

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

FEN FAKÜLTESİ KİMYA ANABİLİM DALI

**BAZI GIDA BOYAR MADDELERİN ANALİZİ İÇİN YENİ BİR TERS FAZ YÜKSEK
PERFORMANSLI SIVI KROMOTOGRAFİSİ (RP-HPLC) METODU GELİŞTİRME**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Davut BAŞKAN

**KASIM 2015
TRABZON**



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. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Gıda katkı maddeleri, gıdaların görünüşlerini, aromasını, tadını, rengini, tekstürünü, besleyici değerini ve muhafaza süresini iyileştirmek için genellikle gıdalara ilave edilerek kullanılırlar. Bu katkı maddelerinin önemli bir sınıfı da gıda boyalarıdır ve genellikle doğal ve yapay olarak sınıflandırılırlar. Doğal ve yapay gıda boyaları, gıdaların üretim sürecinde kaybolan gıdaların kendine has özelliklerini tekrar kazandırmak, gıdaların görünüşlerini daha cazip kılmak ve pazara farklı renkte ürünler sunmak için gıdalara ilave edilirler. Yapay gıda boyaları genellikle aromatik halkalı yapılar ve azo grubu içerdiklerinden dolayı toksik etki gösterebilirler. Bu nedenle yapay boyar maddelerin bilinçsizce kullanımı insan sağlığı için bir tehdit oluşturabilmektedirler. Özellikle bu boyaların düşük maliyetli, yüksek etkinliğe sahip ve kararlı bileşikler olmaları nedeniyle doğal boyaların yerine kullanılmaları teşvik edilmektedir. Bu maddelerin, insan sağlığı için tehdit oluşturmalarının yanı sıra, tüketicilerinin gıdayı oluşturan bileşenleri bilme ihtiyacı, gıdalardaki yapay boyaların miktarı merak konusu haline gelmiştir.

Bu çalışmada, başından sonuna kadar bana destek veren, yardımcı olan, bilgi ve tecrübesiyle yol gösteren tez danışmanım sayın Prof. Dr. Miraç OCAK'a, kimya bölümü öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Ümmühan OCAK'a, eczacılık fakültesi öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Ahmet YAŞAR'a ve lisansüstü öğrencisi sayın Osman Can ÇAĞILCI'nın da aralarında bulunduğu çalışma arkadaşlarıma saygı ve şükranlarımı sunarım. Ayrıca her zaman her konuda beni destekleyen ve yanımda olan sevgili aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim. Son olarak Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne maddi desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Davut BAŞKAN
Trabzon 2015

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum "Bazı Gıda Boyar Maddelerin Analizi İçin Yeni Bir Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC) Metodu Geliştirme" başlıklı bu çalışmayı baştan sonuna kadar danışman hocam sayın Prof.Dr.Miraç OCAK'ın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, 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.06/10/2015

Davut BAŞKAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
KISALTMALAR DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Gıda Boyaları Hakkında Genel Bilgiler	1
1.1.1. Gıda Boyalarının Tarihçesi.....	4
1.1.2. Gıda Boyalarının Numaralandırılması.....	5
1.1.3. Gıda Boyalarının Gruplandırılması	6
1.1.3.1. Sertifikalı ve Sertifikasız Gıda Boyaları.....	6
1.1.3.1.1. Sertifikalı Gıda Boyaları.....	6
1.1.3.1.2. Sertifikasız Gıda Boyaları	8
1.1.3.2. Ürüne Sağladıkları Renkler Açısından Gıda Boyaları	8
1.1.3.3. Elde Edildikleri Kaynağa Göre Gıda Boyaları	9
1.1.3.3.1. Doğal Gıda Boyaları.....	9
1.1.3.3.2. Yarı Sentetik Gıda Boyaları	10
1.1.3.3.3. Sentetik Gıda Boyaları.....	11
1.1.3.3.3.1. Gıda, İlaç ve Kozmetik Boyalar (F.D&C Boyalar)	11
1.1.3.3.3.1.1. Azo Boyalar	12
1.1.3.3.3.1.2. Trifenilmetan Boyalar.....	13
1.1.3.3.3.1.3. Fluoressein Boyalar	13
1.1.3.3.3.1.4. İndigoid Boyalar	13
1.1.3.3.3.2. Gıda İlaç ve Kozmetik Lake Boyalar (FD&C Lake Boyalar)	14
1.1.4. Kalitatif ve Kantitatif Analizi Yapılan Bazı Gıda Boyaları ve Özellikleri	15
1.1.4.1. Tartrazin (E102)	15
1.1.4.2. Allura Kırmızısı (E129).....	15
1.1.4.3. Sunset Sarısı (E110)	16
1.1.4.4. Kinolin Sarısı (E 104).....	16

1.1.5.	Literatürde Gıda Boyalarının Analizi İçin Önerilen Bazı Metodlar	17
1.2.	Kromatografik Analizler.....	20
1.2.1.	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromotography- HPLC)	21
1.2.1.1.	Hareketli Faz Hazneleri ve Çözücü Sistemleri	22
1.2.1.2.	Pompa	22
1.2.1.3.	Enjektör	23
1.2.1.4.	Kolon	23
1.2.1.5.	Detektörler	24
1.2.1.6.	Kaydedici.....	25
1.2.2.	İyonlaşma ve pH.....	25
1.2.3.	Ters Faz Sıvı Kromatografide pH ve Seçicilik.....	26
1.2.4.	Mobil Faz ve pH.....	26
1.2.5.	Sıvı Kromatografide Mobil Faz Optimizasyonu	27
1.2.6.	Mobil Fazda pH Standardizasyonu.....	27
1.3	Çalışmanın Amacı	28
2.	DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	29
2.1.	Kullanılan Cihazlar ve Diğer malzemeler	29
2.2.	Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltilerin Hazırlanması.....	29
2.3.	Numunelerin Hazırlanması.....	30
2.4.	RP-HPLC-UV Koşullar	31
3.	BULGULAR.....	33
3.1.	Her Bir Tür İçin Gradyent Programın Uygulanması	33
3.2.	Kalibrasyon Eğrileri İçin Kromatogramların Eldesi	34
3.3.	Kalibrasyon Eğrilerin Çizilmesi	38
3.4.	Numunelerin Analizi	41
4.	SONUÇ VE TARTIŞMA	47
5.	ÖNERİLER.....	50
6.	KAYNAKLAR.....	51
	ÖZGEÇMİŞ	

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

BAZI GIDA BOYAR MADDELERİNİN ANALİZİ İÇİN YENİ BİR TERS FAZ
YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMOTOGRAFİSİ (RP-HPLC) MEDOTU
GELİŞTİRME

Davut BAŞKAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Ana Bilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Miraç OCAK
2015, 52 Sayfa

Bu çalışmada, Tartazin (E 102), Kinolin Sarısı (E 104), Sunset Sarısı (E 110) ve Allura Kırmızısı (E 129)'un bulunduğu dört sentetik gıda boyasının aynı anda analizi için UV detektör ile donatılmış yeni bir ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografi (RP-HPLC-UV) metodu geliştirildi. Geliştirilen metot farklı gıda örneklerine uygulandı. Bu çalışma süresi içinde tüm gıda örnekleri yerel marketlerden sağlandı ve 10 farklı gıda örneği analiz edildi. Çalışmada Zorbax Eclipse^R XDB-C₈ Analytical (4,6-150 mm, 5 mikron, Agilent) kolon kullanıldı. Mobil faz A, B, C olarak sırasıyla %1'lik pH'ı 7,5'e ayarlanmış amonyum asetat çözeltisi, asetonitril ve metanol kullanıldı. Optimize edilen gradiyent elüsyon kullanılarak tüm bileşenler için 16 dk. içinde başarılı bir ayırım elde edildi. Geliştirilen metot kalibrasyon eğrisi, kesinlik, tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) tespiti ile validasyonu yapıldı. Metot, istatistik student-t testi kullanılarak başka bir metot ile karşılaştırıldı. Ayrıca gıda örneklerindeki boya miktarları Türkiye'nin Ulusal Standartlarıyla karşılaştırıldı.

Anahtar Kelimeler: Gıda Boyaları, RP-HPLC-UV

Master Thesis

SUMMARY

DEVELOPING A NEW REVERSED PHASE HIGH PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY (RP-HPLC) FOR DETERMINATION OF SOME OF FOOD
COLORANTS SUBSTANCES

Davut BAŞKAN

Karadeniz Technical University,
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Programe
Supervisor: Assoc. Prof. Miraç OCAK
2015, 52 Pages

In this study, a new reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC-UV) method coupled with UV detector was developed for simultaneous determination of four synthetic food colorants, including Tartrazine (E 102), Quinoline Yellow (E 104), Sunset Yellow (E 110) and Allura Red (E 129). Developed method was applied for the analysis of different food samples. All food samples used during this study have been obtained from local markets and totally 10 different food samples have been analysed. The study, Zorbax Eclipse^R XDB-C₈ Analytical (4,6-150 mm, 5 micron, Agilent) as column, and 1% (m/v) ammonium acetate buffer solution at pH 7,50, acetonitrile and methanol as mobile phase A, B, C, respectively was used. A good separation was obtained for all compounds using an optimized gradient elution within 16 minute and developed method was validated by determining the calibration curve, precision, limit of quantification and detection (LODs and LOQs). The method was compared with another method, using statistical students-t test. Also, the amounts of colorant in food samples were compared with National Standards of Turkey.

Key Words: Food colorants, RP-HPLC-UV

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Tartrazin (E 102) molekülünün açık yapı formülü.....	15
Şekil 2. Allura Kırmızısı (E 129) molekülünün açık yapı formülü.....	15
Şekil 3. Sunset Sarısı (E 110) molekülünün açık yapı formülü.....	16
Şekil 4. Kinolin Sarısı (E 104) molekülünün açık yapı formülü.....	16
Şekil 5. HPLC cihazı ve kısımları	21
Şekil 6. pH'ın ve iyonik türlerin alıkonma faktörü üzerine etkisi.....	25
Şekil 7. Mobil faz pH'sı ile asidik, bazik ve zwitter türlerin alıkonma faktörlerinin değişimi	26
Şekil 8. 10,00 mg/L standart Tartrazin (E 102) çözeltisine ait kromotogram.....	33
Şekil 9. 10,00 mg/L standart Sunset Sarısı (E 110) çözeltisine ait kromotogram.....	33
Şekil 10. 10,00 mg/L standart Allura Kırmızısı (E 129) boya çözeltisi	34
Şekil 11. 10,00 mg/L standart Kinolin Sarısı (E 104) çözeltisine ait kromotogram.....	34
Şekil 12. 1,00'er mg/L boya karışımına ait kromotogram	35
Şekil 13. 2,50'şer mg/L boya karışımına ait kromotogram	35
Şekil 14. 5,00'er mg/L boya karışımına ait kromotogram	36
Şekil 15. 10,00'er mg/L boya karışımına ait kromotogram	36
Şekil 16. 25,00'er mg/L boya karışımına ait kromotogram	37
Şekil 17. 50,00'er mg/L boya karışımına ait kromotogram	37
Şekil 18. Tartrazin (E 102)'e ait kalibrasyon eğrisi	38
Şekil 19. Kinolin Sarısı I (E104)'e ait kalibrasyon eğrisi	39
Şekil 20. Allura Kırmızısı (E 129)'na ait kalibrasyon eğrisi	39
Şekil 21. Kinolin Sarısı II (E104) 'ye ait kalibrasyon eğrisi.....	40
Şekil 22. Kinolin Sarısı (E 104) III'e ait Kalibrasyon eğrisi.....	40
Şekil 23. Sunset Sarısı (E 110)'na ait kalibrasyon eğrişi	41
Şekil 24. Turuncu sakızlara ait kromotogram (Bulunan miktar 117,20 mg/L Sunset Sarı).41	41
Şekil 25. Şeker (Bulunan miktar 25,79 mg/L Tartrazin-19,89 mg/L Allura Kırmızısı).....	42
Şekil 26. Sarı sakızlara ait kromotogram (Bulunan 127,48 mg/L Tartrazin)	42
Şekil 27. Trabzon kurabiyesine ait kromotogram (Bulunan 386,25 mg/L Tartrazin)	43
Şekil 28. Şeker 2 (Bulunan 57,59 mg/L Allura Kırmızısı).....	43

Şekil 29. Kırmızı sakızlara ait kromotogram (Bulunan 69,97 mg/L Allura Kırmızısı).....	44
Şekil 30. Buzu 1'e ait kromotogram (Bulunan 60,48 mg/L Sunset Sarısı)	44
Şekil 31. Jelibon dil kromotogramı (Bulunan 38,42 mg/L Allura Kırmızısı)	45
Şekil 32. Su buzu 2'ye ait kromotogram (Bulunan 13,26 mg/L Tartrazin)	45
Şekil 33. Limonataya ait kromotogram (Bulunan 12,62 mg/L Kinolin Sarısı I).....	46

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Ürüne sağladıkları renkler açısından gıda boyalarının gruplandırılması.....	8
Tablo 2. Gıda, İlaç ve Kozmetik Boyalar(F.D&C Boyalar) Genel Yapıları.....	12
Tablo 3. Lake boyalar ile sertifikalı boyalar arasındaki fiziksel farklılıklar.....	14
Tablo 4. Uygulanan gradiyent program.....	32
Tablo 5. Detektör zaman tablosu ve boyalar için absorpsiyon dalga boyu	32
Tablo 6. Alıkonma süreleri ve tayinin yapıldığı maksimum dalga boyları	38
Tablo 7. Boyalara ait LOD, LOQ-LOL, R ² ve kalibrasyon eşitlikleri	47
Tablo 8. Trabzon marketlerinde satışa sunulan bazı gıdalarda suda çözünür boyaların tespiti ve GKLS ile tarafımızca tespit edilen miktarların karşılaştırılması, n=3,Maksimum Yasal Miktar(Max. Y.M.).....	48
Tablo 9. Aşağıdaki renklendiricileri içeren gıdaların etiketlerinde yer alması gereken ilave bilgi.....	49

KISALTMALAR DİZİNİ

%BSS	Yüzde Bağlı Standart Sapma
ADI	Kabul Edilebilir Günlük Tüketim Miktarı
s.d.	Serbestlik derecesi
E	Avrupa
FAO	Dünya Sağlık Örgütü
FD&C	Gıda, ilaç ve kozmetik
FDA	Gıda -İlaç Teşkilatı
GKLS	Gıda Kontrol Laboratuvarı Sonuçları
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
INS	Uluslararası Numaralandırma Sistemi
JECFA	Gıda Katkı Maddeleri Ortak Uzmanlar Komitesi
LOD	Tespit Sınırı (Limit of Detection)
LOQ	Tayin Sınırı (Limit Of Quantification)
LOQ-LOL	Linear Aralık
mg	miligram
ODS	Okta Desil Silan
pH	Hidrojen iyonları aktivitesinin eksi logaritması
pK	İyonlaşma sabitlerinin eksi logaritması
mg/L	miligram/Litre
R ²	Korelasyon Katsayısı
RP-HPLC	Terz Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
RP-HPLC-UV	UV Detektörlü Ters faz Yüksek performanslı Sıvı Kromatografisi
SPE	Katı Faz Ekstraksiyon
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

1.1. Gıda Boyaları Hakkında Genel Bilgiler

Gıda sektörüne yeni ve üstün teknolojilerin kazandırdığı değişik üretim teknikleri, buna göre ürünlerin çeşitlenmesi, tüketici beğenisinin değişmesi ve bilinçlenmesi, mevsimlik gıdaların yılın her döneminde tüketilme eğilimlerinin artması, ürünlerde raf ömrünün uzatılması, kalitede standardizasyon zorunluluğu, daralan gıda kaynaklarının rasyonel kullanımı gibi hususlar, gıda endüstrisinde kullanılan tekniklerin yanı sıra gıda katkı maddelerinin kullanımını zorunlu hale getirmiştir (Erdoğan, 2007).

Sorumlu örgütlerce kullanılmasına izin verilen katkı maddelerinin bazıları, sağlık açısından herhangi bir sakınca oluşturmamalarına karşın, bazıları sürekli alınmaları halinde tehlikeler doğurabilecek niteliktedir. Gıda katkı maddelerinin son yıllarda geniş bir şekilde kullanılması ile toplumlarda kanser riskinin arttığı, nedeni bilinmeyen hastalıklar ve ölümlere sebep olduğu düşünülmektedir (Yaman, 1996). Bu nedenle özellikle son 25 yıl içerisinde tüketiciyi bu maddelere karşı koruyan kurumlar ve bunların yaptığı yasalar ortaya çıkmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda başlangıçta zararsız gibi görünen birtakım katkı maddelerinin sağlığa zararlı oldukları saptanmıştır. Ancak kısa bir süre sonra bu çalışmaların ve eldeki bilgilerin uluslararası ticarete yetersiz olduğu anlaşılmıştır. Bir ülkede kullanılmasına izin verilen herhangi bir katkı maddesine diğer bir ülkede izin verilmemekte, bu ise ülkelerin birbirleriyle ticaret yapmalarını engellemektedir. Bunun sonucu olarak tüm çalışmalar uluslararası düzeye kaydırılmıştır (Saldamlı, 1985).

Gıda katkı maddesi, besleyici değeri olsun veya olmasın, tek başına gıda olarak tüketilmeyen ve gıdanın karakteristik bileşeni olarak kullanılmayan, teknolojik bir amaç doğrultusunda üretim, muamele, işleme, hazırlama, ambalajlama, taşıma veya depolama aşamalarında gıdaya ilave edilmesi sonucu kendisinin ya da yan ürünlerinin, doğrudan ya da dolaylı olarak o gıdanın bileşeni olması beklenen maddeleri ifade etmektedir (<http://www.mevzuat.gov.tr>).

Tüketime sunulmadan önce, gıdalara bilinçli ve amaçlı olarak ilave edilen gıda katkı maddeleri, hile amacıyla ve besin değerini yükseltmek için kullanıldıklarında bu tanımın dışında kalırlar. Günümüzde, 2000 den fazla gıda katkı maddesinin gıda sanayinde

kullanılmasına değişik amaçlarla izin verilmiş ve kullanım birçok ÷lkede yasal düzenlemelerle belirlenmiştir (Çakmakçı ve Çelik, 1994).

Gıda katkı maddelerinin bir grubunu oluşturan gıda boya ları günümüzde ayrı ve özel bir önem taşımaktadır. Bunlar, gıdalara renk veren veya rengini geri kazandıran, gıdaların doğal bileşenlerini ve genel olarak oldu ğu gibi gıda olarak tüketilmeyen doğal kaynakları içeren ve genellikle gıdanın karakteristik bir bileşeni olarak kullanılmayan maddelerdir (www.mevzuat.gov.tr).

Ayrıca, gıda maddelerinden ve diğ er yenilebilir doğal kaynaklardan fiziksel ve/veya kimyasal ekstraksiyonla elde edilen diğ er besleyici veya aromatik bileşenleri içermeyecek şekilde pigmentlerin seçimli ekstraksiyonuyla oluşturulan preparatları ifade eder (www.mevzuat.gov.tr).

Bilindi ği gibi çağdaş tüketici, gıdanın içinde yer alan her bir öğeyi bilmek ve onun tüketici açısından en üstün kabul edilebilirlik düzeyinde olması konusunda titizlik gösterme çabası içindedir. Ham maddeden son ürün elde edilinceye kadar değişik aşamalarda kullanılabilen renk maddelerinin tüketici açısından kabul edilebilirliğinde, toplumların sosyal, coğrafi, etnik ve tarihi geçmişlerinin büyük etkisi olmuştur. Örneğin; ileri teknolojik düzeye erişmiş Amerika ve Avrupa ÷lkelerindeki tüketici, akşam yemeğinde mavi renkli çorba, sarı et, kırmızı patates vb. değişik renkleri ile zevke hitabeden tüketim istekleri içindedir (Yılmaz, 1999).

Katkı maddelerinin gıdalarda kullanılabilmesi için etkili olması, analizlerinin yapılabilmesi, sonuçlarının ölçülebilmesi ve çok sıkı bir şekilde kontrol altına alınmış koşullarda hayvanlar üzerinde emniyetinin sağlanmış olması gerekmektedir (Yaman, 1996). Buradan gıda boya larının etkin, doğru ve hızlı bir şekilde analiz edilmesi gereklili ği anlaşılmaktadır.

Bir katkı maddesinin kullanımına yasal olarak izin verilse bile o madde ancak birtakım kriterlere uygun olarak kullanılabilir. Kullanımına izin verilen katkı maddesi; yalnızca izin verildi ği gıdada, belirlenen en yüksek doz aşılmadan kullanılmalıdır. Gıdadaki herhangi bir hatayı örtmek veya tüketiciyi yanıltmak için kullanılmamalı ve kullanıldığı gıdanın etiketinde kullanım miktarı yazılmalıdır (Yılmaz, 1999).

Gıda katkı maddelerinin bir grubu olan gıda boya ları, uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (The Codex Alimentarius) tarafından "gıdanın rengini düzenleyen veya renk

vermek amacıyla katılan madde" olarak tanımlanmaktadır. Renk verme özelliğine sahip pek çok madde kimyasal yapılarındaki farklılıklar nedeniyle farklı fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal özelliklere sahiptirler ve bu özellikler onların hangi tip ürünlerde ve hangi amaçla ne şekilde kullanılacaklarını belirlemektedir. Günümüzde uygulanan gıda işleme tekniklerinin, gıdaların görünüş özellikleri üzerinde meydana getirdikleri olumsuz etkiler, gıdaların teknolojik nedenlerle renklendirilmesi gereksinimini ortaya çıkarmıştır (Karaali ve Özçelik, 1993).

Gıdalarda rengin önem kazanmasının başlıca nedenleri şu şekilde sıralanabilir;

1. Tüketici tercihlerinin ortaya çıkmasında renk en önemli etmenlerden birisidir.
2. Bazı gıdaların rengi zamanla solmaktadır ve bu değişim çoğu kez yapı, tat ve kokudaki değişimlerle birlikte ortaya çıkmaktadır.
3. Sebze ve meyvelerin olgunlaşması renk değişimleriyle paralellik halindedir.
4. Tüketiciler, gıdaların alışık oldukları belirli renkte olmasını beklemektedirler.

Gıdalarda rengin önemini belirten bu faktörlerin ışığında, gıdalara renk maddesi katılmasının nedeni de şu şekilde özetlenebilir;

1. Doğal olarak bulunan rengi arttırarak ya da kaybolanı yerine koyarak gıdanın özelliğini korumak.
2. Teknolojik olarak üründe standart renk oluşturmak.
3. Başka bir renk veya değişik renk tonları vermek.
4. Düşük kalitelerini gizlememek koşuluyla cazip ve kabul edilebilen ürünler elde etmek.

Gıdanın albenisini arttıran özelliği rengidir. Cisimlerde renk, ışığın spektral dağılımına bağlı olarak ortaya çıkan bir görünüş olgusudur. Hemen her gıda maddesi için alışılmış bir renk istenmektedir. Teknolojik işlem görmüş gıda maddelerinde renk kaybı mutlaka görülmektedir. Bu nedenle modern gıda endüstrisi açısından gıda maddelerini çekici hale getirmek ve gıdaların albenisini arttırmak için renk maddeleri etkili olmaktadır. Bu katkıları yeni gıdaların üretilmesinde, üretim sırasında veya sonunda depolamada meydana gelebilecek renk değişimlerini düzeltmek amacıyla çok yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Renk maddelerinin kullanımı ulusal ve uluslararası yasal düzenlemeler çerçevesindedir ve denetlenmektedir (Çakmakçı ve Çelik, 1994).

Teknik alanda yapılan bütün çalışma ve buluşlar, insanları daha yüksek düzeyde sağlıklı bir yaşama kavuşturmak ve onların daha iyi beslenmesini sağlamak amacıyla yapıyorsa da sayısız sorunları da beraberinde getirmektedir. Bu uygulamalar çoğu kez, toplumlarda görülen ve nedeni bilinmeyen hastalıklar ve ölümlerle ilgili görülmektedir. Bu nedenle bazı bilim insanları çalışmalarını gıdalara ilave edilen katkı maddeleri üzerine yoğunlaştırmışlardır. Özellikle Avrupa ve ABD' de yapılan gıda araştırmaları, bu ülkelerde uygulanan ileri teknolojilerin zorlaması sonucu yaygınlaşmıştır (Saldamlı, 1985).

1.1.1. Gıda Boyalarının Tarihçesi

Gıdaların boyanması tarih öncesi zamanlara kadar uzanmaktadır. Bu dönemde sadece bitki ve hayvanlardan elde edilen doğal boya maddeleri kullanılmıştır (Erdoğan, 2007). İlk olarak M.Ö. 5000 yıllarında Mısır'da saç ve deri boyanmıştır. 3500 yıl önce Mısırlılar gıda katkı maddesi olarak renk maddelerini kullanmışlar ve Khand adı verilen boyanmış şeker, ilk kez Büyük İskender'e Hindistan'dan Avrupa'ya döndüğünde hediye olarak sunulmuştur. M.Ö. 1500 yıllarında ise Hindistan ve Çin'de deriler, baharat ve sebze özleri ile boyanmıştır. Perkins, 1856 yılında anilin purple adı verilen renk maddesinin sentezi ile ilgili çalışmalar yapmış ve yapay boyalar üzerinde yapılan çok sayıda çalışmaya öncülük etmiştir (Saldamlı, 1985). 18. yüzyılda tereyağı safranla boyanmış, 19.yüzyılda bazı boyaların kullanılması ticaret hayatına girmiştir. İlk sentetik boya Sir William Henry Perkins tarafından siyah anilinden 1856 yılında elde edilmiştir. 1857'de yiyeceklere katılan karışımlarla ilgili araştırmalarda tatlıların kurşun kromat, civa sülfat, kurşun oksit, bakır arsenitle, şekerlemelerin ise elbise boyaları ile boyandığı tespit edilmiştir. Gıdaların tehlikeli mineral özleri ile boyanması sonucunda ortaya çıkan olumsuzluklardan sonra gıda boyalarının kömür katranından elde edilmesi durdurulmuştur (Saldamlı, 1985).

A.B.D. Tarım Bakanlığı boyaların gıdalarda kullanımını araştırmış ve bununla ilgili ilk yönetmelik ilkelerini 1900'lerin başında oluşturmuştur. Gıda maddeleriyle ilgili ilk yönetmelik 1906'da çıkarılan "Federal Gıda ve İlaç Kanunu"dur (Federal Food and Drugs Act). Bu kanunun oluşturulmasından sonra A.B.D. Tarım Dairesi bu renklendiricilerin sadece bileşim ve saflığı bilinen 7 tanesinin dışındaki tüm boyaların kullanımını yasaklamıştır. İzin verilen bu boyalar Orange I, Eritrosin, Ponceau 3R, Amaranth, Naphtol Sarısı, Light Green ve Indigotin'dir. 1907 yılında kullanımına izin verilen boyalar için

sertifika düzenlenmiştir. 1906'daki yasanın yerini 1938 yılında "Gıda Maddeleri İlaç ve Kozmetik Yasası" almış ve sertifika verilmiş olan boya maddelerinin çeşidi artırılmıştır. Ayrıca bu kanun her gıda boyası grubundan bir örneğin tahlile verilmesini gerektiren zorunlu belgelemeyi getirmiştir. Genel isimlerle daha önce bilinen sentetik boyaların hangilerinin gıdada, ilaç ve kozmetiklerde kullanılacağı belirlenmesi için özel isimler verilmiştir. FD&C Gıda İlaç ve Kozmetiklerde, D&C İlaç ve Kozmetiklerde, harici D ile harici C ise ilaç ve kozmetiklerde uygun olarak belirtilmiştir. 1960 yılında FD&C kanununa değişiklik getirilmiş ve iki bölümden oluşan bu değişikliğe "Delaney Koşulu" denilmiştir. Birinci koşul; insan ve hayvanlarda kanser oluşumuna yol açan boyanın gıdaya katılmasını yasaklarken, ikinci koşul; mevcut boyaların emniyetinin belirlenmesine kadar geçici liste altında kullanılmasına izin vermektedir (Yaman, 1996; Özcan ve Akgül, 1995).

1963-1970 yılları arasında FAO (Food and Agriculture Organization/Gıda Tarım Örgütü) ve World Health Organisation-Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) bünyesinde Joint Expert Committee on Food Additives-Gıda Katkı Maddeleri Ortak Uzman Komitesi (JECFA) adı verilen bir komite oluşturulmuştur. Bu komite dünyada her çeşit katkı maddesi üzerinde yürütülen çalışmaları periyodik toplantılarda ele alarak değerlendirmektedir. Bu çalışmaların sonuçlarına dayanarak FD&C boyaları için Acceptable Daily Intakes-Kabul Edilebilir Günlük Tüketim Miktarı (ADI) değerlerini belirlemekte ve gerekli gördükleri değişiklikleri yapmaktadır (Bayhan ve Yentür, 1988; Yaman 1996; Özcan ve ark., 1997).

1.1.2. Gıda Boyalarının Numaralandırılması

Her gıda katkı boyalarının uluslararası kabul görmüş bir numarası vardır. Bu numaralandırma Uluslararası Numaralandırma Sistemi (INS) ve E kodu'dur. Örneğin 621: Monosodyum glutamat, 102: Tartrazin... gibi. Avrupa Birliği'nde kullanımına izin verilen katkı maddelerine "European" kelimesinin baş harfi olan E kodu verilmiştir. Bu kodlar Avrupa Birliği'nin bir alt komitesi olan "Scientific Committee on Food" tarafından belirlenmektedir (Saldamlı, 1985). Gıda boyaları E100-E180 arasında numaralandırılmıştır.

1.1.3. Gıda Boyalarının Gruplandırılması

1.1.3.1. Sertifikalı ve Sertifikasız Gıda Boyaları

Sertifikalı ve sertifikasız gıda boyaları adı altında iki ana grupta toplanan renk katkılarının yasal tanımı ve sınıflandırması yapılmıştır. Ayrıca, sertifikalı renk maddelerinin gıdalarda kullanılma miktarlarına göre zararlı ve zararsız olduğu limitler saptanarak gıda endüstrisinde kullanılan renk katkılarına ikinci bir kısıtlama getirilmiştir. Bu çalışmaların sonunda tüketiciler için kullanılmasında sakınca görülmeyen renk katkıları bir liste haline getirilmiştir (Saldamlı, 1985).

Bu konuda yapılan bütün çalışmalarda hareket noktası, renk katkılarının "sıfır toksisite etkisinde" olmaları, yani ne miktarda kullanılırsa kullanılsın hiçbir şekilde toksik etki oluşturmayacak nitelikte olmalarıdır. Böylece, 12 Haziran 1960'da yasa haline getirilen renk katkıları listesi, iki bölümden oluşmuştur. Birinci bölüm, her türlü araştırması tamamlanmış, sakıncası görülmemiş ve kullanımına izin verilmiş renk katkılarını içermektedir. İkinci bölümde ise geçici bir liste yer almakta, bu geçici listeye girmiş olan renk katkılarının kullanımı ile ilgili çalışmalar sürdürülmektedir. Ancak şurası bilinmelidir ki herhangi bir renk katkısı, kesin listede yer almasına rağmen bununla ilgili bir sorun ortaya çıktığında derhal ikinci listeye alınarak yeniden araştırmaya kaynak olabilmektedir. Renk katkıları ait oldukları madde grubu içinde sınıflandırıldığı zaman aşağıda görüldüğü şekilde gruplara ayrılmaktadır.

1. Sertifikalı gıda boyaları (Certified Color Additives)

i. Boyalar (Dyes)

ii. Boyarmaddeler (Lakes)

2. Sertifikasız gıda boyaları (Uncertified Color Additives) (Saldamlı, 1985).

1.1.3.1.1. Sertifikalı Gıda Boyaları

Sertifikalı renk katkılarının hepsi yapay kaynaklı boyalardır. 1959 yılından önce bu grupta yalnızca boyalar yer alırken, daha sonra bu boyaların boyarmadde türünde olanları da bu gruba dahil edilmiştir. Boyarmaddeler, diğer bir deyişle pigmentlerdir. Boyalar, renk

verme güçlerini çözüldükten sonra, boyarmaddeler ise çözünmeyen pigmentler olarak dispersiyon yoluyla ortaya koymaktadırlar. Sertifikalı renk katkıları kullanıldıkları gıdalarda stabil özellik göstermekte, ürüne konuldukları miktarlarda, zamana bağlı bir azalma görülmemektedir. Bu konuda yapılan araştırmalara göre 15 yıl süre ile depolanan gıdalara konulan sertifikalı renk katkılarında miktar azalması ve bir değişim saptanmamıştır. Sentetik renk katkıları boyalar ve boyar maddeler olmak üzere 2 ana grupta incelenir.

Boyalar suda çözünür. Boyarmaddeler ise suda çözünmeyen pigmentlerdir; yani esas renk maddeleri boyalardır. Boyalar, çözelti haline getirilerek gıda maddelerine katılırlar. Suda veya yağda daha iyi çözünme durumlarına göre, bu maddelerle farklı çözeltiler hazırlanır. Çözücü ne olursa olsun, daha iyi bir çözünme için belli bir sıcaklığa kadar ısıtılmaları gerekir. Kullanım amacı açısından bu iki grup farklılık gösterir. Her birisi belirli gıda maddelerinde daha avantajlı olabilir. Örneğin, gıda maddesinin su miktarı az ve yağ miktarı fazla ise, boyarmadde kullanımını daha uygundur (Erdoğan, 2007).

Gıda sanayinde kullanılan renk maddeleri, öncelikle uygun çözücüsünde çözüldürülüp daha sonra üretime alınmaktadır. Bu bileşikler genellikle değişik formlarda bulunurlar; toz, granül, sıvı, sulandırılmış, macunsu gibi. Bu nedenle, kullanılacak renk katkısının bulunduğu durum kullanılma hacim ve miktarını etkileyeceğinden, boyanın formu, dikkat edilmesi gereken önemli bir noktadır.

FD&C boyaları suda çözünen, buna karşılık organik çözücüler ve yağlarda çözünmeyen yapıya sahip oldukları için, yağ orijinli gıdalarda genellikle FD&C boyarmaddeleri kullanılmaktadır. Boyarmaddeler, 3.5–9.5 pH'da stabil bir yapıya sahiptirler. Gıda sanayinde, boyarmaddelerin kullanılma şekli gereğince bilinmemektedir. Boyama sırasında boyarmaddeler dispersiyon fazında etkilerini göstermektedirler. Bu durum, iki yöntemle sağlanmaktadır;

1. Boya kitesinin ortama homojen dağılımı,
2. Boyanın dolgu olarak kullanılacak bir materyale karıştırıldıktan sonra kullanılması.

Sentetik/yapay renk katkıları araştırıldıktan sonra sertifika (izin) verilmesi gerektiği için bunlara "sertifikalı renk maddeleri" de denilmektedir. FD&C sertifikalı renk katkılarının hepsi suda çözünür. Bunların 4 sınıfı vardır: Azo Boyalar, Trifenilmetan, Floresan Tip, Sülfonatlı Indigo (Çakmakçı ve Çelik, 1994).

1.1.3.1.2. Sertifikasız Gıda Boyaları

Bu grupta yer alan renk katkılarının hepsi doğal boya maddeleridir. Bu maddeler, 1960 yılında ABD Gıda - İlaç ve Kozmetik Yasası'nda yapılan değişiklik ile sertifikalı boya maddeleri listesinden çıkarılarak, öncelikli ve sürekli kullanılma olasılığı olan maddeler listesine aktarılmıştır (Saldamlı 1985).

1.1.3.2. Ürüne Sağladıkları Renkler Açısından Gıda Boyaları

Ürüne sağladıkları renkler açısından gıda boyalarının gruplandırılması Tablo 1'de belirtilmiştir.

Tablo 1. Ürüne sağladıkları renkler açısından gıda boyalarının gruplandırılması (Karaali ve Özçelik, 1993)

Kırmızı Boyalar	Amaranth, Eritrosin, Ponceau 4R, Allura Kırmızısı 40, Kantaksantin, Karmoisin
Turuncu Boyalar	β -karoten, β -apo-8-karotenol, Annatto, Paprika, Sunset Sarısı
Sarı Boyalar	Riboflavin, Curcumin, Tartrazin, Safran, Lutein, Turmerik
Yeşil Boyalar	Klorofil (bakır kompleksi ve sodyum-potasyum tuzları), Patent Green, Brilliant Green
Mavi Boyalar	Brillant Mavi, İndigo Karmen, Patent Mavi
Menekşe Rengi Boyalar	Antosiyantinler
Kahverengi Boyalar	Karamel, Brown FK, Brown HT
Siyah Boyalar	Brilliant Black, Bitkisel karbon

1.1.3.3. Elde Edildikleri Kaynağa Göre Gıda Boyaları

1.1.3.3.1. Doğal Gıda Boyaları

Doğal boya maddeleri, bitkisel ve hayvansal organizma veya mikroorganizmalar tarafından sentez edildiğinden yapılarında doğal halde bulunurlar. Bir kısmı da minerallerin doğal yapısında mevcuttur (Karaali ve Özçelik, 1993). Bunlar kısmen serbest halde bulunabildikleri gibi, şeker (glikozit halinde) veya proteinlerle birleşmiş olarak da bulunabilirler (Çakmakçı ve Çelik, 1994).

Doğal boyalar üretim masrafları nedeni ile daha pahalıdır. Birçoğu, işleme sırasında sentetik boyalar gibi aynı kalıcılığa sahip değildir. Işığa maruz kaldıklarında kolaylıkla solmakta ve yüksek ısı ile asitliğe karşı düşük direnç göstermektedirler. Örneğin Annatto düşük pH' da portakal sarı renginden pembeye, klorofil ise yeşilden kahverengine dönüşmektedir (Özçelik, 1995). Yapay boyalar bu değişimlere daha fazla dayanıklı olmalarına karşılık yapayların sonuç vermediği durumlarda doğal renk maddeleri iş görmektedir (Çedar peynirine annatto katılması gibi). En önemlisi de daha sağlıklı olmaları ve tüketici psikolojisine uymalarıdır (Ekşi 1996, Karaali ve Özçelik, 1993, Yaman, 1996).

Doğal boyaların kullanılmasını engelleyen bazı dezavantajlar aşağıda açıklanmıştır. Doğal boyaların maliyetleri yapay boyalara göre 30 ile 100 kat daha fazladır. Çünkü doğal boyalar bol miktarda üretilmediğinden pahalıdır. Doğal boyaların renklendirici gücü sentetik boyalardan daha düşüktür. Ayrıca, gıda işleme prosesine ve gıdaların depolanmasına karşı dayanıklılık kabiliyetleri düşüktür.

pH'in etkisi: Antosiyaninler aside karşı çok dayanıklıdır. Bu yüzden çok düşük pH larda (pH 2,5-3,2) çok kuvvetli kırmızı renk verirler. Eğer pH 4,5'lere kadar yükselirse depolama ya da ısı uygulaması sırasında renk mor ya da mora yakın tonlar alır ve bu da pigmentasyon sırasında rengin maviden sarıya dönüşmesine neden olur. Ancak mor mısır antosiyaninleri pH 6 ya kadar kırmızı rengini muhafaza edebilmektedirler. Pancar kırmızısı rengine pH 5'te ulaşılmaktadır. Karotenoidler ve bunların doğal benzerlerinin renkleri birçok gıdada pH 2,5-7,5 arasında değişmez. Aside karşı dayanıklı koşnil boyalarının günümüzde kullanımı yaygındır.

Oksijenin etkisi: Pek çok doğal pigment kimyasal yapısından dolayı oksidasyona karşı hassastır. Çünkü konjuge çift bağ içerirler. Oksijene karşı olan hassasiyeti azaltmak

için bir antioksidan olan askorbik asit ilavesi yapılır. Aynı zamanda pazarlarken uygun ambalajlama tekniği kullanılarak da oksidasyon önlenir.

Sıcaklığın etkisi: Doğal renk maddeleri değişik ısılarda stabil bulunabilmektedirler. Örneğin Karotenoidler ve Antosiyaninler yaklaşık 100°C'ye kadar dayanıklıdır. Isıya en dayanıklı olan doğal renk maddeleri koşnildir. En az dayanıklı olan ise pancar kırmızısıdır.

Metallerin etkisi: Demir ve bakır kontaminasyonu, pigmentlerin renksizleşmesine ve istenmeyen renklerin oluşmasına neden olabilir. Ayrıca metaller, karotenoidler ve betasiyaninlerin katalize edilmesinde azaltıcı etkide bulunurlar.

Diğer katkıların etkisi: SO₂ ve askorbik asit gibi katkıların bulunması renk maddelerinin kararlılıklarını etkilemektedir. SO₂ genellikle gıda işletmelerinde koruyucu olarak kullanılmaktadır ve antosiyaninlerin düşük konsantrasyonlarında kararlılıklarını sağlamaktadır. Karotenoid dışında SO₂ renk stabilizasyonunda çok etkilidir. Eğer askorbik asitle kullanılmıyorsa stabilitenin sağlanması daha kolay olur. Askorbik asit dozajının altında kullanılıyorsa karotenoidlere prooksidant gibi davranmaktadır. Eğer optimal dozajın üstünde kullanılırsa antosiyaninlerin renksizleşmesini artırmaktadır (Anonim, 2010a).

1.1.3.3.2. Yarı Sentetik Gıda Boyaları

Bunlar, doğal kaynaklardan elde edilen maddelere uygulanan çeşitli proseslerle üretilirler. Örneğin klorofilin bakır kompleksi veya sodyum-potasyum tuzları ile şekerin yaklaşık 150°C'de sodyum hidroksit (NaOH), amonyum hidroksit (NH₄OH) gibi katalistlerle yakılmasından elde edilen karamel bu tanıma girmektedir. Bunlardan karamelin Türkiye'de endüstriyel ölçekte üretildiği, ancak diğerlerinin dış-alım yoluyla sağlandığı bilinmektedir (Karaali ve Özçelik, 1993).

Yarı sentetik olan kantaksantin en son onaylanmış ve özellikle FD&C Red No.2'nin kullanımının yasaklanmasından beri önem kazanmıştır. Çok yüksek dozlarda uzun süre alınan kantaksantin'in göz retinasında değişiklik yaparak, görme bozukluklarına yol açtığı belirtilmiştir (Ekşi, 1996).

1.1.3.3.3. Sentetik Gıda Boyaları

Bunlara "kömür katranı" boyalar (coal tar dyes) da denilmektedir. Çünkü hemen hepsinin sentezinde başlama maddesi kömür katranıdır. Çoğunun yapısında $-(N=N)-$ grubu bulunduğundan bir kısmı azo boyalar olarak da tanınırlar. Bunlara örnek olarak tartrazin, amarant ve ponceau 4R verilebilir (Erdoğan, 2007). Tartrazin; fenilhidrazin parasülfonik asidin, dihidroksitartarik asit ile kondensasyonundan üretilmektedir. Sentetik boyaların stabilitesini pH, asit, tuz, ışık, ısı ve koruyucular gibi faktörler etkilemektedir. Sentetik boyaların tümü Türkiye'ye ithal yolu ile girmektedir (Karaali ve Özçelik, 1993).

Sentetik gıda boyaları iki grupta incelenir ve hepsi sertifikalıdır.

1. Gıda İlaç ve Kozmetik Boyalar (FD&C Boyalar)
2. Gıda İlaç ve Kozmetik Lake Boyalar (FD&C Lake Boyalar) (Ekşi 1996, Yaman 1996)

1.1.3.3.3.1. Gıda, İlaç ve Kozmetik Boyalar (FD&C Boyalar)

Bu boyalar 4 grupta incelenmektedir. Tablo 2'de bu boyalar ve genel yapıları verilmiştir.

Tablo 2. Gıda, İlaç ve Kozmetik Boyalar(FD&C Boyalar) Genel Yapıları (Saldamlı, 1985)

Boyalar	Genel Yapısı
Azo Boyalar	
FD ve C Kırmızı No.2 FD ve C Sarı No.5 FD ve C Sarı No.6 FD ve C Kırmızı No.4 FD ve C Kırmızı No.40 Orange B	
Trifenilmetan Boyalar	
FD ve C Mavi No.1, FD ve C Mavi No.3, FD ve C Violet No.1	
Floressein Tipi Boyalar	
FD ve C Kırmızı No.3	
Sülfolanmış İndigo Boyalar	
FD ve C Mavi No.2	

1.1.3.3.1.1. Azo Boyalar

Aromatik diazo bileşiklerinin aromatik fenol veya aminlerle reaksiyonu sonucu oluşan maddelerdir (Çakmakçı ve Çelik, 1994). Ultraviyole ışınları bu bileşiklerin oksidasyonuna sebep olabilir ve renk verme durumunu etkileyebilirler. Azo boyaları en büyük gruptur. Azo grupları metalik iyon veya sülfür dioksit ile kolay indirgenirler.

Bunlardan asidik hidroksil grubu içerenlere asidik azo boya maddeleri, amin veya dialkil amin grubu içerenlere ise bazik azo boya maddeleri denilmektedir. Amino azo benzen (anilin sarısı) ilk keşfedilen bazik, alfa ve betanaftol oranj ise asidik azo boya maddeleridir. Sarı, kırmızı veya turuncu renk veren maddeler bu grup içine girmektedir. Bu renk maddeleri şunlardır: FD&C Red No:2, FD&C Sarısı No:6, FD&C Red No:4, FD&C Red No: 40, Orange B.

1.1.3.3.1.2. Trifenilmetan Boyalar

Sülfonik asit içerdikleri için suda iyi çözünürler. Trifenil metan karbon atomuna bağlanmış iki benzen halkası ve bir p-kinoit grubunun bağlanmasıyla meydana gelmiştir. Mavi, yeşil veya menekşe rengi veren maddeler bu grup içindedir (FD&C Mavi No:1, FD&C Green No: 3, FD&C Violet No:1 gibi).

1.1.3.3.1.3. Fluoressein Boyalar

Bu grup boyar maddeler kırmızı-kahverengi arasında değişen renkler oluştururlar. Fitalik asit ile resorsin'in ısıtılması sonunda elde edilmektedir. FD&C Red No:3 fluoressin boyalardan en fazla kullanılanıdır (Ekşi 1996, Yaman 1996). FD&C boyalar suda çözünmelerine karşı organik çözücülerde zor çözünürler. Suda çözünürlükleri çok yüksek olduğu için gıda sanayinde kullanımları çok kolaydır ve kullanımında da sorun çıkarmamaktadır. Bu boyalardan sadece FD&C Mavi No.2 (indigotin) ayrıcalıklı bir boyadır. Trifenilmetan, indigo ve fluoressin boyalar kimyasal reaksiyonlara daha dirençlidir. FD&C Mavi No.2 ve FD&C Red No.3 ultraviyole ışık ile kolayca okside edilir ve rengi çabuk kaybolur. FD&C boyalarının minimum % 85 saf boya içermesi gerekir, genellikle % 90-93 saf boya içerirler (Yaman, 1996).

1.1.3.3.1.4. İndigoid Boyalar

Bazı bitkilerde glikozit olarak bulunmaktadır. Işık, yıkama, baz ve asitlere karşı dayanıklıdır. Bu boya mavi renkli boyar maddelerin en önemli grubunu oluşturur. En çok kullanılan indigoid boyalardan birisi FD&C Mavi No:2'dir.

1.1.3.3.2. Gıda İlaç ve Kozmetik Lake Boyalar (FD&C Lake Boyalar)

Bu boyalar 1959 yılında sertifikalı gıda boyaları olarak kabul edilmiştir. FD&C Lakeler, FD&C boyalarına karşılık gelen alüminyum tuzlarıdır. Alüminyum hidratin hazırlama yöntemi ve boyanın emilişi, boyama gücünü, tonunu, partikül büyüklüğünü ve dağılımını belirler. Lakeler % 1-45 saf boya içeriği ile hazırlanabilir. Ancak bu oran genellikle % 10-40'tır. Lakelerin boyama güçleri boya içeriği ile orantılı değildir. Boyalardan daha iyi ışık, kimyasal yapı ve termal stabiliteye sahip olup boyalardan daha pahalıdır. Daha çok yağlı ve FD&C boyaları için uygun olmayan düşük nemli ürünler için uygundur. Şeffaflık açısından da boyalardan daha üstündür. FD&C No.40 lakesi hariç bütün lakeler FDA (Food-Drug Administration, Gıda İlaç Teşkilatı) tarafından geçici olarak belirlenmiştir. Sertifikalı boyalar ile lake boyalar arasındaki fiziksel farklılıklar Tablo 3'de gösterilmiştir (Ekşi, 1996; Yaman, 1996).

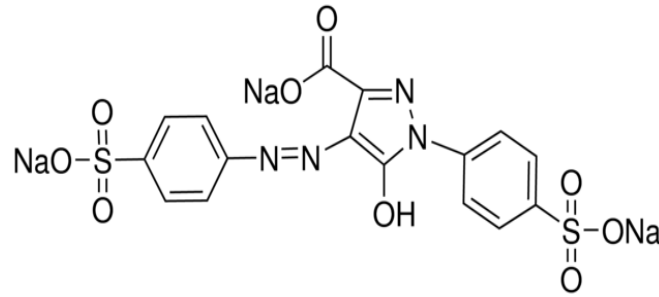
Tablo 3. Lake boyalar ile sertifikalı boyalar arasındaki fiziksel farklılıklar (Saldamlı, 1985)

Özellikler	Lake Boyalar	Sertifikalı Boyalar
Çözünürlük	Hemen hemen tüm çözücülerin hiçbirinde çözünmez	Suda, propilen glikol ve gliserinde çözünür
Renk verme Şekli	Dispersiyon yolu ile	Çözünerek
Saf boya miktarı	%10-40 dolayında	%90-93
Kullanılma Oranı	%0,1-0,3	%0,01-0,03
Partikül büyüklüğü	Ortalama 5 mikron	12-20 mesh
Işığa dayanıklılığı	Daha iyi	İyi
Isıya dayanıklılığı	Daha iyi	İyi
Renk verme gücü	Saf boya miktarı ile orantılı olmaksızın	Doğrudan saf boya miktarı ile ilişkili
Renk tonu	Saf boya miktarına göre değişken	Sabit

1.1.4. Kalitatif ve Kantitatif Analizi Yapılan Bazı Gıda Boyaları ve Özellikleri

1.1.4.1. Tartrazin (E102)

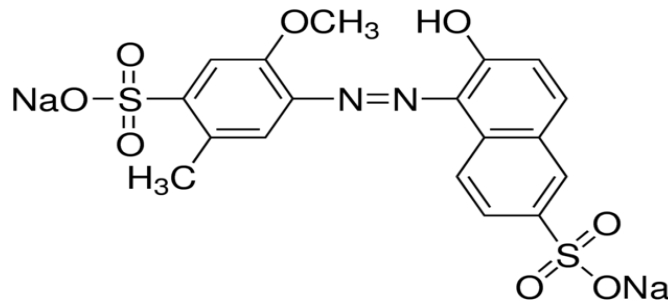
Monoazo sınıfından bir renklendiricidir. Açık turuncu renkte toz veya granüller halinde bulunmaktadır. Suda çözünür nitelikte olan bu madde etanolde çok az çözünmektedir. Kabul Edilebilir Günlük Tüketim Miktarı-Acceptable Daily İntake (ADI) değeri 7,50 mg/kg olup molekül ağırlığı 534,37 g/mol'dür. $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$ kimyasal formülüne sahiptir. Açık yapısı Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Tartrazin (E 102) molekülünün açık yapı formülü

1.1.4.2. Allura Kırmızısı (E129)

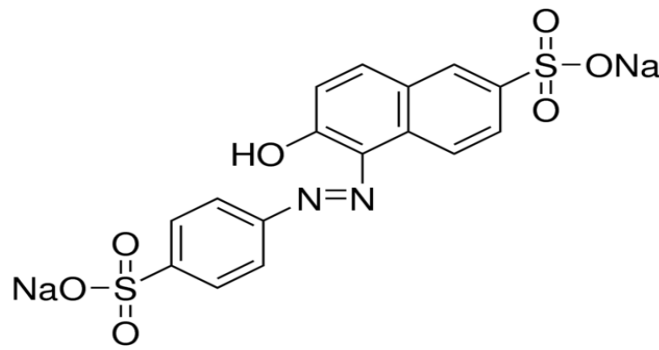
Sülfonat yapısında monoazo sınıfından bir renklendiricidir ve koyu kırmızı renkte toz veya granül halde bulunmaktadır. Suda çözünür nitelikte olan bu madde etanolde çözünmemektedir. Kabul Edilebilir Günlük Tüketim Miktarı-Acceptable Daily İntake (ADI) değeri 7.00 mg/kg olup molekül ağırlığı 496,43 g/mol'dür. $C_{18}H_{14}N_2Na_2O_8S_2$ molekül formülüne sahiptir. Açık formülü Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Allura Kırmızısı (E 129) molekülünün açık yapı formülü

1.1.4.3. Sunset Sarısı (E110)

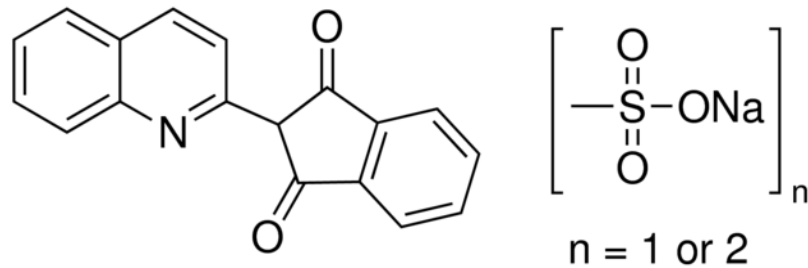
Monoazo sınıfından bir renklendiricidir. Turuncu-kırmızı renkte toz veya granüller halinde bulunmaktadır. Suda çözünür nitelikte olan bu madde etanolde çok az çözünmektedir. Kabul Edilebilir Günlük Tüketim Miktarı-Acceptable Daily İntake (ADI) değeri 2,50 mg/kg olup molekül ağırlığı 452,38 g/mol'dür. $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$ molekül formülüne sahiptir. Açık yapısı Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3. Sunset Sarısı (E 110) molekülünün açık yapı formülü

1.1.4.4. Kinolin Sarısı (E 104)

Gıdalara açık sarı renk vermek amacıyla kullanılan bir gıda boyasıdır. Toz ve granül halinde bulunmaktadır. Sülfolu yapısı suda iyi çözünmektedir. Moleküle ait açık yapı formülü Şekil 4'de verilmiştir.



Şekil 4. Kinolin Sarısı (E 104) molekülünün açık yapı formülü

1.1.5. Literatürde Gıda Boyalarının Analizi İçin Önerilen Bazı Metodlar

Miniote vd., (2007), Tartrazine (E 102), Kinolin Sarısı (E 104), Sunset Sarısı (E 110), Karmazin (E 122), Amaranth (E 123), Ponceau 4R (E 124), Erythrosine (E 127), Kırmızısı 2G (E 128), Allura Kırmızısı AC (E 129), Patent Mavi V (E 131), Indigo Carmine (E 132), Brilliant Mavi FCF (E 133) ve Green S (E 142) boya ları ters faz HPLC yöntemiyle başarılı bir şekilde ayırmış ve kantitatif analizi gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında durgun faz olarak C₁₈ hareketli faz olarak hacimce 20:80 asetonitril ve metanol karışımı ile kütlece %10'luk sodyum hidroksit çözeltisi kullanarak pH'ı 7,50'e ayarlanmış %1'lik amonyum asetat çözeltisi kullanılarak 29 dakika içinde başarılı bir ayırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarını oda sıcaklığında 20,00 µL enjeksiyon ve dakikada 1,50 mL akış hızıyla elde etmişlerdir. Ölçümlerde UV-DAD detektörü kullanarak 350-800 nm arasında absorbans ölçümleri almışlardır. Validasyon işlemlerini yaparak LOD'ların 1,59 µg/L ile 22,10 µg/L aralığında değiştiğini tespit etmişlerdir. Gün içi kesinliği BSS cinsinden %0,37 ile %4,80 olarak hesaplamışlardır. Günler arası kesinlik BSS cinsinden %0,86 ile %10 arasında bulmuşlardır. Daha sonra geliştirdikleri bu yöntemi çeşitli gıda örneklerinde bu boyaların analizi için kullanmış ve başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Analiz öncesi işlemler olarak seyreltme ve ultra saf suyla ekstraksiyon işlemi ile numuneleri analize hazırlamışlardır (Miniote vd, 2007).

Bonan vd., (2013), Azorubine (E122), Amaranth (E123), Cochineal Red A (E124), Red 2G (E128), Allura Kırmızısı (E129), Azocarmine B (AZO B), Azocarmine G (AZO G), Ponceau 2R (P2R), Ponceau 6R (P6R), Tartrazine (E102), Sunset Sarısı (E110), Kinolin Sarısı (E104), Orange II (OR II), Metanil Sarısı (MY), Patent Mavi V (E131), İndigo Carmine (E132) ve Brilliant Mavi FCF(133) boya larını içeren bir karışımı ters faz HPLC yöntemiyle ayırmışlardır. Çalışmalarında 17 farklı gıda boyasını ayırmak için C₈ (150x4.6 mm iç çap, 3 µm partikül büyüklüğü, Phenomenex, CA, USA) kolonu kullanmışlardır. Ayırma işlemi mobil faz akış hızı 1,00 mL/dk, oda sıcaklığında 35 dakika sürmüştür. Mobil faz olarak asetonitril ve pH 7,00'de 100 mM sodyum asetat tamponu kullanmışlardır. Kromatogramlar 240-700 nm arasında UV-DAD detektörü ile alınmıştır. Katı gıda örneklerini su-etanol (1:1, h/h) ile ekstrakte etmiş ultra-trax ile homojenize edilmiş, 15 dk ultra sonik banyoda bekletmiş ardından 1saat yatay çalkalayıcıda karıştırmış ve 15.000 rpm 10 dk. ultrasantrifüjde santrifüjlemişlerdir. Supernatant kısmı ayrılmış geri kalan katı kısım tekrar 20,00 mL etanol-su karışımıyla ekstrakte edilmiş ve ekstraktlar

toplanmıştır. Daha sonra ekstrak fosforik asitle pH=2,00'ye getirilmiştir. SPE poliamid kartuş 4,00 mL MeOH ve 2,00 mL suyla şartlandırmışlar ardında dakikada 1,00 mL olacak şekilde akış hızı ayarlanarak ekstrak kartuştan geçirilmiştir. Kartuş 2,00 mL suyla yıkanmış ve 30 sn. vakumla kurutulmuştur. Son olarak kartuş 4,50 mL metanol %1'lik amonyak çözeltisi (1:1, h/h) ile yıkanarak boyalar test tüpüne elüe edilmiş ve test tüpleri 5,00 mL'ye tamamlanmış. İçecekleri ise içlerinde çözünmüş gazı gidermek için ultra sonik banyoda 20 dk. bekletmiş ve 1/2 oranında deiyonize suyla seyreltmışler ve 15.000 rpm 10 dk. santrifüj etmişlerdir. Tüm bu işlemlerden sonra 20,00 µL enjeksiyon yapılarak boyalar analiz etmişlerdir (Bonan vd., 2013).

Qi vd., (2000), HPLC-MS/MS cihazını kullanarak 11 ayrı boyanın kalitatif ve kantitatif analizini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında Shimadzu Inertsil ODS-3 (3.0x75 mm, 2.2 µm) kolon kullanmış ve kolon sıcaklığını 40°C, ve elüent akış hızını 0,30 mL/dk olarak ayarlamışlardır. Mobil faz olarak metanol (A) ve 5 mM amonyum asetat çözeltisi kullanmışlardır. Gradient elüsyon, diğer kromatografik elüsyonlardan farklı olarak başlangıç olarak %15 A olacak şekilde seçmişler ancak linear olarak 7 dk. boyunca sürekli oran %95 oluncaya kadar artırmış ve bu oranda 1 dk. devam etmiştir. Daha sonra MS/MS kullanılarak kantitatif analizi gerçekleştirmişlerdir. Numuneler analiz edilmeden önce homojenizasyon, ekstraksiyon, kurutma, çözündürme, SPE kartuşlardan geçirme ve yıkama işlemlerini uygulamışlardır. Boyaların LOD and LOQ'leri sırasıyla 0,0023 - 0,022 ve 0,0076 - 0,071 mg/kg aralığındadır. (Qi vd., 2007).

Khanavi vd., (2012), (Tartrazine (E 102), Kinolin Sarısı (E 104), Sunset Sarısı (E 110), Karmazin (E 122), Ponceau 4R (E 124), Allura Kırmızısı (E 129), Indigo Carmine (E 132) ve Brilliant Mavi (E 133)) boyalarını her biri 30 dk. iki kez elüe ederek ayırmayı başarmış ve kalitatif ve kantitatif analizlerini gerçekleştirmiş. Burada izokratik elüsyon kullanmışlardır. Ancak detektör dalga boyu farklı zamanlarda farklı dalga boylarına ayarlandığı için her boya her elüsyonda absorpsiyon vermemiştir. Çalışmalarında C₈ kolunu kullanmışlardır akış hızları ilk 15 dk. 1,00 mL/dk daha sonra 1,50 mL/dk ile yapmışlardır. Yöntem organik solvent kullanmadığı için bir avantaja sahip olmakla birlikte iki farklı yürütme işlemi ile bir dezavantaja sahiptir. Çalışmalarında mobil faz olarak %0,25 triton X-100 içeren 50.00 mM lık pH'ı 7,00 olan fosfat tamponu kullanmışlardır. Analizden önce her numune farklı işlemlerden geçirilmiş (homejenizasyon, mikrodalga çözünürleştirme, filtrasyon, numune pH'larının 3,00'e ayarlanması, absorbet (poliamid)

ilavesi boyaların çözeltilerden alınması için, absorbentlerin yıkanması ve filtrelenmesi, boyaların %25'lik NH₃ ile absorbentten alınması, çözeltilerin kurutulması ve mobil faz ile çözme işlemleri) ve cihaza enjeksiyon yaparak analizi gerçekleştirmişlerdir. LOD'lar 0,05 ile 0,61 mg/L arasında linear aralıklar ise 0,50 ile 25 mg/L arasında değişiklik göstermiştir (Khanavi vd., 2012).

Hajimahmoodi vd., (2013), Tartrazine (E 102), İndigotine (E 132), Kinolin Sarısı (E 104), Ponceau 4R (E 124), Sunset Sarısı (E 110), Brilliant Mavi (E 133), Allura Kırmızısı (E 129) ve Karmazin (E 122)'i içeren boya örneklerini, ekstraksiyonda ve elüsyonda organik solvent kullanmadan kantitatif analizi gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında Eurospher-100 C8 (5 µm, 4.6×250 mm) kolon ve detektör olarak (UV-Vis) kullanmışlardır. Analize başlamadan önce kolon sıcaklığı 35°C ve 30 dk. boyunca 1,00 mL/dk mobil faz akışı sağlanarak kolon şartlandırmışlardır.

Kullanılan mobil fazın bileşimi %0,25 Triton X 100 ve 50,00 mM pH'ı 7,00 olan fosfat tamponu kullanmışlardır. Analiz öncesi işlemler olarak homejenizasyon, filtrasyon, numune pH'larının 3,00'a ayarlanması, boyaların çözeltilerden alınması için absorbent (poliamid) ilavesi, absorbentlerin yıkanması ve filtrelenmesi, boyaların %25'lik NH₃ ile absorbentten alınması, çözeltilerin kurutulması ve mobil faz ile çözme işlemlerini kapsamaktadır. LOD'lar E102 için 0,04 mg/kg ile E122 1,00 mg/kg arasında değişiklik göstermekte; LOQ E 102 için 0,06 mg/kg ile E122 1,12 mg/kg arasında değişmektedir. Analiz iki farklı metot şeklinde uygulanmıştır. Method A: (Tartrazine, Kinolin Sarısı; Ponceau 4R; Brilliant Mavi; Allura Kırmızısı; Karmazin), Method B: (İndigotine; Ponceau 4R; Sunset Sarısı; Allura Kırmızısı; Karmazin) için kullanılmaktadır. Hangi metodun kullanılacağı TLC ile belirlenmiştir. Örnek standartlar ile karşılaştırılır ve örnekte hangi boya ya da boyalar varsa boya içeriğine göre metotlardan biri veya her ikisi analiz için kullanılmıştır. Metotları birbirinden ayıran tek faktör detektörün farklı zamanda farklı dalga boylarına ayarlanmasıyla ilişkilidir (Hajimahmoodi vd., 2013).

Perez-Urquiza M vd., (2000), bazı sülfonat boyaları ve sülfonatlı azo boyar maddeleri analizi için DAD detektörü ile donatılmış kapiler zon elektroforez tekniğiyle 7 farklı boyanın kantitatif analizlerini yaklaşık 8 dk. içinde gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında Celect-FS75 kolon kullanmışlardır. LOD'lar 0,10-4,53 µg/ml aralığında değişiklik göstermişlerdir. Numunelere analiz edilmeden önce filtreden geçirme, HCl ile asidifikasyon ve SPE (Oasis HLB) ile zenginleştirme işlemleri uygulamışlardır.

1.2. Kromatografik Analizler

Kromatografi, bir karışımda bulunan bileşenlerin birbirinden ayrılmasını gerçekleştiren ve bu sayede kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapıldığı yöntemlerin genel adıdır. Bu yöntemlerde çalışma düzeneği temel olarak iki bileşenden oluşur. Bu bileşenlere sabit faz (stationary phase) ve hareketli faz ya da mobil faz (mobile phase) adı verilir. Mobil fazın içerisinde yer alan bileşenler, sabit faza ait dolgu maddesiyle etkileşmeleri sebebiyle, bir miktar tutulurlar. Bu tutulma, örnekteki farklı bileşenler için farklı miktarlarda olur. Böylece bileşenler sabit fazın sonlarına doğru, farklı hızlarda ilerledikleri için, birbirinden ayrılmış olarak sabit fazı farklı zamanlarda terk ederler.

Bu şekilde sabit fazdan çıkan bileşenlerin derişimleri uygun bir biçimde ölçülür ve zamana karşı y-ekseninde işaretlenerek "kromatogram" denilen grafikler elde edilir. Sıvı-sıvı dağılma (partisyon) kromatografisinde çözünmüş maddenin ayırımı, sıvı kromatografik teknikler içinde ters faz (Reversed Phase) sıvı kromatografisinde en yaygın kullanılanıdır. Sabit faz polaritesi, hareketli faz polaritesinden daha düşüktür. Bu kromatografi türü, apolar sabit fazda tutunmaları farklı olan türlerin ayırımında kullanılır. Kimyasal olarak bağlı alkil zincirlerinin sabit faz olarak kullanıldığı ters faz sıvı kromatografisinde, ODS (18 karbon atomu zincirinden oluşan oktadesil silan) en fazla kullanılan sabit fazdır. Ayrıca C₈ ve daha kısa alkil zincirleri, sikloheksil ve fenil bağlanmış sabit fazlar da kullanılmaktadır. Ters faz kromatografisinde hareketli fazlar genellikle su veya sulu tampon çözeltileri ile suyla karışabilen organik çözücü karışımlarından oluşmaktadır.

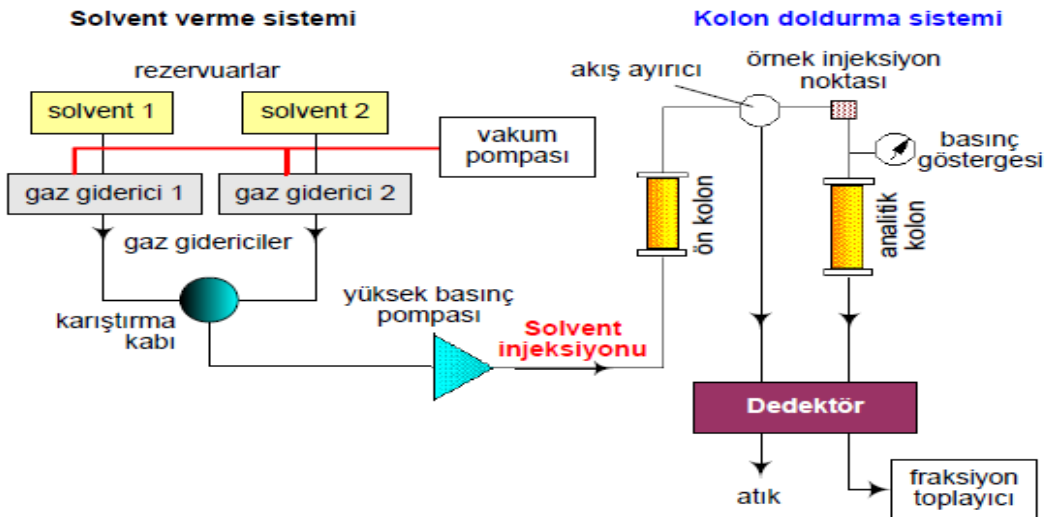
Normal faz sıvı kromatografisinde sabit faz polaritesi hareketli faz polaritesinden daha yüksektir. Sabit faz genellikle silika veya alümina, kullanılan hareketli fazlar ise hekzan, metilen klorür, kloroform, dietil eter ve bunların karışımıdır. Silika jelin üzerine kimyasal bağlarla -CN, -NO₂ veya -NH₂ gibi polar fonksiyonel gruplar bağlanarak farklı normal fazlar elde edilir. Normal faz ayırımlarında polaritesi yüksek olan maddeler, polar olan sabit faz ile daha fazla etkileşmekte, buna bağlı olarak kolonu daha geç terk etmektedir.

1.2.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography-HPLC)

Modern sıvı kromatografi sistemlerinde genel olarak kullanılan ve tanecik boyutu 2 ile 10 μm arasında olan dolgu maddeleri ile uygun sıvı akış hızları elde edebilmek için, yüzlerce atm'lik pompa basınçlarına gerek vardır. Bu yüksek basınçların bir sonucu olarak HPLC için gerekli donanım, diğer tip kromatografi sistemleri dikkate alındığında, daha ince işçilik gerektirir ve sonuçta daha pahalıdır. Şekil 5'de tipik bir yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazının çeşitli kısımları şematik olarak gösterilmiştir.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)'nin diğer kromatografi türlerinden üstünlükleri şunlardır:

1. HPLC kolonu, rejenerasyon olmaksızın pek çok kez kullanılabilir.
2. Bu teknik kullanıcının becerisine daha az bağımlıdır ve tekrarlanabilirlik daha yüksektir.
3. Nitel ve nicel analiz amaçları için kullanılabilir.
4. Analiz süresi oldukça kısadır.
5. Duyarlık çok yüksektir. 10,00 μg lık bir örnek bile, floresans veya elektron yakalama detektörleri kullanılarak tayin edilebilir.



Şekil 5. HPLC cihazı ve kısımları

1.2.1.1. Hareketli Faz Hazneleri ve Çözücü Sistemleri

Modern bir HPLC cihazı, bir veya daha çok cam veya paslanmaz çelikten yapılmış hazne içermektedir. Bu hazneler çoğu zaman, çözücü haznelerde bulunabilecek tozları ve kolonda ve detektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sebep olan çözünmüş gazların (genellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir cihazla donatılmıştır. Bu çözünmüş gazlar kolonda kabarcıklar oluşturarak pik genişlemesine; ayrıca, çoğu zaman gerek gaz kabarcıkları gerekse tozlar, detektörle girişim yaparak cihaz performansında azalmaya sebep olurlar. Çoğunlukla bu sistemler, çözücü içinde bulunabilecek toz ve partikül halindeki maddelerin pompaya veya enjeksiyon sistemine zarar vermemesi veya kolonu tıkamaması için, toz ve partikül maddeleri süzmeye yarayan bir süzme düzeneği de içerirler. Çözücüyü hazneye doldurmadan önce uygulanacak diğer bir yol, çözücüyü, vakum altında bir milipor süzgeçten süzmektedir. Bu uygulama, süspansiyon halindeki maddeleri uzaklaştırmanın yanı sıra gazları da giderir.

Sabit bileşimdeki tek bir çözücü kullanılarak yapılan bir ayırma izokratik elüsyon olarak adlandırılır. Polarlıkları birbirinden farklı iki (veya bazen daha fazla) çözücü sistemlerinin kullanıldığı tekniğe gradient elüsyon adı verilir. Bu teknikte iki çözücünün oranı önceden programlanmış olarak bazen sürekli bazen de kademeli bir şekilde değiştirilir. Elüsyon başladıktan sonra belli bir programa göre, bazen sürekli olarak, bazen de bir seri basamaklar şeklinde çözücülerin oranı değiştirilir. Modern HPLC cihazları, çözücülerin hacimsel oranı zamanla doğrusal olarak veya üstel olarak değiştirilebilecek şekilde, iki veya daha fazla hazneden aldığı çözücülerini bir karıştırma odasında sürekli olarak değişen oranlarda bir araya getiren sistemlerle donatılmıştır. İzokratik elüsyon ile ayrılamayan maddeler, gradient elüsyonla ayrılabilen, farklı kapasite faktörüne sahip madde karışımlarının alıkonma zamanları kısaltılabilmektedir.

1.2.1.2. Pompa

Bir HPLC sisteminde pompanın görevi hareketli fazın kolon boyunca akışını sağlamaktır. Sistemde kullanılan pompalar sabit hacim pompaları ve sabit basınç pompaları olmak üzere iki ana başlıkta toplanabilir. Çalışma farklılığına bağlı olarak ise; pistonlu pompalar, şırınga pompalar ve pnömatik pompalar olmak üzere üçe ayrılırlar.

1.2.1.3. Enjektör

HPLC analizlerinde ölçümlerin kesinliğini belirleyen faktör, numunenin kolon dolgu maddesine gönderilmesinin tekrarlanabilirliğidir. Aşırı numune yüklenmiş kolonlarda görülen bant genişlemesi de kesinliği etkiler. Bu yüzden kullanılan hacim çok küçük olmalıdır ve sistemin basıncını düşürmeden numunenin sisteme girişinin sağlanması gereklidir. Temel olarak, el ile (manüel) ve otomatik olmak üzere iki tip enjektör vardır.

1.2.1.4. Kolon

Sıvı kromatografi kolonları bir HPLC cihazının en önemli parçasıdır ve genellikle paslanmaz çelikten imal edilir. Pek çok üretici tarafından üretilen analitik kolonlar 2-5 mm iç çaplı, 5-30 cm boyundadır. Tanecik çapları ise 2-10 µm arasında değişmektedir. Bu tip kolonların 1 metresinde 40000-60000 kadar tabaka bulunur.

Son yıllarda uzunluğu 3-7,5 cm ve iç çapı 1-4,6 mm olan yüksek performanslı mikro kolonlar da imal edilmeye başlanmıştır. Bu kolonların dolgu maddelerinin parçacık boyutları 2-5 µm ve tabaka sayısı 10000 tabaka/m'ye kadar çıkmaktadır. Bu mikro kolonlar ile çok az miktarda çözücü ile hızlı bir şekilde ayırma yapabilmektedir. Sıvı kromatografisinde kullanılan çözücülerin saflıkları yüksek olmasından dolayı pahalıdır. Çözücüler kullanıldıktan sonra atıldığı için mikro kolon kullanımı çok önemli bir üstünlüktür. 15 saniye gibi çok kısa bir zamanda sekiz farklı madde birbirinden ayrılabilir. 15 saniye gibi çok kısa bir zamanda sekiz farklı madde birbirinden ayrılabilir.

Kolon dolgu maddeleri, film dolgular ve gözenekli dolgular olmak üzere iki tiptir. Film dolgular, gözenekli olmayan cam veya polimer taneciklerden oluşur. Yüzeylerine gözenekli yapıda silika, alümina veya iyon değiştirici reçineden oluşan ince bir gözenekli film kaplanmıştır. Gözenekli dolgular, silika, alümina ve iyon değiştirici reçineden yapılır. Sıvı kromatografisinde kullanılan en yaygın kolon dolgu maddeleri silisyum dioksittir. Mikrondan daha küçük boyutlardaki silisyum dioksit parçacıklarının aglomerasyonuyla, daha büyük ve yaklaşık aynı boyutlarda parçacıklar elde edilir. Hazırlanan, parçacıkların yüzeyi, genellikle bu yüzeye fiziksel veya kimyasal bağlarla bağlanmış ince bir organik filmle kaplanır. Silika temelli bağlı fazlar, yüzeyde bulunan silanol gruplarının organosilanlarla reaksiyonları sonucu elde edilir. En çok kullanılan, klorodimetilsilanların

yüzey silanol grupları ile reaksiyonudur. Ters faz sıvı kromatografisi için kullanılan çeşitli alkil ve substitüe alkil silikalar bu yolla elde edilir. Alümina parçacıkları, gözenekli polimer parçacıkları ve iyon değiştirici reğineler de dolgu maddesi olarak kullanılabilir. Anyonları ve katyonları tutan iyon reğinelerin dolgu maddesi olarak kullanılması halinde, numunede iyon halinde bulunan türler birbirinden ayrılır. İyonların bu reğinelere olan ilgilerine etki eden faktörler, iyonun yükü, iyonun büyüklüğü, pH, iyon şiddeti, kullanılan reğinelerin gözenek büyüklüğü, çözücü cinsi, çözücü derişimi ve çalışma sıcaklığıdır. Kullanılan iyon değiştirici reğineler doğrudan kolona doldurulabilen katı reğineler olabileceği gibi, bir katı yüzeyine kaplanmış sıvı reğineler de olabilir. Katyon değiştirici reğinelerin ortak özelliği, kuvvetli bir asit olan sülfonik asit grupları ile zayıf bir asit olan karboksilik asit gruplarını içermeleridir. Anyon değiştirici reğineler ise, kuvvetli baz olan kuaterner amin grupları ile zayıf baz olan primer amin grupları içerirler.

Sıvı kromatografisinde kolon verimliliği, bir bileşiğin kolondan geçişi sırasında meydana gelen bant genişliğinin derecesi tarafından etkilenir. Bant genişlemesi ve dolayısıyla kolon verimliliğinin kaybı, çözünen bileşenlerin kolondan aşağıya geçeri sırasında yer alan çok sayıda kütle-aktarım işlemlerinin sonucudur. Bu hızları etkileyen bazı değişkenler kontrol edilebilir ve ayırmalar için kullanılabilir.

1.2.1.5. Detektörler

Detektör yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde, cihazın en önemli kısımlarından birini oluşturur. Kolondan çıkan maddelerin derişimi kolon çıkışına yerleştirilen uygun bir detektör ile ölçülür. Detektör seğimi doğru ve hassas bir analiz yapabilmek için son derece önemlidir. Genellikle tek detektör sistemi kullanılmakla beraber, birden fazla detektör sisteminin yer aldığı cihazlar da mevcuttur. Bir detektörde bulunması gerekli önemli karakteristikler şunlardır;

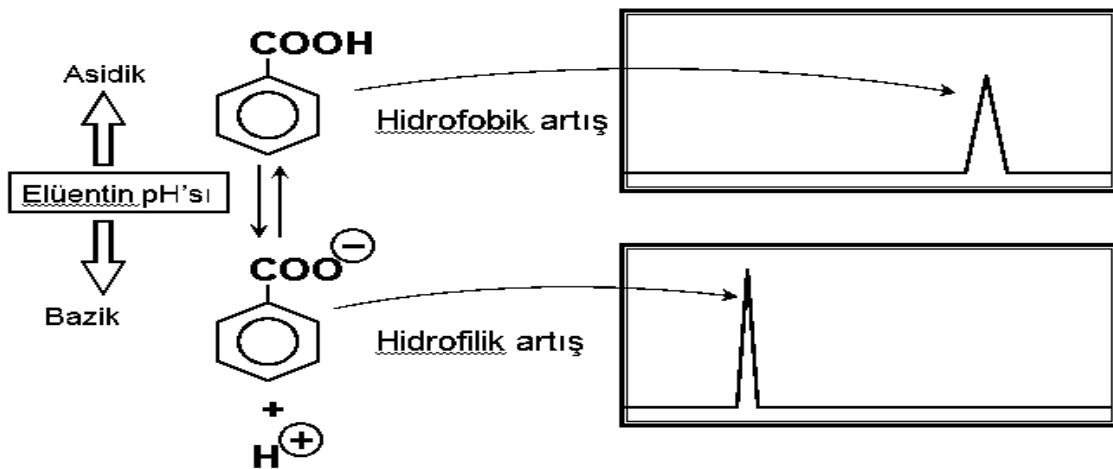
- a) İyi bir kararlılık ve tekrarlanabilirlik
- b) Yüksek güvenirlilik ve kullanım kolaylığı
- c) Kolon bant genişlemesini en aza indirmek için düşük ölü hacme
- d) Sıvı akışı ile uyumlu olmalıdır

1.2.1.6. Kaydedici

Mikroişlemciler ve bilgisayarların kullanıldığı sistemlerde hareketli faz akış hızı, enjektör, kolon fırını, örnek alma sistemi, detektör ve veri kaydı sistemi merkezi bir veri kayıt cihazı ile kontrol edilmektedir. Mikroişlemciler ve bilgisayarların kullanılması kromatografik sistemde tekrarlanabilirliği arttırmakta, sistem validasyon parametrelerinde daha doğru değerler elde edilmesine olanak sağlamaktadır.

1.2.2. İyonlaşma ve pH

İyonlaşan analitlerin alıkonması iyonlaşma derecesine bağlıdır. Ters faz sıvı kromatografide, analitin iyonlaşmamış türü, iyonlaşmış türünden daha yüksek alıkonma zamanına sahiptir. Eğer analit birden fazla iyonlaşma basamağına sahipse; daha yüksek iyonlaşma derecesi basamağında, daha düşük alıkonma zamanı gösterir. Analitin iyonlaşma derecesi, çözeltinin pH'sına ve iyonlaşma basamaklarındaki pK değerine bağlıdır. Ters faz sıvı kromatografide iyonlaşmış tür daima düşük alıkonma zamanına sahiptir. Bu yüzden, bazik türler için, asidik ortamda, asidik türler için ise bazik ortamda alıkonma en düşüktür. Diğer yandan, yüksek alıkonma zamanı analit nötral formdayken de gözlenir. Bu etki Şekil 6'da şematize edilmiştir. Şekilden anlaşıldığı üzere elüent pH'ının artması dengeyi benzoik asit lehine çevirir. Buda analitin polaritesinin azalmasına neden olarak analitin kolondaki apolar dolgu materyali ile daha fazla etkileşmesine neden olarak kolonda daha fazla tutunmuş ve dolayısıyla kolonu daha geç terk etmiştir.



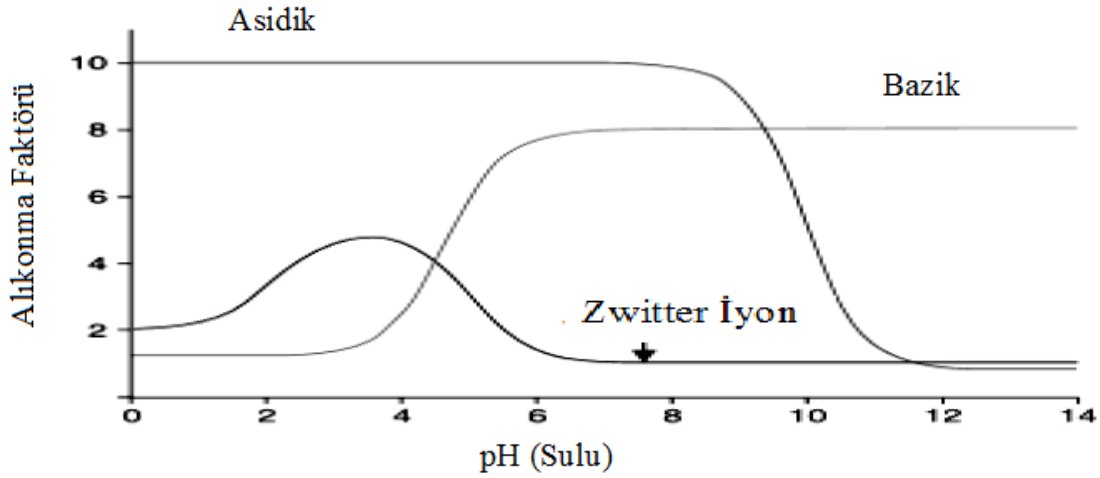
Şekil 6. pH'in ve iyonik türlerin alıkonma faktörü üzerine etkisi

1.2.3. Ters Faz Sıvı Kromatografide pH ve Seçicilik

Ters faz sıvı kromatografi metoduyla analizi yapılan maddelerin çoğu, karboksilik asit, sülfonik asit veya amino grupları gibi, iyonlaşabilen gruplara sahiptir. Maddelerin alıkonma zamanı, büyük ölçüde fonksiyonel grupların iyonlaşmasına bağlıdır. Aynı analitin iyonlaşmış ve nötral şeklinin alıkonma zamanı arasında yaklaşık 30 kat farklılık olabilmektedir. İyonlaşma derecesi mobil fazın pH'sıyla belirlenir. Eğer iyi bir kromatografik seçicilik ve tekrarlanabilir alıkonma isteniyorsa, iyonlaşma derecesini etkileyen faktörlerin çok dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi gerekir.

1.2.4. Mobil Faz ve pH

Şekil 7' de mobil faz pH'sı ile alıkonma süresi arasındaki değişim gösterilmektedir. Tekrarlanabilir pH değerleri için tampon çözeltiler tercihli olarak kullanılmaktadır.



Şekil 7. Mobil faz pH'sı ile asidik, bazik ve zwitter türlerin alıkonma faktörlerinin değişimi

HPLC de kullanılan tamponların literatürlerde verilen pK değerleri, çoğunlukla sudaki değerlerdir. Ters faz sıvı kromatografisinde analiz edilmek istenen analitlerin pK değerleri ve ortamın pH'ı, organik çözücü ilave edilmesi ile değişir. Genellikle organik çözücü ilavesiyle asitlerin pK değerleri artarken, bazların azalır. Yalnız unutulmamalıdır ki tampon kapasitesi, ortama ilave edilen organik çözücü ile değişmez. Bu yüzden etkin bir ayırım için tampon kapasitesi yüksek bir tampon ve derişim aralığı seçmek önemlidir.

Çeşitli tamponların metanol-su ve asetonitril-su ikili karışımlarında pK değerlerinin değişimi incelendiğinde asitlerden oluşan tamponların pK değerlerinin organik çözücü artışı ile arttığı görülmüştür. Bazlardan oluşan tamponların pK değerleri ise geniş bir çözücü derişimi aralığında asidik bölgeye kaymaktadır. Organik çözücü ilavesi asitlerin ve bazların zayıflamasına neden olmaktadır (Şanlı, 2007).

1.2.5. Sıvı Kromatografide Mobil Faz Optimizasyonu

Sıvı kromatografik bir yöntemin geliştirilmesinde üzerinde durulacak en önemli husus, yeterli ayırmaya ulaşıldığının belirlenmesidir. Yüksek performans sıvı kromatografide ayırmanın optimizasyonu, seçiciliğin maksimum hale getirilmesini gerektirir. Kromatografik sistemin seçiciliği, kromatografik sistemde çözünen, mobil faz bileşenleri ve durgun faz arasındaki bütün etkileşimleri yansıtır. Bu etkileşimler, sıcaklık, mobil fazın yapısı, mobil faz pH'sı gibi deneysel koşulların değiştirilmesiyle yönetilebilir. Bu faktörlerin ikisi sabit tutularak diğer değişkenin, analitin alıkonmasındaki etkisi incelenir. Seçicilik, çözünenlerin dağılma katsayıları ile ilgilidir ve çözünenlerin kapasite faktörlerinin bir fonksiyonudur. Bu nedenle çözünenlerin alıkonma davranışlarını ve onların deneysel koşullara bağımlılığını anlamak, seçiciliğin ve devamında ayırmanın optimizasyonu için gereklidir.

Mobil fazın bileşimi, ters faz sıvı kromatografide bileşiklerin alıkonmalarında en önemli rolü oynar (Dolan ve ark., 1979; Barwick, 1997). Mobil faz olarak kullanılan su-organik çözücü karışımlarında polarite, mobil fazın bileşikleri elüe etme gücünün bir ölçüsüdür ve çözünenin kolon ile etkileşimini belirleyen temel faktördür. Ters faz HPLC'de alıkonma, mobil fazın polaritesinin artmasıyla yani su ilavesiyle artar. Bu güç çoğu kez organik çözücü-su karışımlarında organik fazın yüzdesi ile ifade edilir.

1.2.6. Mobil Fazda pH Standardizasyonu

Kromatografik ayırmada mobil faz pH'sı, iyonlaşabilen bileşiklerin ayrılmasında önemli bir faktördür. Sıvı kromatografide kullanılan mobil fazların pH'sı, önceleri sulu çözeltinin pH'sı olarak alınmıştır. Oysa HPLC çalışmalarında su hiçbir şekilde tek başına mobil faz olarak kullanılamaz. Tampon çözelti halinde veya bir organik modifiyer ile

birlikte kullanılır. Bundan dolayı organik modifiyer ilavesi ile pH değişimini göz önüne almak gerekir (Roses ve ark., 1996; Augiar de ve ark., 1997). RP-HPLC mobil fazında organik modifiyer olarak genellikle asetonitril ve metanol tercih edilir. Sulu faz pH'sının ölçümü çok daha kolaydır, ancak su organik çözücü karışımında elektrolitin iyonlaşması seçimli solvasyona çok bağımlıdır ve çözüneneye göre değişir. Bu nedenle HPLC mobil fazına ve su ortamına ait pKa değerleri farklıdır (Bosch ve ark., 1998). Organik çözücü-su karışımlarında ortamın dielektrik sabitinin azalması nedeniyle aktivite katsayıları dikkate alınmaktadır. pH'nın sudaki pH yerine mobil fazdaki değerinin kullanılması, çözünenin tutulması ile pH arasındaki ilişkiye çok daha iyi uyum göstermektedir.

1.3 Çalışmanın Amacı

Gıda boyalarının analiz sırasında numune pH'larının 3,00 ayarlanması, boyaların çözeltilerden alınması için absorbet (poliamid) ilavesi, absorbentlerin yıkanması ve filtrelenmesi, boyaların %25'lik NH₃ ile absorbentten alınması, çözeltilerin kurutulması ve mobil faz ile çözme işlemleri gibi zaman alıcı karmaşık işlemler ile numuneler analiz edilmektedir. Bu çalışmanın amacı Tartrazin, Kinolin Sarısı, Sunset Sarısı ile Allura Kırmızısı'nın aynı anda, karmaşık ve zaman alıcı olmayan, yüksek kesinlik ve doğrulukta rutin olarak kullanılabilen bir analiz metodu geliştirmektir.

2. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Cihazlar ve Diğer malzemeler

- HPLC Agilent 1100 Series, Degasser Agilent 1260 series ile değiştirilmiş, UV detektörü ile donatılmış sistem
- Kolon: Zorbax Eclipse^R XDB-C8 Analytical, 4,6x150 mm 5 mikron Agilent
- Ultra Sonik Banyo (İsolab Laborgerate GmbH)
- pH metre (EUTECH pH 510)
- Ultra Saf Su Cihazı (Sartorius Stedim Arium Pro UV)
- Wortex (Heidolph)
- Hassas terazi 0,1 mg duyarlıkta (Sartorius)
- Otomatik pipet (10-100-1000µL'lik) (Nichiryo)
- 0,45 µm lik tek kullanımlık filtreler (Sartorius)
- Adi filtre kağıdı

2.2. Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltilerin Hazırlanması

- Gıda Boyaları: Tartrazine, Sunset Sarısı, Kinolin Sarısı, Allura Kırmızısı (Sigma Aldrich)
- Katı NaOH (Merck) ve Amonyum asetat (GPR-Rectapor)
- 1000'er mg/L lik Tartrazine, Sunset Sarısı, Kinolin Sarısı ve Allura Kırmızısı çözeltisi
- Hareketli faz A: %1'(a/h) lik amonyum asetat çözeltisi pH 7,5
- Hareketli faz B: HPLC saflıkta Asetonitril (Merck)
- Hareketli Faz C: HPLC saflıkta Metanol (J.T.Baker)
- %10 (a/h)'luk NaOH çözeltisi
- Ultra saf su

%10 (a/h) NaOH: 10,00 gram NaOH dikkatli bir şekilde tartılarak 100 mL'lik bir balon jöjeye aktarıldı, bir miktar ultra saf su ile çözündürüldü ve daha sonra 100 mL'lik

çizgisine kadar ultra saf su ile tamamlandı. Kullanılmak üzere buzdolabında muhafaza edildi.

pH'ı 7,50 %1 (a/h) Amonyum asetat çözeltisi: 10,00 g amonyum asetat dikkatli bir şekilde tartıldı. Daha sonra 1,00 L'lik behere aktarıldı. Bir miktar su ile çözündürülerek yaklaşık 950 mL'ye seyreltildi ve kalibre edilmiş bir pH metre ile pH=7,50 oluncaya kadar bir pastör pipeti yardımıyla daha önceden hazırlanan ve muhafaza edilen %10 (a/h) NaOH çözeltisiyle titre edildi. Çözelti 1,00 L balona aktarıldı ve son hacim çizgisine kadar ultra saf su ile tamamlandı.

1000'er mg/L'lik Stok çözeltileri: 25,00 mL 1000,00 mg/L olacak şekilde hesaplanan ve tartılan boyalar 25 mL'lik balonlara aktarıldı ve son hacim çizgisine kadar ultra saf su ile tamamlandı. Daha sonra kullanılmak üzere buzdolabında muhafaza edildi.

Kalibrasyon Serisi: 1,00-2,50-5,00-10,00-25,00-50,00 mg/L lik çözeltiler stok çözeltilerden uygun miktarda alınıp seyreltilerek hazırlandı ve cihaza verilmek üzere viallere alındı.

2.3. Numunelerin Hazırlanması

Jelibon: 10,00 g hassas bir şekilde tartılarak temiz bir behere aktarıldı. Daha sonra üzerine 70-75 mL kadar ultra saf su ilave edildi ve 25°C'de ultrasonik banyoda 25 dk. bekletilerek tamamen çözünmesi sağlandı ve 100 mL'lik temiz balona aktarılarak hacim çizgisine kadar ultra saf su ile dolduruldu. Son olarak 0,45 µm lik filtrelerden geçirilerek viallere alındı.

Şekerler: 20,00 g hassas bir şekilde tartıldı ve temiz bir behere aktarıldı ardından bir miktar ultra saf su (70-75 mL) ilave edilerek 25°C ultrasonik banyoda tamamen çözününceye kadar bekletildi. Çözünme işlemi sonrasında 100 mL'lik balona aktarıldı ve balon hacim çizgisine kadar ultra saf su ile dolduruldu. Elde edilen çözelti 0,45µm'lik filtrelerden geçirilerek viallere alındı.

Misket sakızlar: Sakızların sadece dış yüzeyi boyayı ihtiva ettiği için sakızların parçalanarak belli bir miktarda alınması tüm örneği temsil etmeyebilir. Bu nedenle sarı sakızlardan 2 adet 19,47 g, turuncu sakızlardan 2 adet 18,76 g ve kırmızı sakızlardan 2 adet 19,44 tartıldı. Daha sonra bu sakızlar temiz bir beher içerisine alındı ve üzerlerine 100 mL

ultra saf su ilavesi yapıldı. Bir süre karıştırma işlemi ile boyanın sıvı faza alınması sağlandı. Elde edilen ekstrakt 0,45 µm'lik filtrelerden geçirilerek viallere alındı. Gramajlar seyreltme faktörü hesaplanırken dikkate alındı.

Su Buzu: Yenilebilir buzlu ürünlerin bir çeşidi olarak piyasada çeşitli markalar altında dondurularak satılan ürünlerden satın alındı. Çözündürme işlemiyle birlikte sıvı hale getirildi ve ardından 1/2 oranında seyreltildi. Son olarak 0,45µm'lik filtrelerden geçirilerek viallere alındı.

Trabzon Kurabiyesi: Kurabiyeler içerdiği yüksek miktarda boya nedeniyle diğer ürünlere göre daha fazla seyreltme işlemine alındı. 4,00 g öğütülerek ve ince toz haline getirilen kurabiye hassas bir şekilde tartılarak temiz bir behere alındı ve üzerine 100,00 mL ultra saf su ilave edilerek 25°C'de 25 dk. boyunca ultra sonik banyoda bekletilerek boyanın sıvı faza geçmesi sağlandı. Sıvı faz adi filtre kağıdın dan süzüldü ve sonra 0,45µm'lik filtrelerden geçirilerek viallere alındı.

Limonata: Çözünmüş gazların giderilmesi için bir süre ultra sonik banyoda bekletildi ardından 0,45 µm'lik filtrelerden geçirilerek viallere alındı.

2.4. RP-HPLC-UV Koşullar

RP-HPLC-UV analizlerinde Agilent marka 1100 seri cihazı kullanıldı. Ancak bu cihazın degazer kısmı arızalı olduğundan degazer kısmı Agilent 1260 series satın alındı ve teknik elemanlarca montajı yaptırıldı. Cihaz, Chemstation programı ile kontrol edildi. Tüm analizler için C₈ kolon (Zorbax Eclipse^R XDB-C8 Analytical, 4,6x150 mm 5 micron Agilent) kullanıldı. Hareketli faz olarak A %10'luk NaOH ile pH'ı 7,50'e ayarlanmış olan %1 (a/h) amonyum asetat çözeltisi, B ise HPLC saflıkta asetonitril, C ise HPLC saflıkta metanol kullanıldı. Enjeksiyon hacmi 20,00 µL, akış hızı 1,00 mL/dk. ve oda sıcaklığında çalışıldı. Cihaz ölçüm yapılmadan önce kolon hareketli faz A ile yaklaşık 1 saat koşullandırıldı. Ölçüm hareketli faz A ile başlatılarak kolonda numuneden gelen ve kolonda tutulmayan türlerin hızlı bir şekilde yıkanması amaçlandı ve son 2 dk. yine hareketli faz A ile yapılarak bir sonraki ölçüme kolonun hazırlanması amaçlandı.

Ana stok çözeltilerinden ayrı ayrı 10,00'ar mg/L'lik boya çözeltileri hazırlandı ve cihazda ölçüm alınmaya başlandı. Alınan kromatogramlar üst üste çakıştırıldığı zaman

başlangıçta bazı piklerin aynı alıkonma zamanına ya da örtüşmenin meydana geldiği kromotogramlar elde edildi. Ayrıca elüsyon süresinin çok uzun olduğu gözlemlendi. Elüent sıvısının bileşimi deneme yanılma yapılarak organik çözücünün hareketli fazdaki bileşimi artırılarak uygun bileşimde mobil faza dönüştürülmesiyle kısa sürede, tipik gauss eğrisine benzeyen oldukça dar bantlar ve yüksek ayırma gücüne ulaşıldı. Boyar maddelerden kinolin Sarısı 3 adet pik verdiği görüldü. Bu pikler muhtemelen mono ya da di sülfü türevlerinden kaynaklandığı düşünüldü. Piklerin çakışma göstermediği (tam ayırımın gözlemlendiği) bulunan gradiyent program Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4. Uygulanan gradiyent program

Zaman (dak)	A-Tampon	B-Asetonitril	C-Methanol
0 - 12	%100	-----	-----
12 -17,6	%52,5	%9,5	%38
17,6 - 21	-----	%20	%80
21 - 23	%100	-----	-----

Detektör Tablo 5'de ölçüm alacak şekilde ayarlandı. Tabloya göre, zamanla hangi dalga boyunda ölçüm alınacağı belirlendi. Burada bulunan dalga boyları ilgili boyaların maksimum absorpsiyon yaptıkları dalga boylarıdır. Maksimum dalga boyları literatür taraması sonucu elde edilen maksimum dalga boylarıdır.

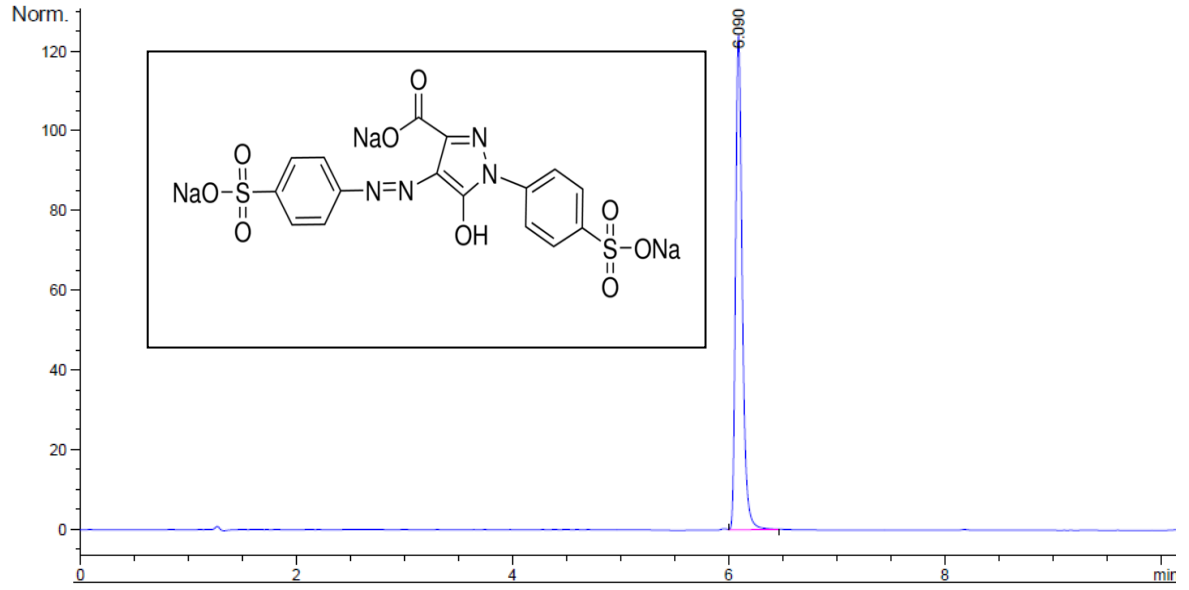
Tablo 5. Detektör zaman tablosu ve boyalar için Max. absorpsiyon dalga boyu

Boya	Zaman (dak)	Max. Dalga boyu (nm)
Tartazin	0 - 7	427
Kinolin Sarısı	7 - 9,5	417
Sunset Sarısı	9,5 - 10, 5	482
Allura Kırmızısı	10,5 - 12	507
Kinolin Sarısı	12 - 23	417

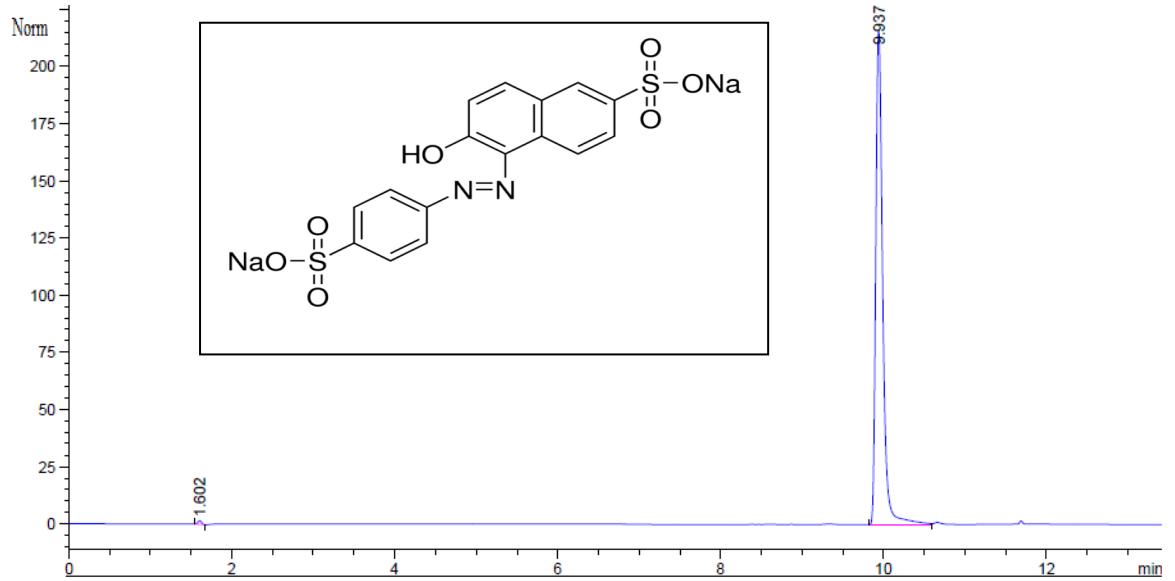
3. BULGULAR

3.1. Her Bir Tür İçin Gradyent Programın Uygulanması

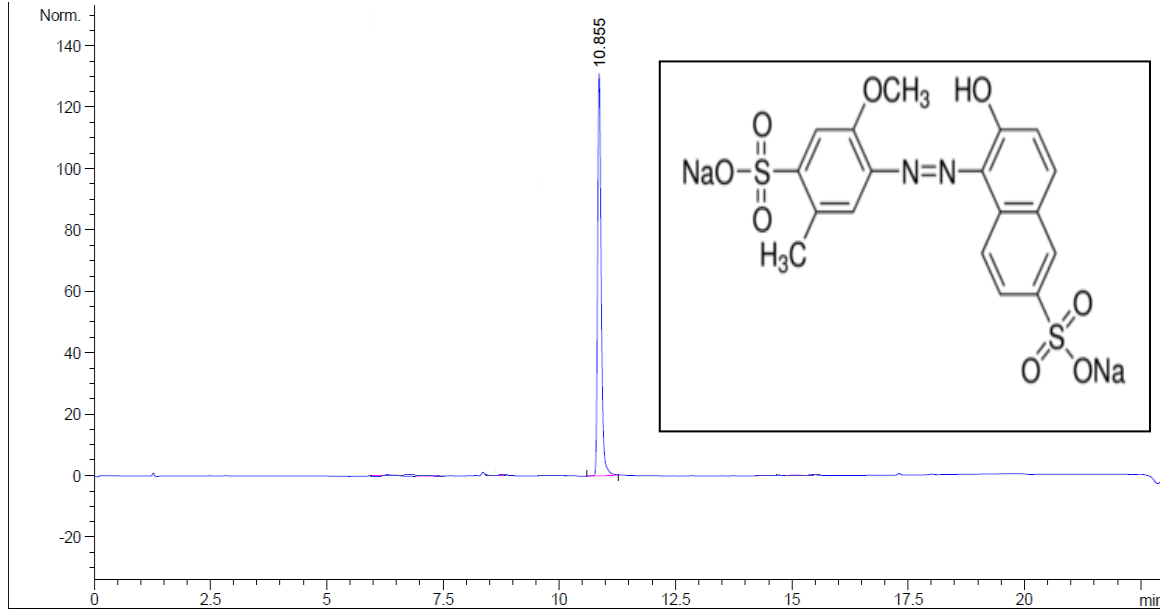
10,00'ar mg/L'lik boyaların daha önce belirtilen koşullar içerisinde gerçekleştirilen elüsyon işleminden sonra elde edilen her bir türe ait kromatogram aşağıda verilmiştir.



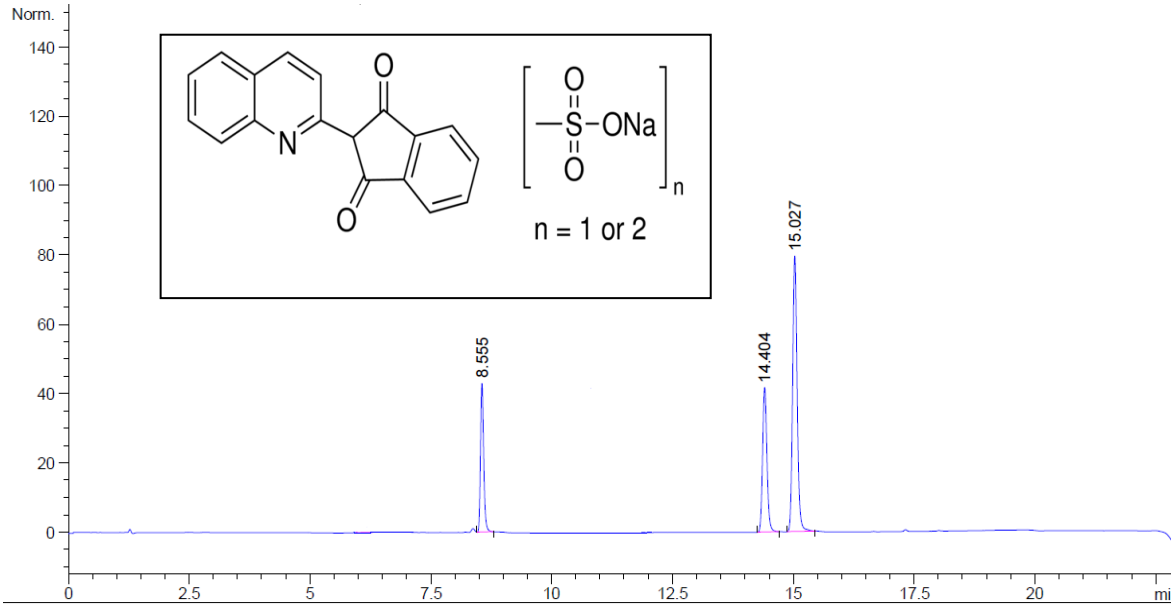
Şekil 8. 10,00 mg/L standart Tartrazin (E 102) çözeltisine ait kromatogram



Şekil 9. 10,00 mg/L standart Sunset Sarısı (E 110) çözeltisine ait kromatogram



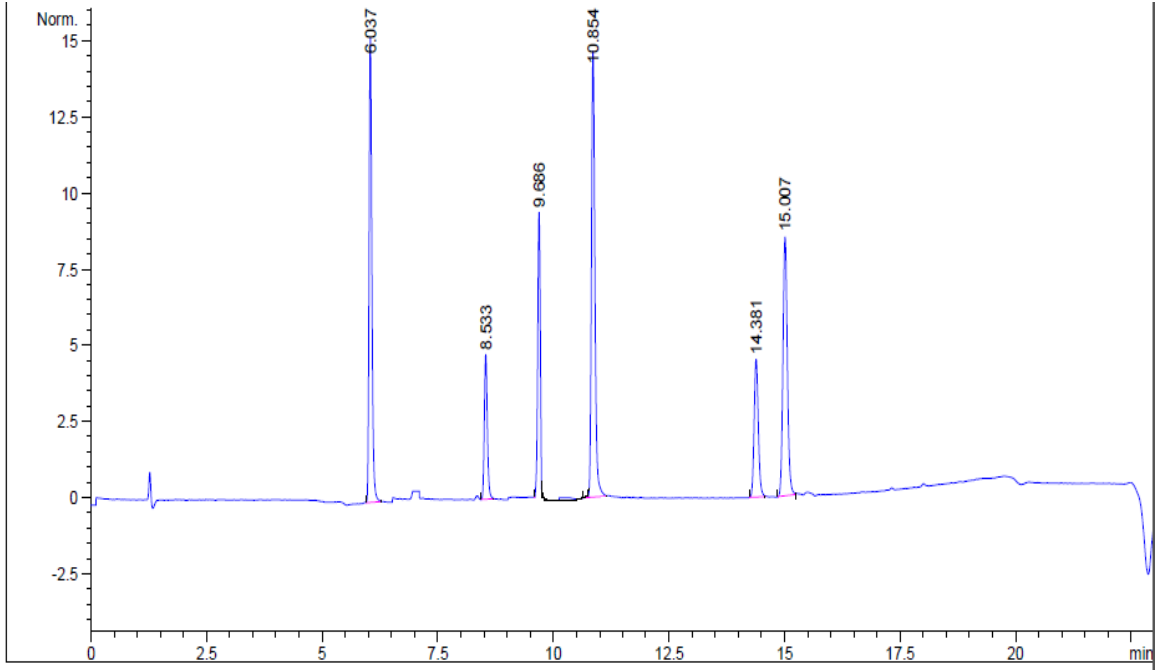
Şekil 10. 10,00 mg/L standart Allura Kırmızısı (E 129) boya çözeltisi



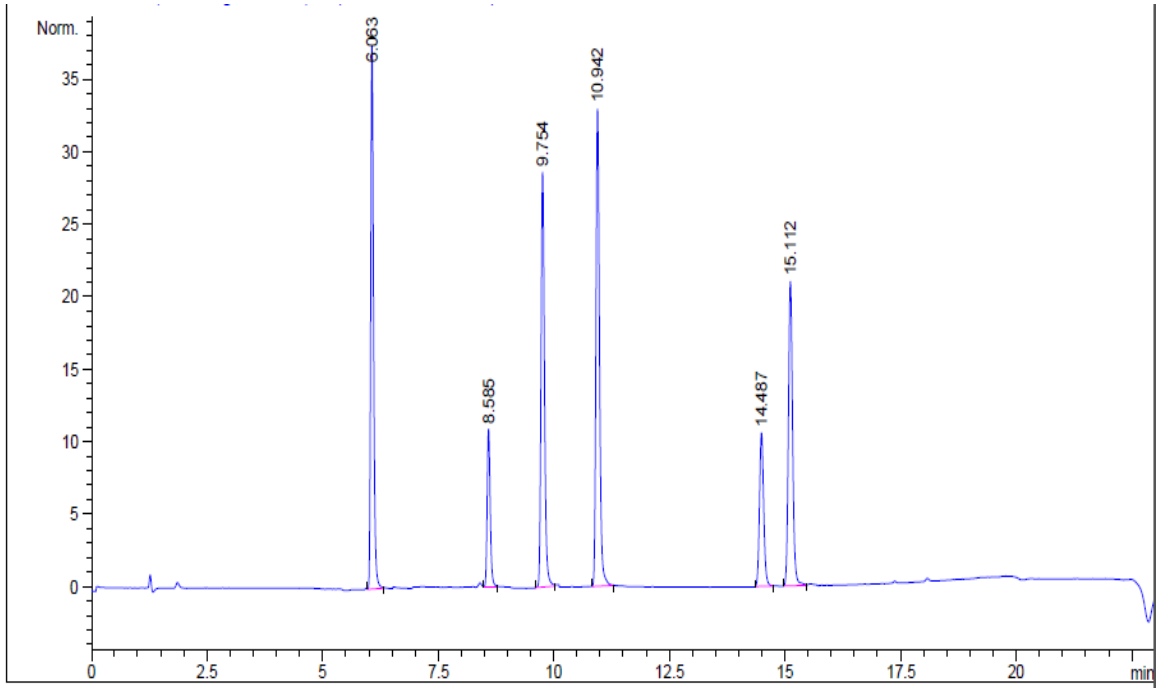
Şekil 11. 10,00 mg/L standart Kinolin Sarısı (E 104) çözeltisine ait kromotogram

3.2. Kalibrasyon Eğrileri İçin Kromotogramların Eldesi

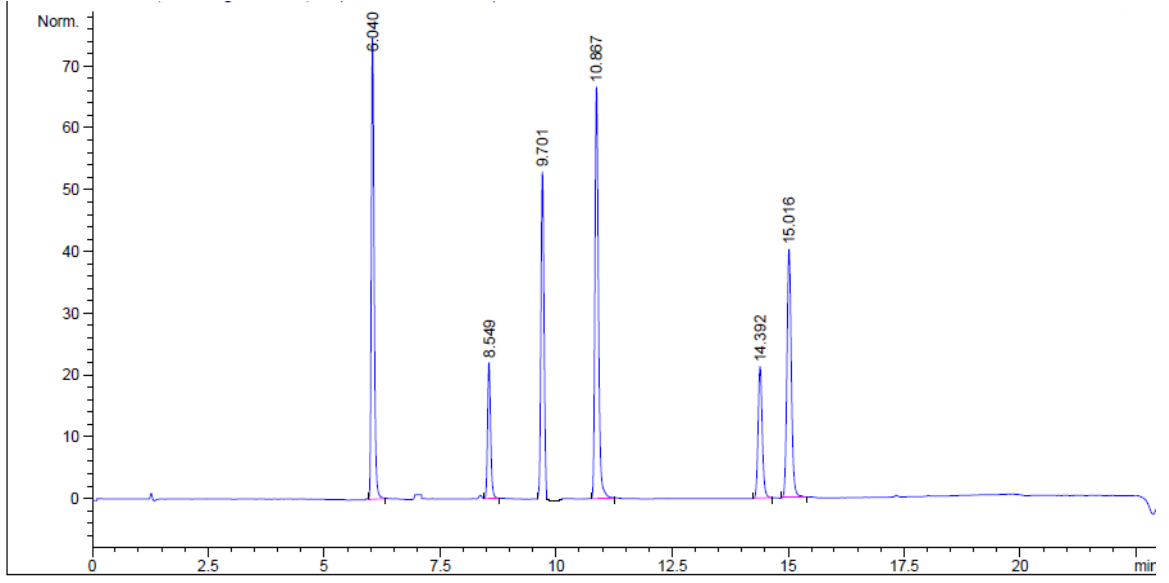
Kalibrasyon eğrisi için 1000,00 mg/L'lik Stok çözeltilerden 1,00-2,50-5,00-10,00-25,00-50,00 mg/L'lik boya karışımları hazırlandı. Bu karışımlara ait kromotogramlar aşağıda sırasıyla verildi.



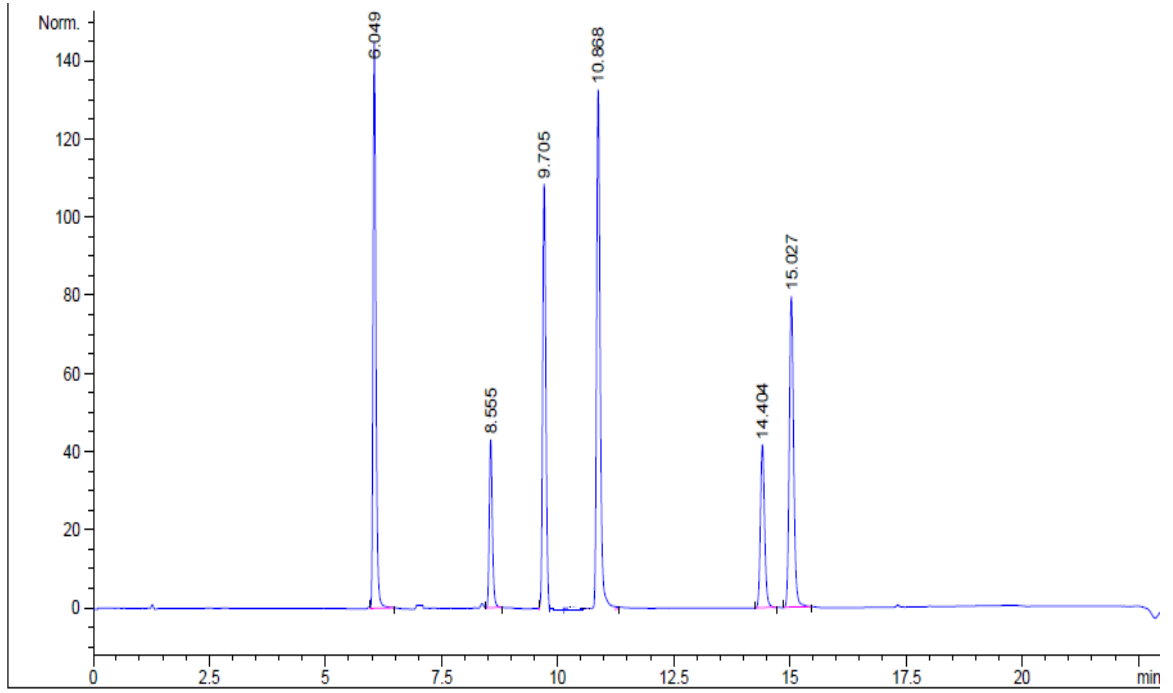
Şekil 12. 1,00'er mg/L boya karışımına ait kromotogram



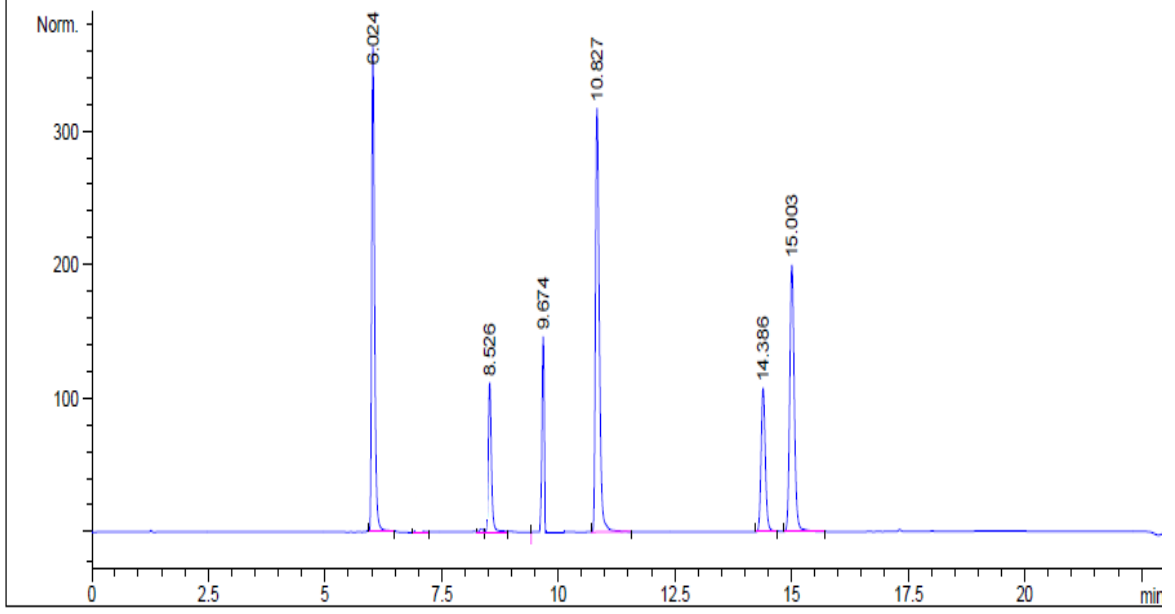
Şekil 13. 2.50'şer mg/L boya karışımına ait kromotogram



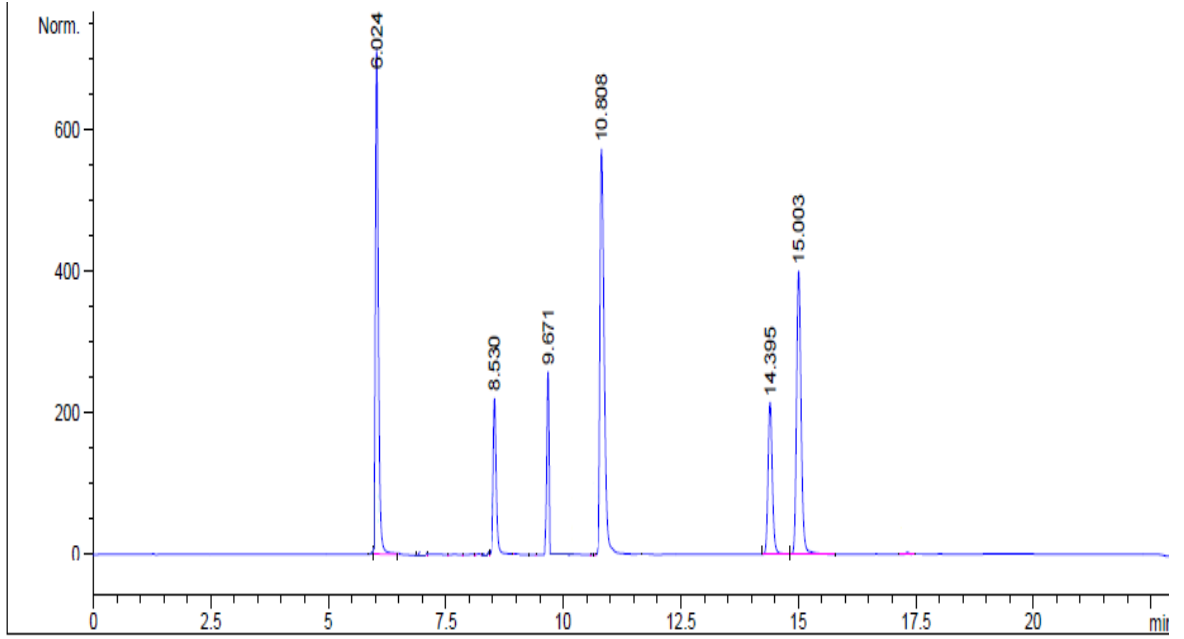
Şekil 14. 5,00'er mg/L boya karışımına ait kromotogram



Şekil 15. 10,00'ar mg/L boya karışımına ait kromotogram



Şekil 16. 25,00'er mg/L boya karışımına ait kromatogram



Şekil 17. 50,00'er mg/L boya karışımına ait kromatogram

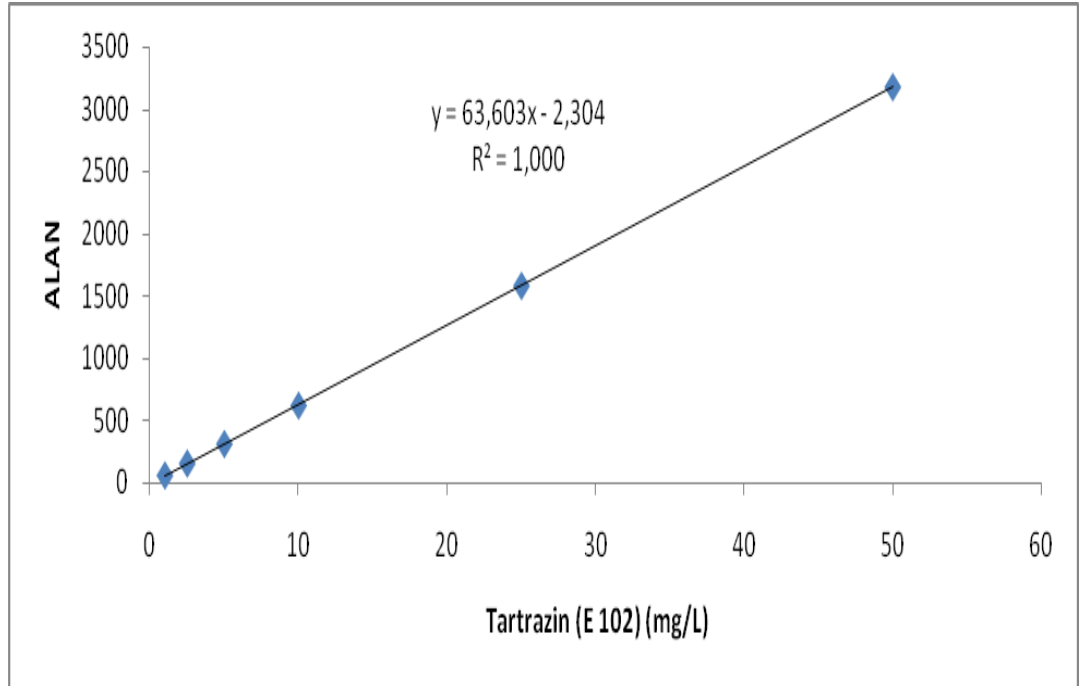
Tablo 6'da gıda boyaları için uygulanan gradient programla elde edilen alıkonma süreleri ve tayin için ölçüm yapılan dalga boyları verildi.

Tablo 6. Alıkonma süreleri ve tayinin yapıldığı maksimum dalga boyları

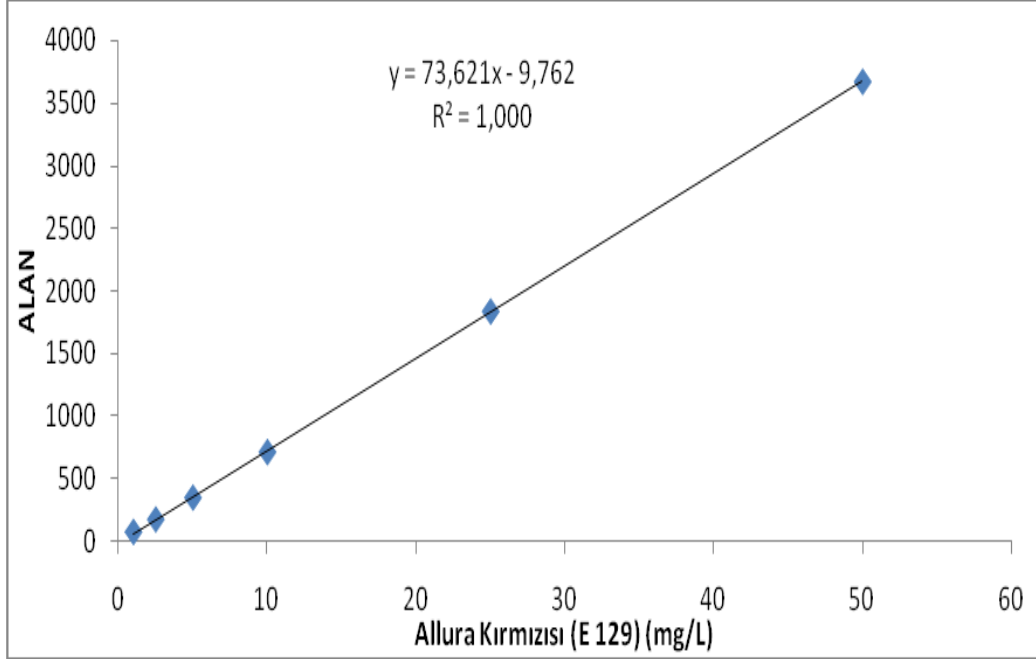
	Tartrazin	Kinolin Sarı I	Sunset Sarı I	Allura Kırmızı I	Kinolin Sarı II	Kinolin Sarı III
Alıkonma Süresi (dk)	6,1±0,1	8,7±0,1	9,9±0,1	10,9±0,1	14,6±0,1	15,1±0,1
Mak. Dalga Boyu (nm)	427 nm	417nm	482nm	507 nm	417 nm	417 nm

3.3. Kalibrasyon Eğrilerin Çizilmesi

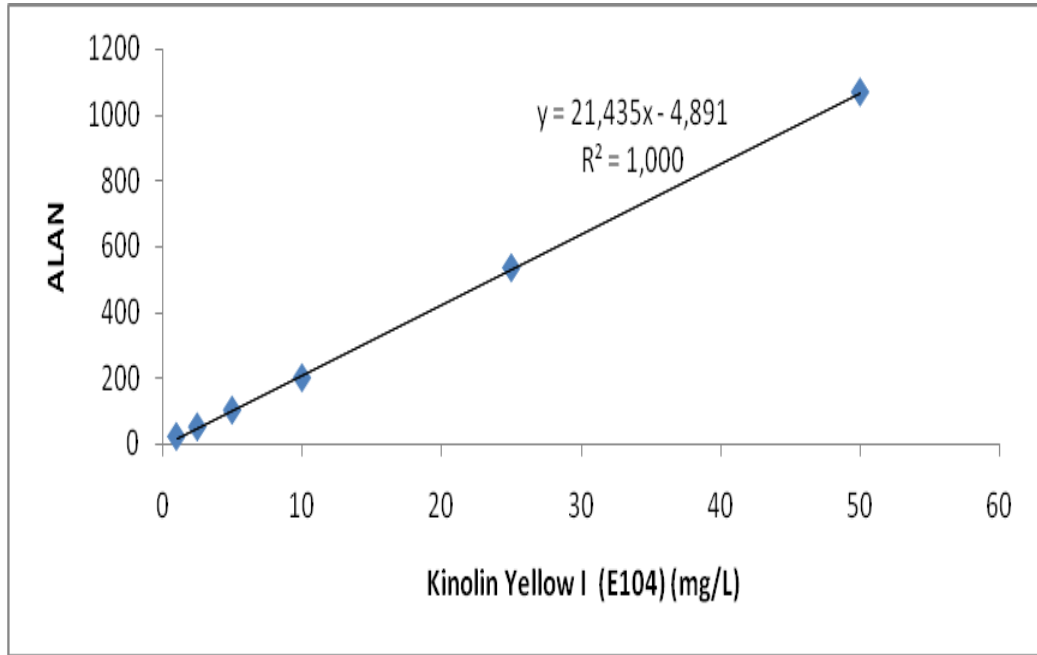
Pik alanları bant genişleme etkilerinden bağımsızdır. Bu nedenle kalibrasyon eğrileri çizilirken pik yükseklikleri yerine pik alanları kullanılmıştır. Modern kromatografi cihazlarının çoğunda olduğu gibi analizlerin gerçekleştirildiği cihazda da pik alanlarının kesin olarak hesaplanmasını sağlayan veri işleme yazılımı bulunmaktadır. Bu yazılım sayesinde pikler altında kalan alan integrasyon işlemi ile hesaplanmıştır. Aşağıda boya karışımlarından elde edilen alanlar ve bu alanların kullanılmasıyla çizilen kalibrasyon eğrileri verildi. Eğrilerin çizilmesinde Excel programı kullanıldı.



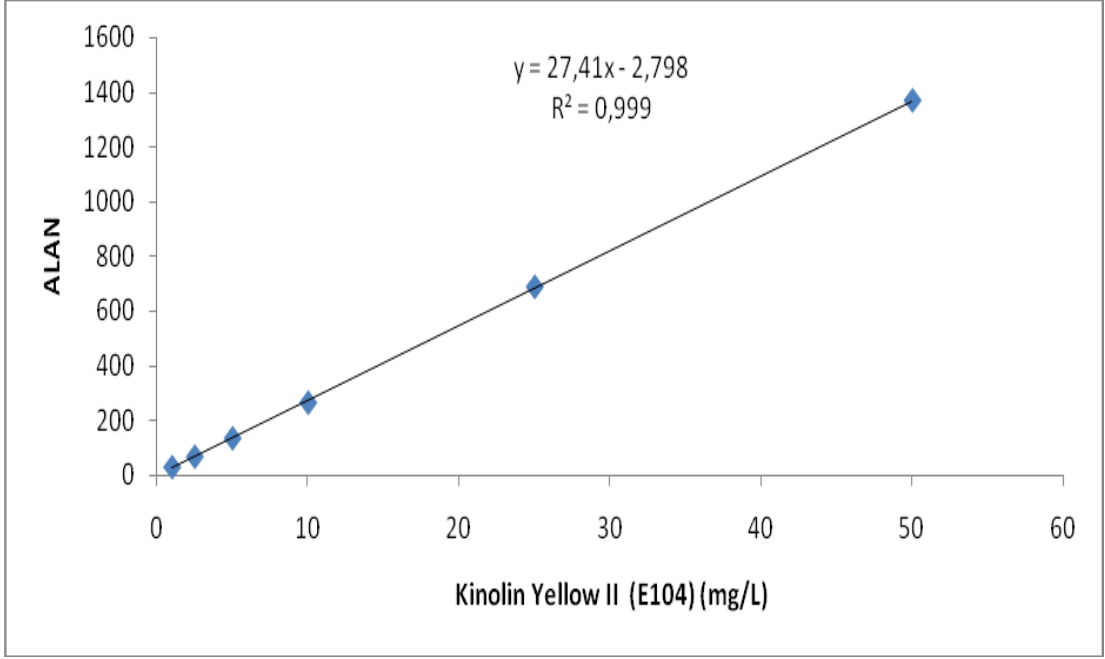
Şekil 18. Tartrazin (E 102)'e ait kalibrasyon eğrisi



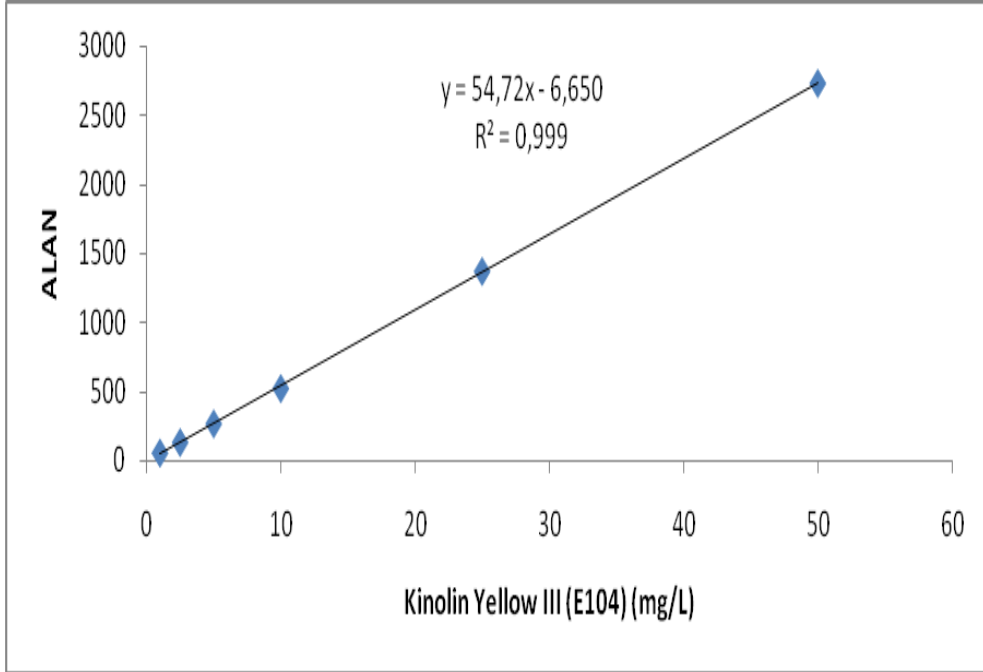
Şekil 19. Allura Kırmızısı (E 129)'na ait kalibrasyon eğrisi



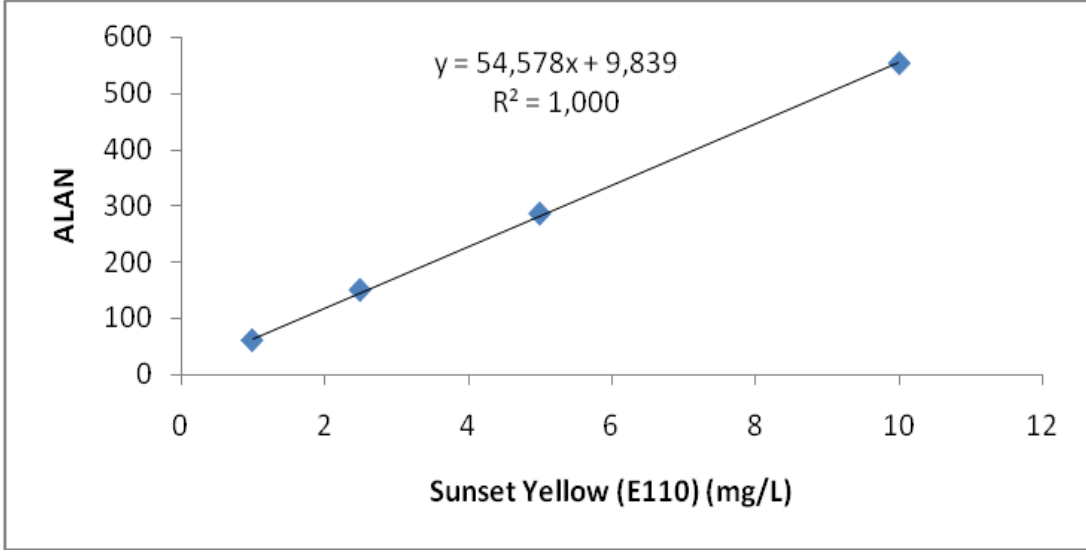
Şekil 20. Kinolin Sarısı I (E104)'e ait kalibrasyon eğrisi



Şekil 21. Kinolin Sarısı II (E104) 'ye ait kalibrasyon eğrisi



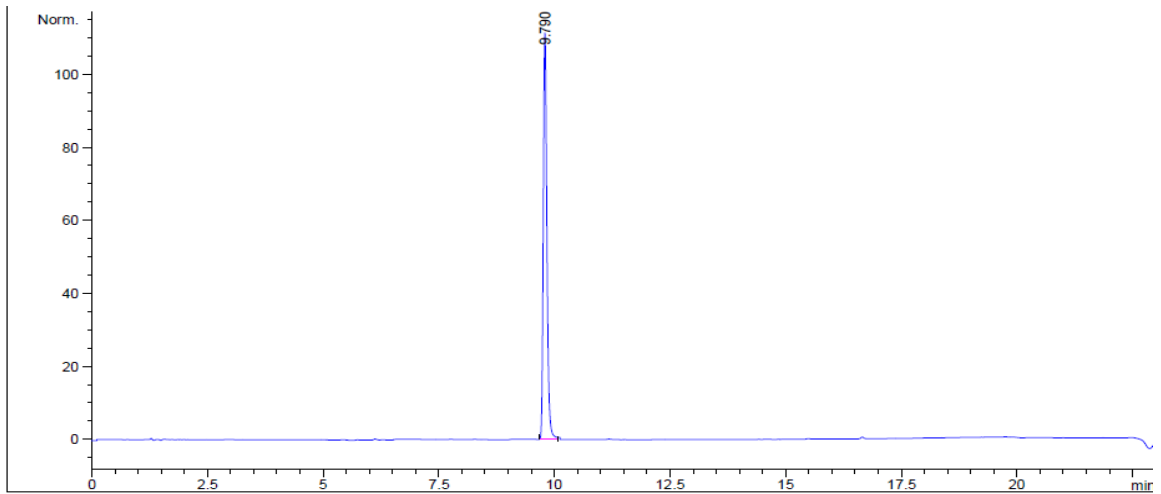
Şekil 22. Kinolin Sarısı (E 104) III'e ait Kalibrasyon eğrisi



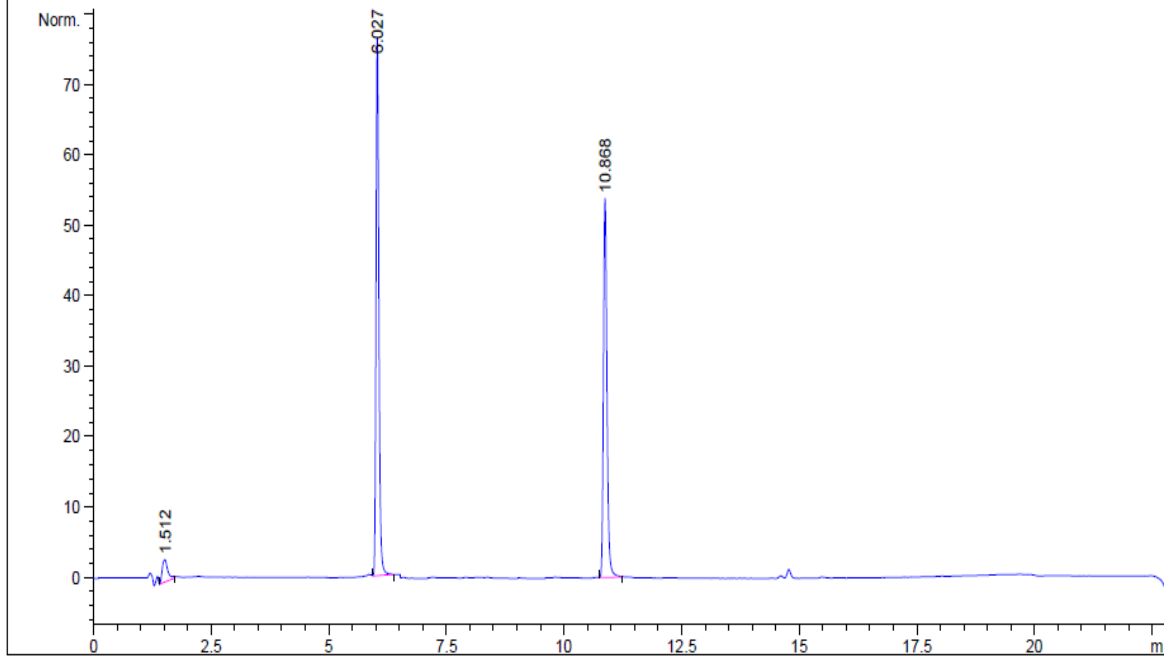
Şekil 23. Sunset Sarısı (E 110)'na ait kalibrasyon eğrisi

3.4. Numunelerin Analizi

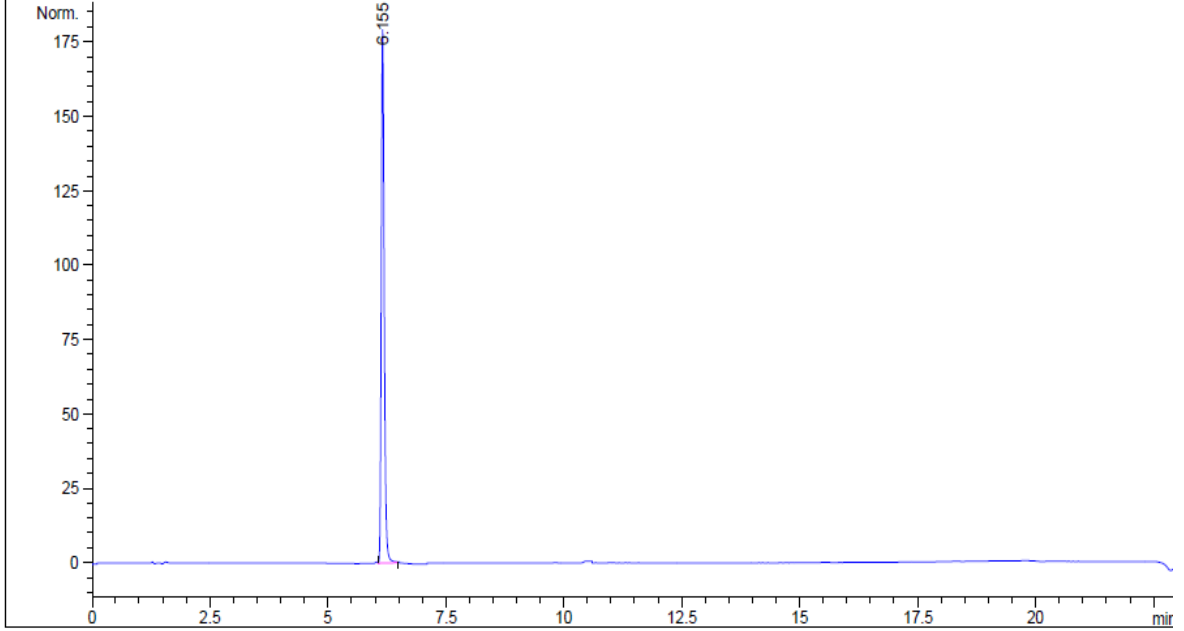
Numune hazırlama kısmında bahsedildiği gibi hazırlanan ve geliştirilen elüsyon şartlarında alınan ölçümlere ait kromotogramlar Şekil 24-33'de verilmiştir. Numunelerdeki analit miktarı kalibrasyon aralığına düşecek şekilde seyreltilmiş ve elde edilen sonuçlar seyreltme faktörü ile çarpılarak numune içerisindeki analit miktarı hesaplanmıştır. Burada eğri altında kalan alanlar ile kalibrasyon eğrisinden hesaplanan sonuçlar her kromotogramın altında verildi. Sonuçların özeti, sonuç ve tartışma kısmında verildi.



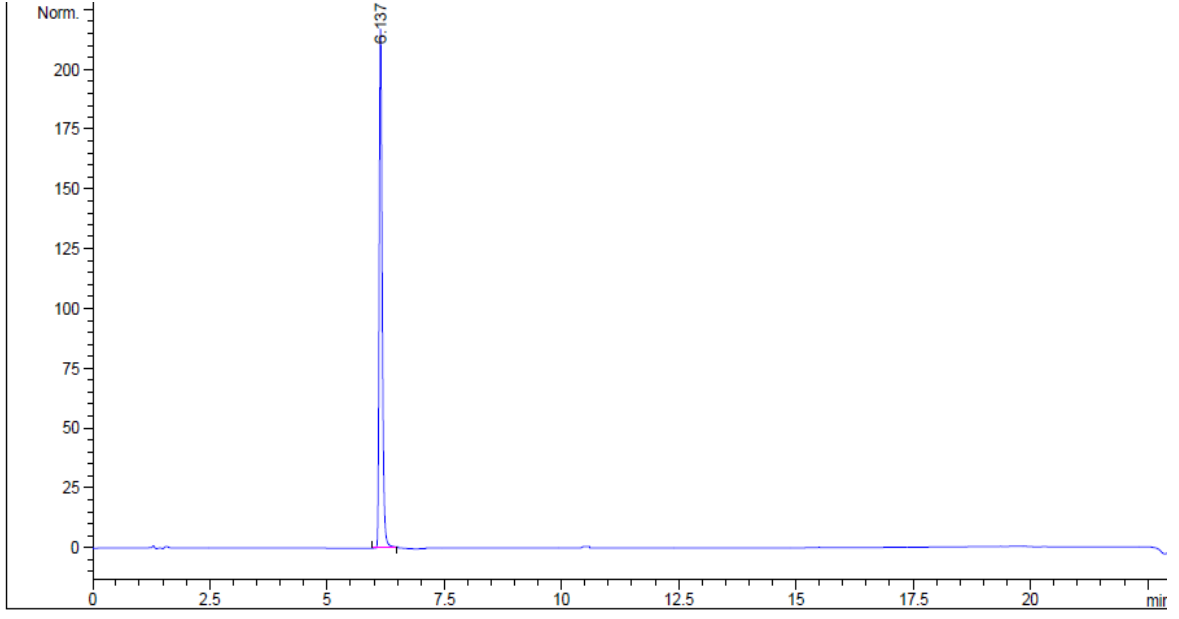
Şekil 24. Turuncu sakızlara ait kromotogram (Bulunan miktar 117,20 mg/L Sunset Sarısı (E 110))



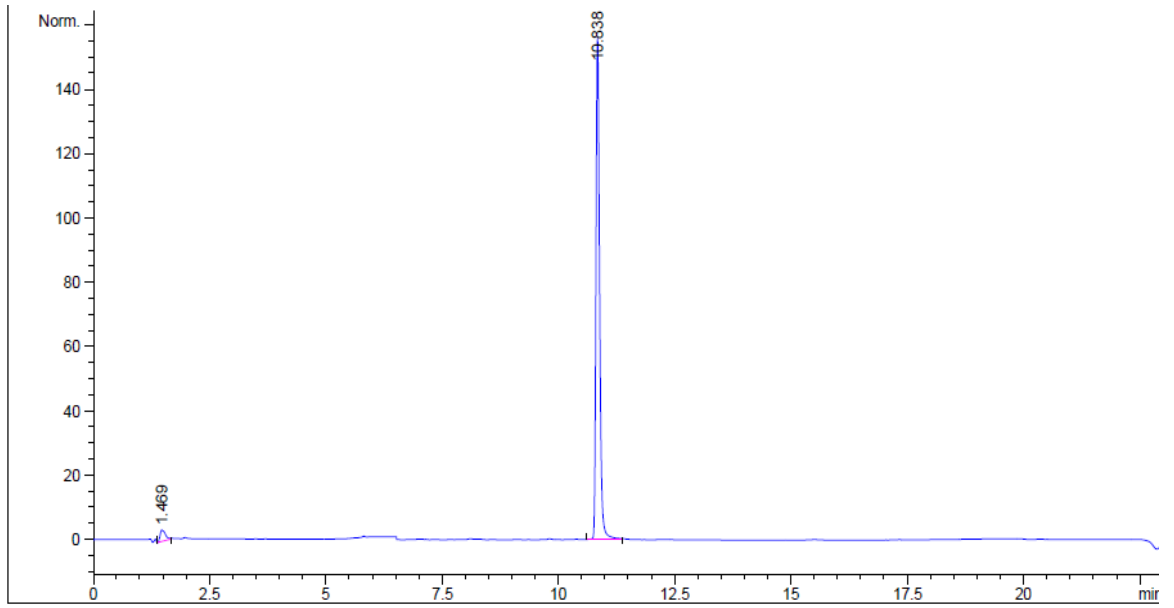
Şekil 25. Şeker (Bulunan miktar 25,79 mg/L Tartrazin-19,89 mg/L Allura Kırmızısı (E 129))



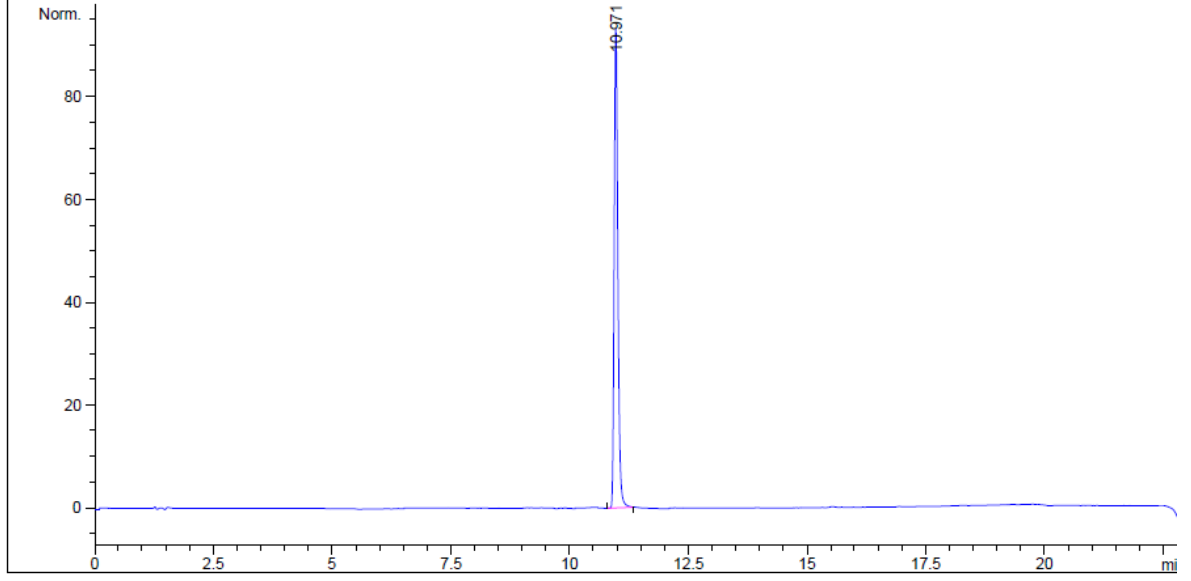
Şekil 26. Sarı sakızlara ait kromotogram (Bulunan 127,48 mg/L Tartrazin (E 102))



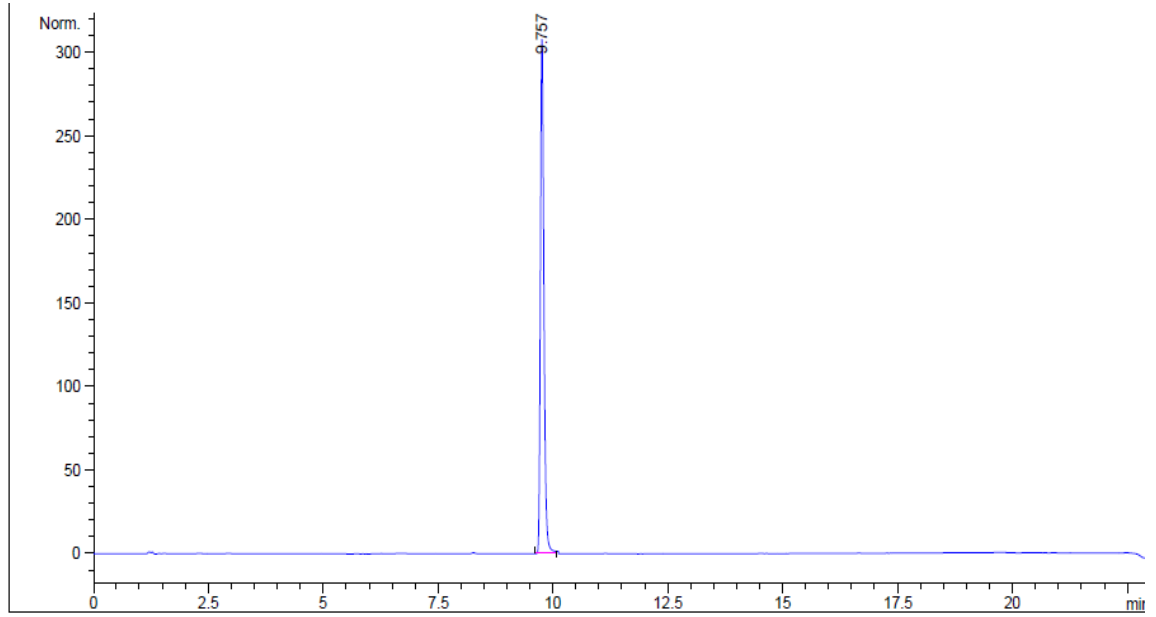
Şekil 27. Trabzon kurabiyesine ait kromotogram (Bulunan 386,25 mg/L Tartrazin (E 102))



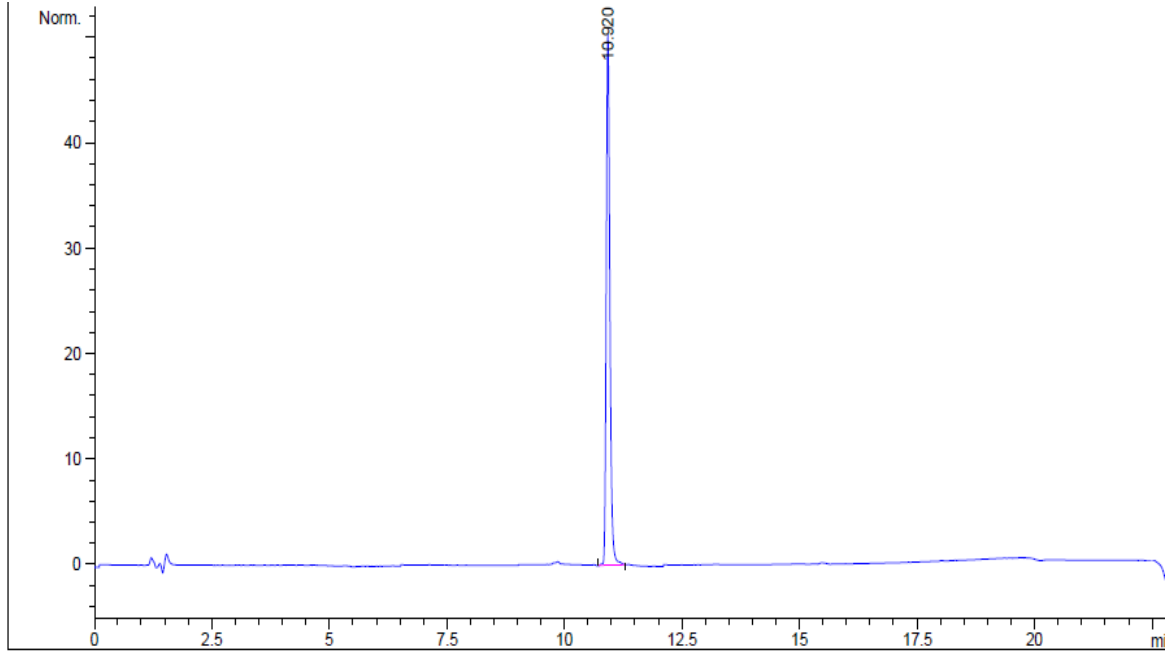
Şekil 28. Şeker 2 (Bulunan 57,59 mg/L Allura Kırmızısı (E 129))



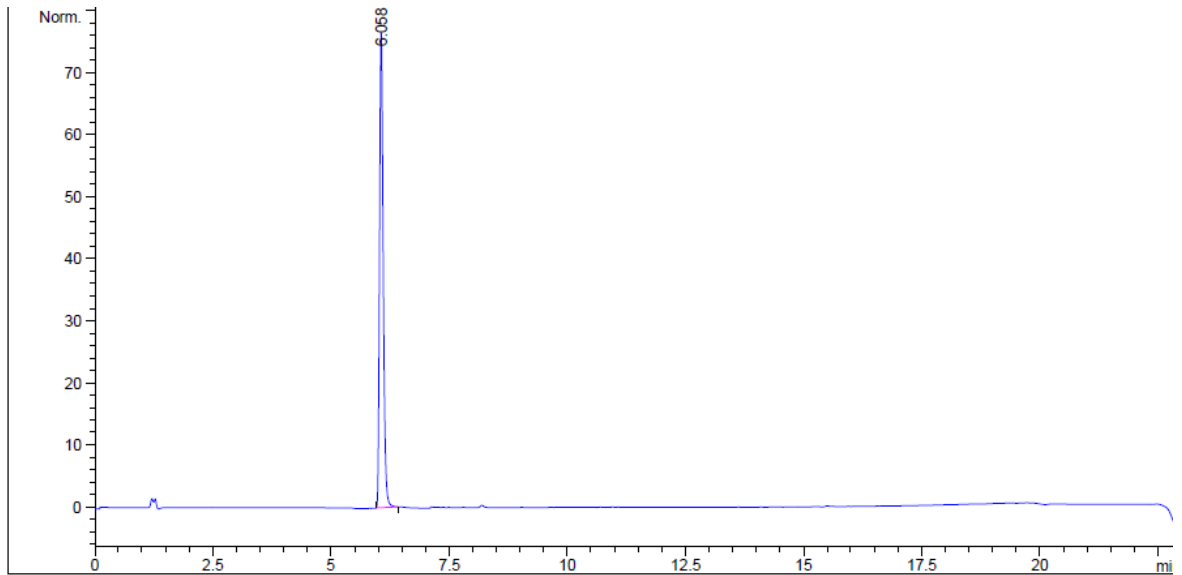
Şekil 29. Kırmızı sakızlara ait kromotogram (Bulunan 69,97 mg/L Allura Kırmızısı (E 129))



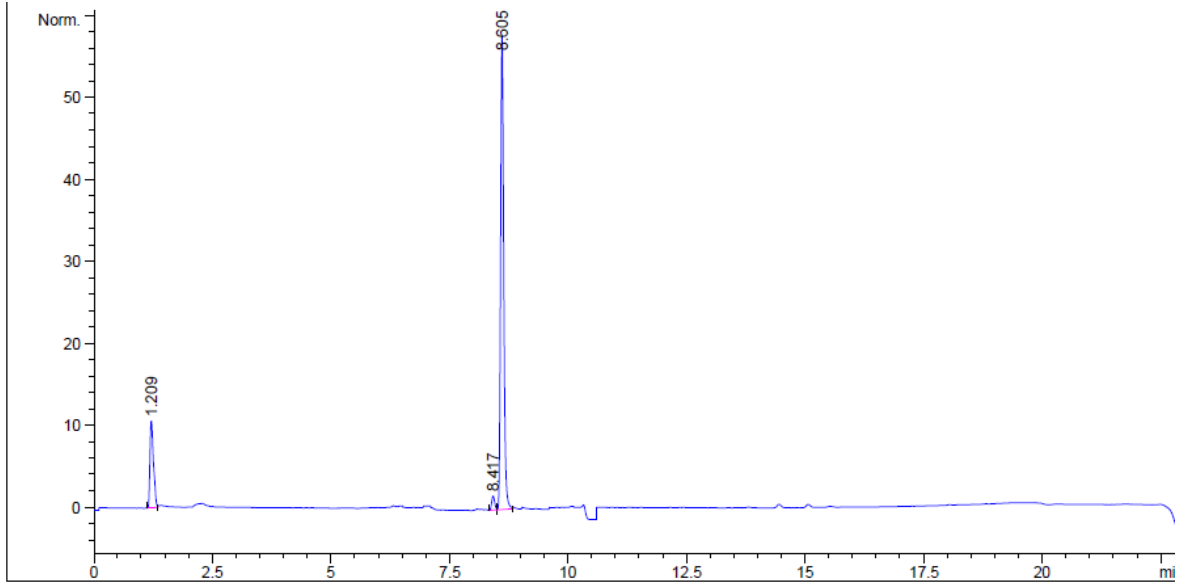
Şekil 30. Buzu 1'e ait kromotogram (Bulunan 60,48 mg/L Sunset Sarısı (E 110))



Şekil 31. Jelibon dil kromotogramı (Bulunan 38,42 mg/L Allura Kırmızısı (E 129))



Şekil 32. Su buzu 2'ye ait kromotogram (Bulunan 13,26 mg/L Tartrazin (E 102))



Şekil 33. Limonataya ait kromotogram (Bulunan 12,62 mg/L Kinolin Sarısı I (E 104))

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Deneysel çalışmalarda elde edilen eğrilere ait R^2 , kalibrasyon eşitliği, LOD ve linear aralık (LOQ-LOL) Tablo 7'de özetlendi. Tablo incelendiğinde yüksek R^2 değerlerinin elde edildiği, LOD'ların ise E104 için 0,08mg/kg ile E110 için 0,25mg/kg arasında değiştiği gözlemlendi. LOD'lar $LOD=3s/m$ şeklinde hesaplandı. Burada s, kalibrasyon grafiğinin regresyon standart sapması, m ise kalibrasyon eğrisinin eğimi olarak alındı. %BSS 0,56 ile 1,65 arasında değişiklik gösterdiği tespit edildi. LOQ, LOD'ların 3 katı alınarak hesaplandı. LOL ise kalibrasyon eğrisinde yer alan en yüksek konsantrasyon olarak alındı.

Tablo 7. Boyalara ait LOD, LOQ-LOL, R^2 ve kalibrasyon eşitlikleri

Boya	LOD mg/kg	LOQ-LOL mg/kg	Kalibrasyon Eşitliği	R^2
Tartrazin (E 102)	0,24	0,72-50	$y = 63,603x - 2,304$	1,000
Kinolin Sarısı (E 104 I)	0,08	0,24-50	$y = 21,435x - 4,891$	1,000
Sunset Sarısı (E 110)	0,25	0,75-10	$y = 54,578x + 9,839$	1,000
Allura Kırmızısı (E 129)	0,23	0,69-50	$y = 73,621x - 9,762$	1,000

Yöntemin doğruluğunu test etmek için ölçümü yapılan gıda örneklerinden birkaçı gıda kontrol laboratuvarına gönderilerek N.M.K.L. 130, 1989 yöntemiyle analiz ettirildi. Trabzon marketlerinde satışa sunulan bazı gıdalarda suda çözünür boyaların tespiti ve gıda kontrol laboratuvarı sonuçları (GKLS) ile tarafımızca tespit edilen miktarların karşılaştırılması Tablo 8'de verildi. Tablodan anlaşıldığı üzere sonuçların birbirine yakın olduğu ve sonuçlar arasında %2-4'lük bir fark olduğu tespit edildi. İstatistik olarak çift yönlü students-t testi uygulandığında %95 güven seviyesinde bulunan t değerlerinin, serbestlik derecesi (s.d.) 4'te $t_{kritik} = 2,78$ 'den küçük olduğu, dolayısıyla sonuçlar arasında anlamlı bir farkın olmadığı hesaplanarak görüldü. Kurabiye, jelibon, limonata ve su buzu örnekleri dışında kalanlar gıda kontrol laboratuvarında test ettirilemediğinden kuruma ait sonuç ve hesaplanabilecek veriler tabloya eklenemedi.

Sonuç olarak, RP-HPLC-UV ile gıda katkı maddesi olarak kullanımına izin verilen bazı sentetik gıda boya ları (Tartrazin (E102), Kinolin Sarısı, E(104), Sunset Sarısı (110) ve Allura Kırmızısı (129)) geniş bir linear aralıkta, yüksek R^2 , düşük LOD'lara sahip, hızlı, aynı kromotogramda, karmaşık olmayan numune hazırlama işlemleri (numune pH'larının 3 ayarlanması, absorbet (poliamid) ilavesi boya ların çözeltilerden alınması için, absorbentlerin yıkanması ve filtrelenmesi, boya ların %25'lik NH_3 ile absorbentten alınması, çözeltilinin kurutulması ve mobil faz ile çözme işlemleri) ile başarılı bir şekilde kantitatif analizi, alıkonma zamanları ile de LOD'ların üstünde kalitatif analiz gerçekleştirildi. Yöntem literatürde bahsedilen yöntemlere nazaran daha az zaman alıcı numune hazırlama işlemleri ile rutin amaçlı olarak kullanılabilir olduğu düşünülmektedir.

Tablo 8. Trabzon marketlerinde satışa sunulan bazı gıdalarda suda çözünür boya ların tespiti ve GKLS ile tarafımızca tespit edilen miktarların karşılaştırılması, n=3, Maksimum Yasal Miktar (Max.Y. M.)

Numune	Bulunan Boya	Boya içeriği mg/kg veya mg/L	%BSS	GKLS mg/kg veya mg/L	Yüzde Hata %	Max. Y. M. mg/L veya mg/kg
Trabzon kurabiyesi	Tartrazin	386,25±5,93	1,54	399,6±5,85	3,34	200
Jelibon	Allura Kırmızısı	38,42±0,6	1,56	37,2±0,55	3,27	300
Limonata	Kinolin Sarısı	12,62±0,16	1,27	12,29±0,14	2,68	10
Su Buzu 1	Sunset Sarısı	60,48±0,68	1,12	61,94±0,67	2,35	Kullanılamaz
Sarı Sakız	Tartrazin	127,48±1,85	1,45	-	-	300
Kırmızı Sakız	Allura Kırmızısı	69,97±0,85	1,21	-	-	300
Turuncu Sakız	Sunset Sarısı	117,2±1,1	0,93	-	-	10
Su buz 2	Tartrazin	13,26±0,22	1,65	-	-	150
Şeker 1	Allura Kırmızısı	19,89±0,24	1,21	-	-	300
	Tartrazin	25,79±0,25	0,97	-	-	300
Şeker 2	Allura Kırmızısı	57,59±0,32	0,56	-	-	300

* HPLC cihazına verilen numunelerdeki boya miktarları kalibrasyon aralığına düşecek şekilde seyreltilmiş olup, Tablo 8'de verilen boya miktarları seyreltme faktörleri ile çarpılmış miktarlardır.

Tablo 8'in son sütununda gıdalara katılmasına izin verilen maksimum boya miktarları verilmiştir. Bu veriler "<http://mevzuat.basbakanlik.gov.tr>" internet adresi üzerinden gıda katkı maddeleri yönetmeliği ekler kısmından alındı. Tablo incelediğinde Trabzon kurabiyesine yasal sınırın neredeyse iki katı tartrazin katıldığı, limon aromalı içeceğe yine yasal sınırdan daha fazla kinolin Sarısı katıldığı, turuncu sakızlara yine yasal sınırın neredeyse 12 katı daha fazla Sunset Sarısı katıldığı tespit edildi. Ayrıca yenilebilir buzlu ürünler kapsamında değerlendirilen su buzunu 1'e Sunset Sarısı katılması yasak olmasına rağmen 60,48 mg/L Sunset Sarısı katıldığı tespit edilmiştir. Diğer ürünlerde yasal sınırlar çerçevesinde gıda boyası katıldığı tespit edildi.

Yasalar gereği üreticiler ürettikleri ürünlerinin bileşiminde bulunan her maddeyi etiket üzerinde belirtmek zorundadır. Bunlardan bir tanesi de kullanılan gıda boyalarıdır. Üreticiler, bazı ürünlerin etiketi üzerinde renklendiricilerin var olduğunu yazmışlar ancak ne olduklarını belirtmemişlerdir. Ayrıca Tablo 9'da yer alan gıda boyalarını içeren gıdaların etiket bilgisi üzerinde "çocukların aktivite ve dikkatleri üzerine olumsuz etkileri bulunabilir" ibaresinin yazılması gerektiği halde yazılmadığı tespit edilmiştir.

Tablo 9. Aşağıdaki renklendiricileri içeren gıdaların etiketlerinde yer alması gereken ilave bilgi

Aşağıdaki renklendiricilerin bir veya daha fazlasını içeren gıdalar	Bilgi
Sunset Sarısı (E 110)	'Renklendirici(ler)nin adı veya E kodu': Çocukların aktivite ve dikkatleri üzerine olumsuz etkileri bulunabilir.
Kinolin Sarısı (E 104)	
Karmosin (E 122)	
Allura Kırmızısı (E 129)	
Tartrazin (E 102)	
Ponzo 4R (E 124)	

5. ÖNERİLER

Elde edilen veriler doğrultusunda kasıtlı ya da kasıtsız olarak gıda boyalarının yasalar dışında gıdalara katılması söz konusudur. Bu gibi yasal olmayan kullanımlar biz tüketicileri kandırmakta ve daha da önemlisi sağlığımızı bozmaktadır. Bu gibi usulsüzlükleri tespit etmek; başta gıda kontrol laboratuvarlarının gıda işletmelerini etkin ve sürekli denetimi ve bilim insanlarının sorumluluğu altındadır. Ayrıca kamu spotlarıyla tüketicilerin bilinçlendirilmesi ve ilköğretimden itibaren sağlıklı gıdanın sağlıklı yaşam olduğu felsefesi benimsetilmelidir. Yasal olmayan kullanımlar bazen mesleki yeterliliğe sahip teknik elemanın çalıştırılmaması veya çalışan teknik elemanın mesleki yeterliliğe sahip olmamasından da kaynaklanmaktadır. Burada işletme sahiplerine düşen görev; mesleki yeterliliğe sahip teknik elemanın çalıştırılması ve teknik elemanın belirli periyotlar içerisinde öğretim kurumlarına gönderilerek kendisini güncellemesini sağlamaktır. Teknik eleman ise mesleğinin sorumluluklarını bilmeli. Uluslararası düzeyde mesleki bilgi ve becerilere sahip olmalı ve değişen mevzuatları takip etmelidir.

6. KAYNAKLAR

- Atlı, B., 2010. Gıda Boyaları, Yüksek Lisans Tezi, N.K.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Augiar de, P. F., Bourguignon, B. ve Massart, D. L., 1997. Comparison of models and desings for optimisation of the pH and the solvent strength in HPLC, Analitica Chimica Acta, 356, 7-18.
- Barwick, V. J., 1997. Strategies for solvent selection – a literature review, Trends in Analytical Chemistry, 16, 6, 293-308.
- Bonan, S., Fedrizzi, G., Menotta, S. ve Elisabetta, C., 2013. Simultaneous determination of synthetic dyes in foodstuffs and beverages by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector, Dyes and Pigments, 99, 36-40.
- Bosch, E., Espinosa, S. ve Roses, M., 1998. Retention of ionizable compounds on highperformance liquid chromatography III Variation of pK values of acids and pH values of buffers in acetonitrile-water mobile phases, Journal of Chromatography A, 824, 137-146.
- Çakmakçı, S. ve Çelik, İ., 1994. Gıda Katkı Maddeleri, ATAUNİ Basımevi, Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü Yayını, No:2 Erzurum, 212 s.
- Dolan, J. W., Gant, J. R. ve Synyder . R., 1979. Gradient elution in high performance liquid chromatography. II: Practical application to reversed- phase systems, Journal of Chromatography, 165, 31-58.
- Ekşi, A., 1996. Ankara Piyasasından Sağlanan Pasta Süsleri ve Bazı Şekerlemelerde Sentetik Boya Miktarlarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Analizleri ve Beslenme Bilim Dalı, Ankara.
- Erdoğan, Ş., 2007. Ankara Piyasasında Satışa Sunulan Bazı Gıdalarda Sentetik Boya Miktarlarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi., Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Hajimahmoodi, M., Afsharimanesh, M., Moghaddam, G., Sadeghi, N., Oveisi, M.R., Jannat B., Pirhadi E., Mazdeh F.Z. ve Kanan H., 2013. Determination of eight synthetic dyes in foodstuffs by green liquid chromatography, Food Additives & Contaminants: Part A, 30, 5, 780–785.
- Karaali, A. ve Özçelik, B., 1993. Gıda Katkısı Olarak Doğal ve Sentetik Boyalar, Gıda, 18, 389-396.

- Khanavi, M., Hajimahmoodi, M., Ranjbar, A.M., Ardekani M.R.S., Mogaddam G. ve Oveisi M.R., 2012. Development of a Green Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Food Colorants, Food Anal. Methods, 5, 408–415.
- Minioti, K., S., Sakellariou, C, F. ve Thomaidis, N.S., 2007. Determination of 13 Synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array-detector, Analytica Chimica Acta, 583, 103-110.
- Özcan, M, ve Akgül, A.,1995. Gıdalar için Doğal Renk Maddeleri-I, Gıda, 20, 4, 209-213.
- Özçelik, B., 1995. Yeşil Bitkilerden Elde Edilen Klorofilin Kompozisyon ve Stabilité Açısından Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İ.Ü, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Perez-Urquiza, M., Ferrer R. ve Beltran, J.L., 2000. Determination of sulfonated azo dyes in river water samples by capillary zone electrophoresis, Journal of Chromatography A, 883, 277–283
- Qi, P., Lin, Z., Chen, G., Xiaoi J., Liang, Z., Lou, L., Zhou, J., Zhang, X.,2000. Fast and simultaneous determination of eleven synthetic color additives in flour and meat products by liquid chromatography coupled with diode-array detector and tandem mass spectrometry, Food Chemistry, 181,101–110
- Roses, M., Canals, I., Allemann, H., Katrin, S. ve Bosch, E. 1996. Retention of ionizable compounds on HPLC. 2. Effect of pH, ionic strength and mobile phase composition on retention of weak acids, Analytical Chemistry, 68, 4094-4100.
- Saldamlı, İ., 1985. Gıda Katkı Maddeleri ve İngrediyenler. Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, 25, Ankara.
- Sanlı, N., 2007. Bazı Sülfonamitlerin Sıvı Kromatografi Yöntemi İle Tayini, Doktora Tezi S.D.U., Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Yaman, M., 1996. Bazı Gıda Maddelerine Katılan Sentetik Boyaların Miktarlarının Araştırılması, Doktora Tezi, Gazi Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Yentür, G. ve Bayhan, A., 1988. Ankara Piyasasında Açıkta Satılan ve Pastörize Tereyağlarında Aromatik Azo Yapısındaki Gıda Boyalarının Araştırılması, Gıda, 13, 389-392.
- Yılmaz, E., 1999. Etiketlerde "E"leri Görmeye Alıştık, Bilim Teknik Dergisi, 94-97.
- URL-1, www.kimyaevi.org/results.asp, 1 Ocak 2010.
- URL-2, mevzuat.basbakanlik.gov.tr/Metin.aspx?MevzuatKod=7.518532&MevzuatIliski=0&sourceXmlSearch=g%C4%B1da%20katk%C4%B1, Erişim tarihi 24/08/2015
- URL-3, www.mevzuat.gov.tr/Metin.aspx?MevzuatKod=7.5.18532&sourceXmlSearch=&MevzuatIliski=0, 31 Temmuz 2014.

ÖZGEÇMİŞ

22.11.1988 yılında Trabzon'un Tonya ilçesinde doğdu. 2006 yılında Pelitli Ahmet Can BALI Lisesi'nden mezun oldu. 2007 yılında Erzurum Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'ne başladı ve 2011'de mezun oldu. 2009 yılında çift ana dal programı ile Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği programına yerleşti ve 2012 yılında mezun oldu. 2009-2011 yılında Pedagojik Formasyon Eğitimi aldı. 2012 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Eğitimine başladı. 2014 yılında Milli Eğitim Bakanlığı bünyesinde kadrolu Gıda Teknolojisi öğretmeni olarak göreve başladı ve halen bu görevi sürdürmektedir.

Davut BAŞKAN

**BAZI GIDA BOYAR MADDELERİN ANALİZİ İÇİN YENİ BİR TERS FAZ YÜKSEK
PERFORMANSLI SIVI KROMOTOGRAFİSİ (RP-HPLC) METODU GELİŞTİRME**

2015
