

47050

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜREV SPEKTROFOTOMETRİK
YÖNTEMLE ASPARTAM
MİKTAR TAYİNİ

Kimyager Nurşen BAŞER

F.B.E. Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Programında
hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Prof.Dr.Esin ÇURGUNLU

E. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
TİPANTASYON MERKEZİ

İSTANBUL, 1995

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇİNDEKİLER.....	I
ŞEKİL LİSTESİ.....	III
TABLO LİSTESİ.....	VII
TEŞEKKÜR.....	IX
ÖZET.....	X
SUMMARY.....	XII
1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI.....	1
2. GENEL BÖLÜM.....	4
2.1. Gıda Katkı Maddeleri.....	4
2.2. Yapay Tatlandırıcılar.....	5
2.3. Aspartam Hakkında Genel Bilgi.....	6
2.3.1. Özellikleri.....	6
2.3.2. Tanınması.....	7
2.3.3. Miktar Tayini (Farmakope Yöntemi).....	8
2.3.4. Diğer Miktar Tayin Yöntemleri.....	8
3. TÜREV SPEKTROFOTOMETRİSİ.....	16
3.1. Türev Ölçüm Teknikleri.....	19
3.2. Türev Spektrofotometrisinin Kullanım Alanları.....	23
4. DENEYSEL BÖLÜM.....	24
4.1. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	24
4.2. Maddeler.....	24
4.3. Çözeltiler.....	25
4.4. Türev Spektrofotometrik Yöntem ile Tatlandırıcı Tabletlerde Aspartam Analizi.....	27

4.4.1. Analiz Koşullarının Saptanması.....	27
4.4.2. Ölçü Eğrisinin Hazırlanması.....	33
4.4.3. Tatlandırıcı Tabletlerdeki Aspartama Türev Spektrofotometrik Yöntemin Uygulanması.....	33
4.5. USP Yöntemi ile Tatlandırıcı Tabletlerde Aspartam Analizi.....	43
4.6. Türev Spektrofotometrik Yöntem ile USP Yönteminin Sonuçlarının Karşılaştırılması.	43
4.7. Türev Spektrofotometrik Yöntem ile Diyet Kolada Aspartam Analizi.....	48
4.7.1. Analiz Koşullarının Saptanması.....	48
4.7.2. Ölçü Eğrisinin Hazırlanması.....	54
4.7.3. Sonuçların İstatistiksel Değerlendirilmesi.....	60
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	64
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 3.1a	Basit bir pikin absorpsiyon ve 1.-4. derece türev spektrumları.....	18
Şekil 3.1b	İki maddenin absorpsiyon piklerinin üstüste geldiği durumdaki spektrumları.	18
Şekil 3.1c	İki maddenin spektrumlarının çakıştığı durumdaki absorpsiyon ve 1.-4. derece türev spektrumları.....	18
Şekil 3.2.	Çakışan iki band ve bu bandların toplam eğrisi.....	21
Şekil 4.1.	500 µg/ml 'lik Aspartam çözeltisinin absorpsiyon spektrumu.....	28
Şekil 4.2.	500 µg/ml 'lik Aspartam çözeltisinin 1. derece türev spektrumu.....	29
Şekil 4.3.	500 µg/ml 'lik Aspartam çözeltisinin 2. derece türev spektrumu.....	30
Şekil 4.4.	500 µg/ml 'lik Aspartam çözeltisinin 3. derece türev spektrumu.....	31
Şekil 4.5.	500 µg/ml 'lik Aspartam çözeltisinin 4. derece türev spektrumu.....	32

Şekil 4.6. 100–500 µg/ml 'lik Aspartam çözeltisinin 2. derece türev spektrumları.....	34
Şekil 4.7. 100–500 µg/ml 'lik Aspartam çözeltisinin 3. derece türev spektrumları.....	35
Şekil 4.8. 2. Derece türev spektrumunda Aspartama ait Ölçü eğrisi ($^2D_{252.4-255.3} = 0.046c + 0.024$) $r=0.9999$	36
Şekil 4.9. 3. Derece türev spektrumunda Aspartama ait Ölçü eğrisi ($^3D_{253.9-256.9} = 0.056c + 0.017$) $r=0.9999$	37
Şekil 4.10. Örnek tablet çözeltisinin absorpsiyon spektrumu.....	40
Şekil 4.11. Örnek tablet çözeltisinin 2. derece türev spektrumu.....	41
Şekil 4.12. Örnek tablet çözeltisinin 3. derece türev spektrumu.....	42

Şekil 4.13. Örnek diyet kola çözeltilisinin %50 'lik etilalkol-su karışımındaki absorpsiyon spektrumu.....	49
Şekil 4.14. Örnek diyet kola çözeltilisinin %50 'lik etilalkol-su karışımındaki 1. derece türev spektrumu.....	50
Şekil 4.15. Örnek diyet kola çözeltilisinin %50 'lik etilalkol-su karışımındaki 2. derece türev spektrumu.....	51
Şekil 4.16. Örnek diyet kola çözeltilisinin %50 'lik etilalkol-su karışımındaki 3. derece türev spektrumu.....	52
Şekil 4.17. Örnek diyet kola çözeltilisinin %50 'lik etilalkol-su karışımındaki 4. derece türev spektrumu.....	53

Şekil 4.18. Örnek diyet kola + 50-250 µg/ml Aspartam çözeltisinin absorpsiyon spektrumu.....	55
Şekil 4.19. Örnek diyet kola + 50-250 µg/ml Aspartam çözeltisinin 1. derece türev spektrumu.....	56
Şekil 4.20. Örnek diyet kola + 50-250 µg/ml Aspartam çözeltisinin 2. derece türev spektrumu.....	57
Şekil 4.21. Örnek diyet kola + 50-250 µg/ml Aspartam çözeltisinin 3. derece türev spektrumu.....	58
Şekil 4.22. Örnek diyet kola + 50-250 µg/ml Aspartam çözeltisinin 4. derece türev spektrumu.....	59
Şekil 4.23. Örnek diyet kola çözeltisindeki Aspartam analizi için hazırlanan ölçü eğrisi.....	61

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 4.1. Aspartamın 2. derece türev spektrumuna ait ölçü eğrisinin $^2D_{252.4-255.3}$ değerleri ve regresyon analizleri.....	38
Tablo 4.2. Aspartamın 3. derece türev spektrumuna ait ölçü eğrisinin $^3D_{253.9-256.9}$ değerleri ve regresyon analizleri.....	39
Tablo 4.3. Türev spektrofotometrik yöntem ile tatlandırıcı tablette Aspartam analizlerine ait deneysel veriler.....	44
Tablo 4.4. USP Yöntemi ile tatlandırıcı tabletlerde Aspartam analizinin deneysel verileri ve istatistiksel sonuçları.....	45
Tablo 4.5. Tatlandırıcı tabletlerdeki Aspartam analizinde 2. derece türev spektrofotometrik yöntem sonuçlarının USP yöntemiyle kıyaslanması.....	46

Tablo 4.6. Tatlandırıcı tabletlerdeki Aspartam analizinde 3. derece türev spektrofotometrik yöntem sonuçlarının USP yöntemiyle kıyaslanması.....	47
Tablo 4.7. Örnek diyet kola çözeltisine ait $^3D_{253.9-256.9}$ değerleri ve regresyon analizleri.....	62
Tablo 4.8. Örnek diyet kola çözeltisinde Aspartam analizinin deneysel verileri ve istatistiksel sonuçları.....	63

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında bana her türlü kolaylığı sağlayan Sayın Prof. Dr. Esin ÇURGUNLU 'ya ve Araş. Gör. Fatma TURAK 'a, her zaman yardımcı olan değerli hocalarıma, arkadaşlarıma ve bana daima destek olan aileme teşekkürü borç bilirim.

ÖZET

Günümüzde yapay tatlandırıcı olarak kullanılan Aspartam (N-L- α -aspartyl-L-phenylalanine methyl ester), aspartik asit ve fenilalanin'in sentetik bir bileşimidir. Sakkarozdan yaklaşık 200 kat daha tatlıdır. Çeşitli yiyeceklerde ve karbonatlı içeceklerde tatlandırıcı olarak çoğu kez sakkarin yerine kullanılmaktadır.

Hernekadar Aspartamın toksik etkisi yoksa da birçok ülkede yüksek otoriteler tarafından yiyeceklerdeki Aspartam miktarı kontrol altında bulundurulmaktadır. Çeşitli yiyeceklerde, tabletlerde ve meşrubatlarda bulunan Aspartamın miktar tayini için çoğunlukla likit kromatografik, gaz kromatografik, spektrofotometrik yöntemler kullanılmaktadır..

Bu çalışmada, tatlandırıcı tabletlerdeki ve diyet koladaki Aspartam miktar tayini için türev spektrofotometrik yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem çabuk ve duyarlıdır. Diğer metodlar uzun ön ayırma işlemleri yada pahalı ayırma cihazları ile uygulanmaktadır. Türev spektrofotometrik spektrumların ayırt edilmesinde kullanılan duyarlı bir yöntemdir.

Tatlandırıcı tabletlerdeki ve diyet koladaki Aspartam miktarı için şimdiye kadar uygulanan zor, zaman alıcı yöntemler yerine daha kolay ve hassas bir yöntem olarak bilinen türev spektrofotometrik yöntemin kullanılabileceği anlaşılmıştır.

Tatlandırıcı tabletlerde Aspartam miktarı için 2. ve 3. derece türev spektrumları kullanıldı. 2. türev spektrumunda 252.4 nm-255.3 nm, 3. türev spektrumunda 253.9 nm-256.9 nm dalga boylarında çalışıldı. Elde edilen sonuçlar USP XXII (1990) da önerilen titrimetrik yöntemle kıyaslandığında aralarında fark olmadığı görülmüştür.

Diyet koladaki Aspartam miktarı için 3. derece türev spektrumu ve 253.9 nm-256.9 nm dalga boyları kullanıldı. Bu yöntem hızlı ve duyarlıdır. Ancak elde edilen sonuçların likid kromatografik yöntemle elde edilen sonuçlarla kıyaslanması gerekmektedir.

SUMMARY

Aspartame (N-L- α -aspartyl-L-phenylalanine 1 methyl ester) is a synthetic combination of two aminoacids, aspartic acid and phenylalanine. It is about 200 times sweeter than sucrose. It is often used as substitute for saccharin in foods and as a sweetener in carbonated drinks.

Although Aspartame does not have toxic effect, the amount of Aspartame in foods always controlled by the health authorities in many countries. The amount of Aspartame in foods, tablets and soft drink is determined by using of liquid chromatography, gas chromatography and usual spectrophotometric methods.

In this study; the amount of Aspartame in sweetener tablets and diet cola was determined by using of derivative spectrophotometric method. The proposed method is rapid and sensitive compare to other methods. generally, other methods are required either long preliminary separation processes or expensive separation equipments.

Second and third derivative spectra were used for the determination of Aspartame in sweetener tablets. The wavelenghts at 252.4 and 255.3 nm were taken for second

derivative spectrum, and 253.9 and 256.9 nm were taken for third derivative spectrum and the obtained results were also compared with titrimetric method which is suggested in the USP XXII (1990).

The amount of aspartame in diet cola was determined by using of third derivative absorbance values at 253.6 and 256.9 nm. It was find out that this method is very rapid and sensitive but the obtained result from derivative spectrophotometry need to be compared with the results which obtained by using of liquid chromatography.

1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Son zamanlarda çeşitli yiyecek ve içeceklerde yapay tatlandırıcı kullanımı çok fazla artış göstermiştir. Önceleri Sakkarin ve Siklamat diyet yiyecek ve içeceklerde oldukça yaygın olarak kullanılıyorlardı. Araştırmalar sonucunda bu maddelerin kanserojen etkisi olduğu bulunmuştur. Bu nedenle bu maddelerin kullanımına ancak özel izinle ve belirli miktarlarda izin verilmiştir(Alperdem, 1979).

Uzun bir süre önce sentez edilmesine rağmen Aspartamın tat verici özelliği 1965 yılında Schlatter tarafından tesadüfen anlaşılmıştır. Dipeptitler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, bu madde sınıfında çok sayıda tat verici madde olduğu bulunmuştur(Enders et al, 1982).

Bir dipeptit olan Aspartam, meşrubatlarda ve çeşitli yiyeceklerde düşük kalorili yapay tatlandırıcı olarak Food and Drug Add.(FDA) tarafından kullanılması uygun görülen bir yapay tatlandırıcıdır. Ve başta ABD ve bir çok ülkede düşük kalorili meşrubat ve çeşitli yiyeceklerde Sakkarin ve Siklamatin yerine kısmen Aspartam kullanılmaktadır. Hidroliz olmaya çok yatkın olduğundan dolayı sulu gıdalarda zamanla tat değeri kaybolacağından, Aspartamın kullanıldığı yiyecek ve içeceklerin kısıtlı raf ömrü vardır.

Aspartam ve bozunma ürünü piperazidion uzun süren toksikolojik deneylere sağlık açısından denenmiştir. Yaygın kullanılan Aspartamın kanserojen veya kronik toksik etkileri bulunmamıştır. Aspartam, insan vücudunda diğer dipeptitler gibi metabolize edilir. Genelde kullanılan dozlarda, aminoasit dengesizlikleri ortaya çıkmaz ve oluşan az miktardaki metanolün zararlı etkileri yoktur. Fakat fenilketönüri hastaları için Aspartam kullanımı uygun değildir.

Aspartamın şeker hastalarının kullandığı bir çok diabetik yiyecek ve içeceklerde kullanımı uygundur. Bu maddeler günümüzde bir çok diyet programlarında kullanılmaktadır. Ama bu maddelerin günlük kullanım miktarının kısıtlı olduğunu unutmamak gerekir.

Aspartam miktar tayini için literatürde çok sayıda yöntem verilmektedir. Tatlandırıcı tabletlerde, diyet yiyecek ve içeceklerde uygulanan bu yöntemlerde daha çok yüksek basınç likid kromatografisi yöntemi kullanılmaktadır. Ayrıca ince tabaka kromatografisi ve gaz kromatografisi yöntemleride kullanılmaktadır.

Bu yöntemler zor, pahalı ve zaman alan yöntemlerdir. Bu çalışmada tatlandırıcı tablet ve diyet koladaki Aspartamın kantitatif analizi için ucuz ve pratik bir yöntem olarak son zamanlarda analitik kimyada çok kullanılan türev spektrofotometrik yöntemin uygulanması amaçlanmıştır.



2. GENEL BÖLÜM

2.1. Gıda Katkı Maddeleri

Gıdalara ve ürünlerine hazırlanmalarının herhangi bir devresinde çeşitli maksatlarla ilave edilen maddelere "Gıda Katkı Maddeleri" denir.

Gıda katkı maddeleri başlangıçta; kişilerin özel gereksinimlerini karşılama yönünde ve dolayısıyla da aile içinde kullanılmaya başlanmıştır. İlk bilinen gıda katkı maddeleri tuz, biber, sirke, duman ve çeşitli baharatlardır. Örneğin Türkler eti dayanıklı ve lezzetli bir hale getirmek için tuz, biber ve sarımsak kullanmışlardır. Önceleri örf ve adetlere göre sınırlı olarak kullanılan gıda katkı maddeleri, zamanla ticari amaçla kullanılmaya başlanmış ve buna paralel olarak da gıda teknolojisi gelişmiştir. Bu arada gıda katkı maddelerinin, insan sağlığına olan zararları araştırılmıştır. Gıdalara katılmasına izin verilecek maddelerin belirlenmesi ve teknolojiideki kullanılma şartlarının bulunması için, araştırmalar yapılmaktadır.

Gıda katkılarının kullanılması, her ülkenin kendi şartlarına uygun kanun, tüzük ve talimatlarla düzenlenmiştir. Uluslararası kuruluşlarca yapılan araştırmalar sonucunda gıda

katkı maddelerinin, teknolojideki yeri, önemi, gıdalarda kullanımı ve sınırları belirlenir. Kodeks Alimentarius Komisyonunun araştırma ve kararları özellikle çok önemlidir. Ülkemizde henüz bir Gıda Kodeksi yoktur. Fakat hazırlanması çalışmaları devam etmektedir.

2.2. Yapay Tatlandırıcılar

Yapay tatlandırıcılar, lezzet ve tat düzelten, geliştiren gıda katkı maddelerindendir. Kalorice fakir gıda ürünlerinin hazırlanmasında, tat verici olarak kullanılırlar. Özellikle şeker hastalarının kullandığı ve rejim programlarında uygulanan yiyecek ve içeceklerde sakkarozun yerine kullanılırlar.

Yapay tatlandırıcıların, satışına önceleri sadece eczanelerde izin verilmiştir. Son yıllarda "hafifletilmiş" ve "light" diye adlandırılan besinlerin hazırlanmasında kullanılmaya başlanmıştır. Yapay tatlandırıcı olarak yaygın kullanılan en eski madde; sakkarindir. Daha sonraları ise siklamatlar kullanılmaya başlanmıştır. Araştırmalar sonucunda bu maddelerin kanserojen etkisi olduğu bulunmuştur. Bu nedenle bu maddelerin kullanımına, ancak özel izinle ve belirli miktarlarda izin verilmiştir ve yeni bir madde arayışı başlamıştır(Alperdem, 1979).

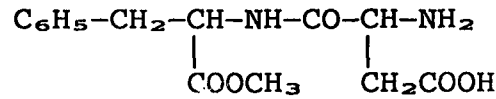
2.3. Aspartam Hakkında Genel Bilgi

Aspartam, aspartik asit ve fenilalanin'in sentetik bir bileşiminden oluşan bir dipeptittir.

Sulu çözeltilerinde Aspartam, ortam bazıkse 3,6-diokso-5-fenilmetil-2-piperazinatik asite dönüşür. Ortam asidik ise L-fenilalanin-1-metilester, L-aspartik asit ve L-fenilalanin maddelerine ve yapı izomeri β APM'ye dönüşür (Menexia et al, 1991).

Aspartamın tat özelliği iyi olarak tanımlanır. Bir çok durumda siklamattan ve her zaman sakkarinden daha iyidir. Sonradan farkedilen istenmeyen lezzet taşımaz.

2.3.1. Özellikleri



N- α -L-Aspatryl-L-phenylalanin methyl ester (α -APM)

Kapalı Formülü : $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5$

Molekül Ağırlığı : 294.3

Görünüş, Renk, Koku : Kristal yapılı, beyaz, kokusuz

Bağıl Tatlılık* : Sakkarozdan 200 kez daha tatlıdır.
Çözünürlük : Aspartamın sudaki çözünürlüğü sıcaklığa ve pH değerine bağlıdır. pH=5.2' de sudaki çözünürlüğünün en az olduğu değerdir. Bu değer yaklaşık 1 g/100ml 'dir. pH değerinin düşmesiyle çözünürlük artar. pH=2.2 'de maksimum değere ulaşır. Artan sıcaklık ile de çözünürlük artar. Pek çok organik çözücüde Aspartamın çözünürlüğü sudakinden daha azdır. Nem kapınca aspartilfenilalanin ve diketopiperazin 'e hidroliz olur ve tatlılık kaybı olur.' Sulu çözeltilerin en stabil olduğu pH değeri yaklaşık 4.3 'tür(Endres, K. et al. 1982).

2.3.2. Tanınması

Belirli bir erime derecesi bulunmamaktadır. 196°C 'de 6-Benzil-2,5-dioksopiperazin-3-karbonik asit metil ester 'e dönüşür. Bu maddenin erime derecesi 315°C 'dir(Endres, 1982).

* Doğal yada yapay tatlandırıcılarda tatlılık değeri trained taste panels metodu ile duyusal olarak bulunur. Sakkaroz genel standarttır ve diğer tatlandırıcıların tatlandırma gücü bağıl olarak bulunur. Yapay tatlandırıcılar yüksek tatlılık değerlerinden dolayı bu tanıma uymazlar. Genellikle kabul edilen kural Aspartamın sakkarozdan 200 kez daha fazla tatlı olduğudur(Furia, 1968).

2.3.3. Miktar Tayini (Farmakope Yöntemi)

USP XXII (1990) 'da Aspartam miktar tayini için titrimetrik yöntem verilmektedir. Bu yöntemle göre Aspartam miktarı; perklorat asidinin susuz asetikasitteki 0.1 N çözeltisiyle susuz ortamda violet TS indikatörü kullanılarak tayin edilmektedir.

2.3.4. Diğer Miktar Tayin Yöntemleri

Aspartam miktar tayini için yapılan çalışmalarda en çok HPLC yöntemleri kullanılmaktadır. Ayrıca görünür alan spektrofotometrik ve ince tabaka kromatografik yöntemlerle de çok sayıda çalışmalar yapılmıştır.

Spektrofotometrik yöntemler arasında ninhidrin reaktifi kullanılarak yapılan miktar tayini en hassas olanıdır. Ninhidrin reaktifi kullanılarak meşrubatlardaki Aspartam miktarının analiz edildiği bir yöntemde propilen karbonat ile solvent ekstraksiyonu uygulanarak metodun seçiciliği arttırılmış ve absorban değeri 585 nm 'de ölçülmüştür (Lau et al, 1988).

Ancak ninhidrin reaktifi serbest α -amino grubu içeren aminoasitlerin bulunduğu durumlarda kullanılmaz. Çünkü reaktif bu maddeyle renk vererek girişime neden olur.

Dietilditiyokarbamat reaktifi kullanılarak 436 nm 'deki absorbands değeri ölçümüne dayanan spektrofotometrik yönteminde leusin katkı maddesi içeren tabletlere uygun olmadığı belirtilmektedir(Güven et al, 1984).

p-Benzokinon reaktifi kullanılarak Aspartamın miktar analizi 450 nm 'de absorbands değerinin ölçülmesiyle mümkün olmuştur. Meşrubatlarda bulunan boya maddeleri girişime sebep olduğundan bu yöntem meşrubatlarda kullanılmaz(Vachek, 1984).

Leusin katkı maddesinin bulunmadığı tabletlere uygulanabilecek bir yöntemde ise p-etilaminobenzaldehit reaktifi kullanılarak çözeltinin absorbandsı 407 nm 'de ölçülmüştür(Özol, 1984).

Tabletlerdeki Aspartamın miktarını tayin için geliştirilen bir başka çalışmada Aspartam ile primer ve sekonder alifatik aminlerle fluoresans türev oluşturan NBD-Cl (7- kloro-4- nitrobenzofruzan) 'ın reaksiyonuna dayanan spektrofluorimetrik bir yöntem önerilmektedir (Atmaca et al, 1989).

Bir başka çalışmada ise çeşitli gıda maddelerinde Aspartam miktar tayini için yeni geliştirilen basit, duyarlı ve hassas üç spektrofotometrik yöntem açıklanmaktadır.

Dolaylı spektrofotometrik yöntemde sülfanilamid reaktifi ile oluşan rengin 520 nm 'de ölçülmesi esasına dayanır. Diğer iki spektrofotometrik yöntemde ise kloranilik asit ve p-kloranil reaktifi kullanılarak oluşan renk 520 nm 'de ölçülür. Bu yöntemlerin Beer kanununa uyduğu konsantrasyonlarda ayrı ayrı belirtilmektedir (Prasad et al, 1988).

Aspartam 'ın floreskamin ile olan reaksiyonundan faydalanılarak spektrofotometrik bir yöntem uygulanmıştır. pH= 7.5 ve oda sıcaklığında çalışan bu yöntemde eksitasyon ve emisyon dalga boyları 390 nm ve 480 nm olarak ölçülmüştür. Bu yöntem çeşitli tatlandırıcı tablet ve tatlılarda bulunan Aspartam 'ın analizi için başarıyla kullanılmıştır(Poctava et al, 1982).

Aspartam analizi için verilen iki spektrofotometrik yöntemden ilkinde 1. derece türev spektrumunda 261-241 nm 'deki pikler ölçülerek pikten pike yöntemi kullanılmıştır. İkinci yöntemde ise Aspartamın etanollü kloranil çözeltisi (pH= 9) ile verdiği kompleksin maksimum absorpsiyonu 354 nm 'de ölçülmüştür. Tatlandırıcı tabletlerde, önerilen ikinci yöntemde sistematik hatalar bulunduğu için birinci yöntem tercih edilmektedir (Alexandria 1991).

Aspartam analizi için önerilen bir türev spektrofotometrik yöntemde ise aspartamın % 50'lik etilalkol-su (V/V) karışımı ile çözeltisi hazırlanmış. 2. derece türev spektrumunda 252.1 nm ile 255.1 nm, 3. derece türev spektrumunda 253.9 nm ile 256.9 nm dalga boylarında çalışılarak tatlandırıcı tabletlerde başarıyla kullanılmıştır (Bertini et al, 1992).

Aspartam ve monosodyumglutamatın birarada bulunduğu karışımlardaki analizleri için hem spektrofotometrik hem de likit kromatografik iki yöntem verilmektedir. Aspartam ve monosodyumglutamat için uygulanan spektrofotometrik yöntem floreskamin reaktifi ile verdiği reaksiyona dayanmaktadır. Aynı karışımın likit kromatografik tayini için geliştirilen yöntemde de floreskamin reaktifi kullanılmakta; fotometrik ve floresans detektör ile çalışılmaktadır. Her iki yöntem ile elde edilen sonuçlar verilmekte ve yöntemlerin karbonatlı içeceklerdeki Aspartam ile hazır çorbalardaki glutamat miktar tayininde iyi sonuçlar verdiği belirtilmektedir (Garcia et al, 1992).

Aspartam miktar tayini için verilen bir gaz kromatografik yöntemde, örnek metanol ile ekstrakte edilmiş ve Aspartamın N-(2-metilpropoksikarbonil)metil ester türevi şeklinde Uniport HP Gaz kromatografi kolonuna verilmiştir.

Internal standart olarakta glisil-L-fenilalanin kullanılarak Aspartam analiz edilmiştir. (Kataoka et al, 1987).

Verilen bir ince tabaka kromatografik yöntemde Whatman LHPKD high-performance silikajel levhalar ile n-butilalkol-asetikasit-su karışımı solvent sistemi olarak kullanılmıştır. Aseton içinde %0.2 'lik ninhidrin kullanılarak Aspartamın belirlenmesi sağlanmış ve Aspartam bölgeleri densitometrik olarak ölçülmüştür. Kola örneğine uygulanan bu çalışmada da geri kazanım % 98.7 olarak bulunmuştur(Sherma et al, 1985).

Aspartam miktar analizlerinde en çok kullanılan yöntem ise likit kromatografisidir.

Likit kromatografi ile yapılan bir çalışmada önce örnek ekstrakte edilip kompleks matrikslerden santrifüjlenerek ya da karrez solusyonu ile ayrılmıştır. Analiz örneği μ Bondapak C_{18} kolonu ile Quarda Pak μ Bondapak C_{18} prekolonu ve KH_2PO_4 pH= 3.5 tamponu ile asetonitril karışımı mobil faz olarak kullanılarak analiz edilmiştir. Bu metod bir çok diyet yiyecek (yoğurt, çikolata vb.) ve içecekte (meyva suyu, meşrubat, meyva özleri vb.) başarıyla uygulanmıştır (Prodolliet et al, 1993).

Başka bir çalışmada da sorbik asit ve benzoik asit içeren diyet içeceklerdeki Aspartam, örnek çözeltisi

kuaterner amonyum anyon değiştiricisi ile diğerlerinden tamamen ayrılır. Li-chromosorb kolonda asetonitril-fosfat pH= 4.5 tamponu mobil faz olarak kullanılarak 215 nm 'de analiz edildiği bu çalışmada geri kazanım % 95 'ten fazladır (Moors et al, 1991).

Kafein ile birlikte bulunan Aspartamın birbirinden ayrılması çok zordur. Bunun için Zorbax-ODS C₁₈ kolonu ile metilalkol ve su karışımında mobil faz olarak kullanılmıştır. UV detektörü kullanılarak 214 nm 'de analizin yapıldığı bu çalışmada geri kazanım % 100-106 arasında verilmektedir (Yang et al, 1991).

Bir çok diyet meşrubata uygulanan bir çalışmada da Aspartam cyclobond I kolonunda, MeOH - %1 trietilamonyum asetat pH= 4.5 mobil fazı kullanılarak 214 nm 'de analiz edilmiştir. Sodyum benzoat, karamel rengi ve kafeininde bu yöntemle miktar analizi mümkündür (Issaq et al, 1986).

Örneğin direkt olarak tayin edildiği bir yöntemde de C₁₈ kolonu ve mobil faz olarakta %10 asetikasit - %3 izopropanol pH= 3 'te kullanılmıştır, ve UV detektör kullanılarak 254 nm 'de Aspartam analiz edilmiştir. Bu yöntemde meşrubatlarda bulunan sakkarin, kafein, sodyum benzoat, renk ve koku verici katkı maddeleri de Aspartam gibi analiz edilebilmektedir (Webb et al, 1984).

Örnek diyet kola çözültisi direkt olarak yada örneğin etanol ekstraktı halinde, Supelcosil LC-18 kolonuna verilmiştir. Mobil faz olarakta KH_2PO_4 (pH= 5) -asetonitril veya KH_2PO_4 pH= 3.5 -asetonitril karışımları kullanılmıştır. Aspartam, alitame, sakkarin, asesulfam ve dulisin 200 nm 'de direkt olarak analiz edilmiştir. Siklamat ise kolondan çıkan kısım iyon değiştirici ile ekstrakte edildikten sonra 585 nm 'de analiz edilmiştir. Meşrubatlara uygulanan bu çalışmada geri kazanım % 98 'in üzerindedir(Lawrance et al, 1988).

Meyva sularında bulunan Aspartam analizi için örnek çözültisi aq. % 50 amonyak çözültisi ile nötrelize edilip santrifüjlendikten sonra Zorbax - ODS kolonuna verilir. Gradient eluent olarak metanol-asetonitril-triamonyum sitrat (I) (10:1:39) ile metanol-I (1:1) kullanılarak Aspartam 254 nm 'de analiz edilmiştir. Bu yöntemle bütün koruyucuların tatlandırıcıların ve renk verici katkı maddelerinin ayrılması ve analizi mümkündür (Zhau et al, 1990).

Diyet çikolata, yoğurt, mayonez, likör gibi çeşitli yiyecek ve içeceklerdeki Aspartamın miktar analizi için öncelikle solid faz ekstraksiyonundan yararlanılmıştır. Öncelikle Aspartamla birarada bulunan sakkarin, siklamat ve asesulfam-K kantitatif olarak ayrıldıktan sonra örnek çözültisi Li-chromosorb-RP-select B kolonuna verilmiştir.

Asetonitril - fosfat tamponu mobil faz olarak kullanılarak Aspartam 220 nm 'de analiz edilmiştir(Lehr et al, 1993).

Diyet kola çözeltisi gazı giderilip su ile seyreltildikten sonra C₁₈ kolonuna verilmiştir. Trietilamonyum fosfat tamponu içinde %15 asetonitril mobil fazı kullanılarak 214 nm 'de Aspartam miktarı analiz edilmiştir. Bu yöntemle diyet koladaki Aspartamla birlikte kafein, sodyum sakkarin ve sodyum benzoat da analiz edilebilmektedir(Tyler 1984).

3. TÜREV SPEKTROFOTOMETRİSİ

Ultraviyole - görünür bölge türev spektrofotometrisi oldukça yeni analitik bir yöntemdir. İlk defa 1920 'li yıllarda Rutherford tarafından kütle spektrumlarının yorumlanmasında kullanılmıştır.

Önceleri V.J. Hammond ile W.C. Prince (1953) ve daha sonraları J.D. Morison (1978) tarafından maksimumların yan tarafında az veya çok belirsiz omuzlar veya zayıf dönüm noktaları gösteren spektrumların türevi alınarak daha iyi ayrılabilceği gözlenmiştir.

İlk zamanlarda sadece 1. ve 2. derece türev spektrumları alınmış, daha sonra elektronik diferantörlerin kullanılmaya başlanmasıyla yüksek dereceli türevlerin alınması mümkün olmuştur (Talsky et al, 1978). Yüksek türev derecelerinin alınmasıyla daha karmaşık spektrumlar ayrılabilmiştir.

Bir fonksiyonun herhangi bir noktasındaki türev dy/dx tir. Absorpsiyon spektrumları söz konusu olduğunda ise türev $dA/d\lambda$ olacaktır. Spektrumun herhangi bir noktasındaki türev değerleri hesaplanıp dalga boyunun fonksiyonu grafik edildiğinde 1. türev absorpsiyon spektrumu elde edilir. Buna benzer şekilde 2., 3., ..., n. derece türev spektrumları

sırasıyla $d^2A/d\lambda^2$, $d^3A/d\lambda^3$,, $d^nA/d\lambda^n$ değerleri ile dalga boyu arasında oluşturulabilir.

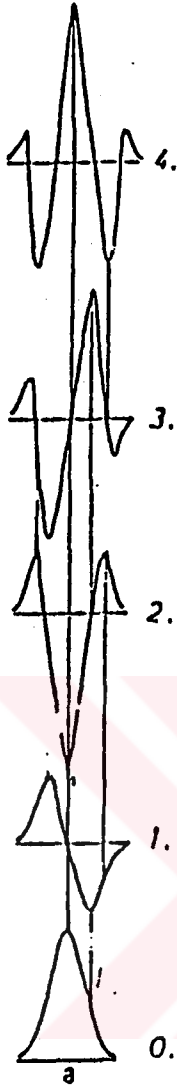
Bir spektrumun türevinin alınmasının en büyük sebebi orjinal spektrumlarda görülmeyen zayıf bazı spektral özelliklerin (örn. omuz) türevde belirgin hale gelmesidir. Bunun yanısıra birbirine benzer ve yakın olan spektrumlardaki çok küçük değişimleri de ortaya çıkararak ayırt eder. Bu şekilde bir çok analitik problemin çözülmesi mümkün olabilir (Talsky et al, 1978).

Şekil 3.1a 'da basit bir pikin absorpsiyon ve 1. -4. derece türev spektrumları verilmiştir. Bu şekilden şu sonuçları çıkarabiliriz:

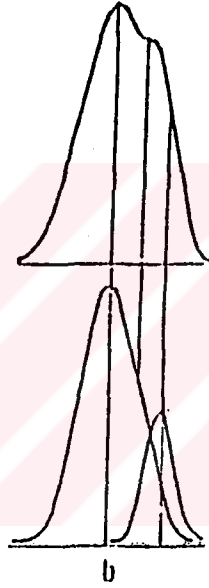
1- Bir pikin birinci derece türev spektrumu alındığında dönüm noktalarının bulunduğu dalga boylarındaki ekstramumlar oluşmakta, orjinal pikteki ekstramumların karşılığı oluşan dalga boylarında ise türev eğrisi sıfırdan geçmektedir.

2- Orjinal spektrumdaki bir pike karşılık n. derece türev spektrumunda n+1 tane pik oluşmaktadır.

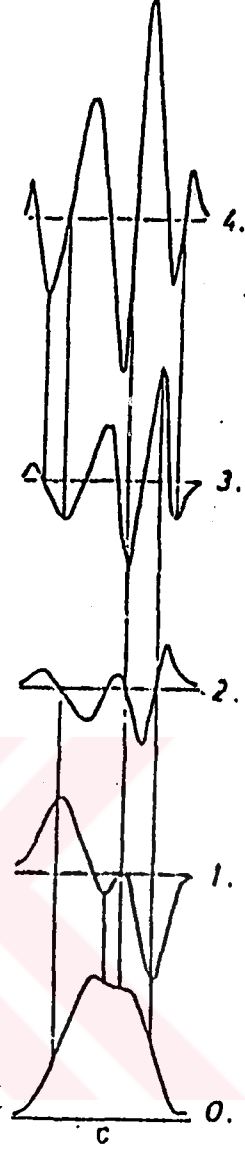
3- Türevin derecesi arttıkça pikler keskinleşmekte ve daralmaktadır. Bu durum saflık testleri ve maddenin tanınmasında önemlidir.



Şekil 3.1a



Şekil 3.1b



Şekil 3.1c

Şekil 3.1a Basit bir pikin absorpsiyon ve 1.-4. derece türev spektrumları

Şekil 3.1b İki maddenin absorpsiyon piklerinin üstüste geldiği durumdaki spektrumları

Şekil 3.1c İki maddenin spektrumlarının çakıştığı durumdaki absorpsiyon ve 1.-4. derece türev spektrumları

4- Orjinal spektrumda absorpsiyon maksimumunun bulunduğu dalga boyunda 2. derece türev spektrumunda bir minimum, 4. derece türev spektrumunda bir maksimum ortaya çıkmakta, 1. ve 3. derece türev spektrumları ise bu dalga boyunda sıfırdan geçmektedir.

5- Orjinal spektrumda bulunan omuzlar tek sayılı türev spektrumlarında ekstramumlara dönüşmektedir. Bundan çakışan piklerin çözülmesinde yararlanılır. Şekil 3.1b 'de görüldüğü gibi iki maddenin absorpsiyon pikleri üst üste geldiği zaman orjinal spektrumdaki küçük pik omuz şeklinde görülür. Bu omuzdan tek dereceli türev spektrumlarında oluşan ekstramumlar her iki maddenin diğerinin etkisi olmaksızın kantitatif tayinine olanak sağlar. Şekil 3.1c 'de ise çakışan iki maddenin absorpsiyon ve 1. - 4. derece türev spektrumları görülmektedir.

3.1. Türev Ölçüm Teknikleri

Absorpsiyon spektrumunda herhangi bir dalga boyunda Lambert-Beer Yasası geçerlidir ($A = \epsilon \cdot b \cdot c$). n. Dereceden türev spektrumunda türev genişliği yada türev absorbansı D_n aşağıdaki eşitlik ile verilir.

$$D_n = d^n A / d\lambda^n = (d^n \epsilon / d\lambda^n) \cdot b \cdot c$$

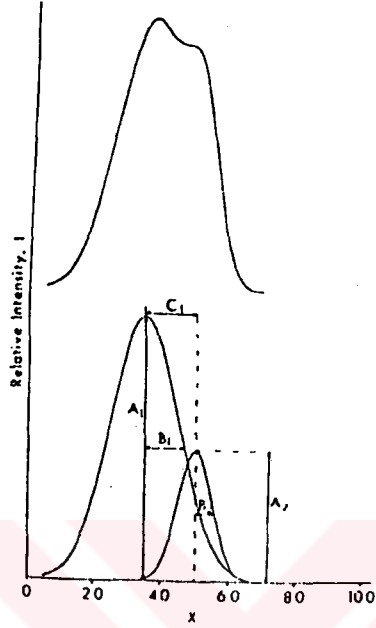
Görüldüğü gibi Lambert-Beer Yasasının geçerli olması koşuluyla türev absorbans değeri ile konsantrasyon arasında doğrusal bir ilişki vardır. Türev spektrofotometrisiyle kantitatif analizin temelini bu eşitlik oluşturur.

Türev Ölçüm teknikleri ile kantitatif analizde küçük spektral özelliklerden yararlanabilmek ve bilinmeyen ve/veya değişebilen şiddetli girişim yapan bandların, analitin spektral bandıyla çakışmasıyla oluşan hatanın azaltılması mümkün olur. Buna göre absorpsiyon spektrumları çakışan iki maddenin hassas bir şekilde yanyana tayininde türev spektrofotometrik yöntem önerilmektedir.

Şekil 3.2 'de iki çakışan band ve bunların toplam eğrisi görülmektedir. Burada büyük olan band girişime neden olan girişim yapan banddır. Küçük olan band ise girişim yapan bandın varlığında şiddeti ölçülmek istenen analit banddır ve toplam eğride omuz olarak görülmektedir.

Girişim yapan band ile analit bandın çakışması durumunda absorpsiyon spektruma toplam intensite ve tanjant base-line teknikleri kullanılabilir.

Toplam İntensite Tekniğinde; toplam eğrinin analit maksimumundaki toplam şiddeti ölçülür.



Şekil 3.2 Çakışan iki band ve bu bandların toplam eğrisi

Tanjant base - line yönteminde; toplam eğriye bir teğet çizilir. Bu teğetin analit maksimumuna olan uzaklığı ordinata paralel olarak ölçülerek uygulanabilir. Bu iki yöntem kısmen doğru sonuç vermektedir.

Toplam eğrinin türevinde, peak-to-peak ölçümü veya tanjant base-line ölçümü kullanılır.

Peak-to-Peak Tekniği; birbirini izleyen iki ektramun arasındaki uzaklık, ordinata paralel olarak ölçülerek uygulanır(Talsky et al, 1978).

Karışımlarda birbiriyle çakışan bantlar olduğunda her bir komponentin tayini için zero-crossing yöntemi önerilmektedir. Değişik türev derecelerine uygulanabilen bu yöntemde bir komponentin türev absorbansının sıfır olduğu dalga boyunda diğerinin verdiği pik yüksekliği ölçülür. Türev band yüksekliği ile konsantrasyon arasında ilgi araştırılır.

Birbiriyle çakışan analit ve girişim yapan bandın hangi koşullarda ayrılabilceği ve hangi değerlendirme yönteminin daha uygun olduğu yapılan bir çalışmada geliştirilen bilgisayar programı pratikte karşılaşılan problemleri çözmekte oldukça yararlı veriler elde edilmiştir(O'Hever, 1976). Bu çalışma ile şu sonuçlar elde edilmiştir:

Toplam İntensite tekniğinde yapılan toplam hatanın büyük bir kısmı sistematik hatalardan ileri gelir, türev ölçümü ile bu giderilir. Genellikle zero-crossing yönteminde en iyi çalışma şartları analit ve girişim yapan band maksimumları birbirine yeterince yakınsa çalışılmalıdır. Diğer taraftan grafik yöntemide analit band genişliği, girişim yapan band genişliğinden daha az olduğunda kullanılır.

Sonuç olarak, türev ölçümleri ile, kantitatif analizde küçük spektral özelliklerden yararlanabilecek ve bilinmeyen ve/veya değişebilen şiddetteki girişim yapan bandın, analit

bandla çakışması ile oluşan hatanın azaltılması mümkün olmuştur. Ayrıca bu yöntem rutin, pratik analitik çalışmaların uygulanmasında diğ er yöntemlere göre daha basit ve ucuzdur.

3.2. T rev Spektrofotometrisinin Kullanım Alanları

- Maksimum dalga boyunun kesin olarak belirlenmesinde
- Rezol syonda artış
- Maddelerin tanınmasında
- Saflık kontrol 
- Eser analiz
- Karışımın eşzamanlı analizleri
- Bulanık   zeltiilerde kantitatif analiz
- Matriks etkisinin giderilmesi

4. DENEYSEL BÖLÜM

4.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

Spektrofotometre : Philips 8700 UV/VIS
türev spektrofotometresi

Yazıcı : Philips Printer/Plotter

Küvet : Hellma 100 QS, 10.00mm

Analitik Terazî : Sartorius (1/1000 g)

Çalkalama Aleti : Nüvel SL 350 çalkalayıcı

Ultrasonik Banyo : Azaklı

Bidestile Su Cihazı : Nüve NS 278 TS 8234

Hesap Makinesi : Casio FX-3600 P

4.2. Maddeler

Farmasötik saflıktaki Aspartam Atabay İlaç Fabrikasından

temin edildi. Diyet kola ve tatlandırıcı tablet piyasadan satın alındı. Glasial asetikasit, formik asit, asetikanhidrit, potasyum ftalat ve kristal viole TS Merck firmasından temin edildi. Tekelden temin edilen etilalkol destillendikten sonra ve su bidestile su cihazı ile destillendikten sonra kullanıldı. (Diyet kolada 240 mg/l, tatlandırıcı tablette 20 mg Aspartam bulunmaktadır.)

4.3. Çözeltiler

§50'lik Etilalkol-Su (v/v) : 500 ml destillenmiş etilalkol 1000 ml'ye bidestile su ile seyreltilerek §50'lik etilalkol-su karışımı hazırlandı.

Stok Aspartam Çözeltisi (1000 µg/ml) : Hassas olarak tartılan 100 mg Aspartam §50'lik etilalkol - su karışımı ile 100 ml'ye setreltilerek hazırlandı.

0.1 N Perklorikasit Çözeltisi : Glasial asetikasit ve asetikanhidrit ile 0.1 N Perklorikasit hazırlandı. Potasyum hidrojenftalat 50 ml glasial asetikasitte çözüldükten sonra violet TS indikadörlüğünde hazırladığımız perklorikasit çözeltisiyle titre edilerek standardize edildi (N=0.1088)

Violet TS İndikatörü : 0.1 g Kristal violet hassas olarak tartılarak 10 ml glasial asetikasitte çözümlenerek hazırlandı.

Örnek Diyetkola Çözeltisi : Piyasadan satın alınan diyet kola; önce kaptan kaba aktarılarak sonra ultrasonik banyoda 15 dak. bekletilerek gazı giderildikten sonra kullanıldı. Bu çözeltiden 2.5 ml alınarak 25 ml'lik balonjojeye konularak % 50'lik etilalkol-su karışımı ile hacmine tamamlandı.

Örnek Tablet(I) Çözeltisi : 100 adet tablet ayrı ayrı tartılıp ortalama tablet ağırlığı bulundu. Tabletler porselen havanda iyice öğütüldü. Bu karışımdan 100 mg aspartama eşdeğer olan miktar hassas olarak tartılıp 100 ml balonjojeye konuldu. 20-30 ml kadar %50'lik etilalkol-su karışımı ilave edilerek çalkalıyıcıda 30 dak. çalkalandıktan sonra hacmine tamamlandı ve beyaz bantlı süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntünün ilk 15 ml'si atıldı. Sonraki süzüntüden 7.5 ml alınarak 25 ml'lik bolonjojeye kondu ve hacmine %50'lik etilalkol-su karışımı ile tamamlanarak örnek tablet(I) çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti türev spektrofotometrik yöntemde kullanıldı.

Örnek Tablet(II) Çözeltisi : 100 adet tablet ayrı ayrı tartılıp ortalama tablet ağırlığı bulundu. Tabletler porselen havanda iyice öğütüldükten sonra kullanıldı. 300 mg aspartama eşdeğer miktar hassas olarak tartıldı ve 250 ml'lik erlene kondu. Üzerine 1.5 ml formikasit ve 60 ml glasial asetikasit ilave edilerek örnek tablet(II) çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti USP'de önerilen titrimetrik yöntemde kullanıldı.

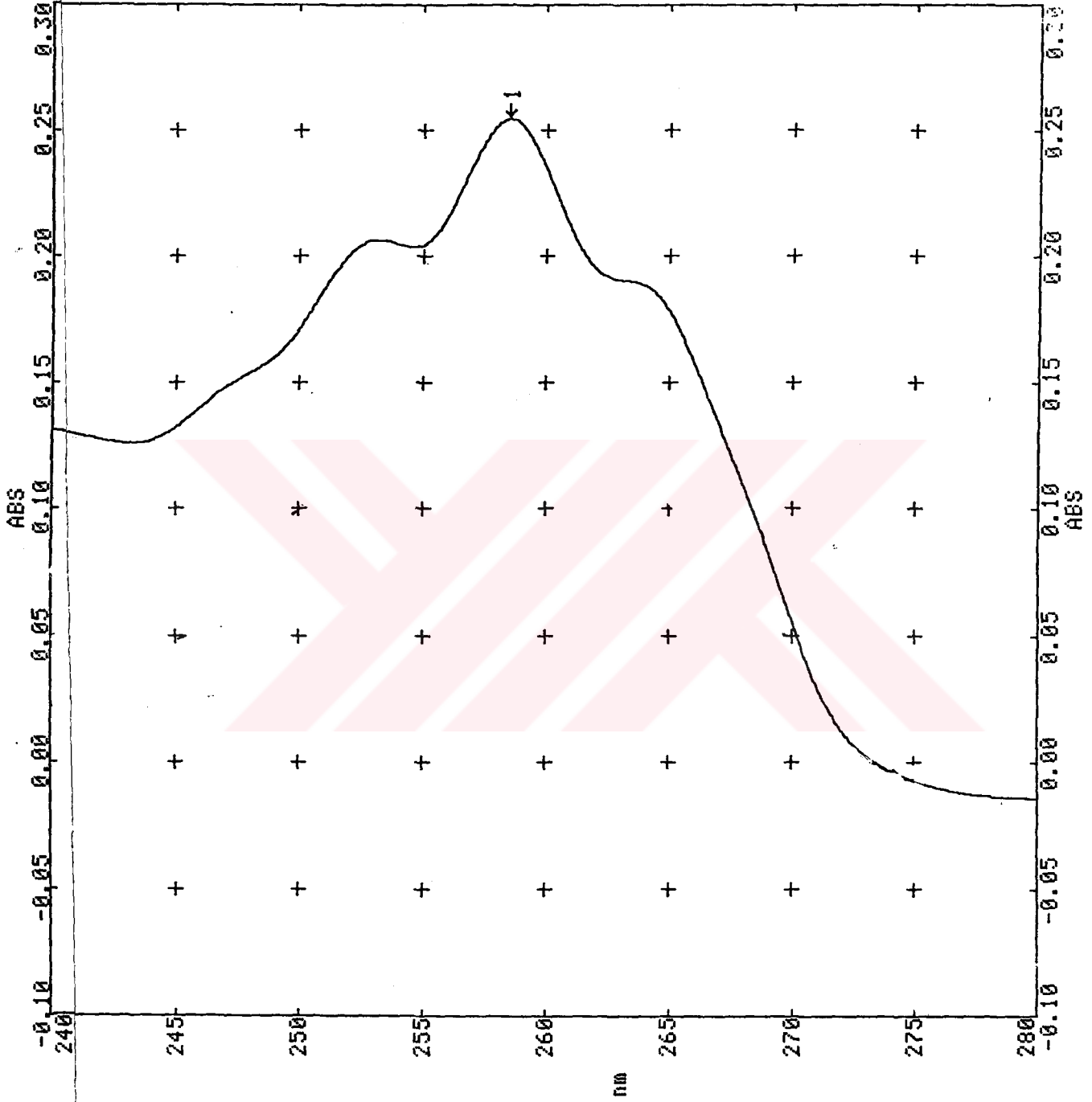
4.4. Türev Spektrofotometrik Yöntem ile Tatlandırıcı Tabletlerde Aspartam Miktar Tayini

4.4.1. Analiz Koşullarının Saptanması

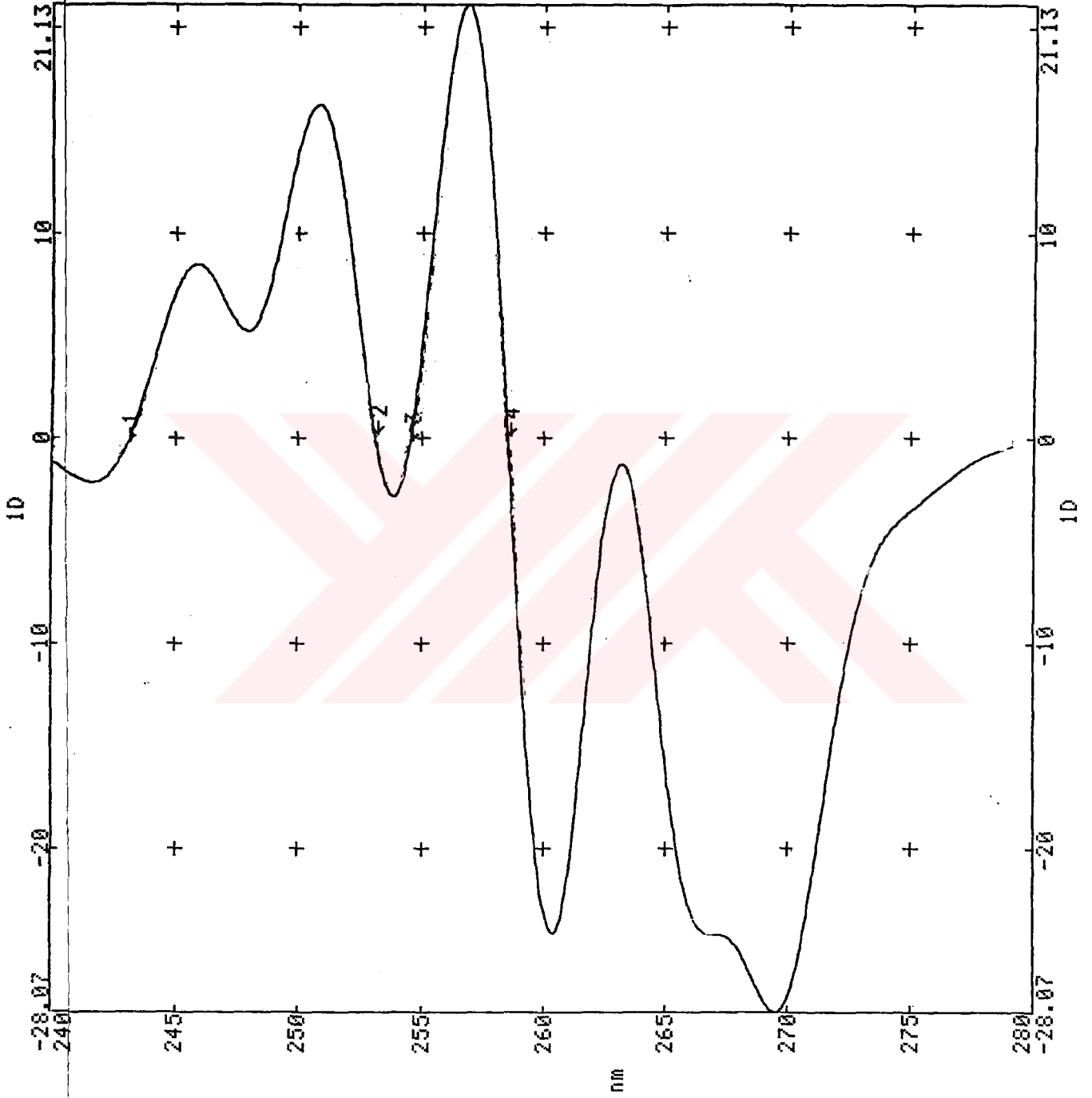
Tatlandırıcı tabletlerde bulunan Aspartam miktar tayini için birçok çalışma denendi. Öncelikle Aspartamın sudaki ve daha sonra çeşitli çözücülerdeki çözeltileri kullanılarak absorpsiyon ve 1. ve 4. derece türev spektrumları alınarak çeşitli dalga boylarında çalışıldı. Fakat bu denemelerde tekrarlanabilir sonuçlar elde edilemedi.

İtalya'daki tabletlere başarı ile uygulanan bir yöntemi ülkemizdeki tabletlere uygulamaya karar verdik. Bunun için optimum koşulları saptadık. Bu amaçla % 50'lik etilalkol-su karışımı ile hazırlanan 500 µg/ml'lik Aspartam çözeltisinin absorpsiyon ve 1. -4. derece türev spektrumları 240 nm-280 nm aralığında, 250 nm/dak tarama hızı, düzeltme orta derece olarak ve 2 nm band genişliği ile alındı. Şekil 4(1,2,3,4,5) te bu spektrumlar verilmiştir.

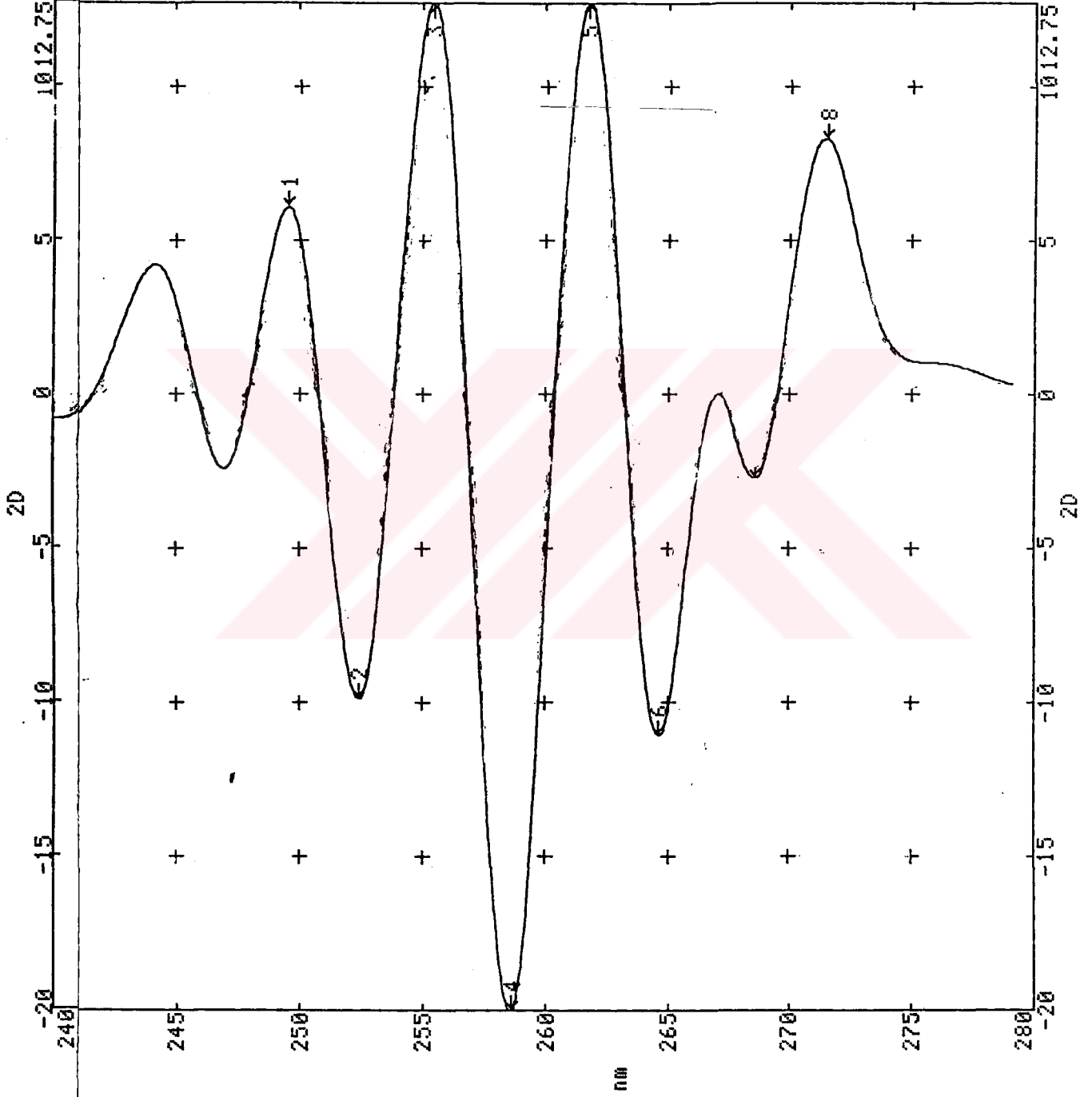
Bu spektrumlar incelendikten sonra 2. derece türev spektrumunda 252.4 nm ile 255.3 nm'lerdeki türev absorbans değerlerinin pikten pike değerleri (${}^2D_{252.4-255.3}$) ve 3. derece türev spektrumunda 253.9 nm ile 256.9 nm'lerdeki türev absorbans değerlerinin pikten pike değerlerinin (${}^3D_{253.9-256.9}$) uygun olduğu saptandı.



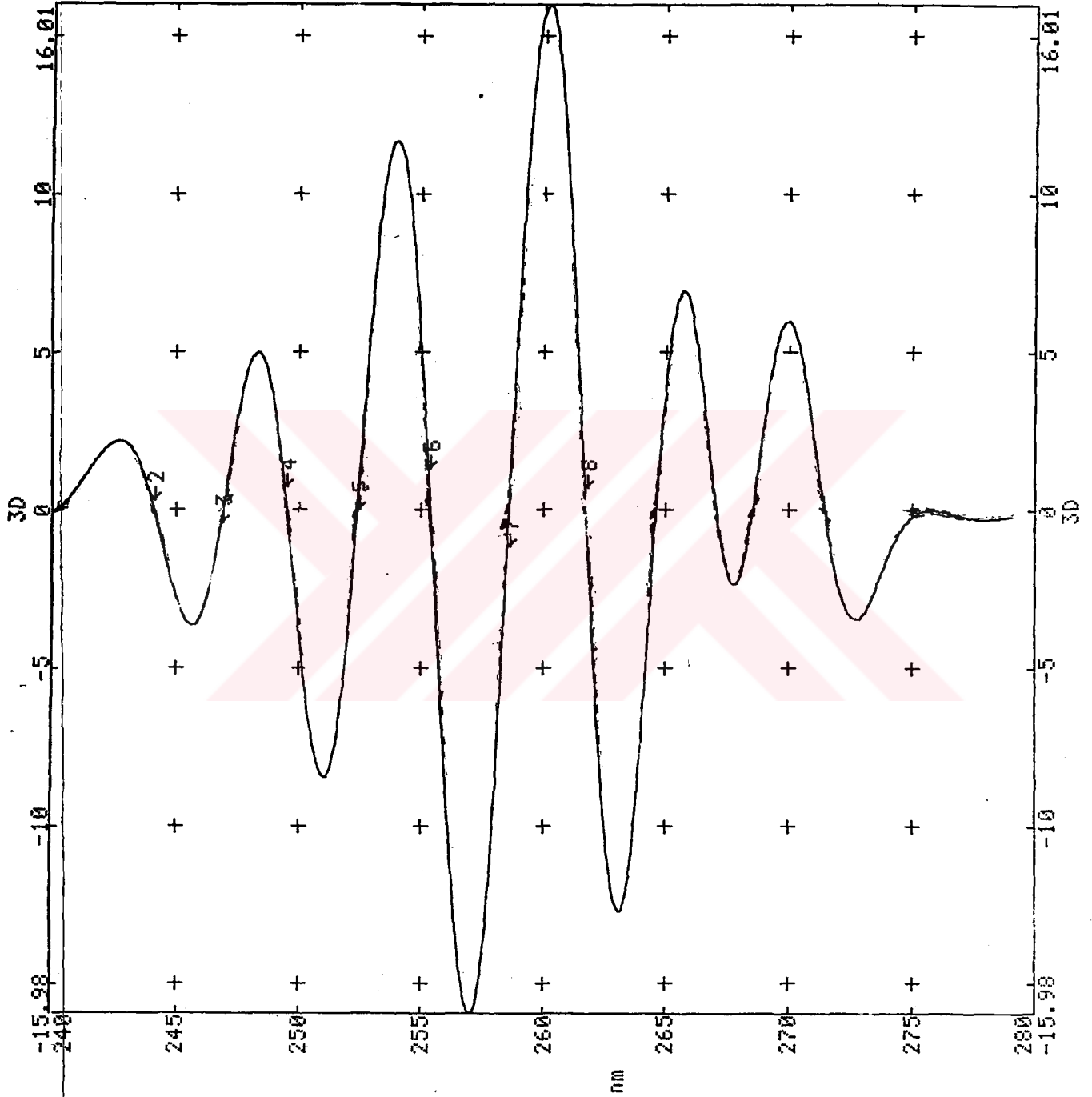
Sekil 4.1. 500 µg/ml 'lik Aspartam çözeltisinin
absorpsiyon spektrumu



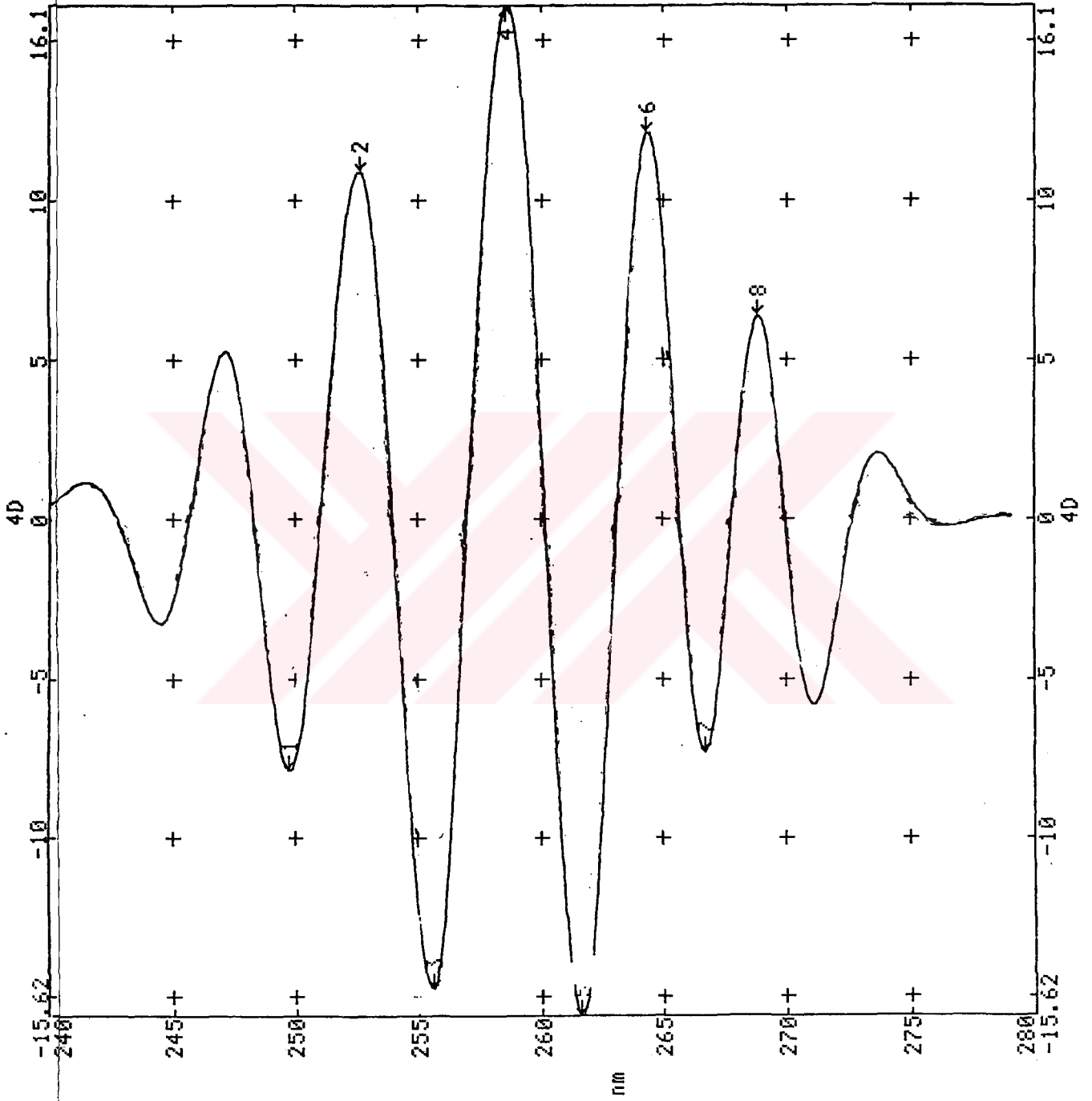
Sekil 4.2. 500 µg/ml 'lik Aspartam çözeltisinin
1. derece türev spektrumu



Sekil 4.3. 500 µg/ml 'lik Aspartam çözeltisinin
2. derece türev spektrumu



Şekil 4.4. 500 µg/ml 'lik Aspartam çözeltisinin
3. derece türev spektrumu



Sekil 4.5. 500 µg/ml 'lik Aspartam çözeltisinin
4. derece türev spektrumu

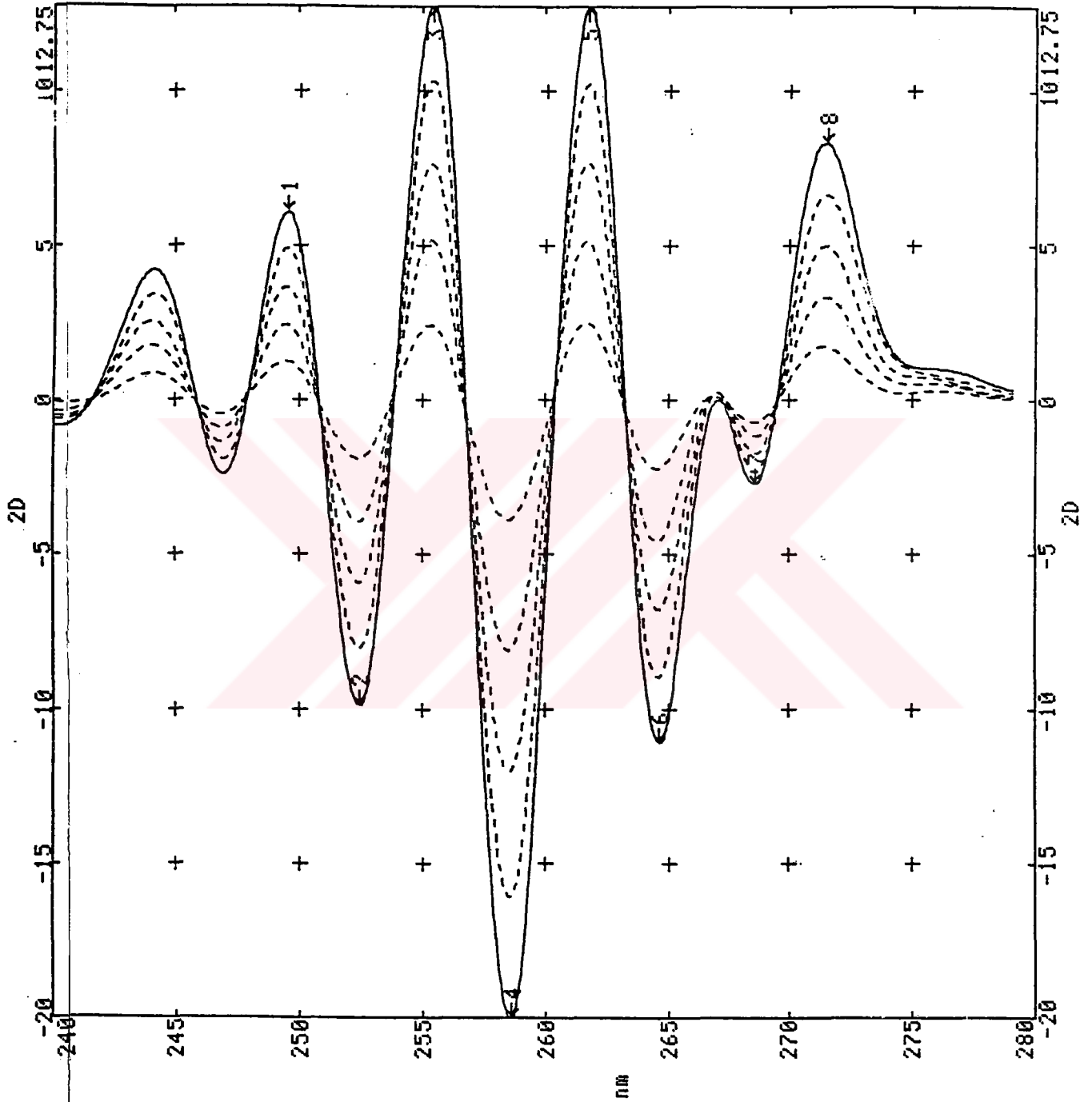
4.4.2. Ölçü Eğrisinin Hazırlanması

Aspartama ait ölçü eğrisinin hazırlanması için 1000 µg/ml konsantrasyonunda hazırlanan stok Aspartam çözeltisinden 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 ml alınarak beş ayrı 25 ml'lik balonjojeye konuldu ve %50'lik etilalkol-su karışımı ile hacmine tamamlandı. Hazırlanan bu çözeltilerin 2. ve 3. derece türev spektrumları alındı. Bu spektrumlar şekil 4.(6,7)'de gösterilmiştir.

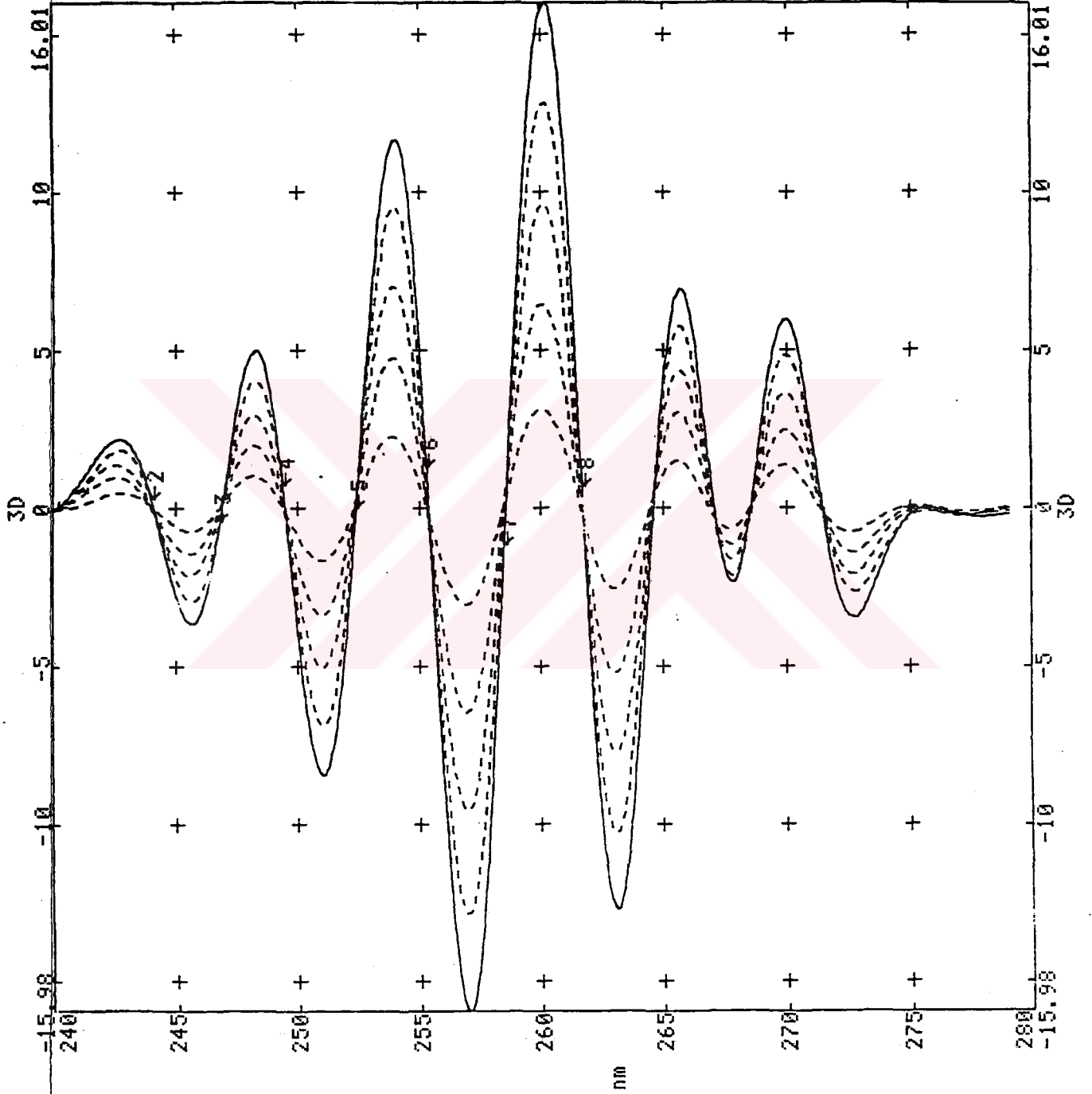
100 - 500 µg/ml konsantrasyonları arasındaki aspartam çözeltilerinin 2. ve 3. derece türev absorbans pikten pike değerleri ($^2D_{252.4-255.3}$ ve $^3D_{253.9-256.9}$) arasında grafikler çizilerek ölçü eğrileri oluşturuldu. Ölçü eğrilerine ait doğru denklemleri en küçük kareler yöntemine göre hesaplandı. Hazırlanan ölçü eğrileri şekil 4.(8,9)'de ve bu ölçü eğrilerinin regresyon analizleri tablo 4.(1,2)'de verilmiştir.

4.4.3. Tatlandırıcı Tabletlerdeki Aspartama Türev Spektrofotometrik Yöntemin Uygulanması

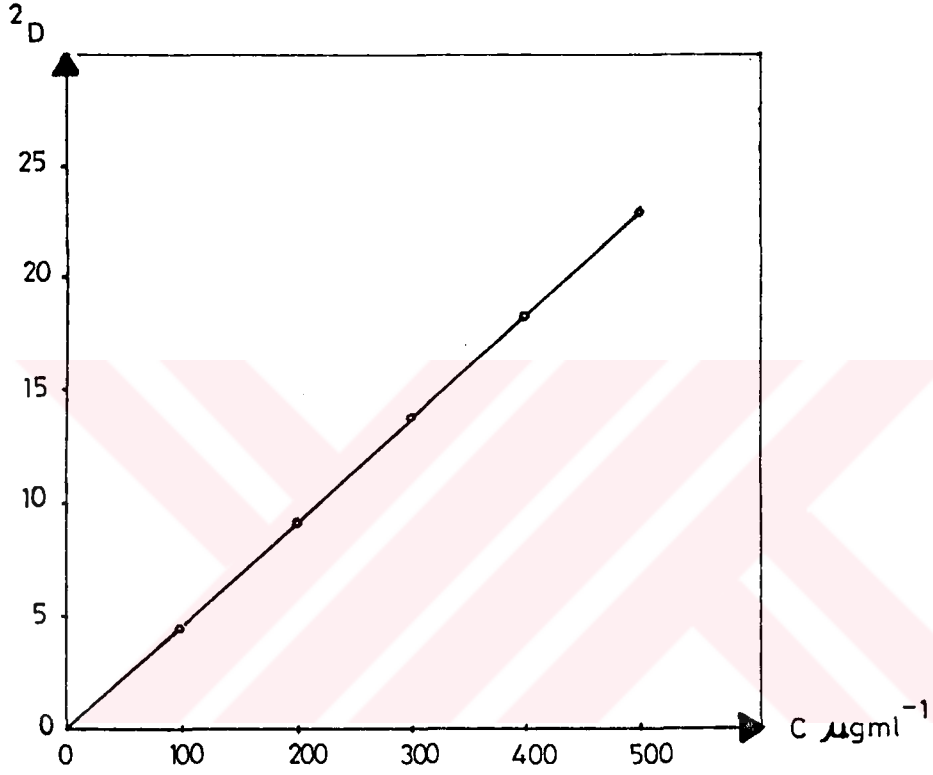
Bölüm 4.4.1'de verilen koşullarda %50'lik etilalkol-su karışımı ile hazırlanan örnek tablet(I) 'in absorpsiyon ve 2. - 3. derece türev spektrumları alındı. Bu spektrumlar şekil 4.(10,11,12)'de görülmektedir.



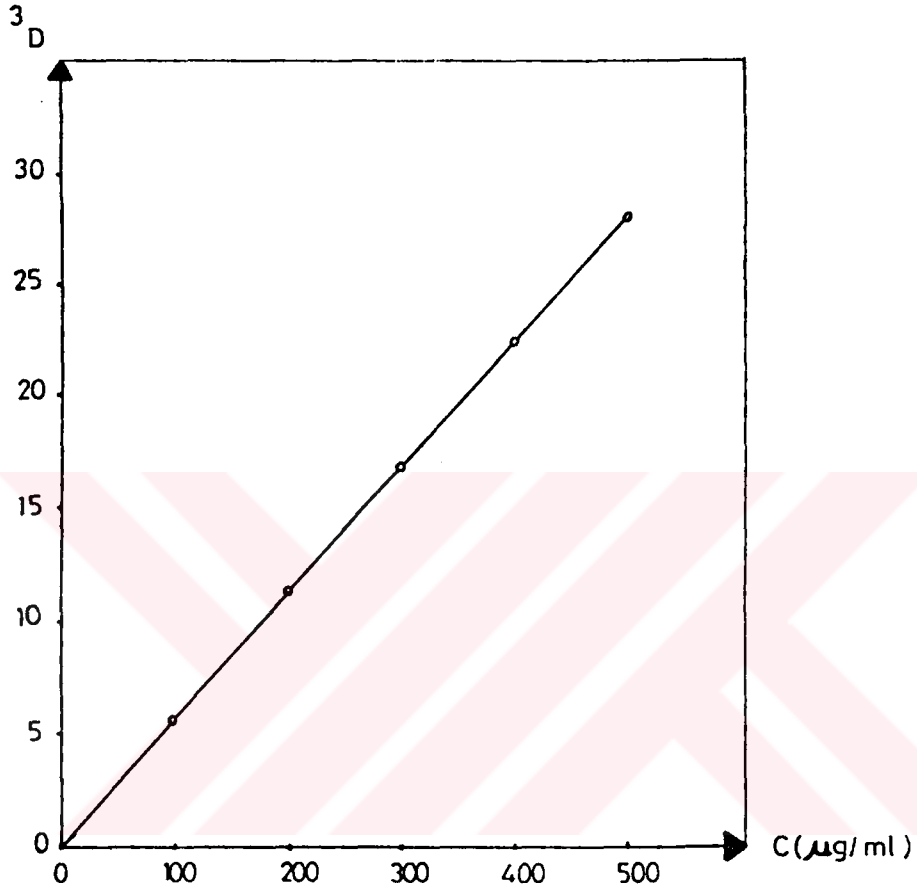
Şekil 4.6. 100-500 µg/ml 'lik Aspartam
çözeltilisinin 2. derece türev
spektrumları



Sekil 4.7. 100-500 $\mu\text{g/ml}$ 'lik Aspartam
çözeltisinin 3. derece türev
spektrumları



Şekil 4.8. 2. Derece türev spektrumunda Aspartama ait
ölçü eğrisi ($2D_{252.4-255.3} = 0.046c + 0.024$)
 $r=0.9999$



Şekil 4.9. 3. Derece türev spektrumunda Aspartama ait
ölçü eğrisi ($^3D_{253.9-256.9} = 0.056c + 0.017$)
 $r=0.9999$

Tablo 4.1 Aspartamın 2. derece türev spektrumuna ait ölçü eğrisinin $^{2D}_{252.4-255.3}$ değerleri ve regrasyon analizleri

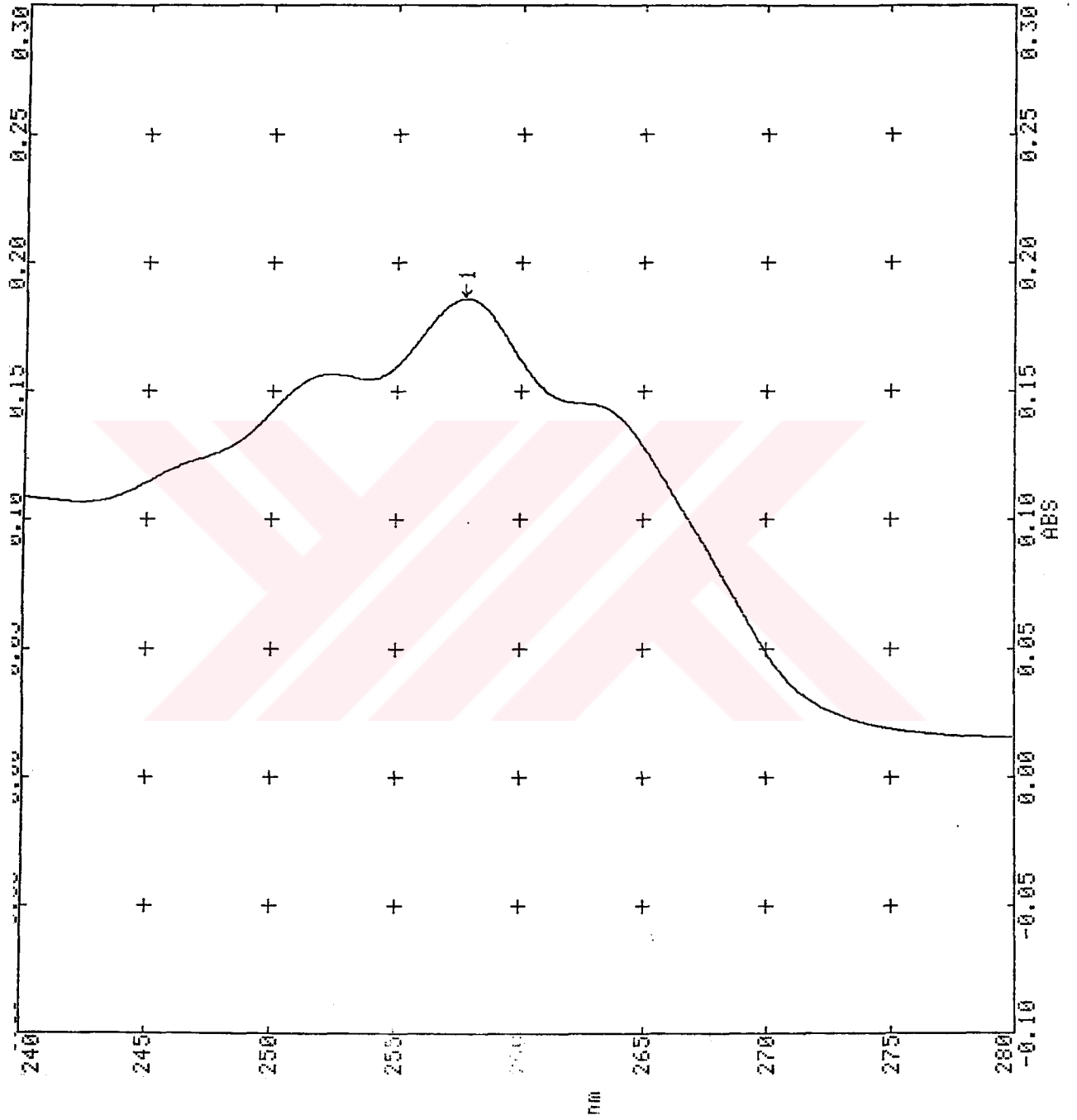
No	C g/ml	$^{2D}_1$	$^{2D}_2$	$^{2D}_3$	2D	S	% S
1	100	4.581	4.659	4.461	4.567	0.10	2.19
2	200	9.223	9.470	9.187	9.293	0.15	1.61
3	300	13.835	13.960	13.893	13.896	0.06	0.43
4	400	18.565	18.709	18.616	18.630	0.07	0.38
5	500	23.12	22.90	22.92	22.98	0.12	0.52
$^{2D}_{252.4-255.3} = 0.046 C + 0.024$ $r = 0.9999$							

	1	2	3	ORTALAMA
a	-0.061	0.223	-0.089	0.024
b	0.046	0.046	0.046	0.046
r	0.9999	0.9998	0.9999	0.9999

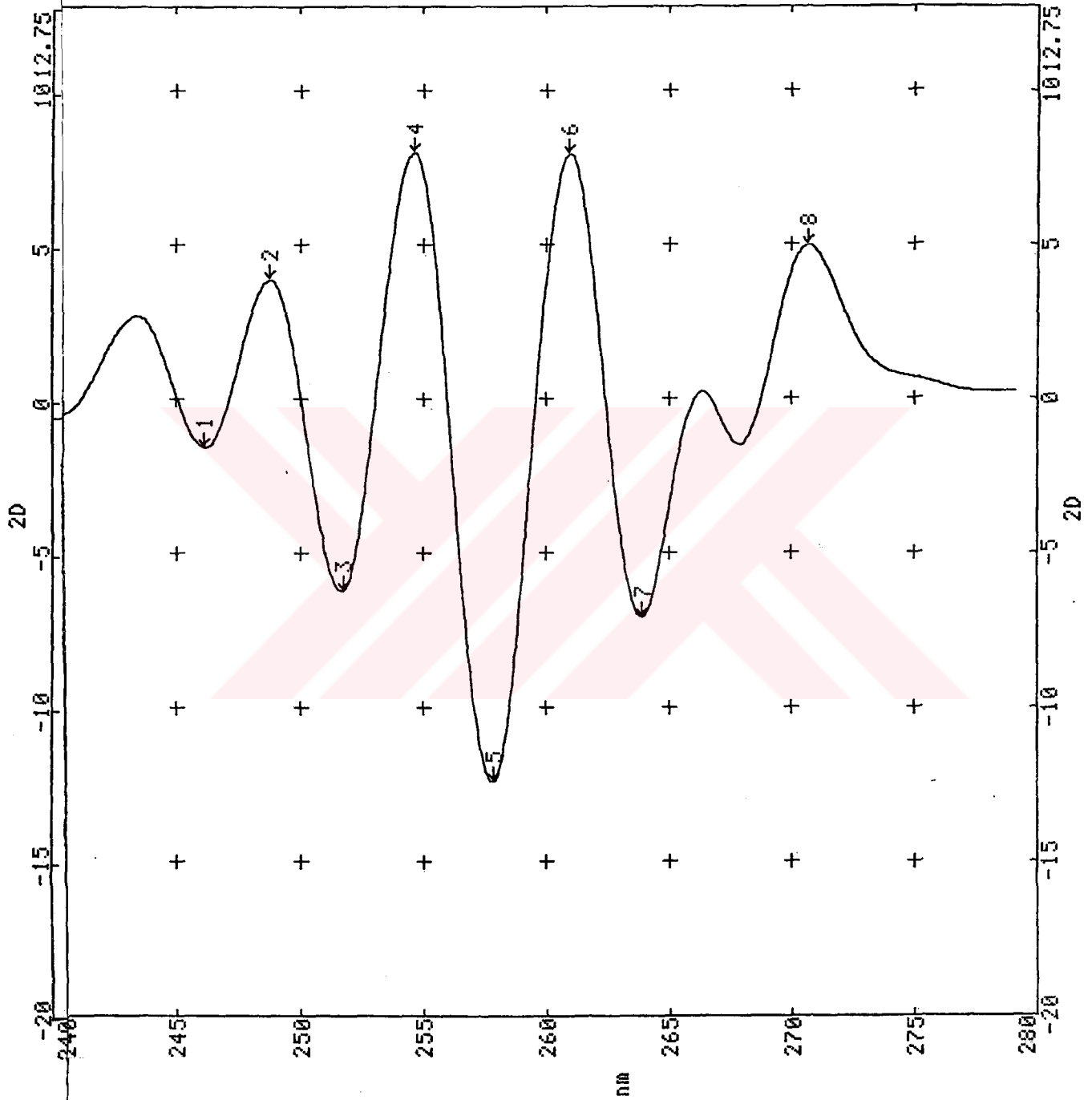
Tablo 4.2 Aspartamin 3. derece türev spektrumuna ait ölçü eğrisinin $^3D_{253.9-256.9}$ değerleri ve regresyon analizleri

No	C g/ml	3D_1	3D_2	3D_3	$^3\overline{D}$	S	% S
1	100	5.562	5.615	5.486	5.554	0.06	1.08
2	200	11.232	11.449	11.134	11.272	0.16	1.42
3	300	16.821	16.951	16.824	16.865	0.07	0.42
4	400	22.522	22.762	22.479	22.588	0.15	0.66
5	500	28.13	27.88	27.82	27.94	0.16	0.57
$^3D_{253.9-256.9} = 0.056 C + 0.017$ $r=0.9999$							

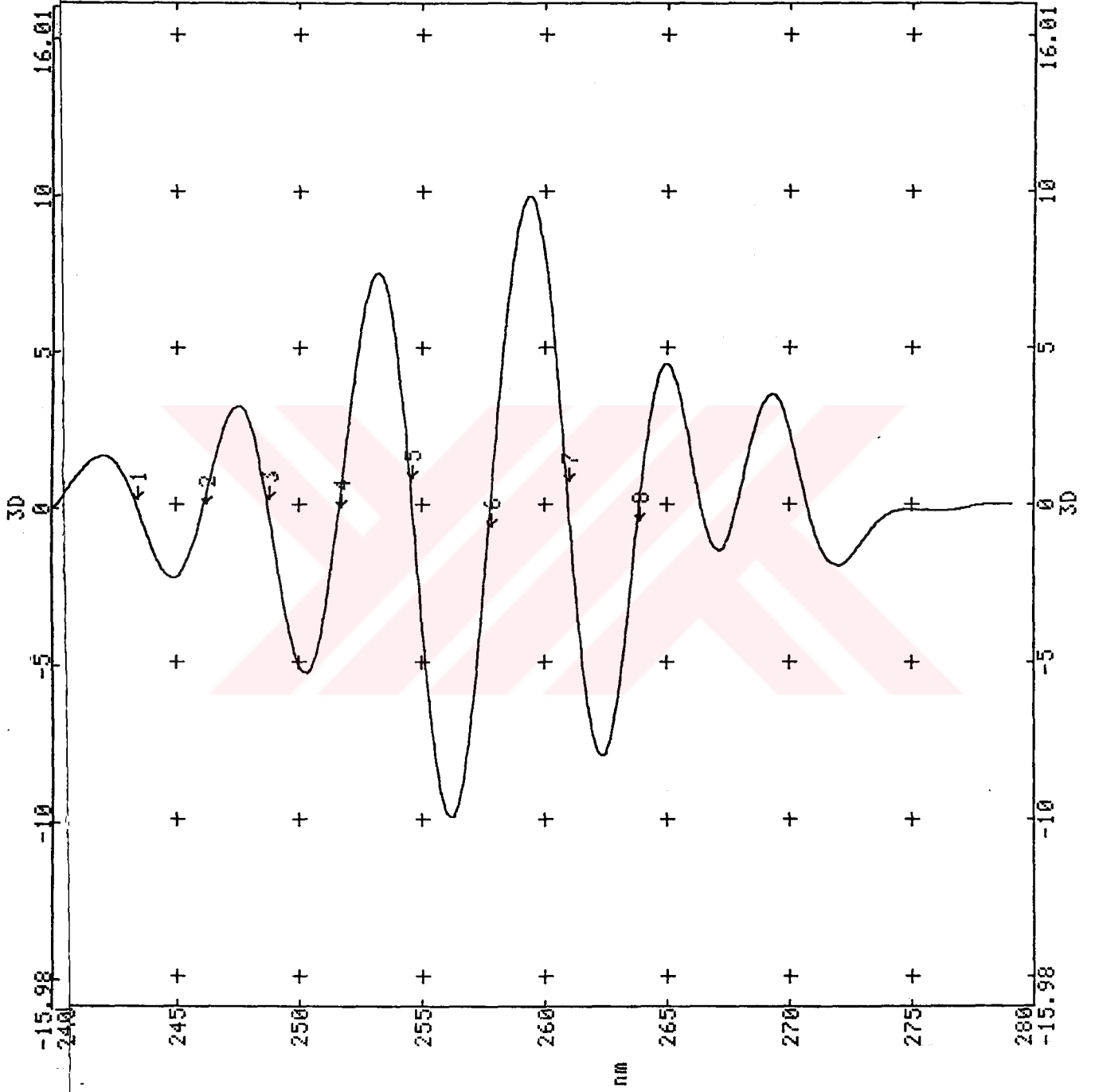
	1	2	3	ORTALAMA
a	-0.074	0.180	-0.055	0.017
b	0.056	0.056	0.056	0.056
r	0.9999	0.9998	0.9999	0.9999



Sekil 4.10. Örnek tablet çözeltisinin
absorpsiyon spektrumu



Sekil 4.11. örnek tablet çözeltisinin
2. derece türev spektrumu



Sekil 4.12. örnek tablet çözeltisinin
3. derece türev spektrumu

2. Derece türev spektrumunda 252.4 nm ile 255.3 nm'deki türev absorbens değerlerinden pikten pike değerleri ($^2D_{252.4-255.3}$) ve 3.derece türev spektrumunda 253.9 nm ve 256.9 nm'deki türev absorbens değerlerinden pikten pike değerlerinden ($^3D_{253.9-256.9}$); ölçü eğrilerindeki karşılıkları bulunarak örnekteki madde miktarı tayin edildi. Tablo 4.3 'de bu yöntem ile elde edilen deneysel veriler verilmiştir.

4.5. USP Yöntemi ile Tatlandırıcı Tabletlerde Aspartam Miktar Tayini

Hazırlanan örnek tablet(II) çözeltisi Violet TS indikatörlüğünde 0.1 N Perklorikasit ile hızla titre edildi.

Tablo 4.4 'de bu yönteme ait deneysel veriler ve istatistiksel sonuçlar verilmiştir.

4.6. Türev Spektrofotometrik Yöntem ile USP Yönteminin Karşılaştırılması

USP yöntemi ile elde edilen sonuçlar ile türev spektrofotometrik yöntemin 2. derece türev spektrumunda ($^2D_{252.4-255.3}$) değerleriyle 3. derece türev spektrumunda ($^3D_{253.9-256.9}$) değerleri ile elde edilen sonuçlar Tablo 4.5 ve Tablo 4.6'da karşılaştırıldı.

Tablo 4.3 Türev Spektrofotometrik Yöntem ile Tatlandırıcı Tablette Aspartam Analizlerine ait Deneysel Veriler

DENEY NO	$^2D_{252.4-255.3}$	mg/tablet
1	13.534	19.58
2	13.610	19.69
3	13.389	19.37
	$^3D_{253.9-256.9}$	mg/tablet
1	16.733	19.90
2	16.834	20.02
3	16.489	19.62

Tablo 4.4 USP Yöntemi ile Tatlandırıcı Tabletlerde
Aspartam Analizinin Deneysel Verileri ve İstatistiksel
Sonuçları

İst. Parametreler		V(ml) HClO ₄	Aspartam Miktarı (mg)	% Kazanım
n	1	9.2	294.6	98.2
	2	9.4	301.0	100.3
	3	9.6	307.4	102.5
$\bar{X}$		9.4	301.0	100.3
S		0.2	6.4	2.15
%S		2.13	2.13	2.14
$\bar{X} \pm t_s / \sqrt{n}$		9.89-8.91	316.89-285.11	105.64-94.96
t=4.30		$\alpha = 0.05$		

Tablo 4.5 Tatlandırıcı Tabletlerdeki Aspartam Analizinde
2. Derece Türev Spektrofotometrik Yöntem Sonuçlarının USP
Yöntemiyle Kıyaslanması

İst. Parametreler		TÜREV SPEKTROFOTO. YÖNTEM II.DERECE TÜREV		USP YÖNTEMİ	
		mg/tablet	% kazanım	mg/tablet	% kazanım
n	1	19.58	97.90	19.64	98.2
	2	19.69	98.45	20.07	100.3
	3	19.37	96.85	20.49	102.5
$\bar{X}$		19.55	97.73	20.07	100.3
S		0.16	0.81	0.42	2.15
%S		0.83	0.83	2.12	2.14
$\bar{X} \pm ts / \sqrt{n}$		19.95-19.15	99.74-95.72	21.11-19.03	105.64-94.96
$t_{(\alpha=0.05)}$		$t_{teorik} = 2.776$		$t_{hesap} = 1.183$	
F		$F_{teorik} = 19.00$		$F_{hesap} = 6.89$	

Bir tablette 20 mg Aspartam bulunmaktadır.

Tablo 4.6 Tatlandırıcı Tabletlerdeki Aspartam Analizinde
3. Derece Türev Spektrofotometrik Yöntem Sonuçlarının USP
Yöntemiyle Kıyaslanması

İst. Parametreler		TÜREV SPEKTROFOTO. YÖNTEM III.DERECE TÜREV		USP YÖNTEMİ	
		mg/tablet	% kazanım	mg/tablet	% kazanım
n	1	19.90	99.50	19.64	98.2
	2	20.02	100.10	20.07	100.3
	3	19.62	98.10	20.49	102.5
$\bar{X}$		19.85	99.23	20.07	100.3
S		0.20	1.03	0.42	2.15
%S		1.01	1.04	2.09	2.14
$\bar{X} \pm ts / \sqrt{n}$		20.35-19.35	101.79-96.7	21.11-19.03	105.64-94.96
t ($\alpha=0.05$)		$t_{teorik}= 2.776$		$t_{hesap}= 0.484$	
F		$F_{teorik}= 19.00$		$F_{hesap}= 4.41$	

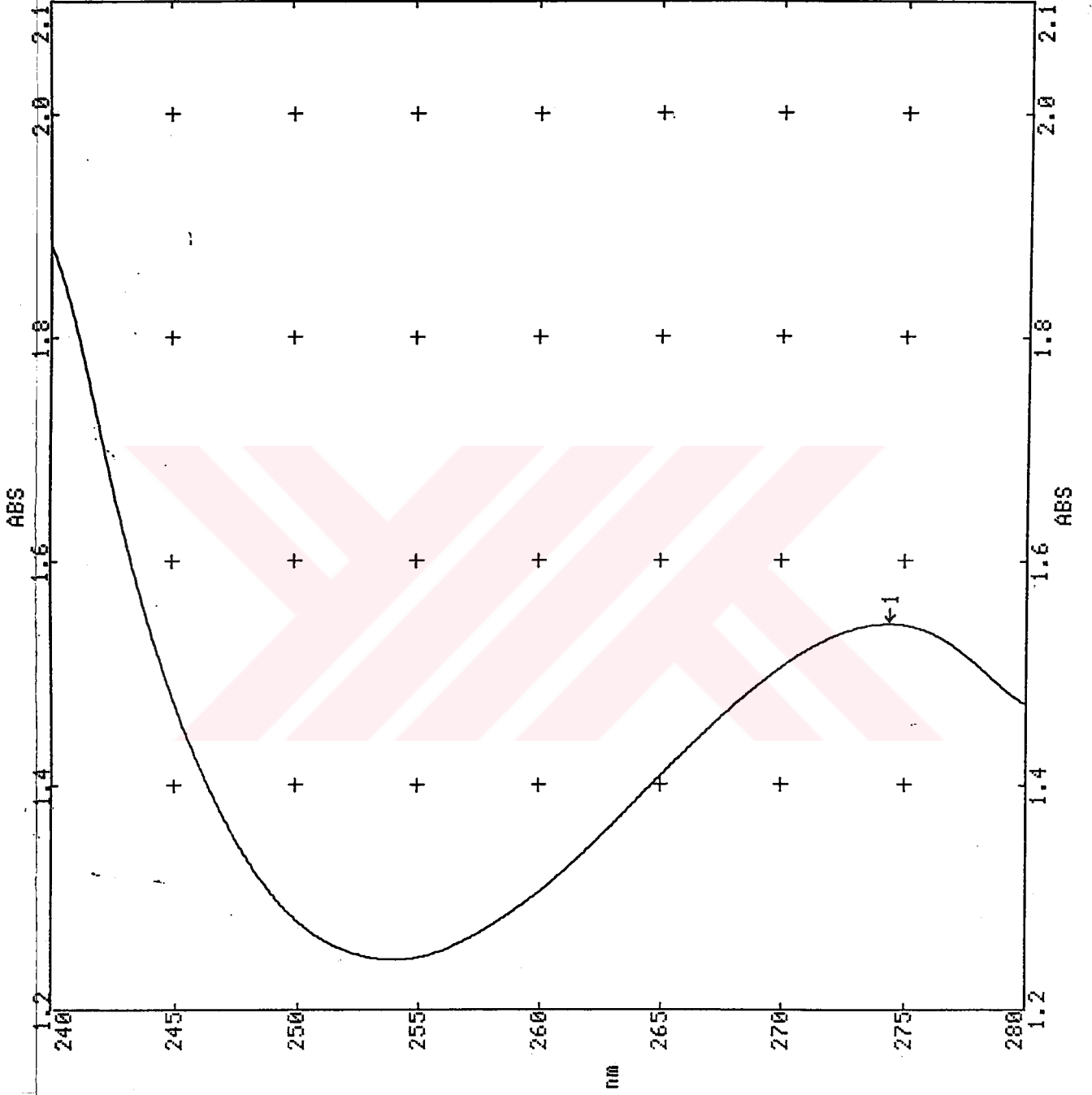
4.7. Türev Spektrofotometrik Yöntem ile Diyet Kola'daki Aspartam Analizi

4.7.1. Analiz Koşullarının Saptanması

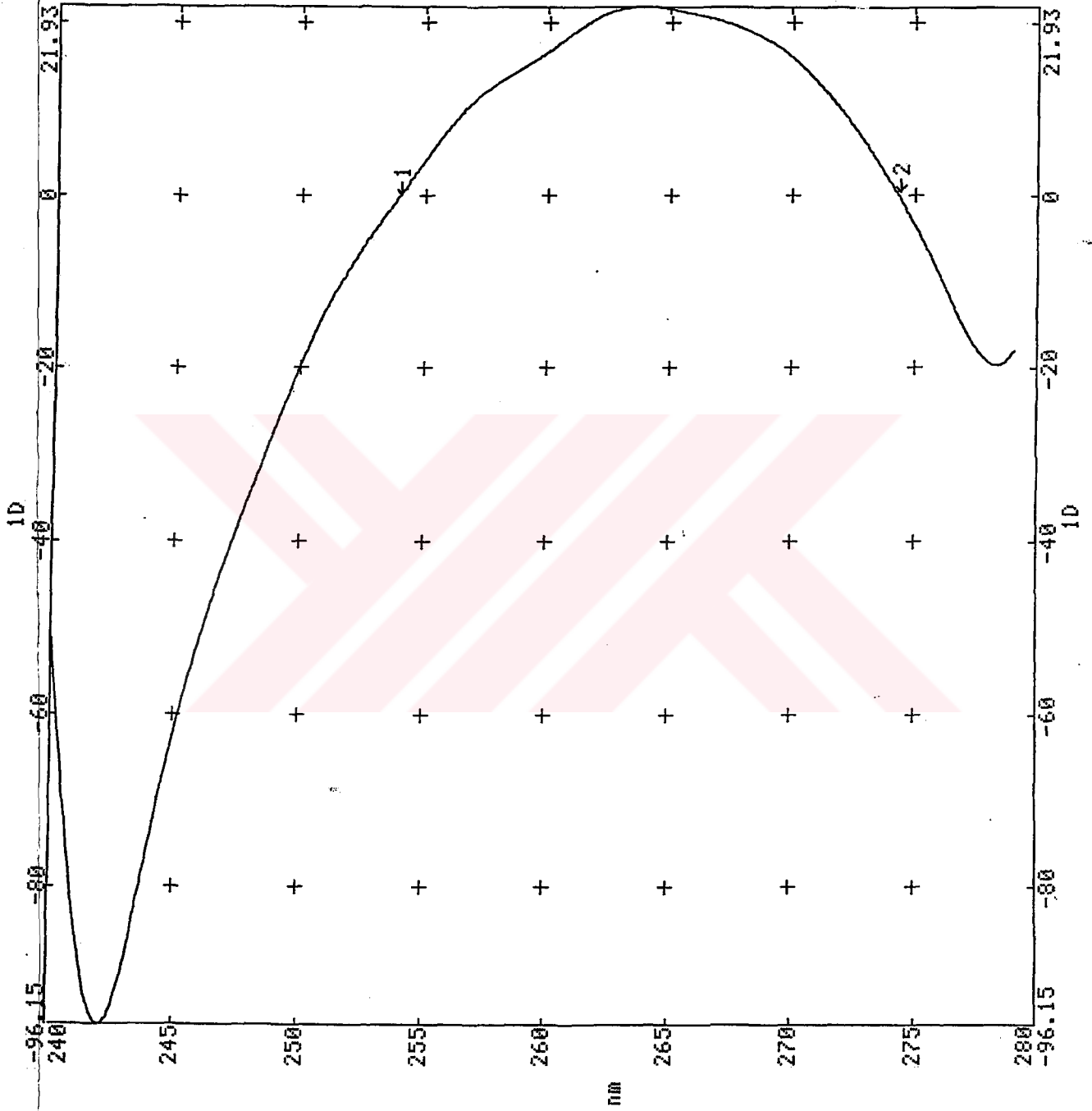
Diyet koladaki Aspartam miktarını tayin için bir çok çalışma denendi. Öncelikle Aspartam bir çok organik maddeye öre suda daha iyi çözündüğünden Aspartamın sudaki özeltillerini kullanarak absorpsiyon ve 1. - 4. derece türev spektrumlarını alarak çeşitli dalga boylarında çalışıldı. Fakat Aspartam suda hidroliz olduğundan tekrarlanabilir sonuçlar elde edemedik.

Daha sonra CH_3COOH ve KH_2PO_4 'ın değişik konsantrasyonlarda ve değişik pH değerlerindeki özeltillerini kullanarak türev spektrofotometrik yöntemle çalışmalar yapıldı. Bu çalışmalarda da tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmedi.

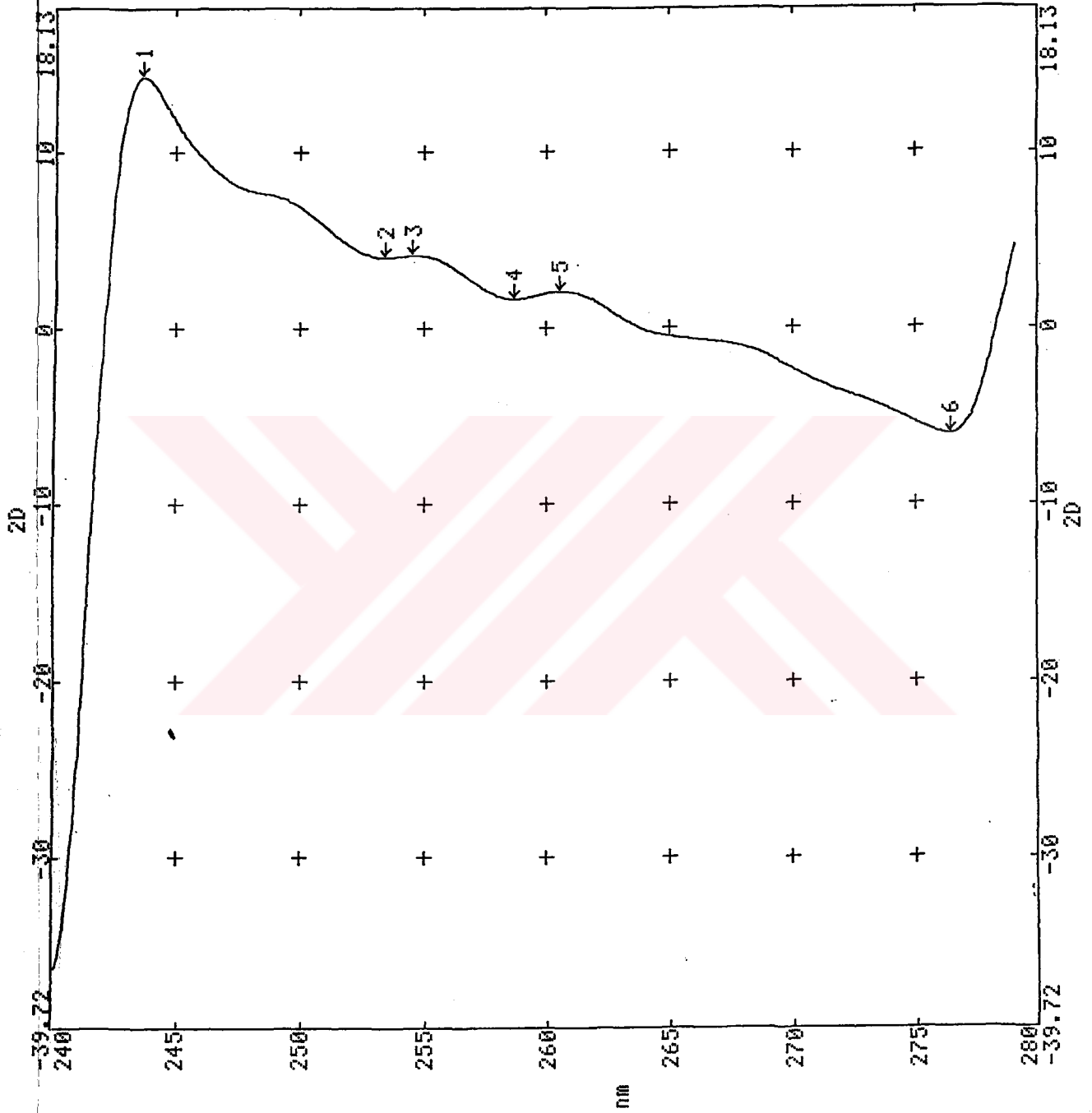
Tatlandırıcı tabletlerdeki Aspartam miktarının tayini için uygulanan yöntemi diyet koladaki Aspartam miktar tayini için uygulamak istedik ve tabletlerdeki miktar tayini için azırlanan ölçü eğrilerini kullanmayı amaçladık. Bunun için 50 'lik etilalkol-su karışımında hazırlanan örnek diyet kola özeltisinin absorpsiyon ve 1. - 4. derece türev spektrumları alındı. Şekil 4.(13,14,15,16,17)' de bu spektrumlar verilmiştir.



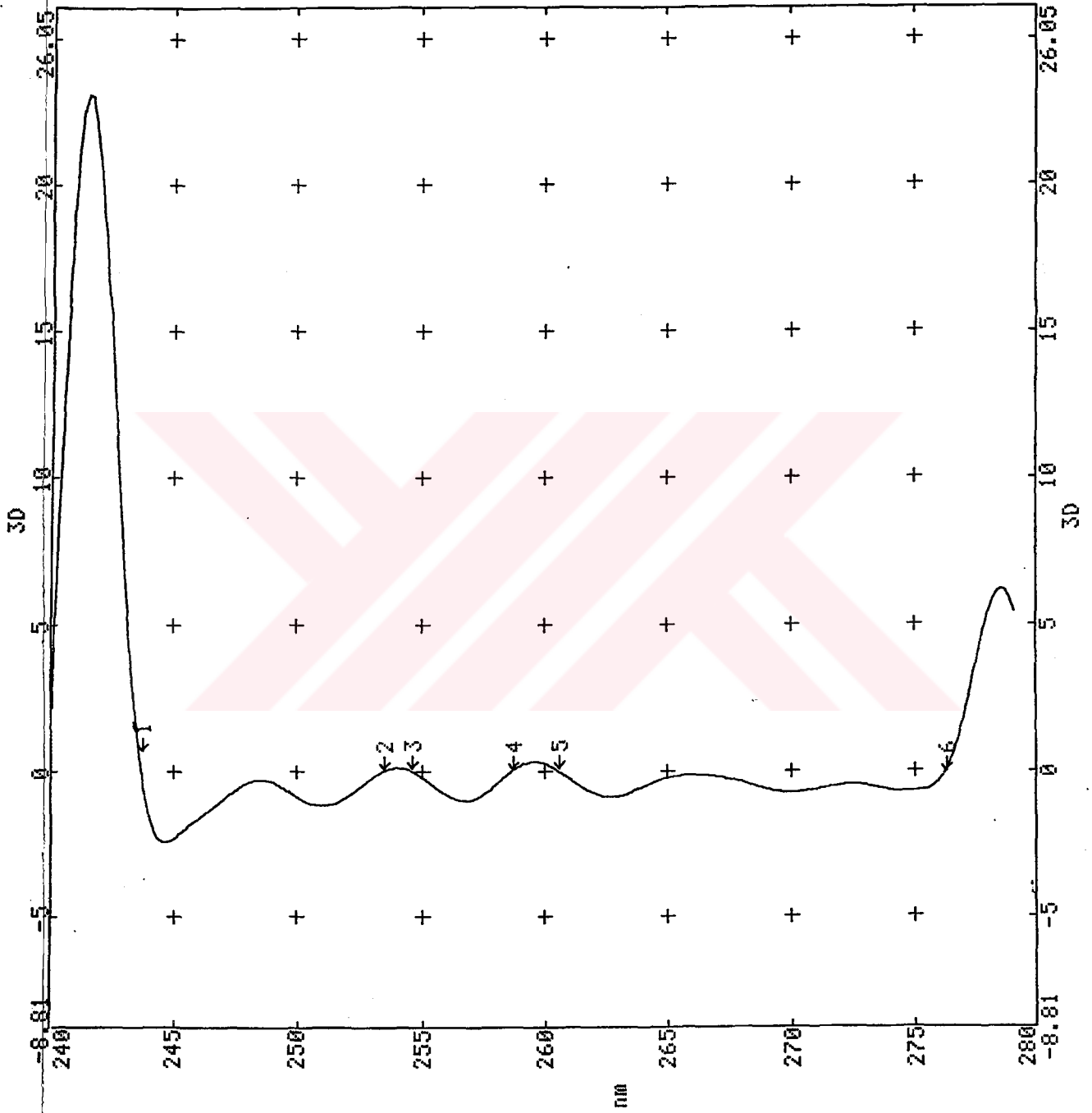
Sekil 4.13. Örnek diyet kola çözeltisinin
%50 'lik etilalkol-su
karışımındaki absorpsiyon spektrumu



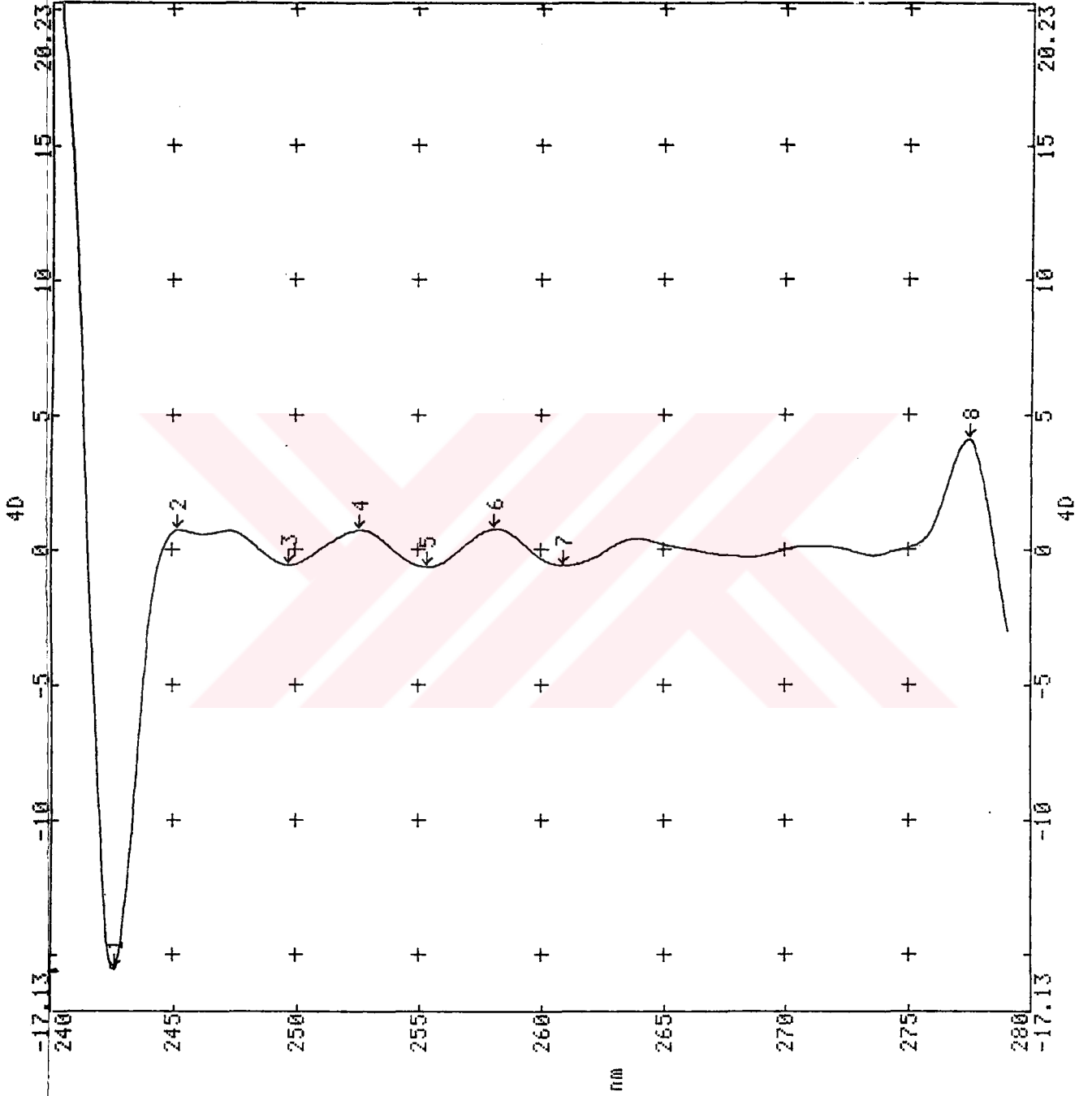
Şekil 4.14. örnek diyet kola çözeltisinin
%50 'lik etilalkol-su karışımındaki
1. derece türev spektrumu



Şekil 4.15. Örnek diyet kola çözeltisinin
%50 'lik etilalkol-su karışımındaki
2. derece türev spektrumu



Sekil 4.16. Örnek diyet kola çözeltisinin
%50 'lik etilalkol-su karışımındaki
3. derece türev spektrumu



Sekil 4.17. Örnek diyet kola çözeltisinin
%50 'lik etilalkol-su karışımındaki
4. derece türev spektrumu

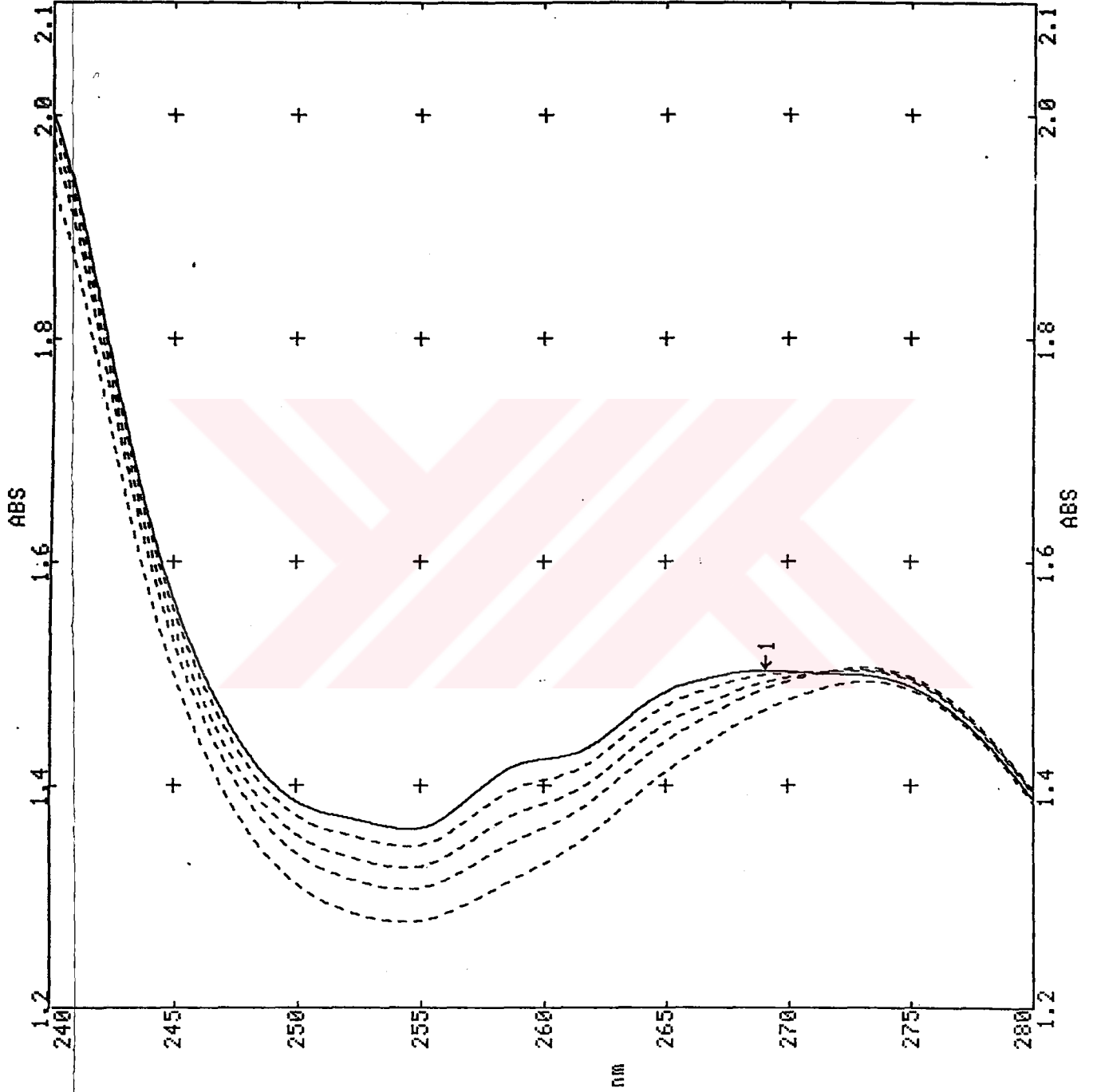
Bu spektrumlar incelendiğinde koladaki Aspartam miktarının az olmasından, koladaki bir çok katkı maddesinin bulunmasından ve örnek çözeltisinin renkli olmasından dolayı bu ölçü eğrisini kullanamayacağımıza karar verildi. Matriks etkisini gidermek için standart katma yönteminin uygulanmasının daha iyi olacağı düşünüldü.

4.7.2. Ölçü Eğrisinin Hazırlanması

24 µg/ml Aspartama eşdeğer örnek diyet kola çözeltisi hesaplanarak alındı. Beş ayrı 25 ml'lik balonjojeye konuldu. Bu çözeltilerin üzerine sırasıyla 1.25, 2.5, 3.75, 5, 6.25 ml stok aspartam çözeltisinden ilave edildi ve %50'lik etilalkol-su karışımı ile hacimlerine tamamlandı. Bölüm 4.4 'de verilen koşullarda absorpsiyon ve 1. - 4. derece türev spektrumları alındı. Bu spektrumlar şekil 4.(18,19,20,21,22) de verilmiştir.

Bu spektrumlar incelendikten sonra 3. derece türev spektrumunda 253.9 nm ile 256.9 nm 'lerdeki türev absorbans değerlerinin pikten pike değerlerinin ($^3D_{253.9-256.9}$) uygun olduğu saptandı.

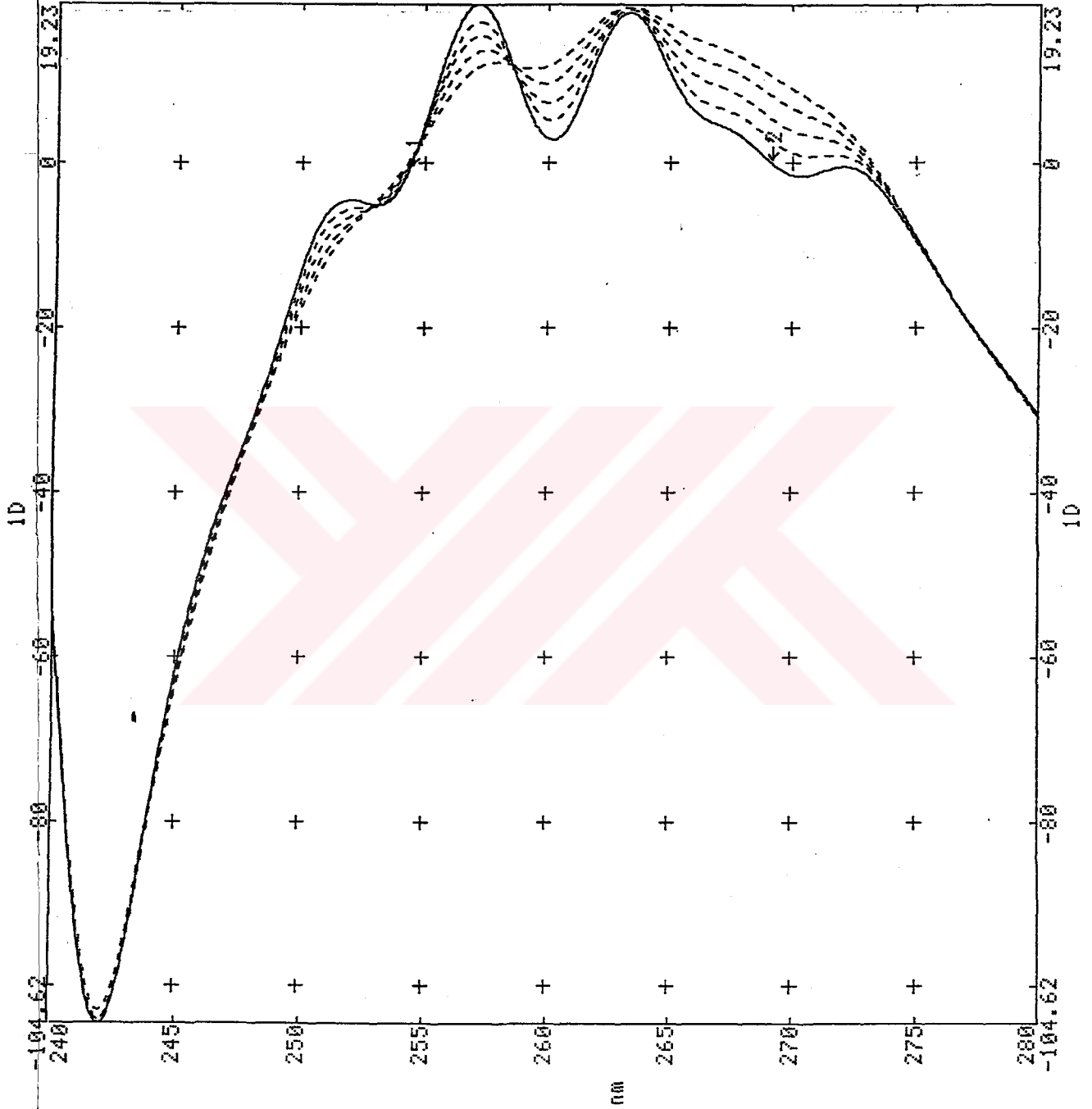
Bu değerler ile karşılık gelen Aspartam konsantrasyonları arasında grafik çizilerek ölçü eğrisi oluşturuldu. Ölçü eğrisine ait doğru denklemleri en küçük



Şekil 4.18. Örnek diyet kola + 50-250 $\mu\text{g/ml}$

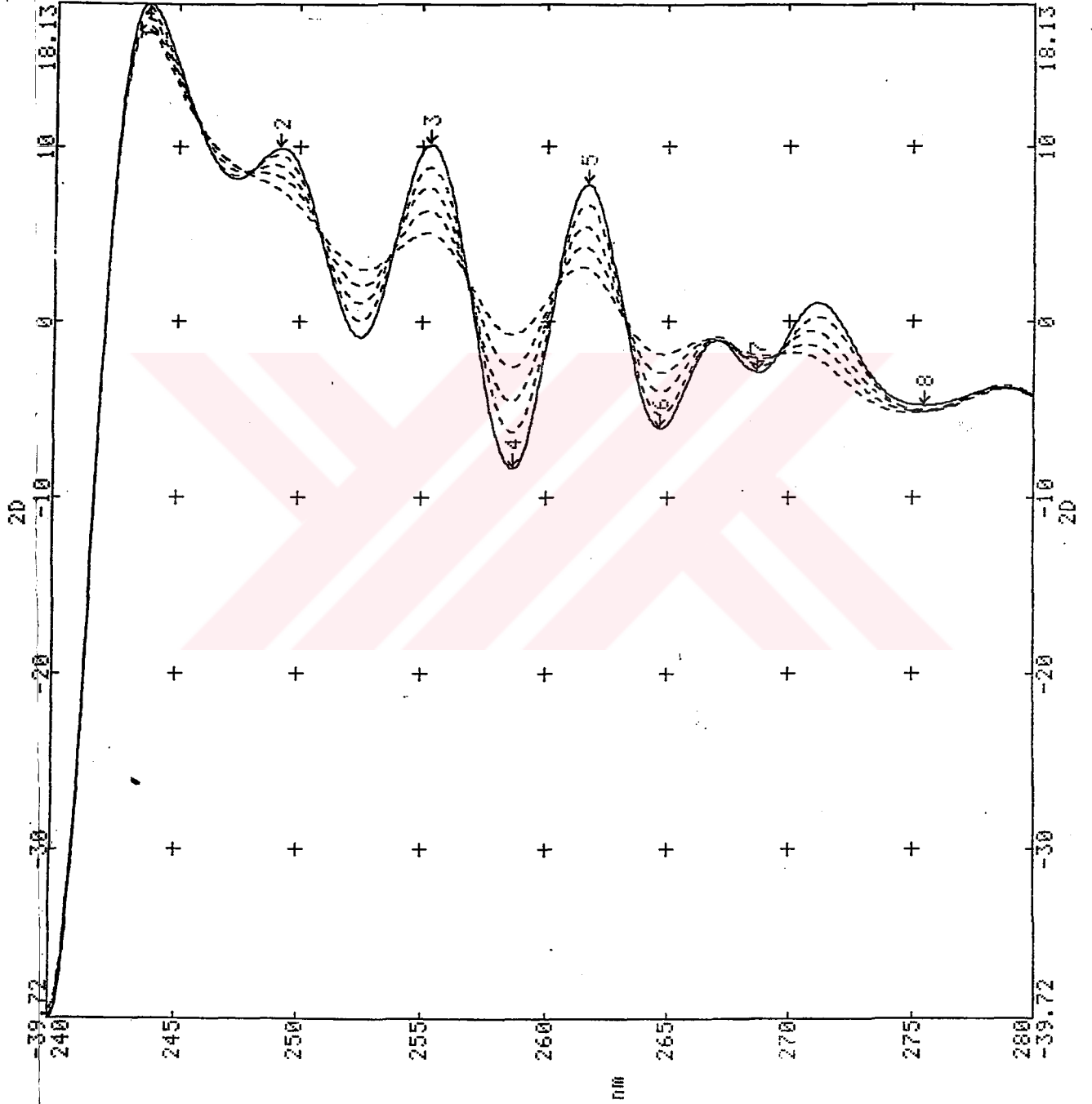
Aspartam çözeltisinin absorpsiyon spektrumu

ASPARTAM KURDU
LİFASİYON KURDU



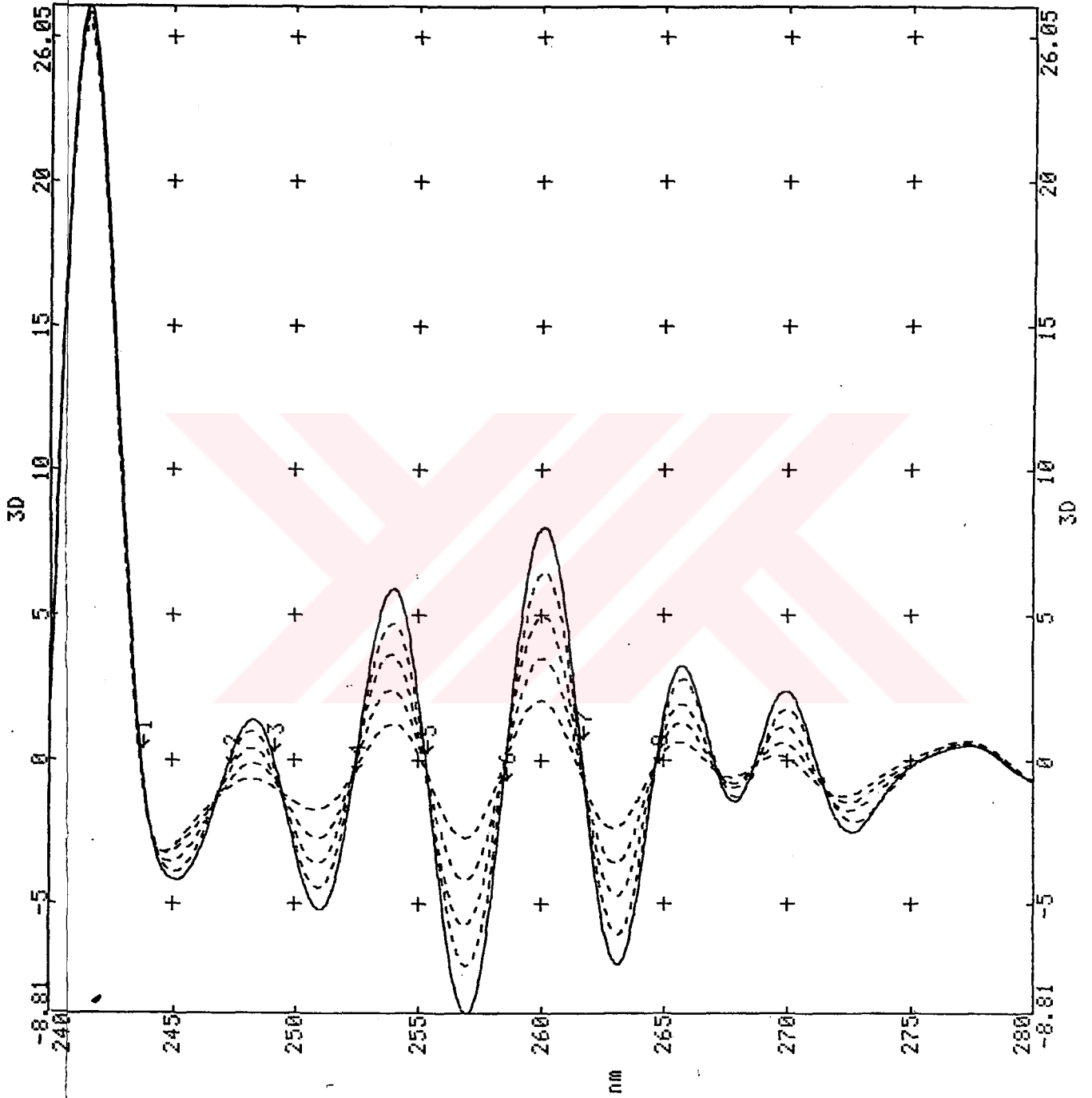
Sekil 4.19. örnek diyet kola + 50-250 $\mu\text{g/ml}$

Aspartam çözeltisinin 1. derece türev
spektrumu



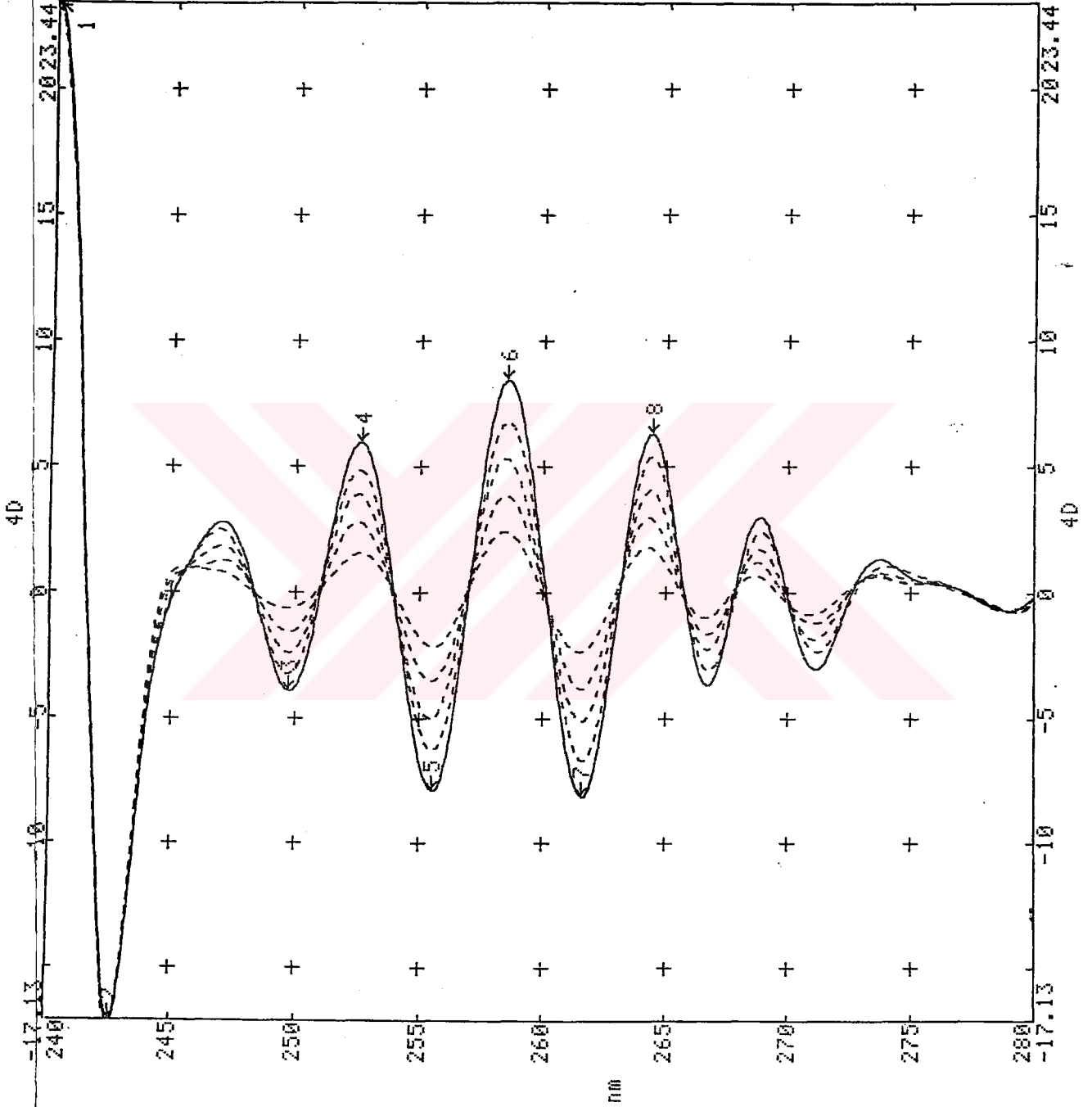
Sekil 4.20. Örnek diyet kola + 50-250 $\mu\text{g/ml}$

Aspartam çözeltisinin 2. derece türev
spektrumu



Şekil 4.21. Örnek diyet kola + 50-250 $\mu\text{g/ml}$

Aspartam çözeltisinin 3. derece türev
spektrumu



Sekil 4.22. örnek diyet kola + 50-250 µg/ml

Aspartam çözeltisinin 4. derece türev
spektrumu

kareler yöntemine göre hesaplandı.

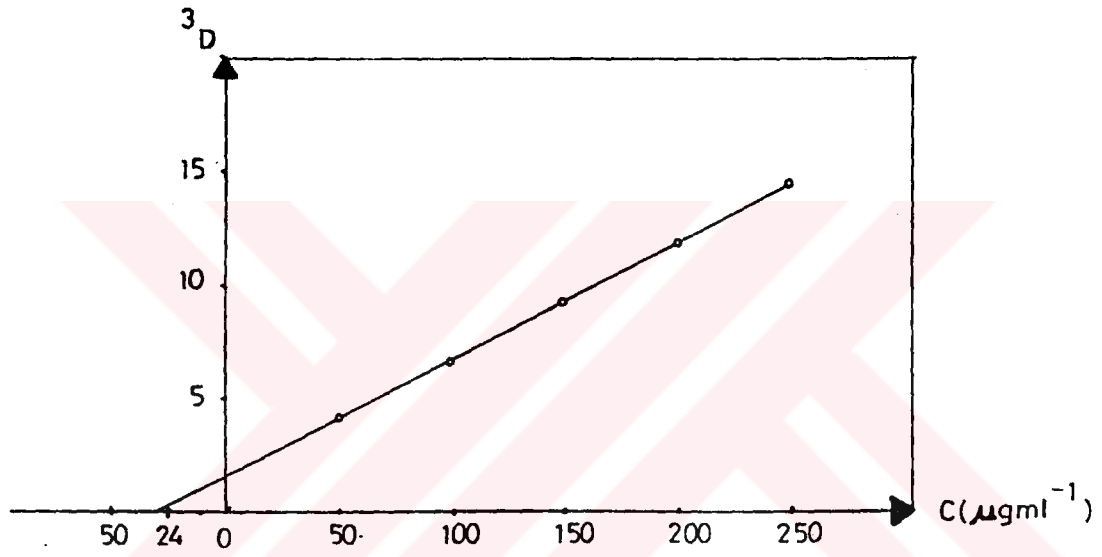
50-250 µg/ml konsantrasyonları arasındaki Aspartam çözeltilerinin 3.derece türev absorbans pikten pike değerleri ($^3D_{253.9-256.9}$) ile hazırlanan ölçü eğrisi şekil 4.(23) de verilmiştir.

Tablo 4.(7) 'de ise bu ölçü eğrisine ait $^3D_{253.9-256.9}$ değerleri ve regrasyon analizleri verilmiştir.

4.7.3. Sonuçların İstatistiksel Değerlendirilmesi

3. Derece türev spektrumunda ; 253.9 nm ve 256.9 nm değerlerinden pikten pike değerleri ($^3D_{253.9-256.9}$) ve 50-250 µg/ml konsantrasyonları ile elde edilen ölçü eğrisinden diet koladaki aspartam miktarı tayin edildi.

Tablo 4.(8) 'de bu yönteme ait deneysel veriler ve istatistiksel sonuçlar verilmiştir.



Şekil 4.23. örnek diyet kola çözeltisindeki Aspartam analizi için hazırlanan ölçü eğrisi

Tablo 4.7 örnek diyet kola çözeltisine ait
değerleri ve regrasyon analizleri

No	C g/ml	3D_1	3D_2	3D_3	$^3\bar{D}$	S	% S
1	50	3.943	3.850	3.938	3.910	0.05	1.28
2	100	6.583	6.677	6.622	6.627	0.05	0.75
3	150	9.403	9.277	9.207	9.296	0.10	1.08
4	200	11.839	11.737	11.867	11.814	0.07	0.59
5	250	14.685	14.577	14.546	14.603	0.07	0.48
$^3D_{253.9-256.9} = 0.053 C + 1.278$ $r = 0.9999$							

	1	2	3	ORTALAMA
a	1.269	1.264	1.298	1.278
b	0.053	0.053	0.053	0.053
r	0.9998	0.9997	0.9999	0.9999

Tablo 4.8 Örnek Diyet Kola Çözeltisindeki Aspartam Analizinin DeneySEL Verileri ve İstatistiksel Sonuçları

İST. PARA METRE LER		$\mu\text{g/ml}$ örnek	% Kazanım
n	1	239.4	99.75
	2	238.5	99.38
	3	244.9	102.04
$\bar{X}$		240.93	100.39
S		3.46	1.44
%S		1.44	1.43
$\bar{X} \pm t_{ts} / \sqrt{n}$		249.52-232.34	103.95-96.83
t=4.3		$\alpha=0.05$	

Diyet kolada 240 $\mu\text{g/ml}$ kola bulunmaktadır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kalori bakımından fakir gıda maddelerinin hazırlanmasında tat verici olarak yapay tatlandırıcı kullanımı son zamanlarda çok artış göstermiştir. Yapay tatlandırıcı olarak kullanılan en eski madde sakkarin ve siklamattır. Bunların kanserojen etkisinin saptanmasından sonra yeni madde arayışı başlamıştır. Bir dipeptit olan Aspartam tat özelliği iyi olan ve sağlık açısından kötü bir etkisi henüz bilinmeyen; günümüzde en çok kullanılan yapay tatlandırıcıdır. Fakat bu maddelerin günlük kullanım miktarları sınırlıdır.

Aspartam miktarı tayini için çok sayıda çalışma yapılmıştır. USP yöntemi sadece tatlandırıcı tabletlere uygulanabilen; karışımlardaki Aspartam miktar tayinlerinde başarılı olmayan klasik bir yöntemdir.

Aspartam miktar tayini için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Tatlandırıcı tabletlerde, diyet yiyecek ve içeceklerdeki miktar tayini için genellikle yüksek basınç likit kromatografi yöntemi tercih edilmektedir. Ayrıca UV-VIS spektrofotometrik, kromatografik yöntemlerle de çok sayıda çalışmalar yapılmıştır. Fakat bu yöntemlerin hepsi pahalı ve zaman alan yöntemlerdir.

Bu çalışmada tatlandırıcı tabletlerde ve diyet koladaki Aspartam miktarını tayin etmek için kolay, ucuz ve pratik bir yöntem olarak son zamanlarda geniş bir kullanım alanı bulan Türev spektrofotometrik yöntemin uygulanması amaçlanmıştır.

Aspatam uv bölgede absorpsiyon yapan bir maddedir. Absorpsiyon spektrumu alındığında bu bölgede pik vermemektedir. Ancak bu pikler kantitatif amaçla kullanılmaya uygun değildir. Türev spektrumu ile pikler belirgin hale gelmekte ve kantitatif amaçla kullanılabilir.

Tabletlerdeki Aspartam miktarının tayini için %50 etilalkol-su karışımı çözücü olarak kullanılmış ve 2. derece türev spektrumunda 252.4 nm - 255.3 nm, 3. derece türev spektrumunda 253.9 nm - 256.9 nm 'lerdeki piklerden yararlanılmıştır. Bu dalga boylarında ölçü eğrilerinin lineer olduğu ve matriks etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca tatlandırıcı tabletlere uygulanan analiz sonuçlarının istatistik değerlendirilmesi yapılmış , yöntemin tekrarlanabilirliğinin, duyarlılığının iyi olduğu , sonucun nominal değere uyduğu, USP yöntemi sonuçları ile aralarında fark olmadığı görülmüştür.

Bu yöntemin; uzun ve zaman alıcı olmaması herhangi bir ön ayırmaya gerek duyulmadan uygulanabilmesi, tekrarlanabilir seçici ve duyarlı olmasından dolayı tatlandırıcı tabletlerde Aspartam miktar tayini için kullanılabileceği saptanmıştır.

Diyet koladaki Aspartam miktar tayininde aynı yöntemin uygulanması için yapılan çalışmada matriks etkisinin fazla olması ve Aspartam miktarının az olması nedeni ile bazı değişiklikler yapılması gerekmiştir. Diyet kolanın deney çözücüsünde alınan 2. derece türev spektrumunda 252.4 nm - 255.3 nm ile 3. derece türev spektrumunda 253.9 nm - 256.9 nm'deki piklerin ölçüm için yeterli derecede belirgin olmadığı görülmüştür. Bu nedenle tablet analizinde kullanılan ölçü eğrisinden yararlanılamamıştır.

Standart katma yöntemi ile çalışılmış, elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi sonucu nominal değer ile uyumlu sonuç elde edilmiştir.

İçeceklerde bulunan Aspartam miktarının ön ayırma gereksiz ve kolay uygulanabilir, oldukça duyarlı ve tekrarlanabilir sonuçlar veren bir yöntem olarak türev spektrofotometrik yöntem ile tayin edilebileceği kanısına varılmıştır. Kesin sonuç için yiyeceklerdeki Aspartam miktar tayini literatürde çok rastlanan HPLC yöntemi ile kıyaslanması ve F testi uygulanması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- (1) Alexandria, J., 1991, Pharm Sci., 5(1) 34-37, Anal. Abstr., 1992, 54: 11 H 230
- (2) Alperdem, I., 1979, Tübitak Araştırma Enstitüsü Beslenme ve Gıda Teknolojisi Ünitesi
- (3) Atmaca, S., Iskender, G., Boyer, E., 1989, Acta Pharma Turc., 31(1): 37-40
- (4) Bartini, D., Nuti, V., 1992, BOLL. CHIM. IGIEN 1992, 43: 11-18
- (5) Endres, K., Kirzinger, W., Schmidt, S., 1982, Ullman Encylöpadre der Technischen Chemie, 22: 359
- (6) Furia, T.E., 1968, Handbook of Food Additives
- (7) Garcia, S.F., Aguilar, G.A., 1992, Anal. Chim. Acta, 270: 45-53, Anal. Abstr., 1993, 55: 9 H 321
- (8) Güven, K.C., Özol, T., 1984, Acta Pharm. Turc., 26(2): 28-30
- (9) Hammod, V.J., Prince, W.C., 1953, J.Opt.Soc.Amer., 43
- (10) Issaq, H.J., Weiss, D., Ridlon, C., Fox, S.D., Muschik, G.M., 1986, J. Liq. Chrom., 9(8), 1781-1801, Chem. Abstr. 1986, 105: 96113z
- (11) Kataoka, H., Yamamoto, Y., Manabe, K., Maluta, M., 1987, Shokuhin Eiseig Anal. Abstr., 1988, 50: 3 F 17
- (12) Lau, O.W., Luk, S.F., Chan, W.M., 1988, Analyst, 113(5): 765-768

- (13) Lawrance, J.F., Charbonneas, C.F., 1988, J. Assoc. of Anal. Chem., 71(5), 934-937, Anal. Abstr. 1989, 51: 6 F 28
- (14) Lehr, M., Schmid, W., 1993, Dtsch Lebensm. Rundsch, 89(2), 43-45, Anal. Abstr. 1993, 55: 12 H 274
- (15) Menexia, N.T., Ptheodore, P. Labuta, 1991, Journal of Food Science, 56, 6: 1671-1675
- (16) Moors, M., Teixeira, C.R.R.R., Jimidar, M., Massart, D.L., 1991, Anal. Chim. Acta 225(1): 177-186
- (17) Morrison, J.D., 1953, J. Chem. Phys., 21: 1767
- (18) O'Haver, T.C., Green, G.L., 1976, Analytical Chemistry 48, 312
- (19) Özol, T., 1985, Acta Pharm. Turc., 26, 59: Anal. Abstr. 1985, 47: 4 E 85
- (20) Poctava, M., Kakac, B., 1982, Česk Farm., 31(3-4) : 113-115 : Chem. Abstr. 1982, 97: 37612
- (21) Prasad, U.V., Divakar, T.E., Sastry, C.S.P., Rao, M.V., Kapur, O.P., 1988, Food Chem. 28(4): 269-278 : Chem. Abstr. 1988, 109: 533089, Anal. Abstr. 1988, 50: 10 F 12
- (22) Prodolliet, J., Bruehlhart, M.J., 1993, A.O.A.C. Int., 76(2) : 275-282, Anal. Chem. 1993, 55: 10 H 396
- (23) Sherma, J., Chapm, S., Followeiler, J.M., 1985, Am. Lab. 17(3) : 131-133, Chem. Abstr. 1985, 102: 165329b
- (24) Talsky, G., Mayring, L., Krevzer, H., 1978, Angewandte Chemie 90, 840

- (25) Talsky, G., Mayring, L., 1978, High-Resolution Higher Order UV/Vis Derivative Spektrophotometry, Angew. Chem., 17 : 785-874
- (26) Talsky, G., Mayring, L., 1978, Fresenius J. Anal. Chem., 233-235, 292
- (27) The United States Pharmacopeia The National Formulary, 1990, USP XXII, NF XVII : 1901-1902
- (28) Tyler, T.A., 1984, J. Assoc. of Anal. Chem., 67(4), 745-747, Chem. Abstr. 1984, 101: 109092m
- (29) Vachek, J., 1984, Cesk. Farm., 33 : 217, Anal. Abstr. 1985, 47: 4 E 86
- (30) Webb, N.G., Beckman, D.D., 1984, J. Assoc. of Anal. Chem., 67(3) : 510-513, Chem. Abstr. 1984, 101: 71139s
- (31) Yang, Z., Wang, Sugui 1991, Shipin Yu Fajiao Gongye, (2) 79-81, Chem. Abstr. 1992, 116: 57639h
- (32) Zhou, S., Li, J., 1990, Sep. 8(1) : Anal. Abstr. 1991, 53: 2 H 149

YENİ YÜZYIL
MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI
MİLLÎ EĞİTİM
MÜHÜRÜ

ÖZGEÇMİŞ

Doğum Tarihi : 1969

Doğum Yeri : İstanbul

İlkokul : Şenlikköy İlkokulu

Ortaokul : Şenlikköy Ortaokulu

Lise : Yeşilköy 50.Yıl Lisesi

Üniversite : Yıldız Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü

Yüksek Lisans : 1991-1992 Öğretim Yılında
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya-Analitik Kimya Anabilim
Dalında Yüksek Lisans
eğitimine başladım.