



**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce**

**Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /**

**Tezin Savunma Tarihi : / /**

**Tez Danışmanı :**

**Trabzon**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun / / gün ve sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Üyeleri**

**Başkan :** .....

**Üye :** .....

**Üye :** .....

**Prof. Dr. Asim KADIOĞLU**  
**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

Çalışmalarında yol göstericiliği ve fikirleriyle katkıda bulunan danışman hocam Prof. Dr. Hakan ALP, Prof. Dr. Ümmühan OCAK ve Prof. Dr. Miraç OCAK'a, doktora öğrencilerinden Serhat GÜN'e ve Abidin GÜMRÜKÇÜOĞLU'na, kullanmış olduğum ligand laboratuvarında sentezlenen Prof. Dr. Nurettin YAYLI'ya ve ligandı sentezleyen Gonca ÇELİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Ece Çilten GÜN

Trabzon, 2019

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Şeker Hamurlarında Kullanılan Gıda Boyası Tartrazinin Yeni Bir Pirazol Türevi İle Spektroflorimetrik Metot İle Tayini” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Hakan ALP sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri ilgili her bir çalışmayı laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 09/07/2019

Ece Çilten GÜN

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET .....	VII
SUMMARY .....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ .....	XII
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Gıda Boyaları.....	1
1.2. Uluslararası Numaralandırma Sistemine Göre Gıda Boyalarının Kodları .....	2
1.3. Gıda Boyalarının Elde Edildikleri Kaynaklara Göre Sınıflandırılması.....	3
1.3.1. Doğal Kaynaklardan Elde Edilen Gıda Boyaları.....	3
1.3.2. Sentetik Olarak Elde Edilen Gıda Boyaları .....	4
1.4. Tartrazin.....	4
1.4.1. Tartrazinin Kullanım Alanları .....	5
1.4.2. Tartrazinin Toksikolojik Etkileri .....	5
1.4.3. Tartrazin Tayini İçin Kullanılan Bazı Yöntemler.....	7
1.5. Moleküler Lüminesans Spektroskopisi.....	7
1.6. Floresans Analiz Cihazı Bileşenleri.....	10
1.6.1. Işın Kaynağı.....	10
1.6.2. Filtre ve Monokromotörler .....	10
1.6.3. Dedektörler .....	11
1.6.4. Hücreler ve Hücre Bölümleri.....	11
1.7. Floresansı Etkileyen Faktörler.....	11
1.8. Metot Validasyon Parametreleri .....	12
1.8.1. Doğruluk.....	12
1.8.2. Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik.....	13
1.8.3. Seçimlilik ve Duyarlık .....	13

1.8.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) .....	13
1.8.5. Tayin Sınırı (LOQ) .....	14
1.8.6. Çalışma Aralığı .....	14
1.9. Floresans Spektrometrisi ile Kantitatif Tayin .....	14
1.9.1. Dış Kalibrasyon Doğrusu Yöntemi .....	14
1.9.2. Standart Ekleme Yöntemi .....	15
1.10. Literatürde Tartrazin Boyalarının Tayini .....	15
1.11. Yapılan Çalışmanın Amacı .....	16
2. DENEYSEL KISIM .....	17
2.1. Kullanılan Ligand .....	17
2.2. Kullanılan Kimyasallar .....	17
2.3. Kullanılan Cihazlar .....	18
2.4. Yapılan Ölçümler .....	19
2.4.1. Ligand Çözeltilerinin Hazırlanması .....	19
2.4.2. Boyar Madde Çözeltilerinin Hazırlanması .....	19
2.4.3. Şeker Hamuru Numunesinin Hazırlanması .....	19
2.4.4. Ölçüm Şartları .....	19
2.5. Tartrazin Tayini İçin Önerilen Metot .....	20
2.6. Spektroflorimetrik Ölçümler .....	20
3. BULGULAR .....	21
3.1. Ligandın Floresans Tarama Spektrumu .....	21
3.2. Ligandın Floresans Spektrumuna Boyar Maddelerin Etkisi .....	21
3.3. Ligandın Floresans Spektrumuna Artan Tartrazin Konsantrasyonunun Etkisi .....	25
3.4. Şeker Hamurunda Tartrazin Tayini .....	26
3.5. Tartrazin Tayini İçin Metot Validasyonu .....	27
3.5.1. Doğrusal Aralık .....	27
3.5.2. Gözlenebilme Sınırı (GS, LOD) ve Tayin Sınırı (TS, LOQ) .....	27
3.5.3. Doğruluk .....	27
3.5.4. Kesinlik .....	28
4. TARTIŞMA .....	29
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	31
6. KAYNAKLAR .....	32
ÖZGEÇMİŞ	

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

ŞEKER HAMURLARINDA KULLANILAN GIDA BOYASI TARTRAZİNİN YENİ  
BİR PİRAZOL TÜREVİ İLE SPEKTROFLORİMETRİK METOT İLE TAYİNİ

Ece Çilten GÜN

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı  
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hakan ALP  
2019, 33 Sayfa

Bu çalışmada şeker hamurlarında kullanılan sarı renkli tartrazin gıda boyasının kantitatif tayini spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirilmiştir. Bunun için dış kalibrasyon yöntemi kullanılmıştır. Kısa sürede ve az malzeme tüketimi ile gerçekleştirilen analizde şeker hamurundaki tartrazin tayini yapılmıştır. Kullanılan şeker hamuru kurumsal bir marketten temin edilmiştir. Metotta çözücü olarak etanol tercih edilmiştir ve etanolün toksik olmayan özelliği metodu kullanışlı hale getirmiştir. Öncelikle artan miktarlarda standart tartrazin çözeltisi içeren sabit konsantrasyondaki ligand çözeltilerinin floresans şiddetleri grafiğe geçirilmiş, daha sonra içerdiği tartrazin miktarı tayin edilecek olan numunenin floresans şiddeti ölçülerek grafikten tartrazin miktarı hesabı yapılmıştır. Kullanılan metodun doğrusal aralığı, doğruluğu, gözlenebilme sınırı (LOD), tayin sınırı (LOQ) ve kesinliği belirlenerek metot valide edilmiştir. Şeker hamurundaki tartrazin tayin sınırı 9 µg/mL olarak bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Tartrazin, spektrofotometre, şeker hamuru.

Master Thesis

SUMMARY

DETERMINATION OF FOOD PAINT TARTRAZINE USED IN SUGAR PASTES  
WITH A NEW PYRAZOL DERIVATIVE BY SPECTROFLORIMETRIC METHOD

Ece Çilten GÜN

Karadeniz Technical University  
Institute of Natural Sciences  
Department of Chemistry  
Supervisor: Prof. Dr. Hakan ALP  
2019, 33 Pages

In this study, the determination of the food color of yellow tartrazine used in sugar paste was carried out by spectrofluorimetric method. External calibration method is preferred. In a short period of time and with less material consumption, tartrazine was determined in sugar paste. The sugar pulp used is obtained from an institutional market. Ethanol was preferred as the solvent in the method and the nontoxic properties of ethanol were useful. Firstly, the fluorescence intensities of the ligand solutions in fixed concentrations containing increasing amounts of standard tartrazine solution were plotted. The method was validated by determining the linear range, accuracy, detection limit (LOD), limit of determination (LOD) and accuracy of the method used. The limit of the determination of tartrazine in sugar paste was found to be 9 µg / mL.

**Key Words:** Tartrazine, spectrofluorimetric, sugar paste.



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Günümüzde yiyeceklerde kullanılan yapay boyalar .....	2
Şekil 2. Doğal kaynaklardan elde edilen gıda boyaları .....	3
Şekil 3. Tartrazin molekül yapısı .....	5
Şekil 4. Temel hal ve uyarılmış haldeki elektronların alabileceği bazı durumların şematik gösterimi .....	7
Şekil 5. Jablonski diyagramı .....	8
Şekil 6. Floresans spektrofotometresinin şematik gösterimi.....	10
Şekil 7. Floresans küveti .....	11
Şekil 8. Floren ve bifenil yapıları.....	11
Şekil 9. 8-Hidroksikinolin kompleksi yapısı.....	12
Şekil 10. Kullanılan ligand.....	17
Şekil 11. Kullanılan QM-4-2006 PTI spektrofotometre cihazı .....	18
Şekil 12. $1 \times 10^{-6}$ M ligand çözeltisinin floresans spektrumu .....	21
Şekil 13. Ligand ve Sudan IV içeren ligand çözeltilerinin floresans spektrumlarının karşılaştırılması .....	21
Şekil 14. Ligand ve Sudan red içeren ligand çözeltilerinin floresans spektrumlarının karşılaştırılması .....	22
Şekil 15. Ligand ve Sudan II içeren ligand çözeltilerinin floresans spektrumlarının karşılaştırılması .....	22
Şekil 16. Ligand ve Sunset yellow içeren ligand çözeltilerinin floresans spektrumlarının karşılaştırılması.....	23
Şekil 17. Ligand ve Sudan I içeren ligand çözeltilerinin floresans spektrumlarının karşılaştırılması .....	23
Şekil 18. Ligand ve quinoline yellow içeren ligand çözeltilerinin floresans spektrumlarının karşılaştırılması.....	24
Şekil 19. Ligand ve tartrazin içeren ligand çözeltilerinin floresans spektrumlarının karşılaştırılması .....	24
Şekil 20. Yalnızca ligand ve allure red içeren ligand çözeltilerinin floresans spektrumlarının karşılaştırılması.....	25

Şekil 21. Artan konsantrasyonlarda tartrazin içeren ligandın floresans spektrumundaki değişimi .....	25
Şekil 22. Artan konsantrasyonlarda tartrazin içeren ligandın kalibrasyon grafiği.....	26
Şekil 23. Kalibrasyon grafiği üzerinde şeker hamurundaki tartrazin miktarı tayini .....	26



## TABLolar DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1. E numarası kodlaması .....	3
Tablo 2. AB ve ABD yetkili kuruluşları tarafından onaylanan bazı gıda boyaları .....	4
Tablo3. Tartrazinin Türkiye’de kullanılabilceği gıdalar ve bulunabileceği en yüksek miktarlar.....	6
Tablo 4. Işık kaynaklarının bölgelere göre kullanılabilirliği.....	10
Tablo 5. Şeker hamurundaki tartrazin analizi sonuçları.....	27
Tablo 6. Numuneler için tartrazin analizi % geri kazanım değerleri .....	28
Tablo 7. Tartrazin tayini için önerilen spektrofiorimetrik yöntemin özellikleri .....	30

## KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

%BSS	: Bağıl Standart Sapma
AB	: Avrupa Birliği
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
FI	: Floresans Şiddeti
L	: Ligand
LOD	: Tespit Sınırı (Limit of Detection)
LOQ	: Tayin Sınırı (Limit of Quantification)
$\mu\text{g/mL}$	: Mikrogram/mililitre
nm	: Nanometre
$R^2$	: Korelasyon Katsayısı

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Gıda Boyaları

Renk, gıdaların duyuşal özellikleri yönünden ele alındığında, tüketici tercihi açısından gıdanın çekiciliğinde önemli rol oynamaktadır. Gıda ile ilgili ilk izlenim görşelliktir ve gıdanın tercih edilmesinde rengi kabul veya red edilmesine bağılıdır.

Günümüzde gelişen gıda üretim teknolojileri dikkate alındığında gıdalar işleme depolama ve satışa sunma gibi çeşitli aşamalarda ısı, ışık, pH değışimi ve oksijen gibi fiziksel ve kimyasal koşullara bağılı olarak renk solması ve kaybına uğramaktadır. Fakat gıda üreticileri gıda işleme sırasında gıdanın orijinal rengini koruma, ürünün tek renk olmasını sağlama ve çekiciliğini artırma amacına bağılı olarak, üretilen renksiz veya az renkli gıdalara renk kazandırma ve bu rengi koruma amaçlı renklendirici katkı maddelerini ürünlerinde kullanmaktadırlar [1].

Gıda boyası kullanımını incelendiğinde temel kullanım amacının gıdalarda renk çeşitliliğini artırarak daha cazip hale gelmesini sağlamaktır. Bu sayede gıdalar daha dikkat çekici hale gelir. Aynı zamanda gıda boyasıyla teknolojik yönden ürün için renk standardı oluşturulur. Bunun yanı sıra herhangi bir gıdanın fazla sıcaktan, nemden, yaşanan hava değışiminden minimum düzeyde etkilenmesini sağlamak ve muhafaza edildikleri bölgede renk kaybı yaşamamasına engel olmak için de gıda boyası kullanılır [2].

Kullanılan gıda boyası ile aslında rengi olmayan bir gıdaya renk kazandırılır. Buna ek olarak gerek rengi gerek görüntüsüyle düşük kaliteli olan bir gıdayı daha çekici hale getirmek için gıda boyası tercih edilir. Böylece gıdanın hem lezzet hem de görüntü kalitesi artar. Bunların yanı sıra tüketicilerin beklentilerini karşılamak amacı ile gıda boyası kullanımıyla işleme ve depolama etkileri en aza indirilir.

Gıda boyaları kendi içerisinde doğal, sentetik ve yarı sentetik olmak üzere üç gruba ayrılır. Bu gruplandırma yapılırken elde edilmiş oldukları kaynak göz önünde bulundurulur. Yapay gıda boyaları kullanılarak elde edilen gıdalar sağlık açısından uygun değildir. Bundan dolayı doğal gıda boyaları daha çok tercih edilir.

Doğal gıda boyaları kırmızı biber, zerdeçal, safran, kırmızı pancar, meyve ve sebze suları gibi direkt olarak kullanılan bitkilerden elde edilebilir. Bunun yanı sıra bitkisel ve

hayvansal maddelerden, karbonhidratlardan ısıyla elde edilen renk maddeleri, vitamin kökenli olan ve inorganik renk maddeleri gibi çeşitlerle de kullanılır.

Gıda boyası zararları incelendiğinde en çok bilinen ve en önemlilerinden biri olan genetik faktörlere etkisi görülür. Aşırı miktarda gıda boyası tüketen kişinin kalıtsal yapısını bozarak çift çekirdeklilik, kromozomların normal dışı olması, DNA problemleri gibi sorunlara yol açabilir. Bunun yanı sıra gıda boyası çeşitli davranış bozukluklarına sebep olur. Bazı araştırmalar küçük yaşlarda gıda boyası tüketen çocukların davranış ve dikkat bozukluğu sergilediğini ifade eder. Bu nedenle özellikle çocuklardan bu tarz gıdaların uzak tutulması gerekir [3].

Gıda boyaları kanser riskini artıran özelliğe sahiptir. Görüntüsüyle cezbedici olan bu boyaların kanser görülme riskini artırdığı, çocuklarda bu riskin daha fazla olduğu söylenir. Öğrenme ve hafıza ile alakalı bozukluklara da yol açtığı, çocuklardaki hafıza merkezini etkilediği ve öğrenme kabiliyetlerinde bozukluklara sebep olduğu belirtilir [3].



Şekil 1. Günümüzde yiyeceklerde kullanılan yapay boyalar

## 1.2. Uluslararası Numaralandırma Sistemine Göre Gıda Boyalarının Kodları

Gıda boyaları E100, E200, E300 gibi E harfi ile kodlanır ve E harfi “European” kelimesini ifade eder. Uluslararası alanda kabul görmüş olan gıda boyalarının, E kodunun yanında bir de numarası vardır [4].

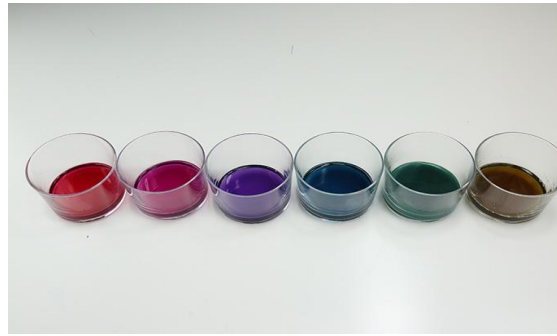
Tablo 1. E numarası kodlaması

E numarası	Adlandırma
E100 - E180	Boyalar
E200 - E297	Koruyucular
E300 - E385	Antioksidanlar
E400 - E466	Jelleştirici ve Koyulaştırıcılar

### 1.3. Gıda Boyalarının Elde Edildikleri Kaynaklara Göre Sınıflandırılması

#### 1.3.1. Doğal Kaynaklardan Elde Edilen Gıda Boyaları

Doğal renklendirici maddeler mikrobiyal, bitkisel, hayvansal ve mineral kaynaklardan elde edilen pigmentlerdir. Renk aralıkları sınırlı olan bu renk maddeleri genel olarak zayıf bir kararlılık ile zayıf bir renklendirme gücüne sahip olup, ısı ve pH'tan etkilenirler. Doğal renk maddelerinin birçok fiziksel ve kimyasal etkilere karşı (ısı, ışık, pH) kararlılıklarının düşük olması ve gıdalarda kullanımlarında çeşitli problemler yaşanmasına karşın, son yıllarda yapılan araştırmalarda sağlık üzerinde olumlu etkileri nedeniyle bu maddelerin kullanımlarının arttığı gözlenmektedir [5].



Şekil 2. Doğal kaynaklardan elde edilen gıda boyaları

Tablo 2. AB ve ABD yetkili kuruluşları tarafından onaylanan bazı gıda boyaları [6].

Doğal Gıda Boyaları	AB Kodu	Sertifika	Kaynak/Renk/Özellik
Kurkumin, Zerdeçal	E 100	Evet	Curcuma longa; turuncu-sarı; keskin koku
Riboflavin	E 101	Evet	Fermantasyondan elde; sarı; acı tat
Karmin	E 120	Evet	Dişi coccus böceği; turuncu kırmızı
Karamel	E 150	Evet	Karbohidratlar; kahverengi
Karoten	E 160a	Evet	Hurma yağı; turuncu; kolay okside
Betanin	E 162	Evet	Kırmızı pancar kökü; kırmızı; ısıya duyarlı
Antosiyanin	E 163	Evet	Üzüm kabuğu, siyah havuç, kırmızı lahana; kırmızı
Kalsiyum karbonat	E 170	Evet	Mineral kayaçlar; beyaz; yüzey boyası
Demiroksit	E 172	Evet	Mineral kayaçlar; yeşil, kırmızı, siyah; yüzey boyası

### 1.3.2. Sentetik Olarak Elde Edilen Gıda Boyaları

Sentetik olarak elde edilen gıda boyaları, doğadan elde edilmeyen fakat laboratuvar ortamında sentez yoluyla üretilen katkı maddeleridir [7]. Bu maddelerin çoğunda ana materyal olarak kömür tercih edilir. Renk verme şiddetleri, renk oluşturabilme aralıkları, kolay kullanılabilir olmaları ve maliyet açısından daha uygun olması nedeniyle doğal gıda boyalarına karşı daha üstün sayılabilirler ve sonuç olarak daha çok tercih edilirler. Sentetik gıda boyaları yüksek oranlarda suda çözünebilirler [8]. Isıya, ışığa, pH değişimine ve çoğu kimyasal maddeye karşı dirençlidirler [9].

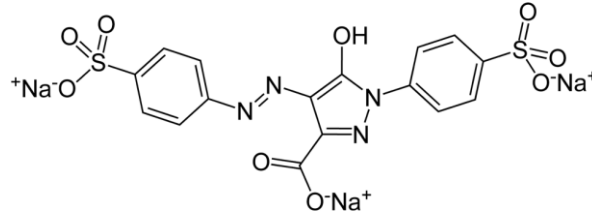
### 1.4. Tartrazin

Tartrazin (E102 veya FD&C Yellow 5); kimyasal adı, Trisodyum 5-hidroksi-1-(4-sülfanato-fenil)-4-(4-sulfanatofenilazo)-H-prizol-3-karboksilat (sodyum tuzu) ve kimyasal formülü  $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$  olan bir bileşiktir [10]. Pirazolin halkası içeren, monoazo yapıda, sertifikalı, sentetik bir boya maddesidir. Bu grupta yer alan boyalar,  $-N=N-$  grubu içerdiğinden azo boyası olarak da bilinirler. Azo boyaları içerisinde en çok kullanılan boyalardan olan tartrazin; turuncu-sarı renkte ve toz halinde bir boyadır. Suda kolaylıkla



çözünebilir ve altın sarısı renkte çözeltiler oluşturur [11]. Tartrazin, oksaloasetik ester ile fenilhidrazin-p-sülfonik asidin kondenzasyonu sonucu sentezlenir. Reaksiyon ürünü, diazot içeren sülfanilik asit ile birleştirildikten sonra oluşan ester, sodyum hidroksit ile hidroliz edilir. Sentezlemenin bir diğer yolu ise, bir mol dihidroksitartarik asit ile iki mol fenilhidrazin-p-sülfonik asidin kondenzasyonudur.

Tartrazinin günlük maksimum alınabileceği miktar, Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA tarafından 5 mg/kg/gün) olarak belirlenmiştir. Ortalama 30 kg ağırlığındaki bir çocuk için bu değer 150 mg/gün doza denk gelmektedir.



Şekil 3. Tartrazin molekül yapısı

#### 1.4.1. Tartrazinin Kullanım Alanları

Dünyada pek çok ülkede kullanılan tartrazin, 1916 yılından beri Amerika Birleşik Devletleri'nde en çok kullanılan ikinci gıda boyasıdır. Tartrazin; aromalı içecekler, konserveler, korunmuş meyveler, pastane mamulleri, süsleme ve kaplama maddeleri, tatlılar, soslar, hardal, cipsler, dondurma ve şekerlemeler, çerezler, evcil hayvan yiyecekleri ve daha birçok gıdanın yanı sıra ilaç ve kozmetik ürünlerinde de sıklıkla kullanılmaktadır. İçecekler, aromalı mısır cipsi, krema tozu, hazır çorbalar, soslar, pastacılık ürünleri, et ve süt ürünleri, jöleler, pudingler, dondurma, sakız, reçel gibi gıda ürünlerinde, boya kalemleri, sulu ecza çözeltileri, ilaç tabletleri, diş macunları, şampuan ve nemlendirici gibi kozmetik ürünlerinde en sık kullanılan renklendiricilerden biridir. Yün, ipek, naylon, deri ve kâğıt boyamada, mürekkep hazırlanmasında, sabun ve plastik boyanmasında ve hayvan histolojisinde kontrast boya olarak da kullanılmaktadır [12].

#### 1.4.2. Tartrazinin Toksikolojik Etkileri

Çeşitli klinik koşullarda etkisi incelenen tartrazinin toksik veya patolojik bir etkisinin

olmadığı ya da tümör oluşumu için herhangi bir risk oluşturmadığı belirtilmesine rağmen yapılan klinik çalışmalarda tartrazin gibi azo grubu boyaların özellikle çocuklarda hiperaktiviteye neden olduğu, astımlı ve aspirine duyarlı bireylerde istenmeyen reaksiyonlar (migren, deride kızarıklıklar ve kabarmalar, nezle, bulanık görme, öğrenme güçlüğü) meydana getirdikleri saptanmıştır. Bunlara ek olarak çocuklarda detoksifikasyon sürecinin daha yavaş gerçekleşmesi de bu sonuca yol açabilmektedir.

Tartrazinin, nörodavranışsal toksisite, anksiyete, migren, klinik depresyon, bulanık görme, kaşıntı, halsizlik, sıcak basması, boğulma hissi, deride lekeler ve uyku bozukluğu gibi pek çok immünolojik tepkilerin ortaya çıkmasına da neden olabileceği belirtilmiştir. Astım ataklarına yol açan alerji, hücrel hasar ve aspirin ve ventolin gibi yaygın kullanılan ilaç ürünleri ile tartrazinin etkileşimini gösteren çalışmalar, bazı ülkelerde tartrazin kullanımının yasaklanmasına yol açmıştır [13].

Tablo 3. Tartrazinin Türkiye’de kullanılabileceği gıdalar ve miktarlar

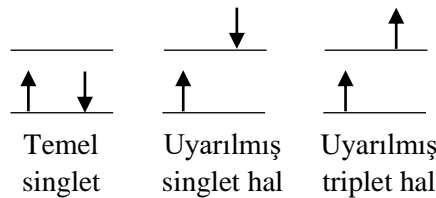
Gıda Maddesi	En Yüksek Miktar
Alkolsüz aromalı içecekler	100 mg/l
Meyve ve sebze şekerlemeleri	200 mg/kg
Şekerlemeler	300 mg/kg
Korunmuş kırmızı meyveler	200 mg/kg
Süsleme ve kaplama maddeleri	500 mg/kg
Hafif fırıncılık ürünleri	200 mg/kg
Yenilebilir buzlar	150 mg/kg
Aromalandırılmış işlenmiş peynir	100 mg/kg
Aromalandırılmış süt ürünleri dahil tatlılar	150 mg/kg
Soslar	500 mg/kg
Ön pişirme yapılmış kabuklu su ürünleri	250 mg/kg
Somon balığı benzerleri	500 mg/kg
Balık yumurtası	300 mg/kg
Füme balık	100 mg/kg
Patlamış veya hacimlendirilmiş çerezler	200 mg/kg
Diğer çerezler	100 mg/kg
Ek sıvı gıdalar, diyet tamamlayıcılar	100 mg/l
Ek katı gıdalar, diyet tamamlayıcılar	300 mg/kg
Çorbalar	50 mg/kg
Bitkisel protein bazlı et ve balık analogları	100 mg/kg
Alkollü içecekler	200 mg/l

### 1.4.3. Tartrazin Tayini İçin Kullanılan Bazı Yöntemler

Gıda maddelerinde tartrazin analizi için birçok sistem geliştirilmiştir. Bu sistemler içinde en yaygın olanı ise yüksek performanslı sıvı kromatografisidir. Son yıllarda elektroanalitik teknikler ve UV-VIS, <sup>1</sup>H-NMR ve Raman gibi spektroskopik yöntemlerle de tartrazin analizleri yapılmaktadır. Floresans spektroskopisi de tartrazin analizi için kullanılan bir spektroskopik yöntemdir. Hızlı, hassas bir analitik tekniktir. Son yıllarda floresans spektroskopisi gıdaların doğrudan analizi için kullanılmaktadır [14].

### 1.5. Moleküler Lüminesans Spektroskopisi

Atomların veya moleküllerin en kararlı hallerinde, elektronlar farklı enerji seviyelerindeki orbital bölgelerinden en düşük enerjili olanlarını doldururlar ve bu hale en düşük enerjili hal, kararlı hal veya temel hal adı verilir. Temel haldeki bir türe dışarıdan bir enerji verildiğinde elektronlar bu enerjiyi absorblayıp daha yüksek enerjili orbitallere geçiş yapabilirler. Bu durumdaki türler kararsızdır ve bu hale uyarılmış hal adı verilir. Uyarılmış haldeki kararsız türler absorbladıkları bu enerjiyi çeşitli yollarla vererek kararlı hale dönerler. İşte bu enerji yayımının ışık şeklinde olmasına lüminesans denir ve bu ışığı inceleyen bilim alanına da lüminesans spektroskopisi denir [15]. Lüminesans, uyarılmış haldeki elektronun spinine bağlı olarak farklı iki mekanizmayla gerçekleşir; floresans ve fosforesans. Eğer uyarılmış halde, yüksek enerjili orbitallere geçiş yapmış elektronun spini temel seviyede bulunan elektronla ters yönde ise bu hale singlet hal denir. Ters durumda, yani yüksek enerjili orbitale geçiş yapmış elektronla temel seviyede bulunan elektronla aynı yönde ise bu hale triplet hal adı verilir [16].



Şekil 4. Temel hal ve uyarılmış haldeki elektronların alabileceği bazı durumların şematik gösterimi

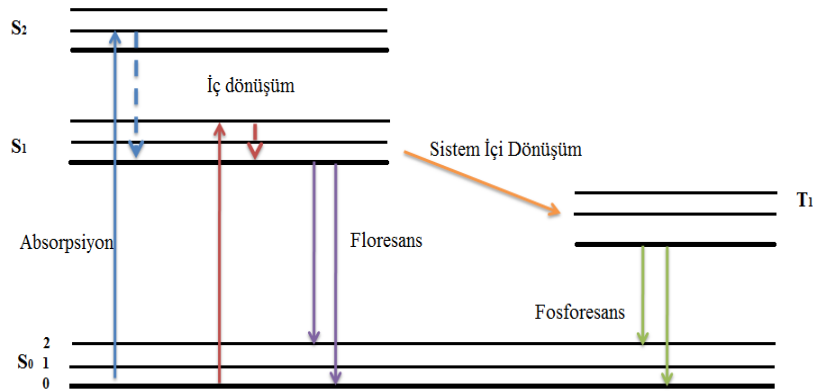
Özel bir bileşik üzerine ışın gönderildiği zaman bu bileşik bir ışına yapar, ışın kesildiği zaman ışımının bir süre daha sürüp yavaş yavaş kaybolduğu olaya fosforesans denir. Fosforesans cisimlere örnek olarak baryum, kalsiyum, çinko sülfürleri sayabiliriz.

Uyarılmış molekülün temel enerji düzeyine dönerken ışık yaymasına genel olarak fotoluminesans denir. Uyarılma enerjisi bir kimyasal tepkimeden karşılanırsa bu olaya kemilüminesans, elektrik enerjisi kullanıldığında elektrolüminesans, canlılardaki biyomoleküller kullanıldığında ise biyoluminesans adını alır [17].

Floresans yayılımında moleküller, ışımsız durumlara nedeniyle enerji kaybettiklerinden dolayı, absorbladıkları enerjiden daha düşük bir enerji yayarlar. Bu yüzden floresans spektroskopisinde genellikle uyarıcı ışığın dalga boyundan daha uzun dalga boylu ışınlar floresansta gözlemlenir. Emisyonun daha büyük dalga boyuna kayma olayına Stokes kayması adı verilir [18].

Floresans olayına dayanan yöntem “Florimetri” denir. Floresans olayı emisyonaya dayanmaktadır. Bunu açıklamak için öncelikle absorpsiyonu tanımlamak gerekir. Çeşitli dalga boylarında ışın içeren bir ışın demeti şeffaf bir ortamdan geçirilirse içinden bazı dalga boylarında ışınların kaybolduğu görülür. Buna ışının absorplanması denir. Absorpsiyon ile ışın enerjisi maddenin atom, iyon veya moleküllerine aktarılır. Işın enerjisini absorplamış olan iyon, atom veya moleküller uyarılmış hale geçerler.

Uyarılmış halde bulunan atom, iyon veya moleküllerin belli dalga boylarında ışımalar yaparak daha düşük enerji seviyelerine geçmesine Emisyon denir. Uyarılmış bir türün temel hale dönmesi için birkaç yol vardır. Yani, emisyon ışımalı ve ışımsız olmak üzere iki başlıkta incelenir.



Şekil 5. Jablonski diyagramı

Titreşimsel Durulma,  $S_1$  ve  $S_2$ 'nin titreşim seviyelerine uyarılmış olan atomlar, uyarılmış oldukları seviyeden temel hale direkt dönmezler, titreşim seviyelerini basamak basamak kat ederek daha düşük titreşim seviyelerine inerler [19].

İç Dönüşüm:  $S_2$ 'nin herhangi bir titreşim seviyesinden  $S_1$ 'in herhangi bir titreşim seviyesine geçiş olabilir.

Lüminesans: Uyarılmış olan analit, uyarıcı ışıktan farklı bir dalga boyunda emisyon yapıyorsa buna "lüminesans" denir.

Fotolüminesans: Uyarıcı bir ışıkta bu olaya fotolüminesans denir.

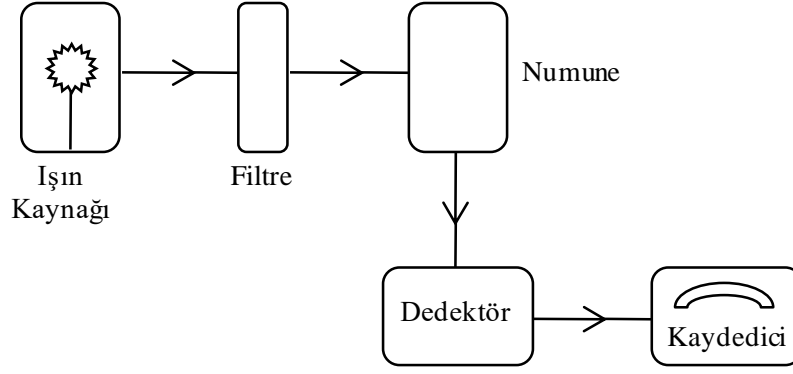
Floresans: Herhangi bir kaynaktan yayılan UV-VIS ışınının absorplanması sonucu uyarılan bir maddenin, kendisini uyaran ışımaya enerjisinden daha düşük enerjili bir ışın yayarak temel hale dönmesine denir. Madde kendine özgü dalga boyunda ışımaya yapar.

Fosforesans: Molekülün, uyarılmış triplet halin herhangi bir seviyesinden, temel hale ışık yayarak geçmesi mümkündür. Bu olaya "fosforesans" denir [20].

Moleküllerde uyarılma, bağ orbitallerinde bulunan elektronların anti bağ orbitallerine geçmesi ile gerçekleşir. Anti bağ orbitallerine geçen elektron spinini değiştirmeden geçiş yapmışsa buna singlet uyarılma denir. Anti bağ orbitallerine geçen elektron, bağ orbitallerindeki elektron ile aynı spine sahipse buna da triplet uyarılma denir. Bazı moleküllerde atom veya molekül, uyarılmış singlet hale geçtikten sonra enerjisinin bir kısmını termal olarak atarak, uyarılmış triplet hale geçebilir. Buna haller arası geçiş denir. Uyarılmış triplet halin enerji düzeyi, uyarılmış singlet halinkinden daha düşüktür. Uyarılmış triplet hal daha düşük enerjili olduğundan dolayı daha karardır. Genel olarak, uyarılmış triplet hale direkt geçiş olmaz [20].

Floresansta uyarılmış singlet hal  $\rightarrow$  singlet hal geçişleri söz konusudur. Bu geçişler daha hızlı olduğu için floresans olayı daha kısa sürer ( $\sim 10^{-5}$  s). Uyarıcı kaynak kesilince floresans da kesilir. Fosforesansta ise uyarılmış singlet hal  $\rightarrow$  uyarılmış triplet hal geçişi söz konusudur. Bu olay çok daha az mümkün olan bir olaydır, yavaştır ve uzun sürede gerçekleşir. Uyarıcı kaynak kesildikten sonra saniyeler hatta dakikalarca fosforesans olayı devam edebilir.

Floresans yapan bileşiklerin çoğu için, hangisinin daha düşük enerjili olduğuna bağlı olarak,  $n \rightarrow \pi$  veya  $\pi \rightarrow \pi^*$  geçişi gözlenir (uyarılma olur). Bu uyarılmadan sonra gerçekleşen floresans emisyonuna hakim olan ışımaya daha düşük olan  $\pi \rightarrow \pi^*$  geçişinden kaynaklanır. ( $\sigma^* \rightarrow \pi^* \rightarrow n \rightarrow \pi \rightarrow \sigma$ )



Şekil 6. Floresans spektrofotometresinin şematik gösterimi [21].

## 1.6. Floresans Analiz Cihazı Bileşenleri

### 1.6.1. Işın Kaynağı

Işık kaynaklarının bölgelere göre kullanılabilirliği aşağıdaki tabloda belirtilmiştir [22, 23].

Tablo 4. Işık kaynaklarının bölgelere göre kullanılabilirliği

UV-Görünür Bölge	D2(Döteryum), W, H2, Xe, Civa Buhar Lambası
Görünür Alanda	Wolfram Lambası
Görünür ve Yakın IR Bölgede	Tungsten Flaman Lambası
UV-Görünür Bölgenin Tümünde	Xe Ark Lambası
Her İki Bölgede	Civa Buhar Lambası

### 1.6.2. Filtre ve Monokromatörler

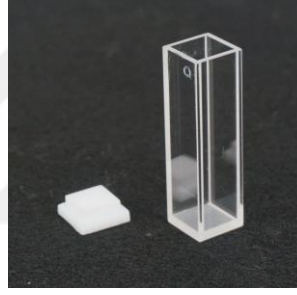
Fluorometrelerde girişim ve absorpsiyon filtrelerinin her ikisi de kullanılmıştır. Çünkü hem uyarma demeti hem de oluşan floresans ışınının dalga boyu seçilmiştir. Spektrofluorometrelerin çoğu en az bir optik ağı monokromatör ile donatılmıştır [22, 23].

### 1.6.3. Dedektörler

Lüminesans sinyalleri genellikle düşük şiddetlidir ve ölçülebilmeleri için yükseltilmeleri gerekir. Duyarlı ölçümler alınan floresans cihazlarında fotoçoğaltıcı tüpler en yaygın kullanılan dedektörlerdir. Bunlar genel olarak artırılmış sinyal/gürültü oranları elde etmek için foton sayım modunda çalıştırılırlar. Sinyal/gürültü oranlarını artırmak için dedektörlerin soğutulması da gerekebilir [22, 23].

### 1.6.4. Hücreler ve Hücre Bölümleri

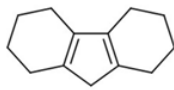
Floresans ölçmeleri için cam veya silisden yapılmış hem silindirik hem de dikdörtgen prizması şeklindeki hücreler kullanılır [22, 23].



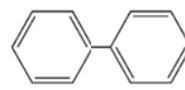
Şekil 7. Floresans küveti

### 1.7. Floresansı Etkileyen Faktörler

Yapısal rijitlik etkisi; yük etkisiyle şekil değiştirememesi olarak tanımlanır. Floresansın rijit yapılara sahip moleküllerde daha fazla olduğu ampirik olarak bulunmuştur. Tekli bağlar etrafındaki serbest dönmeler ışımsız durulma hızını artırır, floresansı azaltır. Aşağıdaki örnekte kuantum verimlerinde gözlenen bu farklılık, florendeki metilen grubunun köprü yapmasıyla oluşan rijitlik artışı sonucu ortaya çıkmıştır.



Floren



Bifenil

Şekil 8. Floren ve Bifenil yapıları

pH etkisi; Asidik ve bazik sübstituentleri içeren bir aromatik bileşiğin floresansı genellikle pH'ya bağlıdır. Örneğin anilinyumun tek bir rezonans hali varken anilinin birçok rezonans hali vardır.

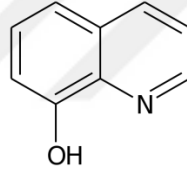
Sıcaklık etkisi; Yüksek sıcaklıklarda artan çarpışma sıklığı ışımsız durulma olasılığını artırır, floresansı azaltır. Ağır atomları veya yapısında bu atomların olduğu diğer çözünenleri içeren çözücüler floresansı azaltır.

Elektronik geçiş etkisi; Elektronik geçişler ne kadar olası ise floresans olasılığı da o kadar yüksektir.

Halkalaşma etkisi; Molekülde halkalaşma sayısı arttıkça floresans özelliği artar.

Heteroatom varlığının etkisi; Heteroatom içeren halkalar 2. ve 3. bir aromatik halkayla birleştirilirse floresans özelliği artar.

Şelat oluşumunun etkisi; Sıklıkla kullanılan şelatlaştırıcılardan biri 8-hidroksikinolin'dir (yapısında heteroatom bulunmaktadır) ve floresans özelliği vardır.  $Zn^{+2}$  ve  $Al^{+3}$ 'ün 8-hidroksikinolin ile verdiği şelatların floresans özelliği şelatlaştırıcının kendisinininkinden fazladır.



Şekil 9. 8-Hidroksikinolin kompleksi yapısı

## 1.8. Metot Validasyon parametreleri

### 1.8.1. Doğruluk

Analiz sonucunun gerçek değere ne kadar yakın olduğunun ifadesine doğruluk denir. % Hata olarak ifade edilen doğruluk; ölçümlerin aritmetik ortalamasının doğru değere yakınlığı olarak *Eşitlik (1)*'de verildiği gibi tanımlanır [23].

$$\% \text{ Hata} = \frac{(X_G - X_{ORT})}{X_G} \times 100 \quad (1)$$

$X_G$ : Doğru değeri,  $X_{ORT}$ : Ölçümlerin aritmetik ortalamasını gösterir.



### 1.8.2. Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Bulunan bir değerin tekrarlanabilme kabiliyetine ya da bireysel test sonuçlarının birbirine yakınlığının derecesine yöntem kesinliği adı verilir. Yöntem kesinliği, ölçüm sonuçlarının birbirine olan yakınlığıdır. Kesinlik % bağlı standart sapma ile ifade edilmektedir. Kesinlik analit derişimine, analiz yöntemine bağlıdır ve bağlı standart sapma %2'den %20'ye kadar çeşitlilik göstermektedir. Tekrarlanabilirlik, kesinliğin bir göstergesiolarak kabul edilir ve gün içi ve günler arası kesinlik olmak üzere iki şekilde hesaplanır [23].

### 1.8.3. Seçimlilik ve Duyarlılık

Seçimlilik; numunede varlığı tespit edilen analiti, analit ile girişim yapabilen diğer bileşenlerden farklı olarak tespit etme yeteneğidir. Yoğun matriks ortamına sahip numunelerde analiz edilecek maddelerin doğru ve özgün olarak belirlenebilmesi analitik yöntemlerin seçimliliğini gösterir. Duyarlılık ise analiz işleminin konsantrasyonundaki küçük değişimleri kaydetme kapasitesi olarak tanımlanır ve kalibrasyon eğrisinin eğimi olarak ifade edilir [23].

Yöntemin seçimliliği; analiti örnekte varlığı tespit edilmiş analit ile girişim yapabilen diğer bileşenlerden farklı olarak ölçme yeteneğidir. Örnek matriksinde bulunması gereken bileşenlerin yanında analiz edilecek maddelerin doğru ve özgün belirlenebilmesi, analitik yöntemlerin seçimliliğini belirler.

### 1.8.4. Gözlenebilme Sınırı (GS, LOD)

Analitik yöntemlerde performans genel olarak gözlenebilme sınırı ile ölçülür. Gözlenebilme sınırı *Eşitlik (2)*'de verildiği gibi ifade edilir ve konsantrasyon birimleri ile temsil edilir. Konsantrasyonun çok düşük olduğu analitik ölçümlerde tanık ile aynı değerde cevap alınır. Pratik olarak gözlenebilme sınırı, en az on tanık çözelti için ölçülen sinyallerin standart sapma değerlerinin üç katı olarak hesaplanır [23].

$$LOD = 3\sigma/m \quad (2)$$

Burada  $\sigma$  tanığın standart sapması,  $m$  kalibrasyon grafiğinin eğimidir.

### 1.8.5. Tayin Sınırı (TS, LOQ)

Gözlenebilme sınırında tekrarlanabilirliğin çok düşük olması sebebiyle gerçek tayinlerde LOD değerinin kimi zaman 5 kimi zaman 9 ya da 10 katı alınır ve bu değere tayin sınırı adı verilir *Eşitlik (3)*. Kabul edilebilir bir bağıl standart sapma değeri bu sınır için önemli bir ölçüttür. Sağlıklı bir tayin için tayin sınırının en az 3 katı kadar konsantrasyon gereklidir [23].

$$LOQ = \frac{9\sigma}{m} \quad (3)$$

Burada  $\sigma$  tanığın sinyalinin standart sapması,  $m$  kalibrasyon grafiğinin eğimidir.

### 1.8.6. Çalışma Aralığı

Doğrusal çalışma aralığı, tayin edilen alt ve üst tayin sınırları arasında bulunan cevap aralığı bölgesi olarak tanımlanır.

$LOQ = \frac{9\sigma}{m}$  formülünde  $\sigma$  tanığın sinyalinin standart sapması,  $m$  kalibrasyon grafiğinin eğimidir.

## 1.9. Floresans Spektrometrisi ile Kantitatif Tayin

### 1.9.1. Dış Kalibrasyon Doğrusu Yöntemi

Kalibrasyon eğrilerinin doğrusal (lineer) olması, yani cihaz cevabıyla hemen hemen orantılı olması istenir. Kalibrasyon eğrisi kullanabilmek için analitin kon-santrasyon aralığı tahmin edilebilmeli, örneğin matriks koşulları değerlendirilmelidir.

➤ Örneğin matriks koşullarına benzer koşullarda bir takım standart çözeltiler hazırlanır; standartların konsantrasyonları tahmin edilen konsantrasyon aralığını kapsayacak aralıkta olmalıdır.

➤ Analit içermeyen bir şahit hazırlanır. Standartlar ve şahit analiz cihazında ölçülür ve elde edilen değerlerle bir kalibrasyon grafiği çizilir.

- Bir kalibrasyon eğrisinin çizilebilmesi için, normal olarak, en az 3 standart ve bir şahit kullanılır.
- Örneğin (analit konsantrasyonu bilinmiyor) ölçümü yapılır; alınan cevap kalibrasyon eğrisinin dinamik aralığı içindeyse, konsantrasyon hesaplanır.

### 1.9.2. Standart Ekleme Yöntemi

Standart katma yöntemi, çoğu zaman örneğin içeriğinin bilinmediği veya kompleks bir karışım olduğu ve analit dışındaki diğer başka maddelerin de sinyali etkilediği durumlarda uygulanan bir kalibrasyon işlemidir. Böyle hallerde matriks, örnek içinde bulunan analitten başka diğer her şeydir; cevabı değiştiren bu tür etkilere 'matriks etkisi' denilir. Örnekte bulunan safsızlıklar analitle etkileşerek cihaz cevabını değiştirirler veya kendi başlarına özel cihaz cevapları üretirler. Bu gibi durumlarda saf analit örneklere göre hazırlanan bir kalibrasyon eğrisi yanlış sonuç verir.

En ideal durum kalibrasyon standartlarının örnek matriksindeki hem analit hem de diğer maddelerin konsantrasyonlarına yakın miktarlarda bileşen içermesidir. Böylece, örnekteki diğer maddelerin, ölçülen analit absorbansına etkisi en aza indirilmiş olur.

### 1.10. Literatürde Tartrazin Tayini

2018 yılında Mathiyalagan, Siva ve arkadaşları sert şekerdeki tartrazine ve brilliant blue miktarını UV-VIS detektörlü HPLC yöntemini kullanarak 4.74 - 140.284 mg / kg aralığı olarak belirlemiştir. Farklı gıda matrikslerinden elde edilen sentetik renklendiricilerin % 90-97'lik bir geri kazanım aralığı ve % 1-9'luk bir RSD ile yapmışlardır [24].

Dudkina ve ark., 2019 yılında farklı miktarlarda gıda boyası içeren ticari içecekler ve meyve sularını HPLC yöntemi ile analiz ettiler. Yöntem, Brilliant Blue, Sunset Yellow ve Tartrazin tayini için basit bir kolorimetrik metodu tarif eder. Optimal koşullar altında  $R^2$  değeri 0.995'ten yüksek ve doğrusal aralıkları 0.01 - 3.0 mgL<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir [25].

2015 yılında Bento ve arkadaşları, HPLC yöntemiyle yoğurt ve sütlü içeceklerde izin verilen azo boyalarının ve azo olmayan boyaların varlığını belirlemiştir. Tartrazinde, %

98.11 geri kazanım oranı elde edilirken, tespit limiti (LOD) ve miktar tayini limiti (LOQ) sırasıyla 1.22 µg / L ve 3.71 µg / L olarak bulunmuştur [26].

2018 yılında NelsonNuñez-Dallos ve arkadaşları voltametrik yöntemle tartrazin analizi yapmışlardır. Elde edilen değerler, tartazin için daha önce yayınlanmış değerlere çok yakındır. Meşrubatlarda tayin aralığı 9.61-10.14 mL/L aralığındadır. Geri kazanım oranı ise % 99,6 olarak belirtilmiştir. Yöntem geçerliliği için, tüm ticari meyva suları ve meşrubatlar gerçek nümune olarak kullanılabilceği de belirtilmiştir [27].

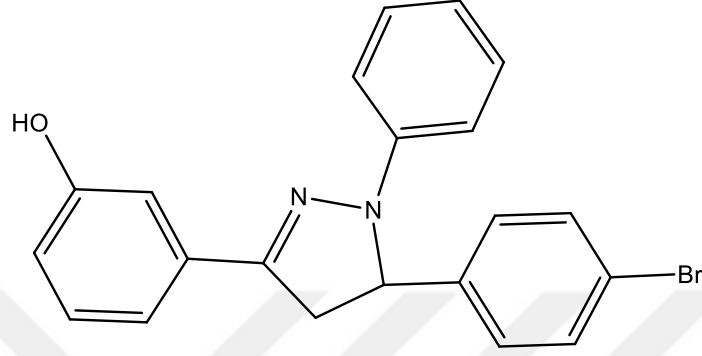
Tavakoli ve arkadaşları 2013 yılınada katı faz ekstraksiyonu ile gerçek örneklerden elde ettikleri tartrazin içeren nünuneleri UV-VIS detektörü ile birleştirilmiş HPLC ile analiz etmişlerdir. Numuneler analiz edilmeden önce spe yöntemi kullanılarak ekstre edilmiş ve tartrazin için LOD ve LOQ sırasıyla 2.50 µg / L ve 8.33 µg / L olarak bulunmuştur [28].

### 1.11. Yapılan Çalışmanın Amacı

Renk katkı maddesi olan tartrazin gıda ürünlerinde, ilaç ve kozmetikte yaygın olarak kullanılmaktadır. Tartrazinin günlük maksimum alınabileceği miktar, Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA tarafından 5 mg/kg/gün) olarak belirlenmiştir. Ortalama 30 kg ağırlığındaki bir çocuk için bu değer 150 mg/gün doza denk gelmektedir. Tartrazin kullanılması ile daha çok astım, çocuklukta hiperaktivite ve ürtiker (deride kaşınma ve yanma), egzama, migren, damar ödemlerinin ortaya çıktığı belirtilmiştir. Bu nedenle tartrazin analizlerinin geliştirilmesi gereklidir. Günümüzde tartrazin analizleri için sıklıkla HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) ve sıvı kromatografisi (LC) yöntemleri tercih edilmektedir. Fakat bu yöntemin bilindiği üzere maliyetli ve zaman alıcı olması, yeni yöntemlerin geliştirilmesini gerektirir. Yapılan bu çalışmada floresans spektroskopisi ile tartrazin analizleri dış kalibrasyon yöntemi ile çok kısa sürede ve ucuz maliyetle gerçekleştirilmesi sağlanacaktır. Floresans spektroskopisi ile şeker hamuru ve çocuk şekerlemeleri gibi ürünlerdeki tartrazin miktarlarının analizi hedeflenmiştir. Elde edilen analiz sonuçları Akredite Laboratuvarlardan gelen sonuçlarla % 1 - %5 hata aralığı ile teyid edilmiştir. Yöntemde ekstraksiyon çözücüsü olarak da etanol kullanılarak yöntemin çevreye ve sağlığa zararsız olması amaçlanmıştır.

## 2. DENEYSEL KISIM

### 2.1. Kullanılan Ligand



Şekil 10. 1-fenil-3-(3'-hidroksifenil)-5-(4''-bromofenil)-2-pirazol (L)

L sentezi; Substitue asetofenon bileşiği ile aldehit bileşiğinin %20'lik KOH-Etil alkol ortamında reaksiyonundan ilgili kalkon bileşiği sentezlenmiştir. Daha sonra kalkon bileşiğinin etilalkol ortamında hidrazin hidrat ile 12 saat kaynatılması sonucu ham ürün elde edilmiştir. Ham ürün kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır ve <sup>1</sup>H-NMR spektrumu alınarak karakterize edilmiştir.

Kullanmış olduğumuz ligand, Dr. Gonca ÇELİK tarafından Prof. Dr. Nurettin YAYLI'nın laboratuvarında sentezlenmiş olup henüz literatürde yayınlanmamıştır.

### 2.2. Kullanılan Kimyasallar

Ligand çözücüsü olarak etanol kullanıldı. Standartlar boyar maddeler; Sudan red, Sudan IV, Sudan II, Sudan I, Quinoline yellow, Sunset yellow, Allura red ve Tartrazin.

### 2.3. Kullanılan Cihazlar

PTIQ spektrofiorimetresi:	QM-4 2006 A Photon Technologies International Quanta (K.T.Ü Kimya Bölümü)
Uv-Vis spektrofotometresi:	Analytik Jena Specord 210 Plus Spektrometresi (K.T.Ü. Kimya Bölümü)
Analitik terazi:	Sartorius Ed244s (0,1 mg duyarlıkta) (K.T.Ü Kimya Bölümü)
Vorteks çalkalayıcı:	Heidoph Instruments D-91126 (K.T.Ü Kimya Bölümü)
Deiyonize su cihazı:	Merck Milipore Direct-Q 8 UV (K.T.Ü Kimya Bölümü)
Ultrasonik banyo:	Bandelin Sonarex Dipitec (K.T.Ü Kimya Bölümü)
Çalkalayıcı:	Edmund Bühler GmbH KS-15 Control (K.T.Ü Kimya Bölümü)
Otomatik pipet:	Nichiryo (10-100-1000 µL'lik) (K.T.Ü. Kimya Bölümü)
Tek kullanımlık filtre:	Sartorius 0,45 µm'lik filtre (K.T.Ü. Kimya Bölümü)



Şekil 11. Kullanılan QM-4-2006 PTI spektrofiorimetre cihazı

## **2.4. Yapılan Ölçümler**

### **2.4.1. Ligand Çözeltilerinin Hazırlanması**

Ligandın  $1 \times 10^{-3}$  M konsantrasyondaki stok çözeltisi etanolde hazırlandı. Ligand boyar madde etkileşiminin incelenmesi için gerekli olan  $1 \times 10^{-4}$  M ara stok çözeltisi hazırlandı.

### **2.4.2. Boyar Madde Çözeltilerinin Hazırlanması**

Katı haldeki boyar madde standartlarından  $1 \times 10^{-3}$  M stok çözeltiler hazırlandı. Ligand boyar madde etkileşiminin incelenmesi için gerekli olan  $1 \times 10^{-4}$  M ara stok çözeltisi hazırlandı.

### **2.4.3.Şeker Hamuru Numunesinin Hazırlanması**

15 g kenton marka şeker hamuru numunesi tartıldı. Saf suda çözüldü ve son hacmi 100 ml ye tamamlandı. Filtreden geçirildi.

### **2.4.4. Ölçüm Şartları**

Floresans ölçümleri için 4 cm'lik kuvars hücre tercih edilmiştir. Dış kalibrasyon grafiği kullanılarak elde edilen geri kazanım değerleri çalışmanın bu yöntemle yapılabilir olduğunu göstermiştir. Optimum uyarma dalga boyunun belirlenmesinde maksimum emisyon şiddetinin elde edildiği dalga boyu kullanılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda en uygun uyarma dalga boylarının 375 nm olduğu belirlenmiştir. Numuneler için ölçüm yapılan emisyon dalga boyları da optimize edilmiştir. Bu dalga boyları 466 nm olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, uyarma dalga boyu 370 nm iken, emisyon dalga boyu 466 nm olarak tercih edilmiştir ve analizler bu dalga boylarında gerçekleştirilmiştir.

## 2.5. Tartrazin Tayini İçin Önerilen Metot

Numunelerde tartrazin analizi için dış kalibrasyon grafiği yöntemi kullanılmıştır. Bunun için her bir deney tüpüne sabit konsantrasyonda ligand çözeltisi ilave edildikten sonra üzerine artan konsantrasyonlarda standart tartrazin çözeltileri eklenerek, saf su ile 4 mL'ye tamamlandı ve floresans şiddetleri ölçüldü. Elde edilen floresans şiddetleri tartrazin konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirildi. Daha sonra numune tüpleri için her bir deney tüpüne sabit konsantrasyonda ligand çözeltisi eklendi. Üzerlerine hazırlanmış olan numune çözeltilerinden artan konsantrasyonlarda eklendi. Son hacim 4 ml olacak şekilde saf su ile tamamlandı ve floresans şiddeti kaydedildi. Miktarı bilinmeyen fakat floresans şiddeti ölçülmüş olan numunenin tartrazin miktarı grafikteki  $y = mx + n$  denkleminde hesaplanmıştır.

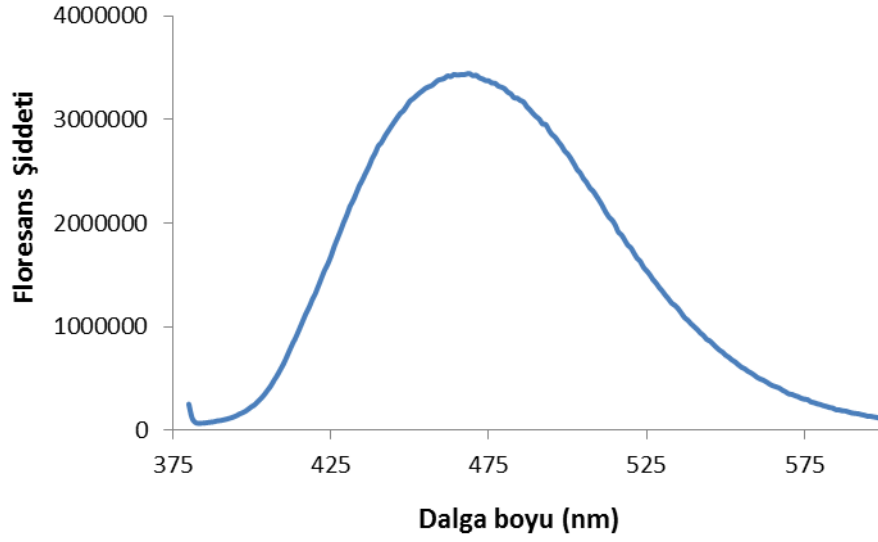
## 2.6. Spektroflorimetrik Ölçümler

2 ml  $1 \times 10^{-6}$  M ligand çözeltisine 2 ml  $1 \times 10^{-4}$  M Sudan red, Sudan IV, Sudan II, Sudan I, Quinoline yellow, Sunset yellow, Allura red ve Tartrazin çözeltileri ayrı ayrı eklenerek oda sıcaklığında vorteks çalkalayıcı ile çalkalandı. Bu çözelti karışımları 375 nm'de uyarılarak 400-600 nm arasında floresans spektrumları kaydedildi. 375 nm'de uyarılma 466 nm'de maksimum bir emisyon verdi.



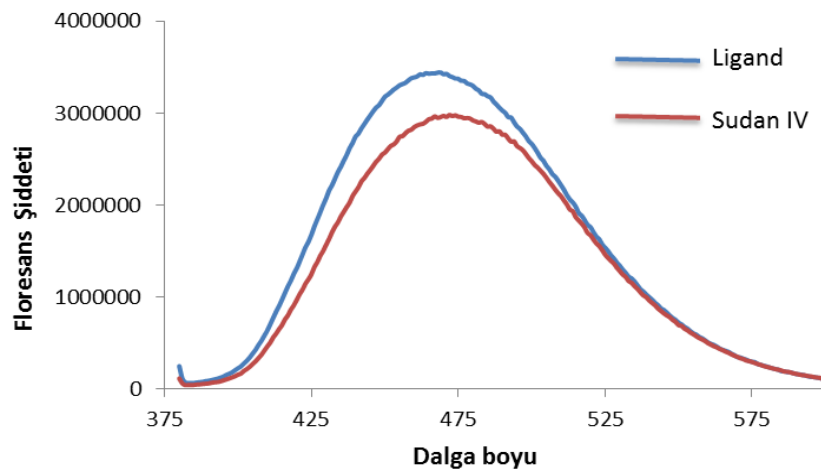
### 3. BULGULAR

#### 3.1. Ligandın Floresans Tarama Spektrumu

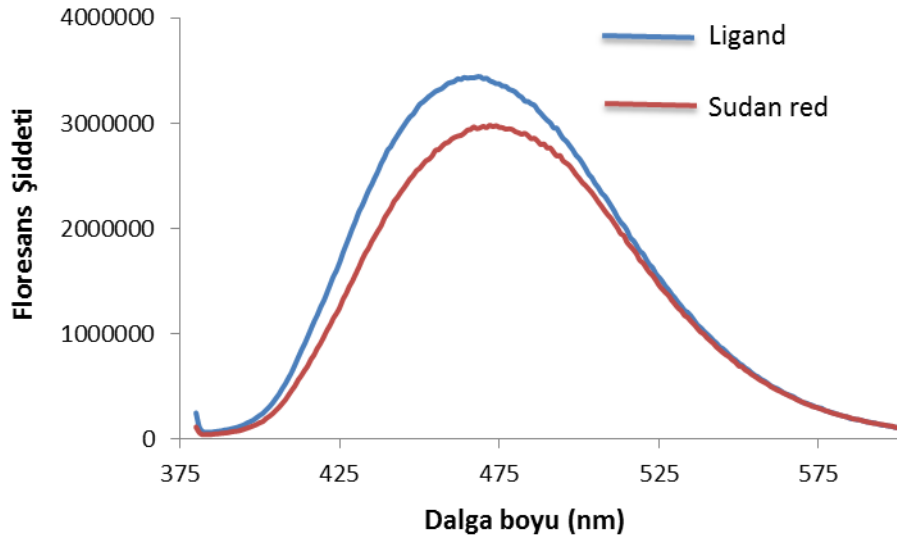


Şekil 12.  $1 \times 10^{-6}$  M ligand çözeltisinin floresans spektrumu (375 nm)

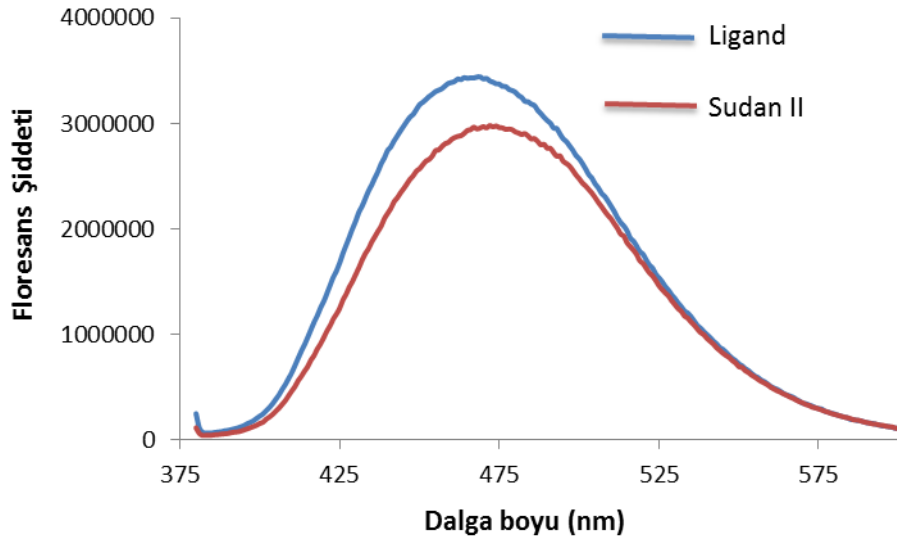
#### 3.2. Ligandın Floresans Spektrumuna Boyar Maddelerin Etkisi



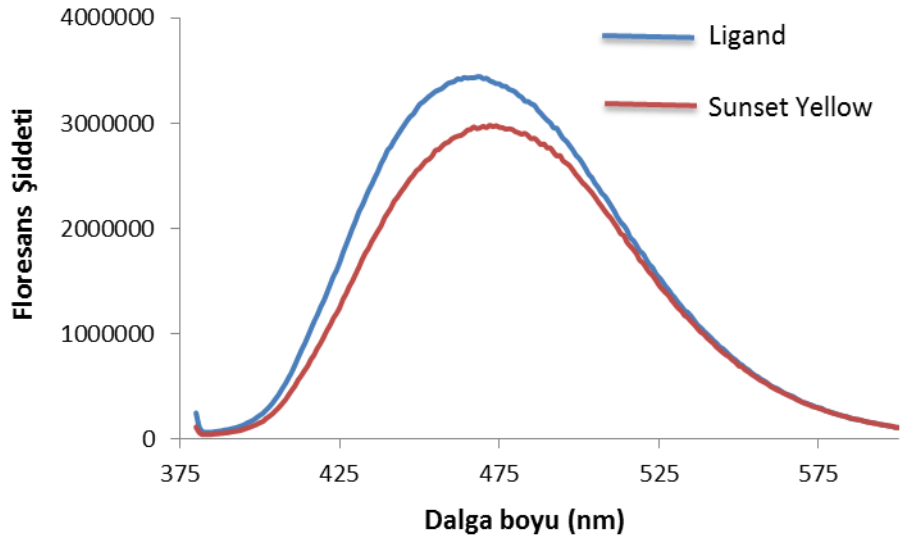
Şekil 13. Ligand ve Sudan IV içeren ligand çözeltilerinin floresans spektrumlarının karşılaştırması [Ligand]:  $1 \times 10^{-6}$  M [Sudan IV]:  $1 \times 10^{-4}$  M



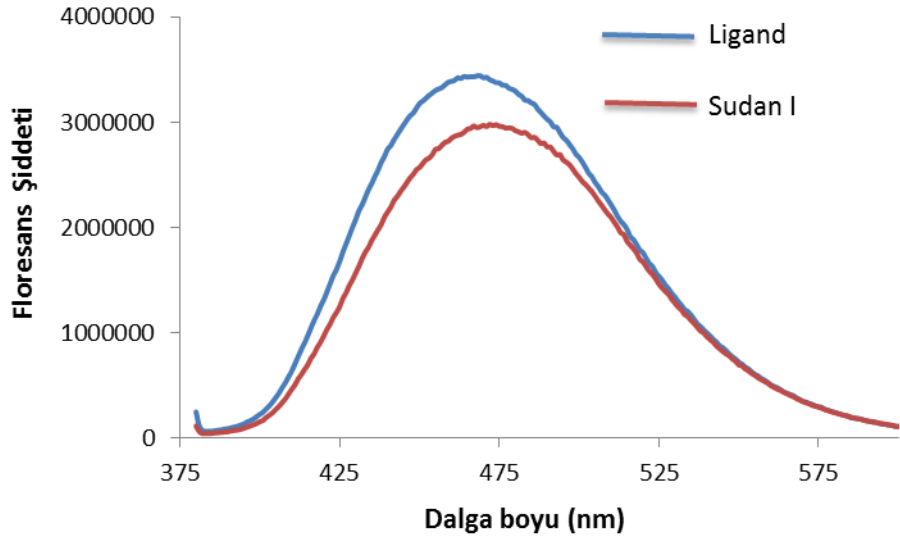
Şekil 14. Ligand ve Sudan red içeren ligand çözeltilerinin floresans spektrumlarının karşılaştırması [Ligand]:  $1 \times 10^{-6}$  M [Sudan red]:  $1 \times 10^{-4}$  M



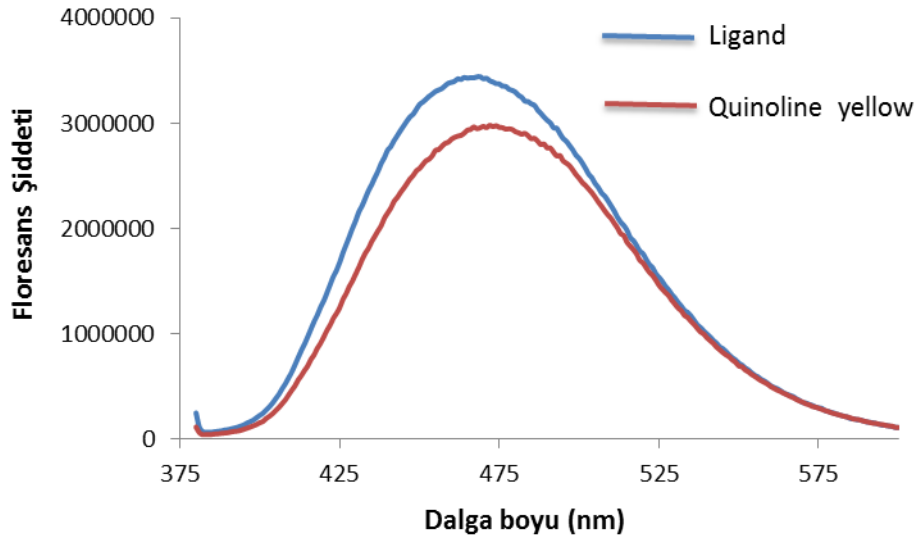
Şekil 15. Ligand ve Sudan II içeren ligand çözeltilerinin floresans spektrumlarının karşılaştırması [Ligand]:  $1 \times 10^{-6}$  M [Sudan II]:  $1 \times 10^{-4}$  M



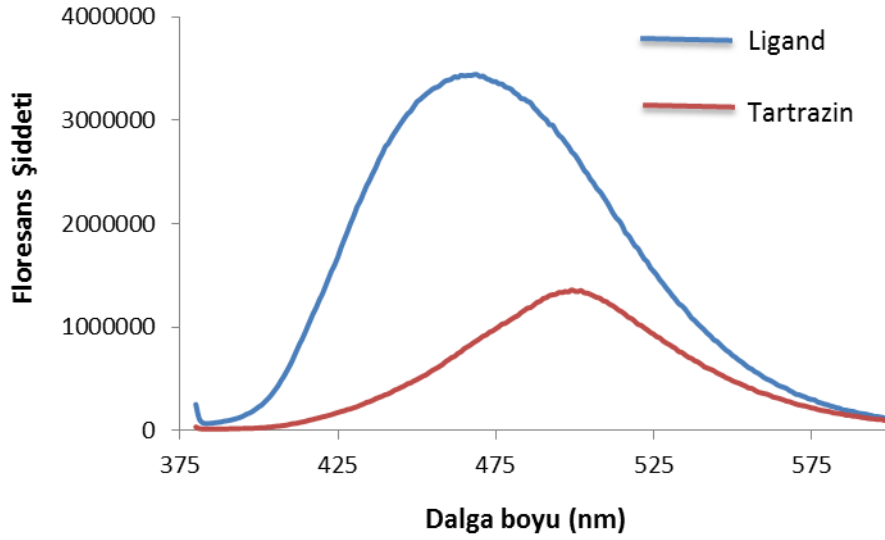
Şekil 16. Ligand ve Sunset yellow içeren ligand çözeltilerinin floresans spektrumlarının karşılaştırması [Ligand]:  $1 \times 10^{-6}$  M [Sunset yellow]:  $1 \times 10^{-4}$  M



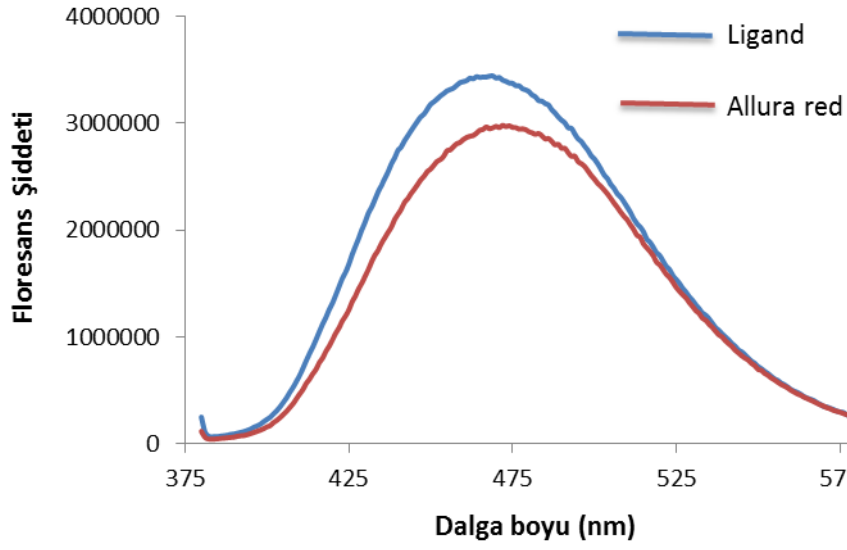
Şekil 17. Ligand ve Sudan I içeren ligand çözeltilerinin floresans spektrumlarının karşılaştırması [Ligand]:  $1 \times 10^{-6}$  M [Sudan I]:  $1 \times 10^{-4}$  M



Şekil 18. Ligand ve quinoline yellow içeren ligand çözeltilerinin floresans spektrumlarının karşılaştırması [Ligand]:  $1 \times 10^{-6}$  M [Quinoline yellow]:  $1 \times 10^{-4}$  M

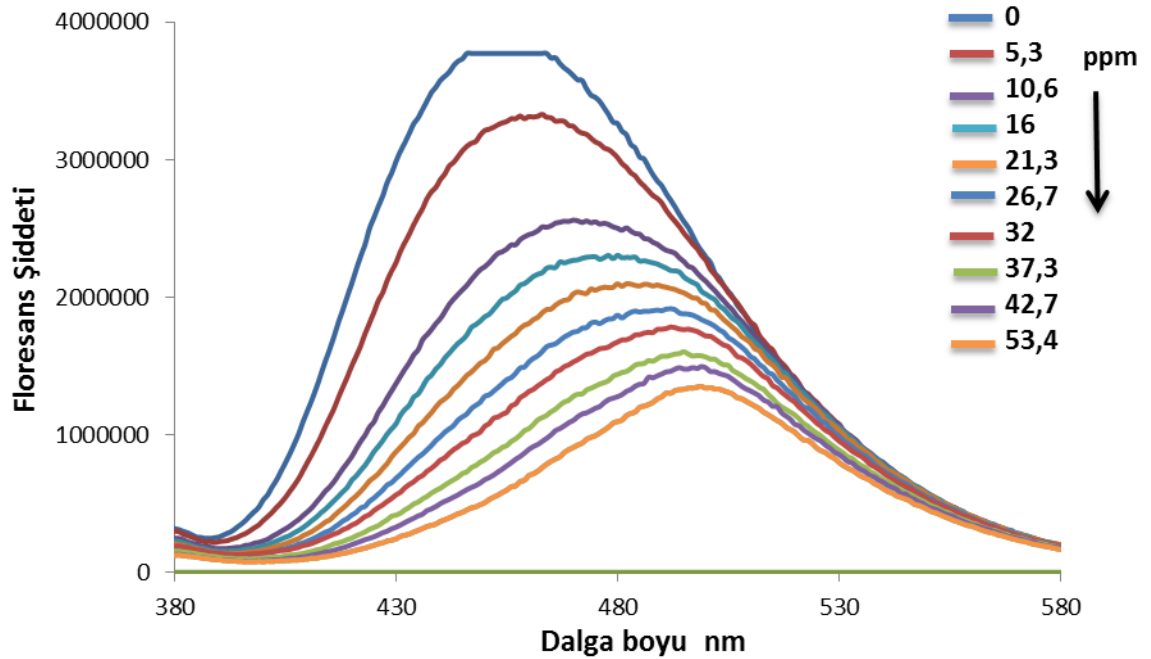


Şekil 19. Ligand ve tartrazin içeren ligand çözeltilerinin floresans spektrumlarının karşılaştırması [Ligand]:  $1 \times 10^{-6}$  M [Tartrazin]:  $1 \times 10^{-4}$  M

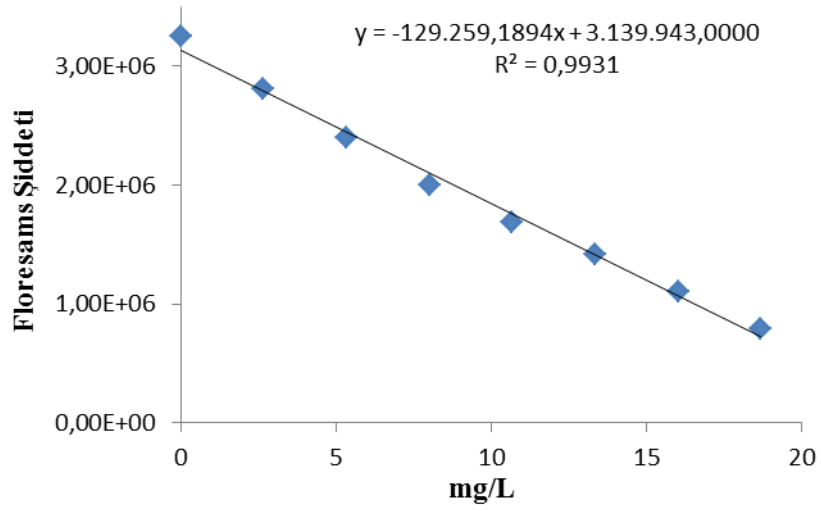


Şekil 20. Yalnızca ligand ve allura red içeren ligand çözeltilerinin floresans spektrumlarının karşılaştırması [Ligand]:  $1 \times 10^{-6}$  M [allura red]:  $1 \times 10^{-4}$  M

### 3.3. Ligandın Floresans Spektrumuna Artan Tartrazin Konsantrasyonunun Etkisi

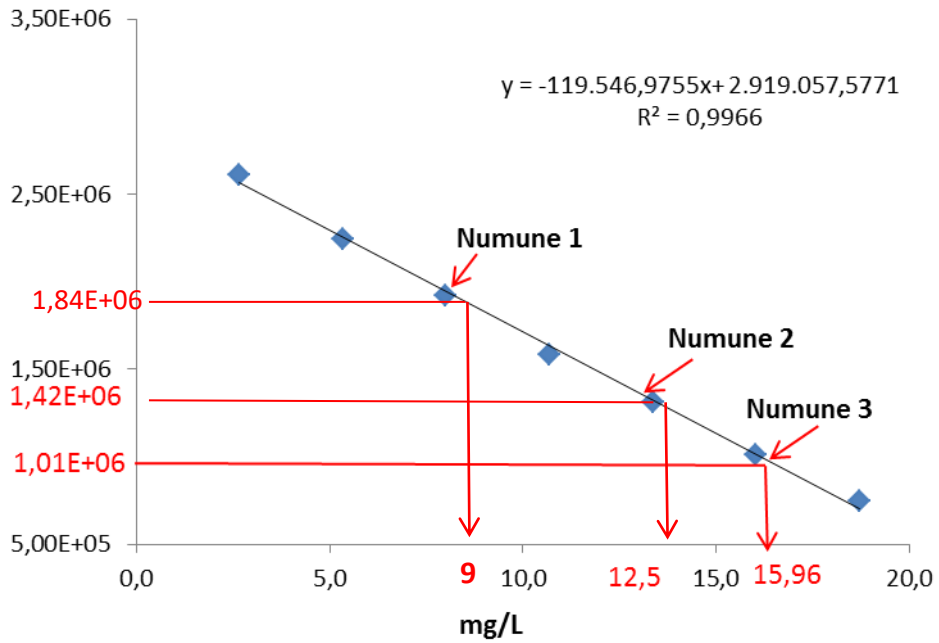


Şekil 21. Artan konsantrasyonlarda tartrazin içeren ligandın floresans spektrumundaki değişimi [Ligand]:  $1 \times 10^{-6}$  M [tartrazin]: 0 – 53,4 ppm



Şekil 22. Artan konsantrasyonlarda tartrazin içeren ligandın kalibrasyon grafiği [Ligand]:  $1 \times 10^{-6}$  M [tartrazin]: 0 – 20 mg/L

### 3.4. Şeker Hamurunda Tartrazin Tayini



Şekil 23. Kalibrasyon grafiği üzerinde şeker hamurundaki tartrazin miktarı tayini

Tablo 5. Şeker hamurundaki tartrazin analizi sonuçları

Numune	FI 466 nm	Bulunan mg/L
Numune 1	1843134,898	9
Numune 2	1424720,483	12,5
Numune 3	1011087,948	15,96

### 3.5. Tartrazin Tayini İçin Metot Validasyonu

#### 3.5.1. Doğrusal Aralık

Kullanılan dış kalibrasyon yönteminde şeker hamuru için tartrazin konsantrasyonunun 0 mg/L ile 18,6 mg/L arasında doğrusal olduğu belirlenmiştir. Tartrazin için elde edilen doğrusal aralığın  $R^2$  değeri 0,9931 olarak belirlenmiştir.

#### 3.5.2. Gözlenebilme Sınırı (GS, LOD) ve Tayin Sınırı (TS, LOQ)

Her bir numune için 11 paralel çalışma yapılarak tanığin floresans şiddetinin ( $F_0$ ) standart sapması hesaplanmıştır. Daha sonra standart sapmanın 3 katı dış kalibrasyon grafiğinin eğimine bölünerek gözlenebilme değeri hesaplandı. Gözlenebilme sınırı değerlerinin 3 katı alınarak tayin sınırları hesaplanmıştır.

#### 3.5.3. Doğruluk

Metodun doğruluğu için ekleme-geri kazanım çalışması yapıldı. Bunun için her bir numune için spayk edilmiş numuneler önerilen yöntemle analiz edildi ve tartrazin için % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

Tablo 6. Numuneler için Tartrazin analizi % Geri Kazanım Değerleri

Numune	Eklenen ( $\mu\text{g/mL}$ )	Bulunan ( $\mu\text{g/mL}$ ) ( $X_{\text{ORT}} \pm \text{BSS}$ )	Geri kazanım (%)
Şeker Hamuru	9,5	$9 \pm 0,06$	94,7
Şeker Hamuru	12,7	$12,5 \pm 0,09$	98,0
Şeker Hamuru	16,0	$15,9 \pm 0,08$	99,7

#### 3.5.4. Kesinlik

Yapılan çalışmanın kesinliği için numunelerin gün içi ve günler arası analizleri yapılmıştır. Sonuçlar % bağlı standart sapma olarak ifade edilmiştir. Gün içindeki kesinlik tartrazin içeren şeker hamuru için % 2,08 ve günler arası kesinlik % 4,5 olarak bulunmuştur.



#### 4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında kullanılan gıda boyalarının, kimyasal yapısı Şekil 10'da gösterilen ligandın floresans spektrumlarına etkisi incelendi.

Gıda boyalarının aşırısının sabit ligand konsantrasyonundaki çözeltilerinin floresans spektrumu üzerine etkileri incelendi. Spektroflorimetre ile yapılan bu çalışmalar sonucunda, sabit ligand çözeltisinin boyar madde çözeltilerinin aşırısı ile etkileşim yaptığı ve ligandın floresans şiddetleri üzerinde azaltıcı bir etkisi olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmalara ait sonuçlar Şekil 13 ile Şekil 20 arasında gösterilmiştir.

Şekil 12 derişimi  $1 \times 10^{-6}$  M olan ve çözücü olarak etanol kullanılmış olan ligand çözeltisinin floresans spektrumunu göstermektedir. Ligand çözeltisinin floresans şiddeti yaklaşık olarak  $3,2 \times 10^6$  olarak görülmektedir.

Şekil 13, Şekil 14, Şekil 15, Şekil 16, Şekil 17, Şekil 18 ve Şekil 19'da sırasıyla Sudan IV, Sudan red, Sudan II, Sunset yellow, Sudan I, Quinoline yellow ve Allura red gıda boyaları çözeltilerinin aşırılarının, sabit ligand konsantrasyonundaki çözeltisinin floresans spektrumları üzerine ciddi derecede bir etki yapmadığı görülmektedir.

Şekil 20'de Tartrazin gıda boyası çözeltisinin aşırısı, sabit ligand konsantrasyonundaki çözeltinin floresans spektrumu üzerine gözle görülür ve dikkate alınır bir etki yaptığı görülmektedir. Şekil 12'de gösterilen ve floresans spektrumu  $3,2 \times 10^6$  olarak okunan ligand çözeltisinin tartrazin çözeltisinin aşırısı ile etkileşiminden sonra floresans şiddetinin  $1,1 \times 10^6$  değerine kadar düştüğü görülmektedir. Gözlenen floresans şiddetindeki azalmayla birlikte, uzun dalga boyuna kayma da görülmektedir. Dolayısıyla tartrazinin floresans spektrumu üzerine olan etkisi, diğer gıda boyalarınınkinden çok farklıdır.

Bundan yola çıkılarak önce Şekil 21'de gösterildiği üzere, artan konsantrasyonlarda tartrazin içeren ligandın floresans spektrumundaki değişim çalışılmıştır. Bu çalışmanın amacı, söz konusu floresans şiddetindeki azalmanın konsantrasyonla doğrusal ilişkili olup olmadığını belirlemektir. Çalışma sonunda, ligandın sabit konsantrasyonu üzerine, artan tartrazin konsantrasyonu etkisi, ligandın floresans cevabında düzenli bir değişime sebep olmuştur. Elde edilen doğrusallığın  $R^2$ : Korelasyon Katsayısı değeri 0,9966 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç, tartrazin analizinin spektroflorimetrik bir yöntemle yapılabilir olmasının önünü açmıştır.

Yöntem olarak dış kalibrasyon yöntemi tercih edilmiştir. Bunun nedeni hızlı, basit, ön aşamaları olmayan ve çok malzeme harcanmadan yapılabilir olmasıdır. Numune olarak kullanılan şeker hamurları kullanılmıştır. Çünkü sarı renkli tüm şeker hamurlarında ve çocuk şekerlemelerinde gıda boyası olarak tartrazin tercih edilmektedir.

Şekil 23'te standart tartrazin çözeltilerinin kalibrasyon grafiği üzerinde şeker hamurundaki tartrazin miktarı tayini gösterilmektedir. Bulunan sonuçlar akredite laboratuvarından gelen sonuçlarla karşılaştırılmış ve %1 - %5 hata aralığıyla teyit edilmiştir.

Tablo 7. Tartrazin tayini için önerilen spektrofotometrik yöntemin özellikleri

Parametreler	Şeker Hamuru
Uyarma dalga boyu	375 nm
Emisyon dalga boyu	466 nm
Gözlenebilme sınırı (LOD)	3 µg/mL
Tayin sınırı (LOQ)	9 µg/mL
Tayin aralığı	9-18 µg/mL
Toplam hacim	4,0 mL
Çözücü ortamı	Etanol/safsu
Korelasyon katsayısı ( $R^2$ )	0,9966

Sonuç olarak tartrazin tayini için literatürdeki metotlar n-hekzan, metanol ve asetonitril gibi toksik çözücülerin kullanımına dayalıdır. Bu çalışmada önerilen metotta ise çözücü olarak toksik özellik göstermeyen etanol kullanılmıştır. Ayrıca literatürdeki metotlar pahalı kromatografik sistemlerin kullanımına dayanır. Yapılan çalışmada ise ucuz ve basit bir spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Ayrıca analiz öncesinde herhangi bir ön deriştirme veya zenginleştirme basamağı da uygulanmadığından literatürdeki yöntemlere göre önemli avantajlara sahiptir.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada spektrofotometrik metotlarla şeker hamurlarındaki tartrazin miktarı incelenmiştir. Kullanılan bileşikler Dr. Gonca ÇELİK'in sentezlediği ve henüz literatüre kazandırılmamış bileşiktir ve açık yapısı Şekil 10'da gösterilmiştir.

Şekil 21'deki grafik incelendiğinde tartrazin boyar maddesinin ligandın floresans şiddetinde azalmaya sebep olduğu görülmektedir.

Şeker hamurlarında tartrazin analizi dış kalibrasyon yöntemi ile yapılmış ve yöntemin doğruluk yüzdesi % 95 ile % 99 arasında olarak akredite laboratuvarlardan alınan sonuçlarla teyid edilmiştir. Sentezlenecek benzer yapıdaki ligandlar ile daha fazla ve daha farklı numunelerde daha hassas tartrazin analizleri spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirilebilir. Bu konudaki çalışmalarımız devam edecektir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Erdoğan, Ş., Ankara Piyasasında Satışa Sunulan Bazı Gıdalarda Sentetik Boya Miktarlarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2007.
2. T.C. Resmi Gazete, Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, Sayı: 23172 Kasım 1997, 16.
3. [www.diyetuzmani.com/beslenme/beslenme-bilgileri/gida-katki-maddeleri.php](http://www.diyetuzmani.com/beslenme/beslenme-bilgileri/gida-katki-maddeleri.php) Gıda Katkı Maddeleri, 23 Ocak 2019.
4. Yurttagün, M., Gıda Katkı Maddeleriyle İlgili Geniş Kapsamlı Bir Araştırma, 2010. [www.saglikvakfi.org.tr/html/gkm.asp](http://www.saglikvakfi.org.tr/html/gkm.asp), 5 Temmuz 2019.
5. Kucharska, M. ve Grabka, J., A Review of Chromatographic Methods for Determination of Synthetic Food Dyes. Talanta, 80, 3 (2010) 1045-1051.
6. Socaciu, C., Food Colorants Chemical and Functional Properties. Chapter:7, Synthetic Colorants 604 (2008) ISBN: 978-0-8493-9357-0, CRC Press.
7. Ekşi, A., Ankara Piyasasından Sağlanan Pasta Süsleri ve Bazı Şekerlerde Sentetik Boya Miktarlarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1996.
8. Crosby, N. T., Food Packaging Requirements, In Food Packaging Materials Aspects of Analysis and Migration of Contaminants, (1981) 9-18.
9. Thakur, B. R. ve Arya, S. S., Stability of Sunset Yellow F.C.F and Tartrazine in Liquid Model Food System. Die Nahrung, 37,1 (1993) 15-19.
10. <https://www.gidahammaddeleri.com/tartrazine-gida-renklendiricisi-sari-e-102-1kg> Tartrazinin Genel Özelliği, 23 Ocak 2019.
11. [https://ansiklopedi.halisinden.com/Tartrazin\\_\(E102\)](https://ansiklopedi.halisinden.com/Tartrazin_(E102)) Tartrazinin Yapısı ve Genel Bilgiler, 23 Ocak 2019.
12. <http://www.milliyet.com.tr/pembenar/uzm-dr-servet-kulahcioglu/gida-katki-maddeleri-2394386> Tartrazinin Kullanım Alanları, 24 Ocak 2019.
13. <http://earsiv.odu.edu.tr:8080/jspui/bitstream/11489/756/1/10136141.pdf> Tartrazinin Toksikolojik Etkileri, 25 Ocak 2019.
14. Tartrazin Tayini İçin Kullanılan Bazı Yöntemler [http://docs.neu.edu.tr/staff/serdar.susever/3gidakatkimaddeleri\\_92.pdf](http://docs.neu.edu.tr/staff/serdar.susever/3gidakatkimaddeleri_92.pdf), 25 Ocak 2019.
15. Baki, S., Spektroflorimetrik Analiz Yöntemlerinin Toplam Antioksidan Kapasite Tayinlerine Uygulanması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2009.
16. Gündüz, T., İnrümental Analiz, 6. Baskı, 1357, Gazi Kitap Evi Tic. Ltd. Şti, Ankara, 2002.

17. Lakowicz, J. R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, Springer Science and Business Media, (2007) 980.
18. Krishnamoorthy, G., Fluorescence Spectroscopy in Molecular Description of Biological Processes, Indian J. Biochem. Bi., 40, 3 (2003) 147-159.
19. Maraba, A., Azaflavanon-3-ol bileşiği ile Yeni Bir Spektroflorimetrik Demir Tayini Metodunun Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 2014.
20. [www.bayar.edu.tr/besergil/10-Bolum-7.pdf](http://www.bayar.edu.tr/besergil/10-Bolum-7.pdf) ,17 Haziran 2019.
21. Skoog, D. A., Holler F. J. ve Nieman, T. A., Enstrümental Analiz İlkeleri, 1. Baskı, Bilim Yayıncılık, Ankara, 1998.
22. Harris, D. C. ve Freeman, W. H., Quantitative Chemical Analysis, New York, (1995) 750.
23. Ertaş Söğüt, Ö. ve Kayalı, A., Analitik Yöntem Geçerliliğine Genel Bir Bakış, Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi, 34 (2005) 41-57.
24. Mathiyalagan, S., Mandal, B. K. ve Ling, Y. C., Determination of synthetic and natural colorants in selected green colored foodstuffs through reverse phase-high performance liquidchromatography, Food Chemistry, 278 (2019) 381-387.
25. Dudkina, A. A., Volgina, T. N., Saranchina, N. V., Gavrilenko, N. A. ve Gavrilenko, M. A., Colorimetric Determination of Food Colourants Using Solid Phase Extraction into Polymethacrylate Matrix, Food Chemistry (Talanta), 202 (2019) 186-189.
26. Bento, W. D. A. S., Lima, B. P. ve Paim, A. P. S., Simultaneous Determination of Synthetic Colorants in Yoğurt by HPLC, Food Chemistry 183 (2015) 154–160.
27. Lancaster, F. E. ve Lawrence, J. F., Ion-pair high performance liquid chromatographic separation and detection of subsidiary dyes in synthetic food colors, Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 65 (1982) 1305-10.
28. Mazlan, S., Lee, Y. ve Hanifah, S., A New Laccase Based Biosensor for Tartrazine, Sensors, 17, 12 (2017) 2859.

## ÖZGEÇMİŞ

02.02.1993 yılında Trabzon'da doğdu. İlköğrenimini Trabzon Kaledibi İlköğretim Okulu'nda, ortaöğrenimini Bener Cordan İlköğretim okulunda tamamladı. 2010 yılında Trabzon Fatih Lisesi'nden mezun olduktan sonra aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2015 yılında bitirdikten sonra aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Analitik Kimya Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.

