nanopartikülleri ve sülfonatlı (doğrudan veya hidrokarbon grupları yoluyla) bir yüzeye (MF-4SC/ZrO₂-SO₃⁻, MF-4SC/SiO₂-(CH₂)₃-SO₃⁻) sahip zirkonya ve silikanın dahil edilmiş nanopartiküllerini içermekteydi. Sulu çözeltilerdeki nikotinik asit iyonlarının LOD değeri 10^{-8} – 10^{-7} M olarak bulunmuştur. Bu çalışmada nikotinik asit farmasötiğindeki aktif ve yardımcı maddeleri belirlemek için ağırlıkça %5 SiO₂–(CH₂)₃-SO₃⁻, ve ağırlıkça %3 SiO₂–(CH₂)₃-NH₃⁺ (15 mol %'si) içeren zarlara dayalı çapraz duyarlı sensör dizisi kullanılmıştır (Parshina ve ark., 2021).

Santos ve Rangel'in yaptığı çalışmada, demlenmiş kahve numunelerinde niasin analizi için amperometrik dedeksiyon ile bir düşük basınçlı kromatografik akış enjeksiyon sistemi geliştirilmiştir. Manifold, didesildimetilamonyum bromür ile kaplanmış 1,0 cm uzunluğunda monolitik bir kolon ve laboratuvar yapımı bor katkılı bir elmas elektrottan oluşmaktaydı ve hareketli fazın hat içi iyonik kuvveti ayarlıydı. Kolonun kaplanması ve şartlanması aşağıdaki çözeltilerin 0,5 mL/dk'lık bir akış hızında sırayla itilmesinden oluşuyordu: (a) asetonitril, su, 50/50, v/v (40 dk); (b)

asetonitril, su, 5/95, v/v (5 ak); (c) asetonitril, su, 5/95, v/v, 1 mM DDAB (1 saat); ve son olarak, (d) HCl 0,0025 M (1 gün). Son adımda, monolitik kolonu DDAB fazlası temizlenene kadar iyice yıkanmıştır, çünkü bu bileşiğin yıkanması BDD elektrodunun hassasiyetini azaltmaktadır. Elektrokimyasal sistem, çalışma elektrotu olarak bir BDD elektrotu, referans elektrotu olarak bir Ag/AgCl çift temaslı elektrotu ve yardımcı elektrot olarak bir camı karbon çubuk elektrottan oluşuyordu. Bu çalışmada korelasyon katsayısı 0,9999, LOD değeri $7,90 \times 10^{-7}$ M, LOQ değeri ise $2,63 \times 10^{-6}$ M olarak belirlenmiştir (Santos ve Rangel, 2015).

1.3.2. Kafeinin Kantitatif Analizi

Spektroskopik Yöntemler

RÁCZ ve arkadaşları 2016 yılında yapmış oldukları bir çalışma ile, FT-NIR spektroskopisi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile Macaristan, Slovakya ve Yunanistan'dan sağlanan yaklaşık yüz ticari içeceği örneğinin kafein ve şeker içeriklerini kantitatif olarak tayin etmişlerdir. Çalışmada kalibrasyon modelleri, kısmi en küçük kareler regresyonu (PLSR) ile oluşturulmuştur. Yazarlar kafein miktarını belirlemek için bir referans HPLC-UV yöntemi kullanılmışlardır. Gerçekleştirilen FT-NIR analizlerinde, yöntem çok boyutlu bir kemometrik tekniklerinden PLSR tekniği ile kombine edilmiştir. Ayrıca çalışmada PLSR tekniğinin yanı sıra temel bileşenler analizi (PCA) ve doğrusal diskriminant analiz (LDA) tekniklerinden de yararlanılmıştır. Bu çalışmada FT-NIR ölçümleri için bir Fourier dönüşümü yakın kızılötesi spektroskopi (FT-NIR) analiz cihazı kullanılmıştır ve cihaz, bir kuvars ışın ayırıcı, entegre bir interferometre, akışlı bir kuvvet ile donatılmış termostatl bir numune bölmesi ve 800–2500 nm dalga boyu aralığında çalışan bir TE-InGaAs dedektörü ile donatılmıştır. Spektral çözünürlük 8 cm^{-1} , tarayıcı hızı 10 kHz ve her bir spektrum, birbirini takip eden 32 taramanın ortalama spektrumu ile elde edilmiştir. Kromatografik analizlerde ise, kafeinin HPLC-UV ile miktarının belirlenmesi için bir C_{18} HPLC kolonu (4,6 mm x 150 mm x 5,0 μm) kullanılmıştır. Kromatografik ayırım, 40 °C'de izokratik elüsyon ile 18 dk'da

gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada akış hızı 1 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 20 µl'dir ve kafein 273 nm'de detekte edilmiştir. Kafeinin kolonda süresi ise yaklaşık 9,5 dk'dır (Rácz ve ark., 2016).

Zielińska ve arkadaşları tarafından, enerji içeceği numunelerinin içerisindeki bileşiklerin analizi, ¹H-NMR spektroskopisi, HPLC-DAD, titrasyon ve refraktometrik yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ¹H-NMR yöntemine, şeker, sitrik asit, kafein ve niasinamid miktarını belirlemek için başvurulmuştur. Tüm ölçümler 295 K'de gerçekleştirilmiştir. Çözeltiler 9:1 (v/v) H₂O ve D₂O karışımından oluşan bir solvent sistemi ile hazırlanmıştır. Niasinamid ve kafein için ¹H-NMR ile elde edilen veriler şu şekildedir: niasinamid için R² 0,997, konsantrasyon aralığı 0,013–0,400 mg/mL, LOD 0,017 mg/mL, LOQ 0,050 mg/mL; kafein için R² 0,996, konsantrasyon aralığı 0,040–1,210 mg/mL, LOD 0,057 mg/mL, LOQ 0,170 mg/mL. Tüm analitler için ortalama geri kazanım değerleri %98 ve %105 aralığında iken, bağıl standart sapma (BSS) değerleri %2'nin altındadır. Kafein, niasinamid ve sitrik asit miktarı, gradient pompa sistemi ve bir fotodiyot dizisi detektörü içeren bir HPLC sistemi kullanılarak analiz edilmiştir. Kromatografik ayırım, 35°C'de ve 1 mL/dk akış hızında, RP-18e kolonu (5 µm, 250 mm x 4,6 mm) ile gerçekleştirilmiştir. HPLC yönteminde geri kazanım değerleri %97-103 aralığında bulunmuştur. Kromatografik analiz gradient elüsyon ile gerçekleştirilmiş ve bunun için %0,1 (v/v) formik asit (A) ve asetonitrilden (B) oluşan bir hareketli faz sisteminden yararlanılmıştır. Gradient elüsyon planı: 0–5 dk, %1 B; 5–10 dk, %1–50 B; 10–15 dk, %50–1 B; 15–20 dk, %1 B. HPLC sisteminde niasin 260 nm'de kafein ise 270 nm'de detekte edilmiştir. Niasinamid ve kafein için alıkonma süreleri sırasıyla 4,7 dk ve 12,4 dk'dır (Zielińska ve ark., 2022).

Mufakkar ve arkadaşları, yaptıkları çalışma ile, piyasada bulunan on farklı marka enerji içeceğindeki kafeinin UV-spektroskopisi ile miktar tayinini yapmışlardır. Bunun için konsantrasyon aralığı 0,1 – 1,3 mg/mL arasında değişen 13 farklı kafein içeren standart çözelti hazırlanmıştır ve bu hazırlanan çözeltilerin UV spektrofotometre ile 272 nm'de absorbanları alınarak enerji içeceklerindeki kafein miktarı belirlenmiştir. Sonuçlar her içekte kafein miktarının farklı olduğunu

göstermiştir. Bu çalışmada, en yüksek kafein konsantrasyonunun Power Horse adlı markada olduğunu (0,754955 mg/mL) ve en düşük miktarda kafeinin ise Big Apple adlı bir markada bulunduğu (0,100901 mg/mL) gözler önüne sermiştir (Mufakkar ve ark., 2015).

Amos-Tautua ve Diepreye tarafından 2014 yılında gerçekleştirilen çalışmada, Nijerya'nın Yenagoa kentinde yerel piyasada bulunan sekiz farklı marka gazlı ve enerji içeceğinin pH ve kafein düzeyleri standart bir UV spektroskopik yöntemle belirlenmiştir. Çalışmada kafeinin kantitatif analizi için ekstraksiyon çözücüsü olarak karbon tetraklorür kullanılmıştır ve her çözeltinin absorbansı, 270 nm absorpsiyonda ölçülmüştür. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, içeceklerin pH seviyesinin 5,92-6,44 arasında hafif asidik olduğunu ve kafein düzeylerinin ise gazlı meşrubat Coca Cola'da $43,71 \pm 0,55$ ppm ve enerji içeceği Red Bull örneğinde ise $58,31 \pm 0,35$ ppm olduğunu göstermiştir. Gazlı meşrubatlar için kafein limiti 43,71-45,83 ppm iken bu çalışmada bu miktar 44,52 ppm bulunmuştur. Benzer şekilde enerji içeceklerinde kafein limiti 47,56-58,31 ppm iken yazarlar bu miktarı 52,24 ppm olarak bulmuşlardır. Tüm bu sonuçlar, analiz edilen içeceklerdeki kafein seviyesinin FDA tarafından izin verilen maksimum limitlerin altında olduğunu göstermiştir (Amos-Tautua ve Diepreye, 2014).

Armenta ve arkadaşları, ticari enerji içeceği numunelerinde kafein tayini için katı fazlı titreşim spektrometrisine dayalı bir metodoloji (katı faz Fourier dönüşümü-Raman spektrometrisi, SP-FT-Raman) geliştirmişlerdir. 5 mm i.d.'lik bir cam tüp içine paketlenmiş bir C₁₈ katı fazı üzerinde sabitlenmiş kafeinin Raman spektrumları, doğrudan 3500 ve 70 cm⁻¹ arasında elde edilmiştir. Kafein tayini için 573 ile 542 cm⁻¹ arasındaki Raman spektrumu değerleri kullanılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, yöntemin tekrarlanabilirliği %3, geri kazanım 99 ± 3 ve LOD değeri ise 18 mg/L'dir (Armenta ve ark., 2005).

2005 yılında yapılan bir çalışmada Huck ve arkadaşları, kaba yeşil çekirdeklerin ayrıştırılmasından sonra kavrulmuş kahvedeki üç ana alkaloid kafein (Caf), teobromin (Tbr) ve teofilin (Tph) miktarının belirlenmesi için yakın kızılötesi

spektroskopiye (NIRS) dayalı yeni bir analitik yöntem geliştirmişlerdir. Bu çalışmada sabit faz olarak gözeneksiz silika- C₁₈ ve gözenekli silika- C₁₈ kullanılmış ve her iki durumda da analiz süreleri karşılaştırılmıştır. 3 alkaloidin gözeneksiz silika- C₁₈ ile analizi 2,5 dk'da, gözenekli silika- C₁₈ ile analizi ise 20 dk'da gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle çalışmada gözeneksiz silika C₁₈ kullanılmıştır. Valide edilmiş LC-UV yöntemi, NIRS sisteminin kalibrasyonu için referans yöntem olarak seçilmiştir. 83 sıvı kahve ekstraktının analizinde, kafein ve teobromin için 0,10 ve 4,13 g/100 g konsantrasyon aralığında 0,86 ve 0,85 korelasyon katsayıları ile sonuçlanmıştır. Bu analizde SEE (standart tahmin hatası) değerleri sırasıyla 0,34/100 g ve 0,40 g/100 g iken; SEP (standart tahmin hatası) değerleri ise 0,07/ 100 g ve 0,10 g/100 g'dır. LC yöntemi ile LOD değeri 0,244–0,60 ng/100 g iken, NIRS yöntemi ile bu değer 0,05 g/100 g'dır ve bu sonuçlar Teofilin NIRS ile analizini imkansız kılmaktadır, teofilin analizi için LC yöntemi tercih edilmelidir. Fakat, NIRS yöntemi ile kafein ve teobrominin analizi mümkündür (Huck ve ark., 2005).

Asogwa ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışma, enerji içeceklerinin porsiyon hacimlerindeki kafein içeriğini spektrofotometrik ve iyodometrik geri titrasyon yöntemleriyle kantitatif olarak analiz etmeyi amaçlamaktadır. Spektrofotometrik yöntem ile kafein miktarının tayin edilmesi için 270 nm dalga boyunda çalışılmıştır. Kafein miktarının enerji içeceklerindeki UV spektroskopi ile bulunan miktarları 37,40 mg/200 mL (Passion) < 64,73 mg/250 mL (Bullet) < 82,70 mg/355 mL (Power Horse) < 86,30 mg/400 mL (Predator) < 114,68 mg/500 mL (Fearless) iken, iyodometrik geri titrasyon yöntemiyle Bullet, korkusuz, Predator, Power Horse ve Passion için bu miktarlar sırasıyla 57,50 mg/250 mL, 165,00 mg/500 mL, 160,00 mg/400 mL, 117,15 mg/355 mL and 40 mg/200 mL'dir. Ürün etiketinde belirtilen miktarlar ise Bullet, korkusuz, Predator, Power Horse ve Passion için sırasıyla 78,75 mg/250 mL, 157,50 mg/500 mL, 120,00 mg/400 mL, 133,60 mg/355 mL ve 50 mg/200 mL olarak verilmiştir. Sonuçlar göstermiştir ki, enerji içeceklerindeki kafein içeriğinin belirlenmesi amacıyla spektrofotometrik ve iyodometrik geri titrasyon yöntemlerine başvurulması, doğru ve güvenilir sonuçlar vermektedir (Asogwa ve ark., 2023).

Alesso ve Fernández tarafından 2016 yılında gerçekleştirilen çalışmada, kafein analizi için 338 nm emisyon ve 280 nm eksitasyon dalga boyunda sıgır serum albümini molekülünün floresan emisyonu üzerindeki söndürme etkisine dayalı olarak yeni bir metodoloji geliştirilmiştir. Taşıyıcı olarak 1,5 mL/dk akış hızında, potasyum dihidrofosfat 5×10^{-3} mol/L tampon (pH 6,8) kullanılmıştır. Önerilen metodoloji, saatte 60 numunenin işlenmesine izin vermektedir. Bu yöntemin sonuçlarına göre kafeinin r^2 değeri 0,9954, LOD değeri 2×10^{-6} mol/L ve LOQ değeri ise $6,68 \times 10^{-6}$ mol/L'dir (Alesso ve Fernández, 2016).

Palo ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada zayıflatılmış toplam yansıma Fourier dönüşümü kızılötesi (ATR-FTIR) spektroskopisinin basılı formülasyonların içerisinde bulunan kafein ve loperamid hidroklorürün kantitatif analizinde kullanımı araştırılmıştır. Bu çalışmada baskı çözünürlüğü değiştirilerek farklı dozlarda kafein ve loperamid hidroklorür (LOP) içeren formülasyonlar hazırlamak için piezoelektrik inkjet yazıcıdan yararlanılmıştır. Basılı ilaç içeriği, CAF için UV-Vis spektrofotometri ile 273 nm'de ve LOP için ise HPLC ile belirlenmiştir. Yöntemin 1,25-20 mg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu belirlenmiştir (R^2 0,9991). Bu çalışma, basılı ilaç formülasyonlarının kantitatif analizi için tek değişkenli/çok değişkenli veri analizi ile birlikte kızılötesi spektroskopinin uygulanabilirliğini göstermesi açısından önem taşımaktadır (Palo ve ark., 2016).

Kromatografik Yöntemler

Chirita ve arkadaşları yapmış oldukları çalışma ile enerji içeceği numunesinde bulunan kafein ve taurinin eş zamanlı tayini için bir HILIC/UV/ELSD yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırma, bir NH_2 polimeri (150 x 2,1 mm iç çap, 5 μm) ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada evaporatif ışık saçılım dedektörü (ELSD) ve UV-Vis. detektörleri kullanılmıştır. Kromatografik sistemde akış hızı 0,15 mL/dk, kolon sıcaklığı 45°C, hareketli faz MeOH/H₂O (30/70, v/v) ve deteksiyon için seçilen dalga boyu 272 nm'dir. Kromatografik ayırma için izokratik elüsyon tercih edilmiştir. Analizde 0,995'in üzerinde r^2 değerlerine ulaşılmıştır. ELSD ile kafein

için LOD değeri yaklaşık 2 mg/L iken 272 nm'de UV ile kafein için LOD değeri yaklaşık 10 µg/L olarak bulunmuştur. ELSD ve UV dedektörleri ile bulunan LOQ değerleri ise sırasıyla 5 mg/L ve 30 µg/L'dir. Geri kazanım değerleri ise kafein için %68,7-84,4 arasında değişmektedir (Chirita ve ark., 2010).

Medina ve arkadaşları 2020 yılında yapmış oldukları çalışma ile San metropol bölgesinde 384 kişiye yapılan bir anketin sonuçlarına göre seçilen ve Kolombiya pazarında tüketilen üç enerji içeceğindeki kafein miktarını analiz etmişlerdir. Enerji içeceği numunelerindeki kafein miktarı, bir ultra hızlı sıvı kromatografisi (UFLC) yöntemi ile belirlenmiştir. UFLC sisteminin kromatografik şartları belirlenirken NTC-ISO 20481 yöntemi referans alınmıştır. Bir C₁₈ kolonuna (4,6 mm x 50 mm x 2,2 µm) sahip, ters faz UFLC-PDA sistemi ile kafein analizi izokratik elüsyon ile 272 nm'de gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırım için metanol: su tip I (24:76) karışımına sahip hareketli fazın akış hızı 1,00 mL/dk, enjeksiyon hacmi 10 µL, fırın sıcaklığı 40 °C'dır. Kafeinin UFLC çalışmasında lineer kalibrasyon aralığı 0,025-30,0 mg/L, LOD değeri 0,0034 mg/L, LOQ değeri 0,0065 mg/L ve alıkonma süresi (tR) 2,050 dk'dır (Medina ve ark., 2020).

Ali ve arkadaşları, HPLC yöntemi ile Sudan yerel pazarlarında ticari olarak pazarlanan 15 farklı içecek numunesinin kafein düzeyini belirlemişlerdir. Kromatografik ayırma Shim-pack VP-ODS kolonu (250 x 4,6 mm) ile 270 nm'de gerçekleştirilmiş ve elüent olarak metanol:su (30:70, v/v) kullanılmıştır. Çalışmada PDA dedektörü kullanılmış ve akış hızı 1,3 mL/min, enjeksiyon hacmi ise 20 µL olarak verilmiştir. Yöntemde doğrusal konsantrasyon aralığı 10-100 ppm'dir ve bu aralıkta korelasyon katsayısı 0,9999 olarak verilmiştir. Bu çalışmada kafeinin gözlenebilme sınırı 0,023 ppm ve yöntemin kesinliği ise %1,25 (40 ppm konsantrasyonda) olarak bulunmuştur. Geri kazanım değerleri ise Pepsi Cola, Coca Cola, Red Bull, Gazaltain siyah çay ve Kahve örneklerinde sırasıyla %99, %105, %99,2, %102 ve %102'dir. Analiz sonucunda numunelerde saptanan kafein miktarı ise şu şekildedir: çay numunelerinde 458,6 ppm, enerji içeceklerinde 255,6 ppm, kahvede 252,4 ppm ve gazlı alkolsüz içeceklerde 96 ppm (Ali ve ark., 2012).

Ahmad ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada iki meşrubat ve altı enerji içeceği olmak üzere pazarlanan sekiz alkolsüz içecekte bulunan kafein miktarını belirlemek için UPLC-PDA yöntemi geliştirmeyi ve doğrulamayı amaçlamışlardır. Kafeinin kromatografik ayırımı, Acquity UPLCVR CSHTM C₁₈ (1,7 mm, 2,1x 100 mm) kolonu ile, izokratik modda ve asetonitril ve sudan (30:70, v/v) oluşan bir hareketli faz kullanılarak, 0,3 mL/dk akış hızında ve 1,0 µL enjeksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir. Kafeinin bu yöntemle elüsyonu 1,06 dk'da gerçekleşmiştir ve kalibrasyon eğrisi oluşturmak için kafeinin 273 nm'deki değerleri kullanılmıştır. Kafeinin doğrusalılığı, 40-200 ng/mL arasında değişen bir konsantrasyon aralığında değerlendirilmiştir. Yöntemden elde edilen sonuçlar: korelasyon katsayısı r^2 0,9994, LOD değeri 7,34 ng/mL, LOQ 22,24 ng/mL ve geri kazanım değerleri ise %97,80–103,28 olarak bulunmuştur. Tüm bu sonuçlar yöntemin doğruluğunu ispat etmektedir (Ahmad ve ark., 2022).

Gliszczyńska-Świąło ve Rybicka 2015 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, kafein ve suda çözünen vitaminlerin (C vitamini, tiamin, riboflavin 5-fosfat ve riboflavin, nikotinik asit ve nikotinamid, pantotenik asit, piridoksal, piridoksamin ve piridoksin, folik asit ve siyanokobalamin) eş zamanlı tayinleri için PDA ve floresan dedektörüne sahip HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırma, µBondapak C₁₈ kartuş koruma kolonu ve Nova-Pak C₁₈ kolonu (150 mm×3,9 mm, 5 µm) ile donatılmış bir HPLC sistemi ile sağlanmıştır. Hareketli faz, Metanol (çözücü A) ve 0,005 M hekzansülfonik asit içeren 0,05 M NaH₂PO₄'ten (pH 3,0) (çözücü B) oluşmaktadır. Çalışmada gradient elüsyon uygulanmıştır; 20 dk boyunca %10 A'dan %40 A'ya kadar doğrusal bir artış gerçekleştirilirken sonraki 10 dk içinde de 1 mL/dk akış hızı ile başlangıç koşullarına geri dönüş sağlanmıştır. Çalışmada enjeksiyon hacmi 20 µL'dir. Kafein ve bazı vitaminlerin tayini için PDA dedektörü kullanılırken, B6 (eksitasyon dalga boyu 290 nm ve emisyon dalga boyu 390 nm) ve B2 vitamini için (eksitasyon dalga boyu 450 nm ve emisyon dalga boyu 530 nm) floresan dedektörü kullanılmıştır. Bu yöntem ile 30 dk'da 13 bileşik analiz edilmiştir. Kolonda kafeinin alıkonma süresi 17,58±0,04 dk'dır ve kafein 270 nm'de dedekte edilmiştir. Bu çalışmada HPLC-PDA ile belirlenen LOD'ler 13-121 ng/mL arasında, HPLC-FL ile belirlenen LOD'ler ise 8-61 ng/mL arasındadır. Gün içi ve günler arası

cihaz kesinliğinin bir ifadesi olan BSS değerleri ise sıvı enerji içeceği için %1,87 ve %1,73'ten az; tablet enerji içeceği içinse %1,44 ve %1,83'ten azdır. Bileşiklerin tanınmasını ve saflığını doğrulamak için ise UV/VIS absorpsiyon spektrumlarından yararlanılmıştır (Głiszczyńska-Świąło, Rybicka 2015).

Foudah ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada, çeşitli ticari enerji içeceklerindeki (ED) ve yeşil farmasötik formülasyonlardaki kafein tayini için ters fazlı yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HTLC) kullanılmıştır. Yöntemde kafein 20 mm/sn'lik bir tarama hızında ve 4 x 0,45 mm'ye ayarlanmış yarık boyutunda 275 nm'de tayin edilmiştir ve hareketli faz olarak ta Etanol-su (55:45 v/v) karışımı kullanılmıştır. Geliştirilen yöntemde kafein için kalibrasyon eğrisinin 50–800 ng/bant konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu tespit edilmiştir. Bu yöntem ile farklı enerji içeceklerinde (ED1-ED10) bulunan kafein miktarı 21,02–37,52 mg/100 mL aralığında, bitkisel ürünlerdeki (F1-F3) kafein miktarı ise 10,63–20,30 mg/100 mL olarak bulunmuştur. Kafein analizi, ters fazlı silika jel 60 F254S plakaları ile önceden kaplanmış 10 x 20 cm cam plakalar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Numuneler otomatik örnekleyici aplikatörü ile ters fazlı TLC plakalarına 6 mm'lik bantlar halinde işaretlenmiştir. Kafeinin uygulama oranı 150 nL/s'dir. TLC plakaları, EtOH-su (55:45, v/v) hareketli faz kullanılarak 80 mm'lik bir mesafeye kadar Otomatik Geliştirme Odasında 22 °C'de 30 dk boyunca EtOH-su buharları (55:45, v/v) ile doyurulmuştur. Çalışma sonucunda belirleme katsayısı (R^2) ve regresyon katsayısı (R) değerleri sırasıyla 0,9973 ve 0,9986 olarak bulunmuştur. LOD ve LOQ değerleri ise sırasıyla, $16,87 \pm 0,45$ and $50,61 \pm 1,35$ ng/band olarak belirlenmiştir (Foudah ve ark., 2022).

Attipoe ve arkadaşları yaptıkları bir çalışma ile piyasada en çok satılan enerji içecekleri (n=9) ve enerji shotları (n=5) içerisinde bulunan kafein miktarının ambalajda belirtilen miktar ile uyumlu olup olmadığını test etmeyi amaçlamışlardır. Bu çalışmada içeceklerdeki kafein miktarı, solvent ekstraksiyonu ve ardından UV dedektörüne sahip bir HPLC yöntemi uygulanması ile belirlenmiştir. Bu yöntem ile kafein seviyesi kantitasyon sınırının altına düştüğünde ise tandem kütle spektrometresi dedektörü ile sıvı kromatografisi kullanılmıştır. Analiz sonucu elde

edilen kafein miktarları ile ambalajda belirtilen miktarlar SPSS kullanılarak karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda bu numunelerden 5'inin ambalajda belirtilen miktar ile uyumlu olmadığı tespit edilmiştir, diğer 9 tanesindeki kafein miktarının ise ambalajda belirtilen miktarın %15'i içinde olduğu tespit edilmiştir. Ürün ambalajlarında yazılı olan kafein miktarı enerji içecekleri için 75-240 mg, enerji shotları için ise 31-270 mg arasında değişmektedir. Ortalama olarak, bulunan kafein miktarı (151 mg), etikette belirtilenden (161 mg) biraz daha düşük bulunmuştur (Attipoe ve ark., 2016).

Grembecka ve Szefer tarafından çeşitli diyet takviyelerinde ve alkolsüz içeceklerde kafein ve aspartamın eş zamanlı tayini için bir HPLC–CAD–UV–DAD yöntemi önerilmiştir. Analizler, aynı anda seri olarak bağlanmış yüklü bir aerosol detektörüne (Corona CAD) ve ultraviyole diyot dizi detektörüne (UV–DAD) bağlı HPLC ile gerçekleştirilmiştir. Yöntemin, diyet takviyeleri ve alkolsüz içeceklerde 0,25–75 µg/mL aralığında kafein ve aspartam miktarını belirlemek için uygun olduğu görülmüştür. Kafein ve aspartamın LOD değeri Corona CAD için sırasıyla 62 ve 43 ng/mL ve UV–DAD dedektörü için 31 ve 30 ng/mL olarak bulunmuştur. Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre, her iki analitin en az 0,999'luk bir korelasyon katsayısına sahip olduğu, yöntemin doğruluğunun aspartam için ortalama %100 ve kafein için ise %98,3 olduğu ve kesinlik değerlerinin ise %0,09-1,12 arasında olduğu görülmüştür. UV–DAD dedektörü ile elde edilen LOQ değerleri her iki analit için de 0,09 µg/mL olarak bulunmuştur. Benzer şekilde, Corona CAD dedektörü ile kaydedilen LOQ değerleri aspartam için 0,13 µg/mL, kafein için ise 0,19 µg/mL'dır. Aspartam için ortalama geri kazanımlar, Corona CAD için %99,8–103 ve UV–DAD için %99,6–101 aralığındayken, kafein için bunlar, Corona CAD için %97,5 ile %98,8 ve UV–DAD için %96,1–100,4 aralığındadır (Grembecka ve Szefer, 2012).

Ford ve arkadaşları, tandem kütle spektrometresi dedektörü ile bir yüzey numune alma elektrosprey iyonlaştırma sistemi kullanarak, ters fazlı C8 ince katmanlı kromatografi plakaları üzerinde alkolsüz içeceklerde ve spor içeceklerinde kafeinin kantitatif tayinini gerçekleştirmişlerdir. Bu yöntemde döteryum etiketli bir kafein iç standardı ve seçilmiş reaksiyon izleme saptaması kullanılmıştır. 44

$\mu\text{m}/\text{sn}$ 'lik bir yüzey tarama hızında 35 dk gerektiren tek bir yüzey tarama deneyinde tek bir plaka üzerinde dokuz adede kadar paralel kafein bandı örneklenmiştir. Bu yöntem ile elde edilen sonuçlar, ters fazlı bir HPLC-UV yöntemi karşılaştırılmıştır. Standartlar ve gerçek örneklerle geri kazanımlar, her iki yöntem için de %97 ile %106 arasında değişmektedir. Analiz sonuçları geliştirilen yöntem ile HPLC/UV yönteminin uyum içinde olduğunu göstermiştir. Diyet Vişne Kola ve diyet sporcu içeceğinde belirlenen kafein miktarlarının literatürde belirtilen değerlerden yüksek olduğu saptanmıştır (Ford ve ark., 2005).

Perrone ve arkadaşları, kahvede kafein, trigonellin, sukroz ve nikotinik asitin eş zamanlı tayini için bir LC-MS yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde önce sıcak su ile ekstraksiyon, bazik kurşun asetat kullanılarak arıtma ve membran filtrasyonu ön işlem basamakları uygulanmış, daha sonrada bir Spherisorb S5 ODS2, 5 μm kromatografik kolon kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırma, 0,2 mL/dk akış hızında %0,3 sulu formik asit/metanol ile gradient elüsyonla gerçekleştirilmiştir. Elektrosprey iyonizasyon kaynağı, sükroz iyonları üretmek için negatif modda ve kafein, trigonellin ve nikotinik asit iyonları üretmek için pozitif modda çalıştırılmıştır. Yeşil ve kavrulmuş kahve özlerinde hazırlanan kalibrasyon eğrileri, $r^2 > 0,999$ ile doğrusaldı. Kavrulmuş kahve ile yapılan analizlerde geri kazanımlar kafein için %93,0-105,1, trigonellin için %85,2-116,2, sükroz için %94,1-109,7 ve nikotinik asit için %89,6-113,5 arasında değişmektedir. Kafein, trigonellin, nikotinik asit ve sukroz için LOD sırasıyla 11,9, 36,4, 18,5 ve 5,0 ng/mL idi. 11 kahve örneğinin (normal veya kafeinsiz yeşil, öğütülmüş ve hazır kahve) analizi literatürle uyumlu sonuçlar vermiştir (Perrone ve ark., 2008).

Mazdeh ve arkadaşları, ticari spor içeceklerinde bulunan gıda katkı maddelerini HPLC yöntemi ile analiz etmişlerdir. Bu çalışmada 21 farklı marka sporcu içeceğine ait 105 numune ile çalışılmıştır. Kromatografik ayırma 0,8 mL/dk akış hızında sulu amonyum asetat tamponu (pH 4,2) ve asenitril karışımından oluşan (80:20, v/v) bir hareketli faz ile C_{18} (150 $\times$ 4,6 mm, 5 μm) kolonu kullanılarak sağlanmıştır. Enjeksiyon hacmi 20 μL ve UV detektörü 225 nm'dir. Analiz sonucunda yapılan hesaplamalarda ortalama geri kazanım değerlerinin %95-106 olduğu belirtilmektedir.

İran' a ait markalarda sodyum benzoat ve potasyum sorbat mışıkları sırasıyla 147,72 and 11,54 ppm olarak belirtilmiştir. Bu miktar yabancı markalı ürünlerde 19,43 and 4,91 ppm'dir. Bu çalışma aynı anda pek çok maddenin analizine imkan vermiştir (Mazdeh ve ark., 2016).

Soto ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, diyet takviyelerindeki kafeinin analizi için üç minyatür sıvı kromatografisi (LC) aleti ile çalışılmış ve daha sonra bunlardan alınan sonuçlar karşılaştırılmıştır; tezgah üstü kapiler LC (capLC) sistemi, tezgah üstü nano LC (nanoLC) sistemi ve taşınabilir LC sistemi. Çalışmalar sonucunda, optimize edilmiş koşullar altında, tezgah üstü sistemlere dayalı yöntemlerin hassasiyet açısından daha üstün olduğu görülmüştür. CapLC ve nanoLC sistemleriyle bulunan LOD değerleri sırasıyla 0,01 µg/mL ve 0,003 µg/mL iken taşınabilir LC cihazı ile elde edilen LOD değeri 1 µg/mL'dir. Taşınabilir LC tabanlı yöntemin, basitlik ve verim (toplam analiz süresi < 15 dk) açısından üstün olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, taşınabilir minyatür LC yönteminin, 1–20 µg mL⁻¹ aralığında iyi bir doğrusallık sağladığını göstermiştir. Yazarlar tarafından önerilen portatif LC tabanlı yöntem, diyet takviyelerindeki kafein içeriği ile ilgili başarılı sonuçlar vermiştir (Soto ve ark., 2022).

Karau ve arkadaşları yaptıkları çalışma ile ters fazlı HPLC yöntemi kullanarak, 19 farklı türde alkolsüz enerji içecekleri ve çaylardaki kafein miktarını tayin etmeyi amaçlamışlardır. Bu numuneler, Supelco HS C₁₈ kolonuna (25 cm x 4,6 cm x 5 µm) sahip bir HPLC-UV sistemi ile, kolon sıcaklığının 40 °C olduğu bir ortamda ve 272 nm'de gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırma için metanol ve su (8:20, v/v) karışımından oluşan ve akış hızı 1,5 mL/dk olan bir hareketli faz sistemi kullanılmıştır. Çalışmada kafeinin korelasyon katsayısı (r) 0,9993 ve alıkonma süresi ise 2,11±0,03 dk olarak bulunmuştur. Kolondan kafeinin geri kazanım yüzdesi %89,78-105,59, LOD değeri 0,279 µg/mL ve LOQ değeri ise 0,931 µg/mL'dir. Bu çalışma alkolsüz içeceklerinin çoğunun yüksek kafein içeriğine sahip olmasına rağmen bunların etikette yer almadığını ispatlaması açısından önemlidir (Karau ve ark., 2010).

Lee ve arkadaşları, 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada enerji içeceklerindeki kafein miktarını tayin etmek için, SPE numune hazırlama, elektrosprey iyonizasyon çoklu tandem kütle spektrometresi dedektörü (ESI-MSn) ile birleştirilmiş yeni bir UPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırma, LCQ iyon tuzağı kütle spektrometresi vezhang Acquity CSH C₁₈ (50 × 1,0 mm, 1,7 µm) UPLC kolonu ile donatılmış ters fazlı bir UPLC kolonu ile izokratik elüsyon modunda 6 dk'da gerçekleşmiştir. Bu çalışmada 150 µL/min akış hızında, %0,05 formik asit içeren metanol - su (85:15, v/v) karışımından oluşan bir hareketli faz sistemi kullanılmıştır. En yüksek ortalama geri kazanım SampliQ C₁₈ ODS'de gözlemlenmiş (%92 ± 4) ve diğer ters fazlı C₁₈ kartuşlarının ise %32-77 arasında değişen önemli ölçüde daha düşük kafein geri kazanımı sağladığı tespit edilmiştir. Bu yöntem ile belirlenen kafeinin LOQ değeri yaklaşık 2,1 ng/mL olarak bulunmuştur ve gün içi ve günler arası kesinlik değerinin %4'ün altında ve ölçümlerin doğruluğunun ise %85,1 ile %93,2 arasında olduğu tespit edilmiştir (Lee ve ark., 2014).

Ptolemy ve arkadaşlarının hazırlamış olduğu çalışmada insan tükürüğü, plazması ve idrar örneklerinde teobromin ve kafein tayini için tek bir ultra santrifüj bazlı numune ön işleminin ardından, bir sıvı kromatografi tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) protokolü uygulanmıştır. Optimize edilmiş kromatografik analizde gradient elüsyon ile her iki analit te 1,3 dk'da analiz edilmiştir. Analiz için pozitif mod elektrosprey iyonizasyonu ve çoklu reaksiyon modunda çalışan bir MS/MS cihazı kullanılmıştır. ¹³C₃ izotopik olarak etiketlenmiş kafein, doğruluğu ve kesinliği artırmak için bir iç standart olarak dahil edilmiştir. 0,7 µL standartlar ve numuneler, termostatl 30°C'de tutulan bir LC C₁₈ köprülü-etil hibrit (BEH) kolonuna (1,7 µm partikül x 2,1 mm x 50 mm) enjekte edilmiştir. Metabolitler, sırasıyla su (faz A) ve asetronitril (faz B) içindeki %0,1 (v/v) formik asit hareketli fazları kullanılarak ayrıldı. Bu analizde akış hızı 0,6 mL/dk ve dalga boyu 280 nm'dir. Çalışmada, sırasıyla hem teobromin (ortalama R² 0,9968) hem de kafein (ortalama R² 0,9997) için 2,5-400 µmol/L arasındaki konsantrasyon aralığında doğrusaldı. Kafein ve teobromin için geri kazanımlar, 10 ve 300 µmol/L konsantrasyon seviyelerinde %114-118 ve %99-105 arasında değişmiştir. Teobromin ve kafein için LOD değeri ise 1,25 µmol/L idi (Ptolemy ve ark., 2010).

Moura-Silva ve arkadaşları Amazon'da yetişen, zengin kafein içeriğine sahip olan ve sulu özü dünyada yaygın bir biçimde kullanılan guarananın (*Paullinia cupana*) bitki özünün bulunduğu, guarana bazlı ticari içeceklerinde kafein tayini için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmada herhangi bir analit ekstraksiyon yöntemi kullanılmamıştır. Sonuçlar deney üzerinde matris etkisinin olmadığını ve 5-135 µg/mL konsantrasyon aralığında yüksek seçicilik ve doğrusallık ($>0,999$) sağlandığını göstermiştir. Deneyden elde edilen LOD ve LOQ sırasıyla 0,02 µg/mL ve 2 µg/mL olarak belirlenmiştir, deneyin doğruluğu ise %99,9-120 arasında değişmekteydi. Elde edilen sonuçlar, geliştirilen yöntemin guarana ekstraktının ve kafein içeren ürünlerin kalitesini değerlendirmek için kullanılabileceğini göstermektedir (Moura-Silva ve ark., 2023).

Elektroforetik Yöntemler

Liotta ve arkadaşları, enerji içecekleri ve akıllı ilaçlardaki kafeinin tayini için diyet dizisi dedektörü mikroemülsiyon elektrokinetik kromatografiye (MEEKC) dayalı yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Ayırmalar, kaplanmamış erimiş silis kılcalları (50 cm x 50 µm (ID)) kullanılarak 20 kV voltajda ve 8,85 mM sodyum tetraborat pH 9,5, SDS %3,3 (a/h), n-heksan 1,5 (h/h) ve 1-butanol %6,6 (h/h)'den oluşan tampon çözelti ile 6 dk'da gerçekleştirilmiştir. Çalışmada iç standart (diprofilin) kullanılmıştır ve enjeksiyon koşulları 0,5 psi, 3 s olarak verilmiştir. Analiz 275 nm'deki UV sonuçlarına göre yapılmıştır fakat pik tanımlanması ve saflık kontrolü için 200-400 nm arasındaki değerlerden yararlanılmıştır. Bu çalışmada gün içi ve günler arası kesinlik değerlerinin, göç süreleri için %0,37'nin ve pik alanları için %9,86'nın altında olduğu rapor edilmiştir. Bu yöntem akıllı ilaçlar ve enerji içeceklerinde kafeinin doğrudan tayini için başarılı sonuçlar vermiştir (Liotta ve ark., 2012).

Elbashir ve arkadaşları 2021 yılında yaptıkları çalışmada içeceklerde kafein, vanilin ve etil vanilinin eş zamanlı tayini için bir kapiler elektroforez yöntemi önermişlerdir. Ayırma, %10 (v/v) asetonitril içeren 25 mM fosfat tamponu (pH 8,5)

ile 200 nm'de ve 3 dk'dan daha kısa bir sürede gerçekleştirilmiştir. Üç analit için 5–80 µg/mL konsantrasyon aralığında ($r^2 > 0,9986$) kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Analitlerin gözlenebilme ve tayin sınırları sırasıyla 2,6-4,3 ve 4,1-5,2 µg/mL aralığındadır ve geri kazanım değerleri ise %92,1-104,4 (n=3) olarak ifade edilmiştir (Elbashir ve ark., 2021).

Zhao ve Lunte'nin gerçekleştirdiği çalışmada, kafein ve metabolitleri olan teobromin, paraksantin, teofilin ve 1,3,7-trimetilürik asit kapiler elektroforez (MECC) ile ayrılmıştır. Bu yöntemde misel fazı olarak sodyum dodesil sülfat (SDS) kullanılmıştır. Bu çalışmada, ilaçlar, gıdalar ve vücut sıvılarında kafein ve dört analogunun tayinini için pH, tampon konsantrasyonu, misel konsantrasyonu, tampon tuzları, iyonik kuvvet, uygulanan voltaj ve enjeksiyon süresi gibi faktörlerin analiz üzerine etkileri incelenerek analiz için optimal koşullar belirlenmiştir. Kafein ve üç analogunun analizi, 1 µg/ml'den daha düşük LOD değeri ile 120 saniye içinde gerçekleştirilmiştir (Zhao ve Lunte, 1997).

Hemwech ve arkadaşları, sırasıyla yedi fenolik asidin (kafein (CF) ile birlikte, p-hidroksifenilasetik asit (PHPA), p-kumarik asit (PCA), p-hidroksibenzoik asit (PHBA), kafeik asit (CFA), (3,4-dihidroksifenil)asetik asit (DHPA), gallik asit (GLA) ve 2,3,4 trihidroksibenzoik asit (THBA)) kapiler elektro-kromatografi (CEC) ve misel elektrokinetik kromatografi (MEKC) tarafından ayrılması için silika kaplı kapiler ve erimiş silika kapilerin karşılaştırma çalışması ile yenilikçi bir silika kaplı kapiler yöntem sunmuşlardır. MEKC modu için kullanılan tampon, 50,0 mM sodyum dodesil sülfat içeren 25,0 mM borat tamponudur (pH 9,0). Bu çalışmada kaplanmamış kapilerin, yedi fenolik asidin tümünü CEC veya MEKC ile ayıramadığı belirlenmiştir. Bu nedenle hem CEC hem de MEKC için kaplanmış kapiler ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, CEC'te tüm bitişik pik çiftleri için plaka sayısının $N \geq 2,0 \times 10^4 \text{ m}^{-1}$ ve çözünürlüğünün ise $R_s \geq 1,6$ olduğu belirlenmiştir. Yedi fenolik asit ve kafeinin doğrusal kalibrasyon aralığı farklı olduğu ancak r^2 değerlerinin tümünün $>0,9965$ olduğu belirlenmiştir. Kaplanmış kapiler yöntemleri için fenolik asitlerin ve kafeinin ayrılma etkinliğinde istatistiksel olarak hiçbir fark olmadığı belirlenmiştir. Demlenmiş çaydaki kafein ve fenolik asitlerin analizi için

tiramin iç standardı kullanılmıştır ve ayırma 15 dk'dan daha az sürmüştür. Kuru çay yaprağında kafein ve gallik asit içerikleri sırasıyla 10,8–15,0 ve 2,6–4,8 mg/g olarak belirlenmiştir. Numunelerin geri kazanım yüzdesi ise sırasıyla 90 ± 9 ila 106 ± 13 olarak verilmiştir. Bu çalışmada kafeinin LOD değeri 3,4 mM'dır (Hemwech ve ark., 2021).

Amini ve arkadaşları gerçekleştirdikleri çalışma ile bir diyet ürünüde kafein, efedrin ve psödo-efedrinin iki kapiler elektroforez (CE) yöntemi ile belirlenmesini ele almışlardır. Çözünenler, 0,2 M HCl kullanılarak üründen çıkarılmış ve pH 2,5 ve pH 7,6'da, %7,5 yüksek oranda sülfatlanmış-b-siklodekstrin içeren arka plan elektrolitleri kullanılarak CE ile belirlenmiştir. Efedrin ve psödo-efedrin tayini, kapilerin saptama tarafındaki anot ile pH 2,5'te gerçekleştirilirken, kafeinin miktarı normal bir elektroforez polarite modu ile pH 7,6'da ölçülmüştür. Bu çalışmada kafeinin LOD değeri 1,5 µg/mL iken LOQ değeri 5,0 µg/mL'dir (Amini ve ark., 2006).

Khasanov ve arkadaşları, enerji içeceklerindeki kafein, C vitamini, PP (nikotinamid) ve B6 vitamin miktarlarını kapiler elektroforez ile tayin etmişlerdir. Ayırma için, iç çapı 75 µm, toplam uzunluğu 60 cm ve çalışma boyu (etkin uzunluk) 48 cm olan poliamid kaplamalı içi boş bir kuvars kapiler kullanılmıştır ve analiz 254 nm'de gerçekleştirilmiştir. MECK modunda çalışmayı sağlayan tampon çözeltisi 10 mM sodyum tetraborat ve 40 mM sodyum dodesil sülfat (pH 9,0)'tan oluşmaktadır. Numuneler analiz öncesinde tampon çözelti ile 1:1 ile 1:9 oranlarında karıştırılmıştır. İçeceklerdeki analit miktarını belirlemek için standart ekleme yönteminden yararlanılmıştır. Analitlerin doğrusal konsantrasyon aralıkları kafein, nikotinamid ve B6 vitamini için 1-1000 mg/L olarak belirlenmiş ve her bileşik için yaklaşık güvenilirlik değerleri $R^2 > 0,9997$ olarak bulunmuştur. Analizde askorbik asit içeren çözeltilerin stabilizasyonu için %0,02-0,5 aralığında etilendiamintetraasetik asidin (EDTA) disodyum tuzu kullanılmıştır (Khasanov ve ark., 2013).

Elektrokimyasal Yöntemler

Spătaru ve arkadaşları bor katkılı elmas elektrotları (BDD), ksantin ve doğal olarak oluşan N-metil türevlerinin (teofilin, teobromin, ve kafein) elektrokimyasal oksidasyonunu incelemek için kullanmışlardır. Bu çalışmada, pH, konsantrasyon ve potansiyel tarama hızının voltametrik yanıt üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu reaksiyonun mekanizmasının, pirolitik grafit elektrotta pürin türevlerinin oksidasyonuna benzer olduğu görülmüştür. Teofilin, teobromin ve kafein için 1 - 400 μM , ksantin için ise 1 – 100 μM konsantrasyon aralığında bu bileşikler tayin edilmiştir. Bu analiz ile, kafein gerçek numunelerde matristen ayrılmadan kolayca analiz edilebilmektedir (Spătaru ve ark., 2002).

Farag ve arkadaşları, farklı ticari enerji içeceği numunelerinde bulunan kafein ve piridoksinin eş zamanlı tayini için yeni bir voltametrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem, elektrokimyasal teknik olarak diferansiyel puls voltammetrisi ile, 0,1 M Britton-Robinson tamponu (pH 4,5) kullanılarak, 5 mV potansiyel basamağında, 70 mV potansiyel genlikte ve 50 mV/s tarama hızında, ince sülfonatlı floropolimer Nafion® kaplı camısı karbon elektrotta biyolojik olarak azot içeren bu heterosikllerin anodik oksidasyonuna dayanır. Kafein ve piridoksin tayini için doğrusal aralıklar, sırasıyla 18,9 ve 2,2 μM 'dir. Çalışmada kafein ve piridoksinin LOD değerleri sırasıyla 18,9 ve 2,2 μM olarak rapor edilmiştir. Yöntemin geri kazanım değerleri ise kafein için %102 ve piridoksin için %105'tir. Yöntemi doğrulamak için spektrofotometrik analiz ve HPLC analizi yöntemleri kullanılmıştır (Farag ve ark., 2019).

1.3.3. Sodyum Bezoatın Kantitatif Analizi

Spektroskopik Yöntemler

Wang ve arkadaşları tarafından kıymada (domuz eti) bulunan sodyum benzoatın kalitatif ve kantitatif analizleri için ön konsantrasyon tekniği ile birleştirilmiş yakın kızılötesi yansıma spektroskopisi (NIRS) kullanılmıştır. Bu çalışmada yararlanılan ön zenginleştirme yönteminde alümina adsorbat olarak kullanılmış ve sodyum benzoat, potasyum sorbat ve bunların bir karışımını sınıflandırmak için diskriminant analizi yöntemi kullanılmıştır. Ayrıca, bu araştırmada kemometrik yöntemler arasında yer alan kısmi en küçük kareler regresyonu (PLS) ve temel bileşen regresyonu (PCR) yöntemleri de kullanılmıştır. Kantitatif analiz modelini değerlendirmek ve kalibrasyon modelini test etmek için çapraz doğrulama katsayısı, çapraz doğrulamanın hata kareleri ortalaması (RMSECV) ve harici doğrulama parametreleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, zenginleştirmeli NIRS'nin, ette sodyum benzoat miktar tayinine ($r^2 = 0,94055$; RMSECV = 0,00090) imkan verdiği görülmüştür (Wang ve ark., 2013).

Wang ve arkadaşları önerdikleri yöntem ile, ultraviyole (UV) spektrofotometri verilerine BP-nöral ağ algoritması (BP-ANN) ve kısmi en küçük kareler regresyonu (PLS) uygulayarak üç farklı içecekteki sodyum benzoat ve potasyum sorbat miktarını eş zamanlı tespit etmişlerdir. Çalışmada sırasıyla 0,00-15,00 µg/mL ve 0,00-6,00 µg/mL konsantrasyon aralığında 5 grup sodyum benzoat ve potasyum sorbat çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltiler kullanılarak her bir bileşen için regresyon denklemi oluşturulmuştur. Regresyon analizi sodyum benzoat ve potasyum sorbatın absorpsiyon piklerinin, sırasıyla 225 nm ve 255 nm civarında olduğu dalga boyundaki değerler kullanılarak hesaplanmış. Kalibrasyon modelleri, ortogonal tasarıma göre 36 referans numunesi kullanılarak oluşturulmuş ve tahmin modeli seti, rasgele yapılandırılmış 9 set, karışık çözeltilerden oluşturulmuştur. BP-ANN ve PLS kullanılarak elde edilen sonuçlar, sırasıyla sodyum benzoat ve potasyum sorbatın tahminlenen hata kareleri ortalamasının (RMSEP) 0,129, 0,09 ve 0,155, 0,089

olduğunu ve korelasyon katsayısının (R^2) 0,9997, 0,9994 ve 0,9998, 0,9995 olduğunu göstermiştir. İçecek numunelerinin analizlerinde ise her iki yöntemle geri kazanımının %97'nin üzerinde olduğu görülmüştür (Wang ve ark., 2020).

Xue ve arkadaşları, ibuprofen oral solüsyonunda bulunan sodyum benzoatın zenginleştirilmesi ve analizi için, yüzeyi geliştirilmiş Raman saçılması (SERS) ile birleştirilmiş bir dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (DLLME) yönteminden yararlanmışlardır. Bu çalışmada aynı zamanda DLLME'yi etkileyen deneysel parametreler de incelenmiştir ve optimal koşullar altında, DLLME ve SERS analizi dahil olmak üzere tüm prosedür 10 dk içinde gerçekleştirilebilmiştir. 10,00 – 500,00 mg/L konsantrasyon aralığında sodyum benzoatın korelasyon katsayısı (R^2) 0,9986 olarak belirlenmiştir ve önerilen yöntem ile sodyum benzoatın LOD değeri 0,56 mg/L olarak bulunmuştur. Bu çalışmada karşılaştırma yöntemi olarak HPLC yöntemi kullanılmış ve HPLC deneyleri; bir gaz giderici, otomatik örnekleyici ve diyot dizisi detektörü ile donatılmış bir HPLC cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Bu analiz C_{18} kolonu (150 x 4,6 mm, 5 μ m) ile, 280 nm'de, 1,0 mL/dk akış hızında ve ikili hareketli faz sistemi (hareketli faz A (0,02 mol/L amonyum asetat çözeltisi) ve hareketli faz B (metanol)) ile gerçekleştirilmiştir. Elüsyon 0–6 dk'da %85 (A), %15 (B) olacak şekilde ayarlanmıştır (Xue ve ark., 2020).

Zhang ve arkadaşları, gıda ürünlerinde sodyum benzoat miktarını belirlemek için bir kolorimetrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem D-amino asit oksidaz (DAAO) ve 2D metal organik çerçeve (2D MOF) nano-tabakalar aracılı kademeli enzim reaksiyonlarına dayalı olarak oluşturulmuştur. Sentezlenen 2D MOF nanotabakaları, olağanüstü peroksidaz benzeri katalitik aktiviteye sahip yüksek verimli nanozim görevi görmüş ve H_2O_2 ile 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidin arasındaki renk reaksiyonunu katalize etmiştir. Rekabetçi bir DAAO inhibitörü olarak sodyum benzoat, DAAO aracılı oksidasyon reaksiyonunda H_2O_2 üretimini etkileyebilmektedir. Bu iki reaksiyonun birleşiminden sonra, bu kolorimetrik kantitatif yöntem, geniş doğrusal aralık (2,0–200,0 μ M), düşük LOD değeri (2,0 μ M), yüksek doğruluk (%95,80 $\pm$ 108,00'de geri kazanım oranı) ve tatmin edici sonuçlar vermiştir. Çalışma UV-Vis spektrophotometre ile 652 nm'de

gerçekleştirilmiştir ve bu yöntem meyve suyu, şarap ve sirkedeki sodyum benzoat miktarını çıplak gözle analiz etmek için kullanılmıştır (Zhang ve ark., 2022).

Ren ve arkadaşları, gıda ürünlerinde sodyum benzoatın tayini için bir poliklonal antikora dayalı bir floresan polarizasyon immün testi (FPIA) geliştirmişlerdir. Bu çalışmada sentezlenen immünojen ve floresan etiketli analit konjugatı, TLC ile saflaştırılmıştır. Optimum test koşulları altında, FPIA, sodyum benzoatın borat tamponunda LOD değeri 0,26 µg/mL'dir. Yazarlar, FPIA'nın gerçek numunelerdeki uygulanabilirliğini test etmek için, FPIA tekniğini dört çeşit gıda örneğine (enerji içeceği, şekerleme, buz emici, RIOTM kokteyli) uygulamışlardır. Elde edilen geri kazanım değerlerinin enerji içeceklerinde %96,68–106,55; şekerlemelerde %95,78-100,80; buz emicilerde %86,97–102,70; RIOTM kokteylinde %103,58–109,87 olduğu ve bu yöntemin varyasyon katsayılarının tümünün %11,25'ten düşük olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada geliştirilen FPIA yöntemi, HPLC yöntemi ile karşılaştırılmış ve iki yöntem arasında karşılaştırmalı iyi bir performans olduğu ifade edilmiştir (Ren ve ark., 2014).

Zhang ve Ma yaptıkları çalışma ile, floresans probu olarak akridin turuncu (AO) boya kullanarak simüle edilmiş fizyolojik tamponda (pH 7,4) sodyum benzoat (SB) ve buzağı timus DNA'sı arasındaki etkileşimi, DNA erime çalışmaları ve viskozite ölçümlerinin yanı sıra UV-Vis absorpsiyonu, floresans ve dairesel dikroizim (CD) spektroskopisi ile araştırmışlardır. Bu çalışmada, genişletilmiş UV-Vis spektral veri matrisi, çok değişkenli eğri çözünürlüğü- değişen en küçük kareler (MCR-ALS) yaklaşımıyla çözülmüştür. Denge konsantrasyon profilleri ve SB, DNA ve DNA-SB kompleksi için yüksek düzeyde örtüşen bileşik yanıtta elde edilen saf spektrumlar, aynı anda elde edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, sodyum benzoatın DNA'ya bağlanabildiğini ve hidrofobik etkileşimlerin ve hidrojen bağlarının bağlanma sürecinde önemli bir rol oynadığını gözler önüne sermiştir. Sodyum benzoatın burada, statik bir prosedürle DNA-AO kompleksinin floresansını söndürdüğü de belirlenmiştir (Zhang ve Ma, 2013).

Kromatografik Yöntemler

Mahboubifar ve arkadaşları, su ile seyreltilmiş kurabiye, yoğurt ve salatalık turşusu gibi gıdalarda sorbik asit, benzoik asit ve bunların tuzlarının miktarını belirlemişlerdir. Bu koruyucu maddeler UV spektrofotometre ve HPLC ile eş zamanlı olarak belirlenmiştir. UV analizinde sodyum benzoat 227 nm’de potasyum sorbat ise 250 nm’de tayin edilmiştir. Kromatografik analiz, UV detektörüne ve C₁₈ kolonuna (5 µm, 4,6×250 mm) sahip bir HPLC sistemi ile, kolon sıcaklığının 25 °C, enjeksiyon hacminin 20 µL, akış hızının 0,8 mL/dk ve deteksiyon limitinin 225 nm olduğu şartlarda gerçekleştirilmiştir. HPLC sisteminde sodyum salisilat iç standart olarak kullanılmış ve sodyum salisilat, sodyum benzoat ve potasyum sorbatın alıkonma sürelerinin sırasıyla 6,4 dk, 14,8 dk ve 20,0 dk olduğu görülmüştür. HPLC yöntemi ile sodyum benzoat ve potasyum sorbatın LOD değerinin 0,3 mg/L olduğu bildirilmiştir. Alınan sonuçlar neticesinde, içerisinde girişim yapan bileşiklerin bulunduğu gıdalarda potasyum sorbat ve sodyum benzoat tayininde HPLC yönteminin daha seçici olduğu tespit edilmiştir (Mahboubifar ve ark., 2011).

Gören ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, HPLC -UV ve LC-MS/MS yöntemleri ile ketçap ve alkolsüz içecek örneklerinde sodium benzoat ve potasyum sorbatın kantitatif analizlerini gerçekleştirmiş ve bu iki yöntemden elde edilen sonuçları karşılaştırmışlardır. HPLC-UV ile gerçekleştirilen analizde, C₁₈ HPLC kolonu (15 cm × 3,9 mm I.D., 5 µm) kullanılmıştır. Geliştirilen HPLC-UV metodunda kromatografik şartlar; amonyum asetat tamponu (pH 4,20): asetonitrilden (72:28, v/v) oluşan bir hareketli faz sistemi, dalga boyları sodyum benzoate için 225 nm ve potasyum sorbat için 255 nm, akış hızı 1 mL/dk, enjeksiyon hacmi 10 µL ve kolon sıcaklığı ise 21 °C’dir. LC-MS/MS yönteminde ise, fenomeneks 150 × 2 mm, 4 µm HPLC kolonu kullanılmıştır. Bu yöntemin HPLC-UV’den farklı olan kromatografik şartları ise şu şekildedir; amonyum asetat tamponu (pH 4,20): metanol (50:50, v/v) oluşan bir hareketli faz sistemi, dalga boyları sodyum benzoate için 225 nm ve potasyum sorbat için 255 nm, akış hızı 0,35 mL/dk. Yöntemler optimize edilerek sodyum benzoate ve potasyum sorbat kromatografik olarak 4 dk’dan daha kısa bir sürede ayrılmışlardır. Bu çalışma sonuçları, LC–MS/MS yönteminin, HPLC

yönteminden daha hızlı, basit, hassas, kesin ve doğru cevaplar verdiğini ve LC-MS/MS yönteminin LOD ve LOQ değerlerinin düşük daha düşük olduğunu göstermiştir. Bu nedenle yiyecek ve içeceklerde daha düşük benzoate ve sorbat konsantrasyonlarının LC-MS/MS yöntemi ile tespitinin daha uygun olduğu görülmüştür (Gören ve ark., 2015).

Ivković ve arkadaşları 2019 yılında yapmış oldukları çalışma ile farmasötik bir formülasyonda (Klozan suspension) sodyum metabisülfid ve sodyum benzoatın eşzamanlı olarak ayrılması, tanımlanması ve belirlenmesi için ters fazlı bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) yöntemi geliştirmişlerdir. Yazarlar yöntem geliştirmek ve bileşiklerin kantitatif analizi için gerekli olan optimal şartları belirlemek için optimizasyon tekniği uygulamışlardır. Optimizasyon tekniği ile, sabit faz ve hareketli faz bileşimi, çözücü sisteminin pH'ı gibi faktörlerin analiz üzerine etkileri incelenmiştir. Yazarlar, çalışmalarında kromatografik ayırma için farklı kolon sistemlerini de (RP8, RP18, siyano ve amino HPLC kolonları) test etmişlerdir. HPLC analizi, DAD detektörü ve C₁₈ (150 x 4,6 mm i.d., 3,5 µm partikül) kolonu ile donatılmış bir sistemle ve izokratik bir elüsyonla gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırma için şartlar; hareketli faz 62:38 (v/v) oranında %0,1 fosforik asit ve asetonyitril karışımı, akış hızı 1,0 ml/dk, kolon sıcaklığı 25 °C ve çalışılan dalga boyunda 275 nm'dir. Her iki analit için de doğrusal konsantrasyon aralığı 0,05–0,15 mg/mL'dir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre; regresyon analizlerinin sonuçları sodyum metabisülfid için $r = 0,9995$ ve sodyum benzoat için $r = 0,9999$ ve geri kazanım değerleri her iki analit için %98,16 ile %101,94 arasındadır. Analiz süresi ise 3 dk'dır (Ivković ve ark., 2019).

Dönmez ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, bir içecek numunesinde bulunan sodyum benzoat, potasyum sorbat, ponceau 4R ve karmoizin miktarının belirlenmesi için HPLC-DAD ile bir analiz yöntemi önerilmiştir. Çalışmada izokratik elüsyon uygulanmış ve elde edilen veriler, PLS-2 ve PCR algoritmaları tarafından işlenmiştir. Kromatografik analizler, diyot dizisi detektörü ve bir C₁₈ RP kolonundan (5 lm, 250 x 4,6 mm) oluşan bir HPLC sistemi kullanılarak yapılmıştır. Çalışma, 200–600 nm dalga boyu aralığında (1,2 nm'lik aralıklarla), izokratik koşullar altında

gerçekleşmiştir. Kromatografik ayırma, su ve metanolden (10:90, v/v) oluşan bir hareketli fazla, 1,0 mL/dk akış hızında ve 20 µL enjeksiyon hacminde, oda sıcaklığında 3 dk'da gerçekleştirilmiştir. Kemometri destekli HPLC-DAD yöntemi ile geleneksel HPLC yöntemi karşılaştırılmıştır. Geleneksel HPLC yönteminde gradyan elüsyon koşulları uygulanmış ve analiz 9 dk'da gerçekleştirilmiştir. Yazarlar tarafından geliştirilen yöntemde ile tüm analitler için ortalama geri kazanımlar %98,27-101,37 aralığında ve ortalama bağıl hatalar ise %3'ün altındadır (Aksu Dönmez ve ark., 2020).

El-Gindy ve arkadaşları, laboratuvarında hazırlanan karışımlarda ve iki çeşit ticari şurup karışımında (karışım 1 (Osinex şurup): guaifenesin, dekstrometorfan hidrobromür, fenilefrin hidroklorür, klorfeniramin maleat, butilparaben ve sodyum benzoat; karışım 2 (Bronchophane şurup): guaifenesin, dekstrometorfan hidrobromür, difenhidramin hidroklorür, efedrin hidroklorür ve sodyum benzoat) sodyum benzoat ve ilaç etkin maddelerinin analizleri için yeni HPLC ve spektrofotometrik yöntemler geliştirmişlerdir. Karışım 1'in HPLC ile analizi için bir ODS kolonu (150×4,6 mm (i.d) TSK-Gel 5 µm ODS-80 TM) kullanılmıştır. Bu analiz izokratik elüsyonda, 2 mL/dk akış hızında 5 mM heptan sülfonik asit sodyum tuzu içeren asetronitril -10 mM potasyum dihidrojen fosfat, pH 2,7 (40:60 v/v) hareketli faz ile gerçekleştirilmiştir. Karışım 2 için ise kromatografik ayırım izokratik elüsyon ile, 1,5 mL/dk akış hızında, siyanopropil kolon (5 µm partikül boyutlu 250×4,6 mm (i.d) Shim-pack) kullanılarak, UV dedektörü ile 214 nm'de gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak ise asetronitril -12 mM amonyum asetat, pH 5 (40:60 v/v) oluşan karışım kullanılmıştır. Çalışmada ayrıca temel bileşen regresyonu (PCR) ve kısmi en küçük kareler (PLS-1) içeren kemometrik destekli spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Bu çalışmada spektrofotometrik analiz yöntemi de uygulanmıştır ve karışım 1 ve karışım 2'deki bileşenlerin üst üste binen spektrumlarını çözümlemek için kemometrik PCR ve PLS-1 yöntemlerine başvurulmuştur. Karışım 1 için analiz süresi yaklaşık 10 dk, karışım 2 için ise yaklaşık 8 dk'dır. Çalışmada uygulanan kemometrik yöntemler ile elde edilen analiz sonuçları, önerilen HPLC yöntemi ile karşılaştırılmış ve tatmin edici sonuçlar elde edilmiştir (El-Gindy ve ark., 2006a).

El-Gindy ve arkadaşları farmasötik şurupta susuz teofilin (TH), guaifenesin (GP), difenhidramin hidroklorür (DP), metilparaben (MP), propilparaben (PP) ve sodyum benzoatın (BZ) eş zamanlı tayini için üç yöntem (RP-HPLC, PLS-1 ve PCR) geliştirmişlerdir. HPLC yöntemi, 2 mL/dk akış hızı ile 25 mM KH₂PO₄ (pH 3,2) ve asetonitrilden (60:40, v/v) oluşan hareketli faz kullanılarak, 222 nm’de ve ortam sıcaklığında ters fazlı bir C₁₈ kolonunda (4,6 µm tanecik boyutu) ayrılma esasına dayanır. Geliştirilen HPLC yöntemi TH, GP, DP, MP, PP ve BZ'nin eş zamanlı tayini için uygulanmıştır. TH, GP, DP, BZ, MP ve PP için kolonda ortalama tutulma süreleri sırasıyla 1,5 ± 0,02, 2,0 ± 0,03, 2,5 ± 0,04, 2,9 ± 0,02, 3,5 ± 0,03 ve 8,7 ± 0,02 dk olarak bulunmuştur. Uygulanan diğer iki yöntem ise kemometrik yöntemlerdir; kısmi en küçük kareler (PLS-1) ve temel bileşen regresyonu (PCR). Bu yaklaşımlar, çözeltilerin λ= 0,4 nm aralıklarla 220–270 nm dalga boyu aralığındaki UV spektrumlarında yer alan bilgileri kullanarak altı analiti ölçmek için kullanılmıştır. Daha sonra PLS-1 ve PCR yöntemlerinden elde edilen sonuçlarla HPLC yönteminden elde edilen sonuçlar karşılaştırılmış ve yöntemler arasında iyi bir uyum bulunmuştur (El-Gindy ve ark., 2006b).

Sefidi ve arkadaşları bazı süt ürünlerinde sodyum benzoat (SB) ve potasyum sorbatın (PS) eş zamanlı analizi için, modifiye edilmiş bir yöntem olan QuEChERS ekstraksiyon yöntemini ve ardından izokratik RP-HPLC yöntemini uygulayarak yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Yazarlar, SB ve PS'nin ekstraksiyon geri kazanımını ve arıtma verimliliğini arttırmak için bazı etkili parametreleri optimize etmişlerdir. Ekstraksiyon geri kazanımları SB için 94,0 ve PS için 99,8’dir. SB ve PS’nin regresyon katsayıları sırasıyla 0,998 ve 0,999 olarak belirlenmiş ve SB için LOD değeri 0,01 µg/ mL ve PS için LOD değeri 0,02 µg/ mL olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntem, kuru süt, süt, yoğurt ve yoğurt içeceği gibi çeşitli süt ürünlerine uygulanmış ve SB ve PS için %81-107 aralığında bağıl geri kazanım ve %9'dan az BSS elde edilmiştir. Son olarak elde edilen sonuçlar, sıvı kromatografi-kütle spektrometresi kullanılarak doğrulanmıştır (Sefidi ve ark., 2018).

2011 yılında yayınlanan bir çalışmada Can ve arkadaşları, kolalar, buzlu çaylar, gazlı içecekler, maden suları gibi 41 farklı alkolsüz içecek içerisinde bulunan

potasyum sorbat ve sodyum benzoatın analizi için yeni bir RP-HPLC metodu geliştirmişlerdir. Kromatografik analizler, PDA dedektörü ve C₁₈ kolonu (2 mm makro gözenek boyutu ve 130 Å mezo gözenek boyutu, 100x4,6 mm) ile donatılmış HPLC sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma boyunca izokratik elüsyon uygulanmış ve fosfat tamponu (0,025 M, pH 2,0) – su – asetonitrilden (50:45:5, v/v/v) oluşan bir tampon sistemi kullanılmıştır. Diğer kromatografik şartlar ise şu şekildedir; hareketli fazın akış hızı 3,0 mL/dk, enjeksiyon hacmi 10 µL, kolon sıcaklığı 25°C ve deteksiyon dalga boyu 230 nm'dir. Bu yöntemin uygulanmasında herhangi bir ön işleme ihtiyaç duyulmamıştır. Potasyum sorbat ve sodyum benzoatın kolonda alıkonma süreleri sırasıyla yaklaşık 12 dk ve 14 dk ve toplam analiz süresi ise 17,5 dk'dır. Kalibrasyon grafiği oluşturmak için sodyum benzoatın 0,040–2,000 mg/mL ve potasyum sorbatın ise 0,100–5,000 mg/mL konsantrasyon aralığında 10 farklı seviyedeki çözeltilerinden yararlanılmıştır. Her iki analit için de belirlenen R² değerleri 0,9999 üzerindedir. Ortalama geri kazanım değerleri ve standart hatalar ise sodyum benzoat için 100,61 ± 0,541, potasyum sorbat için 100,17 ± 0,397'dir (Can ve ark., 2011).

Baranowska ve Wojciechowska tarafından kozmetik ve farmasötik ürünlerde ve yüzey sularında altı farklı koruyucunun HPLC ile eş zamanlı analizi için yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Metilizotiazolinon (MI), klorometilizotiazolinon (CMI), benzil alkol (BA), potasyum sorbat (PS), sodyum benzoat (SB) ve metilparaben (MP)'in bir Develosil RP Aqueous AR-5 RP-30 (250 x 4,6 mm, 5,0 µm) kolonunda, asetonitril ve %0,1 sulu formik asit hareketli fazı ile bir gradyan elüsyonu kullanılarak ayrılmıştır. Çalışmada hareketli fazın akış hızı 1,0 mL/dk, enjeksiyon hacmi ise 20 µL olarak belirtilmiştir. Gradyan elüsyon ile hareketli fazın asetonitril içeriği analiz sırasında %15'ten %25'e çıkarılmıştır. Bu çalışmada analiz süresi 22 dk olarak rapor edilmiştir. Bu çalışma, aynı zamanda kozmetiklerin, farmasötiklerin ve çevresel su numunelerinin numune hazırlama prosedürleri hakkında da bilgi vermektedir. Bu çalışmada sucul ekosistemlerdeki koruyucu kalıntılarının analizi için geliştirilen kromatografik yöntemle birleştirilmiş katı faz ekstraksiyon (SPE) yöntemi de kullanılmıştır. Bileşiklerin LOD değeri 0,15-5,3 µg/mL ve LOQ değeri ise 0,45-16,0 µg/ mL aralığındadır. SPE'de sorbent olarak HLB dolgulu kartuşlar

kullanılmıştır (Oasis HLB, 6 mL, 500 mg). Geliştirilen yöntem yüz tonikleri, kremler, losyonlar, duş jelleri, yüz maskeleri ve şuruplar gibi numunelerin analizlerinde belirlenen koruyucuların içerikleri ile yüzey sularında kalıntılarının tespiti ve tanımlanması için uygulanmıştır (Baranowska ve Wojciechowska, 2013).

Mohamed bu çalışmayı sefaleksinin (CPH) ve sodyum benzoatın (SDM) dozaj formlarında eş zamanlı olarak ölçülmesini sağlamak ve varyasyonu azaltmak amacıyla gerçekleştirmiştir. Yazar bu amaçla yalın altı sigma (LSS) uygulanması için yeni yöntemler (kromatografik ve MCR yöntemleri) geliştirmiştir. İzokratik ayırma, 1,5 mL/dk akış hızında Agilent XDB-C8 (4,6 mm × 250 mm) 5 µm kolonu kullanılarak 254 nm'de gerçekleştirilmiştir. Burada hareketli faz olarak %0,1 ortofosforik asit (OPA) içeren asetonyitril: su (30:70, v/v) içeren bir karışım kullanılmıştır ve enjeksiyon hacmi 20 µL'dir. UPLC analizi ise Agilent ZORBAX SB- C₁₈ kolonu (50 mm × 2,1 mm, 1,8 µm partikül boyutu) kullanılarak, 0,25 mL/dk akış hızında, enjeksiyon hacminin ise 0,8 µL olduğu durumda gerçekleştirilmiştir. MCR spektrofotometrik yöntemin kullanılma amacı ise, sırasıyla CPH ve SDM için 240 nm ve 250 nm'de ilaçların spektral örtüşmelerini çözmektir (Mohamed, 2021).

Farid ve arkadaşları geliştirdikleri kromatografik yöntemlerle, oksometazin (Ox), sodyum benzoat (SB), guaifenesin (Gu) ve parasetamolün (Par) eş zamanlı tayinini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada şurup ve fitillerde dört ilacın eş zamanlı tayini için iki yöntem tanımlanmış ve doğrulanmıştır. İlk yöntem, 220 nm'de ters fazlı bir HPLC ve UV yöntemidir. Bu yöntem, C₁₈ kolonu ile izokratik elüsyon ile, gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan hareketli faz asetonyitril, metanol ve 35 mM KH₂PO₄ (20:5:75, v/v/v ve pH to 2,9 ± 0,1) karışımından oluşmaktadır. Burada akış hızı 1,5 mL/dk'dır ve kromatografik ayırma 15 dk'dan daha kısa bir sürede sağlanmıştır. Kullanılan ikinci yöntem ise TLC spektrodansitometrik yöntemidir. İlaçlar silika jel plakalara uygulanmış ve hareketli faz olarak metilen klorür-metanol-asetik asit-%33 amonyak (hacimce 89: 8,4: 2: 0,6) kullanılarak geliştirme yapılmıştır. Dört ilacın bantları, 270 nm'de spektrodansitometrik olarak taranmış ve nicelendirilmiştir (Farid ve ark., 2014).

Elektroforetik Yöntemler

Zhang ve arkadaşları tarafından, sodyum benzoatın (SB) tayini için, kiral ligand değişimi kapiler elektroforez (CE) yöntemi ile d-amino asit oksidaz (DAAO) aktivitesine rekabetçi inhibe edici etkinliği hakkında kinetik bir çalışma önerilmiştir. Bu çalışmada Zn (II)-l-prolinamid kompleksi kiral seçici olarak tercih edilmiştir. Daha sonra bu kiral ligand değişimi CE yöntemi, iyi doğrusallık ($r^2 \geq 0,995$), verimli geri kazanım (%95,6–100,9) ile, işaretlenmiş d,l-Serini belirlemek için uygulanmıştır (Zhang ve ark., 2011).

Pereira ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bu çalışma, kılcal elektroforez yöntemi kullanarak Brezilya'daki hardal, ketçap ve domates sosu numunelerindeki sorbat ve benzoatın kütle fraksiyonlarını belirlemeyi amaçlamıştır. Elektroforetik ayırmalar, 32 cm'lik (8,5 cm etkin uzunluk×50 µm iç çap×375 µm dış çap) kaplanmamış erimiş silika kapiler içinde gerçekleştirilmiştir. Uygulanan voltaj 30 kV, sıcaklık 25 °C ve çalışılan dalga boyu benzoat ve salisilat için 200 nm, sorbat için ise 254 nm'dir. Arka plan elektroliti, pH=8,1'de 25 mmol/L TRIS ve 12,5 mmol/L HIBA'dan oluşmaktaydı. İç standart olarak ise salisilat kullanılmıştır. Gün içi ve günler arası kesinlik sonuçlarının %2,60 bağıl standart sapmadan düşük olması yöntemin kesinliğini doğrulamıştır. geri kazanım değerleri hardalda sorbat ve benzoat için sırasıyla %99,0-101,1 ve %98,8 -101,6 arasında değişirken, ketçapta sorbat için %91,6-98,8 ve benzoat için %94,2-104,2 arasında değişmekteydi Bu sonuçlar yöntemin doğruluğunu göstermiştir (Pereira ve ark., 2021).

Elektrokimyasal Yöntemler

Sun ve arkadaşları bir Zhacai (Çin'de bulunan yumrulu bir sebze türü) numunesinde ve genellikle buğday unu sürecinde katkı maddesi olarak kullanılan benzoil peroksitte sodyum benzoat içeriğini belirlemek için benzoat iyonlarına duyarlı yeni bir poli (vinil klorür) (PVC) membran elektrodu geliştirmişlerdir. Bu elektrotta nötr taşıyıcı olarak N,N'-bis(salisiliden)-1,2-diaminoetan çinko(II)

(Zn(SDE)) kompleksi ve plastikleştirici olarak o-nitrofeniloktil eter (o-NPOE) kullanılmıştır. Yazarlar, çalışmalarında nötr taşıyıcının, plastikleştiricinin ve PVC membran bileşiminin elektrotun potansiyel tepkileri üzerindeki etkilerini araştırmışlardır ve en iyi yanıtı elde ettikleri şartı Zn(SDE): PVC: o-NPOE = 2,7: 32,6: 64,7 olarak rapor etmişlerdir. Analiz sonuçlarına göre elektrodun pH 4,4'te $2,7 \times 10^{-4}$ M ile $1,0 \times 10^{-1}$ M aralığındaki konsantrasyonlarda -51,9 mV dekat⁻¹'lik bir eğimle Nernst altı bir tepki gösterdiği ifade edilmiştir. Elektrot, benzoat iyonlarına ClO_4^{-1} , NO_3^{-} ve Cl^{-} gibi diğer anyonlardan daha iyi bir seçicilik göstermiştir. Elde edilen ortalama geri kazanım ve standart sapma sırasıyla %99,5 ve %2,4 (n=4) idi. Çalışmada referans elektrot olarak bir Ag-AgCl elektrodu, gösterge elektrodu olarak benzoat iyon seçici elektrot (ISE) ve referans elektrot olarak ise kalomel elektrot (SCE) kullanılmıştır. Emf ölçümleri oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem ile sodyum benzoatın LOD değeri $1,1 \times 10^{-4}$ olarak bulunmuştur (Sun ve ark., 2010).

Ji ve arkadaşları bu çalışmada, serbest radikal polimerizasyonu ile sentezledikleri poli(amino asitler) bazlı bir magnetik katı faz ekstraksiyon (MSPE) sorbentini (poli(stiren-ko-N-metakriloil-L-fenilalanin metil ester) (poli(St-co-MA-)) oluşturmuş ve bu sorbenti de içeceklerdeki gıda koruyucularının analizi için kullanılmışlardır. N-metakriloil-L-fenilalanin metil ester ve stiren fonksiyonel monomerler ile poli(amino asit) bazlı sorbentler oluşturulmuştur. Elde edilen sorbent sodyum benzoata karşı iyi bir seçicilik göstermiş ve sorbentlerin sodyum benzoata adsorpsiyon kapasitesi $6,08 \pm 0,31$ mg/g olarak verilmiştir. Bu yöntem ile adsorpsiyon dengesine 5 dk'da ulaşılmıştır. Çalışmada HPLC yönteminden de yararlanılmıştır. Tüm kromatografik ölçümler, C₁₈ (5 µm, 150 mm x 4,6 mm id) kolonlu HPLC sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. HPLC için kromatografik şartlar: dalga boyu 231 nm; akış hızı 0,8 mL/dk; hareketli faz çözücü A: çözücü B (22:78, v/v), çözücü A metanol, çözücü B fosfat tamponu (50,0 mM). Sodyum benzoatın bu çalışmada doğrusal konsantrasyon aralığı 12,4 ile 400,0 µg/mL arasındadır, LOD (S/N = 3) 3,73 µg/mL ve LOQ (S/N = 10) 12,4 µg/mL ve geri kazanım ise %82,50-98,31'dir (Ji ve ark., 2017).

Zyablov ve Yen yapmış oldukları çalışma ile moleküler olarak baskılı bir polimer temelinde seçici bir piezo-elektrik sensör oluşturmayı ve oluşturulan bu sensör ile alkolsüz içeceklerde sodyum benzoat (E211) miktarını belirlemeyi amaçlamışlardır. Piezoelektrik sensör, sodyum benzoata karşı seçici hale getirilmek amacıyla moleküler baskılı bir polimer (MIP) ile modifiye edilmiştir. Çalışmada MIP-E211 piezoelektrik sensörü ile alınan sonuçlar; R^2 değeri 0,98 ve LOD değeri 2 mg/L'dir. Elde edilen sensör alkolsüz içeceklerde sodyum benzoat tayininde test edilmiş ve içeceklerdeki koruyucu konsantrasyonunun izin verilen aralıkta olduğu belirlenmiştir (Zyablov ve Yen, 2022).

Pezza ve arkadaşları, bir grafit matris içinde immobilize edilmiş bir potansiyometrik sensör kullanarak içeceklerde benzoat iyonunu tayin etmişlerdir. Bu çalışmada bir elektrotun özellikleri, performansı ve uygulaması, yani $Pt | Hg | Hg_2(Bzt)_2$ | grafit açıklanmaktadır. Burada Bzt benzoat iyonu anlamına gelmektedir. Bu elektrot, Bzt'ye, $1,6 \times 10^{-1}$ mol/L gözlenebilme sınırı ile pH 6,0-8,0'da $5 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-1}$ mol $^{-1}$ aralığında $57,7 \pm 1,0$ mV/dekat hassasiyetle yanıt vermiştir. Benzoat tayini için kullanılan elektrot, kolay yapım, hızlı tepki süresi (10–30 s arasında), düşük maliyetli ve mükemmel yanıt kararlılığı (sürekli kullanımda ömür boyu > 6 ay) göstermektedir. Önerilen sensörün, çeşitli karboksilat ve inorganik anyonların varlığında benzoat için iyi bir seçicilik sergilediği görülmüştür (Pezza ve ark., 2001).

1.3.4. Potasyum Sorbatın Kantitatif Analizi

Spektroskopik Yöntemler

Ogunleye ve arkadaşları 2017 yılında yapmış oldukları bir çalışma ile Nijerya'nın Lagos kentinde satılan 30 içecekteki sodyum benzoat ve potasyum sorbat konsantrasyonunu belirlemek için HPLC ve UV-Vis. spektrofotometreden yararlanmışlardır. Bu çalışmada sodyum benzoat ve potasyum konsantrasyonunun yanı sıra içeceklerin pH'ı da belirlenmiştir. UV-Vis. Spektrofotometre ile SB 226

nm'de, PS ise 250 nm'de tayin edilmiştir. Kromatografik ayırım ise bir HPLC sistemine bağlı bir UV dedektörü ile 30°C'de, izokratik elüsyonda, ters fazlı bir C₁₈ analitik kolonu (100 mm, 3,0 mm iç çap, 3,5 µm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kromatografik sistemde kullanılan hareketli faz 0,5 mL/dk akış hızında, %85 fosfat tamponu ve %15 asetonitrilden oluşmaktaydı. HPLC yönteminde %BSS değerleri sodyum benzoat için %0,4 ve potasyum sorbat için %0,1 olarak bulunmuştur. Bu sistemde SB ve PS'nin alıkonma süreleri sırasıyla, 5,97 dk ve 7,56 olarak rapor edilmiştir. Yazarlar daha sonra kullanmış oldukları iki yöntemi de karşılaştırmış ve %95 güven sınırında yöntemler arasında anlamlı bir fark gözlemlemişlerdir. HPLC ve UV sonuçlarının karşılaştırıldığında, UV'den elde edilen değerlerin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında bazı alkolsüz içeceklerde SB ve PS tayini için HPLC yönteminin daha iyi sonuç verdiği görülmüştür. Bunun nedeni HPLC sisteminin daha iyi bir ayırım sağlamasıdır (Ogunleye ve ark., 2017).

Jiang ve arkadaşları, tarım ürünlerinde bulunan potasyum sorbat (PS) ve sorbik asit (SA) miktarını tayin etmek için THz zaman alanı spektroskopisi (THz-TDS) yöntemi geliştirmişlerdir. Bu amaçla, PS ve SA'nın absorpsiyon spektrumları, oda sıcaklığında 0,2 ile 1,6 THz arasında ölçülmüştür. PS ve SA'nın miktar tayinleri için, farklı ağırlıklardaki polietilen içerisinde ve toz tarım ürünlerinde bulunan PS ve SA'nın absorbanslarından yararlanılmıştır. Bu çalışmada, bir parçacık sürüsü optimizasyonu ve destek vektör sınıflandırması (PSO-SVC) algoritması ile birleştirilmiş aralıklı kısmi en küçük kareler (İPLS) önerilmiştir. Burada İPLS, frekans optimizasyonu, PSO-SVC algoritması ise optimum spektrum aralıklarına dayalı koruyucu içeriğin spektrum analizi için kullanılmıştır. Çalışma sonucunda optimum penaltı parametresi c ve kernel parametresi g, PS (0,551–1,487 THz) için sırasıyla 1,284 ve 0,863, SA (0,454–1,216 THz) için 1,374 ve 0,906 olarak bulunmuştur (Jiang ve ark., 2020).

2020 yılında Magomya ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, Nijerya'da farklı ticari marka altında pazarlanan 20 çeşit içeceğin içerisindeki sodyum benzoat ve potasyum sorbat miktarları UV-Vis spektrofotometrik yöntem kullanılarak tayin edilmiştir. Bu çalışmada benzoat için ortalama %94,54 – 97,25 ve sorbat için %92,7

– 96,82 yüzde geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Yöntemin %BSS değerleri ise benzoat ve sorbat için sırasıyla %1,67 ve %2,36 idi. Gözlenebilme ve tayin sınırları (LOD, LOQ), sodyum benzoat için 1,35, 0,87 mg/L ve potasyum sorbat için 4,11, 2,56 mg/L olarak verilmiştir. Analiz edilen numunelerin tamamı 25,80 ila 245,10 arasında değişen konsantrasyonlarda sodyum benzoat içerirken, potasyum sorbat için on dört numune 1,36 – 158 mg/L arasındaki konsantrasyonlarda pozitif olarak test edilmiştir. Yazarların yapmış oldukları çalışma, analiz edilen tüm numunelerde potasyum sorbat miktarının kabul edilebilir sınırlarda olduğunu fakat yedi numunede sodyum benzoat miktarının izin verilen limitlerin üzerinde olduğunu ispatlamıştır (Magomya ve ark., 2020).

Lian ve arkadaşları 2020 yılında yaptıkları bir çalışma ile terahertz zaman alanlı spektroskopi sistemini (THz-TDS) kullanarak süt tozundaki potasyum sorbat içeriğini tespit etmişlerdir. Bu amaçla, ilk olarak, numunelerin THz zaman alanlı spektrumları, Fourier dönüşümü ile frekans spektrumlarına dönüştürülmüş ve daha sonra, optik parametrelerin bir dizi basitleştirilmiş formülü aracılığıyla, THz absorpsiyon spektrumları ve kırılma indisi spektrumları elde edilmiştir. Potasyum sorbatın karakteristik absorpsiyon pikine dayanarak, sıradan en küçük kareler (OLS) lineer regresyon kullanılarak süt tozundaki potasyum sorbatın kantitatif bir analiz modeli oluşturulmuştur. Çalışmada potasyum sorbat içeriğinin düşük (<%1) olduğu durumlarda, Alt-PLS olarak adlandırılan bir kısmi en küçük kareler (PLS) modeli oluşturmak için özel bir THz absorpsiyon bandı (0,887–1,000 THz) seçilmiştir. Bu analizde ayrıca kısmi en küçük kareler ayırım analizi (PLS-DA) tekniği de kullanılmıştır. Elde edilen deneysel sonuçlar, önerilen Alt-PLS modelinin doğruluk açısından tam spektruma dayalı PLS modelinden üstün olduğunu ve önerilen PLS-DA'nın destek vektör makinesi ve sinir ağı gibi diğer doğrusal olmayan regresyon yöntemlerinden üstün olduğunu göstermektedir (Lian ve ark., 2020).

Oguntade ve Ajibode 2022 yılında yapmış oldukları çalışma ile Nijerya'nın batısındaki Ogun Eyaleti, Sango Ota'daki 12 gıda örneğinde bulunan Sodyum benzoat ve Potasyum sorbat miktarlarını UV Spektrometre yöntemiyle tayin etmişlerdir. Analiz edilen gıda numuneleri; meyve içecekleri, margarin, soslar ve

ketçaptan oluşmaktadır. Bu çalışma ile 12 gıda örneğinin tamamının pH değerlerinin 2,71 – 4,89 aralığında olduğu belirlenmiştir, bu değerler tüm gıdalarda etikette belirtilmese dahi her iki koruyucunun da aynı anda bulunduğunu göstermektedir. İçecek numunelerinde sodyum benzoat için 432,00 – 468,00 mg/L ve potasyum sorbat için 180,26 – 566,52 mg/L aralığında değerler kaydedilmiştir. Margarin örneklerinde sodyum benzoat 360,00 - 1260,00 mg/L ve potasyum sorbat 154,51 - 618,03 mg/L iken yemek soslarında ise sodyum benzoat 576,00 - 1080,00 mg/L, potasyum sorbat ise 206,01-360,52 mg/L'dir. Analiz sonuçları, koruyucu miktarlarının margarinlerde yüksek düzeyde olduğu ve bunların tüketim için güvenli olmadığını ispatlamıştır (Oguntade ve Ajibode, 2022).

Li ve arkadaşları, gerçekleştirdikleri bu çalışma ile, hapten ile modifiye edilmiş polidiasetilen (PDA) vezikülleri kullanarak küçük moleküllerin tespiti için rekabetçi bir kolorimetrik immünoassay oluşturmak için yeni bir strateji oluşturmuşlardır. Bu çalışmada model analit olarak sodyum benzoatı kullanmışlardır. Yazarlar çalışmada, sodyum benzoat antikoru ekledikten sonra maviden kırmızıya renk geçişini kolaylaştırmak için benzoat analogu, 4-aminobenzoik asit ile PDA monomerini birleştirmişlerdir, çünkü sodyum benzoatın varlığında, antikoruğun 4-aminobenzoik asit ile etkileşimi engellenmiş olur ve renk değişiminin derecesi azalır. Bu analizin oldukça spesifik ve HPLC yöntemi kadar doğru olduğu belirlenmiştir. Önerilen yöntem, numunelerin benzoat analizinde başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır. Bu yöntemin hapten ile modifiye edilmiş PDA veziküllerinin, diğer kimyasal gıda katkı maddelerinin kolorimetrik tespitinde de umut verici bir yaklaşım olması beklenmektedir. Bu çalışmada sodyum benzoatın alıkonma süresi 5,4 dk., LOQ değeri 1 µg/mL, ve geri kazanım değerleri enerji içecekleri için %96,66-105,55 ve şekerler için %94,78-103,34'tür. Tüm bu sonuçlar bu kolorimetrik yöntemin HPLC yönteminden daha hassas olduğunu ve numune matrisinin analiz üzerine çok az müdahale bulunduğunu ispatlamaktadır (Li ve ark, 2018).

Kromatografik Yöntemler

Sohrabvandi ve arkadaşları, İran'a has bir süt bazlı fermente içecek olan Doogh içerisinde kullanılan potasyum sorbat ve sodyum benzoat koruyucularının miktar tayinleri için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Analitlerin kromatografik ayrımı, asetat tamponu (0,2 mol/L, pH 4,4): asetonitril (63:37) karışımından oluşan bir hareketli fazın 25 °C sıcaklığındaki bir C₁₈ (250 mm×4 I.D, 5 µm) kolonundan 1 mL/dk akış hızıyla geçirilmesi ile 235 nm'de gerçekleşmiştir. Çalışmada, Carrez solüsyon miktarı, pH ve santrifüj hızı gibi faktörler optimize edilmiştir. Yazarlar önerilen yöntemler ile sorbik asidin ve benzoik asidin LOD sırasıyla 1,823 mg/L ve 1,985 mg/L ve LOQ ise 6,078 mg/L ve 6,619 mg/L olarak tespit etmişlerdir. Sorbik asit ve benzoik asit için bağıl standart sapmalar (BSS'ler), sırasıyla 4,4 ve 4,087; R² değerleri 0,990 ve 0,995 ve geri kazanım değerleri 80 ve 65 olarak verilmiştir. Her iki analit için de lineer konsantrasyon aralığı 4-1000 mg/mL 'dir (Sohrabvandi ve ark., 2015).

Byrne ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre, topikal bir krem preparasyonunda betametazon-17-valerat, fusidik asit, potasyum sorbatın ve metil- ve propilparabenin eş zamanlı analizi için yeni bir RP-HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Yöntem, aktif farmasötik bileşenlerin en önemli bozunma ürünlerini ayırma ve farmasötik ürünün raf ömrü boyunca aktif maddeler ve koruyucuların içeriğindeki değişiklikleri tespit etmede kullanılmıştır. Kromatografik analiz C₁₈ kolonu (100 mm × 3,0 mm iç çap) ile 30 °C'de, 240 nm'de ve akış hızının 0,75 mL/dk olduğu bir gradyan elüsyon ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan hareketli fazlar şu şekildedir; hareketli faz A, 83:17 (v/v) asetonitril ve metanol karışımından ve hareketli faz B, saf su içinde 10 g/L %85 fosforik asit çözeltisinden oluşuyordu. Her bileşen için geri kazanım oranları %99,1 ile %102,4 arasındadır. Yazarlar, yöntemi doğrulamak için, Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı (ICH) yönergelerinden yararlanmışlardır (Byrne ve ark., 2014).

Katakam ve arkadaşlarının 2020 yılında yapmış olduğu bir çalışma ile, bitmiş krem formlarında hidrokortizon asetat, pramoksin hidroklorür, potasyum sorbat ve

sorbik asit miktarının belirlenmesi için bir UPLC metodu geliştirilmiştir. Bu yöntem uygulanmadan önce optimize edilmiştir. Kromatografik ayırma 30 °C'deki Acquity UPLC BEH kolonu, C₁₈, (150 x 2,1 mm, 1,7 µm) ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 10 mM dibazik potasyum fosfat (pH 7,5) ve asetonditrlden (95:5 v/v) oluşan Hareketli faz A ve asetonditril ve su karışımından (90:10 v/v) oluşan hareketli faz B kullanılmıştır. Potasyum sorbat PDA dedektörü ile 254 nm'de dedekte edilmiştir. Kromatografik ayırma 10 dk'nın altında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada her maddenin korelasyon katsayısının 0,999'nın üzerinde olduğu belirtilmiştir. Hidrokortizon asetat, Sorbat ve Pramoksin Hidroklorür için BSS %2,2'den küçük, geri kazanım değerleri ise %97,5 ile %102,4 arasındadır (Katakam ve ark., 2020).

Chaleshtori ve arkadaşları, Kaşan'da 103 adet kek, tost ekmeği, salça, mayonez sosu, gazlı meşrubat ve Olovieh salatası örneğinde sodyum benzoat (SB) ve potasyum sorbat (PS) koruyucularının spektrofotometri ve HPLC ile analizini gerçekleştirmişlerdir. SB ve PB bileşiklerinin kromatografik ayırımı bir Supelcosil LC-18 kolonunda (C₁₈ 5µm: 25cm×4,6mm) HPLC ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada SB için 225 nm ve PS için 254 nm'de absorpsiyon değerleri ölçülmüştür. Bir metanol/fosfat tampon çözeltisi (pH=4,4; 70:30 v/v) izokratik modda elüsyon maddesi olarak kullanılmış ve hareketli fazın akış hızında 1,0 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Bu analiz sonucunda LOD değerleri benzoik asit için 0,6 mg/L, sorbik asit için 0,2 mg/L iken LOQ değerleri ise benzoik asit için 4,0 mg/L, sorbik asit için 2,0 mg/L'dir (Chaleshtori ve ark., 2018).

Petanovska-Ilievska ve arkadaşları içeceklerde sodyum benzoat ve potasyum sorbatın eş zamanlı tayini için yüksek hızlı kolonun kullanıldığı bir RP-HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Her iki koruyucunun kromatografik ayırımı, 25 °C'de ters faz LiChroCART® Purospher STAR RP-18e (30 mm x 4 mm; 3 µm) kolonu ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 1,0 mL/dk akış hızında, asetonditril ve fosfat tamponu (pH 3,5) (8:92, v/v) karışımından oluşan bir hareketli faz sistemi kullanılmıştır. Sodyum benzoat 195 nm'de, potasyum sorbat ise 260 nm'de dedekte edilmiştir ve analiz süresi 7,5 dk'nın altındadır. Sodyum benzoat için doğrusallık aralığı 6,04–200,27 mg/L ($R^2= 0,999$), potasyum benzoat için ($R^2= 0,999$), 12,19–406,36

mg/L'dir. Çalışma sonucunda sodyum benzoat ve potasyum sorbatın LOD değerleri sırasıyla 0,004 ve 0,003 mg/L, LOQ değerleri ise sırasıyla 0,012 ve 0,009 mg/L olarak bulunmuştur. Bu yöntem kısa analiz süresi sağlayan yüksek hızlı kolonların kullanılması bakımından avantaj sağlamıştır (Petanovska-Ilievska ve ark., 2017).

Akbari-Adergani ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada bir İran'da geleneksel süt içeceği olan Doogh'da bulunan sodyum benzoat ve potasyum sorbatın miktar tayini için yeni HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Bu amaçla 27 farklı marka adı altında pazarlanan Doogh içecekleri analiz edilmiştir. Analiz, UV detektörü ve bir Supelcosil LC-18 kolonu (25 cm x 4,6 mm, 5 μ m) ile donatılmış bir HPLC sistemi ile izokratik elüsyonla 225 nm'de gerçekleştirilmiştir. Burada kolon sıcaklığı 20°C, enjeksiyon hacmi 20 μ L ve hareketli faz (amonyum asetat tamponu: asetonitril (90:10, v/v)) akış hızı ise 0,8 mL/dk'dır. HPLC analizi sonucunda sodyum benzoat ve potasyum sorbatın ortalama konsantrasyonları ve standart sapmaları sırasıyla 195,9 (SD 1,8) ve 328,8 (SD 2,1) mg/kg olarak bulunmuştur. Numunelerde benzoat ve sorbat için LOD değerleri sırasıyla 0,15 ve 0,24 mg/kg, LOQ değerleri ise sırasıyla 0,5 ve 0,8 mg/kg olarak bulunmuştur. Sodyum benzoat ve potasyum sorbatın standart eğrileri için korelasyon katsayılarının sırasıyla 0,999 ve 0,998'den fazla olduğu görülmüştür. Geri kazanım değerleri sodyum benzoat için %95,7, potasyum sorbat için %96,1 olarak verilmiştir (Akbari-Adergani ve ark., 2013).

Mazdeh ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, süt ürünlerindeki koruyucuları (sodyum benzoat, potasyum benzoat, natamisin) eş zamanlı olarak 220 nm'de UV algılamalı ters faz kromatografisi ile saptamak için bir yöntem geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırma hareketli faz olarak amonyum asetat tamponu (pH 5) ve asetonitril (73:27, v/v) karışımından oluşan bir hareketli fazın kullanıldığı C₁₈ kolonu (150 x 4,6 mm, 5 μ m) ile gerçekleştirilmiştir. Analitlerin ayrılması, UV dedektörü ile 220 nm'de ve 1 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada 5 çeşit ticari peynir ve yoğurttan oluşan 195 numune kullanılmıştır. Sonuçlar, LOD ve LOQ'nun benzoat ve sorbatta sırasıyla 0,326-0,520 mg/kg ve 0,989-1,575 mg/kg aralığında olduğu durumlarda yetersiz ayırma sağlamıştır.

Analitlerin kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısının 0,997'den yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Mazdeh ve ark., 2017)

Yuliana ve arkadaşları, öksürük şurubunda dekstrometorfan hidrobromür, klorfeniramin maleat ve potasyum sorbat'ın eşzamanlı tayini için yeni bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Analiz, üç maddeden oluşan simülasyon numunesi üzerinden gerçekleştirilmiş ve her konsantrasyon için üç tekrarlı beş farklı konsantrasyon hazırlanmıştır. HPLC analizi, 230 nm'de gradient elüsyon ile C₁₈ kolonu kullanılarak yapılmıştır. Bu analizde kullanılan hareketli faz asetonitril ve sodyum-heptan sülfonat iyon çifti içeren fosfat tamponundan (pH 2,5) (5:95, v/v) oluşmaktaydı. Diğer kromatografik koşullar ise şu şekildedir: kolon sıcaklığı 35 °C, akış hızı 1 mL/dk, enjeksiyon hacmi 20 µL. Sonuçlara göre, yöntemin geri kazanımı (%98-102 aralığında), kesinliği (BSS < %2) ve doğrusallığı ($r \geq 0,98$) tatmin edici seviyedir. Dekstrometorfan-HBr, klorfeniramin maleat ve potasyum sorbat için LOD değerleri sırasıyla 3,13 µg/mL, 0,94 µg/mL ve 0,12 µg/mL ve LOQ değerleri ise sırasıyla 9,49 µg/mL, 2,85 µg/mL olarak bulunmuştur (Yuliana ve ark., 2021).

Kreuz ve arkadaşları, tescilli bir portakal aroması ve Magnasweet tatlandırıcı arttırıcı içeren sulu süspansiyonlarda potasyum sorbat, metilparaben, propilparaben ve indinavir'in eş zamanlı analizi için bir gradient elüsyon ile, ters fazlı bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırma, bir Eclipse XDB-C8 kolonu ile 260 nm'de, 35 dk'da gerçekleşmiştir ve enjeksiyon hacmi 50 µL'dir. Çalışmada kullanılan hareketli faz, 0,5 mL/dk akış hızında asetonitril ve asetonitril:sitrat tamponundan (pH 4,0) oluşmaktadır (20:80 v/v). Potasyum sorbat, metilparaben ve propilparaben için LOD değerleri sırasıyla 0,3, 0,8 ve 1,0 ng/mL iken LOQ değerleri ise sırasıyla 1,0, 3,0 ve 4,0 ng/mL'dir. Her analitin ortalama geri kazanım değerleri ise %99-101 aralığındadır (Kreuz ve ark., 1999).

Bahreman ve Eskandari İran'ın geleneksel içeceği olan Doogh'ta potasyum sorbat ve sodyum benzoatın analizi için yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem HPLC yönteminin kullanıldığı ve ardından iki koruyucunun da UV diyot dizisiyle saptandığı güvenilir bir yöntemdir. Bu çalışmada, 27 Doogh numunesi analiz edilmiş

ve bu numuneler içerisindeki potasyum sorbat ve sodyum benzoatın miktarı spektrofotometri yöntemiyle karşılaştırmalı olarak HPLC ile belirlenmiştir. Koruyucuların kromatografik analizi C₁₈ kolonu (25 cm x 4,6 mm, 5 mm) ve UV dedektörü ile donatılmış RP-HPLC ile gerçekleştirilmiştir. HPLC çalışması izokratik elüsyon ile gerçekleştirilmiştir. Diğer kromatografik koşullar ise şu şekildedir: kolon sıcaklığı 20°C, enjeksiyon hacmi 20 µL ve akış hızı 0,8 mL/dk'dır. Koruyucuların alıkonma süreleri sodyum benzoat için 9,80 dk ve potasyum sorbat için ise 26,50 dk'dır. Bu analizde sodyum benzoate 225 nm'de, potasyum sorbat ise 255 nm'de tayin edilmiştir. Spektrofotometri ile yapılan çalışmada ise sodyum benzoate 228 nm'de potasyum sorbat ise 250 nm'de dedekte edilmiştir. Numunelerde sodyum benzoat ve potasyum sorbat için LOD değerleri sırasıyla 0,15 mg/kg ve 0,24 mg/kg ve LOQ değerleri ise sırasıyla 0,5 mg/kg ve 0,8 mg/kg olarak bulunmuştur. Geri kazanım değerleri ise sırasıyla %93,1-96,3 ve %92,9-99,7 arasında değişmektedir. Sodyum benzoat ve potasyum sorbatın standart eğrileri için korelasyon katsayıları sırasıyla 0,9993 ve 0,9988'dir. Çalışma sonucunda, düşük konsantrasyonlarda spektrofotometri yönteminin, HPLC tarafından belirtilenlere kıyasla yüksek değerler gösterdiği görülmüştür. Yüksek konsantrasyonda ise spektrofotometri, HPLC'ye kıyasla daha düşük değer göstermiştir. Bu çalışmada spektrofotometri, bir numunedeki potasyum sorbat ve sodyum benzoatı aynı anda güvenilir ve kesin sonuçlarla saptayıp belirlemeye yetmemiştir (Bahremand ve Eskandari, 2013).

Özdemir ve arkadaşları 2020 yılında gerçekleştirdikleri çalışma ile, Türkiye pazarında bulunan 10 farklı peynir örneklerinde bulunan sorbik asit miktarını HPLC ile belirlemeyi hedeflemişlerdir. HPLC analizi, 25°C'de, bir X-Terra RP-18 (150 x 4,60 mm i.d. x 5 µm) kolonu ile 1,0 mL/dk akış hızında 3 dk'da gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak ise 0,2 (v/v) glasiyal asetik asit içeren %50 (v/v) asetonitril –su kullanılmıştır. Çalışma sonucunda analiz edilen numunelerdeki sorbik asit miktarları 21,3-511,3 mg/kg aralığında bulunmuştur. Çalışma sonucunda sorbik asidin korelasyon katsayısı 0,999, LOD değeri 0,0018 µg/mL ve LOQ değeri ise 0,0269 µg/mL olarak bulunmuştur. Geri kazanım sonuçları sırasıyla 0,314 ve 0,210'da düşük düzeyde BSS değerleri ile 97,5 ve 98,1 olarak bulunmuştur (Özdemir ve ark., 2020).

Matysova ve arkadaşları beş tip oral sıvı ürününde sotalol hidroklorür ve potasyum sorbat miktarının belirlenmesi için seçici ve hassas bir gradient elüsyonlu bir HPLC-UV yöntemi geliştirmişlerdir. Bu maddelerin ayrılması için gradient elüsyon modunda bir Ascentis Express C₁₈ (100 x 4,6 mm, 2,7 µm) katı çekirdekli HPLC kolonu kullanılmıştır. UV/Vis absorbans detektörü, 237 nm dalga boyuna ayarlanmıştır. Ayrıca bu çalışmada kolon sıcaklığı 25°C, akış hızı 1,3 mL/dk, enjeksiyon hacmi 5 µL ve toplam analiz süresi 4,5 dk'dır. Hareketli faz olarak ise bir sodyum dihidrojen fosfat dihidrat çözeltisi (pH 2,5; 17,7 mM) ve asetonitril karışımı (ACN~%10–60) kullanılmıştır (Matysova ve ark., 2015).

2013 yılında Ahmed ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada sodyum benzoat ve potasyum sorbat içeren 114 yerli ve ithal marka meyve suları, gazlı içecekler, içecekler, süt, soslar, sürülebilir yağlar, reçeller, jöleler, marmelatlar, peynir ve margarinler RP-HPLC ile analiz edilmiştir. Bu çalışmada her iki koruyucunun da doğru belirlenmesini engelleyen numune matrisinin etkisini azaltmak için çeşitli ekstraksiyon prosedürleri uygulanmıştır. Kromatografik ayırma, oda sıcaklığında, 1mL/dk akış hızında ve hareketli faz olarak asetonitril ile izokratik elüsyonda ters faz C₁₈-5µm ve 1000A gözenek boyutlu kolon (250 mm x 4,6 mm) kullanılarak 25°C sıcaklıkta ve sodyum benzoat için 227 nm'de, potasyum sorbat için 250 nm'de gerçekleştirilmiştir. Ürünlerde tespit edilen sodyum benzoat ve potasyum sorbat konsantrasyonu sırasıyla 1,03 - 60,76 mg/L ve 3,24-14,48 mg/L aralığındaydı. Geri kazanım yüzdesi sodyum benzoik için 92,01±1,31 - 99,95±1,99 ve potasyum sorbat için 90,81±1,16 - 99,87±1,99 olarak bulunmuştur. Sodyum benzoat için gözlenebilme sınırı ve tayin sınırı sırasıyla 0,231 ve 0,772 mg/L ve potasyum sorbat için ise bu değerler sırasıyla 0,018 ve 0,060 mg/L idi (Ahmed ve ark., 2013).

Amirpour ve arkadaşları salatalık turşusu, salça konservesi, vişne reçeli, alkolsüz içecekler, meyve suları ve süt ürünleri (UF-Feta peynirleri, Lighvan peynirleri, laktik peynirler, yoğurtlar ve hamur) dahil olmak üzere 400 gıda numunesinde benzoat ve sorbat düzeylerinin tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik analiz, UV Detektörü ve bir

Eclipse-XDB C₁₈ kolonu (150x4,6 mm, 5 µm) ile donatılmış bir HPLC sisteminde gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz, 0,8 mL/dk akış hızına sahip sulu bir amonyum asetat tamponu (pH = 4,2) ve asetonitrilden (80:20 v/v) oluşuyordu. Enjeksiyon hacmi 20 µL idi ve UV detektörü 225 nm'ye ayarlandı. Sonuçlar, tüm numunelerin 270'inin sırasıyla laktik peynir ve meyve suyunda 11,9 mg/kg ve 288,5 mg/kg arasında değişen benzoat içerdiğini gösterdi. Örneklerin 98'indeki sorbat seviyeleri, hamur ve meyve suyunda sırasıyla 20,1 ton 284,3 mg/kg'dır. Ayrıca, laktik peynirde 11,9 mg/kg ile UF-Feta peynirde 91,2 mg/kg benzoat tespit edilmiştir. Analiz sonucunda sodyum benzoat ve potasyum sorbat için bulunan LOD değerleri sırası ile 0,6 mg/kg ve 0,5 mg/kg iken, LOQ değerleri ise 1,9 mg/kg ve 1,5 mg/kg'dır (Amirpour ve ark., 2015).

Gholipour ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada İran'da hamurda kullanımı yasak olan potasyum sorbatın HPLC-UV ile tayini için yöntem geliştirilmiştir. Bu analizde Mazenderan ili fabrikalarından toplanan 100 adet hamur örneği ile çalışılmıştır. Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler şu şekildedir; korelasyon katsayısı 0,999, LOD değeri 6,37 µg/ml, LOQ değeri 19,11 µg/ml ve doğrusal konsantrasyon aralığı 19-100 µg/ml'dir. Numunelerin %32'sinde potasyum sorbat tespit edilmiştir. İran'ın hamurda kullanımına yönelik ulusal standart yasağına rağmen hamur numunelerinde potasyum sorbat varlığı tespit edilmiştir (Gholipour ve ark., 2014).

Ruyi ve Chenggang tarafından 2016 yılında fonksiyonel içeceklerde bulunan glukuronik asit, malik asit, taurin ve potasyum sorbatının eş zamanlı tayini için bir iyon kromatografisi yöntemi geliştirilmiştir. Kromatografik ayırma için bir anyon ayırma kolonu (4x250 mm) ve bir anyon koruma kolonu (4x50 mm) kullanılmıştır. 1,0 mL/dk'da 20 mmol/L KOH hareketli fazı, 20 dk boyunca 35 °C'de anyon ayırma kolonundan geçirildi. Bu çalışmada anyon baskılayıcı akım 50 mA ve hücre sıcaklığı ise 30°C'dir. Bu metotta glukuronik asit, malik asit, taurin ve potasyum sorbatın korelasyon katsayıları sırasıyla 0,999, 0,996, 0,989 ve 0,958'dir. LOD değerleri ise glukuronik asit için 0,72 µg/mL, malik asit için 0,64 µg/mL, taurin için 2,58 µg/mL ve potasyum sorbat için ise 1,5 µg/mL olarak verilmiştir. Bu bileşiklerin geri

kazanım değerleri ise %94-104 aralığında ve bağıl standart sapma ise %0,77-1,08 (n=6) aralığındadır. Bu sonuçlar bu yöntemin fonksiyonel içeceklerin analizi için doğru bir yöntem olduğunu gözler önüne sermiştir (Ruyi ve Chenggang, 2016).

Dinç Zor ve arkadaşları gerçekleştirdikleri bu çalışmada, potasyum sorbat, , kinolin sarısı, sodyum benzoat ve gün batımı sarısının eş zamanlı tayini için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Yazarlar bu çalışmada optimum kromatografik şartları belirlemek için üç seviyede üç değişken kullanan bir Box-Behnken tasarımı optimizasyon tekniğinden yararlanmışlardır. Burada test edilen faktörler ve seviyeleri şunlardır; hareketli fazın pH'ı 6,0-7,0; akış hızı 0,8-1,2 mL/dk ve 0,025 M sodyum asetat/asetik asit tamponundan oluşan hareketli faz oranı %80-90. Burada znrlk yanıt olarak seçilmiştir. Kromatografik analizler, bir DAD detektörü, 5 um Inertsil OctaDecylSilane (ODS)-3V (250 mm x 4,6 mm) RP kolonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Optimize edilen kromatografik şartlar ise şu şekildedir; izokratik elüsyon ile, pH 6,0'lık 0,025 M sodyum asetat/asetik asit tamponu ve asetonitril (85:15, v/v) karışımından oluşan bir hareketli faz sistemi, akış hızı 0,8 mL/dk, enjeksiyon hacmi 20 L, dalga boyu optimizasyon prosedürü için 230 nm, validasyon prosedüründe ise sodyum benzoat ve potasyum sorbat için 230 nm, kinolin sarısı ve gün batımı sarısı için 460 nm'dir. Bu çalışmada potasyum sorbat, sodyum benzoat, kinolin sarısı ve gün batımı sarısı için korelasyon katsayıları sırasıyla 0,9979, 0,9980, 0,9979 ve 0,9993'tür. LOD ve LOQ değerleri ise sırasıyla potasyum sorbat için 0,082 g/mL ve 0,273 g/mL; sodyum benzoate için 0,154 g/mL ve 0,513 g/mL; kinolin sarısı için 0,044 g/mL ve 0,146 g/mL ve gün batımı sarısı için 0,069 g/mL ve 0,230 g/mL'dur. Çalışmadan elde edilen geri kazanım değerlerinin ise <%95 olduğu görülmektedir. Geliştirilen yöntem daha sonra ticari limonata ve limon sosu numunelerinde de uygulanmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Dinç Zor ve ark., 2016).

Elektroforetik Yöntemler

Costa ve arkadaşları 2008 yılında yapmış oldukları bir çalışma ile ticari içeceklerde benzoat ve sorbat iyonlarının tayini için bir kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntem geliştirmede, arka plan elektrolitinin pH'ı ve bileşenleri, etkili mobilitelere karşı pH eğrileri kullanılarak seçilmiştir. Bu çalışmada dahili standart (salisilat iyonu) kullanılmıştır. Analizde arka plan elektroliti, pH 8,1'de 25 mmol L(-1) tris(hidroksimetil)aminometan ve 12,5 mmol L(-1)2 hidroksiizobütirik asitten oluşmuştur. Ayırma, erimiş silika kapilerinde (32 cm toplam uzunluk ve 8,5 cm etkin uzunluk, 50 mikrom iç çap) kısa uçlu enjeksiyon konfigürasyonu ve UV ile, benzoat ve salisilat için 200 nm'de ve sorbat için 254 nm'de 28 sn'de gerçekleşmiştir. Bu yöntem ile elde edilen sonuçlar; $R^2 > 0,999$, LOD değerleri benzoat için 0,9 mg/L, sorbat için 0,3 mg/L, geri kazanım değerleri %97,9 – 105 olarak ifade edilmiştir. Alkolsüz içeceklerde ve çayda benzoat miktarı 197-401 mg/L ve sorbat miktarı 28-144 mg/L olarak bulunmuştur (Costa ve ark., 2008).

de Jesus ve arkadaşları, ekmek numunelerinde bulunan propiyonat ve sorbat koruyucularının eş zamanlı belirlenmesi için yeni bir kapiler elektroforez (diyot dizisi spektrofotometrik deteksiyon ile) yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntem, sonikasyon yardımı ile sulu ekstraksiyon kullanılarak basit ve hızlı bir numune hazırlama işlemi gerektirmektedir. 10 mmol/L benzoik asit, 15 mmol/L L-histidin ve 0,2 mmol/L setiltrimetilamonyum bromürden (CTAB) oluşan bir arka plan elektroliti (BGE), koruyucuların 5 dk'dan daha kısa sürede iyi çözünürlükle ayrılmasını sağlamıştır. Bu çalışmada propiyonat 235 nm'de, sorbat ise 250 nm'de dedekte edilmiştir. Propiyonat ve sorbat için LOQ değerleri sırasıyla 4,3 mg/kg ve 1,5 mg/kg olarak bulunmuştur. Önerilen yöntem, ticari dilimlenmiş beyaz ekmek örneklerinde propiyonat ve sorbat koruyucularının analizi için başarılı bir yöntemdir (de Jesus ve ark., 2018).

Elektrokimyasal Yöntemler

Stefan-van Staden ve arkadaşları, gıda kalitesini değerlendirmek için gıdalardaki sorbik asit miktarını tayin etmişlerdir. Bu çalışmada, gıdalarda (unlu mamüller ve mayonezde sorbik asit tayini için metal porfirinler (Zn protoporfirin IX ve 2,3,7,8,12,13,17,18 oktaetil, 21H, 23H-porfirin Mn(III) klorür) ile modifiye edilmiş altın nanopartikül macunu ile dekore edilmiş nanografene dayalı iki sensör önerilmiştir. Burada sensörlerin karakterizasyonu ve doğrulanması için kare dalga voltammetrisi kullanılmıştır. Yazarlar, önerdikleri her iki sensörde de LOD değerini 0,33 $\mu\text{mol/L}$ ve LOQ değerlerini ise 1,00 $\mu\text{mol/L}$ bulmuşlardır. En yüksek hassasiyet (0,35 $\text{nA}/\mu\text{mol L}^{-1}$), 2,3,7,8,12,13,17,18 oktaetil, 21H, 23H-porfirin Mn(III) klorür bazlı sensör kullanıldığında kaydedilmiştir ve bu elektrokatalizörün Zn protoporfirin IX'unkinden daha yüksek elektrokatalitik etkisi olduğunu kanıtlanmıştır. Bu sensörler ekmekte ve mayonezde bulunan sorbik asit tayini için kullanıldığında geri kazanım yüzdesi %95'ten fazla çıkmış ve BSS değerleri ise her iki sensör için %5'ten küçüktür (Stefan-van Staden ve ark., 2022).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışmasında, piyasada bulunan ve farklı içeriklere sahip olan iki çeşit ticari enerji içeceği (ticari enerji içeceği (I) ve ticari enerji içeceği (II)) numunesi içerisinde bulunan ve dedekte edilebilen bileşiklerin (ticari enerji içeceği (I)'de KAF ve PS; ticari enerji içeceği (II)'de B3, SB, PS ve KAF) eş zamanlı miktar tayinleri için yeni UPLC yöntemlerinin geliştirilmesinde ve çalışmaların yürütülmesinde aşağıda belirtilen cihazlar, bilgisayar programları ve yazılımlar, laboratuvar gereçleri, kimyasallar ve ticari enerji içeceği numuneleri kullanılmıştır.

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Cihaz ve Gereçler

- Waters Acquity H-Class UPLC Sistemi (fotodiyot array dedektörü (photodiode array dedector → PDA) ile birlikte). (Waters Corporation, MA, ABD)
- Kolon → Waters BEH® C₁₈ (2,1 x 100 mm, 1,7 µ)
- Empower UPLC Programı.
- Vial (Waters)
- Sartorius Entris 224-1S marka hassas terazi:
- Manyetik karıştırıcı (Isolab, Eschau, Almanya)
- Ultrasonik banyo (Isolab, Eschau, Almanya)
- Eppendorf Mikropipet (20-200 µL ve 100-1000 µL)
- ISOLAB Şırınga Ucu Filtre Steril PVDF (Polivinilinden Diflorür) (Gözenek çapı = 0,22 µm)
- Agilent Şırınga Ucu Filtre Nylon (Gözenek çapı 0,20 µm)
- Farklı hacimlerde balon joje (5-1000 mL, Isolab, Eschau, Almanya)
- Beher (10-1000 mL, Isolab, Eschau, Almanya)

2.1.2. Kullanılan Bilgisayar Yazılımları

- Empower2 (Waters, MA, ABD)
- Excel 2010 (Microsoft, Washington, ABD)
- Matlab R2018b (Mathworks, MA, ABD)

2.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Metanol (Sigma-Aldrich)
- Ultra saf su (Merck Millipore)
- H_3PO_4 (Sigma Aldrich)
- NaOH (Riedel-de Haen)
- $(NH_4)_2CO_3$ (Merck)
- Potasyum Sorbat
- Sodyum Benzoat
- Kafein
- Vitamin B3 (Niasin)
- Trietilamin (TEA) (Sigma Aldrich)

2.1.4. Ticari Enerji İçecekleri

- Ticari Enerji İçeceği (I) (Burn Gold Spark → BGS)
 - Potasyum sorbat (Miktar belirtilmemiş)
 - Kafein (en fazla 150 mg/L)

İçindeki diğer bileşenler: Şeker, asitliği düzenleyiciler (sitrik asit, sodyum sitrat), karbondioksit, taurin (710 mg/l), renklendirici (karamel), aroma vericiler, inositol (90 mg/l), glukoronolakton (20 mg/l).

- Ticari Enerji İçeceği (II) (AK47 Enerji İçeceği → AK47)
 - Niasin (8,0 mg/100 mL)
 - Potasyum sorbat (Miktar belirtilmemiş)
 - Sodyum Benzoat (Miktar belirtilmemiş)
 - Kafein (En fazla 150 mg/L)

İçindeki diğer bileşenler: Şeker, karbondioksit, asitlik düzenleyiciler (sitrik asit ve trisodyum sitrat), tatlandırıcı (karışık meyve), taurin (800 mg/l), renklendirici (karamel), pantotenik asit (vitamin B5, 2 mg/100 ml), vitamin B6 (2,0 mg/100 ml), riboflavin (vitamin B2, 0,6 mg/l), vitamin B12 (2,0 µg/100 ml), inositol (maksimum 100 mg/l), glukoronolakton (maksimum 20 mg/l),

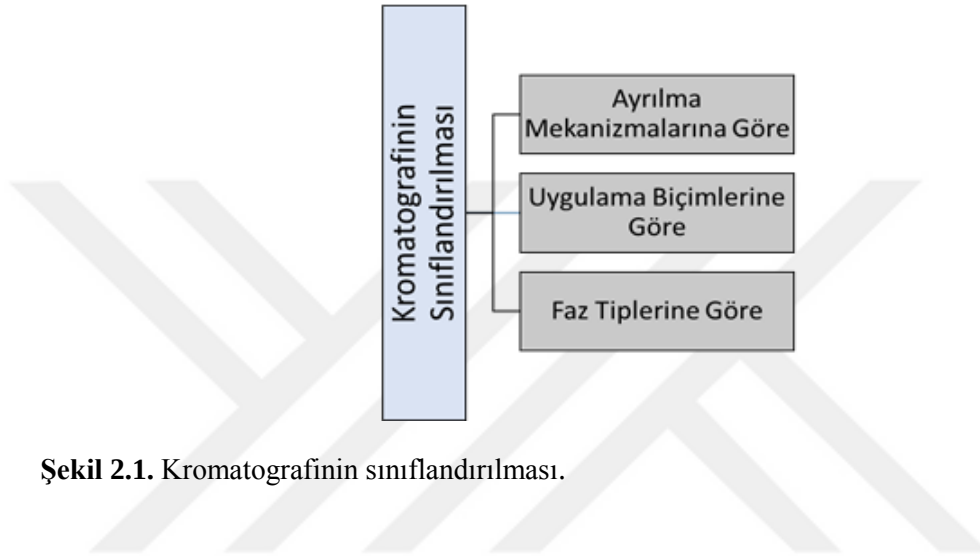
2.2. Yöntem

Bu doktora tez çalışması kapsamında ticari enerji içeceklerindeki bileşenlerin kantitatif analizlerinde UPLC tekniği kullanılmıştır. Analiz işlemleri için UPLC yöntemlerinin geliştirilmesinde kemometrik deneysel tasarım optimizasyon metodolojilerinden faydalanılmıştır. Aşağıda kromatografik yöntemlerin temel esasları açıklanmaktadır.

2.2.1. Kromatografik Yöntemler

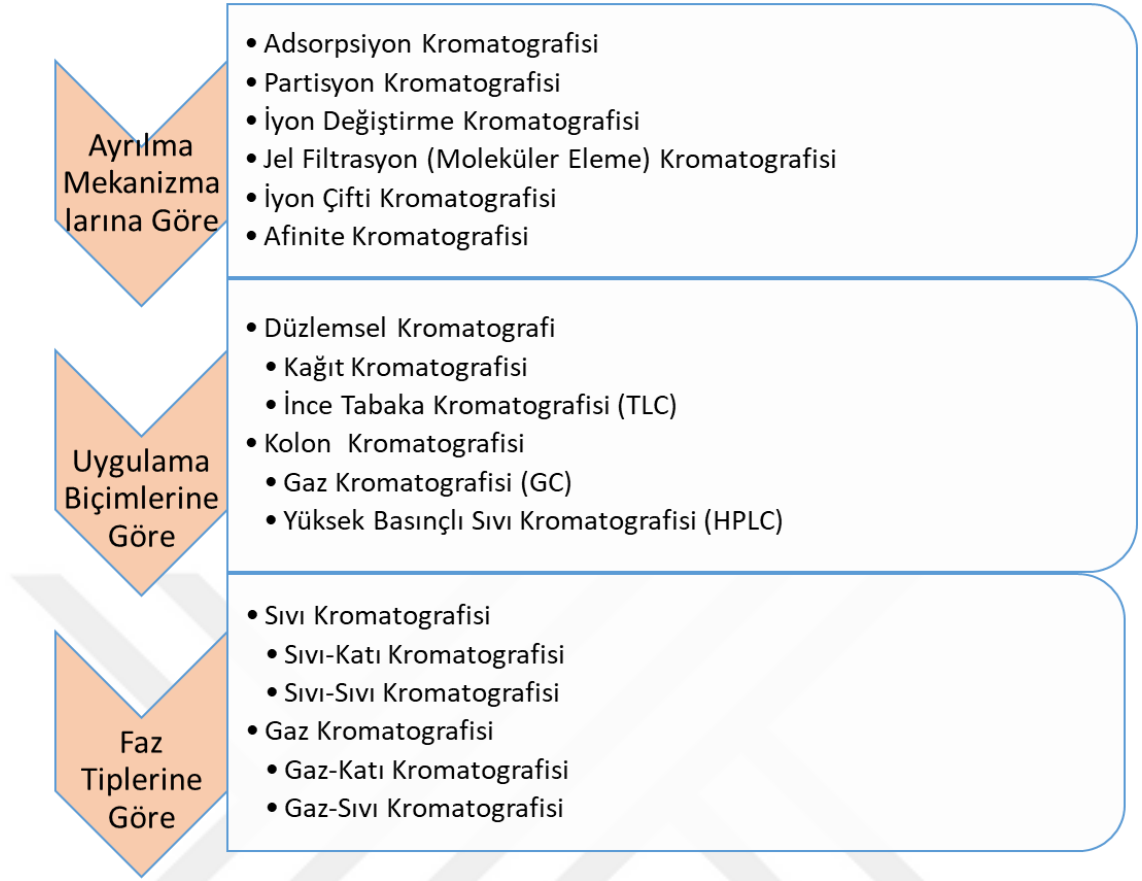
Bir karışımdaki bileşenlerin birbirinden ayrılmasını sağlayan bir ayırma metodu olan kromatografi ilk kez Rus botanikçi, Mikhail Tswett tarafından 1906 yılında bulunmuştur. Kromatografiyi ksantofil ve klorofil gibi pek çok pigmenti ayırmada kullanan Tswett, kromatografiyi tanımlarken “bir karışımdaki bileşenlerin bir akış sistemi yardımıyla, bir adsorban kolon üzerinden ayrıldığı bir yöntem” olarak tanımlamıştır. Tswett bu pigmentlerin ayrılması sırasında kolonda renkli bantlar gözlemlemiş ve bu nedenle de yöntemin adını “kromatografi olarak

belirlemiştir. Kromatografide analizi yapılacak numune hareketli faz içerisinde çözünür ve daha sonra bu hareketli faz, kendisi ile karışmayan sabit bir faz içerisinde (bir kolon veya katı bir yüzey) geçirilir. Numune içerisindeki bileşenler polaritelerine göre sabit fazdan değişik hızlarda geçerler ve bu da numunedeki bileşenlerin ayrılmasını sağlar (Braithwaite ve Smith, 2012, s: 1-4; Skoog ve ark., 2007, s:762). Kromatografi üç sınıf altında ele alınabilir.



Şekil 2.1. Kromatografinin sınıflandırılması.

Bunlar da kendi içinde farklı sınıflara ayrılırlar (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Kromatografik yöntemler.

Ayrılma Mekanizmalarına Göre Kromatografik Yöntemler aşağıda ayrıntılı bir biçimde sunulmaktadır.

İyon Değişim Kromatografisi

İyon değiştirme kromatografisi (IEC), İkinci Dünya Savaşı sırasında (1939-1945) nadir bulunan toprak elementlerini ve transuranyum elementlerini ayırmak için kullanılan bir tekniktir. IEC'nin kullanımı ilk kez 1938'de Taylor ve Urey tarafından zeolit reçineleri kullanılarak lityum ve potasyum izotoplarını ayırmak için kullanılmıştır. İyon değişimi, çözeltideki iyonlar ile çözünmeyen, yüksek mol kütleli bir katının yüzeyindeki benzer işaretli iyonların yer değiştirmesidir. Durgun faz zayıf ya da kuvvetli bir iyon değiştirici reçinedir ve numune moleküllerinin iyonik

gruplarıyla etkileşime giren iyonik grupları (örn. NR_3^+ veya SO_3^-) içerir, hareketli faz ise belli bir pH derecesine sahip, ve yükü sabit fazın yükünün tersi olan zıt iyonu içeren bir sulu çözeltidir. Organik iyon değiştiriciler: katyon değiştirici ve anyon değiştirici reçineler olarak ikiye ayrılır. Sabit yük (+) ise anyon değiştirici, (-) ise katyon değiştirici reçinedir. İyon değişim kromatografisi, farmasötik preparatlar (ilaçlar ve bunların metabolitleri, serumlar, vitamin karışımları), gıdalar (gıda koruyucular, şekerler) gibi farklı yapıdaki organik ve biyokimyasal sistemlere uygulanabilir (Braithwaite ve Smith, 2012; Meyer, 2010, s:203-205; Skoog ve ark., 2007).

Affinite Kromatografisi

Kromatografi tekniklerinin en yenisi olan bu kromatografide, afinite ligandı, katı bir destek yüzeyine kovalent bir biçimde bağlanır. Afinite ligantları, enzim inhibitörleri, antikorlar veya numunedeki analit moleküllerine tersinir bir biçimde bağlanan moleküllerdir. Bu kromatografinin seçiciliği oldukça yüksektir ve hormon, enzim, vb protein yapılı maddelerin saflaştırılmasında kullanılır. Kolonun dolgu maddesine, protein ile kompleks yapabilme özelliğine sahip bir ligand bağlanır, bağlanmayan moleküller ise hareketli faz ile birlikte kolonu terkeder. Sabit faz tarafından alıkonmuş analitler, daha sonra hareketli fazın bileşimi değiştirilerek elüe edilir (Skoog ve ark., 2007).

Adsorpsiyon Kromatografisi

Ayrılacak bileşenlerin sabit katı faz üzerinde tersinir olarak adsorblanmaları esasına dayanır. Adsorpsiyon kromatografisinde hareketli faz, adsorban üzerinde sıvı olarak hareket eder. Bileşenler birbirlerinden katı yüzeye olan ilgilerine göre ayrılırlar. Adsorpsiyon denge sabiti daha büyük olan bileşen yüzeyde daha uzun süre kalırken, küçük olan ise daha kısa sürede kalmakta, hiç adsorplanmayan bileşen ise kolondan hareketli faz ile taşınarak hemen dışarı çıkmaktadır. Yüzeye adsorplanan

bileşenler ise yüzeyle olan etkileşim boyutuna bağlı olarak farklı kalma sürelerinde kolonu terk etmektedir. Adsorpsiyon kromatografisi, polarlıkları birbirinden farklı bileşenlerin karışımlarının ayrılmasında iyi sonuç vermektedir. Adsorpsiyon kromatografide sabit faz olarak genellikle polar yapılı ince öğütülmüş silis ve alumina kullanılır. Genellikle, numune tutma kapasitesi daha yüksek olan silis tercih edilir. Bu iki maddenin adsorpsiyon özellikleri benzerdir. Her iki sabit fazdaki alıkonma süreleri, analitin polarlığı arttıkça artar. Hareketli fazda ise polaritesi çok düşük veya apolar sıvılar (benzene, kloroform, vb) kullanılır.

İyi bir sabit faz; ayrılması gereken maddelerin parçalanmasına neden olmamalı, ayrılması gereken madde ile reaksiyon vermemeli, yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip olmalı ve adsorplanan maddeleri geri verebilmelidir. İyi bir hareketli faz ise düşük viskoziteye sahip olmalı, istenen saflıkta, kolay ulaşılabilir ve ekonomik olmalı, toksik olmamalı, numunedeki bileşenlerin tamamını çözmeli ve sabit fazın özelliklerinin değişmesine neden olmamalıdır (Skoog ve ark., 2007).

Jel Filtrasyon (Boyut Eleme) Kromatografisi

Jel süzme veya jel geçirgenlik kromatografi olarak ta adlandırılan boyut ayırıcı kromatografi, özellikle yüksek mol kütleli türlere uygulanabilen çok etkili tekniktir. Bu teknik, molekülleri boyutlarına göre, yani molekülleri kütlelerine göre ayırır. Önce en büyük moleküller ve en son en küçük moleküllerin ayrılmasını sağlayan bu teknikte küçük boyutlu ($\sim 10 \mu\text{m}$) silis veya polimer tanecikler dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır. Burada sabit faz, polimerlerin hidratize edilmesiyle oluşturulan bir jel, hareketli faz ise bir sıvıdır. Bu dolgular düzgün gözenekli bir yapıya sahiptir. Bu gözenekli yapı çözünen ve çözücü moleküllerinin difüzlenebileceği bir yapıdadır. Moleküller, hareketli fazın akışı sırasında gözenekli yapıda molekül büyüklüğüne bağlı olarak etkin bir biçimde tutulur ve daha sonra bırakılır. Molekülün boyutu ortalama gözenek boyutundan daha büyük ise, bunlar dolgu maddesi tarafından tutulmazlar ve bu moleküller kolondan hareketli faz ile aynı hızda geçtikleri için alıkonma süresinden bahsedilemez. Molekülün boyutu ortalama gözenek boyutundan

daha küçük olduğunda ise, molekül dolgu maddesinin gözeneklerine girerek burada tutunarak uzun süre alıkonurlar. Kolonda gözeneklerde alıkonan moleküllerin alıkonma süresi, molekülün çap boyutuna bağlı olarak değişir. Jel filtrasyon kromatografisinde, ayrılacak olan molekül ile sabit faz arasında fiziksel ve kimyasal etkileşimlerin olmayışı, bu kromatografi tekniğini diğer kromatografik tekniklerden ayıran önemli bir özelliktir. Bu teknik özellikle de proteinleri birbirinden ayırmak için yaygın bir biçimde kullanılmaktadır (Braithwaite ve Smith, 2012; Meyer, 2010, s:231-233; Skoog ve ark., 2007).

Partisyon (Dağılma) Kromatografisi

Dağılma kromatografisinde, sabit faz, hareketli faz ile karışmayan ikinci bir sıvıdır. Sıvı-sıvı kromatografisinde, sabit sıvı fazı yerinde sabitlemek için fiziksel adsorpsiyondan faydalanılır. Bağlı-sıvı-faz kromatografisinde ise, sıvı, tutunduğu yüzeye kimyasal bağlıdır ve bu sayede hareketli fazla çözünmeyen kararlı bir dolgu meydana gelir.

Dağılma kromatografisi, sabit ve hareketli fazların polarlığına bağlı olarak iki farklı biçimde ele alınır; ters faz ve normal faz. Normal faz kromatografisi (NF), sabit fazın hareketli faza göre daha polar olduğu bir kromatografidir. Burada sabit faz olarak genelde silika (SiO_2), alümina (Al_2O_3) ve magnezyum oksit (MgO) kullanılır. Analit, sabit faz ile ne kadar güçlü etkileşirse kolonda o kadar uzun süre tutulur. NF’de hareketli faz olarak ise sabit faza oranla polaritesi daha az (eter gibi) olan ya da apolar (hekzan, heptan gibi) olan solvent sistemleri kullanılır. Bir karışımı oluşturan birbirinden farklı yapıdaki moleküller, polaritelerine bağlı olarak sabit faz üzerinde farklı derecelerde adsorbe edilirler ve bunun sonucu olarak ta her bir maddenin kolonu terk etme süresi de birbirinden farklı olacaktır. NF’de polar bileşikler polar olmayan bileşiklerden daha sonra kolonu terk ederler (Kazakevich ve Lobrutto, 2007, s: 10; Meyer, 2010, s: 173-174). Normal faz kromatografide, düşük polaritedeki bileşenler hareketli faz ile daha fazla çözündükleri için daha önce elüe

edilirler; hareketli fazın polaritesindeki artış, elüsyon süresinin azalmasına neden olur (Skoog ve ark., 2007).

Ters faz kromatografide sabit faz apolar; hareketli faz ise daha polar (su, metanol, asetonitril gibi) bir çözücüdür oluşmaktadır. Ters faz sisteminde, daha polar bileşenler, kolondan daha önce gelir ve hareketli fazın polaritesindeki artış, elüsyon süresinin artmasına neden olur. Ters faz kromatografinin en yaygın kullanıldığı HPLC sistemlerinin yaklaşık dörtte üçünde, ters faz dolgu maddesi ile doldurulmuş kolonlar tercih edilmektedir. Ters faz sistemi çeşitli avantajlara sahiptir. Hareketli faz daha çok su bazlı çözeltilerden oluşur bu nedenle normal faz kromatografisine göre daha fazla tercih edilir (Kazakevich ve Lobrutto, 2007, s: 11; Meyer, 2010, s: 173-174; Skoog ve ark., 2007). Suyun kullanılması oldukça önemlidir, çünkü suyun ucuz olması, toksik olmaması, UV-geçirgenlik ve biyolojik türlere uygunluk sağlaması suya üstünlük sağlamaktadır. Ters fazlı sıvı kromatografisinde dengeye ulaşma hızı normal faz sıvı kromatografisine göre daha hızlıdır, ters fazlı sıvı kromatografisinde maliyeti ve toksisitesi yüksek apolar çözücüler kullanmak gerekmiyor. Yaygın olarak kullanılan kolonlar arasında siloksanın R grubu olan malzemelerle kaplı olan C₈- (n-oktil) ve C₁₈-(n-oktasil zinciridir) kolonlarıdır (Skoog ve ark., 2007). Bu sistemde polar olmayan bileşikler polar bileşiklerden daha sonra kolonu terk ederler.

Dağılma kromatografisinin uygulama alanları; biyokimya, ilaç, endüstriyel kimyasallar, gıda ürünleri, kirleticiler, adli tıp ve klinik kimyadır (Skoog ve ark., 2007).

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (high performance liquid chromatography → HPLC) son yıllarda en çok başvurulmuş ve en hızlı gelişen analitik analiz yöntemidir. HPLC, sabit fazdan oluşan bir kolon sisteminden hareketli fazın geçirilmesiyle analitlerin sabit ve hareketli faza olan ilgilerinin farklılığı ile ayrışmalarına dayanan bir yöntemdir. Tüm kromatografik yöntemlerde olduğu gibi

HPLC’de de kimyasal ayırma, saflaştırma, miktar tayini amaçları için kullanılır. HPLC’ de kullanılan mobil ve sabit fazların polariteleri birbirinden farklıdır. Bu da kolonda numune bileşenlerinin birbirinden ayrılmasını sağlar.

Bir HPLC cihazı şu kısımlardan oluşur;

- Hareketli faz rezervuarı
- Pompa Sistemi
- Numune Enjeksiyon sistemi
- Kolon
- Dedektör

HPLC’de kullanılan başlıca dedektörler şunlardır;

- UV- Görünür ışın absorpsiyon dedektörleri
- Filtreli UV-Absorpsiyon dedektörleri
- Taramalı Absorpsiyon dedektörleri
- Infrared Absorpsiyon dedektörleri
- Floresans dedektörleri
- Kırma İndisi dedektörü
- Buharlaştırmalı ışık saçılım dedektörü
- Elektrokimyasal dedektörler
- Kütle Spektrometrik dedektörler

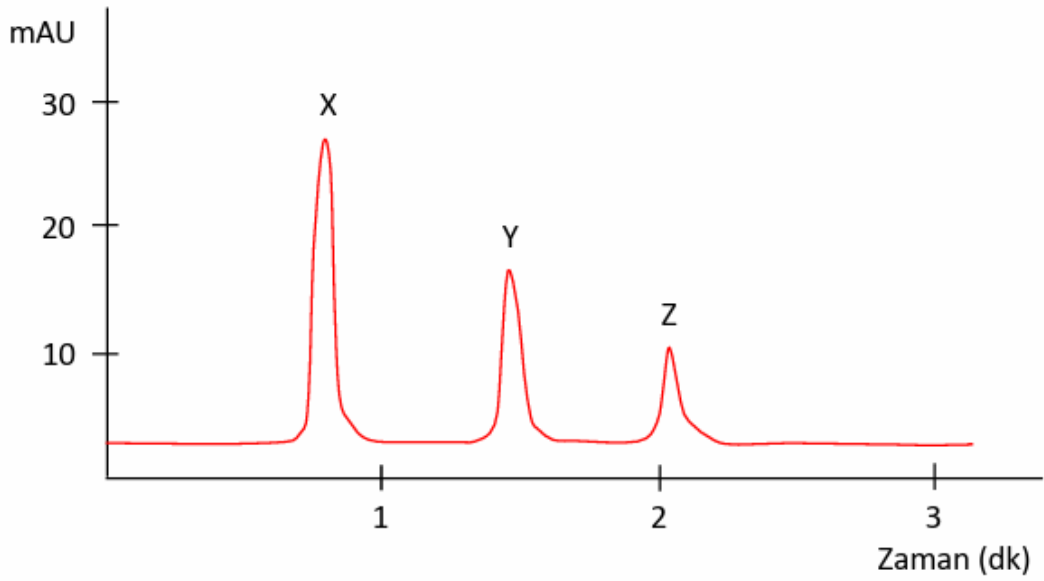
Günümüzde HPLC cihazları geliştirilerek daha da avantajlı hale getirilmiş ve her bakımdan üstün özelliklere sahip olan yeni bir cihazın; aşırı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (ultra high performance liquid chromatography → UPLC) cihazının ortaya çıkmasını sağlamıştır. HPLC ile UPLC’nin çalışma prensipleri temelde aynıdır. UPLC’de, numunenin, aşırı yüksek basınç altında (100M Pa' ya kadar) özel dolgulu kolonlardan (parçacık boyutu 2 µm) geçirilmesiyle, numunede bulunan bileşenlerin birbirlerinden ayrılmasını ve bunların detektörde miktarlarının

tain edilmesini sağlayan gelişmiş bir cihazdır. Tanımdan da anlaşıldığı üzere HPLC ile UPLC arasındaki fark uygulanan basınç ve kolon dolum malzemesidir. UPLC'nin kolon dolum malzemesinin 2 µm büyüklüğünde olması UPLC'de ayırımın HPLC den daha iyi ve hassas olmasını sağlar. UPLC, özetle üç alanda geliştirilmiş olan aşırı yüksek performanslı sıvı kromatografisini ifade eder: "hız, çözünürlük ve duyarlılık. UPLC, HPLC ile kıyaslandığında, daha hızlı, daha hassas sonuçlar verir. UPLC sisteminin sağlamış olduğu diğer avantajlar şu şekildedir:

- Analiz süresi oldukça kısadır
- Sıvı kromatografisi yöntemleri arasında en seçici, en hassas olan yöntemdir
- Kromatogramda çözölmüş pikler elde edilir.
- Sabit faz olarak çok küçük dolgu malzemesi (2 µm) kullanılır ve bu da ayırma gücünün artması nedeniyle avantaj sağlar
- Çözöcülerin tüketimi daha azdır bu nedenle daha ekonomiktir.
- Oldukça fazla maddenin analizine imkân sağlar

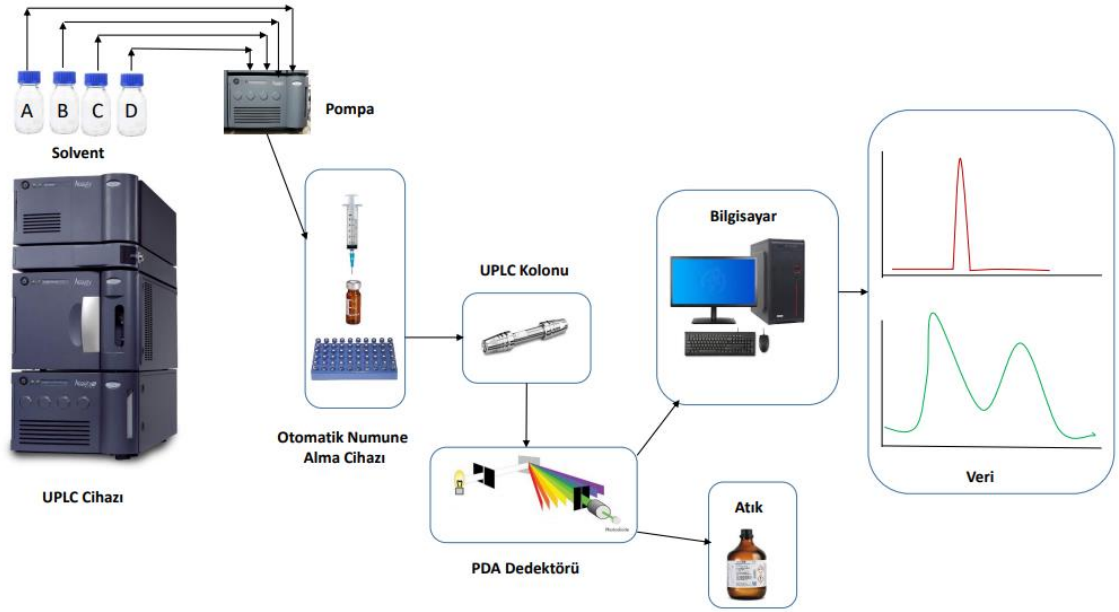
UPLC nin tek dezavantajı, uygulamış olduğu aşırı yüksek basınçtan dolayı kolon ömrünün kısa olmasıdır.

UPLC'de kullanılan hareketli ve sabit fazların polariteleri birbirinden farklıdır. Fazlar arasındaki bu farklılıklara bağlı olarak UPLC sisteminde normal faz veya ters faz kromatografisine başvurulur. UPLC'lerin çoğunda ters faz dolgu maddesi ile doldurulmuş kolonlar kullanılmaktadır (Onur, 2011, s:179; Skoog ve ark., 2007, s:829).



Şekil 2.3. X, Y ve Z bileşiklerinin UPLC ile kromatografik olarak ayrılması.

UPLC özellikle ilaç endüstrisinde oldukça ihtiyaç duyulan bir yöntemdir. UPLC ile daha doğru veriler daha hızlı bir şekilde üretilebilir. UPLC 'nin benzersiz özellikleri, yüksek çözünürlük ve hızlı analizin, adsorpsiyon, dağılım, metabolizma ve boşaltım (ADME) gibi farmakokinetik çalışmalarda da çok yararlı olduğunu göstermektedir. İlaç geliştirme ve formülasyon prosesi için, ilaç maddelerini ve bunların safsızlıklarını saptamak, miktarlarını belirlemek için sıkça başvurulmuş bir yöntemdir (Büker ve Dinç, 2017; Dermiş ve ark., 2015; Dinç ve Baleanu, 2012; Dinç ve Büker, 2012; Dinç ve ark., 2015; Dinç ve Ertekin, 2016; Dinç ve Büker, 2016; Dinç ve Büker, 2019; Dinç ve ark., 2022; Güzel ve ark., 2021; Güzel ve ark., 2022; Rouhani ve ark., 2022; Selimoğlu ve ark., 2016; Taleuzzaman ve ark., 2015; Turak ve ark., 2016; Üstündağ ve Dinç, 2021).



Şekil 2.4. UPLC Cihazının şematik gösterimi.

Kromatografide Kolon Uygunluk Parametreleri

Bir ayırma işleminde ayırma işleminin geçerliliğini sağlayan bir takım parametreler vardır. Bunlar;

- Alıkonma Zamanı
- Kapasite Faktörü
- Seçicilik
- Kolon Verimliliği
- Kolon Ayırma Gücü
- Simetri Faktörü

İyi bir ayırmanın gerçekleşebilmesi için bu parametrelerin sağlanması gerekmektedir. Kolonda numune bileşenleri ayrılırken kromatogramlar elde ederiz. Analiz koşullarının uygun olup olmadığı elde edilen kromatogramlar vasıtasıyla izlenebilmektedir. Kromatografik bir sistemde numunede bulunan bileşenlerin kolona verilmesinden dedektöre ulaşıncaya geçen zamana karşı, dedektör tarafından

verilen sinyalle oluşturulan grafiğe “kromatogram” adı verilmektedir (Skoog ve ark., 2004).

Alıkonma Zamanı

Bir numunenin kolona enjeksiyonundan sonra dedektöre ulaşması için geçen süre “alıkonma zamanı (t_R)” olarak ifade edilir. Numune bileşenlerinin kolona verildikten sonra kolondan geçip dedektöre ulaşması için gerekli olan hareketli faz hacminde “alıkonma hacmi” adı verilmektedir. Alıkonma hacmi;

$$V_R = t_R \cdot F_c \quad (2.1)$$

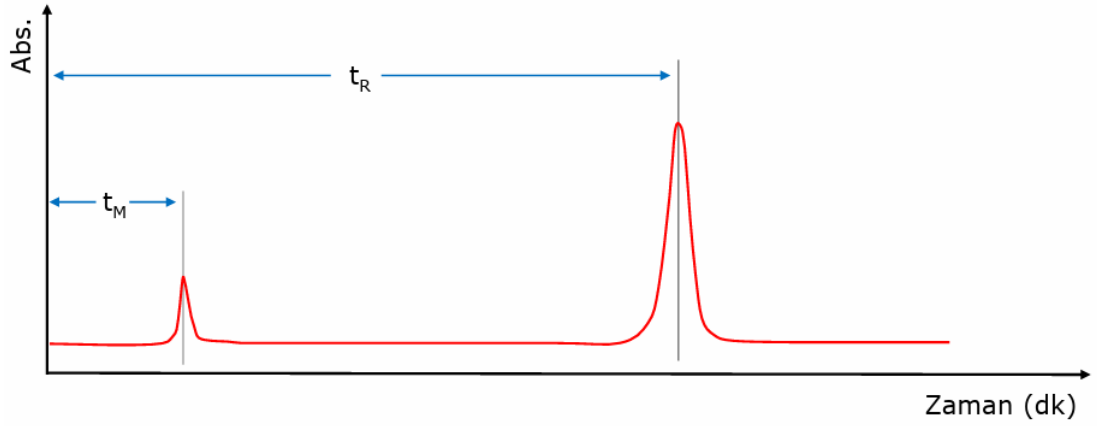
burada alıkonma hacmi V_R , alıkonma zamanı t_R , ve volumetrik akış hızı F_c ile ifade edilmektedir. Bir analitin kolonda alıkonması, numune bileşenlerinin hareketli faz ve sabit faz ile arasındaki etkileşimi gösterir. Bütün kromatografik ayırmaların temelinde, çözünenlerin hareketli ve sabit faz arasındaki dağılma derecesi esas alınmıştır.

$$A (\text{hareketli faz}) = A (\text{sabit faz}) \quad (2.2)$$

Bu reaksiyonun denge sabiti K ya eşittir ve dağılma katsayısı olarak ifade edilmektedir.

$$K = C_S / C_M \quad (2.3)$$

Çözünenin sabit fazdaki molar analitik derişimi C_S ve hareketli fazdaki molar analitik derişimi C_M dir. Kolonda tutunamayan bir maddenin kolondan geçişi için gerekli zaman “ölü zaman (t_M)” olarak ifade edilir ve bunun kolonda ilerleme hızı hareketli faz moleküllerinin detektöre ulaşması için gereken süre ile aynıdır (Skoog ve ark., 2004).



Şekil 2.5. İki bileşenli bir numuneye ait kromatogram.

Alıkonma/Kapasite Faktörü (k')

Bir numunenin enjeksiyonundan dedektöre ulaşması için gereken zamana “alıkonma zamanı (t_R)” denir. Kolonun performansını gösteren parametrelerden biri olan alıkonma (kapasite) faktörü ise kolonda çözünen analitlerin kolondan göç etme hızlarını açıklamak için kullanılır. Kapasite faktörü;

$$k' = (t_R - t_M) / t_M \quad (2.4)$$

eşitliği ile ifade edilir. Burada k' kapasite faktörünü, t_M ölü zamanı, t_R ise analitin alıkonma süresini ifade etmektedir. $k' < 1$ ise elüsyon alıkonma süresinin tayinini zorlaştıracak kadar kısa olur, k' değeri 20-30 gibi bir sayıdan daha büyük ise elüsyon süresi çok uzun olur. İyi bir ayırma için alıkonma faktörünün 1-10 arasında olması beklenir. Kapasite faktörü her maddenin kendine özgüdür.

Kapasite faktörü maddenin fazları arasındaki (hareketli ve sabit faz) dağılım katsayısına bağlıdır.

$$k' = K V_s / V_m \quad (2.5)$$

Bu eşitlikte K dağılma katsayısını, V_M kolon içerisindeki hareketli fazın hacmini, V_S ise sabit fazın hacmini ifade eder (Onur, 2011, s:188; Skoog ve ark., 2004).

Seçicilik

Bir kromatografik sistemde, karmaşık yapıları bir numunedeki analitlerin iyi bir biçimde ayrılabilmesi kromatografinin öncelikli hedefleri arasındadır. Bunun sağlanabilmesi için uygulanabilecek işlemlerden biri de seçiciliği arttırmaktır. Kromatografik sistemin farklı analitleri ayırt etme yeteneğine seçicilik (α) denir. Seçicilik, iki analitin alıkonma faktörlerinin oranı olarak ifade edilmektedir. Kolon seçiciliği (α) bağlı alıkonma olarak da bilinmektedir. A ve B gibi iki farklı tür için bir kolonun seçicilik faktörü (α);

$$\alpha = k_B' / k_A' \quad (2.6)$$

k_B' kolonda daha kuvvetli tutulan analitin kapasite faktörünü, k_A' ise kolondan hızlı bir biçimde ayrılan analitin kapasite faktörünü göstermektedir. Bu nedenle, α daima 1 den büyüktür. k' değerleri t_R ve t_M cinsinden yeniden ele alınırsa aşağıdaki denklem elde edilir;

$$\alpha = [(t_R)_B - t_M] / [(t_A)_1 - t_M] \quad (2.7)$$

α değeri 1'e yaklaştıkça ayırım o derece güçleşir. α daha çok bileşiklerin tanınmasında kullanılır. Seçicilik analitlerin doğasına ve sabit faz yüzeyi ile etkileşimlerine bağlıdır. Bir ayırma için seçicilikte bir değişiklik yapmak gerekiyorsa, en iyi çözüm sabit fazın tipinin değiştirilmesidir (Kazakevich ve Lobrutto, 2007, s: 18; Onur, 2011, s:187-188; Skoog ve ark., 2004, s:927).

Kolon Verimliliği

Kromatografik kolon verimliliği genel olarak iki terim ile ifade edilmektedir: Teorik tabaka sayısı (N) ve tabaka yüksekliği (H). Bu iki terim arasındaki ilişki;

$$H = L / N \quad (2.8)$$

L burada kolon uzunluğunu (cm) ifade etmektedir.

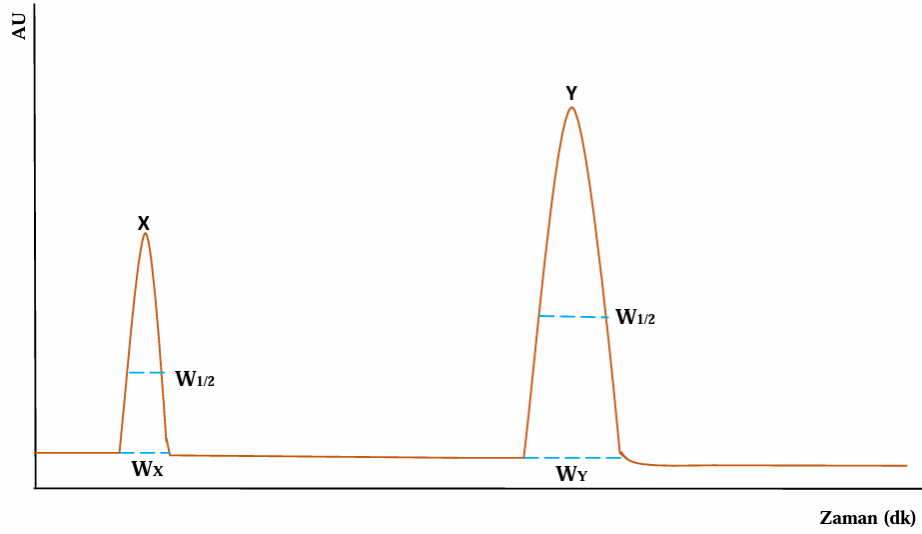
Teorik tabaka, ayırımın gerçekleştiği en küçük tabakadır ve sayısı ne kadar fazla olursa ayırım o kadar iyi gerçekleşir. Bu nedenle kromatografik kolonun verimliliği tabaka sayısının artması ile artar. Her tabakanın bir yüksekliği vardır (etkin teorik tabakanın yüksekliği) ve bir analit bu tabakada belirli bir süre geçirmektedir. Bu süre dengeye ulaşmak için yeterli kabul edilir. Tabaka yüksekliği ne kadar az olursa iki faz arasındaki analit değişimi o kadar verimli olur ve ayırma o kadar iyi gerçekleşir. Bir kromatografi kolonunun verimli olup olmadığını, elde edilen kromatografi piklerinin keskinliğinden anlamak mümkündür; İdeal pik şekli keskin, iki tarafı simetrik ve dar olmalıdır.

$$N = 16 (t_R / W)^2 \quad (2.9)$$

Burada t_R alıkonma zamanını, W ise pikin taban genişliğini ifade etmektedir. Kolon etkinliği aynı zamanda kolon cinsi ve boyutuna, hareketli fazın bileşimine ve hareketli fazın akış hızına bağlıdır. Pik genişliğinin ölçülmesinde yarı yükseklikteki pik genişliği de ($W_{1/2}$) kullanılabilir. Bu durumda teorik tabaka sayısını hesaplamak için;

$$N = 5,54 (t_R / W_{1/2})^2 \quad (2.10)$$

formülü kullanılabilir. (Kazakevich ve Lobrutto, 2007, s: 19; Onur, 2011, s: 186-187; Skoog ve ark., 2004, s:927-931)



Şekil 2.6. X ve Y maddelerine ait pikleri gösteren kromatogram.

Kolon Ayırma Gücü (R_s)

Kolon ayırma gücü (rezolüsyon, R_s), kolonun iki analiti birbirinden ayırabilmesinin bir ölçüsüdür. Pikler arasındaki mesafe, kromatografik sistemin seçiciliğini yansıtır. Mesafe ne kadar büyük olursa, seçicilik o kadar yüksek olur. Rezolüsyon iki bant arasındaki uzaklığın, bant genişliği cinsinden değeridir. Ayırma gücü aşağıdaki gibi hesaplanır.

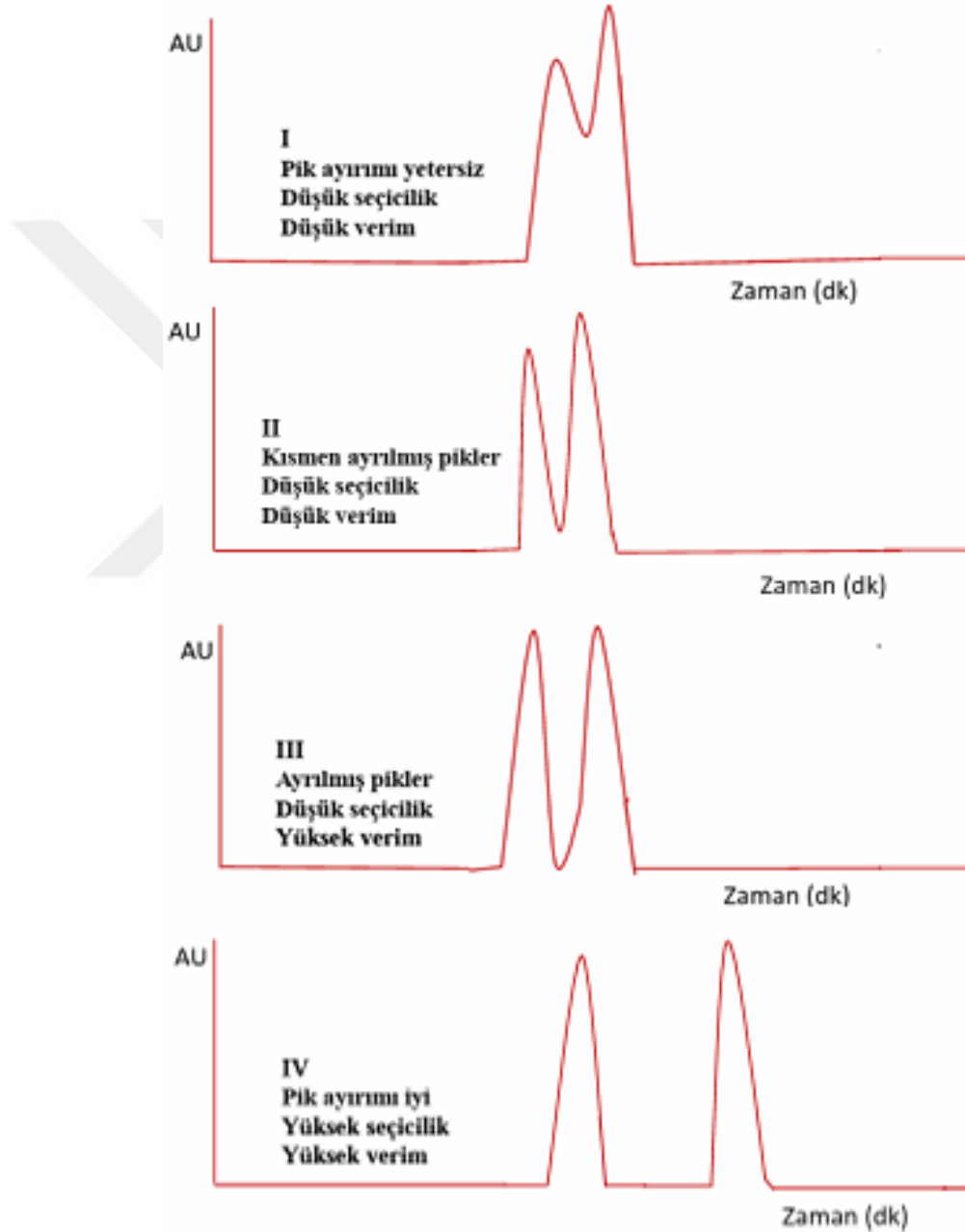
$$R_s = 2[(t_R)_B - (t_R)_A] / W_A + W_B \quad (2.11)$$

Burada W pik genişliğini, $(t_R)_A$ ve $(t_R)_B$ sırasıyla A ve B maddelerinin kolonda alıkonma sürelerini ifade eder. $R_s = 1,5$ olması durumunda iki pik birbirinden tamamen ayrılmış sayılır. Kantitatif analizler için pikler R_s değerinin 1,5'den büyük ($R_s \geq 1,5$) olması önerilir.

Aşağıdaki eşitliğe göre kolon ayırma gücünü etkileyen faktörler; kapasite faktörü (k'), seçicilik (α) ve tabaka sayısıdır (N).

$$R_s = (1/4) [(\alpha-1) / \alpha] [k' / (k'+1)] N^{1/2} \quad (2.12)$$

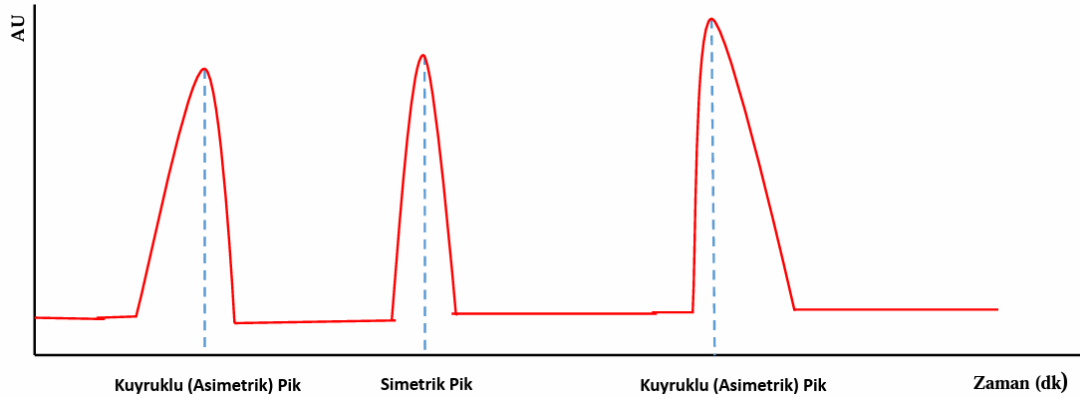
Eşitlik göstermektedir ki seçiciliğin 1'e eşit olması termodinamik olarak iki madde arasında bir fark olmadığı anlamına gelir ve bu durumda ayırım gerçekleşemez. İyi bir ayırım için seçiciliğin 1'den büyük olması gerekmektedir (Kazakevich ve Lobrutto, 2007, s:22-23; Onur, 2011, s:188-189; Skoog ve ark., 2004, s:936-942).



Şekil 2.7. Piklerin ayrılmasını gösteren kromatogramlar.

Pik Simetri Faktörü

Simetri faktörü, pik omuzlanması veya kuyruklanmasını ifade etmektedir. Bir kromatografik analizde, bazı durumlarda pikin Gauss formunun simetrik olmadığı, pikin önünde veya arkasında bir yayılmanın (kuyruk) olduğu görülmektedir. Bu durum, kromatografik sistemin analiz için uygun bir sistem olmadığına göstergesidir. Bunun bir takım nedenleri olabilir. Bu nedenler; analiz şartlarının uygun olmaması, kolon yapısının bozulmuş olması, ekstra kolon hacimleri, kolona aşırı derecede yüklenilmesi, piklerin kolondan geç gelmesi gibi nedenler olabilir. Pik kuyruklanması, kolon plaka sayısını azaltarak kolonun çözünürlüğünü bozar, pikin alıkonma süresinin tekrar edilebilirliğini zorlaştırır ve doğrusallıktan saparak analiz sonuçlarının hatalı çıkmasına neden olur. Bu nedenle çalışmalarda simetrik pikler tercih edilmelidir ve kuyruklu pikler varsa nedenleri ortadan kaldırılarak pikler simetrik hale getirilmelidir (Meyer, 2010, s: 142; Onur, 2011, s:189-190).



Şekil 2.8. Pik simetrisini gösteren kromatogram.

2.2.2. Kemometri

Kemometri, kimya ve ilgili disiplinlerde kompleks yapıli sistemlerin çözümü için matematiksel ve istatistiksel yöntemlerin bir arada kullanıldığı yeni bir disiplindir. Gıda endüstrisinde üreticiler, rekabette üstünlük kazanmak amacıyla ürün içeriklerini zenginleştirerek bunları daha fonksiyonel hale getirmişlerdir. Bunun

neticesinde ürün sayısı ve çeşidi gün geçtikçe katlanarak artmış ve ürünler daha kompleks yapıya hale gelmiştir. Ürünlerin kompleks yapıda olmaları, klasik analiz yöntemlerinin analitik sorunların çözümünde yetersiz kalması analizcileri, tüm bu problemlerin çözümü için yeni, pratik, güvenilir, zaman açısından avantajlı ve daha kesin sonuçlar veren yeni analiz yöntemleri geliştirmeye zorlamıştır. Araştırmacılar bu amaçla, kompleks yapılu numune analizlerinde, kısa sürede maksimum bilgiyi veren ve kimyasal verilerden istenen bilginin ekstraksiyonunu sağlayan kemometrik yöntemlere yönelmişlerdir. Analitik kimyada kemometriden sadece deneysel verilerin işlenmesinde değil, aynı zamanda uygun deneysel şartların belirlenmesinde de yararlanılmaktadır. Bunun için ise kemometrik deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojilerine sıklıkla başvurulmaktadır.

Matematiksel ve istatistiksel yöntemler üzerine kurulu olan kemometri disiplini, bilgi ve sistem kuramı, tanımlayıcı ve açıklayıcı istatistik, resim işleme, deneysel tasarım, optimizasyon, sinyal işleme, modelleme, yapı tanıma, kalibrasyon, yapay akıl yöntemleri, sınıflandırma gibi konuları kapsamaktadır. Kemometride sinyallerin işlenmesi amacıyla fourier ve dalgacık dönüşümü yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler ile sinyaller fourier ve dalgacık dönüşümü yöntemleri vasıtasıyla, düzleştirme, filtreleme şeklinde ya da türev veya integrasyonu alınarak işlenmektedir.

Kemometrik yöntemler sıklıkla analitik kimyada kullanılıyor olsa da fizikokimya, organik kimya, çevre kimyası, adli tıp, gıda kimyası gibi pek çok alan tarafından da kullanılmaktadır. Kemometri kompleks hesaplamalar içerdiğinden, kemometriyi kullananların belli bir ölçüde matematik ve istatistik bilgisine sahip olması gerekmektedir. Kimyasal analizlerde veri sayısı oldukça fazla olduğundan bu hesaplamalar için genellikle Excel ve Matlab programlarından yararlanılmaktadır.

Kemometrik çalışmalarda, kompleks numune analizlerinde genellikle kısmi en küçük kareler (partial least-squares → PLS), klasik en küçük kareler (classical least-squares → CLS), temel bileşen regresyon (principal component regression → PCR) ve

ters en küçük kareler (inverse least-squares → ILS) gibi çok değişkenli kalibrasyon yöntemlerinden de yararlanılmaktadır.

Kemometride temel amaç, önemli sistem uygunluk parametreleri dahilinde kusurları tespit etmek ve sağlam 'tasarım alanı' oluşturmaktır. Sağlam tasarım uzayının burada istenen durumu tipik tek değişkenli veya her seferinde bir faktörü değiştiren yaklaşımlardan ziyade mantıksal çok değişkenli deneylere dayanmaktadır. Kemometrinin geleneksel yaklaşımlara oranla, kritik değişkenlerin daha anlaşılır olması ve kontrol edilebilmesi, değişik matrislerde numunelerin analizinde esneklik sağlaması, üretim düzeyine sorunsuz yöntem aktarımı, geliştirilmiş yöntem sağlamlığı nedeniyle değişkenliğin azaltılması gibi pek çok avantajı bulunmaktadır (Dinç, 2007).

Deneysel Tasarım ve Optimizasyon Metodolojisi

Bir kimyasal analizde öncelikli amaç; minimum çaba ile en kısa sürede ve eldeki mevcut kaynakları verimli bir biçimde kullanarak en doğru ve kesin sonuçlara ulaşmaktır. Bir kromatografik analize uygulanan deneysel tasarımlar, matematiksel modeller vasıtasıyla deney şartlarının optimizasyonu ve yüksek ekstraksiyon veriminin yanı sıra kromatografik ayırma performansının iyileştirilmesi için de sıklıkla kullanılmaktadır. İdeal olarak, birkaç faktörün bir süreç üzerinde eşzamanlı etkisi vardır. Deneysel bir tasarımda, analiz üzerine etki eden bir veya daha fazla faktör önceden belirlenir ve bu faktörler kombine edilerek optimizasyon yapılır. Böylelikle, her bir faktörün analiz üzerine etkileri araştırılır. Burada bağımlı (y) ve bağımsız (x) değişkenlerden yararlanılır ve bu değişkenler arasındaki ilişki düzeyi belirlenir.

$$y = f(x_i) \quad (2.13)$$

Önemli faktörlerin tanımlanması ve optimizasyonu, daha az deneysel deneme ile yetkin bir sonuca ulaşılmasını sağlar. Bir analizde, analize uygun deneysel

tasarımların belirlenmesi için öncelikli olarak deneysel uzayın belirlenmesi ve ardından ele alınan değişkenlerin matematiksel modellemesinin yapılması gerekmektedir. Deneysel tasarımlar, başta analitik kimya olmak üzere birçok disiplin ve endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır.

Bir kromatografik çalışmada, numune bileşiminde yer alan analitlerin arzu edilen kromatografik ayrımlarını elde etmek için çok sayıda değişken aynı anda kontrol edilebildiğinden, kemometrik yaklaşımlar aşırı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi çalışmalarında da önemli tamamlayıcılar olarak görülmektedir. Deneysel tasarımın verimli bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için dört aşamada ele alınması gerekir;

- (i) uygun tasarımın seçilmesi,
- (ii) uygun yazılım,
- (iii) deneysel denemeler, veri analizi ve
- (iv) yorumlama.

Bir deneyin amaçlarına bağlı olarak, tüm tasarımlar iki geniş kategoride sınıflandırılabilir: Tarama Tasarımları, Cevap Yüzey Tasarımları (optimizasyon tasarımı). Bununla bir birlikte bir analizcinin karşılaşılabileceği her duruma uygun bir deneysel tasarım modeli bulunmaktadır. Tam faktöriyel tasarım, merkezi bileşenli tasarım, Box-Behnken tasarımı sıklıkla başvurulmuş deneysel tasarımlar arasında yer almaktadır (Bıyık, 2017; Sahu ve ark., 2018).

Özetle, deneysel tasarım, problemlerin sistematik bir şekilde çözülmesi ve bilgi açısından zengin sonuçlar elde edilmesi yaklaşımıdır ve bu tasarımlar bir kimyasal analizde karşılaşılabilecek problemleri çözme yeteneğine sahip güçlü tasarımlar olmaları nedeniyle araştırmacılar tarafından sıklıkla kullanılmaktadırlar (Dinç ve ark., 2007; Dinç ve ark., 2015; Akyüz ve ark., 2016; Büker ve Dinç, 2017; Rouhani ve ark., 2017; Dinç ve ark., 2020a).

Tarama Tasarımları

Bazı durumlarda, kimyasal analizlerde çok sayıda faktör deneyi etkilemektedir ve bu faktörlerin tamamının taranması mümkün olmamaktadır. Bu gibi durumlarda deney üzerinde önemli bir etkisi olmayan bazı faktörlerin atılması gerekmektedir. Bir analizde en etkili faktörlerin taranması, deneysel tasarımın birincil amacıdır. Bu tasarımlar, en önemli faktörleri ve bunların tüm faktörlerle olan etkileşimlerinin ve analiz üzerinde etkili olan faktörlerin analizi ne şekilde etkilediğinin tam olarak belirlenmesi amacıyla kullanılırlar. Bunlar kalitatif ve kantitatif faktörleri aynı anda incelemek için çok faydalıdır. Tarama tasarımı için, Tam Faktöriyel tasarımı (FFD), Kesirli Faktöriyel tasarımı (FrFD) ve Plackett-Burman tasarımının (PBD) sıklıkla kullanıldığı görülmektedir. Bu tür iki seviyeli tasarımlar, daha az deneyle çok sayıda faktörün taranmasına imkan verir. Varyans analizi (ANOVA) veya regresyon analizi, incelenen faktörlerin belirli bir yanıt üzerindeki etkisinin hesaplanması için temel olabilir. Ayırma tekniklerinin, formülasyonların, ürünlerin veya kalite kontrol süreçlerinin ve sağlamlık testinin iyileştirilmesi için sıklıkla uygulanırlar (Sahu ve ark. 2018).

Optimizasyon Tasarımı

Optimizasyon, bir analizin optimal koşulunu ayarlamaya yarayan ek bir kemometrik yaklaşım uygulamasıdır. Bu tür yaklaşımlar genellikle deney üzerinde etkili olan potansiyel faktörleri seçmek için bir tarama tasarımından önce gelir. Cevap yüzeyi tasarımları iki tiptir: simetrik tasarımlar ve asimetrik tasarımlar. Üç seviyeli tam faktörlü tasarım (Full factorial design → FFD), Merkezi bileşik tasarım (Central composite design → CCD), Box-Behnken tasarımı (Box-Behnken design → BBD) ve Taguchi tasarımı (Taguchi design → TD) ve Doehlert tasarımları, deneysel hatayı tahmin etmek için bir merkez noktası olan simetrik bir alanı kapsar. D-optimal tasarım gibi tasarımlar ise asimetrik tasarımlardır. Bu doktora tez çalışması kapsamında ticari enerji içeceği (I) ve ticeri enerji içeceği (II) numunelerinde var olan ve dedeksiyon sınırları dahilinde yer alan bileşiklerin analizi

için deneysel tasarım ve optimizasyon (EDO) metodolojisinden yararlanılmıştır ve optimizasyon işlemi tam faktöriyel tasarım ile gerçekleştirilmiştir.

Karışım tasarımları, yalnızca karışım değişkenlerini incelemek, yani karışımların bileşimini optimize etmek için uygulanır. ANOVA, sinyal-gürültü oranı ve aralık analizi, cevap yüzeyi tasarımları için istatistiksel analiz yöntemlerinin temelini oluşturur. Aralık analizi, her bir faktörün etkisini bulmak ve farklı faktörlerin optimal seviyesini belirlemek için kullanılır. Bir faktör için ortalama aralığı, tüm seviyelerin maksimum ve minimum değerlerinin farkının ortalamasıdır. Bir sistem için, en geniş aralığa sahip faktör, performans üzerinde en güçlü etkiye sahip olan faktördür.

Regresyon analizi, bir regresyon fonksiyonu aracılığıyla değişkenler arasındaki ilişkilerin tahmin edilmesini sağlar.

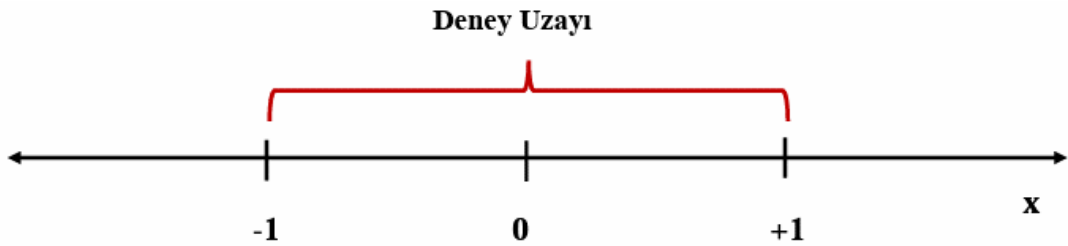
HPLC, geniş uygulama yelpazesine sahip çok yönlü bir ayırma tekniğidir. Çeşitli değişkenler tarafından yönlendirilen HPLC yöntemi ile analitik ölçümler sırasında büyük miktarda veri elde edilir. HPLC yöntemlerinin optimizasyonu oldukça karmaşıktır; arzu edilen ayrımların elde edilmesinde çeşitli değişkenler (mobil fazın pH'sı, tampon çözeltinin konsantrasyonu, akış hızı, kolon sıcaklığı, vb.) kontrol altında tutulmalıdır.

Kemometrik optimizasyon metodolojileri, araştırmacıların analizlerde kritik yanıtları etkileme eğiliminde olan parametreleri anlamalarına imkan verir ve deneydeki karmaşıklığı azaltır. Cevap yüzey metodolojisi (Response surface methodology → RSM) bazlı kemometrik tasarımlar, önemli değişken-yanıt ilişkilerini kapsayan analitik yöntemlerin geliştirilmesinde etkilidir. Deneysel tasarımlarda, deney üzerine etki eden faktörler için üç farklı seviye belirlenir; yüksek (+1), orta (0) ve düşük (-1) ve bu seviyelerde belirlenen deneysel şartlar kullanılarak çalışmalar yapılır ve analizin yanıt haritası elde edilir. Üç boyutlu (3D) cevap yüzey çizimlerinin kullanılması, bağımsız değişkenlerin katkısını göstererek sistemin davranışını anlamaya olanak tanır.

Kemometrik tekniklerin kullanılması, deney sayısında azalma, daha düşük reaktif tüketimi ve daha az laboratuvar çalışması gibi pek çok avantajlar sağlar. Yöntemin optimizasyonu sırasında, her seferinde bir faktör değiştirilirken diğerleri sabit tutulur. Tek bir kromatografik koşul ile HPLC analizini etkileyen tüm faktörlerle ilgili yeterli bilgiye ulaşılamaz. Bu nedenle, çok sayıda değişkenin dikkatli bir şekilde tanımlanması, araştırılması ve kontrol edilmesi gerekmektedir.

Deneyel Uzak Kavramı

Bir araştırmada analizci deneyi ölçen ve cevap olarak adlandırılan bir nicel veri (büyüklük) ile ilgilenir. Deneyel çalışmada elde edilen bu cevaplar, deneyel tasarım ve optimizasyon modelinde “faktör” olarak nitelendirilen bir çok değişkene bağılıdır. Bir kimyasal deneyde, sıcaklık, pH, zaman gibi kavramlar da birer faktör olabilirler. Deneyel tasarım işlemlerinde ilk aşama bir takım ödeneylerle deneyel faktörlerin belirlenmesidir. Daha sonra yine bu aşamada deneyel faktörlerle birlikte her bir faktörün seviyeleri de belirlenir ve en düşük seviye (-1) ile yüksek seviye (+1) arasında arasındaki değerleri kapsayan bir deneyel uzak tasarlanır. Bir faktöre ait seviyeler Şekil 2.9’da bir eksen üzerinde gösterilmiştir.

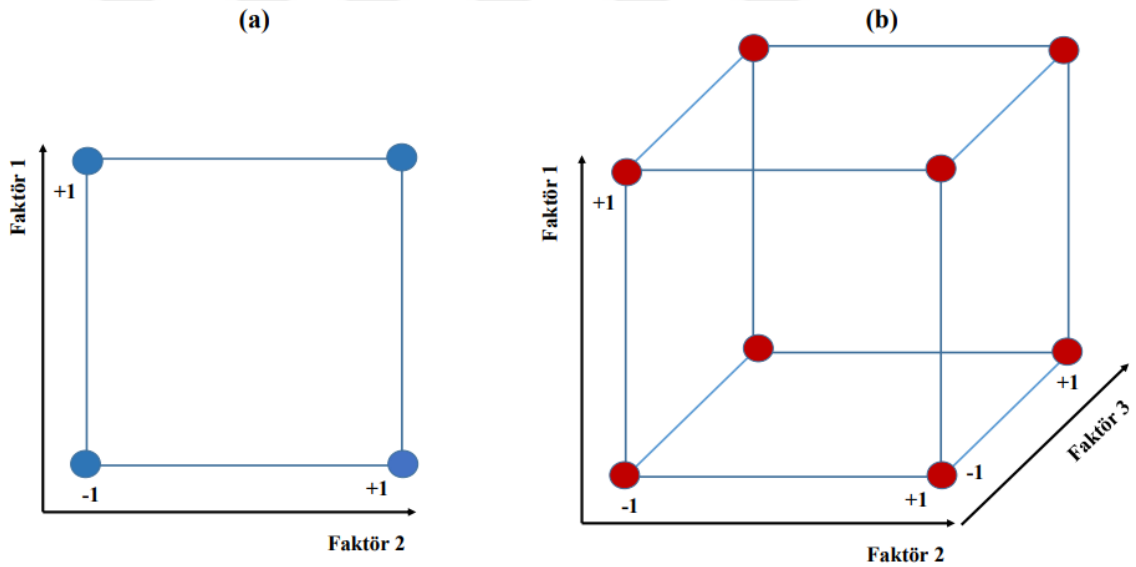


Şekil 2.9. Bir deneyde bir faktöre ait seviyelerin eksen üzerinde gösterimi.

Bir deneyde faktör sayısı arttıkça deney uzayının boyutu da artar. Örneğin, eğer çalışmada deneyi etkileyen iki faktör varsa deney uzayı iki boyutlu, üç faktör varsa da deney uzayı üç boyutlu bir hale gelir. Tüm bu faktörlerin her biri için de ayrı ayrı deney seviyeleri oluşturularak bir deneyel uzak tasarlanır. Deney uzayını

oluşturan faktörler ve bu faktörlere ait seviyeleri gösteren diagram Şekil 2.10(a-b)'de gösterilmiştir.

Deney uzayının doğru bir biçimde belirlenmesi oldukça önemlidir. Analizci bu noktada hem çok dikkatli hem de tecrübeli olmak zorundadır. Deneysel uzayın sınırlarının çok geniş olması gereksiz pek çok deneyin yapılmasına, gereksiz yere efor sarfedilmesine ve deney maliyetlerinin artmasına neden olmakla kalmaz aynı zamanda doğru deneysel optimal şartların belirlenmesini de zorlaştırır. Sınırların dar tutulması ise, deneysel şartların dar bir alanla sınırlandırılmasına ve optimum çalışma alanının bu sınırlar dışında kalmasına neden olabilir (Bıyık, 2017; Ertekin Özkan, 2021; Sahu ve ark., 2018).



Şekil 2.10. Deneysel tasarımın şematik gösterimi a) 2 faktörlü ve 2 seviyeli (2^2) ve b) 3 faktörlü ve 2 seviyeli (2^3).

Cevap Yüzeyi Metodolojisi

Cevap yüzey metodolojisi (Response surface methodology → RMS) deneylerin istatistiksel tasarımında önemli bir konudur. Bir deneyde, bazı x bağımsız değişkenleri gözlemlenebilir cevap değişkenlerine (y) dönüşümlerle deney yoluyla yararlı sonuçlar sağlayabilir. RMS, ilgilenilen bir yanıtın çeşitli değişkenlerden

etkilendiği ve amacın bu yanıtı optimize etmek olduğu problemlerin modellenmesi ve analizi için yararlı matematiksel ve istatistiksel tekniklerdir. İşlemler belirli bir değer aralığında olduğunda, yanıt değişkenini (y) geliştirmek, iyileştirmek ve optimize etmek için cevap yüzeyi metodolojisi kullanılır. Optimizasyon çalışmalarında cevap yüzey metodolojisi çeşitli basamaklar çerçevesinde uygulanır. Bunlar, faktörlerin seçimi, faktör seviyelerinin belirlenmesi, uygun deney tasarımının seçimi, deneylerin yapılması, modelleme ve son olarak optimal şartların bir takım istatistiksel ve matematiksel uygulamalarla hesaplanarak bulunması.

RMS aynı zamanda aşağıdaki denklemde de ifade edilir

$$y = f(X_1, X_2, \dots, X_n) + e \quad (2.14)$$

Burada, X_1 , X_2 ve X_n bağımsız değişkenleri, y ise bağımlı değişken olan yanıt temsil etmektedir. Burada y , X_1 , X_2 ve X_n 'nin ve e olarak gösterilen deneysel hata teriminin bir fonksiyonudur. Hata terimi e , cevaptaki herhangi bir ölçüm hatasını ifade eder.

Cevap yüzey tasarımları için istatistiksel bir analiz yöntemi olan varyans analizi (analysis of variance → ANOVA) kullanılmaktadır. ANOVA'da, veriler bir F-testi ile analiz edilirler ve her faktörün F değeri, her faktör için varyansın deneysel hatasının oranını ifade eder. Her bir faktörün yüzde katkısı, o faktörden kaynaklanan karesel sapma toplamının toplam karesel sapma içindeki yüzdesidir. Faktörün etkisini yansıtır (Sahu ve ark. 2018).

Kimyasal analizlerde cevap yüzey metodoloji sağlamış olduğu avantajlar nedeniyle özellikle de analitik kimyacılar tarafından sıklıkla kullanılmaktadır. Bu avantajlardan bazıları; analitik cevap üzerine etki eden faktörlerin etkileşiminin göz ardı edilme riski azalır, uzman kişilere olan bağımlılık ortadan kalkar çünkü burada deney üzerine etki eden faktörlerin özellikleri iyi bilinmese de istenen optimal

cevaplara ulaşabilmek mümkündür ve en önemlisi de minimum deney ile maksimum bilgilere ulaşma imkanı sağlar (Ertekin Özkan, 2021).

Modelleme

Bir deneyde analiz koşulları değiştirildikçe, analiz sonucunda elde edilen cevapta değişecektir. Analiz koşullarındaki bu değişimin analizi nasıl ve ne boyutta etkileyebileceğini tahmin etmek için analizdeki bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkinin iyi bilinmesi gerekmektedir. Model, deneysel faktörler ve cevap arasındaki matematiksel ilişkinin boyutuna verilen addır, modelleme ise bu ilişkinin kurulmasıdır. Modelleme yapılırken çoğu zaman analizcinin tecrübesi yeterli gelmeyebilir ve bu da analizciyi yanlış sonuçlara götürebilir. Bu nedenle deneysel hatanın önüne geçilmesi için matematiksel bir modelin oluşturulması şarttır. Bunun için öncelikle deneysel faktörlerin doğru kodlanmış olması gerekmektedir.

Cevap, bağımsız değişkenlerin lineer bir fonksiyonudur. Deneye etki eden faktör sayısının artması oluşturulacak olan modeli etkileyecektir. İki faktörlü bir çalışmada, birinci dereceden bir model şu şekilde ifade edilebilir:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \varepsilon \quad (2.16)$$

Cevap yüzeyinde eğrilik varsa daha yüksek dereceli bir polinom kullanılmalıdır. İki değişkenli yaklaşık fonksiyona “ikinci dereceden model” denir.

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \varepsilon \quad (2.17)$$

Üç değişkenli bir fonksiyonda ise aşağıdaki denklem elde edilir.

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3$$

(2.18)

Denklem 2.17 ve denklem 2.18’de, X_1 , X_2 ve X_3 faktörleri, y cevabı, β_0 çalışma bölgesinin merkezinden elde edilen cevabı, β_1 faktör 1’in temel etkisini, β_2 faktör 2’in temel etkisini, β_3 faktör 3’ün temel etkisini β_{12} , β_{12} ve β_{12} etkileşim parametrelerini, β_{11} , β_{22} ve β_{33} ikinci dereceden parametreleri ve ε ise cevaptaki ölçüm hatasını ifade etmektedir.

Genel olarak, tüm RSM problemleri bu modellerden birini veya her ikisinin karışımını kullanır. Her modelde, her faktörün düzeyi diğer faktörlerin düzeyinden bağımsızdır. Polinomların yaklaşımında en verimli sonucu elde etmek için veri toplamak için uygun deneysel tasarım kullanılmalıdır. RSM'nin amacı, optimal cevabın meydana geldiği bölgeyi bulmak ve maksimum veya minimum yanıtı ulaşmak için bir yol boyunca hızlı ve verimli bir şekilde hareket etmektir, böylece cevap optimize edilmiş olur (Ertekin Özkan, 2021; Sahu ve ark. 2018).

Bir deneydeki terimlerin anlamlılık seviyeleri denklem 2.17 ve denklem 2.18’de belirtilen model katsayılarından belirlenmektedir. Bir terimin katsayısı ne kadar büyükse, bu terim deney üzerinde o kadar etkilidir demektir. Terimlerin anlamlılık seviyelerinin belirlenmesinin bir diğer yoluda istatistiksel verilerden yararlanmaktır. t- tablosu baz alınarak, her bir terimin katsayısı için hesaplanan t-değerleri karşılaştırılarak ta terimlerin anlamlılık seviyeleri hakkında yorum yapılabilir. t-değeri yüksek olan terimin cevap üzerine etkisi de güçlüdür (Ertekin Özkan, 2021).

Tam Faktöriyel Tasarım (FFD)

Faktöriyel tasarımlar, 1926 yılında Ronald Fisher tarafından ortaya konan ve optimizasyon çalışmaları için sıklıkla başvurulanan yöntemlerdir (Allé ve ark., 2020; Barka ve ark., 2014; Cestari ve ark., 2008; Dahmoune ve ark., 2016; Dinç ve ark., 2020a; Erden ve ark., 2016; Gohel ve Amin, 1998; Kordkandi ve Forouzesh, 2014;

Kumar ve ark., 2015; Oral ve ark., 2016; Özbay ve ark., 2013; Rakhshandehroo ve ark., 2018; Veličković ve ark., 2013).

Faktöriyel tasarımlar, sistem üzerinde önemli etkiye sahip olabilecek faktörlerin araştırılması amacıyla özel olarak tasarlanmış bir deney sistemi sunar. Burada amaç, birçok faktörün etkilerini aynı anda açıklayarak bunların önemini ortaya koymaktır. Bu sayede sisteme etki eden faktörlerin önem sıralaması ortaya konmuş olur.

Tam faktöriyel tasarım, tüm olası faktör ve düzey kombinasyonlarının araştırıldığı ve tüm ana etkilerin ve etkileşimlerin değerlendirilebildiği bir matristen oluşur. Tam faktöriyel tasarımda öncelikli olarak sistemi önemli ölçüde kaç faktörün etkilediği tespit edilir. Kromatografik analizlerde genellikle sistemi önemli derecede etkileyen faktörler; kolon tipi, hareketli faz bileşimi, akış hızı, hareketli fazın pH'sı, vs. olarak görülmektedir. Sisteme etki eden faktör sayısı dört veya daha az ise tam faktöriyel tasarım (FFD) uygulanabilir, fakat faktör sayısı dörtten fazla olduğunda deney sayısında artış olacağı için indirgenmiş faktöriyel tasarımlardan (örneğin, kesirli faktöriyel tasarım (FrFD) veya Plackett-Burman tasarımı (PBD)) uygulanmalıdır.

FFD için deney sayısı n^k ile tanımlanır, burada n seviye sayısını ve k faktör sayısını ifade eder. Kromatografide, faktörler genellikle iki seviyede incelenir. Bu nedenle, araştırılan k faktör için 2^k deney yapılmalıdır. 2, 3 ve 4 faktör için deney sayısı sırasıyla 4, 8 ve 16 olacaktır. Dörtten fazla faktör için deney sayısı hızla artar ve azaltılmış faktöriyel tasarım biçimleri tercih edilir. 2^k tasarımlarda k ana etki (birinci dereceden etkiler), $k(k-1)/2$ iki faktörlü etkileşim ve $k(k-1)(k-2)/3$ üç faktörlü etkileşim vardır. Tam faktöriyel tasarım ortogonal olacak şekilde inşa edilir, yani her bir faktörün etkisi ve iki faktörün çarpımı birbirinden bağımsız olarak tahmin edilebilir.

İlişkiyi tanımlayan genel matematiksel model Faktörler ve tepkiler arasındaki ilişki şu şekilde ifade edilebilir:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_{12} \quad (2.14)$$

Sunulan denklemlerde y yanıt, x_1 ve x_2 faktörler ve b_1 , b_2 ve b_{12} katsayılarıdır. Bazı durumlarda etkileşimle ilgili katsayılar ihmal edilebilir ve o zaman en basit polinom modeli ortaya çıkar. Faktör etkisinin yoğunluğu, katsayı değeri ve işareti ile tanımlanır ve farklı faktörlerin karşılaştırılabilmesi için bunlar kodlanarak verilir.

Katsayılar için elde edilen değerlerden, faktörlerin etkisi tanımlanmış ve daha önemli olanlar, optimum kromatografik koşulların ayarlanmasını sağlayan yanıt yüzeyi metodolojisi kullanılarak ayrıntılı olarak analiz edilmiştir. FFD’de deneye etki eden faktörler belirlendikten sonra bir sonraki uygulama yöntem optimizasyonudur (Stojanović, 2013).

FFD’de, çok sayıda faktörle, en yüksek dereceden etkileşimlerin önemli bir etkisinin olmaması olasıdır. Bu gibi durumlarda deney sayısı sistematik bir şekilde azaltılabilir ve ortaya çıkan tasarıma FrFD denir. FrFD, tam veya FFD’nin bir fraksiyonudur ($1/X_p$), burada p , fraksiyonasyon derecesidir ve FrFD tasarımları için gereken toplam deney sayısı $X_n - p$ ile verilir.

Cevap Faktörünün Hesaplanması

Bir kromatografik analizde, kompleks karışımlar içerisinde bulunan bileşenlerin eş zamanlı kromatografik analizi oldukça zor bir iştir çünkü, her bir madde kromatografik sistemden farklı şekilde etkilenecek ve kolonda farklı sürede tutulacaktır. Kompleks yapıları bir numunedeki bileşenlerin benzer fiziksel ve kimyasal yapıda olmaları ve kromatogramdaki piklerin çakışmaları gibi nedenler de bu bileşenlerin eş zamanlı analizini zorlaştıran nedenler arasında yerini almaktadır. Ayrıca, bir analizci için kompleks yapıları bir ürünlerdeki bileşenlerin eş zamanlı ayrılması yeterli değildir, aynı zamanda tatmin edici pik simetrisinin sağlanması, minimum elüsyon süresinin elde edilmesi gibi faktörlerin de kabul edilebilir düzeyde olması önemlidir. Deney sonucunda elde edilen tüm bu parametrelerin uygunluğunun

sağlanabilmesi ve deneysel uzayın keşfi için matematiksel araçların yardımı gereklidir.

Optimizasyon sürecinde günümüze farklı pek çok cevap fonksiyonları kullanılmıştır ancak bunlar istenilen cevabı vermede yetersiz kalmışlardır. Bu tez çalışmasında KAF-PS ve B3-SB-PS-KAF bileşenlerinin eş zamanlı tayinleri için optimum kromatografik koşulların sağlanmasında en gelişmiş kromatografik cevap fonksiyonu (KCF) kullanılmıştır. KCF değerleri UPLC kromatogramlarından elde edilen verilerden hesaplanmıştır.

KCF, incelenen tüm bileşenlerin ayrılmasını, kromatografik işlem süresini ve elde edilen tepe noktalarının kalitesini aynı anda ölçen bir matematiksel araçtır. KCF, en iyi kromatografik davranışın sergilendiği deneysel bölgelerin tanımlanması amacıyla kullanılmaktadır.

Bir kromatografik analizde, kromatogramda bazı hedeflere (örn. Bileşenlerin ayrılmış olması) ulaşılmış olması fakat diğer hedeflerin kaçırılmış olması (örn., toplam elüsyon süresinin uzun olması) ihtimal dahilindedir. Bu gibi durumlarda, analistin elde edilen kromatogramlardan hangisinin daha iyi olduğu konusundaki keyfi kararı güvenilir olmayabilir. Deney sonuçlarından matematiksel olarak elde edilen KCF değerleri, istenen tüm kromatogram özelliklerini tek bir sayısal değerde birleştirmesi nedeniyle bu soruna çözüm sunma konusunda oldukça başarılıdır.

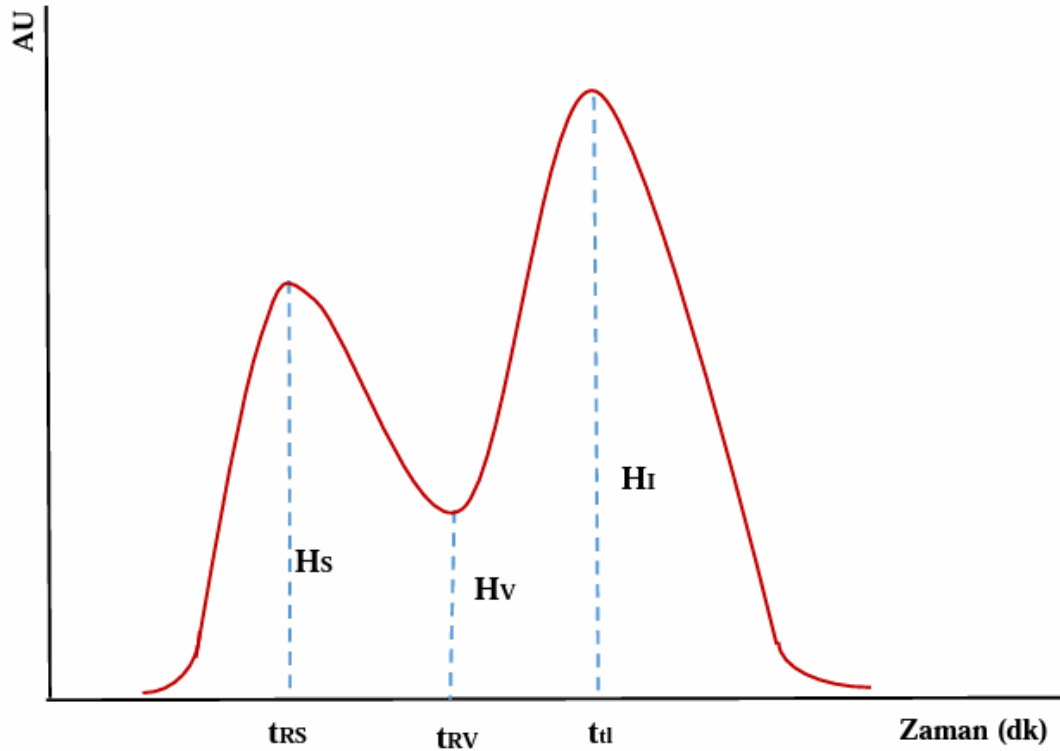
KCF'nin doğru tasarımı zorlu bir iştir: ilk olarak, araştırılan parametreleri uygun şekilde tanımlamalıdır (bitişik tepe noktaları arasındaki çözünürlük, pik simetrisi, toplam elüsyon süresi vb.) ve ikincisi, her parametrenin yeterli ağırlıklandırmasını yapmalıdır. KCF şu şekilde hesaplanmaktadır;

$$KCF = \left(\alpha \left(1 - \frac{\sum_{i=1}^{N-1} Q_{s,i}}{N-1} \right) + 1 \right) + \left(1 + \left(\frac{t_f}{t_{opt}} \right)^b \right) \quad (2.18)$$

burada $Q_{s,l}$ tahmin edilen çözünürlük kriteridir Carle'ın Q kriteri olarak adlandırılır ve aşağıdaki şekilde hesaplanır,

$$Q_{s,l} = 1 - \left((H_v \times |t_{R,l} - t_{R,s}|) / (|t_{R,v} - t_{R,s}| \times (H_1 - H_s) + H_s \times |t_{R,l} - t_{R,s}|) \right) \quad (2.19)$$

N, beklenen piklerin sayısıdır, t_f , son pikin elüsyon süresidir, t_{opt} , seçilen optimum genel elüsyon süresidir ve a ve b önceden belirlenmesi gereken katsayılarıdır ve a genellikle 1-5 arasında ve b'de 0-5 arasında bir değer alır. H_s ve H_1 piklerin yükseklikleridir, H_v vadi yüksekliğidir, $t_{R,s}$ ve $t_{R,l}$ piklerin tutulma süreleridir ve $t_{R,v}$ Şekil 2.11'de gösterildiği gibi pikin zaman konumudur.



Şekil 2.11. Carle'ın Q kriter hesaplamasındaki parametreleri gösteren kromatogram.

($R_s = 2\Delta t / (w_1 + w_2)$), burada Δt_R , pik maksimumlarının alıkonulma sürelerindeki arasındaki farktır ve w_1 ve w_2 , piklerin genişliğidir. Q kriteri ile hem Gauss şekilli hem de Gauss şekilli olmayan pikler tahmin edebilir. y kriteri ise 0-1 arasında bir

değere sahiptir. Bu değer 0 olduğunda pikler tamamen örtüşüyor demektir, 1 olduğunda ise pikler mükemmel bir biçimde ayrılmış demektir.

Kromatografik pikin şekli önemlidir çünkü Gauss olmayan şekil, geniş ve ölçümü imkansız bir pik verir. Ayırma arttıkça ve toplam elüsyon süresi azaldıkça KCF minimuma ulaşır. Bu nedenle, analiz edilen sistemin en iyi kromatografik davranışı, en düşük KCF değerleri ile karakterize edilir. Uyarlanmış KCF* fonksiyonu şu şekilde formüle edilir:

$$KCF^* = \left(a \left(1 - \frac{\sum_{i=1}^{N-1} Q_{S,i}}{N-1} \right) + 1 \right) \left(1 + \left(\frac{t_f}{t_{opt}} \right)^b \right) \left(1 + \frac{\sum w_i}{N} \right)^c \quad (2.20)$$

burada w_i taban çizgisindeki pik genişliğidir. Elde edilen KCF*, yalnızca en iyi ayırma ve minimum toplam elüsyon süresinin değil, aynı zamanda iyi bir pik şeklinin de elde edildiği kromatogramın seçilmesine izin verir. KCF*'de yeni tanıtılan genişlik teriminin dengesi, c katsayısı ile belirlenir (Rakić ve ark., 2012).

3. BULGULAR

Bu doktora tez çalışmasında, iki farklı içeriğe sahip ticari enerji içeceklerinin (ticari enerji içeceği (I) ve ticari enerji içeceği (II)) kantitatif analizi için kemometrik deneysel tasarım ve optimizasyon (EDO) metodolojisi kullanılarak yeni UPLC yöntemleri geliştirildi. UPLC yöntemlerinin geliştirilmesinde tam faktöriyel tasarım ve optimizasyon tekniği kullanıldı.

Çalışmalarımızda yeni geliştirilen, optimize ve valide edilmiş UPLC yöntemleriyle ticari enerji içeceği (I)'de bulunan ve dedeksiyon sınırları içinde yer alan PS ve KAF ve ticari enerji içeceği (II)'de bulunan ve dedeksiyon sınırları içerisinde yer alan B3, SB, PS ve KAF bileşiklerinin eşzamanlı miktar tayinleri gerçekleştirildi.

3.1. Ticari Enerji İçeceği (I)'de İki Bileşen Analizi

Ticari enerji içeceği (I)'deki iki bileşiğin (KAF ve PS) eş zamanlı miktar tayinleri için deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojisi yardımıyla yeni bir UPLC yöntemi geliştirildi.

3.1.1. İki Bileşen Analizi için Deneysel Tasarım ve Optimizasyon ile UPLC Yönteminin Geliştirilmesi

Bu doktora tez çalışmasında enerji içeceği (I)'in içeriğinde bulunan KAF ve PS'nin kantitatif analizleri için yeni bir UPLC yönteminin geliştirilmesi basamağında kromatografik şartların belirlenmesi için bir kemometrik optimizasyon metodolojisi kullanıldı. UPLC analizinde kromatografik deneysel koşulların optimizasyonunda tam faktöriyel tasarımı ve regresyon analiziyle elde edilen ikinci dereceden kuadratik denklemden oluşan bir model kullanıldı.

Deneysel tasarım ve optimizasyon çalışmalarıyla da kromatografik şartların saptanmasında, çalışmalar numune içeriğinde yer alan KAF ve PS dışında diğer bileşenlerin (numune matriksinin) kromatografik analizinde girişim yapabileceği dikkate alınarak, ticari enerji içeceği (I) (BGS) üzerinde gerçekleştirildi.

Deneysel tasarım ve optimizasyon işleminin birinci basamağında, önce kromatografik ayırma gücü üzerine etki eden etkin faktörler belirlendi. Yapılan ön deneylerle de özellikle kolon sıcaklığı, hareketli faz bileşiminde yer alan tampon yüzdesi ve akış hızının KAF ve PS ayırımı üzerine etkili oldukları görüldü.

Bu kapsamda bileşenlerin kromatografik cevap faktörü olan ayırım gücü üzerine etki eden faktörler olarak kolon sıcaklığı ($^{\circ}\text{C}$) (X_1), hareketli faz bileşimindeki tampon çözelti (0,4 mL/L trietilamin (TEA) içeren 0,1 M H_3PO_4 ve NaH_2PO_4 karışımı, pH 2,15) yüzdesi (X_2) ve kolon sisteminde hareketli fazın akış hızı (X_3) kromatografik değişkenler olarak seçildi.

Deneysel tasarım optimizasyonun ikinci basamağında seçilen faktörlerin (X_1 , X_2 ve X_3) deneysel uzaydaki aralıklarının belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirildi. Bu çalışmaların sonucu olarak faktörlerin seviyeleri düşük (-1), orta (0) ve yüksek (+) şeklinde karşılık gelen sayısal değerler ile Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Enerji içeceği (I)'in deneysel tasarımı için UPLC yönteminin uygulanmasıyla belirlenen faktörler, çalışma aralıkları ve seviyeler.

Seviye	Kolon Sıcaklığı (°C)	Tampon (%)	Akış Hızı (mL/dk)
	X ₁	X ₂	X ₃
-1	30	54	0,16
0	45	62	0,21
1	60	70	0,26

Tampon bileşimi: 0,4 mL/L TEA içeren 0,1 M H₃PO₄ ve NaH₂PO₄ karışımı, pH 2,15

Seviyeler : Düşük (-1), orta (0), yüksek (+1)

X₁ : Kolon sıcaklığı (°C)

X₂ : Hareketli fazdaki mobil faz yüzdesi (%)

X₃ : Hareketli faz akış hızı (mL/dk)

UPLC yönteminin geliştirilmesinde 3³ (üç faktör üç seviye) tam faktöriyel tasarım matrisinde 27 farklı kromatografik deney gerçekleştirildi. Üç faktör üç seviye için FFD planı Çizelge 3.2'de sunulmuştur. FFD planı her faktörün düşük (-1), orta (0) ve yüksek (+1) seviyelerinin kombinasyonu ile oluşturulmuştur.

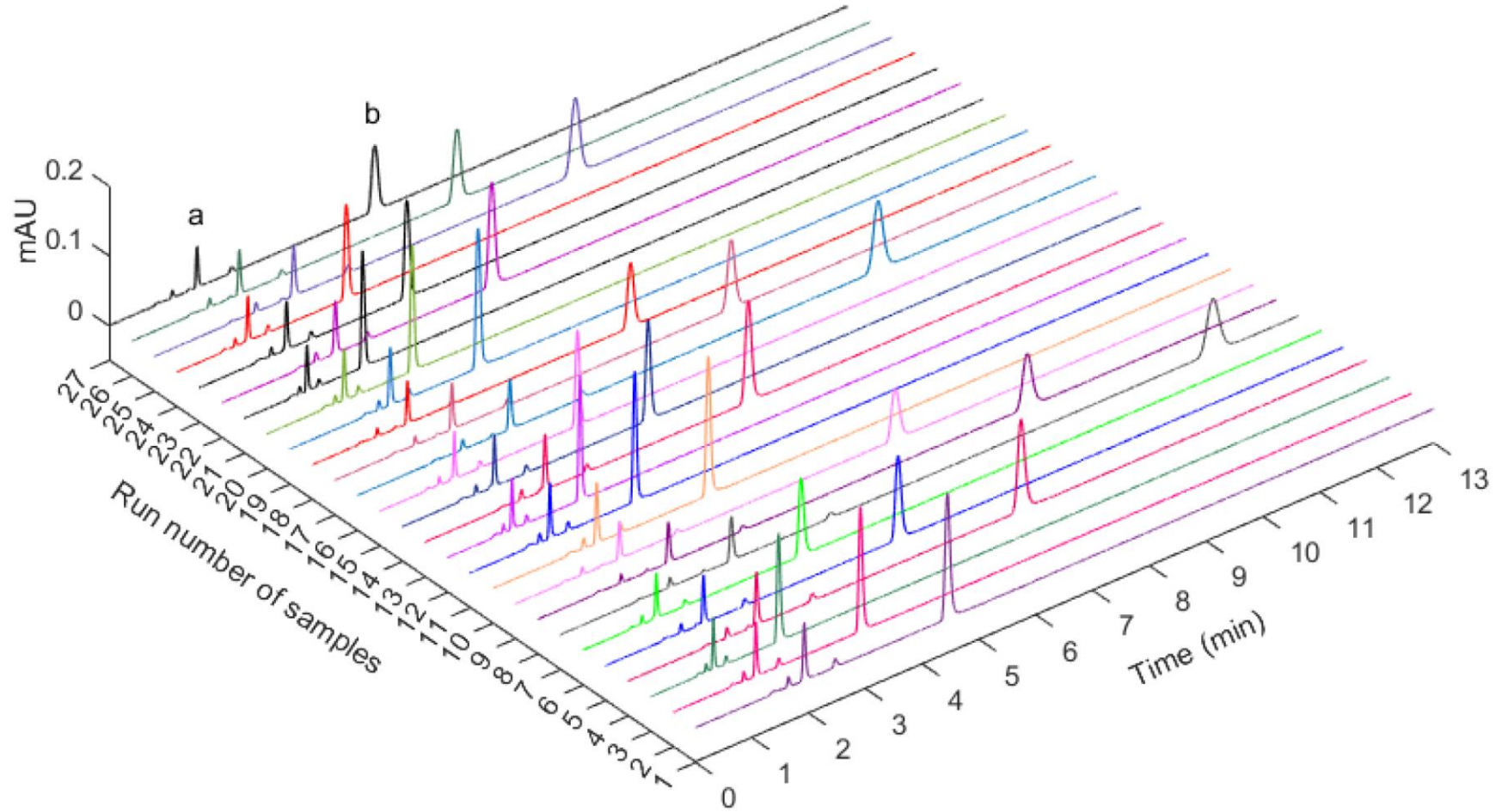
Çizelge 3.2. Tam faktöriyel tasarım metodolojinin enerji içeceği (I) numunesine uygulanması ile hesaplanan kromatografik cevap faktörü (KFC) değerleri.

Deney No	X ₁	X ₂	X ₃	KCF	
	Sıcaklık (°C)	Tampon (%)	Akış Hızı (mL/dk)	Ölçülen	Tahmin edilen
1	-1	-1	-1	7,6644	7,8687
2	-1	-1	0	3,6558	3,3570
3	-1	-1	1	2,6030	2,4492
4	-1	0	-1	16,5951	17,3455
5	-1	0	0	9,1385	9,4800
6	-1	0	1	5,3302	5,2183
7	-1	1	-1	33,3778	32,2827
8	-1	1	0	20,9064	21,0634
9	-1	1	1	13,2414	13,4478
10	0	-1	-1	6,1819	5,9407
11	0	-1	0	3,1661	2,9545
12	0	-1	1	3,4639	3,5721
13	0	0	-1	12,6910	12,7463
14	0	0	0	6,5568	6,4062
15	0	0	1	3,8520	3,6699
16	0	1	-1	24,7637	25,0122
17	0	1	0	14,9191	15,3183
18	0	1	1	9,2538	9,2282
19	1	-1	-1	4,9661	4,9404
20	1	-1	0	3,4667	3,4796
21	1	-1	1	5,0169	5,6227
22	1	0	-1	9,1442	9,0747
23	1	0	0	4,6781	4,2601
24	1	0	1	3,2644	3,0493
25	1	1	-1	18,4965	18,6694
26	1	1	0	10,3326	10,5010
27	1	1	1	6,1680	5,9363

Seviyeler : Düşük (-1), orta (0), yüksek (+1)
X₁ : Kolon sıcaklığı (°C)
X₂ : Hareketli fazdaki mobil faz yüzdesi (%)
X₃ : Hareketli faz akış hızı (mL/dk)

Bu çizelgede gösterilen plana göre 27 deneye karşılık UPLC kromatogramları çizdirildi. Bunun için enerji içeceği (I) numunesinden (BGS) 1 mL alınarak 0,1 M HCl çözeltisi ile 10 mL'ye seyreltildi ve hazırlanan çözelti UPLC-PDA sistemine enjekte edilerek 284 nm'de kromatogramları alındı (Şekil 3.1). Daha sonra elde edilen kromatogramlar üzerinden KCF değerleri hesaplandı ve bu değerler kullanılarak minimum alıkonma süresinde, en iyi kromatografik ayrımı sağlayan şartlar belirlendi.





Şekil 3.1. Ticari enerji içeceği (I) numunesine uygulanan ve şartları deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojisi kullanılarak oluşturulan 27 farklı kromatografik şarta sahip deneyin 284 nm’deki dedeksiyonla elde edilen kromatogramları.

Tam faktöriyel tasarım ile geliştirilen UPLC yönteminin optimal deney koşullarının tespiti için analize etki eden faktörler; kolon sıcaklığı (X_1), hareketli faz içerisindeki tampon yüzdesi (X_2), hareketli faz akış hızı (X_3) ve faktör etkileşimleri ile KCF arasındaki matematiksel ilişkiden doğrusal regresyon analizi ile ikinci dereceden polinomiyal model aşağıdaki denklemle elde edilmiştir;

$$Y = 6,4062 - 2,6099X_1 + 6,1819X_2 - 4,5382X_3 + 0,4639X_1^2 + 2,7302X_2^2 + 1,8019X_3^2 - 2,6712X_1X_2 + 1,5254X_1X_3 - 3,3539X_2X_3$$

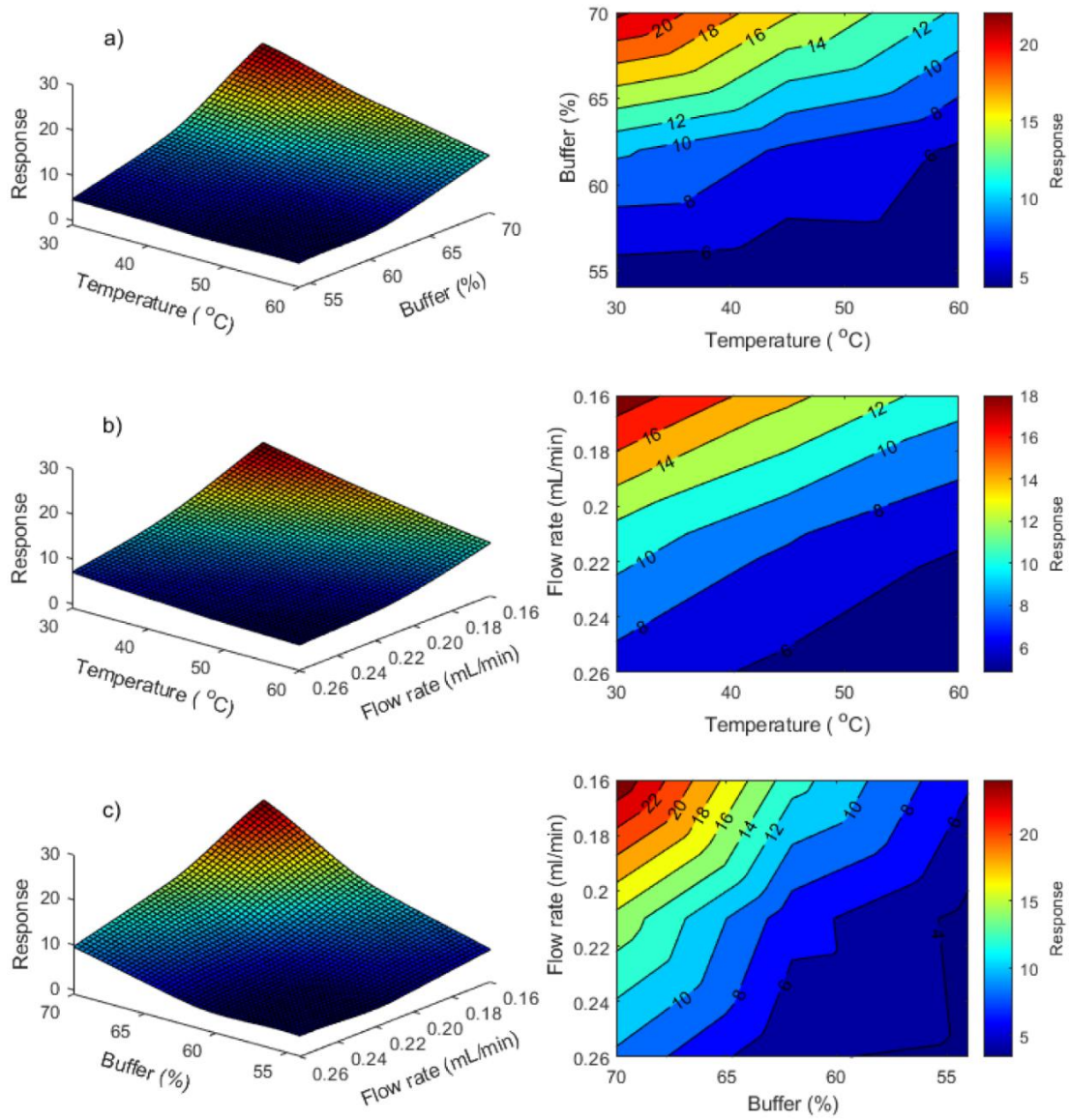
Burada X_1 , X_2 ve X_3 ana faktörleri, X_1X_2 , X_1X_3 ve X_2X_3 faktörlerin etkileşimlerini, X_1^2 , X_2^2 ve X_3^2 faktörlerin karesini ve y ise KCF'yi ifade etmektedir. Fonksiyondaki sayılar, kesim ve model katsayılarını göstermektedir. Yukarıdaki denklemde yer alan katsayıların anlamlı olup olmadığı istatistiksel olarak ortaya konmuştur. Burada hareketli faz içerisindeki tampon yüzdesinin (X_2) analiz üzerinde en etkili faktör olduğu katsayısının yüksek olmasından da anlaşılmaktadır. Çizelge 3.3'te, test sonuçlarına göre bulunan p- değeri $< 0,05$ olduğundan, seçilen faktörlerin kromatografik cevabı etkilediği tespit edilmiştir.

Çizelge 3.3. Enerji içeceği (I) numunesinin modelleme çalışması ile edilen İkinci dereceden polinomiyal fonksiyonun istatistiksel P testi sonuçları.

Regresyon İstatistikleri	Bulunan Değerler
Çoklu R	0,9989
R Kare	0,9979
Düzeltilmiş R Kare	0,9967
Standart hata	0,4348
Gözlemler	27

Parametreler	Katsayılar	P-değeri (P<0,05)
Kesim noktası	6,4062	0,0000
X_1	-2,6099	0,0000
X_2	6,1819	0,0000
X_3	-4,5382	0,0000
X_1^2	0,4639	0,0182
X_2^2	2,7302	0,0000
X_3^2	1,8019	0,0000
$X_1 * X_2$	-2,6712	0,0000
$X_1 * X_3$	1,5254	0,0000
$X_2 * X_3$	-3,3539	0,0000

Enerji ieeği (I) analizinde deney üzerinde etkili faktörler ve faktörlerin birbirleri ile etkileşimleri ve bunlarla KCF ile ilişkiyi sergileyen 3D cevap yüzey metodolojileri ayrıntılı bir biçimde ele alınmıştır. % 0,4 mL/L TEA içeren 0,1 M H_3PO_4/NaH_2PO_4 (pH 2,15) ve kolon sıcaklığı ile KCF, kolon sıcaklığı ve hareketli faz akış hızı ile KCF, hareketli faz akış hızı - % 0,4 mL/L TEA içeren 0,1 M H_3PO_4/NaH_2PO_4 (pH 2,15) ile KCF arasındaki bağlantıyı belirten 3D yüzey cevap metodolojileri şekil 3.2(a-c)'de sergilenmiştir. Bu grafikler, seçilen faktörlerin etkileşimlerinin KCF üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. şekil 3.2a'da hareketli fazda tampon oranı arttı ve kolon sıcaklığı dştk KCF değerinin arttığı görülmektedir. Bu sonuçlar grafiğin sağındaki eş yükselti eğrilerinden net bir biçimde görülebilmektedir. şekil 3.2b'de görüldüğü üzere kolon sıcaklığı ve akış hızının birlikte düşük olduğu durumlarda KCF değer artmaktadır. şekil 3.2c'de hareketli fazdaki tampon yüzdesinin yüksek, hareketli faz akış hızının düşük olduğu durumlarda KCF değerinin de arttığı görülmektedir. Deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojisinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda ticari enerji ieeğinde bulunan KAF ve PS'nin miktar analizi için bulunan optimum kromatografik koşullar; kolon sıcaklığı 58,9 C, hareketli faz akış hızı 0,24 mL/dk. ve hareketli fazdaki tampon (0,4 mL/L TEA içeren 0,1 M H_3PO_4/NaH_2PO_4 , pH 2,15) yüzdesi % 59,3 olarak bulunmuştur. Bu analizde hareketli faz tampon ve metanolden (MeOH)'den oluşmaktadır (Tampon: MeOH= 59,3: 40,7).



Şekil 3.2. 3D yüzey cevap metadolojileri ve bunlara ait eş yükselti eğrileri

a) % 0,1 M $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ve kolon sıcaklığı ile KCF, **b)** kolon sıcaklığı ve hareketli faz akış hızı ile KCF, **c)** hareketli faz akış hızı ve % 0,1 M $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ile KCF arasındaki bağlantıyı ifade eden 3D yüzey cevap metadolojileri ve bunlara ait eş yükselti eğrileri.

3.1.2. UPLC Yöntemiyle Ticari Enerji İçeceği (I)'in Analizi

Standart Çözeltilerin Hazırlanması

- KAF ve PS'nin 10 mg/100 mL olan stok çözeltileri 0,1 M HCl çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır. Tüm çalışmalarda çözücü olarak 0,1 M HCl çözeltisi kullanılmıştır.
- KAF için 2,0-26,0 µg/mL aralığında, PS için ise 4,0-28,0 µg/mL konsantrasyon aralığında 8 farklı kalibrasyon çözeltisi hazırlanmıştır. Her iki maddeyi de içerisinde bulunduran kalibrasyon çözeltileri aynı balon jojelerin içerisinde hazırlanmıştır.
- KAF için 2,0-26,0 µg/mL aralığında ve PS için ise 4,0-28,0 µg/mL aralığında KAF ve PS karışımlarının farklı kombinasyonları ile oluşturulmuş 8 farklı validasyon çözeltisi hazırlanmıştır.
- Gün içi ve günler arası analizler için KAF ve PS stok çözeltilerinden hazırlanan ve her bir bileşiğin üç farklı konsantrasyon seviyesi ile hazırlanan çözeltiler kullanılmıştır. Bu çözeltiler, KAF'ın 4,0 µg/mL, 14,0 µg/mL ve 24,0 µg/mL ve PS'nin 6,0 µg/mL, 16,0 µg/mL ve 26,0 µg/mL konsantrasyon seviyelerinin kombinasyonu ile oluşturulmuştur.
- Standart ekleme yöntemi için tüm çözeltilerinde sabit miktarda (0,5 mL/10 mL) KAF ve PS içeren ticari enerji içeceği ve farklı konsantrasyon aralıklarında KAF (0 – 20,5 µg/mL) ve PS (0 – 16,0 µg/mL) bulunan dört farklı çözelti oluşturulmuştur. Aynı balon jojelerin içerisinde hazırlanan bu çözeltilerdeki KAF konsantrasyonu 0 µg/mL, 5,5 µg/mL, 10,5 µg/mL ve 20,5 µg/mL iken PS konsantrasyonu 0 µg/mL, 4,0 µg/mL, 8,0 µg/mL ve 16,0 µg/mL'dir.

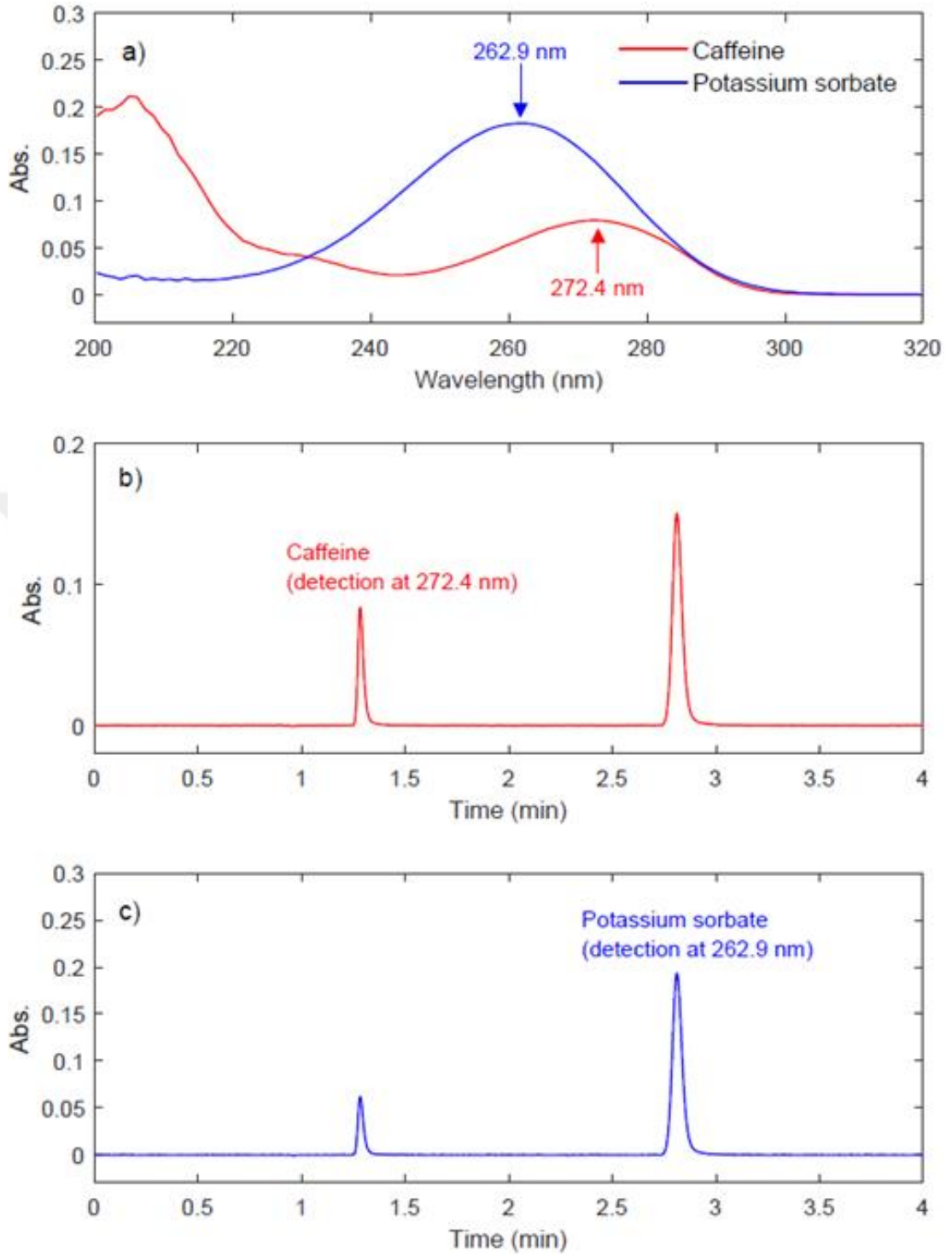
UPLC Yöntemiyle Belirlenen Kromatografik Şartlar

- Hareketli Faz: Ticari enerji içeceği KAF ve PS'nin kromatografik ayırımı için kullanılan hareketli faz (0,4 mL/L TEA içeren 0,1 M H₃PO₄ ve NaH₂PO₄ karışımı, pH 2,15) ve metanol (59,3:40,7, h/h) karışımından oluşmaktadır.
- Kolon: C18 kolonu (Waters Acquity® BEH, 100 mm x 2,1 mm i.d., 1,7 µm)
- Kolon Sıcaklığı: 58,9 °C
- Basınç: ~519 bar.
- Akış Hızı: 0,24 mL/dk.
- Enjeksiyon Hacmi: 1,0 µL
- Dedeksiyon için seçilen dalga boyu: Deneyde analizi yapılan KAF ve PS analizi için dalga boyu sırasıyla 272,4 nm ve 262,9 nm olarak seçilmiştir.

Çalışmalarımızda ticari enerji içeceği (I)'in analizi için UPLC yönteminin geliştirilmesinde hareketli faz bileşimi, kolon sıcaklığı ve hareketli fazın akış şartlarının belirlenmesi deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojisiyle yapıldı.

Kalibrasyon Denkleminin Hesaplanması

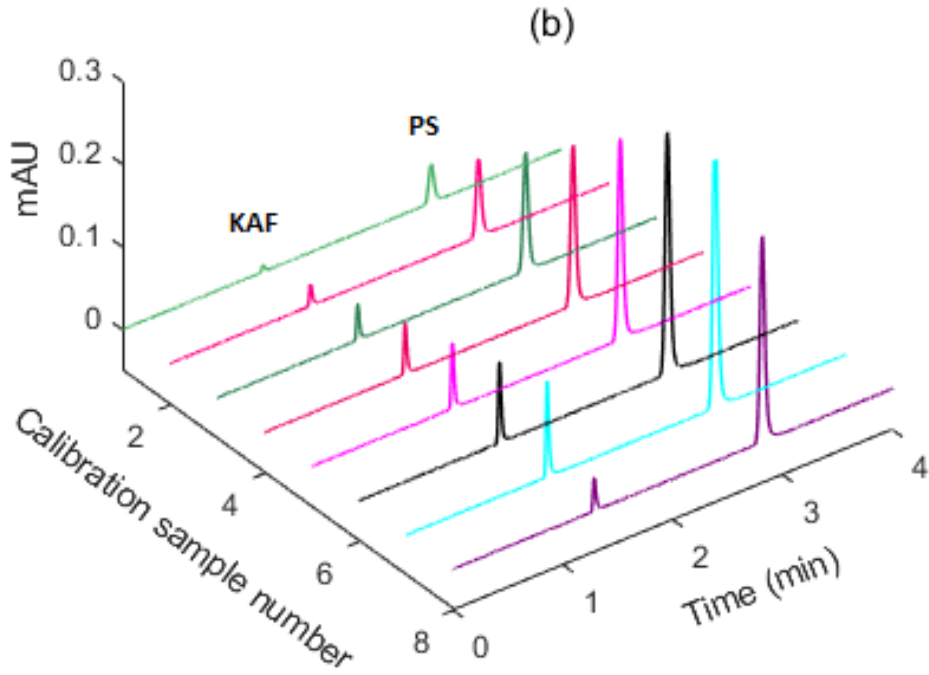
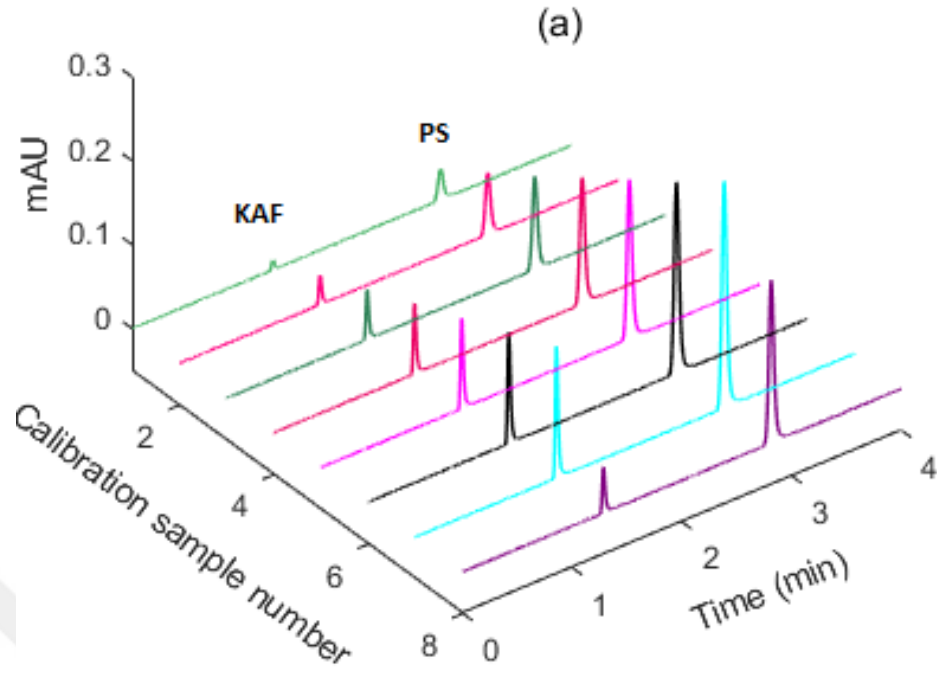
UPLC yöntemiyle ticari enerji içeceği (I)'de bulunan KAF ve PS'nin eşzamanlı miktar tayinleri çalışmada kalibrasyon eğrileri konsantrasyona karşı bileşiğin kromatografik pik alanı grafiğe geçirilerek elde edildi. Bu işlemde önce bileşiklerin optimal pik alanlarının UPLC dedektörü vasıtasıyla doğru bir dedeksiyon yapılabilmesi için bileşiklerin Şekil 3.3a'da gösterildiği gibi UV spektrumları alındı. Bu UV absorpsiyon spektrumlarından KAF'ın 272,4 nm'de ve PS'nin 262,9 nm'de maksimum absorpsiyon yaptığı gözlemlendi. KAF için 272,4 nm'deki dedeksiyonla ve PS için 262,9 nm'deki dedeksiyonla kromatografik pikler elde edildi (Şekil 3.3b ve Şekil 3.3c). Bu seçilen dalga boylarında yapılan dedeksiyon ile KAF ve PS için alıkonma süreleri sırasıyla 1,29 dk ve 2,81 dk olarak tespit edildi.



Şekil 3.3. Bileşenlerin UV spektrumları ve kromatogramları; **a)** KAF ve PS bileşenlerinin UV spektrumları, **b)** Enerji içeceği (I)'in KAF'ın maksimum absorbans verdiği 272,4 nm'de dedeksiyonla elde edilen kromatogram **c)** Enerji içeceği (I)'in PS'nin maksimum absorbans verdiği 262,9 nm'de dedeksiyonla elde edilen kromatogram.

Daha sonra bu çalışmalardan elde edilen kromatografik cevaplar değerlendirilerek optimizasyon çalışmasında tüm bileşenlerin aynı anda kromatografik pik verdiği dalga boyu (284 nm) belirlendi ve tüm KCF hesaplamalarında bu dalga boyundaki dedeksiyonla elde edilen kromatografik cevaplar kullanıldı.

Bileşiklerin maksimum absorbens verdiği dalga boyları belirlendikten sonra ticari enerji içeceği (I)'in UPLC kromatogramları alındı. Şekil 3.4a, KAF'ın maksimum absorbens yaptığı 272,4 nm'deki dedeksiyonla ve Şekil 3.4b PS'nin maksimum absorbens yaptığı 262,9 nm'deki dedeksiyonla elde edilen kromatogramlardır.



Şekil 3.4. Ticari enerji içeceği (I)'in içeriğinde bulunan KAF ve PS'nin kalibrasyon çözeltileri için; **a)** KAF'nin maksimum absorbens verdiği 272,4 nm'deki dedeksiyonla elde edilen kromatogramlar, **b)** PS'nin maksimum absorbens verdiği 262,9 nm'deki dedeksiyonla elde edilen kromatogramlar.

Şekil 3.4a-b'deki KAF ve PS'nin maksimum absorbands yaptığı dalga boylarındaki UV dedeksiyonları ile elde edilen kromatogramlardan yararlanarak her bir madde için ayrı ayrı doğru denklemi oluşturulmuştur. Bunun için farklı konsantrasyon aralıklarındaki KAF (2,0-26,0 µg/mL) ve PS (4,0-28,0 µg/mL) karışımından oluşan 8 farklı kalibrasyon çözeltisi kullanılmıştır. Regresyon denklemi, doğru denklemindeki bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki matematiksel ilişkinin bir ifadesi olarak oluşturulmuştur. Regresyon denklemine ait istatistiksel veriler Çizelge 3.4'te sunulmaktadır.



Çizelge 3.4. Enerji içeceği (I)'de bulunan KAF ve PS için elde edilen doğrusal regresyon analizi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Parametreler	KAF ($\mu\text{g/mL}$)	PS ($\mu\text{g/mL}$)
m	0,2400	0,8500
n	-0,0230	-0,0401
r	1,0000	1,0000
Kalibrasyon Aralığı	2,0-26,0 $\mu\text{g/mL}$	4,0-28,0 $\mu\text{g/mL}$
SS (m)	0,0009	0,0031
SS (n)	0,0143	0,0556
SS (r)	0,0016	0,00147
LOD	0,1800	0,2000
LOQ	0,5900	0,6500

m : Eğim
n : Kesim noktası
r : Korelasyon katsayısı
SS (m) : Eğimin standart sapması
SS (n) : Kesim noktasının standart sapması
SS (r) : Korelasyon katsayısının standart sapması
LOD : Gözlenebilme sınırı ($\mu\text{g/mL}$)
LOQ : Alt tayin sınırı ($\mu\text{g/mL}$)

Regresyon denkleminde KAF ve PS için ayrı ayrı R^2 (KAF için 1,0000 ve PS için 1,0000), LOD (KAF için 0,1800 µg/mL, PS için 0,2000 µg/mL) ve LOQ (KAF için 0,5900 µg/mL, PS için 0,6500 µg/mL) değerleri hesaplandı.

KAF ve PS bileşenlerine ait gözlenebilirlik sınırı (Limit of detection → LOD) ve tayin sınırı (Limit of quantification → LOQ) değerleri aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır (Dinç ve ark., 2020b)

$$LOD = \frac{3 \times SS}{m} \quad (3.1)$$

$$LOQ = \frac{10 \times SS}{m} \quad (3.2)$$

burada SS standart sapmayı, m doğru eğimini, 3 ve 10 değerleri ise sinyal/gürültü oranını ifade etmektedir. LOD değeri cihazın algılayabildiği fakat kantitatif analiz sınırları dışında kalan en düşük konsantrasyonu, LOQ ise alt tayin sınırını ifade etmektedir.

Kalibrasyon çözeltilerine ait kromatogramların verileri UPLC-H-Class Empower2 programı ile kayıt altına alınmış ve bu veriler yine aynı program yardımıyla Microsoft Excell programına transfer edilerek Matlab 7,0 programında “m-file” yazılımı ile işlenmiştir.

UPLC Yönteminin Geçerliliği

Bu bölümde tam faktöriyel tasarım ile optimal kromatografik şartları belirlenen ve ticari enerji (I) içerisinde yer alan KAF ve PS'nin eş zamanlı analizleri için geliştirilen UPLC yönteminin validasyon işlemleri ayrıntılı bir biçimde ele alınmıştır. Geliştirilen yeni UPLC yönteminin validasyon çalışmaları için, farklı konsantrasyon seviyelerindeki karışımlarından oluşan 8 farklı konsantrasyondaki çözelti kullanıldı. Bu çözeltiler, KAF ve PS'nin 10 mg/100 mL'lik stok çözeltilerinden, KAF konsantrasyonu 2,0-26,0 µg/mL ve PS konsantrasyonu 4,0-28,0 µg/mL aralığında olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerden alınan kromatografik cevaplardan KAF ve PS için ayrı ayrı %geri kazanım ve bağıl standart sapma (BSS) değerleri hesaplanmıştır. Validasyon çalışmaları ile bulunan geri kazanım değerleri KAF için %100,7, PS için %100,5; bağıl standart sapma (BSS) değerleri ise KAF için %1,49 ve PS için %2,03'dir. Validasyon çalışması ile elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. KAF ve PS'nin miktar tayinleri için geliştirilen UPLC yönteminin validasyon çalışmalarından elde edilen istatistiksel veriler.

Validasyon		Eklenen		Bulunan		Geri kazanım	
Çözeltileri		(µg/mL)		(µg/mL)		(%)	
Kod		KAF	PS	KAF	PS	KAF	PS
M1		2	20	2	20,2	101,4	101,1
M2		10	20	10,1	20,2	101,1	100,8
M3		18	20	18	20,1	99,8	100,4
M4		26	20	25,9	19,8	99,6	99,1
M5		14	4	13,9	3,9	99,0	97,8
M6		14	12	13,9	11,8	99,4	98,5
M7		14	20	14,4	20,7	102,8	103,5
M8		14	28	14,4	28,8	102,7	102,9
					$\bar{X}$	$100,7 \pm 0,53$	$100,5 \pm 0,72$
					SS	1,49	2,03
					BSS	1,48	2,02
$\bar{X}$: Aritmetik ortalama SS : Standart sapma BSS : Bağlı standart sapma							

Tam faktöriyel tasarım ile geliştirilen yeni UPLC yönteminin kesinliği ve tekrar edilebilirliği gün içi ve günler arası validasyon çözeltileri kullanılarak test edildi. Bu çalışma için KAF (4,0 µg/mL, 14,0 µg/mL ve 24,0 µg/mL) ve PS'nin (6,0 µg/mL, 16,0 µg/mL ve 26,0 µg/mL) üç farklı seviyelerinin karışımı ile hazırlanan konsantrasyonları birbirinden farklı 3 çözelti kullanıldı. Gün içi analizlerde KAF ve PS karışımından oluşan çözeltilerin kromatografik cevapları aynı gün birer saat aralıklarla ve günler arası çözeltilerde ise birbirini izleyen üç günde üçer tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Geri kazanım ile yöntemin seçiciliği, %BSS ile yöntemin kesinliği ve doğruluğu ve %BSH ile ise yöntemin doğruluğu test edilmiştir. Gün içi ve günler arası çalışmalara ait analiz sonuçları Çizelge 3.6'da verildi. Ulaşılan sonuçlar yöntemin enerji içeceği numunelerinde KAF ve PS'nin eş zamanlı analizleri için başarılı ve güvenilir bir yöntem olduğunu göstermiştir.

Çizelge 3.6. Gün içi ve günler arası çözeltilerinin deney verileri.

	Eklenen ($\mu\text{g/mL}$)		Bulunan ($\mu\text{g/mL}$)		Geri Kazanım (%)		BSS (%)		BSH (%)	
	KAF	PS	KAF	PS	KAF	PS	KAF	PS	KAF	PS
Gün içi	6	10	4,07	6,05	101,6	100,8	0,68	1,08	1,63	0,81
	12	25	14,16	16,39	101,1	102,4	0,66	0,50	1,11	2,43
	18	40	24,04	26,46	100,2	101,8	0,75	0,31	0,19	1,79
Günler arası	6	10	4,07	6,04	101,7	100,7	1,08	0,38	1,66	0,68
	12	25	14,14	16,35	101	102,2	0,60	0,46	1,00	2,20
	18	40	24,13	26,43	100,6	101,6	0,59	0,52	0,56	1,65

%BSS : Bağlı standart sapma

%BSH : Bağlı standart hata

n : 3 (Her bir çözelti için, gün içi analizler aynı gün birer saat aralıklarla ve günler arası analizlerde birbirini izleyen üç günde üçer tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Kafein ve potasyum sorbat analizi için geliştirilen yöntemin seçiciliğini test etmek için standart ekleme metodu kullanıldı. Bu yöntem ticari enerji içeceği (I) numunesinde bulunan KAF ve PS dışındaki diğer bileşenlerin (numune matrisinin) analizde girişim yapıp yapmadıklarını test etmek amacıyla kullanıldı. Bunun için, içerisinde sabit miktarda (0,5 mL/10 mL) enerji içeceği (I) (BGS) numunesi bulunan çözeltilerin üzerine, artan miktarlarda KAF (0 – 20,5 µg/mL) ve PS (0 – 16,0 µg/mL) standart çözeltileri ilave edilerek 4 farklı içeriğe sahip standart ekleme çözeltileri hazırlandı. Standart ekleme çözeltilerinin bir tanesinde sadece ticari enerji içeceği numunesi (I) (0,5 mL/10 mL) eklendi ve bu çözeltiliye KAF ve PS'nin standart çözeltilerinden ekleme yapılmadı. 0,5 mL/10 mL BGS numunesi içeren diğer üç çözeltideki KAF ve PS konsantrasyonları ise şu şekildedir; SE1 → 5,5 µg/mL KAF ve 4,0 µg/mL PS; SE2 → 10,5 µg/mL KAF ve 8,0 µg/mL PS; SE3 → 20,5 µg/mL KAF ve 16,0 µg/mL PS. Hazırlanan tüm çözeltilerin hacmi 0,1 M HCl çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltilerin belirlenen analiz koşullarında UPLC cihazı ile kromatografik cevapları alınarak, her bir bileşiğin pik alanı kalibrasyon denkleminde yerlerine yerleştirildi ve bu şekilde çözeltilerin içerisinde bulunan toplam KAF ve PS miktarları hesaplandı. Standart ekleme çözeltilerinde bulunan toplam KAF ve PS miktarlarından enerji içeceği numune ilavesinin çıkarılmasıyla, eklenen ve bulunan KAF ve PS miktarları karşılaştırıldı. Standart ekleme çözeltilerinden her biri üçerli tekrarlar halinde hazırlandı ve her birinin tam faktöriyel tasarım ile belirlenen optimal kromatografik koşullar altında UPLC yöntemi ile kromatografik cevapları alındı. Daha sonra her bir standart ekleme çözeltilisine ait çözeltilerden alınan kromatografik cevapların ortalaması alınarak enerji içeceği (I) numunesindeki KAF ve PS'nin her birinin %geri kazanım ve BSS değerleri hesaplandı. Standart ekleme çözeltilerine ait istatistiksel veriler Çizelge 3.7'de verildi.

Çizelge 3.7. UPLC yönteminin standart ekleme numunelerine uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.

Ticari ürün adı	Eklenen ($\mu\text{g/mL}$)		Bulunan ($\mu\text{g/mL}$)		Geri kazanım (%)		BSS (%)	
	KAF	PS	KAF	PS	KAF	PS	KAF	PS
BGS	4	15	5,50	4,04	99,9	100,9	1,94	2,14
BGS	8	25	10,48	7,94	99,8	99,3	2,16	2,50
BGS	12	35	20,54	15,60	100,2	97,5	1,15	0,91

BGS: Burn Gold Spark Enerji içeceği

%BSS : Bağıl Standart sapma

Bir kromatografik analizde, seçicilik, kolonun pik ayırma kapasitesi, pik asimetrisi, seçicilik, teorik tabaka sayısı, kuyruklanma faktörü gibi sistem uygunluk parametreleri, analizde uygulanan UPLC yönteminin doğruluğu ve kesinliği hakkında bilgi vermektedirler. KAF ve PS bileşenlerinin ayrılması için uygulanan UPLC yönteminde, Acquity Waters Empower 2 programı tarafından hesaplanan sistem uygunluk testi parametrelerine ait değerler Çizelge 3.8’de verilmiştir (Bıyık, 2017; Ertekin Özkan, 2021).

Çizelge 3.8. UPLC yöntemiyle KAF ve PS analizinde elde edilen system uygunluk değerleri.

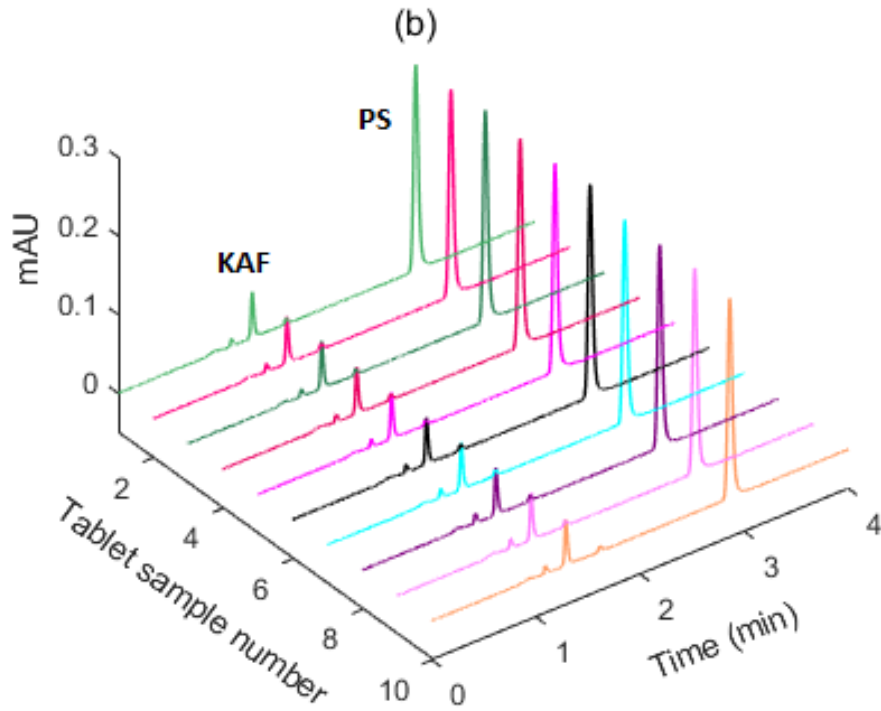
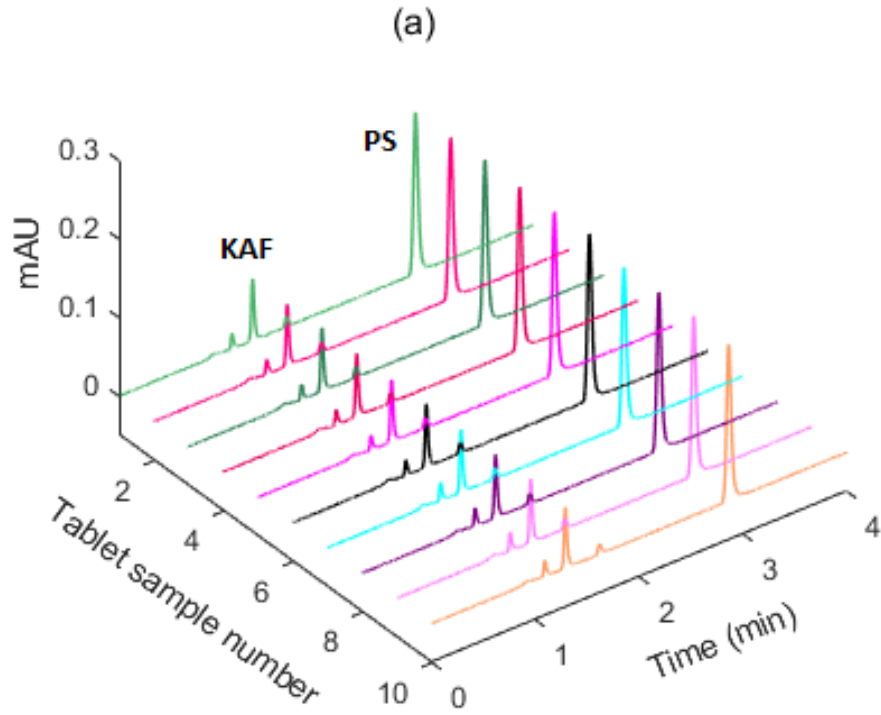
Sistem Uygunluk parametresi	Bulunan Değer	Referans Değer
Seçicilik (α)	2,90	>1
Kolon ayırma gücü (R_s)	5,39	$\geq 1,5$
Pik asimetri	1,33	0,9-1,4
Kuyruklanma faktörü (T)	1,23	<2
Teorik tabaka sayısı (N)	16400	>2000

UPLC Yönteminin Ticari Enerji İçeceği (I) Analizine Uygulanması

Tam faktöriyel tasarım metodoloji kullanılarak geliştirilen ve valide edilen yeni UPLC yönteminin uygulanabilir olup olmadığı KAF ve PS içeren ticari enerji içeceği (I) numunesi (BGS) ile test edildi. Bunun için BGS enerji içeceği numunesi iyice çalkalandı ve daha sonra geniş bir behere alınarak ultrasonic banyoda 25 dk boyunca degaze edildi. Bu sayede gazlı bir içecek olan BGS enerji içeceği içerisindeki gazlardan uzaklaştırıldı. Daha sonra numune PVDF (Poliviniliden Diflorür) şırınga filtre (Isolab, 0,22 μm gözenekli) ile süzölmüş ve ardından bu süzüntüden 1,0 mL alınarak 0,1 M HCl çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlandı. Bu numune çözeltisinden ayrı ayrı 10 adet hazırlandı.

Hazırlanan çözelti viallere konulduktan sonra optimizasyon çalışmaları ile belirlenen optimal kromatografik koşullar altında kromatografik ayırımın gerçekleşmesi için UPLC enjeksiyon sistemi tarafından sisteme enjekte edildi. Ticari enerji içeceği (I)'in içeriğinde bulunan KAF ve PS'nin her birinin maksimum absorbans verdiği farklı dalga boylarındaki kromatogramları Şekil 3.5'de verilmiştir. Şekil 3.5 yöntemin doğru ve uygulanabilir bir yöntem olduğunu gözler önüne sermektedir.





Şekil 3.5. UPLC yönteminin ticari enerji içeceği (I) numunesine uygulanması ile elde edilen **(a)** KAF'ın (en fazla 15 µg/mL) maksimum absorbans verdiği 272,4 nm dalga boyundaki kromatogramları ve **(b)** PS'nin maksimum absorbans verdiği 262,9 nm dalga boyundaki kromatogramlar.

Ticari enerji ieeği (I) içerisindeki KAF ve PS'nin geliştirilen yeni UPLC yöntemiyle miktar tayinleri deneysel tasarım ve optimizasyon çalışmaları ile belirlenen kromatografik koşullar altında gerçekleşti. UPLC yöntemiyle elde edilen kromatografik cevaplar kalibrasyon çözeltisinde yerine konuldu ve bulunan bu değerlerden numunedeki KAF ve PS miktarları hesaplandı. Bulunan bu değerler ticari enerji ieeği (I) numunesinin ambalajında belirtilen miktarlarla karşılaştırıldı. Enerji ieeği (I) numunesinin ambalajında koruyucu bir madde olan PS'nin miktarı belirtilmezken, KAF miktarı maksimum 150 mg/L olarak belirtilmiştir. UPLC analizi sonucunda bulunan KAF miktarı (148,9 mg/L) ile ticari enerji ieeği (I)'in ambalajında belirtilen KAF miktarı karşılaştırıldığında, deneysel olan elde edilen miktarlarla ambalaj üzerindeki miktarın uyum içerisinde olduğu görüldü. UPLC yönteminin ticari enerji ieeği (I)'e uygulanması ile bulunan istatistiksel sonuçlar izelge 3.9'te sunuldu.

Çizelge 3.9. UPLC yönteminin enerji içeceği (I) numunesinde KAF ve PS'nin eş zamanlı miktar analizlerine uygulanmasıyla elde edilen istatistiksel sonuçlar.

Numune No	mg/L	
	KAF	PS
1	147,6	214,0
2	147,6	213,2
3	150,8	218,2
4	149,1	216,1
5	147,5	214,9
6	149,3	220,3
7	149,0	209,0
8	149,8	210,3
9	152,7	212,5
10	145,4	207,9
$\bar{X}$	$148,88 \pm 0,65$	$213,6 \pm 1,32$
SS	2,07	4,18
%BSS	1,39	1,96

$\bar{X}$: Aritmetik ortalama
SS : Standart sapma
BSS : Bağlı standart sapma
Etiket değeri : Kafein (en fazla 150 mg/l), PS miktar belirtilmemiş

Ticari enerji içeceği (I)'in kromatografik analizinde, numune içeriğinde yer alan KAF ve PS için bulunan miktarlar sırasıyla 148,9 mg/L ve 213 mg/L'dir. Bu alışma ile hesaplanan standart sapma (SS) değerleri KAF için 2,07 ve PS için 4,18; BSS değerleri ise KAF için 1,39 ve PS için 1,96'dır.

3.2. Ticari Enerji İçeceği (II)'de Dört Bileşen Analizi

Doktora tez çalışmasının bu bölümünde Ticari enerji içeceği (II) içerisinde yer alan B3, SB, PS ve KAF bileşiklerinin eş zamanlı miktar tayinleri için deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojisi ile belirlenen optimal kromatografik şartların kullanıldığı yeni bir UPLC metodu geliştirilmiştir.

3.2.1. Dört Bileşen Analizi için Deneysel Tasarım ve Optimizasyon ile UPLC Yönteminin Geliştirilmesi

Bu doktora tez çalışmasında enerji içeceği (II)'in içeriğinde bulunan B3, SB, PS ve KAF'ın kantitatif analizleri için yeni bir UPLC yöntemi geliştirilmiştir. UPLC yönteminin geliştirilmesinde optimal kromatografik şartların belirlenmesi için kemometrik optimizasyon metodolojisi kullanılmıştır. Optimizasyon çalışmalarında, uygun kromatografik şartların bulunması için öncelikle cevap yüzey faktörünün belirlenmesi gerekmektedir. Ticari enerji içeceği (II)'deki dedeksiyon sınırları içerisinde yer alan B3, SB, PS ve KAF'ın eş zamanlı miktar analizleri için gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları için aşağıdaki işlem basamakları uygulanmıştır:

- 1- Basamak: Bu basamakta yapılan bir takım ön deneyler ile öncelikle deney için en iyi kromatografik ayırımın sağlandığı analitik kolon (C_{18} kolonu) ve tampon çözelti 0,5 mL/L TEA içeren 0,08 M $(NH_4)_2CO_3$ belirlenmiştir. Daha sonra tüm faktörler ayrı ayrı değerlendirilerek B3, SB, PS ve KAF ayırımı üzerinde etkili olan faktörlerin; kolon sıcaklığı, hareketli faz

bileşiminde yer alan tampon yüzdesi ve akış hızı olduğu görüldü. Bu aşamada bileşenlerin kolon sıcaklığı ($^{\circ}\text{C}$) (X_1), hareketli faz bileşimindeki tampon çözelti (0,5 mL/L TEA içeren 0,08 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) yüzdesi (X_2) ve kolon sisteminde hareketli fazın akış hızı (X_3) kromatografik değişkenler olarak seçildi.

- 2- Basamak: İlk basamaktaki çalışmalarla faktörler belirlenmiş ve daha sonra 2. Basamak olan faktör seviyelerinin belirlenmesi aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada bir deney uzayı belirlemek amacıyla her bir faktör ayrı ayrı değerlendirilerek, faktörlerin en düşük (-1) ve en yüksek (+1) seviyeleri tespit edilmiştir. Kromatografik ayırım üzerine etkili olan faktörlerin seviyelerine karşılık gelen sayısal değerler Çizelge 3.10'da sunulmuştur.

Çizelge 3.10. Enerji içeceği (II)'in deneysel tasarımı için UPLC yönteminin uygulanmasıyla belirlenen faktörler, çalışma aralıkları ve seviyeler.

Seviye	Kolon Sıcaklığı ($^{\circ}\text{C}$)	Tampon (%)	Akış Hızı (mL/dk)
	X_1	X_2	X_3
-1	30	42	0,17
0	47	53	0,22
1	64	64	0,27

Tampon İçeriği: 0,5 mL/L TEA içeren 0,08 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$
Seviyeler : Düşük (-1), orta (0), yüksek (+1)
 X_1 : Kolon sıcaklığı ($^{\circ}\text{C}$)
 X_2 : Hareketli fazdaki mobil faz yüzdesi (%)
 X_3 : Hareketli faz akış hızı (mL/dk)

- 3- Basamak: Bu basamakta seviyeleri belirlenen tüm faktörler birlikte ele alınarak, her bir faktörün en düşük (-1), orta (0) ve en yüksek (+1) seviyeleri kombine edilerek bir deney tasarımı gerçekleştirilmiştir.

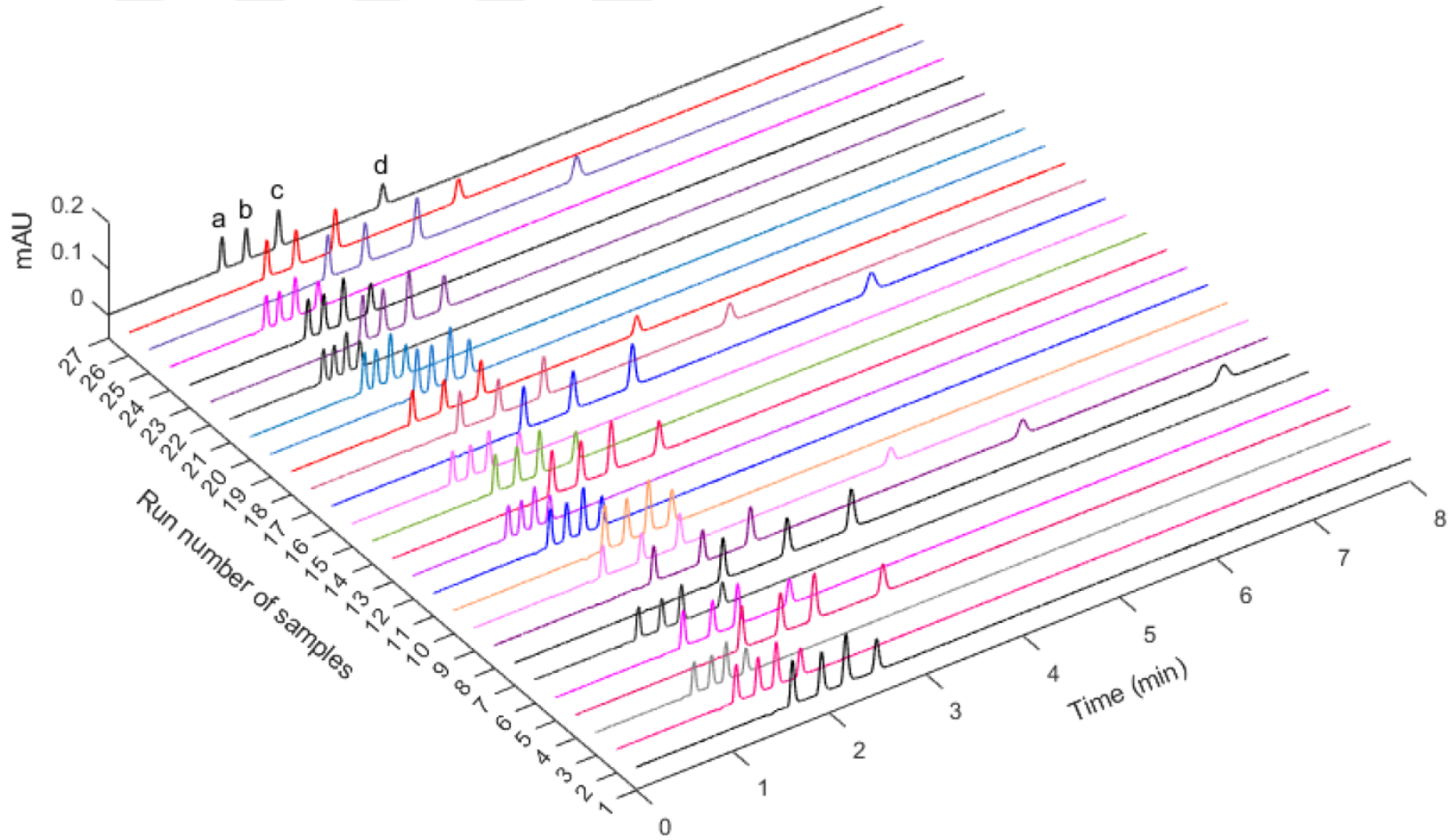
- 4- Basamak: Bu aşamada 3. Basamakta oluşturulan deney tasarımında belirlenen şartlarla farklı deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasında deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojilerinden tam faktöriyel tasarım kullanıldığı için üç faktör ve üç seviyeden oluşan (3^3) 27 farklı deney gerçekleştirildi.
- 5- Basamak: Bu basamakta yapılan 27 farklı her deneyin 230 nm'deki kromatografik cevaplarından denklem 2.18 kullanılarak bir modelleme yapıldı. Bu modelleme ile deney üzerinde en etkili olan faktör belirlenmiş oldu.
- 6- Basamak: Son olarak bu basamakta optimizasyon çalışması için gerçekleştirilen 27 farklı deneyden alınan cevaplara uygulanan bir takım matematiksel ve istatistiksel uygulamalar ile ticari enerji içeceği (II)'nin içğinde yer alan ve dedekte edilebilen B3, SB, PS ve KAF'ın eş zamanlı miktar tayinleri için en kısa sürede en iyi ayırımın sağlandığı kromatografik şartlar belirlendi.

UPLC yönteminin geliştirilmesinde kullanılan model, kromatografik deneysel koşulların optimizasyonunda tam faktöriyel tasarımı ve regresyon analiziyle elde edilen ikinci dereceden kuadratik bir denklem ile oluşturulmuştur.

Deneysel tasarım ve optimizasyon çalışmalarıyla kromatografik şartların belirlenmesinde, optimizasyon işlemi öncesinde yapılan bir takım önçalışmalarda numune içerisinde bulunan B3, SB, PS ve KAF dışında diğer bileşenlerin (numune matriksinin) kromatografik analizde girişim yaptığı gözlemlendi ve bu nedenle optimizasyon işlemi B3 (20 µg/mL), SB (15 µg/mL), PS (16 µg/mL) ve KAF (20 µg/mL) karışımından oluşan bir sentetik bir çözelti üzerinden gerçekleştirildi. Optimizasyon çalışmasından elde edilen kromatogramlar Şekil 3.6'da verilmiştir.

EDO metodolojisi ile belirlenen kromatografik şartlarda geliştirilen UPLC metodu valide edilmiş ve ardından yöntemin güvenilirliği ve uygulanabilirliği B3, SB, PS ve KAF içeren ticari enerji içeceğine uygulanarak test edilmiştir.





Şekil 3.6. B3 (a), SB (b), PS (c) ve KAF (d)'nin sentetik karışımlarına uygulanan ve şartları deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojisi kullanılarak oluşturulan 27 farklı kromatografik şarta sahip deneyin 230 nm'deki dedeksiyonla elde edilen kromatogramları.

UPLC yönteminin geliştirilmesi amacıyla yararlanılan EDO metodolojisi kapsamında üç faktör üç seviyeden oluşan (3^3) tam faktöriyel tasarım matrisinde 27 farklı kromatografik deney gerçekleştirildi. Optimizasyon çalışması için oluşturulan FFD planı Çizelge 3.11’de sunulmuştur.

Çizelge 3.11. Ticari enerji içeceği (II)’ye tam faktöriyel tasarım uygulanmasıyla hesaplanan KCF değerleri.

Deney No	Sıcaklık (°C) X_1	Tampon (%) X_2	Akış Hızı (mL/dk) X_3	KCF	
				Ölçülen	Tahmin edilen
1	-1	-1	-1	7,6644	7,8687
2	-1	-1	0	3,6558	3,3570
3	-1	-1	1	2,6030	2,4492
4	-1	0	-1	16,5951	17,3455
5	-1	0	0	9,1385	9,4800
6	-1	0	1	5,3302	5,2183
7	-1	1	-1	33,3778	32,2827
8	-1	1	0	20,9064	21,0634
9	-1	1	1	13,2414	13,4478
10	0	-1	-1	6,1819	5,9407
11	0	-1	0	3,1661	2,9545
12	0	-1	1	3,4639	3,5721
13	0	0	-1	12,6910	12,7463
14	0	0	0	6,5568	6,4062
15	0	0	1	3,8520	3,6699
16	0	1	-1	24,7637	25,0122
17	0	1	0	14,9191	15,3183
18	0	1	1	9,2538	9,2282
19	1	-1	-1	4,9661	4,9404
20	1	-1	0	3,4667	3,4796
21	1	-1	1	5,0169	5,6227
22	1	0	-1	9,1442	9,0747
23	1	0	0	4,6781	4,2601
24	1	0	1	3,2644	3,0493
25	1	1	-1	18,4965	18,6694
26	1	1	0	10,3326	10,5010
27	1	1	1	6,1680	5,9363

Tampon bileşimi: 0,5mL/L TEA içeren 0,08 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$

Seviyeler : Düşük (-1), orta (0), yüksek (+1)

X_1 : Kolon sıcaklığı (°C)

X_2 : Hareketli fazdaki mobil faz yüzdesi (%)

X_3 : Hareketli faz akış hızı (mL/dk)

Çizelge 3.11’de belirtilen her bir 27 deney için de UPLC kromatogramları çizdirilmiştir. B3, SB, PS ve KAF’ın eş zamanlı analizlerinin yapılabilirdiği, en iyi ayırımın sağlandığı optimum kromatografik koşullar, optimizasyon çalışması için yapılan 27 farklı deneyden elde edilen kromatografik cevaplara, matematiksel ve istatistiksel işlemlerin uygulanmasıyla hesaplanan KCF değerleri üzerinden bulunmuştur. B3, SB, PS ve KAF bileşiklerinden oluşan sentetik karışım üzerinden gerçekleştirilen 27 farklı kromatografik analiz ve bu analizlerin cevaplarından hesaplanan KCF değerleri Çizelge 3.11’da sunulmuştur.

KCF değerleri (Bölüm 2.2.2)’de açıklandığı gibi, bir kromatografik çalışmada, en kısa alıkonma süresinde bir çözeltideki analitlerin maksimum ayırımının sağlandığı bir matematiksel fonksiyondur (Rakic ve ark., 2012). Ticari enerji içeceği (II) analizi için geliştirilen yeni UPLC yönteminin optimizasyonunda faktörler (X_1 , X_2 ve X_3) ve bu faktörler arasındaki etkileşimler ile KCF arasındaki matematiksel ilişki kullanılarak ikinci dereceden polinomial bir denklem elde edilmiş ve aşağıda sunulmuştur;

$$y = 6,4062 - 2,6099X_1 + 6,1819X_2 - 4,5382X_3 + 0,4639X_1^2 + 2,7302X_2^2 + 1,8019X_3^2 - 2,6712X_1X_2 + 1,5254X_1X_3 - 3,3539X_2X_3$$

Burada y KCF’yi, X_1 , X_2 ve X_3 faktörleri, X_1X_2 , X_1X_3 ve X_2X_3 faktörler arası etkileşimleri, X_1^2 , X_2^2 , ve X_3^2 ise faktörlerin karesini ifade etmektedir. Denklemdaki sayılar, kesim ve model katsayılarını göstermektedir ve bu katsayıların anlamlı olup olmadığı istatistiksel testlerle ortaya konmuştur. Bu denklemde X_2 ’nin katsayısının yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuç B3, SB, PS ve KAF analizi üzerindeki etkili faktörün hareketli faz içerisindeki tampon yüzdesinin olduğunu gösterdi. Test sonuçlarından elde edilen verilere göre p- değeri <0,05 olduğu için seçilen faktörlerin ve faktör etkileşimlerinin cevap üzerinde oldukça etkin olduğu belirlendi. Test sonuçları Çizelge 3.12’de sunulmuştur..

Çizelge 3.12. İkinci dereceden polinomiyal fonksiyon için bulunan istatistiki t- ve F-testlerinin sonuçları.

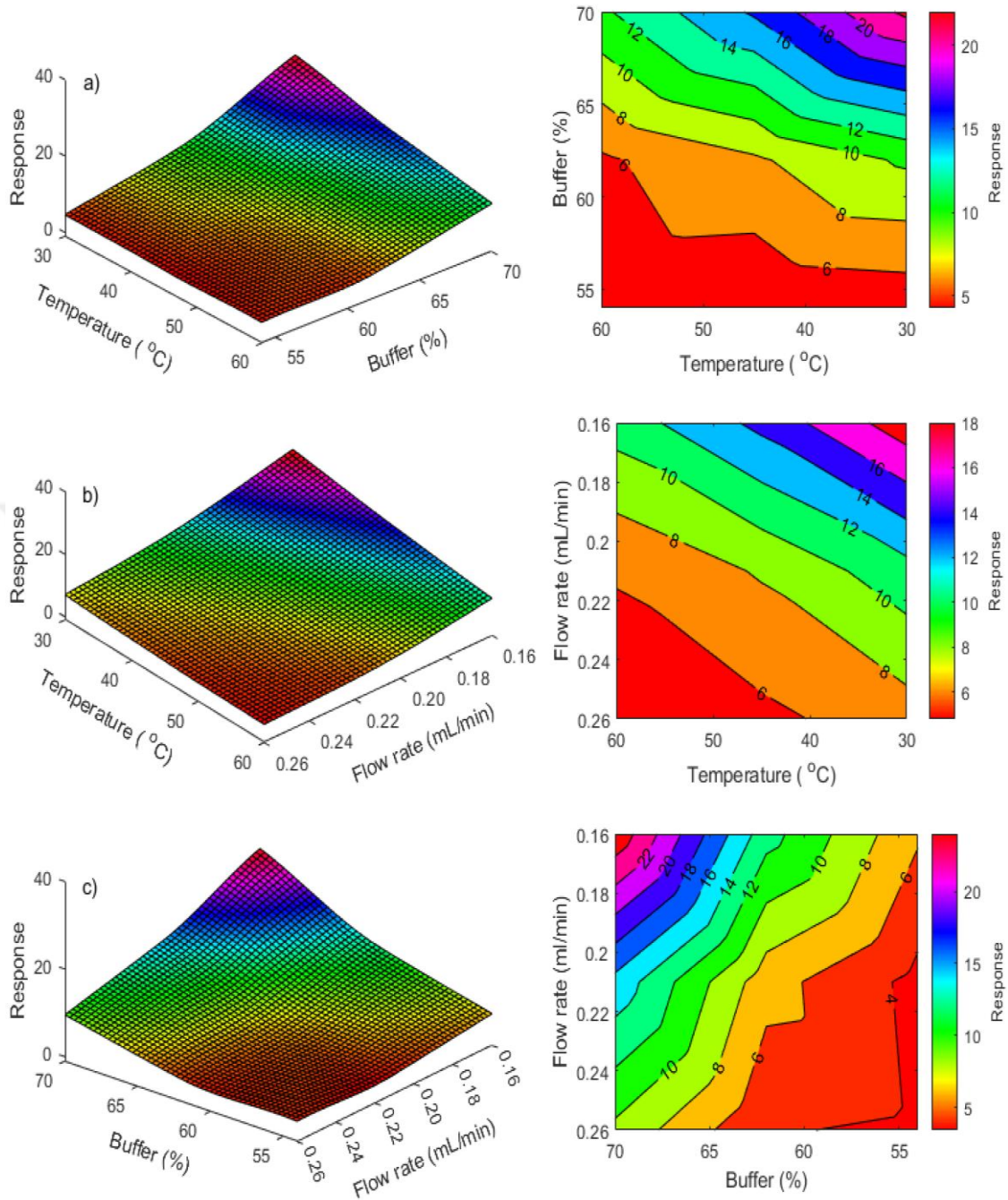
Parametre	Katsayılar	Standart Hata	t-testi	P-değeri
Kesim Noktası	6,4062	0,2214	28,9347	0,0000
X_1	-2,6099	0,1025	-25,4656	0,0000
X_2	6,1819	0,1025	60,3177	0,0000
X_3	-4,5382	0,1025	-44,2795	0,0000
X_1^2	0,4639	0,1775	2,6130	0,0182
X_2^2	2,7302	0,1775	15,3799	0,0000
X_3^2	1,8019	0,1775	10,1505	0,0000
X_1X_2	-2,6712	0,1255	-21,2809	0,0000
X_1X_3	1,5254	0,1255	12,1527	0,0000
X_2X_3	-3,3539	0,1255	-26,7191	0,0000

X_1 : Kolon sıcaklığı (°C)
 X_2 : Hareketli fazdaki mobil faz yüzdesi (%)
 X_3 : Hareketli faz akış hızı (mL/dk)

B3, SB, PS, KAF bileşenlerinin eş zamanlı analizleri UPLC yönteminin geliştirilmesinde kullanılan EDO metodolojisinde ele alınan faktörler; kolon sıcaklığı (X_1), hareketli faz içerisindeki tampon yüzdesi (X_2) ve hareketli faz akış hızı (X_3) olarak belirlenmiştir. Bu faktörler ve faktör etkileşimleri ile KCF bağımlı değişkeni

arasındaki ilişkiyi belirten 3D cevap yüzey metodolojileri Şekil 3.7a-c’de sunulmuştur. Şekil 3.7a’da tampon (% 0,5 mL/L TEA içeren 0,08 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) yüzdesi arttıkça ve kolon sıcaklığı düştükçe KCF değerinin artış gösterdiği gözlenmiştir. Şekil 3.7b’de akış hızı ve kolon sıcaklığı azaldıkça KCF değerinin arttığı görülmektedir. Şekil 3.7c’de akış hızı azaldıkça ve tampon yüzdesi arttıkça KCF değeri de arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar grafiğin sağındaki eş yükselti eğri haritasından da görülebilmektedir. Bu yüzey-cevap metodolojilerinden elde edilen verilere göre seçilen faktörlerin arasındaki etkileşimlerin KCF üzerinde etkili olduğu görülmektedir.





Şekil 3.7. 3D cevap yüzey metodolojileri ve bunlara ait eş yükselti eğrileri

a) % 0,5 mL/L TEA içeren 0,08 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ve kolon sıcaklığı ile KCF, **b)** hareketli faz akış hızı ve kolon sıcaklığı ile KCF, **c)** hareketli faz akış hızı ve % 0,5 mL/L TEA içeren 0,08 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ile KCF arasındaki bağlantıyı ifade eden 3D cevap yüzey metodolojileri ve bunlara ait eş yükselti eğrileri.

Deneyisel tasarım ve optimizasyon metodolojilerinden tam faktöriyel tasarım ile B3, SB, PS ve KAF sentetik karışımının eş zamanlı analizi için belirlenen optimum kromatografik koşullar şu şekildedir; kolon sıcaklığı 52,7 °C, akış hızı

0,25 mL/min, enjeksiyon hacmi 0,8 µL, hareketli fazdaki 0,5 mL/L TEA içeren 0,08 M (NH₄)₂CO₃ yüzdesi %51,2. Burada hareketli faz H₂O: Metanol: 0,5 mL/L TEA içeren 0,08 M (NH₄)₂CO₃: 24,0: 24,8: 51,2 karışımında oluşmaktadır.

3.2.2. UPLC Yöntemiyle Ticari Enerji İçeceği (II)'nin Analizi

Standart Çözeltilerin Hazırlanması

1. B3, SB, PS ve KAF bileşenlerinin yeni geliştirilen UPLC metodu ile eş zamanlı analizleri için kullanılan sentetik çözeltiler bu bileşenlerin stok çözeltilerinden hazırlanmıştır. 0,1 M HCl içerisinde hazırlanan bu stok çözeltilerin konsantrasyonları şu şekildedir; B3 (10 mg/100 mL), SB (10 mg/100 mL), PS (20 mg/100 mL) ve KAF (10 mg/100 mL).
2. B3, SB, PS ve KAF stok çözeltilerinden B3 için 5,0- 25,0 µg/mL, SB için 4,0- 20,0 µg/mL, PS için 6,0- 30,0 µg/mL ve KAF için 5,0- 25,0 µg/mL konsantrasyon aralıklarında 5 farklı kalibrasyon çözeltisi hazırlanmıştır. Tüm çözeltiler 0,1 M HCl çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır.
3. Validasyon testi için aynı balon jojelerin içerisinde hazırlanan ve B3 için 5,0- 25,0 µg/mL, SB için 4,0- 20,0 µg/mL, PS için 6,0- 30,0 µg/mL ve KAF için 5,0- 25,0 µg/mL konsantrasyon seviyelerinde 27 farklı çözelti hazırlanmıştır.
4. Gün içi ve günler arası analizler için B3, SB, PS ve KAF stok çözeltilerinden hazırlanan ve her bir bileşiğin üç farklı konsantrasyon seviyesi ile hazırlanan çözeltiler kullanılmıştır. Bu çözeltiler; B3 için 6,0 µg/mL, 15,0 µg/mL ve 24,0 µg/mL; SB için 4,0 µg/mL, 12,0 µg/mL ve 20,0 µg/mL; PS için 8,0 µg/mL, 18,0 µg/mL ve 28,0 µg/mL ve KAF için 6,0 µg/mL, 15,0 µg/mL ve 24,0 µg/mL'dir.

5. Standart ekleme yöntemi için tüm çözeltilerinde aynı miktarda (0,5 mL/10 mL) ticari enerji içeceği ve farklı konsantrasyon seviyelerinde B3 (0 – 20,0 µg/mL), SB (0 – 16,0 µg/mL), PS (0 – 16,0 µg/mL) ve KAF (0 – 16,0 µg/mL) bulunan dört farklı standart ekleme çözeltisi oluşturulmuştur. Aynı balon jojelerin içerisinde hazırlanan bu çözeltilerde bulunan maddelerin konsantrasyonları şu şekildedir; B3 için 0 µg/mL, 5,0 µg/mL, 10,0 µg/mL ve 20,0 µg/mL; SB için 0 µg/mL, 4,0 µg/mL, 8,0 µg/mL ve 16,0 µg/mL; PS için 0 µg/mL, 4,0 µg/mL, 8,0 µg/mL ve 16,0 µg/mL ve KAF için 0 µg/mL, 4,0 µg/mL, 8,0 µg/mL ve 16,0 µg/mL'dir.

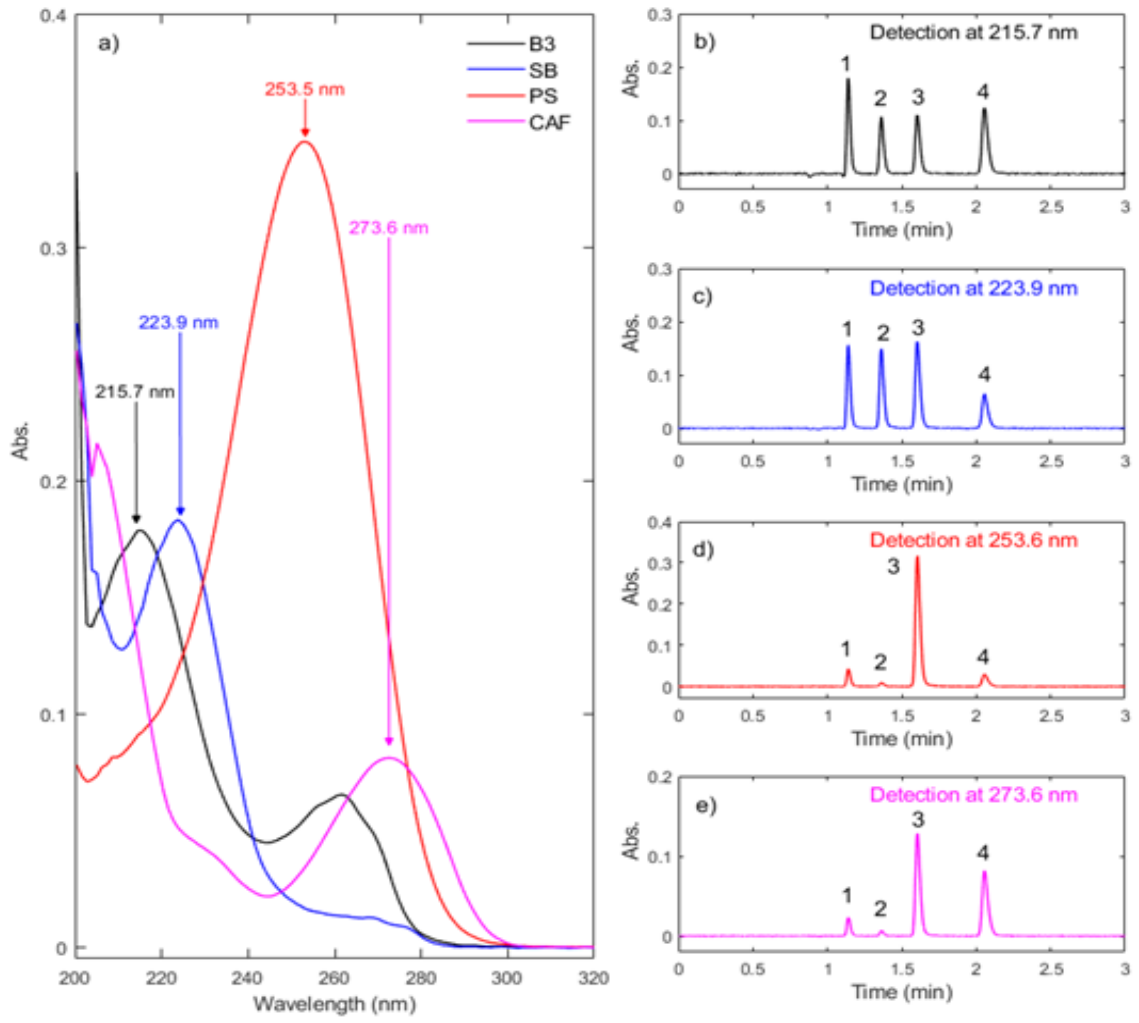
UPLC Yöntemiyle Belirlenen Kromatografik Şartlar

- Hareketli Faz: Ticari enerji içeceğindeki B3, SB, PS ve KAF bileşiklerinin kromatografik ayırımı için kullanılan hareketli faz; H₂O: Methanol (MeOH): 0,5 mL/L TEA içeren 0,08 M (NH₄)₂CO₃ (24,0: 24,8: 51,2, h/h/h) karışımından oluşmaktadır.
- Kolon: Waters Acquity ® BEH C₁₈ kolonu (100 mm x 2,1 mm i.d., 1,7 µm)
- Kolon Sıcaklığı: 52,7 °C
- Basınç: ~525 bar
- Akış Hızı: 0,25 mL/dk.
- Enjeksiyon Hacmi: 0,8 µL
- Dedeksiyon için seçilen dalga boyu: B3 için 215,7 nm, SB için 223,9 nm, PS için 253,5 nm ve KAF için 273,6 nm'dir.

Ticari enerji içeceği (II)'in analizi için geliştirilen UPLC yönteminde, hareketli faz bileşimi, kolon sıcaklığı ve hareketli fazın akış şartlarının belirlenmesi deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojisiyle gerçekleştirildi.

Kalibrasyon Denkleminin Hesaplanması

EDO metodolojisi ile geliştirilen UPLC yöntemiyle ticari enerji içeceği (II)'de bulunan B3, SB, PS ve KAF bileşiklerinin eşzamanlı miktar tayinlerinde kalibrasyon eğrileri, konsantrasyona karşı bileşiğin kromatografik pik alanının grafiğe geçirilmesiyle elde edildi. Bu işlemde önce, doğru bir dedeksiyon yapılabilmesi amacıyla her bir bileşiğin ayrı ayrı UPLC-PDA dedektörü aracılığıyla Şekil 3.8a'da da gösterildiği gibi UV spektrumları alındı ve bu spektrumlardan her bir bileşiğin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyları (B3 için 215,7 nm, SB için 223,9 nm, PS için 253,5 nm ve KAF için 273,6 nm) belirlendi. Daha sonra B3 için 215,7 nm'deki dedeksiyonla (Şekil 3.8b), SB için 223,9 nm'deki dedeksiyonla (Şekil 3.8c), PS için 253,5 nm'deki dedeksiyonla (Şekil 3.8d) ve KAF için 273,6 nm'deki dedeksiyonla (Şekil 3.8e) kromatografik pikler elde edildi.

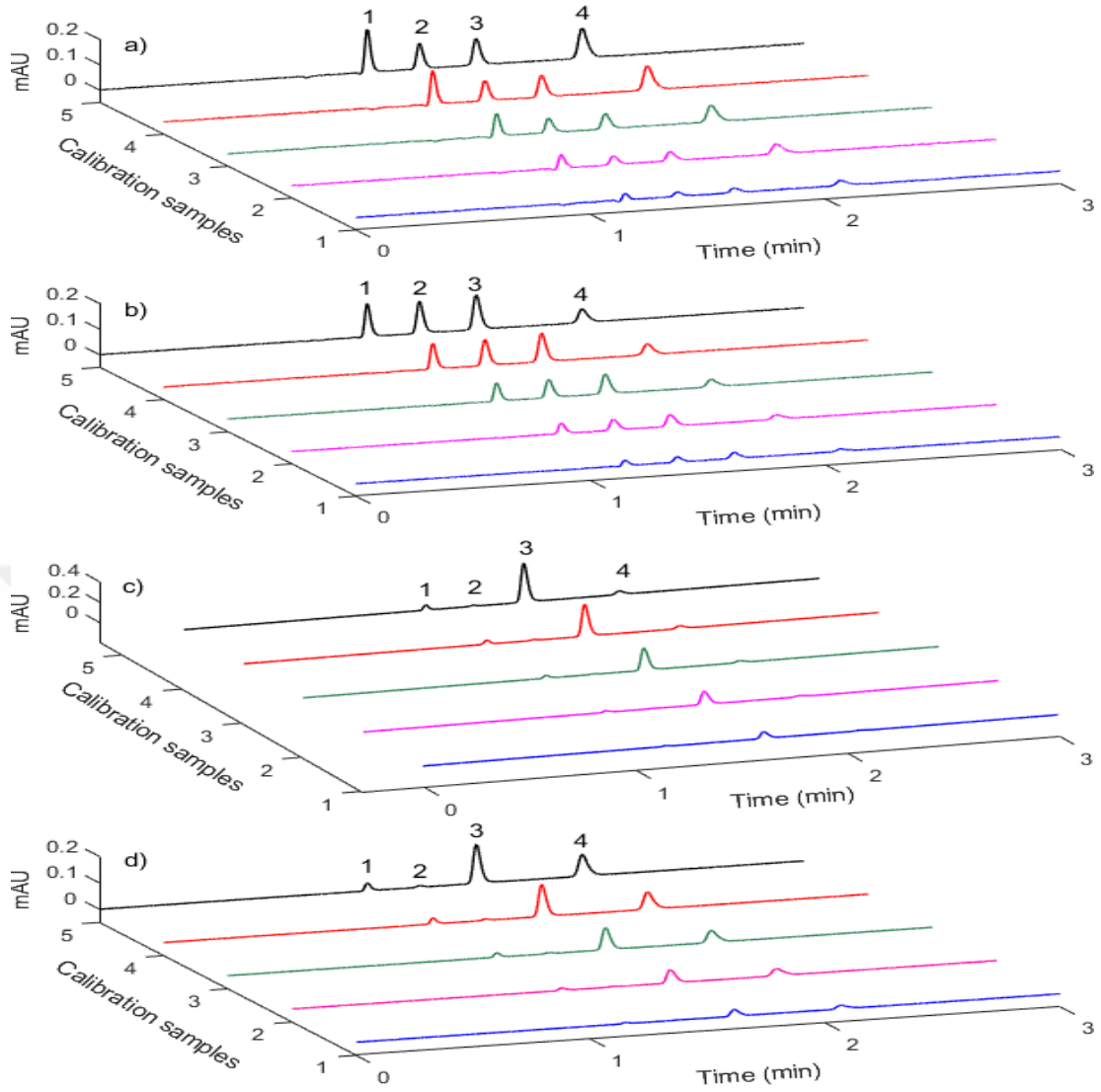


Şekil 3.8. B3, SB, PS ve KAF bileşiklerine ait UV spektrumları ve kromatogramları;

- B3, SB, PS ve KAF bileşenlerinin UV spektrumları,
- B3'ün maksimum absorbans yaptığı 215,7 nm'deki dedeksiyonla,
- SB'nin maksimum absorbans yaptığı 223,9 nm'deki dedeksiyonla,
- PS'nin maksimum absorbans yaptığı 253,6 nm'deki dedeksiyonla,
- KAF'ın maksimum absorbans yaptığı 273,6 nm'deki dedeksiyonla elde edilen kromatogramlar.

Bu maddelerin seçilen dalga boylarında kromatografik sistemde alıkonma süreleri B3 1,14 dk, SB 1,38 dk, PS 1,61 dk ve KAF 2,06 dk olarak tespit edildi (Şekil 3.9). Şekil 3.9'daki kromatografik cevaplar değerlendirilerek optimizasyon çalışmasında tüm bileşenlerin aynı anda kromatografik pik verdiği dalga boyu (230 nm) belirlenerek, bu dalga boyundaki kromatografik cevaplardan KCF değeri hesaplandı.





Şekil 3.9. B3, SB, PS ve KAF içeren kalibrasyon çözeltilerinin;

- a) B3'ün maksimum absorbans verdiği 215,7 nm'deki dedeksiyonla,
- b) SB'nin maksimum absorbans verdiği 223,9 nm'deki dedeksiyonla
- c) PS'nin maksimum absorbans verdiği 253,5 nm'deki dedeksiyonla ve
- d) KAF'ın maksimum absorbans verdiği 273,6 nm'deki dedeksiyonla elde edilen kromatogramları.

UV spektrumları alındı ve bu spektrumlardan her bir bileşimin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyları (B3 için 215,7 nm, SB için 223,9 nm, PS için 253,5 nm ve KAF için 273,6 nm) belirlendi. Daha sonra B3 için 215,7 nm'deki dedeksiyonla (Şekil 3.8b), SB için 223,9 nm'deki dedeksiyonla (Şekil 3.8c), PS için 253,5 nm'deki dedeksiyonla (Şekil 3.8d) ve KAF için 273,6 nm'deki dedeksiyonla (Şekil 3.8e) kromatografik pikler elde edildi.

Şekil 3.9'daki kromatogramlardan yararlanarak B3, SB, PS ve KAF bileşiklerinin her biri için ayrı bir doğru denklemi oluşturuldu. Doğru denkleminde bağımlı değişken ile bağımsız değişken arasındaki ilişkinin matematiksel bir ifadesi olarak her bir bileşen için regresyon denklemi ile elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 3.13'te sunulmuştur. Regresyon denkleminde her bir bileşen için ayrı ayrı R^2 (B3 için 0,9988, SB için 0,9964, PS için 0,9992 ve KAF için 0,9992), LOD (B3 için 1,00 µg/mL, SB için 1,37 µg/mL, PS için 0,84 µg/mL ve KAF için 1,01 µg/mL) ve LOQ (B3 için 3,34 µg/mL, SB için 4,55 µg/mL, PS için 2,80 µg/mL ve KAF için 3,37 µg/mL) değerleri hesaplandı.

Çizelge 3.13. Doğrusal regresyon analizi ve istatistiksel analiz sonuçları.

	B3	SB	PS	KAF
m	0,2653	0,2707	0,7167	0,5972
n	-0,7353	-0,1459	-0,0406	-0,0406
r	0,9994	0,9982	0,9996	0,9996
Kalibrasyon				
Aralığı	5,0-25,0 µg/mL	4,0-20,0 µg/mL	6,0-30,0 µg/mL	5,0-25,0 µg/mL
SH(m)	0,0053	0,00929	0,0121	0,0101
SH(n)	0,0885	0,1230	0,2010	0,2010
SH(r)	0,0116	0,0198	0,0098	0,0098
LOD	1,0000	1,3700	0,8400	1,0100
LOQ	3,3400	4,5500	2,8000	3,3700

m : Eğim

n : Kesim noktası

r : Korelasyon katsayısı

SH (m) : Eğimin standart hatası

SH (n) : Kesim noktasının standart hatası

SH (r) : Korelasyon katsayısının standart hatası

LOD : Gözlenebilme sınırı (µg/mL)

LOQ : Alt tayin sınırı (µg/mL)

Ticari enerji ieeği (II) numunesine ait kromatografik veriler UPLC-H-Class Empower2 programı ile bilgisayar tarafından kaydedildi ve buradan Microsoft Excell programına transfer edilerek Matlab 7,0 programında “m-file” yazılımı ile işlendi.

UPLC Yönteminin Geçerliliği

Çalışmanın bu bölümünde, ticari enerji ieeği (II)’nin içeriğinde yer alan B3, SB, PS ve KAF’ın eş zamanlı miktar tayinleri için geliştirilen ve kromatografik şartları EDO metodolojisi ile belirlenen UPLC yönteminin validasyonu gerçekleştirilmiştir. Yeni UPLC yönteminin kesinlik ve doğruluğu, her bileşenin 5 farklı konsantrasyon seviyelerinin kombinasyonu ile oluşturulan farklı konsantrasyonlardaki çok sayıda çözelti ile test edildi. Bu özeltiler, B3, SB ve KAF’ın 10 mg/100 mL’lik ve PS’nin de 20 mg/100 mL’lik stok çözeltilerinden, konsantrasyon seviyeleri B3 için 5,0- 25,0 µg/mL, SB için 4,0- 20,0 µg/mL, PS için 6,0- 30,0 µg/mL ve KAF için 5,0- 25,0 µg/mL aralığında olacak şekilde hazırlandı. Daha sonra bu çözeltilerden alınan cevaplardan her bir bileşenin %geri kazanım ve bağıl standart sapma (BSS) değerleri hesaplandı. %Geri kazanım değerleri B3 için %101,2, SB için %99,9, PS için %99,2 ve KAF için %99,6 olarak bulunmuştur. BSS değerleri ise; B3 için %2,46, SB için %1,79, PS için %1,92 ve KAF için ise %1,38 olarak bulunmuştur. UPLC yöntemi ile elde edilen validasyon çalışması sonuçları izelge 3.14’te verilmiştir.

Çizelge 3.14. Geliştirilen UPLC yöntemi ile B3, SB, PS ve KAF'ın miktar tayini için gerçekleştirilen validasyon çalışmasının istatistiksel sonuçları.

Kod	Eklenen (µg/mL)				Bulunan (µg/mL)				Geri Kazanım (%)			
	B3	SB	PS	KAF	B3	SB	PS	KAF	B3	SB	PS	KAF
1	8,5	4	6	5	8,53	4,05	5,84	4,71	100,3	101,4	97,4	94,2
2	8,5	8	12	10	8,60	8,23	12,19	9,99	101,2	102,9	101,6	99,9
3	8,5	12	18	15	8,65	11,83	17,69	14,93	101,7	98,6	98,3	99,6
4	8,5	16	24	20	7,90	15,78	23,18	19,78	93,0	98,6	96,6	98,9
5	8,5	20	30	25	8,58	19,81	29,52	24,83	101,0	99,1	98,4	99,3
6	5	8	6	5	5,05	8,26	5,97	5,06	101,0	103,3	99,6	101,2
7	10	8	12	10	10,30	7,92	12,08	9,99	103,0	99,0	100,7	99,9
8	15	8	18	15	15,17	7,97	17,37	14,98	101,1	99,6	96,5	99,9
9	20	8	24	20	20,38	8,11	23,46	19,93	101,9	101,4	97,7	99,7
10	25	8	30	25	25,32	8,03	29,56	24,75	101,3	100,4	98,5	99,0
11	5	4	24	5	5,00	4,07	24,13	4,97	99,9	101,7	100,6	99,3
12	10	8	24	10	10,27	7,81	24,01	10,00	102,7	97,6	100,0	100,0
13	15	12	24	15	15,08	11,75	23,88	15,09	100,5	97,9	99,5	100,6
14	20	16	24	20	21,18	16,12	24,07	19,93	105,9	100,7	100,3	99,7
15	25	20	24	25	24,81	19,95	23,94	25,08	99,3	99,7	99,7	100,3
16	5	4	6	15	5,10	4,06	6,26	15,03	101,9	101,5	104,4	100,2
17	10	8	12	15	10,09	7,86	11,72	15,13	100,9	98,2	97,7	100,8
18	15	12	18	15	15,04	12,17	17,83	14,93	100,3	101,5	99,1	99,5
19	20	16	24	15	20,66	15,80	23,66	14,98	103,3	98,7	98,6	99,9
20	25	20	30	15	25,12	19,45	28,97	15,14	100,5	97,2	96,6	100,9
21	8,5	8	24	15	8,94	7,83	24,14	14,96	105,2	97,9	100,6	99,8
Mean									101,2	99,9	99,2	99,6
SS									2,49	1,78	1,90	1,37
BSS									2,46	1,79	1,92	1,38

$\bar{X}$: Aritmetik ortalama

SS : Standart sapma

BSS : Bağlı standart sapma

Deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojilerinden tam faktöriyel tasarım ile geliştirilen UPLC yönteminin kesinliği ve tekrar edilebilirliği diğer bir validasyon çalışması olan gün içi ve günler arası çalışmaları ile test edildi. Bunun için aynı balon jojelerde farklı konsantrasyon seviyelerinde, içerisinde B3 (6,0, 15,0 ve 24,0 µg/mL), SB (4,0, 12,0 ve 20,0 µg/mL), PS (8,0, 18,0 ve 28,0 µg/mL) ve KAF (6,0, 15,0 ve 24,0 µg/mL) bulunan 3 farklı çözelti kullanıldı. Gün içi analizlerde B3, SB, PS ve KAF karışımından oluşan çözeltilerin kromatografik cevapları aynı gün birer saat aralıklarla ve günler arası çözeltilerde ise birbirini izleyen üç günde üçer tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Hesaplanan yüzde geri kazanım (%), bağıl standart sapma (%BSS) ve bağıl standart hata (%BSH) değerlerine bakılarak yöntem test edilmiştir. Analiz sonuçları Çizelge 3.15'te verilmiştir. Elde edilen veriler yöntemin enerji içecekleri numunelerinde B3, SB, PS ve KAF eş zamanlı analizleri için başarılı ve güvenilir bir yöntem olduğunu göstermiştir.

Çizelge 3.15. UPLC yönteminin gün içi ve günler arası çözeltilerine uygulanması ise elde edilen istatistiksel veriler.

	Eklenen ($\mu\text{g/mL}$)				Bulunan ($\mu\text{g/mL}$)			
	B3	SB	PS	KAF	B3	SB	PS	KAF
Gün içi	6	4	8	6	6,07	4,03	8,00	6,10
	15	12	18	15	15,06	12,02	18,01	15,21
	24	20	28	24	24,20	19,78	28,10	23,97
Günler arası	6	4	8	6	6,09	4,06	8,03	6,07
	15	12	18	15	14,93	11,92	17,74	15,19
	24	20	28	24	24,28	19,52	27,92	23,84
Geri Kazanım (%)								
Gün içi					101,2	100,7	100,0	101,6
					100,4	100,2	100,1	101,4
					100,8	98,9	100,4	99,9
Günler arası					101,5	101,4	100,3	101,2
					99,5	99,3	98,6	101,3
					101,1	97,6	99,7	99,3
BSS (%)								
Gün içi					1,26	2,22	1,58	1,12
					1,31	2,33	1,01	1,00
					1,40	1,76	1,10	2,41
Günler arası					1,59	0,33	2,34	1,36
					1,07	1,20	1,72	1,70
					1,03	1,02	1,20	2,27
SH (%)								
Gün içi					1,21	0,69	-0,02	1,65
					0,40	0,16	0,06	1,41
					0,82	-1,10	0,35	-0,14
Günler arası					1,51	1,44	0,33	1,24
					-0,46	-0,66	-1,42	1,26
					1,15	-2,42	-0,29	-0,67

BSS : Bağıl standart sapma

SH : Bağıl standart hata

n : 3

Ticari enerji ieeği (II)’de içecekte bulunan B3, SB, PS ve KAF bileşikleri dışındaki diğer bileşenlerin (numune matrisinin) analiz üzerine etkisini araştırmak için standart ekleme metodundan yararlanılmıştır. Her birinde sabit miktarda (0,5 mL/10 mL) ticari enerji ieeği (II) bulunan ve farklı konsantrasyonlarda B3 (0 – 20,0 $\mu\text{g/mL}$), SB (0 – 16,0 $\mu\text{g/mL}$), PS (0 – 16,0 $\mu\text{g/mL}$) ve KAF (0 – 16,0 $\mu\text{g/mL}$) içeren 4 farklı içeriğe sahip standart ekleme çözeltileri hazırlanmıştır. Burada sadece ilk standart ekleme çözeltisine (SE0) B3, SB, PS ve KAF’ın standart çözeltilerinden ekleme yapılmamıştır. Diğer standart ekleme çözeltilerinde ise eklenen 0,5 mL ticari enerji (II) numunesine ek olarak her bir bileşene ait standart çözeltilerden de ekleme yapıldı. SE1, SE2 ve SE3 standart ekleme çözeltilerinde bulunan standart madde konsantrasyonları SE1 çözeltisinde 5,0 $\mu\text{g/mL}$ B3, 4,0 $\mu\text{g/mL}$ SB, 4,0 $\mu\text{g/mL}$ PS ve 4,0 $\mu\text{g/mL}$ KAF; SE2 çözeltisinde 10,0 $\mu\text{g/mL}$ B3, 8,0 $\mu\text{g/mL}$ SB, 8,0 $\mu\text{g/mL}$ PS ve 8,0 $\mu\text{g/mL}$ KAF ve SE3 çözeltisinde 20,0 $\mu\text{g/mL}$ B3, 16,0 $\mu\text{g/mL}$ SB, 16,0 $\mu\text{g/mL}$ PS ve 16,0 $\mu\text{g/mL}$ KAF olacak şekilde hazırlandı. Bu zeltilerin deneysel tasarım ve optimizasyonla belirlenen analiz koşullarında kromatogramları alınarak, bu kromatogramlardan pik alanları hesaplandı ve bu değerler kalibrasyon denkleminde yerlerine konularak çözeltilerin içerisinde bulunan toplam B3, SB, PS ve KAF miktarları bulundu. Standart ekleme çözeltilerinde bulunan toplam B3, SB, PS ve KAF miktarlarından enerji ieeği numune ilavesinin çıkarılmasıyla, eklenen ve bulunan B3, SB, PS ve KAF miktarları karşılaştırıldı. Standart ekleme deneyinde farklı konsantrasyon seviyelerindeki her bir standart ekleme çözeltisinin üçerli tekrarlar halinde kromatografik cevapları kaydedildi ve elde edilen kromatografik cevapların ortalamaları alınarak enerji ieeği (II) numunesindeki B3, SB, PS ve KAF’nin ayrı ayrı %geri kazanım ve BSS değerleri hesaplandı. Elde edilen standart ekleme deneyi sonuçlarına göre her bir maddenin geri kazanım değerleri B3 için %98, SB için %99,8, PS için %99,4 ve KAF için %99,0; BSS değerleri ise B3 için %2,07, SB için %1,54, PS için %1,7 ve KAF için %1,47 olarak bulundu. Standart ekleme metodu ile elde edilen sonuçlar izelge 3.16’te sunulmuştur.

Çizelge 3.16. UPLC yönteminin standart ekleme numunelerine uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.

	Eklenen ($\mu\text{g/mL}$)				Bulunan ($\mu\text{g/mL}$)			
	B3	SB	PS	KAF	B3	SB	PS	KAF
FS	5	4	4	4	4,89	9,00	18,55	15,26
FS	10	8	8	8	9,83	8,94	18,18	15,18
FS	20	16	16	16	19,56	9,18	18,32	15,15
Geri kazanım (%)								
					97,9	101,7	97,4	99,4
					98,3	98,3	100,9	99,4
					97,8	99,4	99,9	98,2
BSS (%)								
					2,66	2,10	1,82	2,30
					2,33	1,04	1,51	1,62
					1,21	1,48	1,77	0,49

BSS: Bağıl Standart Sapma

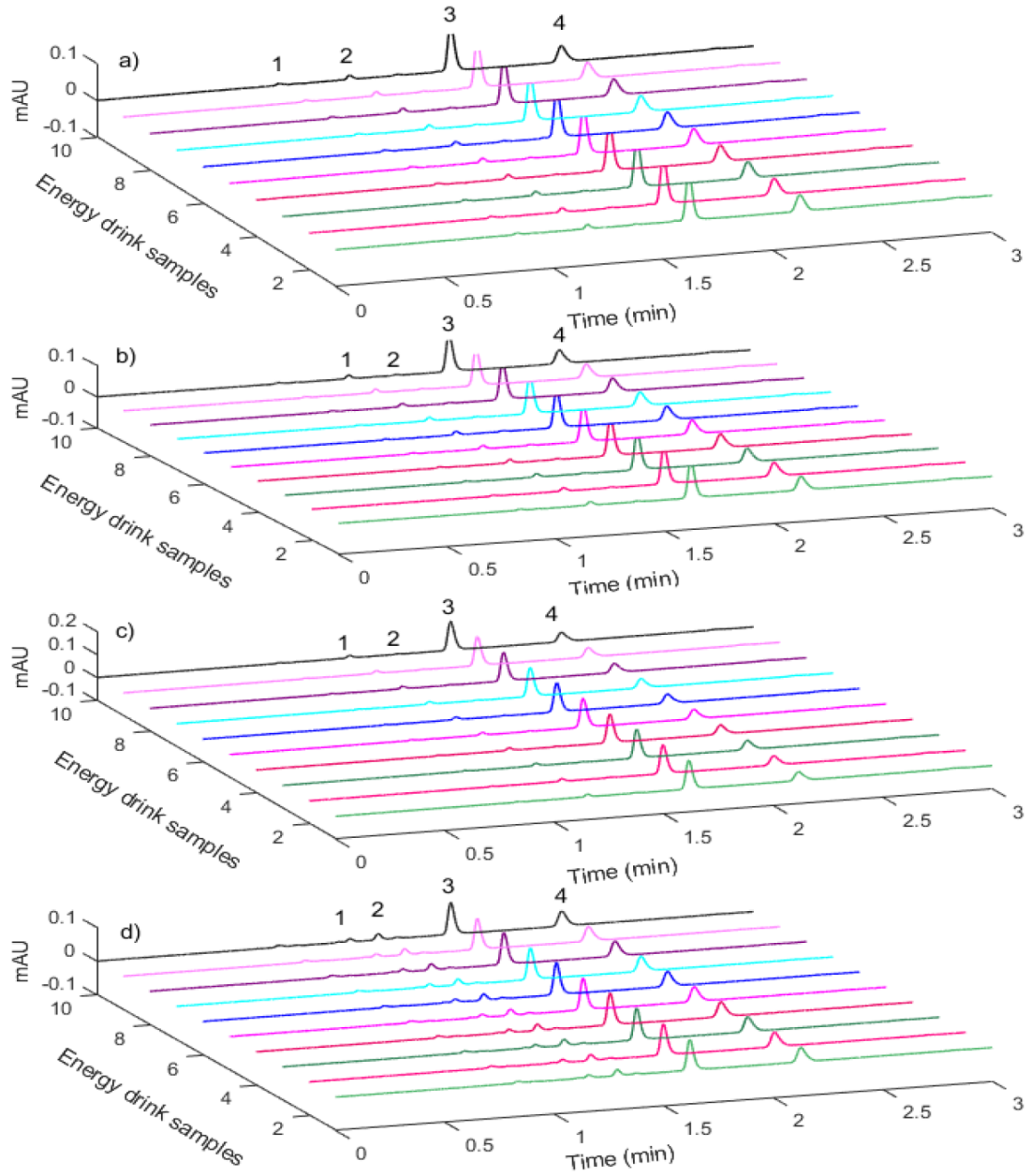
Bu doktora tez çalışmasında, ticari enerji içeceği (II) numunesinde B3, SB, PS ve KAF bileşenlerinin eş zamanlı tayini için uygulanan UPLC yönteminin doğruluğunu ve seçiciliğini test etmek için validasyon çalışmalarına ek olarak yöntemin sistem uygunluk parametreleri de değerlendirilmiştir. Bu parametreler (seçicilik, kolonun pik ayırma kapasitesi, pik asimetrisi, seçicilik, teorik tabaka sayısı, kuyruklanma faktörü) UPLC cihazında bulunan Acquity Waters Empower 2 programı ile hesaplanmıştır. Sistem uygunluk parametreleri ve değerleri Çizelge 3.17’de verilmiştir (Bıyık, 2017; Ertekin Özkan, 2021).

Çizelge 3.17. B3, SB, PS ve KAF karışımının analizi için geliştirilen UPLC yöntemlerine ait sistem uygunluk testi sonuçları.

Sistem Uygunluk parametresi	1	2	3	4	Referans Değer
Seçicilik (α)		1,34	1,27	1,40	>1
Kolon ayırma gücü (Rs)		4,82	4,51	7,15	$\geq 1,5$
Pik asimetri	1,55	1,42	1,39	1,25	0,9-1,4
Kuyruklanma faktörü (T)	1,41	1,32	1,26	1,18	<2
Teorik tabaka sayısı (N)	10600	11600	12800	13700	>2000

UPLC Yönteminin Ticari Enerji İçeceği (II) Analizine Uygulanması

Bu çalışma ile geliştirilen yeni UPLC yöntemi B3, SB, PS ve KAF içeren sentetik karışımlara uygulanarak sistem valide edildi. Validasyon çalışmalarında tatmin edici sonuçlar veren yeni UPLC tekniğinin uygulanabilirliğini test etmek amacıyla, geliştirilen yöntem B3, SB, PS ve KAF içeren ticari enerji içeceği (II) numunesine (AK47) uygulandı. Bunun için öncelikle, enerji içeceği (II) numunesi iyice çalkalandıktan sonra geniş bir behere alındı ve ultrasonik banyoda 25 dk boyunca degaze edildi. Bu şekilde gazı alınan enerji içeceği 0,20 µm gözenekli naylon şırınga filtre ile süzüldü ve ardından bu süzüntüden 0,5'er mL alınarak 0,1 M HCl çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti viallere konuldu ve daha sonra EDO metodolojisi ile belirlenen koşullar altında, UPLC yöntemi ile kromatografik ayırım sağlandı. Ticari enerji içeceği (II)'nin içerisinde yer bulunan B3, SB, PS ve KAF'ın her birinin maksimum absorbans verdiği farklı dalga boylarındaki kromatogramları Şekil 3.10'da verilmiştir.



Şekil 3.10. UPLC yönteminin ticari enerji içeceği (II) numunesine uygulanmasıyla B3, SB, PS ve KAF bileşenlerinin;
a) B3'ün maksimum absorbans verdiği 215,7 nm'deki dedeksiyonla,
b) SB'nin maksimum absorbans verdiği 223,9 nm'deki dedeksiyonla
c) PS'nin maksimum absorbans verdiği 253,5 nm'deki dedeksiyonla ve
d) KAF'ın maksimum absorbans verdiği 273,6 nm'deki dedeksiyonla elde edilen kromatogramları.

Ticari enerji ieeği (II) içerisindeki B3, SB, PS ve KAF'ın miktar tayinleri için ise tam fakt6riyel tasarım ile belirlenen optimal kromatografik şartlar kullanılarak analiz gerçekleştirildi. Ticari enerji ieeği (II)'den elde edilen kromatografik veriler kalibrasyon grafiğinde yerine konuldu ve buradan numunedeki s6z konusu bileşenlerin miktar tayinleri gerçekleştirildi. UPLC analizi sonucunda bulunan B3, SB, PS ve KAF miktarları ile ticari enerji ieeği (II)'nin ambalajında belirtilen miktarlar karşılaştırdı ve deneysel olan elde edilen miktarlarla ambalaj 6zerindeki miktarların uyum içerisinde olduğu g6r6ld6. Enerji ieeğinde koruyucuların miktarları (PS ve SB) belirtilmezken, B3 miktarı 8,0 mg/100 mL ve KAF miktarı en fazla 150 mg/L olarak belirtilmiştir. B3 için geri kazanım %100,25, BSS değerı %1,86; KAF için ise geri kazanım %101,27 ve BSS %0,73 bulunmuştur. (izelge 3.18).

Çizelge 3.18. UPLC yönteminin ticari enerji içeceği (II) numunesine uygulanmasıyla numunede bulunan B3, SB, PS ve KAF miktarları.

	mg/100 mL			
	B3	SB	PS	KAF
1	7,92	9,04	17,90	15,04
2	8,09	9,25	18,69	15,09
3	8,16	9,33	18,38	15,30
4	7,93	9,38	18,69	15,40
5	7,84	8,79	18,56	15,18
6	7,93	8,83	18,39	15,19
7	8,30	9,03	17,95	15,16
8	8,13	8,92	18,69	15,29
9	7,85	8,87	17,89	15,09
10	8,00	9,18	18,32	15,15
$\bar{X}$	8,02	9,06	18,35	15,19
SS	0,15	0,21	0,33	0,11
BSS	1,86	2,36	1,80	0,73

$\bar{X}$: Aritmetik ortalama

SS : Standart sapma

BSS : Bağıl standart sapma

Etiket değeri : B3 miktarı 8 mg/100 mL, kafein (en fazla 150 mg/l), PS miktar belirtilmemiş

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, ticari enerji içeceklerinde (ticari enerji içeceği (I) ve ticari enerji içeceği (II)) bulunan ve dedeksiyon sınırları içerisinde yer alan bileşenlerin (B3, SB, PS ve KAF) eş zamanlı analizleri için deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojisi ile yeni UPLC metodları geliştirildi. Geliştirilen bu yöntemler ile ticari enerji içeceği (I)'de KAF ve PS'nin, ticari enerji içeceği (II)'de ise B3, SB, PS ve KAF'ın eş zamanlı analizleri gerçekleştirildi. Literatürde, ticari enerji içeceklerinde bulunan söz konusu bileşenlerin eş zamanlı tayinleri için EDO metodolojisi ile oluşturulmuş UPLC yöntemlerinin olmadığı tespit edilmiş ve literatürdeki bu eksikliği gidermek için bu tez çalışması gerçekleştirildi.

Bu doktora tez çalışmasında geliştirilen UPLC yöntemlerinde analiz için uygun kromatografik şartların belirlenmesinde öncelikle deney üzerinde etkili olan faktörler (kolon sıcaklığı, hareketli faz tampon yüzdesi ve hareketli faz akış hızı) belirlendi ve ardından tam faktöriyel tasarım ile bu faktörlerin her birinin üç farklı seviyesi (+1, 0 ve -1) ile 27 (3^3) çeşit deney tasarlandı (Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.11). Daha sonra her bir deneyin kromatografik cevaplarından modelleme ile KCF değerleri hesaplandı ve analizlerde maksimum kromatografik ayırmanın sağlandığı en kısa alıkonma süresi belirlendi. Optimizasyon çalışmalarının ardından, belirlenen kromatografik şartlarla yöntemler valide edilerek ticari enerji içeceği numunelerine başarıyla uygulandı.

Ticari enerji içeceği (I)'in analizinde, içecek içerisindeki maddelerden KAF ve PS'nin kromatografik analizi için yeni bir UPLC metodu geliştirilmesi hedeflendi. UPLC yönteminin geliştirilmesi için deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojisi kullanıldı. Ticari enerji içeceği (I) için yapılan ön çalışmalarda, numune içerisinde yer alan KAF ve PS dışındaki diğer bileşenlerin analiz üzerinde etkili olmadığı görüldü. Bu nedenle enerji içeceği (I)'in optimizasyon çalışmaları numune üzerinden gerçekleştirildi. Optimizasyon çalışmalarında seçilen faktörler kolon sıcaklığı ($^{\circ}\text{C}$) (X_1), hareketli fazdaki tampon çözelti (0,4 mL/L TEA içeren 0,1 M H_3PO_4 ve NaH_2PO_4 karışımı, pH 2,15) yüzdesi (X_2) ve hareketli faz akış hızı (mL/dk) (X_3)

faktörleridir ve cevap değişkeni olarak KCF değerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Tam faktöriyel tasarım ile belirlenen optimal kromatografik şartlar: kolon sıcaklığı 58,9 °C, hareketli faz içerisindeki tampon yüzdesi %59,3, hareketli faz içerisindeki metanol yüzdesi %40,7 ve hareketli faz akış hızı 0,24 mL/dk olarak belirlenmiştir.

KAF ve PS karışımından oluşan kalibrasyon çözeltileri kullanılarak, tam faktöriyel tasarım ile belirlenen optimum koşullarda her bir bileşik için ayrı ayrı regresyon denklemleri oluşturuldu. Kalibrasyon eğrisinin kesim noktasından ve standart sapmasından her bir bileşen için LOD ve LOQ değerleri hesaplandı (Çizelge 3.4). LOD değerleri KAF için 0,18 µg/mL iken PS için 0,20 µg/mL'dir. LOQ değerleri ise KAF için 0,59 µg/mL ve PS için ise 0,65 µg/mL'dir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan KAF ve PS'nin gün içi ve günler arası çözeltileri ve standart ekleme çözeltileri ile yöntem, tekrarlanabilirlik, kesinlik, seçicilik, geri kazanım gibi parametreler açısından valide edildi (Çizelge 3.5, Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7). Validasyon çalışmalarında %geri kazanım, KAF için %100,7 ve PS için %100,5, standart sapma (SS), KAF için 1,49 ve PS için 2,03 ve bağıl standart sapma (BSS), KAF için 1,48 ve PS için 2,02 olarak hesaplandı (Çizelge 3.5). Validasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar, ticari enerji içeceği numunesinde yer alan KAF ve PS dışındaki hiç bir bileşiğin analiz üzerine girişimde bulunmadığını göstermesi açısından büyük bir öneme sahiptir. Yöntem, KAF ve PS içeren enerji içeceği (I) numunesine başarıyla uygulandı ve uygulanan yöntemle bulunan miktarlarla, numunenin ambalajı üzerinde belirtilen miktarların uyumlu olduğu görüldü (Çizelge 3.9). Ticari enerji içeceği (I) içerisindeki PS ve KAF'ın eş zamanlı analizi için geliştirilen UPLC yöntemi yalnızca validasyon çalışmaları ile değil aynı zamanda seçicilik, kolon ayırma gücü, kuyruklanma faktörü gibi sistem uygunluk parametreleri açısından da değerlendirildi ve bu parametrelerin referans değerlere uygun olduğu görüldü (Çizelge 3.8).

Ticari enerji içeceği (II) analizinde tam faktöriyel tasarım ile B3, SB, PS ve KAF bileşiklerinin eş zamanlı tayinleri için yeni bir UPLC metodu tasarlandı. Enerji içeceği numunesi (II) içerisindeki B3, SB, PS ve KAF bileşenlerinin eş zamanlı analizini sağlayan optimum kromatografik koşulların belirlenmesi için deneysel

tasarım ve optimizasyon metodolojisi kullanıldı ve bu numune için gerçekleştirilen bir takım ön deneylerle deney üzerine etkili faktörler belirlendi (Çizelge 3.10). Deneyde etkili olan bu faktörlerin (kolon sıcaklığı, hareketli fazdaki 0,5 mL/L TEA içeren 0,08 M (NH₄)₂CO₃ yüzdesi ve hareketli faz akış hızı) olduğu belirlendi.

Daha sonra her bir faktörün yüksek (+1), orta (0) ve düşük (-1) seviyelerinin kombinasyonu ile 3 faktörlü ve 3 seviyeli (3³) 27 farklı deneysel tasarım planı oluşturuldu (Çizelge 3.11). Kromatografik koşulları birbirinden farklı olan 27 deneyin her birinden alınan kromatografik cevaptan KCF değerleri hesaplandı. KCF değerleri ile B3, SB, PS ve KAF bileşenlerinin eş zamanlı analizleri için en kısa alıkonma zaman aralığında maksimum kromatografik ayırmanın sağlandığı optimum kromatografik koşullar belirlendi. Bu şartlar; akış hızı 0,25 mL/dk., kolon sıcaklığı 52,7 °C ve hareketli faz içerisindeki 0,5 mL/L TEA içeren 0,08 M (NH₄)₂CO₃ yüzdesi %51,2, hareketli faz içerisindeki metanol yüzdesi %24,8, hareketli faz içerisindeki su miktarı %24,0 ve enjeksiyon hacmi 0,8 µL olarak belirlendi. B3, SB, PS ve KAF bileşenlerinin analizi için öncelikli olarak her bir bileşenin maksimum absorbans yaptığı dalga boylarındaki dedeksiyonla (B3 için 215,7 nm, SB için 223,9 nm, PS için 253,5 nm ve KAF için 273,6 nm) ayrı ayrı kalibrasyon denklemleri oluşturuldu (Çizelge 3.13). Daha sonra bu denklemlere uygulanan bir takım matematiksel işlemler ile regresyon analizi yapıldı. Kalibrasyon denklemlerinden B3, SB, PS ve KAF'ın her biri için LOD ((B3 için 1,00 µg/mL, SB için 1,37 µg/mL, PS için 0,84 µg/mL ve KAF için 1,01 µg/mL) ve LOQ (B3 için 3,34 µg/mL, SB için 4,55 µg/mL, PS için 2,80 µg/mL ve KAF için 3,37 µg/mL) değerleri hesaplandı. Geliştirilen UPLC metodunun doğruluğu ve kesinliği validasyon çalışmaları ile test edildi. Bu çalışmalarla her bir bileşenin geri kazanımı (B3 için %101,2, SB için %99,9, PS için %99,2 ve KAF için %99,6), standart sapması (B3 için 2,49, SB için 1,78, PS için 1,90 ve KAF için 1,37) ve %bağıl standart sapma değerleri (BSS) değerleri (B3 için 2,46, SB için 1,79, PS için 1,92 ve KAF için 1,38) bulundu (Çizelge 3.14). Geliştirilen UPLC yönteminin gün içi ve günler arası çözeltilerine uygulanmasıyla yöntemin tekrar edilebilirliği ve doğruluğu test edilmiştir (Çizelge 3.15). Standart ekleme çözeltilerinden elde edilen sonuçlar, çalışılan dalga boylarında, ticari enerji içeceği (II) numunesi içerisinde yer alan B3, SB, PS ve KAF

dışındaki diğer bileşenlerin analiz üzerinde etkili olmadığını göstermiştir (Çizelge 3.16). Geliştirilen UPLC yönteminin güvenilirliğini ve doğruluğunu test etmek için sistem uygunluk parametreleri UPLC sistemine ait Empower yazılımı ile hesaplanmış ve elde edilen sonuçların referans değerlere uygun olduğu görülmüştür (Çizelge 3.17). Optimize edilerek valide edilen yöntemin doğruluğu ve uygulanabilirliğinin test edilmesi için yöntem içerisinde B3, SB, PS ve KAF içeren ticari enerji içeceği (II)'ye uygulanmıştır (Çizelge 3.18).

Deneyisel tasarım ve optimizasyon metodolojisi ile geliştirilmiş olan UPLC yöntemleriyle, ticari enerji içeceklerindeki KAF,-PS ve B3-SB-PS-KAF bileşenlerinin kalite kontrol ve rutin analizlerinde daha hızlı, ekonomik, kolay, doğru ve kesin analiz sonuçları elde edildi. Geliştirilen yöntemler ile elde edilen veriler tez içerisinde çizelgeler halinde sunuldu.

Bu doktora tez çalışması, önerilen yöntemlerin sadece gıda endüstrisinde değil aynı zamanda ilaç endüstrisinde de birden fazla bileşen içeren kompleks numunelerin aynı anda analizi için çevre dostu, zaman ve ekonomik açıdan kazanç sağlayan, kolay uygulanabilir alternative yöntemler olduğunu göstermiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu doktora tez çalışması, toplum tarafından yaygın bir biçimde tüketilen ve ciddi sağlık sorunlarına neden olan ticari enerji içeceklerinin içerisinde yer alan ve insan sağlığı üzerinde etkili olan bileşenlerin eş zamanlı kantitatif analizleri için literatürde daha önce rastlanmayan yeni UPLC metodlarının geliştirilmesini amaçladı. Bu çalışmada geliştirilen yeni yöntemlerle, ticari enerji içeceği (I) ve ticari enerji içeceği (II) olmak üzere iki farklı çeşit enerji içeceğinin içerisindeki bileşenlerin aynı anda analizi gerçekleştirildi. UPLC metodlarının geliştirilmesinde, bir deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojisi olan tam faktöriyel tasarımdan (FFD) yararlanıldı ve FFD ile elde edilen cevap yüzey metodolojilerine dayanarak, deneylerin her biri için en uygun (kısa analiz süresi ve iyi bir kromatografik ayırım) optimize edilmiş kromatografik şartlar belirlendi. Enerji içecekleri gibi hiper kompleks ürünlerin cevap yüzey metodolojisiyle optimizasyonunda, faktörlerin seçimi, bu faktörlere ait deneysel aralıkların belirlenmesi ve bu deneysel aralıklara dayanarak deney tasarımının oluşturulması zaman alıcı ve maliyetli işlemlerdir. Bu nedenle, bu tez çalışması sonucunda önerilen yeni UPLC yöntemleri gıda ve ilaç endüstrilerinin, bu tezin konusu olan bileşenlerin (B3, SB, PS ve KAF) eş zamanlı analizlerinde doğrudan kullanabilecekleri güvenilir, doğru ve kolay uygulanabilir yöntemler olma özelliğine sahip olduğu saptanmıştır.

Geliştirilen her iki yöntemde de numunelere herhangi bir ön ayırma işlemi uygulanmamış olup, literatürlerde rapor edilen yöntemlerle kıyaslandığında tezde önerilen yöntemlerin diğer yöntemlere göre daha hızlı, kesin, doğru ve güvenilir sonuçlar verdiği açıktır. Bu yöntemler gıda endüstrisinde KAF-PS ve B3-SB-PS-KAF içeren ticari enerji içeceklerinin eş zamanlı, kalite kontrol ve rutin analizleri için, hızlı ve kolay uygulanabilir yöntemler olması nedeniyle tercih sebebi olacaklardır. Bu tez çalışması bu bileşenleri içeren ürünler için mevcut ve yapılacak olan tüm çalışmalara kaynak olma özelliğine sahiptir.

ÖZET

Ticari Enerji İçeceklerindeki Bileşenlerin Kantitatif Analizleri İçin Kemometrik Optimizasyon Metodolojisi Kullanılarak Aşırı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemlerinin Geliştirilmesi

Günümüzde ticari enerji içecekleri insanlar, özellikle de gençler tarafından önemli ölçüde tüketilmektedir. Bu nedenle bu ürünlerin kaliteleri, kalite kontrolleri ve rutin analizleri insan sağlığı ve gıda sektörü açısından oldukça ilgi çekicidir. Ayrıca bu enerji içeceklerinin içerikleri de gün geçtikçe değişmektedir. Bu durum, gıda endüstrisinde çalışan bilim insanlarını ve analistleri, ticari enerji içeceklerinin içeriğini doğru bir şekilde tespit edebilmek için yeni analitik yöntemler geliştirmeye veya eski analitik yöntemleri güncellemeye zorlamaktadır.

Bu doktora tezinde, deneysel tasarım ve optimizasyon prosedürleri kullanılarak iki farklı ticari enerji içeceğinde (ticari enerji içeceği (I) ve ticari enerji içeceği (II)), PDA sistemi tarafından tespit edilebilen bileşenlerin eş zamanlı kantitatif analizleri için yeni UPLC yöntemleri geliştirilmiştir. UPLC yöntemlerinin deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojisi ile geliştirilmesinde, üç faktörlü üç seviyeli tam faktöriyel tasarım (FFD) kullanılmıştır. İlk ticari enerji içeceğinde (I) kafein (KAF) ve Potasyum sorbat (PS) analizi için yapılan ön deneylerde, kromatografik cevabı etkileyen önemli faktörler ve bunların etkileşimleri olarak kolon sıcaklığı, akış hızı ve mobil fazdaki tampon yüzdesi bulundu. Bir sonraki aşamada, faktörlerin seviyeleri belirlenmiş ve ardından 3^3 tam faktöriyel tasarım matrisinin kromatogramları, 284 nm dalga boyunda PDA tespiti ile kaydedilerek kromatografik cevap faktörü (KFC) değerleri elde edilmiştir. Tasarım matrisi ve KCF değişkenleri arasındaki ilişkiden ikinci dereceden bir denklem hesaplandı ve ardından optimum kromatografik koşulları elde etmek için çözüldü. Ticari enerji içeceği (I)'in UPLC analizi için, optimum kromatografik şartlar, kolon sıcaklığı 58,9 °C, mobil fazdaki tampon yüzdesi %59,3 ve akış hızı 0,24 mL/dk olarak bulundu. Yukarıdaki koşullar altında, numunelerdeki KAF ve PS'nin ayrılması, 0,4 mL trietilamin (TEA)/L varlığında metanol ve 0,1 M H_3PO_4 tamponu, pH 2.15 (59.3:40.7, v/v) içeren bir mobil faz kullanılarak, Waters Acquity® BEH C₁₈ kolonu (100 mm x 2,1 mm i.d., 1,7 µm) üzerinden gerçekleştirildi.

İlk ticari enerji içeceğinin analizinde olduğu gibi, ikinci ticari enerji içeceğindeki (II) dört bileşiğin (niasin (B3), sodyum benzoat (SB), PS ve KAF) analizi için yeni bir UPLC yöntemi geliştirildi. İkinci ticari enerji içeceğindeki (II) dört bileşiğin miktarının belirlenmesi için UPLC yönteminin geliştirilmesinde, aynı kromatografik faktörler (kolon sıcaklığı, mobil fazdaki tampon yüzdesi ve akış hızı) üç seviyeli ve üç faktörlü tam faktöriyel tasarım kullanılarak optimize edildi. İkinci ticari enerji içeceğinin kantitatif analizinde, optimum kromatografik koşullar kolon sıcaklığı için 52,7 °C, mobil fazdaki tampon içeriği yüzdesi için %24 ve akış hızı için 0,25 mL/dak olarak belirlenmiştir. Enerji içeceği numunesi (II)'de B3, SB, PS ve KAF'nin kromatografik ayrımı, 0,5 mL TEA/L varlığında 0,08 M $(NH_4)_2CO_3$, H_2O ve metanol (24: 24,8: 51,2, v/v/v) içeren bir mobil faz sistemi kullanılarak Waters Acquity ® BEH C₁₈ kolonu (100 mm x 2.1 mm i.d., 1.7 µm) ile gerçekleştirildi. Yukarıdaki kromatografik koşullar altında, tam faktöriyel tasarım numunelerinin kromatogramları, 230 nm dalga boyunda PDA tespiti ile elde edildi. KCF değerleri, kaydedilen kromatogramlardan hesaplandı. Daha sonra, KCF ve tasarım matrisi değişkenleri arasındaki regresyon analizi kullanılarak ikinci dereceden denklem hesaplandı. İkinci dereceden denklem çözüldükten sonra optimum kromatografik koşullar elde edildi. Yukarıda bahsedilen deneysel UPLC koşullarında 2,0-26,0 µg/mL ve 4,0-28,0 µg/mL lineer konsantrasyon aralığında KAF ve PS

içeren kalibrasyon numunelerinin kromatogramları, sırasıyla maksimum dalga boyuna karşılık gelen 272,4 ve 262,9 nm'de PDA tespiti ile kaydedildi. Konsantrasyon ve pik alanları arasındaki ilişki kullanılarak, her bir bileşik için yüksek bir korelasyon katsayısına sahip (her iki bileşik için 1.0) bir lineer regresyon denklemi elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin kesim noktasının standart sapmasından, gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri KAF için sırasıyla 0,18 µg/mL ve 0,59 µg/mL ve PS için 0,20 µg/mL ve 0,65 µg/mL olarak hesaplandı. Daha sonra optimize edilmiş UPLC yöntemi, test numuneleri (bağımsız test numuneleri, günler arası ve gün içi numuneler ve standart ekleme numuneleri) analiz edilerek valide edilmiştir. Tatmin edici yüzde geri kazanım sonuçları elde edildi (KAF için %100,7 ve PS için %100,5). Validasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar, yeni geliştirilen yöntemin tekrarlanabilir, kesin, doğru, seçici ve uygulanabilir bir yöntem olduğunu ortaya koymuştur. Son olarak geliştirilen yöntem KAF ve PS'den oluşan ticari enerji içeceği (I) numunesinin analizine uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar, ürün etiketinde belirtilen miktar ile uyumluydu.

İkinci enerji içeceği örneğinde (II) B3, SB, PS ve KAF'nin yukarıda belirtilen kromatografik UPLC koşulları altında eş zamanlı analizi için, B3, SB, PS ve KAF içeren kalibrasyon numunelerinin kromatogramları, 5.0-25.0 µg/mL, 4.0-20.0 µg/mL, 6.0-30.0 µg/mL, and 5.0-25.0 µg/mL lineer konsantrasyon aralığında, maksimum dalga boyuna karşılık gelen dalga boylarında sırasıyla 215.7, 223.9, 253.5, and 273.6 nm'de PDA tespiti ile kaydedildi. B3, SB, PS ve KAF'nin konsantrasyon ve pik alanları arasındaki ilişki kullanılarak, her bir bileşik için yüksek korelasyon katsayılı (B3 için 0.9994, SB için 0.9982, PS için 0.9996 ve KAF için 0.9996) lineer regresyon denklemleri üretildi. B3, SB, PS ve KAF'nin LOD ve LOQ değerleri, kalibrasyon eğrisinin standart sapması ve kesim noktası kullanılarak hesaplandı ve B3 için 1,00 µg/mL ve 3,34 µg/mL, SB için 1.37 µg/mL ve 4.55 µg/mL, PS için 0.84 µg/mL ve 2.80 µg/mL ve KAF için 1.01 µg/mL ve 3.37 µg/mL olarak bulundu. B3, SB, PS ve KAF'nin eşzamanlı analizi için yeni geliştirilen UPLC yönteminin validasyonu, test numuneleri (bağımsız test numuneleri, gün içi ve günler arası numuneler ve standart ekleme numuneleri) kullanılarak gerçekleştirildi. Yüzde geri kazanım sonuçları B3, SB, PS ve KAF için sırasıyla %101,2, %99,9, %99,2 ve %99,6 olarak elde edildi. Bu sonuçlar, bu yöntemin B3, SB, PS ve KAF'nin eş zamanlı analizi için seçici, doğru ve güvenilir bir yöntem olduğunu göstermiştir. Son olarak geliştirilen yöntem, ticari enerji içeceği (II) numunesindeki dört bileşiğin eş zamanlı analizine uygulanmış ve tatmin edici sonuçlar elde edilmiştir. Deneysel analiz sonuçları ile ticari enerji içeceğinin (II) beyan edilen etiketi arasında iyi bir uyum gözlemlendi.

Bu doktora tezi, optimize edilmiş ve onaylanmış UPLC yöntemlerinin, analiz edilen enerji içeceklerindeki söz konusu bileşiklerin kalite kontrolü ve rutin analizi için alternatif yöntemler olarak kullanılabileceğini ortaya koydu.

Anahtar Sözcükler: Deneysel Tasarım ve Optimizasyon, Kafein, Niasin, Potasyum Sorbat, Sodyum Benzoat, Tam Faktöriyel Tasarım, UPLC.

SUMMARY

Development of Ultra High Performance Liquid Chromatography Methods Using Chemometric Optimization Methodology for Quantitative Analysis of Ingredients in Commercial Energy Drinks

Today, commercial energy drinks have been dramatically consumed by people, especially teenagers. For this reason, their quality, quality control, and routine analysis are very interesting in terms of human health and the food industry. In addition, the content of these energy drinks has changed day by day. This situation forces scientists and analysts working in the food industry to develop new analytical methods or update old analytical methods to correctly detect the content of commercial energy drinks.

In this doctoral thesis, new UPLC methods were developed for the simultaneous quantitative analysis of ingredients, which can be detected by the photodiode arrays (PDA) system, in two different types of commercial energy drinks (commercial energy drink (I) and commercial energy drink (II)) using experimental design and optimization procedures. In the development of the UPLC methods with experimental design and optimization methodology, full factorial design (FFD) with three factors three levels was used. In the preliminary experiments for the analysis of caffeine (CAF) and potassium sorbate (PS) in the first commercial energy drink (I), the significant factors and their interactions, which affect on the chromatographic response, were found as column temperature, flow rate, and percentage of buffer in the mobile phase. In the next step, factors' levels were determined, and then the chromatograms of the 3^3 full factorial design matrix were recorded with the PDA detection at the wavelength of 284 nm to obtain ICRF values. A second-order equation was computed from the relationship between the design matrix and ICRF variables and then was solved to get optimal chromatographic conditions. For the UPLC analysis of the commercial energy drink (I), the optimal chromatographic conditions were found to be the column temperature of 58.9 °C, the percentage of the buffer system in the mobile phase of 59.3%, and the flow rate of 0.24 mL/min. Under the above conditions, the separation of CAF and PS in samples was carried out on the Waters Acquity® BEH C₁₈ column (100 mm x 2.1 mm i.d., 1.7 µm) using a mobile phase containing MeOH and 0.1 M H₃PO₄ buffer, pH 2.15 (59.3:40.7, v/v) in the presence of the 0.4 mL triethylamine (TEA)/L.

As in the analysis of the first commercial energy drink (I), a new UPLC method was improved for the analysis of four compounds (niacin (B3), sodium benzoate (SB), PS, and CAF) in the second commercial energy drink (II). The same chromatographic factors (column temperature, percentage of buffer in the mobile phase, and flow rate) were optimized using the full factorial design with three factors at three levels for the UPLC method development for the quantitation of four compounds in the second commercial energy drink (II). In the quantitative estimation of the second commercial energy drink, optimal chromatographic conditions were determined as 52.7 °C for the column temperature, %24 for the percentage of the buffer content in the mobile phase and 0.25 mL/min for the flow rate. The chromatographic separation of B3, SB, PS, and CAF in energy drink sample (II) was performed by Waters Acquity® BEH C₁₈ column (100 mm x 2.1 mm i.d., 1.7 µm) using a mobile phase system containing 0.08 M (NH₄)₂CO₃, H₂O, and methanol (24: 24.8: 51.2, v/v/v) in the presence of 0.5 mL TEA /L. Under the above chromatographic conditions, the chromatograms of the full factorial design samples were obtained by using the PDA detection at the wavelength of 230 nm. ICRF values were calculated from the recorded

chromatograms. Then, the second-order equation was calculated using the regression analysis between the ICRF and design matrix variables. After solving the second-order equation, optimal chromatographic conditions were obtained.

Under the above-mentioned experimental UPLC conditions, the chromatograms of the calibration samples containing CAF and PS in the linear concentration range of 2.0-26.0 $\mu\text{g/mL}$ and 4.0-28.0 $\mu\text{g/mL}$ were recorded with the PDA detection at 272.4 and 262.9 nm, which correspond to maxima of wavelength, respectively. A linear regression equation for each compound was obtained using the relationship between concentration and peak areas with a high correlation coefficient (1.0 for both compounds). From the standard deviation of the intercept of the calibration curve, the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) values were calculated as 0.18 $\mu\text{g/mL}$ and 0.59 $\mu\text{g/mL}$ for CAF and 0.20 $\mu\text{g/mL}$ and 0.65 $\mu\text{g/mL}$ for PS, respectively. Then, the optimized UPLC method was validated by analyzing test samples (independent test samples, inter-day and intra-day samples, and standard addition samples). Satisfactory percent recovery results were obtained (100.7% for CAF and 100.5% for PS). The results obtained from the validation studies revealed that the newly developed method is a reproducible, precise, accurate, selective, and applicable method. Finally, the developed method was applied to the analysis of the commercial energy drink (I) sample consisting of CAF and PS. The obtained results were compatible with the amount specified on the label of product.

For the simultaneous analysis of B3, SB, PS and CAF in second energy drink sample (II), under the above-mentioned chromatographic UPLC conditions, the chromatograms of the calibration samples containing B3, SB, PS and CAF in the linear concentration range of 5.0-25.0 $\mu\text{g/mL}$, 4.0-20.0 $\mu\text{g/mL}$, 6.0-30.0 $\mu\text{g/mL}$, and 5.0-25.0 $\mu\text{g/mL}$ were recorded with the PDA detection at 215.7, 223.9, 253.5, and 273.6 nm, which correspond to maxima of wavelength, respectively. Using the relationship between concentration and peak areas of the B3, SB, PS and CAF, linear regression equations with high correlation coefficients (0.9994 for B3, 0.9982 for SB, 0.9996 for PS and 0.9996 for CAF) were generated for each compound. The LOD and LOQ values of B3, SB, PS and CAF were calculated using the standard deviation and intercept of the calibration curve and were found to be 1.00 $\mu\text{g/mL}$ and 3.34 $\mu\text{g/mL}$ for B3, 1.37 $\mu\text{g/mL}$ and 4.55 $\mu\text{g/mL}$ for SB, 0.84 $\mu\text{g/mL}$ and 2.80 $\mu\text{g/mL}$ for PS, and 1.01 $\mu\text{g/mL}$ and 3.37 $\mu\text{g/mL}$ for CAF, respectively. Validation of the newly developed UPLC method for the simultaneous analysis of B3, SB, PS, and CAF was performed by using test samples (independent test samples, inter-day and intra-day samples, and standard addition samples). The percent recovery results for B3, SB, PS, and CAF were obtained as 101.2%, 99.9%, 99.2% and 99.6%, respectively. These results showed that this method is a selective, accurate, and reliable method for the simultaneous analysis of B3, SB, PS, and CAF. Finally, the developed method was applied to the simultaneous analysis of four compounds in commercial energy drink (II) sample and satisfactory results were obtained. A good agreement was observed between experimental analysis results and the claimed label of the commercial energy drink (II).

This doctoral thesis revealed that the optimized and validated UPLC methods can be used as alternative methods for the quality control and routine analysis of the subject matter compounds in the analyzed energy drinks.

Keywords: Experimental Design and Optimization, Caffeine, Niacin, Potassium Sorbate, Sodium Benzoate, Full Factorial Design, UPLC

KAYNAKLAR

- ABDOON FM, KHALEEL AI, EL-TOHAMY MF (2015). Utility of electrochemical sensors for direct determination of nicotinamide (B3): comparative studies using modified carbon nanotubes and modified β -cyclodextrin sensors. *Sensor Letters*, **13**(6): 462-470.
- AGUILERA ASDRUBAL (2012). The Chemistry and Biochemistry of Niacin (B3),.
- AHMAD W, YUSUF M, AHMAD A, HASSAN YA, AMIR M, WAHAB S (2022). Development and Validation of Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) Method for the Quantitative Estimation of Caffeine in Non-Alcoholic Soft and Energy Drinks. *Journal of AOAC International*, **105**(4): 1146-1152.
- AHMED M, SHAHZADI SK, WASEEM R, SHAHZAD S, AHMAD W (2013). Sodium benzoate and potassium sorbate in Pakistani retail foodstuffs. *International Journal of Chemical Sciences and Research*, **3**(6), 1-6.
- AKBARI-ADERGANI B, ESKANDARI S, N (2013). Determination of sodium benzoate and potassium sorbate in "Doogh" samples in post market surveillance in Iran 2012. *Journal of Chemical Health Risks*, **3**(1).
- AKSU DÖNMEZ Ö, DINÇ-ZOR Ş, AŞÇI B, BOZDOĞAN AE (2020). Quantitative analysis of food additives in a beverage using high performance liquid chromatography and diode array detection coupled with chemometrics. *Journal of AOAC International*, **103**(3): 779-783.
- AKYUZ M, ATA Ş, DINÇ E (2016). A chemometric optimization of method for determination of nitrosamines in gastric juices by GC-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **117**: 26-36.
- ALESSO M, FERNÁNDEZ LP (2016). Caffeine determination by flow injection analysis employing bovine serum albumin as a fluorophore. *Microchemical Journal*, **127**: 165-169.
- ALI MM, EISA M, TAHA MI, ZAKARIA BA, ELBASHIR AA (2012). Determination of caffeine in some Sudanese beverages by High Performance Liquid Chromatography. *Pakistan Journal of Nutrition*, **11**(4): 336-342.
- ALI NW, ABDELWAHAB NS, ABDELKAWY M, EMAM AA (2016). A comparative study of ICH validated novel spectrophotometric techniques for resolving completely overlapping spectra of quaternary mixtures. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **154**: 114-122.

- ALLÉ PH, FANOU GD, ROBERT D, ADOUBY K, DROGUI P (2020). Photocatalytic degradation of Rhodamine B dye with TiO₂ immobilized on SiC foam using full factorial design. *Applied Water Science*, **10**: 1-9.
- ALRABADI NI, AL-MASSAD M, GHARAIBEH AA (2013). The antifungal effect of potassium sorbate on *Penicillium* sp in Labaneh. *American-Eurasian J Agric Environ Sci*, **13**(11): 1497-1502.
- AMETA RK, SINGH M (2014). A thermodynamic in vitro antioxidant study of vitamins B (niacin and niacin amide) and C (ascorbic acid) with DPPH through UV spectrophotometric and physicochemical methods. *Journal of Molecular Liquids*, **195**: 40-46.
- AMINI A, BARCLAY V, RUNDLÖF T, JÖNSSON S, KARLSSON A, ARVIDSSON T (2006). Determination of ephedrine, pseudo-ephedrine and caffeine in a dietary product by capillary electrophoresis. *Chromatographia*, **63**: 143-148.
- AMIRPOUR M, ARMAN A, YOLMEH A, AKBARI AZAM M, MORADI-KHATOONABADI Z (2015). Sodium benzoate and potassium sorbate preservatives in food stuffs in Iran. *Food Additives & Contaminants: Part B*, **8**(2): 142-148.
- AMOS-TAUTUA W, DİEPREYE E (2014). Ultra-violet spectrophotometric determination of caffeine in soft and energy drinks available in Yenagoa, Nigeria. *Advance Journal of Food Science and Technology*, **6**(2): 155-158.
- ARMENTA S, GARRIGUES S, DE LA GUARDIA M (2005). Solid-phase FT-Raman determination of caffeine in energy drinks. *Analytica Chimica Acta*, **547**(2): 197-203.
- ASFARAM A, GHAEDI M, DASHTIAN K (2017). Ultrasound assisted combined molecularly imprinted polymer for selective extraction of nicotinamide in human urine and milk samples: spectrophotometric determination and optimization study. *Ultrasonics Sonochemistry*, **34**: 640-650.
- ASOGWA F, UGODI G, EBUGOSI R, ACHARA I, ATIM HA (2023). UV-spectroscopic and iodometric back titration analysis of total caffeine content of energy drinks available in markets in cross river state, south-south, Nigeria. *Global Journal of Pure and Applied Sciences*, **29**(1), 1-10.
- ATTIPOE S, LEGGIT, J, DEUSTER PA (2016). Caffeine content in popular energy drinks and energy shots. *Military Medicine*, **181**(9): 1016-1020.
- AVCI E (2017). Türkiye’deki Enerji İçeceği Kullanım Sıklığının Belirlenmesinde Klasik ve Bayesci Meta-analizi. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, **7**(2): 320-330.
- AYDIN S ve DEDE BN (2016) Enerji İçeceklerinin Sağlık Üzerine Etkilerinin Toksikolojik Açıdan Değerlendirilmesi. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, **(1)**: 89-127.

- BAHREMAND N, ESKANDARI S (2013). Determination of potassium sorbate and sodium benzoate in "Doogh" by HPLC and comparison with spectrophotometry. *International Journal of Bio-Inorganic Hybrid Nanomaterials*, 2(3): 429-435.
- BARANOWSKA I, WOJCIECHOWSKA I (2013). The Determination of Preservatives in Cosmetics and Environmental Waters by HPLC. *Polish Journal of Environmental Studies*, 22(6): 1609-1625.
- BARKA N, ABDENNOURI M, BOUSSAOUD A, GALADI A, BAÂLALA M, BENSITEL M, SAHIBED-DINE A, NOHAIR K, SADIQ M (2014). Full factorial experimental design applied to oxalic acid photocatalytic degradation in TiO₂ aqueous suspension. *Arabian Journal of Chemistry*, 7(5): 752-757.
- BIYIK E (2017). Timolol maleat içeren ticari farmasötik preparatlardaki etkin maddelerin spektrofotometrik ve kromatografik ölçümlere dayalı kemometrik yöntemlerle miktar tayinleri. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. Ankara.
- BRADLEY N (2007). The response surface methodology. (Doctoral dissertation, Indiana University South Bend).
- BRAITHWAITE A, SMITH JF (2012). *Chromatographic Methods*. Springer Science & Business Media.
- BRODY T (1998). *Nutritional Biochemistry*. Elsevier.
- BUCHER J, FITZPATRICK D, SWANSON AG, ABRAHAM SP (2019). Caffeine intake habits and the perception of its effects on health among college students. *The Health Care Manager*, 38(1): 44-49.
- BÜKER E, DİNÇ E (2017). A new UPLC method with chemometric design–optimization approach for the simultaneous quantitation of brimonidine tartrate and timolol maleate in an eye drop preparation. *Journal of Chromatographic Science*, 55(2): 154-161.
- BYRNE J, VELASCO-TORRIJOS T, REINHARDT R (2014). Development and validation of a novel stability-indicating HPLC method for the simultaneous assay of betamethasone-17-valerate, fusidic acid, potassium sorbate, methylparaben and propylparaben in a topical cream preparation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 96, 111-117.
- CAN NO, ARLI G, LAFCI Y (2011). A novel RP- HPLC method for simultaneous determination of potassium sorbate and sodium benzoate in soft drinks using C₁₈-bonded monolithic silica column. *Journal of separation science*, 34(16- 17): 2214-2222.

- CESTARI AR, VIEIRA EF, TAVARES AM, BRUNS RE (2008). The removal of the indigo carmine dye from aqueous solutions using cross-linked chitosan—Evaluation of adsorption thermodynamics using a full factorial design. *Journal of Hazardous Materials*, **153**(1-2): 566-574.
- CHALESHTORI FS, ARIAN A, CHALESHTORI RS (2018). Assessment of sodium benzoate and potassium sorbate preservatives in some products in Kashan, Iran with estimation of human health risk. *Food and chemical toxicology*, **120**, 634-638.
- CHANDA I, BORDOLOI R, CHAKRABORTY DD, CHAKRABORTY P, DAS SRC (2017). Development and validation of UV-spectroscopic method for estimation of niacin in bulk and pharmaceutical dosage form. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **7**(9): 081-084.
- CHIRITA RI, DASCALU C, GAVRILA L, ELFAKIR C (2010). Simultaneous analysis of taurine and caffeine in energy drinks using hydrophilic interaction chromatography with UV and evaporative light scattering detection on line. *Revista de chimie*, **61**: 1173-1176.
- CIULU M, SOLINAS S, FLORIS I, PANZANELLI A, PILO MI, PIU PC, SPANO N, SANNA G (2011). RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. *Talanta*, **83**(3): 924-929.
- COSTA ACO, DA SILVA PERFEITO L, TAVARES MF, MICKE GA (2008). Determination of sorbate and benzoate in beverage samples by capillary electrophoresis—Optimization of the method with inspection of ionic mobilities. *Journal of Chromatography A*, **1204**(1): 123-127.
- ÇATAK J (2019). Determination of niacin profiles in some animal and plant based foods by high performance liquid chromatography: association with healthy nutrition. *Journal of animal science and technology*, **61**(3): 138.
- DA SILVA DC, VISENTAINER JV, DE SOUZA NE, OLIVEIRA CC (2013). Micellar electrokinetic chromatography method for determination of the ten water-soluble vitamins in food supplements. *Food Analytical Methods*, **6**: 1592-1606.
- DAHMOUNE F, REZGUI F, G'SELL C (2016). Full factorial design optimization of anti-inflammatory drug release by PCL–PEG–PCL microspheres. *Materials Science and Engineering: C*, **58**: 412-419.
- DE JESUS FFS, COELHO AG, DE ASSIS PALLOS L, DA SILVA JAF, DANIEL D, DE JESUS DP (2018). Simple and fast method for simultaneous determination of propionate and sorbate in bread by capillary electrophoresis with UV spectrophotometric detection. *Journal of Food Composition and Analysis*, **72**: 93-96.
- DE MEJIA EG, RAMIREZ-MARES MV (2014). Impact of caffeine and coffee on our health. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, **25**(10): 489-492.

- DEHGHAN P, MOHAMMADI A, MOHAMMADZADEH-AGHDASH H, DOLATABADI JEN (2018). Pharmacokinetic and toxicological aspects of potassium sorbate food additive and its constituents. *Trends in Food Science & Technology*, **80**: 123-130.
- DERMİŞ S, BÜKER E, ERTEKİN ZC, DİNÇ E (2015). A new fast reversed-phase ultra-performance liquid chromatographic approach for quantitative analysis of pantoprazole in tablets. *Asian Journal of Chemistry*, **27**(12).
- DİNÇ E (2007). Kemometri çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri. *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi*. **27**, Sayı.1, 61-92.
- DİNÇ E, ARSLAN F, BALEANU D (2007). Experimental design and optimization for the spectral analysis of two-component mixture.
- DİNÇ E, BALEANU D (2012). Fractional-continuous wavelet transforms and ultra-performance liquid chromatography for the multicomponent analysis of a ternary mixture containing thiamine, pyridoxine, and lidocaine in ampules. *Journal of AOAC International*, **95**(3): 903-912.
- DİNÇ E, BÜKER E (2012). A new application of continuous wavelet transform to overlapping chromatograms for the quantitative analysis of amiloride hydrochloride and hydrochlorothiazide in tablets by ultra-performance liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, **95**(3): 751-756.
- DİNÇ E, ERTEKİN ZC, ROUHANI G (2015). A new RP-UPLC method for simultaneous quantitative estimation of bisoprolol hemifumarate and hydrochlorothiazide in tablets using experimental design and optimization. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **38**(9): 970-976.
- DİNÇ E, ERTEKİN ZC (2016). Three-way analysis of the UPLC–PDA dataset for the multicomponent quantitation of hydrochlorothiazide and olmesartan medoxomil in tablets by parallel factor analysis and three-way partial least squares. *Talanta*, **148**: 144-152.
- DİNÇ E, BÜKER E (2016). Parallel factor analysis and trilinear partial least squares applied to the UPLC-PDA data array for the quantification of brimonidine tartrate and timolol maleate in an eye drop formulation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **39**(7): 374-383.
- DİNÇ E, BÜKER E (2019). Spectrochromatographic determination of dorzolamide hydrochloride and timolol maleate in an ophthalmic solution using three-way analysis methods. *Talanta*, **191**: 248-256.
- DİNÇ E, DERMİŞ S, CAN AKCASOY S, ERTEKİN, ZC (2020a). A New Chemometric strategy in electrochemical method optimization for the quantification of cefdinir in tablets, effervescent tablets and suspension samples. *Electroanalysis*, **32**(3): 613-619.

- DİNÇ E, ERTEKİN ZC, ÜNAL N (2020b). Three-way analysis of pH-UV absorbance dataset for the determination of paracetamol and its pKa value in presence of excipients. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **230**: 118049.
- DİNÇ E, ÖZDEMİR N, TILKAN MG, ROUHANI G, BÜKER E, HOANG VD (2022). Using Both Classical and Chemometric Chromatographic Measurements to Quantify and Monitor the in- vitro Dissolution Profiles of Lamivudine and Zidovudine in Combined Tablets. *ChemistrySelect*, **7**(43): e202203174.
- DİNÇ ZOR Ş, AŞCI B, AKSU DÖNMEZ Ö, YILDIRIM KÜÇÜKKARACA D (2016). Simultaneous determination of potassium sorbate, sodium benzoate, quinoline yellow and sunset yellow in lemonades and lemon sauces by HPLC using experimental design. *Journal of Chromatographic Science*, **54**(6): 952-957.
- DZIECIOŁ M, WODNICKA A, HUZAR E (2010). Analysis of preservatives content in food. *Proceedings of ECOpole*, **4**.
- ELBASHIR AA, ELGACK ELGORASHE RE, ALNAJJAR AO, ABOUL- ENEIN HY (2021). Capillary electrophoresis method for simultaneous analysis of caffeine, vanillin and ethyl vanillin in beverages. *Separation Science Plus*, **4**(6-7): 266-272.
- EL-GINDY A, EMARA S, MESBAH MK, HADAD GM (2006a). New Validated methods for the simultaneous determination of two multicomponent mixtures containing guaiphenesin in syrup by HPLC and chemometrics- assisted UV- spectroscopy. *Analytical letters*, **39**(14): 2699-2723.
- EL-GINDY A, EMARA S, MOSTAFA A (2006b). Application and validation of chemometrics-assisted spectrophotometry and liquid chromatography for the simultaneous determination of six-component pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**(2): 421-430.
- ERDEN S, ESKİKÖY BAYRAKTEPE D, YAZAN Z, DİNÇ E (2016). TiO₂ modified carbon paste sensor for voltammetric analysis and chemometric optimization approach of amlodipine in commercial formulation. *Ionics*, **22**: 1231-1240.
- ERTEKİN ÖZKAN ZC (2021). “Sülfonamidleri içeren farmasötik preparatlardaki etkin maddelerin cevap yüzey metodolojisine dayanan aşırı yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile miktar tayini”. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. Ankara.
- ESFANDIARI Z, BADIEY M, MAHMOODIAN P, SARHANGPOUR R, YAZDANI E, MIRLOHI M (2013). Simultaneous determination of sodium benzoate, potassium sorbate and natamycin content in Iranian yoghurt drink (Doogh) and the associated risk of their intake through Doogh consumption. *Iranian journal of public health*, **42**(8): 915.

- FARAG AS, PRAVCOVÁ K, ČESLOVÁ L, VYTRÁS K, SÝS M (2019). Simultaneous determination of caffeine and pyridoxine in energy drinks using differential pulse voltammetry at glassy carbon electrode modified with nafion®. *Electroanalysis*, **31**(8): 1494-1499.
- FARID NF, EL RAGEHY NA, HEGAZY MA, ABDELKAWY M, METWALLY FH (2014). Simultaneous determination of a quaternary mixture of oxomemazine, sodium benzoate, guaifenesin and paracetamol by chromatographic methods. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, **3**(4), 260-268.
- FATIMA Z, JIN X, ZOU Y, KAW HY, QUINTO M, LI D (2019). Recent trends in analytical methods for water-soluble vitamins. *Journal of Chromatography A*, **1606**: 360245
- FERRAND C, MARC F, FRITSCH P, CASSAND P, DE SAINT BLANQUAT G (2000a). Mutagenicity and genotoxicity of sorbic acid–amine reaction products. *Toxicology in vitro*, **14**(5): 423-428.
- FERRAND C, MARC F, FRITSCH P, CASSAND P, DE SAINT BLANQUAT G (2000b). Genotoxicity study of reaction products of sorbic acid. *Journal of agricultural and food chemistry*, **48**(8): 3605-3610.
- FORD MJ, DEIBEL MA, TOMKINS BA, VAN BERKEL GJ (2005). Quantitative thin-layer chromatography/mass spectrometry analysis of caffeine using a surface sampling probe electrospray ionization tandem mass spectrometry system. *Analytical chemistry*, **77**(14), 4385-4389.
- FOUDAH AI, SHAKEEL F, SALKINI MA, ALSHEHRI S, GHONEIM MM, ALAM P (2022). A Green High-Performance Thin-Layer Chromatography Method for the Determination of Caffeine in Commercial Energy Drinks and Formulations. *Materials*, **15**(9): 2965.
- GHOLIPOUR M, BABAI Z, MOHAMMADI Z, KARIMZADEH L, ABEDI S (2014). Validation method and determination of potassium sorbat in dough with HPLC. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, **23**(109), 37-44.
- GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO A, RYBICKA I (2015). Simultaneous determination of caffeine and water-soluble vitamins in energy drinks by HPLC with photodiode array and fluorescence detection. *Food analytical methods*, **8**: 139-146.
- GOHEL MC, AMIN AF (1998). Formulation optimization of controlled release diclofenac sodium microspheres using factorial design. *Journal of controlled release*, **51**(2-3): 115-122.
- GÖREN AC, BİLSEL G, ŞİMŞEK A, BİLSEL M, AKÇADAĞ F, TOPAL K, OZGEN H (2015). HPLC and LC–MS/MS methods for determination of sodium benzoate and potassium sorbate in food and beverages: Performances of local accredited laboratories via proficiency tests in Turkey. *Food chemistry*, **175**: 273-279.

- GRAMZA-MICHAŁOWSKA A (2014). Caffeine in tea *camellia sinensis*—content, absorption, benefits and risks of consumption. *The journal of nutrition, health & aging*, **18**(2): 143-149.
- GREMBECKA M, SZEFER P (2012). Simultaneous determination of caffeine and aspartame in diet supplements and non-alcoholic beverages using liquid-chromatography coupled to Corona CAD and UV-DAD detectors. *Food Analytical Methods*, **5**: 1010-1017.
- GRESSNER OA, LAHME B, SILUSCHEK M, GRESSNER AM (2009). Identification of paraxanthine as the most potent caffeine- derived inhibitor of connective tissue growth factor expression in liver parenchymal cells. *Liver International*, **29**(6): 886-897.
- GURLEY BJ, STEELMAN SC, THOMAS SL (2015). Multi-ingredient, caffeine-containing dietary supplements: history, safety, and efficacy. *Clinical therapeutics*, **37**(2): 275-301.
- GÜZEL R, ERTEKİN ZC, DİNÇ E (2021). A new application of PARAFAC model to UPLC dataset for the quantitative resolution of a tri-component drug mixture. *Journal of Chromatographic Science*, **59**(4): 361-370.
- GÜZEL R, ERTEKİN ZC, ZİYADANOĞULLARI B, DİNÇ E, ZİYADANOĞULLARI R (2022). Comparative Study of the Quantitative Resolution of Paracetamol and Methocarbamol Mixture by Spectrophotometry with Wavelet Transform and UPLC Techniques. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, **55**(10): 1126-1132.
- HAŁKA A, PŁOCHARZ PW, TORBICZ A, DZIDO TH (2010). Reversed-phase pressurized planar electrochromatography and planar chromatography of acetylsalicylic acid, caffeine, and acetaminophen. *JPC—Journal of Planar Chromatography—Modern TLC*, **23**, 420-425.
- HAMZAH HH, YUSOF NA, SALLEH AB, BAKAR FA (2011). An optical test strip for the detection of benzoic acid in food. *Sensors*, **11**(8): 7302-7313.
- HECKMAN MA, SHERRY K, DE MEJIA EG (2010). Energy drinks: an assessment of their market size, consumer demographics, ingredient profile, functionality, and regulations in the United States. *Comprehensive Reviews in food science and food safety*, **9**(3): 303-317.
- HEMWECH P, OBMA A, DETSANGIAMSACK S, WIRASATE S, CHAIYEN P, WILAIRAT P, CHANTIWAS R (2021). Capillary electrophoresis-UV analysis using silica-layer coated capillary for separation of seven phenolic acids and caffeine and its application to tea analysis. *SN Applied Sciences*, **3**: 1-14.

- HESHMATI A, PORTAGHI J, MOMTAZ JK, KHODADADI I (2017). Evaluation of naturally occurring benzoic acid level in feta and cream cheese during fermentation, production processing and storage In refrigerator. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*, **9**(2): 143-151.
- HORIYAMA S, HONDA C, SUWA K, UMEMOTO Y, OKADA Y, SEMMA M, ICHIKAWA A, TAKAYAMA M (2008). Sensitive and simple analysis of sorbic acid using liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **56**(4): 578-581.
- HU Y, WU HL, YIN XL, GU HW, XIAO R, XIE LX, LIU Z, WANG HFL, YU RQ (2018). Rapid and interference-free analysis of nine B-group vitamins in energy drinks using trilinear component modeling of liquid chromatography-mass spectrometry data. *Talanta*, **180**: 108-119.
- HUCK CW, GUGGENBICHLER W, BONN GK (2005). Analysis of caffeine, theobromine and theophylline in coffee by near infrared spectroscopy (NIRS) compared to high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, **538**(1-2): 195-203.
- IAMMARINO M, DI TARANTO A, PALERMO C, MUSCARELLA M (2011). Survey of benzoic acid in cheeses: contribution to the estimation of an admissible maximum limit. *Food Additives and Contaminants: Part B*, **4**(4): 231-237.
- IVKOVIĆ B, BRBORIĆ J, DOBRIČIĆ V, ČUDINA O (2019). Development and validation of a new isocratic RP-HPLC method for simultaneous determination of sodium metabisulfite and sodium benzoate in pharmaceutical formulation. *Acta Chromatographica*, **31**(2): 133-137.
- JI S, LI N, QI L, WANG M (2017). Poly (styrene- co- N- methacryloyl- l- phenylalanine methyl ester)- functionalized magnetic nanoparticles as sorbents for the analysis of sodium benzoate in beverages. *Journal of separation science*, **40**(2): 466-471.
- JIANG Y, LI G, LV M, GE H, ZHANG Y (2020). Determination of potassium sorbate and sorbic acid in agricultural products using THz time-domain spectroscopy. *Chinese Physics B*, **29**(9), 098705.
- KARAU M, KIHUNYU J, KATHENYA N, WANGAI L, KARIUKI D, KIBET R (2010). Determination of Caffeine Content in Non-Alcoholic Beverages and Energy Drinks Using HPLC-UV Method. *African Journal of Drug and Alcohol Studies*, **9**(1).
- KATAKAM LNR, DONGALA T, ETTABOINA SK (2020). Novel stability indicating UHPLC method development and validation for simultaneous quantification of hydrocortisone acetate, pramoxine hydrochloride, potassium sorbate and sorbic acid in topical cream formulation. *Talanta Open*, **1**, 100004, <https://doi.org/10.1016/j.talo.2020.100004>.

- KAZAKEVICH YV, LOBRUTTO R (2007). HPLC for Pharmaceutical Scientists. John Wiley & Sons, New Jersey.
- KAZEMIPOUR M, ANSARI M, RAMEZANI H, MORADALIZADEH M (2012). Simultaneous determination of lovastatin and niacin in tablet by first and third derivative spectrophotometry and H-point standard addition methods. *Research in Pharmaceutical Sciences*, **7**(2): 95.
- KHASANOV VV, SLIZHOV YG, KHASANOV VV (2013). Energy drink analysis by capillary electrophoresis. *Journal of Analytical Chemistry*, **68**: 357-359.
- KOMPANY-ZAREH M, MIRZAEI S (2004). Spectrophotometric resolution of ternary mixtures of pseudoephedrine hydrochloride, dextromethorphan hydrobromide, and sodium benzoate in syrups using wavelength selection by net analyte signals calculated with hybrid linear analysis. *Analytica chimica acta*, **526**(1), 83-94.
- KORDKANDI SA, FOROUZESH M (2014). Application of full factorial design for methylene blue dye removal using heat-activated persulfate oxidation. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, **45**(5): 2597-2604.
- KREUZ DM, HOWARD AL, IP D (1999). Determination of indinavir, potassium sorbate, methylparaben, and propylparaben in aqueous pediatric suspensions. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **19**(5): 725-735.
- KRISHNAN PG, MAHMUD I, MATTHEES DP (1999). Postcolumn fluorimetric HPLC procedure for determination of niacin content of cereals. *Cereal chemistry*, **76**(4): 512-518.
- KUMAR L, REDDY MS, MANAGULI RS, PAI G (2015). Full factorial design for optimization, development and validation of HPLC method to determine valsartan in nanoparticles. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **23**(5): 549-555.
- LACROIX DE, WOLF WR, KWANSA AL (2005). Rapid trichloroacetic acid extraction and liquid chromatography method for determination of nicotinamide in commercial cereals. *Cereal chemistry*, **82**(3): 277-281.
- LAHÉLY S, BERGAENTZLÉ M, HASSELMANN C (1999). Fluorimetric determination of niacin in foods by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization. *Food Chemistry*, **65**(1): 129-133.
- LEE MS, HUONG NL, HOANG NH, SHRESTHA A, WON PARK J (2014). Ultra-high performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry for the determination of caffeine in energy drinks. *Analytical Letters*, **47**(11): 1852-1861.
- LEÓN-RUIZ V, VERA S, GONZÁLEZ-PORTO AV, SAN ANDRÉS MP (2013). Analysis of water-soluble vitamins in honey by isocratic RP-HPLC. *Food analytical methods*, **6**: 488-496.

- LI X, LIU W, YUE X, SONG P, YIN Y, MENG M, XI R (2018). A competitive immunoassay using hapten-modified polydiacetylene vesicles for homogeneous and sensitive detection of sodium benzoate. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **258**: 1060-1065.
- LIAN FY, FU MX, XU DG (2020). Qualitative and quantitative analyses of potassium sorbate in milk powder using terahertz spectra. *Journal of Applied Spectroscopy*, **87**: 764-772.
- LINKE BGO, CASAGRANDE TAC, CARDOSO LA (2018). Food additives and their health effects: A review on preservative sodium benzoate. *African Journal of Biotechnology*, **17**(10): 306-310.
- LIOTTA E, GOTTARDO R, SERI C, RIMONDO C, MIKSIK I, SERPELLONI G, TAGLIARO F (2012). Rapid analysis of caffeine in “smart drugs” and “energy drinks” by microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC). *Forensic science international*, **220**(1-3): 279-283.
- LIU M, ZHANG D, WANG X, ZHANG L, HAN J, YANG M, Xiao X, ZHANG Y, LIU H (2012). Simultaneous quantification of niacin and its three main metabolites in human plasma by LC–MS/MS. *Journal of Chromatography B*, **904**: 107-114.
- MAGOMYA AM, YEBPELLA GG, OKPAEGBE UC, OKO OJ, GAMBO SB (2020). Analysis and health risk assessment of sodium benzoate and potassium sorbate in selected fruit juice and soft drink brands in Nigeria. *Int. J. Pharm. Chem*, **5**: 54-59.
- MAHBOUBIFAR M, SOBHANI Z, DEHGHANZADEH G, JAVIDNIA K (2011). A comparison between UV spectrophotometer and high-performance liquid chromatography method for the analysis of sodium benzoate and potassium sorbate in food products. *Food Analytical Methods*, **4**(2), 150-154.
- MATYSOVA L, ZAHALKOVA O, KLOVRZOVA S, SKLUBALOVA Z, SOLICH P, ZAHALKA L (2015). Development of a gradient HPLC method for the simultaneous determination of sotalol and sorbate in oral liquid preparations using solid core stationary phase. *Journal of analytical methods in chemistry*, **2015**.
- MAZDEH FZ, MORADI Z, MOGHADDAM G, MORADI-KHATOONABADI Z, AFTABDARI FE, BADA EI P, HAJIMAHMOODI M (2016). Determination of synthetic food colors, caffeine, sodium benzoate and potassium sorbate in sports drinks. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **15**(1), 183-188.
- MEDINA IY, RODRIGUEZ DC, PARRA JW (2020). Analysis of caffeine in energy drinks by ultra-fast liquid chromatography. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. **1587**, No. **1**, p. 012024). IOP Publishing.

- MELFI MT, NARDIELLO D, CICCIO N, CANDIDO V, CENTONZE D (2018). Simultaneous determination of water-and fat-soluble vitamins, lycopene and beta-carotene in tomato samples and pharmaceutical formulations: Double injection single run by reverse-phase liquid chromatography with UV detection. *Journal of Food Composition and Analysis*, **70**: 9-17.
- MEYER VR (2010). Practical High-Performance Liquid Chromatography. 5. Baskı. John Wiley & Sons. İsviçre.
- MOHAMED MA (2021, March). Simultaneous Quantification of Cephalexin and Sodium Benzoate in their Dosage forms by high analytical technique. Application of Lean Six Sigma and In-Vitro Dissolution studies. In *Annales Pharmaceutiques Françaises* (Vol. **79**: No. 2, pp. 152-169). Elsevier Masson.
- MONFERRER-PONS L, CAPELLA-PEIRÓ ME, GIL-AGUSTÍ M, & ESTEVE-ROMERO J (2003). Micellar liquid chromatography determination of B vitamins with direct injection and ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography A*, **984**(2): 223-231.
- MOURA-SILVA AK, MANO-SOUSA BJ, SANTOS LP, COSTA RSD, ANDRADE FPD, DUARTE-ALMEIDA JM, GONÇALVES DB (2023). Development and validation of an analytical method by HPLC-DAD for determination of caffeine in products based on guarana extracts (*Paullinia cupana*). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **59**: e22106.
- MUCHLISYAM SM (2021). Application of Mean Centering Ratio and Multiple Wavelength Methods for Determination of Four Component Level in Multivitamin Syrup by Ultraviolet Spectrophotometry. *Journal of Hunan University Natural Sciences*, **48**(7).
- MUFAKKAR M, FATIMA K, FAHEEM H, AHMAD S, KHAN MH (2015). Estimation of Caffeine in different brands of Energy drinks by Ultra-Violet Spectroscopy. *International Journal of Scientific and Research Publications*.
- NADEEM IM, SHANMUGARAJ A, SAKHA S, HORNER NS, AYENİ OR, KHAN M (2021). Energy drinks and their adverse health effects: a systematic review and meta-analysis. *Sports Health*, **13**(3): 265-277.
- NONTHAKAEW A, MATAN N, AEWSIRI T, MATAN N (2015). Caffeine in foods and its antimicrobial activity. *International Food Research Journal*, **22**(1).
- NWANISOBI GC, UKOHA PO (2016). Spectrophotometric determination of niacin using 2, 3-dichloro-5, 6-dicyano-1, 4-benzoquinone. *Asian Journal of Chemistry*, **28**(11): 2371.
- OGUNLEYE DT, OYEYIOLA AO, ONWORDI CT, FALANA TG, ABOLADE OM (2017). Spectrophotometric and high performance liquid chromatographic determination of sodium benzoate and potassium sorbate in some soft drinks. *UNILAG Journal of Medicine, Science and Technology*, **5**(1): 168-178.

- OGUNTADE BK, AJIBODE CP (2022). UV-Spectrophotometry Determination of Sodium Benzoate and Potassium Sorbate from Some Selected Food Samples in Ota, Ogun State, Nigeria. *International Journal of Women in Technical Education and Employment*, **3**(1): 39-46.
- ONUR F (2011). Analitik Kimya II. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*. **101**: Ankara.
- ORAL EV, ZİYADANOGULLARI B, AYDIN F, DINC E, ZİYADANOGULLARI R (2016). ICP-OES method for the determination of Fe, Co, Mn, Cu, Pb, and Zn in Ore samples from the Keban region using experimental design and optimization methodology. *Atomic Spectroscopy*, **37**(4): 142-149.
- ÖZBAY N, YARGIÇ AŞ, YARBAY-ŞAHİN RZ, ÖNAL E (2013). Full factorial experimental design analysis of reactive dye removal by carbon adsorption. *Journal of Chemistry*, **2013**.
- ÖZDEMİR A, ŞANLI S, SARDOĞAN B, SARDOĞAN S. (2020). Determination of sorbic acid in cheese samples by rapid HPLC-DAD method. *International Journal of Analytical Chemistry*, **2020**.
- PALO M, KOGERMANN K, GENINA N, FORS D, PELTONEN J, HEINÄMÄKI J, SANDLER N (2016). Quantification of caffeine and loperamide in printed formulations by infrared spectroscopy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **34**: 60-70.
- PANDA H (2003). Herbal Foods and Its Medicinal Values. Niir Project Consultancy Services. Delhi.
- PARSHINA AV, HABTEMARIAM GZ, KOLGANOVA TS, SAFRONOVA EY, BOBRESHOVA OV (2021). Potentiometric Multisensory System Based on MF-4SC Membranes and Surface Modified Oxides for Analysis of Nicotinic Acid Pharmaceuticals. *Membranes and Membrane Technologies*, **3**(3): 155-162.
- PARSHINA AV, SAFRONOVA EY, KOLGANOVA TS, HABTEMARIAM GZ, BOBRESHOVA OV (2022). Perfluorosulfonic Acid Membranes with Functionalized Carbon Nanotubes in Potentiometric Sensors for the Analysis of Nicotinic Acid Pharmaceuticals. *Journal of Analytical Chemistry*, **77**(2): 195-205.
- PENCHEVA I, GEORGIEVA M (2014). Analysis of water-soluble vitamins in supplement mixtures by HPLC/UV. *Pharmacia*, **61**: No. 3/2014.
- PEREIRA LM, DELLA BETTA F, SERAGLIO SKT, SCHULZ M, NEHRING P, GONZAGA LV, FETT R, COSTA ACO (2021). Assessment of sorbate and benzoate content in mustard, ketchup and tomato sauce by sub-minute capillary electrophoresis. *Food Technology and Biotechnology*, **59**(3): 376-384.

- PEZZA L, SANTINI AO, PEZZA HR, MELIOS CB, FERREIRA VJF, NASSER ALM (2001). Benzoate ion determination in beverages by using a potentiometric sensor immobilized in a graphite matrix. *Analytica chimica acta*, **433**(2), 281-288.
- PERRONE D, DONANGELO CM, FARAH A (2008). Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography–mass spectrometry. *Food chemistry*, **110**(4): 1030-1035.
- PETANOVSKA-ILIEVSKA B, VELKOSKA-MARKOVSKA L, JANKULOVSKA MS (2017). Development of reverse-phase high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of sodium benzoate and potassium sorbate in beverages. *Acta Chromatographica*, **29**(3): 345-358.
- PFUHL P, KÄRCHER U, HÄRING N, BAUMEISTER A, TAWAB MA, SCHUBERT-ZSILAVECZ M (2005). Simultaneous determination of niacin, niacinamide and nicotinuric acid in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **36**(5): 1045-1052.
- PTOLEMY AS, TZIOUMIS E, THOMKE A, RIFAI S, KELLOGG M (2010). Quantification of theobromine and caffeine in saliva, plasma and urine via liquid chromatography–tandem mass spectrometry: A single analytical protocol applicable to cocoa intervention studies. *Journal of Chromatography B*, **878**(3-4): 409-416.
- PYLYPIW JR HM, GREETHER MT (2000). Rapid high-performance liquid chromatography method for the analysis of sodium benzoate and potassium sorbate in foods. *Journal of chromatography A*, **883**(1-2): 299-304.
- QI P, HONG H, LIANG X, LIU D (2009). Assessment of benzoic acid levels in milk in China. *Food Control*, **20**(4): 414-418.
- RÁCZ A, HÉBERGER K, FODOR M (2016). Quantitative determination and classification of energy drinks using near-infrared spectroscopy. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **408**: 6403-6411.
- RAKHSHANDEHROO GR, SALARI M, NIKOO MR (2018). Optimization of degradation of ciprofloxacin antibiotic and assessment of degradation products using full factorial experimental design by Fenton homogenous process. *Global NEST Journal*, **20**(2): 324-332.
- RAKIĆ T, STOJANOVIĆ BJ, MALENOVIĆ A, IVANOVIĆ D, MEDENICA M (2012). Improved chromatographic response function in HILIC analysis: application to mixture of antidepressants. *Talanta*, **98**: 54-61.
- REISSIG CJ, STRAIN EC, GRIFFITHS RR (2009). Caffeinated energy drinks—a growing problem. *Drug and alcohol dependence*, **99**(1-3): 1-10.

- REN L, MENG M, WANG P, XU Z, EREMIN SA, ZHAO J, YIN Y, XI, R. (2014). Determination of sodium benzoate in food products by fluorescence polarization immunoassay. *Talanta*, **121**: 136-143.
- Research and Markets (2023). Energy Drinks Global Market Report Erişim Adresi: [<https://www.researchandmarkets.com/reports/5744354/energy-drinks-global-market-report>]. Erişim Tarihi: 15/07/2023.
- RIBEIRO DO, PINTO DC, LIMA LMT, VOLPATO NM, CABRAL LM, DE SOUSA VP (2011). Chemical stability study of vitamins thiamine, riboflavin, pyridoxine and ascorbic acid in parenteral nutrition for neonatal use. *Nutrition journal*, **10**(1): 47.
- ROUHANI G, ERTEKİN ZC, DİNÇ E (2022). A Chemometric Strategy in the Development of a RP-UPLC Method for the Quantitative Resolution of a Two-Component Syrup Formulation. *Journal of Chromatographic Science*, **60**(10): 937-945.
- ROUHANI G, ERTEKİN ZC, DİNÇ E (2017). A new UPLC approach for the quantitation of ephedrine and guaifenesin in a syrup formulation using multivariate optimization strategy. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **40**(7): 333-339.
- RUDENKO AO, KARTSOVA LA (2010). Determination of water-soluble vitamin B and vitamin C in combined feed, premixes, and biologically active supplements by reversed-phase HPLC. *Journal of analytical chemistry*, **65**, 71-76.
- RUYI S, CHENGGANG C (2016). Simultaneous Determination of Glucuronic Acid, Malic Acid, Taurine and Potassium Sorbate in Functional Drinks by Ion Chromatography. *Research Journal of Biotechnology* **11**: 10.
- SAHU PK, RAMISETTI NR, CECCHI T, SWAIN S, PATRO CS, PANDA J (2018). An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **147**: 590-611.
- SAIMAITI A, ZHOU DD, LI J, XIONG RG, GAN RY, HUANG SY, SHANG AO, ZHAO CN, Lǐ HY, Lǐ HB (2022). Dietary sources, health benefits, and risks of caffeine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-19.
- SANTOS JR, RANGEL AO (2015). Development of a chromatographic low pressure flow injection system using amperometric detection: Application to the analysis of niacin in coffee. *Food chemistry*, **187**: 152-158.
- SEFIDI Z, TALEBPOUR Z, ABEDI G, MAHDAVI V, ABOUL-ENEIN HY (2018). Modified QuEChERS-HPLC method for determination of sodium benzoate and potassium sorbate preservatives in dairy products. *Current Analytical Chemistry*, **14**(6): 571-582.

- SEIFERT SM, SEIFERT SA, SCHAECHTER JL, BRONSTEIN AC, BENSON BE, HERSHORIN ER, ARHEART KL, FRANCO VI, LIPSHULTZ SE (2013). An analysis of energy-drink toxicity in the National Poison Data System. *Clinical toxicology*, **51**(7): 566-574.
- SELİMOĞLU F, KADIOĞLU Y, DİNÇ E (2016). Simultaneous determination of ascorbic acid, paracetamol, aspirin in tablets using UPLC. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, (2), 135-149.
- SHETTY SA, YOUNG MF, TANEJA S, RANGIAH K (2020). Quantification of B-vitamins from different fresh milk samples using ultra-high performance liquid chromatography mass spectrometry/selected reaction monitoring methods. *Journal of Chromatography A*, **1609**: 460452.
- SKOOG DA, HOLLER FJ, CROUCH SR (2007). Enstrümental Analiz. *Thomson Higher Education*. **6. Baskı**. Kanada.
- SKOOG DA, WEST DM, HOLLER FJ, CROUCH SR (2004). Analitik Kimya Temel İlkeler. *Thomson Higher Education*. Cilt:2. ABD.
- SOHRABVANDI S, VESAL H, MORTAZAVIAN A, MOHAMMADI A (2015). Simultaneous Determination of Potassium Sorbate and Sodium Benzoate in Doogh Using High Performance Liquid Chromatography. *Orient J Chem*, **31**(3): 1793-1799.
- SOTO C, PONCE-RODRÍGUEZ HD, VERDÚ-ANDRÉS J, HERRÁEZ-HERNÁNDEZ R, CAMPÍNS-FALCÓ P (2022). Determination of caffeine in dietary supplements by miniaturized portable liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1664**: 462770.
- SPĂȚARU N, SARADA BV, TRYK DA, FUJISHIMA A (2002). Anodic voltammetry of xanthine, theophylline, theobromine and caffeine at conductive diamond electrodes and its analytical application. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, **14**(11): 721-728.
- STEFAN-VAN STADEN RI, NICULAE AR, VAN STADEN JF, GEORGESCU STATE R, SFIRLOAGA P (2022). Nanographene-based electrochemical sensors for ultrasensitive determination of sorbic acid from food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **414**(23): 6813-6824.
- STOJANOVIĆ BJ (2013). Factorial-based designs in liquid chromatography. *Chromatographia*, **5**(76): 227-240.
- SUN CJ, SUN XX, ABOUL-ENEIN HY (2010). A polymer membrane electrode based on a zinc (ii) Schiff base complex for the selective determination of sodium benzoate. *Analytical letters*, **43**(12): 1989-1998.

- TALEUZZAMAN M, ALI S, GILANI SJ, IMAM SS, HAFEEZ A (2015). "Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) - A Review". *Austin J Anal Pharm Chem*. **2**(6): 1056.
- TANKER M, TANKER N (2003). *Farmakognozi* cilt 2.
- Türk Gıda Kodeksi Enerji İçecekleri Tebliği; 2006 Erişim tarihi: 12 December 2017.
- TFOUNI SAV, TOLEDO MCF (2002). Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. *Food control*, **13**(2): 117-123.
- TRANDAFIR I, NOUR V, IONICĂ E (2009). Development and validation of an HPLC method for simultaneous quantification of acesulfame-K, saccharin, aspartame, caffeine and benzoic acid in cola soft drinks. *Sci. Stud*, **10**: 185-194.
- TURAK F, GÜZEL R, DİNÇ E (2016). A new UPLC approach for the simultaneous quantitative estimation of four compounds in a cough syrup formulation. *Journal of chromatographic science*, **54**(1), 28-35.
- Türk Gıda Kodeksi. Enerji İçecekleri Tebliği (2017/4). Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 30 Haziran 2017 tarih ve 30110 sayılı Resmi Gazete, Ankara.
- ÜSTÜNDAĞ Ö, DİNÇ E (2021). Continuous wavelet transforms and ultra performance liquid chromatography applied to the simultaneous quantitative determination of candesartan cilexetil and hydrochlorothiazide in tablets. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, **152**: 1097-1106.
- VALLEZ-GOMIS V, PERIS-PASTOR G, BENEDE JL, CHISVERT A, SALVADOR A (2021). Green determination of eight water-soluble B vitamins in cosmetic products by liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **205**: 114308.
- VELIČKOVIĆ AV, STAMENKOVIĆ OS, TODOROVIĆ ZB, VELJKOVIĆ VB (2013). Application of the full factorial design to optimization of base-catalyzed sunflower oil ethanolysis. *Fuel*, **104**: 433-442.
- VIJAYAKUMAR A, MOSES V, CS G (2014). A Study on caffeine effect of tea on health. *Int J Adv Biotechnol Res [Internet]*, **5**: 359-63.
- WALCZAK-NOWICKA ŁJ, HERBET M (2022). Sodium Benzoate—Harmfulness and Potential Use in Therapies for Disorders Related to the Nervous System: A Review. *Nutrients*, **14**(7): 1497.
- WANG M, ZHANG J, ZHANG Z, LIU X, FAN J, LIU W, ZHANG X (2020). Simultaneous ultraviolet spectrophotometric determination of sodium benzoate and potassium sorbate by BP-neural network algorithm and partial least squares. *Optik*, **201**: 163529.

- WANG Y, LAU CE (1998). Caffeine has similar pharmacokinetics and behavioral effects via the ip and po routes of administration. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **60**(1): 271-278.
- WANG Y, NI C, M, LIU Y (2013). Classification and quantitative determination of sodium benzoate in muddy flesh by near- infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Food Processing and Preservation*, **37**(6): 1043-1048.
- WANG X, LI K, YAO L, WANG C, VAN SCHEPDAEL A (2018). Recent advances in vitamins analysis by capillary electrophoresis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **147**: 278-287.
- WARD CM, TRENERRY VC, PANT I. (1997). The application of capillary electrophoresis to the determination of total niacin in concentrated yeast spreads. *Food chemistry*, **58**(3): 185-192.
- WARD CM, TRENERRY VC (1997). The determination of niacin in cereals, meat and selected foods by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, **60**(4): 667-674.
- WOLK BJ, GANETSKY M, BABU KM (2012). Toxicity of energy drinks. *Current opinion in pediatrics*, **24**(2): 243-251.
- WOOLLARD DC, INDYK HE. (2002). Rapid determination of thiamine, riboflavin, pyridoxine, and niacinamide in infant formulas by liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, **85**(4): 945-951.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2000). Benzoic acid and sodium benzoate.
- WYSOCZANSKA K, DO HT, SADOWSKI G, MACEDO EA, HELD C (2020). Partitioning of water- soluble vitamins in biodegradable aqueous two- phase systems: Electrolyte perturbed- chain statistical associating fluid theory predictions and experimental validation. *AIChE Journal*, **66**(10): e16984.
- XIAO X, HOU Y, DU J, SUN D, BAI G, LUO G (2012). Determination of vitamins B2, B3, B6 and B7 in corn steep liquor by NIR and PLSR. *Transactions of Tianjin University*, **18**: 372-377.
- XUE L, CHEN L, DONG J, CAI L, WANG Y, CHEN X (2020). Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with surface enhanced Raman scattering for the rapid detection of sodium benzoate. *Talanta*, **208**: 120360.
- YERLIKAYA O, GUCER L, AKAN E, MERIC S, AYDIN E, KINIK O (2021). Benzoic acid formation and its relationship with microbial properties in traditional Turkish cheese varieties. *Food Bioscience*, **41**: 101040.

- YULIANA T, GUSTIN SSN, ALAMSYAH A, BUDIMAN S, HARDIAN A, YUN YF, AGMA M (2021, March). HPLC Method for Simultaneous Determination of Dextromethorphan Hydrobromide, Chlorpheniramine Maleate and Potassium Sorbate in Cough Syrup. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, **1115**(1): p. 012035). IOP Publishing.
- ZAMANI MAZDEH F, SASANFAR S, CHALIPOUR A, PIRHADI E, YAHYAPOUR G, MOHAMMADI A, ROSTA A, AMINI M, HAJIMAHMOODI M (2017). Simultaneous determination of preservatives in dairy products by HPLC and chemometric analysis. *International journal of analytical chemistry*, **2017**.
- ZHANG G, MA Y (2013). Spectroscopic studies on the interaction of sodium benzoate, a food preservative, with calf thymus DNA. *Food chemistry*, **141**(1): 41-47.
- ZHANG H, QI L, QIAO J, MAO L (2011). Determination of sodium benzoate by chiral ligand exchange CE based on its inhibitory activity in D-amino acid oxidase mediated oxidation of D-serine. *Analytica chimica acta*, **691**(1-2): 103-109.
- ZHANG H, YANG H, LIU P, QIN X, LIU G (2022). Colorimetric quantification of sodium benzoate in food by using d-amino acid oxidase and 2D metal organic framework nanosheets mediated cascade enzyme reactions. *Talanta*, **237**, 122906.
- ZHANG Y, ZHOU WE, YAN JQ, LIU M, ZHOU Y, SHEN X, MA YL, FENG XS, YANG J, LI GH (2018). A review of the extraction and determination methods of thirteen essential vitamins to the human body: An update from 2010. *Molecules*, **23**(6): 1484.
- ZHAO Y, LUNTE CE (1997). Determination of caffeine and its metabolites by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **688**(2): 265-274.
- ZIELIŃSKA A, MAZUREK A, SIUDEM P, KOWALSKA V, PARADOWSKA K (2022). Qualitative and quantitative analysis of energy drinks using ¹H NMR and HPLC methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **213**: 114682.
- ZYABLOV AN, YEN VH (2022). Determination of Sodium Benzoate in Liquids Using a Piezoelectric Sensor Modified by a Molecularly Imprinted Polymer. *Journal of Analytical Chemistry*, **77**(12): 1607-1611.