

**T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GIDA ÜRÜNLERİNDEKİ RENK MADDELERİNİN UV-  
GÖRÜNÜR ALAN SPEKTROSKOPİSİ, POTANSİYOMETRİ VE  
YÜKSEK PERFORMANS SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE  
İNCELENMESİ VE ELDE EDİLEN VERİLERİN ÇOKLU  
KEMOMETRİK YÖNTEMLERLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Güzide PEKCAN ERTOKUŞ**

**Danışman: Doç. Dr. Ahmet Hakan AKTAŞ**

**DOKTORA TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI  
ISPARTA -2011**

## TEZ ONAYI

Güzide PEKCAN ERTOKUŞ tarafından hazırlanan “**Gıda Ürünlerindeki Renk Maddelerinin UV-Görünür Alan Spektroskopisi, Potansiyometri ve Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi İle İncelenmesi ve Elde Edilen Verilerin Çoklu Kemometrik Yöntemlerle Değerlendirilmesi**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Süleyman Demirel Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç.Dr. Ahmet Hakan AKTAŞ  
(Süleyman Demirel Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı)

Jüri Üyeleri:  
Doç. Dr. Ahmet Hakan AKTAŞ  
(Süleyman Demirel Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı)

Prof. Dr. Mustafa CENGİZ  
(Süleyman Demirel Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı)

Prof. Dr. Aynur Gül KARAHAN  
(Süleyman Demirel Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı)

Doç. Dr. Hakan DAL  
(Anadolu Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı)

Doç. Dr. Esengül KIR  
(Süleyman Demirel Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı)

**Prof.Dr. Mustafa KUŞCU**  
**Enstitü Müdürü**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
İÇİNDEKİLER .....	i
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	viii
TEŞEKKÜR.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
SİMGELER DİZİNİ.....	xix
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Gıda Katkı Maddeleri .....	1
1.2. Gıdalarda Kullanılan Renk Maddeleri.....	2
1.3. Gıdalarda Kullanılan Renk Maddelerinin Sınıflandırılması.....	2
1.3.1. Kimyasal yapılarına göre renk maddeleri.....	2
1.3.2. Toksikolojik özelliklerine göre renk maddeleri.....	3
1.4. Renk Maddelerinin Gıda Endüstrisinde Kullanım Alanları.....	3
1.5. Renk Maddelerinin Sağlık Üzerine Etkileri.....	3
1.6. Gıdalarda Kullanılan Renk Maddelerinin Fiziksel Özellikleri.....	4
1.6.1. Tartrazine.....	5
1.6.2. Allura Red .....	5
1.6.3. Sunset yellow.....	5
1.6.4. Karamel.....	5
1.7. UV ve Görünür Bölge Spektroskopisi.....	6
1.7.1. Absorpsiyonun nicel yorumu.....	7
1.7.2. UV ve görünür bölge absorpsiyon spektrofotometreleri.....	7
1.7.3. UV ve görünür bölge moleküler absorpsiyon spektroskopisinin uygulamaları.....	8
1.7.3.1. Nitel analiz.....	8
1.7.3.2. Nicel analiz.....	9
1.8. Kromatografik Yöntemler ve HPLC yöntemi.....	9
1.8.1. Kromatografi nedir?.....	9

1.8.2. Kromatografinin temel prensipleri ve tanımları . . . . .	10
1.9. Potansiyometrik Analiz Metotları. . . . .	11
1.9.1. Potansiyometride kullanılan cam elektrot. . . . .	12
1.9.2. Potansiyometrik titrasyon. . . . .	15
1.10. Kemometri. . . . .	15
1.10.1. Çok değişkenli kalibrasyon algoritmaları. . . . .	18
1.10.1.1. Temel bileşen analizi yöntemi (Principal component analysis method) . . . . .	18
1.10.1.2. Temel bileşen regresyon yöntemi (Principal component regression method) . . . . .	19
1.10.1.3. Kısmi en küçük kareler yöntemi (Partial least squares regression method). . . . .	20
1.10.1.4. Çok değişkenli doğrusal regresyon (Multiple linear regression method) . . . . .	22
1.10.2 Kalibrasyon (derişim) setinin tasarımı. . . . .	23
1.10.3. Çapraz validasyon işlemi (Cross-validation procedure). . . . .	23
1.10.4. Kemometrik kalibrasyon yöntemlerinin uygulamaları. . . . .	24
1.10.4.1. Kemometrik yöntemlerin uygulama alanları. . . . .	24
1.10.4.2. Çoklu bileşen analizi (Multicomponent analysis). . . . .	24
1.10.4.3. Organik bileşiklerin kantitatif analizi. . . . .	24
1.10.5. Varyans analizi (ANOVA) . . . . .	25
2. KAYNAK ÖZETLERİ . . . . .	27
2.1. UV/VIS Spektrofotometri Yöntemiyle Yapılan Çalışmaları. . . . .	27
2.2. HPLC Yöntemi İle Yapılan Çalışmalar. . . . .	39
2.3. Potansiyometri İle Yapılan Çalışmalar. . . . .	46
3. MATERYAL VE YÖNTEM . . . . .	48
3.1 Materyal. . . . .	48
3.2. Kullanılan Cihazlar. . . . .	48
3.2.1. UV-görünür spektrofotometre cihazı. . . . .	48
3.2.2. Yüksek performans sıvı kromatografisi cihazı. . . . .	49
3.2.3. Potansiyometri cihazı. . . . .	49
3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler. . . . .	49

3.3.1	Kullanılan çözeltiler	50
3.4.	Metot	51
3.4.1.	UV/VIS spektroskopisi yöntemi.	51
3.4.2.	Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi	52
3.4.3.	Potansiyometrik yöntem.	52
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI.	53
4.1.	UV Spektroskopisi.	53
4.1.1.	Saf halde renk maddelerinden elde edilen spektrumlar.	53
4.1.2.	Temel bileşen analizi (PCA)	55
4.1.2.1.	Kalibrasyon yönteminin validasyonu.	57
4.1.3.	Kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS).	59
4.1.3.2.	Kalibrasyon yönteminin validasyonu.	59
4.1.3.3.	PLS yöntemi için ANOVA testi.	61
4.1.3.4.	PLS yönteminde istatistiksel analiz.	62
4.1.3.5.	Kısmi en küçük kareler Yönteminin ticari numuneye uygulanması.	65
4.1.4.	Temel bileşen regresyonu yöntemi (PCR).	66
4.1.4.2.	Kalibrasyon yönteminin validasyonu.	66
4.1.4.3.	PCR yöntemi için ANOVA testi.	68
4.1.4.4.	PCR yönteminde istatistiksel analiz.	68
4.1.4.5.	Temel bileşen regresyon yönteminin ticari numuneye uygulanması.	71
4.1.5.	Çok değişkenli regresyon yöntemi (MLR)	72
4.1.5.1.	Kalibrasyon yönteminin validasyonu.	72
4.1.5.2.	MLR yöntemi için ANOVA testi.	75
4.1.5.3.	MLR yönteminde istatistiksel analiz.	75
4.1.5.4.	Çok değişkenli regresyon yönteminin ticari numuneye uygulanması.	78
4.2.	Potansiyometrik Yöntem.	79
4.2.1.	Elektrot kalibrasyonu.	79
4.2.2.	Temel bileşen analizi (PCA)	83
4.2.2.1.	Kalibrasyon yönteminin validasyonu.	85
4.2.3.	Kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS)	85
4.2.3.2.	Kalibrasyon yönteminin validasyonu.	86
4.2.3.3.	PLS yöntemi için ANOVA testi.	88

4.2.3.4. PLS yönteminde istatistiksel analiz. ....	89
4.2.3.5. Kısmi en küçük kareler yönteminin ticari numuneye uygulanması. . .	92
4.2.4. Temel bileşen regresyonu yöntemi (PCR) .....	93
4.2.4.1. Kalibrasyon yönteminin validasyonu. ....	93
4.2.4.2. PCR yöntemi için ANOVA testi. ....	95
4.2.4.3. PCR yönteminde istatistiksel analiz. ....	95
4.2.4.4. Temel bileşen regresyon yönteminin ticari numuneye uygulanması.	98
4.2.5. Çok değişkenli regresyon yöntemi (MLR) .....	99
4.2.5.1. Kalibrasyon yönteminin validasyonu. ....	99
4.2.5.2. MLR yöntemi için ANOVA testi. ....	102
4.2.5.3. MLR yönteminde istatistiksel analiz. ....	102
4.2.5.4. Çok değişkenli regresyon yönteminin ticari numuneye uygulanması.	105
4.3. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) .....	106
4.3.1. Temel bileşen analizi (PCA) .....	110
4.3.2. Kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS) .....	111
4.3.2.1. Kalibrasyon yönteminin validasyonu. ....	111
4.3.2.2. PLS yöntemi için ANOVA testi. ....	114
4.3.2.3. PLS yönteminde istatistiksel analiz. ....	115
4.3.2.4. Kısmi en küçük kareler yönteminin ticari numuneye uygulanması. . .	117
4.3.3. Temel bileşen regresyonu yöntemi (PCR) .....	118
4.3.3.1. Kalibrasyon yönteminin validasyonu. ....	119
4.3.3.2. PCR yöntemi için ANOVA testi. ....	121
4.3.3.3. PCR yönteminde istatistiksel analiz. ....	121
4.3.3.4. Temel bileşen regresyon yönteminin ticari numuneye uygulanması.	123
4.3.4. Çok değişkenli regresyon yöntemi (MLR) .....	125
4.3.4.1. Kalibrasyon yönteminin validasyonu. ....	125
4.3.4.2. MLR yöntemi için ANOVA testi. ....	127
4.3.4.3. MLR yönteminde istatistiksel analiz. ....	127
4.3.4.4. Çok değişkenli regresyon yönteminin ticari numuneye uygulanması.	130
4.4. Yöntemlerin Gıda Numunesine Uygulanmasıyla Elde Edilen Bulgular. .	130
5. TARTIŞMA VE SONUÇ. ....	140
KAYNAKLAR. ....	143

ÖZGEÇMİŞ.....	149
---------------	-----

## ÖZET

Doktora Tezi

### GIDA ÜRÜNLERİNDEKİ RENK MADDELERİNİN UV-GÖRÜNÜR ALAN SPEKTROSKOPİSİ, POTANSİYOMETRİ VE YÜKSEK PERFORMANS SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE İNCELENMESİ VE ELDE EDİLEN VERİLERİN ÇOKLU KEMOMETRİK YÖNTEMLERLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Güzide PEKCAN ERTOKUŞ

Süleyman Demirel Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ahmet Hakan AKTAŞ

Bu tez çalışmasında, kemometrik kalibrasyon yöntemlerinden kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS), temel bileşen regresyonu yöntemi (PCR) ve çoklu lineer regresyon yöntemi (MLR) karbondioksitli bir içecek numunesinde bulunan karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow renk maddelerinin aynı anda miktar tayinlerine hiç bir ayırma işlemi kullanmaksızın başarıyla uygulanmıştır. Bu yöntemler uygulanmadan önce temel bileşen analizi (PCA) hesaplamalara uygulanmıştır. UV-Görünür Alan Spektroskopisi, Potansiyometri ve Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemlerinden elde edilen veriler kemometrik olarak değerlendirilmiştir.

Bu kemometrik yöntemler için 0,4-16 µg / mL doğrusal çalışma aralığında karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow içeren farklı konsantrasyonlarda 16 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir dizi hazırlanmıştır. UV yönteminde kalibrasyon setinin 260 - 560 nm aralığında absorpsiyon spektrumu kaydedilmiştir. Kalibrasyon dizisi ve bu dizi ile elde edilen absorpsiyon verileri arasındaki ilişkiyi yararlanılarak üç kemometrik kalibrasyon oluşturulmuştur. PLS, PCR ve MLR yöntemlerinin validasyonu, karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow içeren sentetik karışımların analiziyle gerçekleştirilmiştir. Potansiyometrik yöntemde ise 0,6-2,2 mL aralığında PLS kalibrasyon için hazırlanan kalibrasyon dizisinin mL aralığında  $\Delta\lambda = 0,05$  mL aralıklarla mV değerleri okunmuştur. Elde edilen potansiyometrik veriler yine üç kemometrik yöntemle değerlendirilmiştir. HPLC ile ölçümler beş farklı dalga boyunda DAD dedektör yardımıyla yapılmıştır. Kullanılan istatistik program ile HPLC için kalibrasyon dizisinin pik alanı oranı (renk maddesi/IS) ve konsantrasyon değerlerinin varyans-kovaryans matrisleri hesaplandı.

PLS, PCR and MLR yöntemlerinin aralığında karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow içeren karışımların analizin uygulamasında, % geri kazanım sonuçları ile karşılık gelen bağıl standart sapma değerleri şu şekildedir. PLS yönteminde karamel için % 100,064 ile % 1,93, allura red için % 98,9042 ile % 2,11, tartrazin için % 98,8317 ile %1,92, sunset yellow için % 99,9983 ile % 0,019 (UV), karamel için % 99,4411 ile %



1,95, allura red için % 99,4235 ile % 2,11, tartrazin için % 98,9494 ile %1,38, sunset yellow için % 99,3190 ile % 0,85 (potansiyometri), allura red için % 98,9107 ile % 2,17, tartrazin için % 100,4751 ile %1,12, sunset yellow için % 99,8231 ile % 0,61 (HPLC); PCR yönteminde karamel için % 99,6694 ile % 0,70 , allura red için % 99,1872 ile % 1,32, tartrazin için % 99,4778 ile %1,50, sunset yellow için % 100,0652 ile % 0,092 (UV), karamel için % 100,288 ile % 1,64, allura red için % 99,4055 ile % 1,47, tartrazin için % 100,4751 ile %1,11, sunset yellow için % 99,2810 ile % 1,14 (potansiyometri), allura red için % 99,2622 ile % 1,12, tartrazin için % 100,021 ile %1,10, sunset yellow için % 99,9534 ile % 0,23 (HPLC); MLR yönteminde karamel için % 99,3014 ile % 1,05 , allura red için % 98,6523 ile % 1,71, tartrazin için % 100,3765 ile %0,53, sunset yellow için % 99,8151 ile % 1,08 (UV), karamel için % 99,4861 ile % 0,89, allura red için % 99,0044 ile % 1,67, tartrazin için % 100,5346 ile % 0,52, sunset yellow için % 100,0682 ile % 1,10 (potansiyometri), allura red için % 99,5149 ile % 1,54, tartrazin için % 100,5517 ile % 0,52, sunset yellow için % 100,0447 ile % 0,70 (HPLC) olarak bulundu.

Sonraki basamakta PCR, PLS ve MLR yöntemleri, ticari içecek numunesindeki karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellowun aynı anda miktar tayinlerine uygulandı. PCR, PLS ve MLR kalibrasyon yöntemleriyle hesaplanan deneysel veriler istatistiksel olarak karşılaştırıldı ve sonuçlar arasında iyi bir uyum gözlemlendi.

**Anahtar Kelimeler:** PLS, PCR, MLR, UV, potansiyometri, kemometri, HPLC  
**2011, 154 sayfa**

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

### SIMULTANEOUS DETERMINATION OF COLORANTS IN FOOD PRODUCTS BY CHEMOMETRIC UV-VISIBLE SPECTROSCOPY, POTENTIOMETRY AND HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Güzide PEKCAN ERTOKUŞ

Süleyman Demirel University  
Graduate School of Applied and Natural Sciences  
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc.Prof.Dr. Ahmet Hakan AKTAŞ

In this thesis, three different chemometric calibration methods (principle component regression (PCR), partial least square (PLS) and multiple linear regression (MLR)) were successfully applied to the simultaneous determination of caramel, allura red, tartrazine and sunset yellow in food beverage sample without using any separation step. Before applying these methods, principal component analysis (PCA) was applied in the calculations. The data of UV-Visible Spectroscopy, Potentiometry, and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method applied to the chemometric calculations.

Chemometric methods for 0.4 to 16 µg / mL, the linear operating range of caramel, allura red, tartrazine and sunset yellow solution containing different concentrations of 16 consisting of a set of artificial mixtures were prepared. UV Method calibration sets 260 to 560 nm range absorption spectra were recorded. Absorption data obtained from the calibration set and the relationship between this set was created using the three Chemometric calibration. PLS, PCR and MLR methods validation, caramel, allura red, tartrazine and sunset yellow was the analysis of synthetic mixtures.

PLS calibration in the range of 0.6 to 2.2 ml of the potentiometric method for the calibration set was prepared in the range  $\Delta\lambda = 0.05$  ml mV values are read at intervals. Potentiometric data obtained were evaluated again in three Chemometric methods. In terms of high-performance liquid chromatography measurements of five different wavelengths were measured with DAD detector. Here, the response of the peak area. Statistical program used in the calibration set, with the peak area ratio (color agent / IS) and variance-covariance matrix of concentration values were calculated.

Percent mean recoveries with their corresponding relative standard deviations in the application of PCR, PLS and MLR methods to the synthetic mixtures containing all compounds were found to be 100,064 % with 1,93 % for caramel ; 98,9042 % with 2,11 % for allura red ; 98,8317 % with 1,92 % for tartrazine; 99,9983 % with 0,019 % for sunset yellow (UV-PLS); 99,4411 % with 1,95 % for caramel ; 98,9042 % with 2,11 %

for allura red ; 98,9494 % with 1,38 % for tartrazine; 99,3190 % with 0,085 % for sunset yellow (potentiometry-PLS); 98,9107 % with 2,17 % for allura red ; 100,4751 % with 1,12 % for tartrazine; 99,8231 % with 0,61 % for sunset yellow (HPLC-PLS); 99,6694 % with 0,70 % for caramel ; 99,1872 % with 1,32 % for allura red ; 99,4778 % with 1,50 % for tartrazine; 100,4751 % with 1,11 % for sunset yellow (potentiometry -PCR); 100,288 % with 1,64 % for caramel ; 99,4055 % with 1,46 % for allura red ; 100,4751% with 1,11 % for tartrazine; 99,2810 % with 1,14 % for sunset yellow (potentiometry-PCR); 99,2622 % with 1,12 % for allura red ; 100,021 % with 1,10 % for tartrazine; 99,9534% with 0,23 % for sunset yellow (HPLC-PCR); 99,3014 % with 1,05 % for caramel ; 98,6523 % with 1,71 % for allura red ; 100,3765 % with 0,53 % for tartrazine; 99,8151 % with 1,08 % for sunset yellow (UV -MLR); 99,4861 % with 0,89 % for caramel ; 99,0044 % with 1,67 % for allura red ; 100,5346 % with 0,52 % for tartrazine; 100,0682 % with 1,10 % for sunset yellow (potentiometry -MLR); 99,5149 % with 1,54 % for allura red ; 100,5517 % with 0,52 % for tartrazine; 100,0447 % with 0,70 % for sunset yellow (HPLC-MLR) respectively.

In the next step, PCR, PLS and MLR methods, commercial beverage sample caramel, allura red, tartrazine and sunset yellow quantity determinations were performed at the same time. PCR, PLS and MLR calculated from experimental data, calibration methods, a good fit between the observed and the results were compared statistically.

**Key words:** PLS, PCR, MLR, UV, potentiometry, Chemometrics, HPLC  
**2011, 154 pages**

## TEŐEKKÖR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan Sayın Danışman Hocam Doç. Dr. A. Hakan AKTAŞ'a teőekkr eder sonsuz saygılarımı sunarım.

Hayatım boyunca ve tezim sırasında gerek manevi gerekse maddi desteklerini üzerimden eksik etmeyen annem Seher PEKCAN ve babam İsmet PEKCAN'a teőekkr ederim.

Araştırmanın yürütülmesinde manevi yardımlarını gördüğüm Kimya Mühendisi Hülya PEKCAN ÖZDEMİR ve Kimya Mühendisi Sezer ÖZDEMİR'e teőekkr eder, herşeyin gönüllerince olmasını dilerim.

Tezimin esnasında evde çalıştığım ve yeri geldiğinde onlara zaman ayıramama rağmen bana hep destek olan eşim Ahmet Nazmi ERTOKUŞ ve biricik oğlum Alper ERTOKUŞ'a sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Güzide PEKCAN ERTOKUŞ

ISPARTA, 2011

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil.1.1. Tartrazinin kimyasal formülü. . . . .	4
Şekil.1.2. Allura red maddesinin kimyasal formülü. . . . .	5
Şekil.1.3. Sunset yellow maddesinin kimyasal formülü. . . . .	5
Şekil.1.4. Karamel maddesinin kimyasal formülü. . . . .	5
Sekil 1.5. Bir kapta bulunan bir çözelti üzerine gönderilen ışın demetinde yansıma, saçılma (dağılma) ve absorbansla $I_0$ demetinin zayıflaması ve I demeti olarak çözeltiyi terk etmesi. . . . .	7
Sekil 1.6. Bir spektrofotometrenin temel bileşenleri. . . . .	8
Şekil 1.7. UV-görünür alan cihazı. . . . .	8
Şekil 1.8. pH ölçümlerinde kullanılan hücre (elektrot sistemi) . . . . .	12
Şekil 1.9. Kombine cam pH elektrodu. . . . .	14
Şekil 1.10. Kemometrinin ilişkili olduğu disiplinler. . . . .	16
Şekil 1.11. X1 ve X2 olan iki değişken için PC1 ve PC2 olan iki esas bileşeni gösteren diyagram. . . . .	18
Şekil 1.12. PLS2 kalibrasyonu. . . . .	21
Şekil 4.1. Karamel maddesinin absorpsiyon spektrumu. . . . .	53
Şekil.4.2. Allura red maddesinin absorpsiyon spektrumu. . . . .	54
Şekil.4.3. Tartrazine maddesinin absorpsiyon spektrumu. . . . .	54
Şekil 4.4. Sunset yellow maddesinin absorpsiyon spektrumu. . . . .	55
Şekil 4.5. Değişkenlerin doğrusal bileşenleri. . . . .	56
Şekil 4.6. Kemometrik verilerden elde edilen özdeğerlerin grafiği. . . . .	57
Şekil 4.7. Sentetik karışımın absorpsiyon spektrumu. . . . .	58
Şekil 4.8. Atık değerlerinin dağılımı . . . . .	61
Şekil 4.9. Kemometrik hesaplamalar esnasında oluşturulan matris. . . . .	62
Şekil 4.10. PLS kalibrasyon basamağında karamel için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. . . . .	63
Şekil 4.11. PLS kalibrasyon basamağında allura Red için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. . . . .	64
Şekil 4.12. PLS kalibrasyon basamağında tartrazine için gerçek ve tahmin	

edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. . . . .	64
Şekil 4.13. PLS kalibrasyon basamağında sunset yellow için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. . . . .	64
Şekil 4.14. PCR kalibrasyon basamağında karamel için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. . . . .	69
Şekil 4.15. PCR kalibrasyon basamağında allura red için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. . . . .	69
Şekil 4.16. PCR kalibrasyon basamağında tartrazine için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. . . . .	70
Şekil 4.17. PCR kalibrasyon basamağında sunset yellow için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. . . . .	70
Şekil 4.18. MLR kalibrasyon basamağında karamel için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. . . . .	76
Şekil 4.19. MLR kalibrasyon basamağında allura red için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. . . . .	77
Şekil 4.20. MLR kalibrasyon basamağında tartrazine için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. . . . .	76
Şekil 4.21. MLR kalibrasyon basamağında sunset yellow için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. . . . .	77
Şekil 4.22. NaCl için iyonik şiddetin aktivite katsayısı ile değişimi. . . . .	80
Şekil 4.23. Gran fonksiyonu grafiği. . . . .	81
Şekil 4.24. Saf renk maddelerinin mV /pH-mL titrasyon eğrileri a)Allura Red	

b)Karamel c) Tartrazine d) Sunset Yellow . . . . .	81
Şekil 4.25. Hazırlanan sentetik karışımın titrasyon eğrisi (mV-mL) . . . . .	83
Şekil 4.26. Hazırlanan sentetik karışımın titrasyon eğrisi (pH-mL) . . . . .	83
Şekil 4.27. Değişkenlerin doğrusal bileşenleri. . . . .	84
Şekil 4.28. Kemometrik verilerden elde edilen özdeğerlerin grafiği . . . . .	85
Şekil 4.29. Atık değerlerinin dağılımı . . . . .	88
Şekil 4.30. Kemometrik hesaplamalar esnasında oluşturulan matris . . . . .	89
Şekil 4.31. PLS kalibrasyon basamağında karamel için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar . . . . .	90
Şekil 4.32. PLS kalibrasyon basamağında allura red için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar . . . . .	90
Şekil 4.33. PLS kalibrasyon basamağında tartrazine için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar . . . . .	91
Şekil 4.34. PLS kalibrasyon basamağında sunset yellow için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. . . . .	91
Şekil 4.35. PCR kalibrasyon basamağında karamel için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar . . . . .	96
Şekil 4.36. PCR kalibrasyon basamağında allura red için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. . . . .	96
Şekil 4.37. PCR kalibrasyon basamağında tartrazine için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. . . . .	97
Şekil 4.38. PCR kalibrasyon basamağında sunset yellow için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. . . . .	97
Şekil 4.39. MLR kalibrasyon basamağında karamel için gerçek ve tahmin	

edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar . . . . .	103
Şekil 4.40. MLR kalibrasyon basamağında allura red için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. . . . .	103
Şekil 4.41. MLR kalibrasyon basamağında tartrazine için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. . . . .	104
Şekil 4.42. MLR kalibrasyon basamağında sunset yellow için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. . . . .	104
Şekil 4.43. Tartrazine maddesinin kromatogramı. . . . .	106
Şekil 4.44. Allura red maddesinin kromatogramı. . . . .	106
Şekil 4.45. Sunset yellow maddesinin kromatogramı. . . . .	107
Şekil 4.46. Tartrazine maddesinin kalibrasyon grafiği. . . . .	107
Şekil 4.47. Allura red maddesinin kalibrasyon grafiği. . . . .	108
Şekil 4.48. Sunset yellow maddesinin kalibrasyon grafiği. . . . .	109
Şekil 4.49. İç standart (Brilliant Blue)maddesinin kalibrasyon grafiği . . . . .	109
Şekil 4.50. Değişkenlerin doğrusal bileşenleri. . . . .	110
Şekil 4.51. Kemometrik verilerden elde edilen özdeğerlerin grafiği . . . . .	111
Şekil 4.52. Atık değerlerinin dağılımı. . . . .	114
Şekil 4.53. Kemometrik hesaplamalar esnasında oluşturulan matris . . . . .	115
Şekil 4.54. PLS kalibrasyon basamağında allura red için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. . . . .	116
Şekil 4.55. PLS kalibrasyon basamağında tartrazine için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. . . . .	116
Şekil 4.56. PLS kalibrasyon basamağında sunset yellow için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. . . . .	117
Şekil 4.57. PCR kalibrasyon basamağında allura red için gerçek ve tahmin	



edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. . . . .	122
Şekil 4.58. PCR kalibrasyon basamağında tartrazine için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar . . . . .	122
Şekil 4.59. PCR kalibrasyon basamağında sunset yellow için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. . . . .	123
Şekil 4.60. MLR kalibrasyon basamağında allura red için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. . . . .	128
Şekil 4.61. MLR kalibrasyon basamağında tartrazine için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar . . . . .	128
Şekil 4.62. MLR kalibrasyon basamağında sunset yellow için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. . . . .	129
Şekil 4.63. Karamel renk maddesinin gerçek ve tahmini derişimleri arasındaki doğrusal ilişki. . . . .	134
Şekil 4.64. Allura red renk maddesinin gerçek ve tahmini derişimleri arasındaki doğrusal ilişki. . . . .	134
Şekil 4.65. Tartrazine renk maddesinin gerçek ve tahmini derişimleri arasındaki doğrusal ilişki. . . . .	135
Şekil 4.66. Sunset yellow renk maddesinin gerçek ve tahmini derişimleri arasındaki doğrusal ilişki. . . . .	135
Şekil 4.67. Karamel renk maddesinin gerçek ve tahmini derişimleri arasındaki doğrusal ilişki. . . . .	136
Şekil 4.68 . Allura red renk maddesinin gerçek ve tahmini derişimleri arasındaki doğrusal ilişki. . . . .	136
Şekil 4.69. Tartrazine renk maddesinin gerçek ve tahmini derişimleri arasındaki doğrusal ilişki. . . . .	137
Şekil 4.70. Sunset yellow renk maddesinin gerçek ve tahmini derişimleri	

arasındaki doğrusal ilişki. ....	137
Şekil 4.71. Karamel renk maddesinin gerçek ve tahmini derişimleri arasındaki doğrusal ilişki. ....	138
Şekil 4.72. Allura Red renk maddesinin gerçek ve tahmini derişimleri arasındaki doğrusal ilişki. ....	138
Şekil 4.73. Tartrazine renk maddesinin gerçek ve tahmini derişimleri arasındaki doğrusal ilişki. ....	139
Şekil 4.74. Sunset Yellow renk maddesinin gerçek ve tahmini derişimleri arasındaki doğrusal ilişki. ....	139

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve formülleri. ....	49
Çizelge 4.1. Renk maddelerinin spektroskopik özellikleri. ....	53
Çizelge 4.2. Karamel, allura Red, tartrazine ve sunset yellow karışımlarını içeren kalibrasyon seti. ....	58
Çizelge 4.3. Sentetik olarak hazırlanan karışımındaki renk maddelerinin PLS kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları. ....	60
Çizelge 4.4. Ticari numunede bulunan renk maddelerinin PLS kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları. ....	65
Çizelge 4.5. Sentetik olarak hazırlanan karışımındaki renk maddelerinin PCR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları. ....	67
Çizelge 4.6. Ticari numunede bulunan renk maddelerinin PCR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları. ....	72
Çizelge 4.7. Sentetik olarak hazırlanan karışımındaki renk maddelerinin MLR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları. ....	74
Çizelge 4.8. Ticari numunede bulunan renk maddelerinin MLR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları. ....	78
Çizelge 4.9. Sentetik olarak hazırlanan karışımındaki renk maddelerinin PLS kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları. ....	87
Çizelge 4.10. Ticari numunede bulunan renk maddelerinin PLS kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları. ....	92
Çizelge 4.11. Sentetik olarak hazırlanan karışımındaki renk maddelerinin PCR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları. ....	94
Çizelge 4.12. Ticari numunede bulunan renk maddelerinin PCR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları. ....	98
Çizelge 4.13. Sentetik olarak hazırlanan karışımındaki renk maddelerinin MLR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları. ....	101
Çizelge 4.14. Ticari numunede bulunan renk maddelerinin MLR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları. ....	105
Çizelge 4.15. Sentetik olarak hazırlanan karışımındaki renk maddelerinin PLS kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları. ....	113
Çizelge 4.16. Ticari numunede bulunan renk maddelerinin PLS kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları. ....	113

kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları. ....	118
Çizelge 4.17. Sentetik olarak hazırlanan karışımdaki renk maddelerinin PCR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları. ....	120
Çizelge 4.18. Ticari numunede bulunan renk maddelerinin PCR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları. ....	124
Çizelge 4.19. Sentetik olarak hazırlanan karışımdaki renk maddelerinin MLR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları. ....	126
Çizelge 4.20. Ticari numunede bulunan renk maddelerinin MLR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları. ....	130
Çizelge 4.21. Ticari numunede bulunan renk maddelerinin kemometrik olarak hesaplanan sonuçları (PLS yöntemi) ....	131
Çizelge 4.22. Ticari numunede bulunan renk maddelerinin kemometrik olarak hesaplanan sonuçları (PCR yöntemi) ....	132
Çizelge 4.23. Ticari numunede bulunan renk maddelerinin kemometrik olarak hesaplanan sonuçları (MLR yöntemi) ....	133

## SİMGELER DİZİNİ

<b>ANOVA</b>	Varyans Analizi (Analysis of Variance)
<b>BSS</b>	% Bağlı Standart Sapma
<b>GS</b>	Güven Sınırı
<b>HPLC</b>	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
<b>MLR</b>	Çoklu Lineer Regresyon (Multiple Linear Regression)
<b>PCA</b>	Temel Bileşen Analizi Yöntemi (Principal Component Analysis)
<b>PCR</b>	Temel Bileşen Regresyonu Yöntemi (Principal Component Regression)
<b>PLS</b>	Kısmi En Küçük Kareler Yöntemi (Partial Component Regression)
<b>R</b>	Regresyon Katsayısı
<b>SS</b>	Standart Sapma
<b>UV-Vis</b>	Ultra Viyole Görünür Alan Spektroskopisi
<b>x</b>	Ortalama Değer

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Gıda Katkı Maddeleri

Gıda katkı maddeleri genel anlamda “gıdaların özelliklerini istenilen biçimde etkilemek amacıyla kullanılan maddeler” olarak tanımlanmaktadır. Bu özellikler arasında görünüm, lezzet, koku, besleyici değer ve depolama ömrü sayılabilmektedir. Uluslararası terminolojide ise gıda katkı maddeleri şöyle tanımlanmaktadır. “Tek başına gıda olarak tüketilmeyen ve gıdanın tipik bir bileşeni olmayan, besleyici değeri olsun veya olmasın imalat, işleme, hazırlama, uygulama, paketlenme, ambalajlama, taşıma ve depolama aşamalarında gıdalara teknolojik amaçla katılan veya bu gıdaların içinde ya da yan ürünlerinde doğrudan veya dolaylı olarak bir bileşeni haline gelen veya bunların karakteristiklerini değiştiren maddelerdir”. Gıda katkı maddesinin görevi ürünün üretimi, taşınması ve depolanması gibi işlemler sırasında gıda maddesinin tat, koku, görünüş ve yapı özelliklerini korumak, düzeltmek bunun yanı sıra ürünün kalite ve raf ömrünü arttırmaktır. Bu maddeler üretim süreci içerisinde gıdaların yapısına katılabileceği gibi bazen gıdalarda doğal olarak da bulunabilirler. Gıda katkı maddelerinin gıda endüstrisinde kullanımı teknolojik gereksinimlerden kaynaklanmaktadır. Ancak; bunun yanında; dünya nüfusundaki artışlar, gıda sektörünü besleyen hammadde kaynaklarındaki azalmalar, insanların yaşam standartlarını yükseltme eğilimleri gibi etmenler teknolojik buluşları yönlendirmiştir. 1950’li yıllardan bu yana hızla artan dünya nüfusuna paralel olarak gıda maddelerine duyulan gereksinimin çoğalması, şehirleşme ve insanların yaşam biçimlerinde oluşan değişimler, yüksek kalitede ve çeşitlilikteki gıda maddelerine duyulan ihtiyaç, seyahat ve nakil imkânlarının gelişmesi, gıda sektörüne yeni ve üstün teknolojilerin kazandırdığı değişik üretim teknikleri, buna göre ürünlerin çeşitlenmesi, tüketici beğenisinin değişmesi, ürünlerde raf ömrünün uzatılması gibi durumlar, gıda endüstrisinde kullanılan tekniklerin yanı sıra gıda katkı maddelerinin kullanımını zorunlu hale getirmiştir. Bu maddelerin gıdalarda güvenli bir şekilde kullanımı ise tüketiciler açısından bu konunun en önemli yönünü oluşturmaktadır. Bu nedenle dünyadaki pek çok uluslararası ve ulusal kuruluşlar, katkı maddelerinin gıdalarda güvenilir bir şekilde kullanılmasını amacıyla spesifikasyonlar ve sınırlamalar getirmişlerdir. Ülkemizde de 6 Mart 1988’de

yürürlüğe giren “Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği” gıda katkı maddelerinin kullanılmasına ilişkin genel hükümleri ve prensipleri kapsamaktadır.

Gıda katkı maddeleri bazen ait oldukları madde grubuna göre, bazen kullanım amacına göre, bazen de üretimde kullanıldığı gıdaya göre gruplandırılmaktadır. Katkı maddeleri işlevlerine göre 25'den fazla gruba ayrılırlar. Eğer genel bir şekilde sınıflandırma yapacak olursak;

- 1) Renk maddeleri
- 2) Aroma maddeleri
- 3) Koruyucu maddeler
- 4) Gıdanın yapı ve görünüşünü etkileyen maddeler
- 5) Biyolojik değeri artırıcı maddeler şeklinde olur (Aydoğdu, 2007).

## **1.2. Gıdalarda Kullanılan Renk Maddeleri**

Gıdalarda mikrobiyolojik kalitenin dışında kalan kalite kavramı içine ürünün rengi, tat-kokusu, doku ve besleyici özellikleri girmektedir. Bu nedenle tüketici açısından fark edilen kalite daha çok duyuşsal özelliklere ve bunun da ötesinde gıdanın rengine dayanmaktadır. Gıdanın tüketim öncesi gözlenen bu özelliği hammaddenin yetiştirilmesi sırasındaki etmenlerle ve imalat sürecindeki üretim parametrelerinin etkisi ile değışmeye uğrar. Renkte görülen bu farklılıklar, tüketici tercihini genellikle olumsuz bir biçimde etkilerler. Bu nedenle renk maddeleri, teknolojik işlem görmüş et, meyve-sebze, fırıncılık, sütçülük ürünlerinde ve şekerleme endüstrisinde kaybolan rengi geri vermek, kısmen kayba uğramış olan ya da hiç olmayan rengi yapıya kazandırmak için kullanılan gıda katkı maddeleridir (Saldamlı,1998).

## **1.3. Gıdalarda Kullanılan Renk Maddelerinin Sınıflandırılması**

Gıdalarda kullanılacak renk maddeleri genel olarak kimyasal yapılarına göre ve toksikolojik özelliklerine göre değerlendirilirler ve sınıflandırılırlar.

### **1.3.1. Kimyasal yapılarına göre renk maddeleri**

*Doğal Organik Boyalar*, bunlar bitkisel ve hayvansal organizma ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenen renkli maddelerdir. Bunlardan bazıları,

yerlerini gıda boyalarına bırakmış olsa da, son yönetmelikte karamel, anotto ekstraktları, karetenoidler, kurkumin, riboflavin, klorofil gibi doğal boya çeşitleri daha çok kullanılır duruma gelmiştir.

*Anorganik Boyar Maddeler*, demir oksit, karbon siyahı gibi maddelerdir. Bunların kullanımları sınırlıdır (Toptan, 1999).

*Sentetik Boyar Maddeler*, brilliant blue, tartrazin, sunset yellow gibi maddelerdir. Bu tip maddeler doğal maddelere göre daha parlak, daha kararlı, daha ucuzdur. Bütün yapay renk maddeleri suda çözünen ancak organik çözücülerde çözünmeyen özelliktedir. Bu nedenle gıda endüstrisinde kullanımları kolaydır (Saldamlı,1998).

### **1.3.2. Toksikolojik özelliklerine göre renk maddeleri**

Bu sınıflama toksikolojik çalışmaların gelişmesi ile oluşmuştur. Sağlıkla ilgili çalışmaların ilki, 1923 yılında Fünner tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada asit boyaların, bazik boyalar kadar sağlığa zararlı olmadığı saptanmıştır (Toptan, 1999).

### **1.4. Renk Maddelerinin Gıda Endüstrisinde Kullanım Alanları**

Renk maddeleri gıda endüstrisinde çok yaygın olarak çoğu kez de bilgisizce kullanılan katkı maddeleridir. Ancak, renk katkılarının kullanılması ile ilgili uygulamadaki pek çok sorunu, modern üretim tekniklerinin kullanılması ve suyun özelliklerinin bazı özel işlemlerle iyileştirilmesi büyük ölçüde çözümlenmiştir. Alkolsüz içeceklerde, fırıncılıkta, şekerlemede endüstrisinde, süt ürünlerinde kullanılırlar (Saldamlı, 1998).

### **1.5. Renk Maddelerinin Sağlık Üzerine Etkileri**

*Tartrazin, sunset yellow, allura red* azo boyar maddeleri sınıfındadır. Azo gıda boyaları herhangi bir alerjik reaksiyona sebep olmaz. Birçok azo tekstil boyaları ise alerji ve deride yüksek duyarlılığa neden olur. Fakat bunlar gıda boyası olarak kullanılmaz. Azo boyalarının çok az miktarı dahi, bağışıklık sisteminde farklı etkilere yol açar fakat doğrudan alerjik reaksiyonlara neden olmaz. Fakat bazı azo boyaları, özellikle tartrazin, diğer maddelere karşı (örneğin ilaçların birçoğu) alerjik



reaksiyonları arttırır. Tartrazin ile benzer özellikte boyalar ve diğer bazı azo boyaları insanlarda astım ve bunun gibi hastalıkların artmasına sebep olur.

Azo gıda boyaları, alerjik reaksiyonlara ve astıma sebep olan mekanizması hala tamamen anlaşılmamıştır. Fakat azo gıda boyaları, çocuklarda ADHD sendromu (hiperaktivite) vakalarının büyük bir yüzdesini oluşturur.

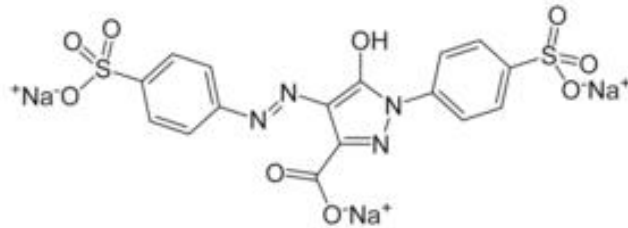
Uluslar arası Kanser Araştırma Ajansının yaptığı araştırmalarda, *brilliant blue FCF* nin disodyum tuzu farelerde karsinojenik etki göstermiştir. Farelere oral verilmesinden sonra böbrek tümörü oluşmuştur.

Beta-karotenin etkilerini belirlemek için yapılan fare denemelerinde beta-karotenin güvenli olduğu görülmüştür.

Doğal boyalardan karamel IV in farelerle tek veya çoklu oral doz olarak verildiği absorpsiyon dağılımının incelendiği çalışmada gastro intestinal yolda radyoaktivite ve lenfa nodüllerinin olduğu bulunmuştur (Toptan, 1999).

## 1.6. Gıdalarda Kullanılan Renk Maddelerinin Fiziksel Özellikleri

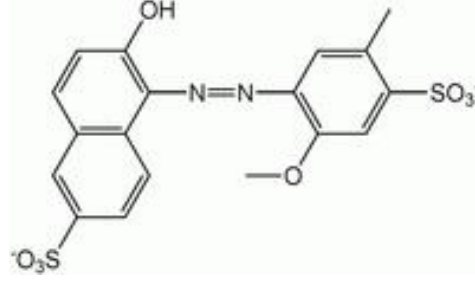
### 1.6.1. Tartrazin



Şekil.1.1. Tartrazinin kimyasal formülü

Sentetik azo boyasıdır. Sarı gıda renklendiricisi olarak kullanılır ve suda iyi çözünür. Günlük kabul edilebilir alım miktarı, vücut ağırlığı üzerinden 7,5 mg/kg dır. E-102 olarak bilinir ve toz içecekler, pudingler, patates cipsleri, çorbalar, şekerler vb. birçok üründe kullanılır.

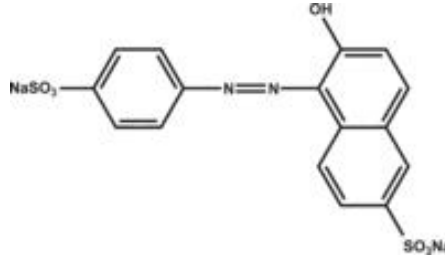
### 1.6.2. Allura red



Şekil.1.2. Allura red maddesinin kimyasal formülü

Sentetik azo boyasıdır. Kırmızı gıda renklendiricisi olarak kullanılır ve suda iyi çözünür. Günlük kabul edilebilir alım miktarı, vücut ağırlığı üzerinden 7,5 mg/kg dır. E-129 olarak bilinir ve toz içecekler, şekerler vb. birçok üründe kullanılır .

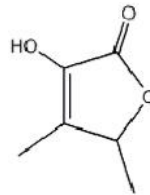
### 1.6.3. Sunset yellow



Şekil.1.3. Sunset yellow maddesinin kimyasal formülü

Sentetik azo boyasıdır. Sarı-turuncu gıda renklendiricisi olarak kullanılır ve suda iyi çözünür. Günlük kabul edilebilir alım miktarı, vücut ağırlığı üzerinden 2,5 mg/kg dır.

### 1.6.4. Karamel



Şekil.1.4. Karamel maddesinin kimyasal formülü

Kompleks kahverengi renklendirici karışımı, alkali, amonyak, sülfat veya bunların kombinasyonları varlığında şekerin kuru ısıtılması ve yakılması ile oluşur.

Kahverenginden siyaha renklendiricilerdir. Suda çözünür ve spesifiktir, bazen acı tadı vardır.

Günlük kabul edilebilir alım miktarı E150c ve E150d için vücut ağırlığı üzerinden 200 mg/kgdır.

E150c ve E150d'nin kullanılmasıyla yan etkileri belirlenmiştir, fazla miktarlarda yenilmesinden sonra bağırsaklarda problemler meydana gelebilir. Karışımlarının kompleks çeşitleri yüzünden toksikoloji testlerinde hala incelenmektedir .

### **1.7. UV ve Görünür Bölge Spektroskopisi**

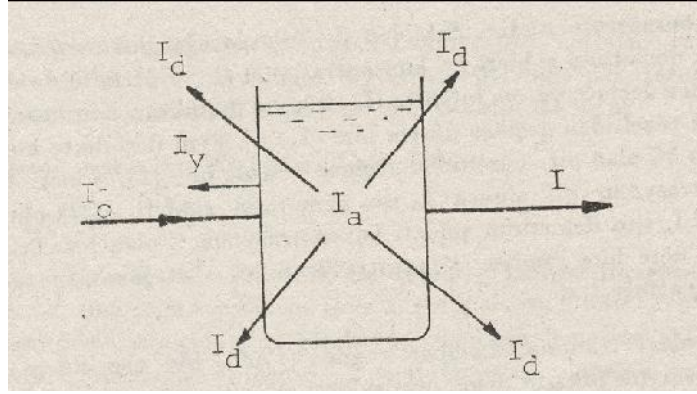
Her madde üzerine düşürülen ışıklardan bazılarını absorplayabilir. Maddenin hangi dalga boylarındaki ışınları absorplayacağı kendine özgüdür. Bundan yararlanılarak nitel analiz yapılabilir. Bir maddenin absorplayacağı ışın şiddeti ise madde miktarı ile orantılıdır. Bundan yararlanılarak da nicel analiz yapılabilir. Bu amaçla madde üzerine çok çeşitli enerjilere sahip ışınlar gönderilebilir. Madde ile etkileşen ışının enerjisi değiştiğinde madde ile etkileşim mekanizması da değişir. Buna bağlı olarak ölçüm tekniğinin de değişmesi gerekir. Bu nedenle elektromanyetik spektrumun tümü için ölçüm yapılabilecek tek bir cihazın bulunması mümkün değildir. Elektromanyetik spektrumun farklı bölgeleri için farklı cihazlar kullanılır. Dalga boyu 110 nm – 1000 nm arasındaki UV ve görünür bölge ışınları ile çalışılabilen cihazlara *UV ve Görünür Bölge Spektrofotometreleri* denir. Bu bölgedeki ışınların absorplanmalarının ölçümlerini temel alan analitik yönteme de *UV ve Görünür Bölge Spektroskopisi* denir. UV ve görünür bölge ışınları molekülün en üst enerji seviyesindeki bir elektronun daha yüksek bir enerji düzeyine geçiş yapmasına sebep olur. UV ve görünür bölge ışınları, moleküllerde benzer etki yaptığı için birleştirilmişlerdir. Hem organik, hem de anorganik moleküller UV ve görünür bölge ışınlarını absorplarlar. Her iki grup molekülde de ışın absorpsiyonu elektron geçişi ile gerçekleşmesine rağmen etkileşim mekanizmaları farklıdır. Organik moleküllerdeki absorpsiyon molekül orbital teorisine göre, anorganik moleküllerdeki absorpsiyon ise kristal alan teorisine göre açıklanır (Şener, 2006).

### 1.7.1. Absorpsiyonun nicel yorumu

Işığın geçiren bir kap içerisinde bulunan bir madde üzerine  $I_0$  şiddetindeki monokromatik ışın demeti gönderilecek olursa demetten bir kısım ışın yansır ( $I_y$ ) (ışın demeti çözeltiye dik olarak geldiği için çözelti kabının cidarına dik olarak geri döner), bir kısmı maddenin tanecikleri (iyon, molekül) tarafından absorplanır ( $I_a$ ), bir kısmı çözeltide bulunan büyük veya büyükçe moleküller tarafından etrafa saçılır ( $I_d$ ), bir kısmı da çözeltiden geçer ( $I$ ). Şekil 1.5’de bu olaylar görülmektedir. Bunlar arasında,

$$I_0 = I + I_a + I_y + I_d \quad (1.1)$$

şeklinde bir bağıntı vardır.



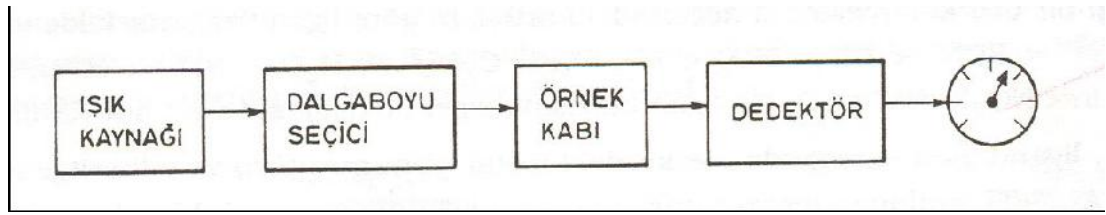
Şekil 1.5. Bir kapta bulunan bir çözelti üzerine gönderilen ışın demetinde yansıma, saçılma (dağılma) ve absorpsiyonla  $I_0$  demetinin zayıflaması ve  $I$  demeti olarak çözeltiyi terk etmesi

Burada amaç ışık şiddetinin madde tarafından absorplanan ışık miktarını ölçmektir. Bu nedenle saçılma ve yansıma oluşmuş kayıpların engellenmesi gerekir. Bu amaçla  $I_0$  şiddetindeki ışın demeti birkaç kez çözücünden birkaç kez de incelenecek maddeyi içeren çözeltiden geçirilir. Saf çözücünden geçen ışık şiddeti  $I_0$  olarak alınır. Maddeyi içeren çözeltide yansıma, saçılma ve absorpsiyon, saf çözücüde ise sadece yansıma ve saçılma gerçekleşir (Şener, 2006).

### 1.7.2. UV ve görünür bölge absorpsiyon spektrofotometreleri

Maddenin ışığı absorplamasını incelemek için kullanılan düzeneğe absorpsiyon spektrometresi veya absorpsiyon spektrofotometresi adı verilir. Bir spektrofotometre düzeneği Şekil 1.6.’de görüldüğü gibi başlıca; ışık kaynağı, dalga boyu seçicisi ve

dedektörden oluşur. Dedektörde elektrik sinyaline çevrilen optik sinyal bir kaydedici veya bir galvanometre ile ölçülür.



Şekil 1.6. Bir spektrofotometrenin temel bileşenleri

Bu ana bileşenlere ek olarak spektrofotometrelerde ışığı toplamak, odaklamak, yansıtmak, iki demete bölmek ve örnek üzerine belli bir şiddette göndermek amacıyla mercekler, aynalar, ışık bölücüleri ve giriş ve çıkış aralıkları vardır. Örnek ise, kullanılan dalga boyu bölgesinde ışığı geçiren maddeden yapılmış örnek kaplarına konularak ışık yoluna yerleştirilir.



Şekil 1.7. UV-Görünür Alan cihazı

### 1.7.3. UV ve görünür bölge moleküler absorpsiyon spektroskopisinin uygulamaları

Bu yöntemin başlıca uygulama alanları şunlardır.

**1.7.3.1. Nitel analiz:** Analizi yapılacak olan bilinmeyen madde saflaştırıldıktan sonra uygun bir çözücüde çözülerek spektrumu alınır. Bu spektrum bilinen bileşiklerin aynı koşullarda çekilmiş spektrumları ile karşılaştırılır. Bilinmeyen madde spektrumu

kendisinininkine tam olarak uygun maddedir. Bu yöntem nitel analiz için çok uygun bir yöntem değildir. Çünkü moleküllerin absorpsiyon bantları oldukça geniştir ve bazı kromoforların absorpsiyon bantları birbiri ile örtüşebilir. Ayrıca moleküllerin UV ve görünür bölge absorpsiyon spektrumlarında çok az sayıda bant bulunur. Bu az sayıda bandın birbiri ile karşılaştırılarak karar verilmesi bazen hatalı sonuçlara yol açabilir.

**1.7.3.2. Nicel analiz:** Işığın absorplamasına dayanan analiz yöntemleri nicel analiz için oldukça yararlı ve güçlü yöntemlerdir. Bu yöntemlerin klasik yöntemlere göre önemli avantajları vardır. Bunlar:

- a) Analiz süresi kısadır. Sonuç çabuk alınır.
- b) Doğruluk derecesi yüksektir. Çoğunlukla analizlerdeki hata binde bir veya iki civarındadır.
- c) Oldukça duyarlı bir yöntemdir.  $10^{-8}$  M a kadar seyreltik çözeltilerin bile analizleri yapılabilir.
- d) Her maddenin kendine özgü bir absorpsiyon spektrumu olduğu için seçiciliği yüksektir. Çoğunlukla bir karışımdaki maddeler bir ön ayırma işlemine gerek kalmaksızın analizleri yapılabilir.
- e) Hem organik hem de anorganik pek çok molekül UV ve görünür bölge ışınları absorpladığından uygulama alanı geniştir (Şener, 2006).

## **1.8. Kromatografik Yöntemler ve HPLC yöntemi**

### **1.8.1. Kromatografi nedir?**

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 vaziyette sabit fazı farklı zamanlarda terk ederler. Bu şekilde sabit fazdan çıkan bileşenlerin derişimleri uygun

bir biçimde ölçülür ve zamana veya mobil fazın kullanılan hacmine karşı y-ekseninde işaretlenerek “kromatogram” denilen grafikler elde edilir (Yıldız, 1993).

### 1.8.2. Kromatografinin temel prensipleri ve tanımları

**Mobil faz:** Örnek bileşenlerini, sabit faz (kolon) boyunca taşıyan, çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip çözelti veya çözücü karışımlarıdır. Kullanılacak mobil fazın seçiminde, analizi yapılacak örnek madde bileşenlerinin özellikleri, kullanılacak sabit faz ve dedektörün özellikleri vb. birçok parametreye dikkat edilmelidir .

**Sabit faz:** Mobil faz içerisinde gelen örneğe ait bileşenlerin etkileşime girdikleri ve belirli ölçüde alıkonuldukları fazdır. Kromatografi tekniğinin çeşidine göre tasarlanmış ve çok değişik materyallerden çok farklı ölçülerde imal edilmiş ve “kolon” olarak adlandırılmış sabit fazlar mevcuttur. Özellikle gaz ve sıvı kromatografileri için ticari boyutta oldukça fazla marka ve boyutta kolon üretimi yapılmaktadır. Sıvı kromatografisinin bir çeşidi olan yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) uygulamalarında kullanılan kolonlar daha çok 30-300 mm uzunluğunda yaklaşık 5 µm iç çapında metalik boru şeklinde olup iç yüzeyleri çok değişik özelliklerde kaplama materyalleri ile kaplanarak, analizi yapılacak madde grupları için modifiye edilebilmektedir.

**Alıkonma:** Mobil faz içerisinde gelen, analizi yapılacak maddeye ait bileşenlerin sabit faz ile etkileşime girerek belirli oranda tutulması daha doğrusu yavaşlatılması ve böylece daha geç olarak sabit fazı terk etmesi olayıdır. Bu özellikten yola çıkılarak, belirli sabit analitik koşullar altında, her kimyasal madde için parmak izi niteliği taşıyan alıkonma zamanı (retention time- $t_R$ ) tanımı türetilmiştir. Bu kavram belirli sabit deneysel koşullarda analizi yapılan maddenin sabit fazı terk etmesi için geçen süreyi göstermektedir.

$t_0$  = kolona ait ölü zaman (column dead time)

$t_R$  = alıkonma zamanı (retention time)

$t'_R$  = net alıkonma zamanı (net retention time)

$$t_R = t_0 + t'_R$$

**Dedektör:** Kolonda ayırımı yapılan analizlenecek maddeye ait bileşenlerin alıkonma zamanlarına göre sırayla içerisinden geçerken miktar tayinlerinin yapıldığı HPLC donanımıdır. Kullanılacak dedektörün türü analizlenecek maddenin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre seçilmelidir.

**Kromatogram:** Kromatografik analiz sonucunda elde edilen grafiğdir. Y-ekseni, kullanılan dedektörün ölçtüğü fiziksel özelliğı (absorbans, fluoresans, iletkenlik, akım, kırılma indisi vb.), X-ekseni ise zamanı göstermektedir (alıkonma zamanı için kolaylık olması bakımından genellikle dakika cinsinden). Zamana karşı Y-ekseninde ölçülen fiziksel özelliğın artıp tekrar azalması şeklinde oluşan pik şeklindeki eğrilerin her biri analizlenen maddeye ait bir bileşeni göstermektedir. Bu piklere ait değerler (pik alanı, yüksekliğı, vb.) kullanılarak kalitatif ve kantitatif analizler yapmak olasıdır (Yıldız, 1993).

### 1.9. Potansiyometrik Analiz Metotları

Bir çözeltilinin elektrokimyasal bir hücre haline getirilerek önemli miktarda akım almadan potansiyelinin ölçülmesi, ölçülen potansiyelden yararlanılarak da içindeki maddenin derişiminin tayin edilmesi prensibi üzerine kurulmuş olan metotlar topluluğuna potansiyometri veya potansiyometrik analiz metotları denir. Potansiyometri bu asrın başından beri titrimetrik analizlerde kullanılmaktadır. Metot her tip çözeltiliye (renkli, renksiz, denge veren veya tamamen iyonlaşabilen maddelerin çözeltilerine) uygulanabilir. Bu metodun en büyük dezavantajı, diğeri indikatörlü metotlara göre daha çok zaman almasıdır. Potansiyometrik yöntemler için gerekli düzenekler basit ve ucuzdur, bir referans elektrot, bir çalışma elektrodu ve potansiyel ölçüm cihazını gerektirmektedir. Şekil 1.8. 'de pH ölçümlerinde kullanılan elektrot sisteminin şematik gösterimi verilmektedir. Bir elektrotun potansiyeli içine daldırıldığı çözeltide bulunan, iyon veya iyonların aktivitelerine bağlıdır. Referans elektrot potansiyeli, içine daldırıldığı çözeltiden etkilenmez. Potansiyeli sabit kaldığı sürece değışmez. Sıcaklık yükselirse potansiyelde

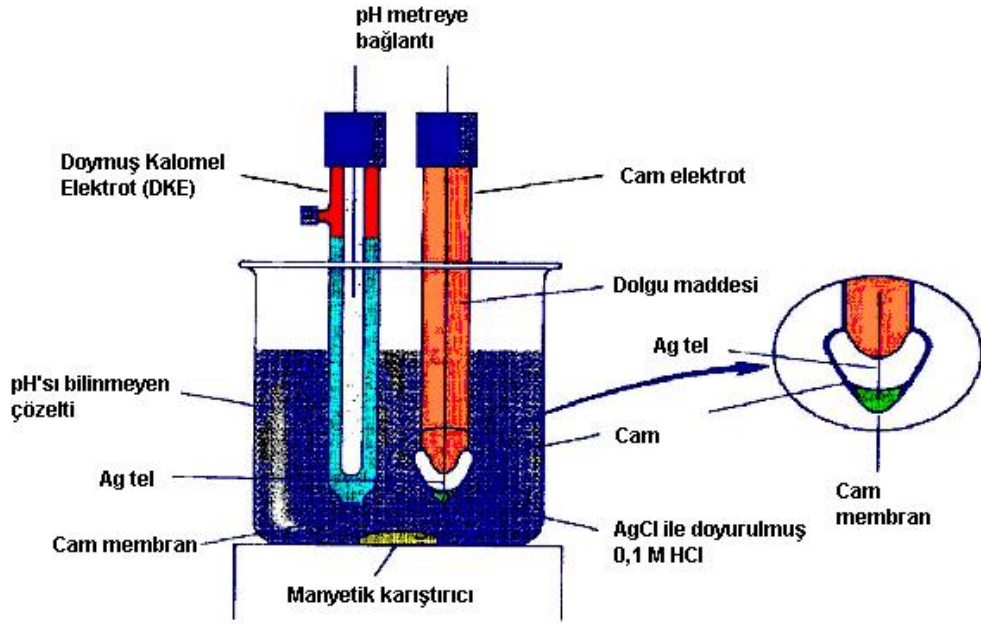


düşme olmaktadır. İndikatör elektrot ise, daldırıldığı çözeltide bulunan elektroaktif iyonun derişimine bağılı olarak farklı potansiyel göstermektedir. Bu özellik Nernst denklemi ile gösterilebilir. Denklemden  $a_i$  elektroaktif iyonun indirgenmiş halini,  $a_y$  ise yükseltgenmiş halini göstermektedir.

$$E = E^o - \frac{0,059}{N} \log \frac{a_i}{a_y} \quad (1.2)$$

Bu iyon veya iyonlar elektrot elementinin tuzlarından gelebileceğı gibi, elektrot elementiyle ilgisi olmayan başka bir elementin tuzlarından da gelebilir.

Potansiyometri bu temel üzerine kurulmuştur.



Şekil 1.8. pH ölçümlerinde kullanılan hücre (elektrot sistemi)

### 1.9.1. Potansiyometride kullanılan cam elektrot

Cam elektrot, hidrojen iyonu tayini için bilinen en iyi indikatör elektrotudur ve genel olarak gümüş/gümüş klorür referans elektroduyla birlikte kullanılır. İyon seçici elektrotların en çok bilineni cam elektrotudur. Cam elektrotta membran olarak ince bir cam zar kullanılır (Şekil 1.9.). Bu cam zar, yapısındaki oksitlerin türüne ve bağılı miktarına göre çeşitli iyonlara karşı seçicilik gösterir. Örneğin, bileşiminde % 21

Na<sub>2</sub>O, % 6 CaO ve %72 SiO<sub>2</sub> bulunan camdan yapılmış cam elektrot, çözeltideki H<sup>+</sup> iyonlarına karşı seçimlilik gösterir. H<sup>+</sup> iyonlarına karşı seçimlilik gösteren cam elektrot, H<sup>+</sup> iyonları derişiminin 1 - 10<sup>-13</sup> M olduğu derişim aralığında Nernst eşitliğine uyar; ölçülen elektrot gerilim değeri ile pH arasında doğrusal bir ilişki vardır. Ölçüm yapılmadan önce, ölçülecek pH değerinden bir pH birimi daha büyük ve bir pH birimi daha küçük pH değerlerindeki tampon çözeltilerle kalibre edilmesi gereken bu elektrot, çok asidik ve çok bazik çözeltiler için kullanılmaz.

Elektrot, ortamda bulunan yükseltgenlerden, indirgenlerden ve gazlardan etkilenmez. Ayrıca bu elektrot gümüş/gümüş klorür elektroduyla değil de kalomel referans elektroduyla birlikte kullanılırsa, ortamda bulunan proteinler bile etkili olamaz. Bunlardan başka cam elektrotlarla, viskoz ve hatta yarı akıcı numunelerin bile pH'sı tayin edilebilir.

Cam elektrotlar çok özel amaçlar için de kullanılabilir. Son zamanlarda geliştirilen mikro cam elektrotlarla hem damla mertebesindeki bir çözeltinin pH'sını, hem de hastaya yutturularak mide pH'sını ölçmek mümkün olmuştur. Cam elektrot mideye indiği zaman kalomel elektrot ağızda tutulur. Cam elektrotla yapılan pH ölçümleri sırasında bir takım hatalar oluşabilir. Çok asidik çözeltide asit hatası; çok bazik çözeltilerde ise alkali hatası söz konusudur. Modern cam elektrotlar pH 11'in üstünde, alkalilere hassastır. 0,5 pH'nın altında daha yüksek pH değerleri ölçülür. Elektrodun su kaybetmesi hatalı ölçmeler yapılmasına neden olur. İyonik şiddeti düşük olan nehir ve göl sularında pH ölçümlerinde 2 pH büyüklüğüne varan hatalar yapılabilir. Bunun nedeni, böyle numunelerde tekrarlanamayan temas yüzeyi potansiyelidir. Kalibrasyon amacıyla hazırlanan tampon standart çözeltilerin hazırlanmasında da bir takım hatalar oluşabilir.

Derişimleri farklı iki asit çözeltisi özel olarak yapılmış ince bir cam levhayla ayrılırsa, cam levhanın iki yüzü arasında bir potansiyel farkı meydana gelir. Bu potansiyel farkı

$$E = K + 0,059 \log a_1 / a_2 \quad (1.3)$$

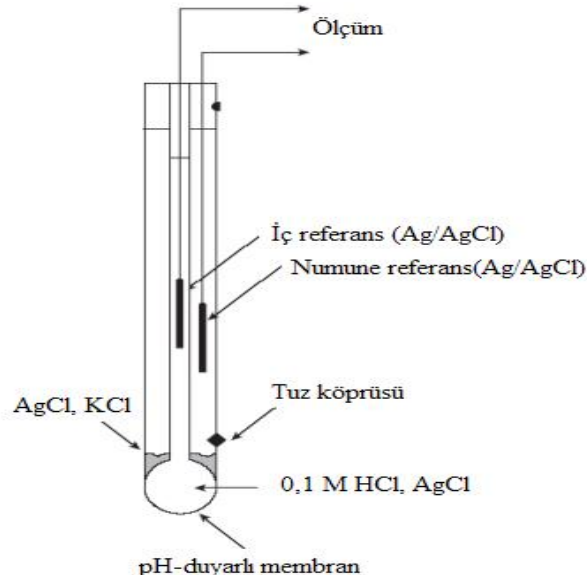
kadardır. Eşitlikteki  $a_1$  ve  $a_2$  çözeltilerin hidrojen iyonu aktiflikleri,  $K$  da bir sabittir. Bu eşitlikten yararlanılarak potansiyometrik olarak pH tayinleri yapılır. Bu amaçla çözeltilerden birinin aktifliği örneğin,  $a_2$  sabit tutulur. Buna göre,

$$E = k + 0,059 \log a_1 \quad (1.4)$$

$$E = k - 0,059 \text{ pH} \quad (1.5)$$

elde edilir. Bir elektrot için  $k$  sabiti, aktivitesi belli bir çözelti alınıp potansiyelinin ölçülmesinden hesaplanır.

Gümüş / gümüş klorür elektrodu ortamdaki hidrojen iyonu aktivitesine bağlı olarak bir potansiyel gösterir. Bunun da nedeni cam elektrodun iki yanındaki farklı hidrojen aktivitesidir. Cam elektrot yardımıyla gümüş elektroda geçen bu potansiyel kalomel bir elektroda karşı ölçülür. Bir çok cam elektrot 1-10 pH aralığında kullanılır.



Şekil 1.9. Kombine cam pH elektrodu

### 1.9.2. Potansiyometrik titrasyon

Çeşitli elektrotlar kullanılarak, farklı tepkimeler potansiyometrik ölçümler ile izlenebilir. Potansiyometrik titrasyon adını alan bu nicel analiz yönteminde her titrant eklenmesinden sonra ölçülen gerilim değeri, eklenen titrant hacmine karşı grafiğe geçirilerek potansiyometrik titrasyon eğrisi oluşturulur. S şeklinde olan potansiyometrik titrasyon eğrisinde, dönüm noktası eğrinin eğiminin en büyük olduğu noktadır. Dönüm noktasının hatasız bir biçimde elde edilebilmesi için, eşdeğerlik noktası civarındaki titrant eklenmesi çok özenli olarak yapılmalıdır. Potansiyometrik titrasyon ile doğru ve kesin sonuçlar elde edilir ve sürekli olarak gerilim değişmesi ölçüldüğünden sıvı temas geriliminin ve aktivite katsayısının ölçümlere etkisinin dikkate alınması gerekmez. Asit-baz tepkimelerinde kullanılan iyon seçici elektrot, cam elektrottur. Bu titrasyonlarda eşdeğerlik noktasında pH değerinde birdenbire büyük bir değişme olur. Asidin veya bazın kuvveti azaldıkça, yani  $pK_a$  veya  $pK_b$  değerleri arttıkça, dönüm noktasında gözlenen pH değişmesinin büyüklüğü ve keskinliği azalır. Aynı durum, kullanılan titrant derişiminin azaldığı zaman ve zayıf bir asidin kuvvetli bir baz yerine zayıf bir bazla titre edildiğinde de gözlenir (Sardohan,2006).

### 1.10. Kemometri

Kemometri kelime olarak, 1970'li yıllarda istatistik ve matematiksel yöntemler ile birlikte bilgisayar ve yazılımların kullanıldığı kimyadaki uygulamaları için sözü edilmeye başlanmıştır. Kemometri kavramı, 1972 yılında İsveçli Svante Wold ve Amerikalı Bruce R. Kowalski tarafından ileri sürülmüştür ve 1974 yılında Uluslararası Kemometri Derneği tarafından bu disiplinin ilk resmi açıklaması yapılmıştır. İzleyen yıllarda, dünyada, ulusal ve uluslararası kemometri konferanslarının da organize edildiği gözlenmektedir.

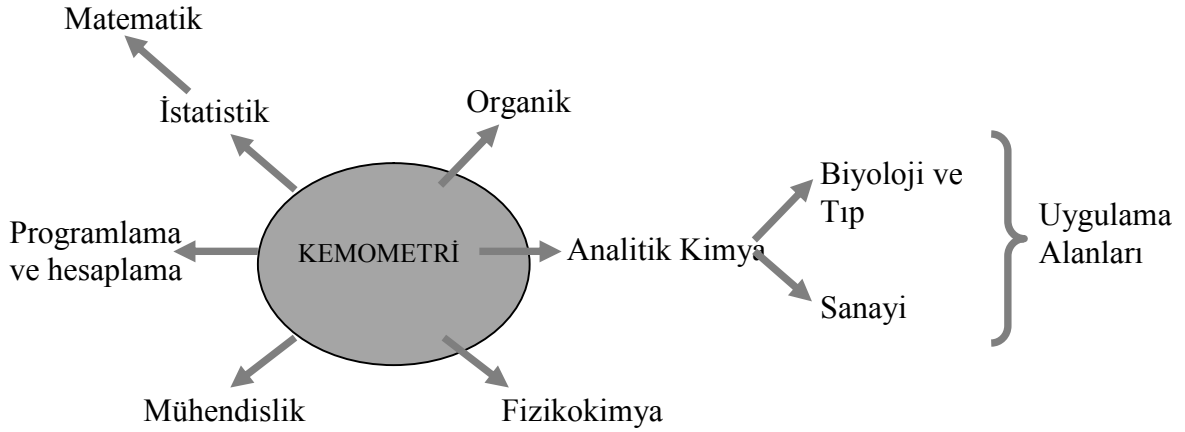
Tanımlayıcı ve açıklayıcı istatistik, sinyal işleme (signal processing), deneysel tasarım (experimental design), modelleme (modeling), kalibrasyon (calibration), optimizasyon (optimization), yapı tanıma (pattern recognition), sınıflandırma (classification), yapay akıl yöntemleri (artificial intelligence methods), resim işleme

(image processing), bilgi ve sistem kuramı (information and system theory) gibi kavram ve uygulamalar kemometrinin konularını oluşturmaktadır.

Kemometri disiplininde temel olarak üzerinde vurgu yapılan istatistik- matematik yöntemlerdir. Rastgele (düzensiz) veriler, sırasıyla istatistiğin tanımlayıcı ve açıklayıcı yöntemleriyle karakterize ve test edilirler. Analitik verilerin işlenmesinde, istatistik ve uygulamalı matematik kemometrinin temel araçlarıdır.

Sinyallerin işlenmesi, düzleştirme (smoothing), filtreleme (filtering), türev ve integrasyon için kullanılan algoritmalar vasıtasıyla gerçekleştirilir. Fourier ve dalgacık dönüşümü gibi yöntemler sinyal işlemek için kullanılan yöntemlerdir.

Kemometrik yöntemlerin en büyük kullanıcısı analitik kimyacılar olmakla birlikte, laboratuvar ve analiz çalışması yapan komşu branşlarda da kullanıldığı yayınlanan eğitici notlardan ve bilimsel makalelerden gözlenmektedir. Kemometrinin farklı disiplinler ile ilişkileri Şekil 1. 10. de sunulmaktadır.



Şekil 1.10. Kemometrinin ilişkili olduğu disiplinler

Şekil 1.10. da görüldüğü kemometrik çalışmalarda, analitik kimyacıların ve diğer ilgili disiplinlerin ihtiyaçları ölçüsünde uygulamalı matematik ve istatistik bilgisine sahip olmaları gerektiği açıktır. Burada programlama ve hesaplama çok önemlidir. Kemometrik uygulamaların çoğu kompleks hesaplamalar içermektedir. Bu

hesaplamaları elle veya basit hesap makineleriyle gerçekleştirmek mümkün olmadığı için bilgisayar programlarına ihtiyaç vardır. Kemometrik hesaplamalarda genellikle EXCEL, MATLAB, PANORAMA, MİNİTAB, XLSTAT, SOLO ve diğer paket programlar kullanılmaktadır.

Kemometri; analitik kimya, adli tıp, biyoloji, gıda kimyası, çevre kimyası, arkeoloji gibi alanlarda kullanılmaktadır. Fizikokimyacılar ve madde bilimcilerin sinyal işleme ve çok değişkenli verilerin analizinde kemometrik yöntemleri uyguladıkları görülmektedir. Organik kimyacılar ve farmasotik kimyacılar, reaksiyon koşullarının optimizasyonunda deneysel tasarım ve ilaç tasarımında yapı etki ilişkisi çalışmalarında kemometrinin araçlarını kullanmaktadırlar.

İki veya daha fazla aktif bileşiği içeren karışımlarda bu aktif bileşiklerin hiçbir ayırma işlemi kullanmaksızın analizi analitik kimyanın ve diğer komşu branşların temel problemlerinden birisidir. Karışım halindeki numunelerin analizi için çeşitli kromatografik ve spektrofotometrik yöntemlerin yaygın olarak kullanıldığı çalışmalarda da görülmektedir. Bazı durumlarda bahsedilen bu yöntemlerin iyi sonuçlar vermediği de bir gerçektir. Sayılan bu nedenlerden dolayı daha düşük miktarlarda numunelerin analizi için gelişmiş analitik cihazlar geliştirilmesine rağmen klasik analitik cihazlardan elde edilen verilerin çeşitli matematiksel algoritmalara tabi tutularak yöntemlerin hassasiyeti ve sonuçların doğruluğu artırılmaya çalışılmaktadır. Örneğin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi, cihazın pahalı olması ve kromatografik şartların optimizasyonunun uzun zaman alması gibi dezavantajlara sahiptir. Diğer taraftan türev spektrofotometrisi gibi klasik grafik işlemlere dayanan yöntemler ikili karışımların analizi için kullanılabilirliğine rağmen ikiden daha fazla aktif bileşiği içeren numunelerin analizinde yetersiz kalmaktadır (Dinç, 2007).

### 1.10.1. Çok değişkenli kalibrasyon algoritmaları

#### 1.10.1.1. Temel bileşen analizi yöntemi (Principal component analysis (PCA) method)

Çok bileşenli verilerle ilgili en önemli sorunlardan biri, orijinal verilerin tamamının desen ve ilişkilerinin görülmesini engellemesidir. Çok değişkenli analiz yöntemlerinin birçoğunun temel hedefi verilerin boyutunu küçültmektir. Temel bileşen analizi daha çok bileşenler arasında korelasyonun olmadığı durumlarda verilerin miktarını azaltmak için kullanılan bir tekniktir.

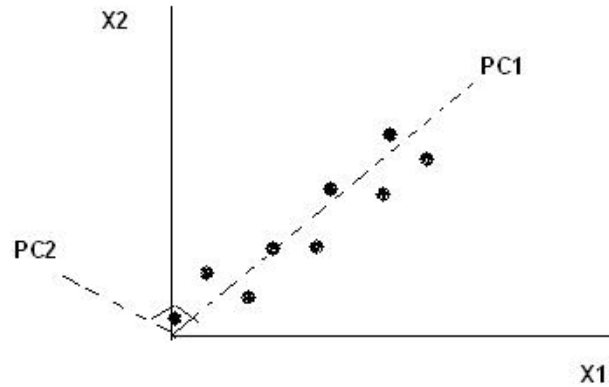
Temel bileşen analizinin dayandığı ana fikir, her bir numuneyi tanımlayan orijinal değişkenlerin,  $X_1, X_2, \dots, X_n$ , doğrusal kombinasyonu olan  $PC1, PC2, \dots, PCn$  şeklindeki temel bileşenleri bulmaktır.

$$PC1 = a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + \dots + a_{1n}X_n \quad (1.6)$$

$$PC2 = a_{21}X_1 + a_{22}X_2 + \dots + a_{2n}X_n$$

vb.

Esas bileşenler genellikle ortak varyans (kovaryans) matrisinden elde edilir. Ortak varyans, iki değişkenin birleşik varyansının bir ölçüsüdür. Matematiksel anlamda temel bileşenler (PC), ortak varyans matrisinin eigenvektör (özvektör) leridir ve bu vektörlerin bulunmasında kullanılan tekniğe eigen analizi adı verilir. Her bir esas bileşene (yani, eigen vektörüne) karşılık gelen eigen değeri, o esas bileşenle tanımlanan veri takımının varyansının miktarını gösterir. Esas bileşenler birbirine dik açı oluşturur. Bu özellik diksellik olarak adlandırılır (Uyanık, 2008).



Şekil 1.11.  $X_1$  ve  $X_2$  olan iki değişken için  $PC1$  ve  $PC2$  olan iki esas bileşenigösteren diyagram (Uyanık, 2008)

### 1.10.1.2. Temel bileşen regresyon yöntemi (Principal component regression (PCR) method)

Kemometrik kalibrasyon yöntemlerinden birisi olan temel bileşen regresyon yöntemi, derişim seti için ölçülen absorbans verilerinin dekompozisyonu ile birbirine dik (ortogonal) doğrular elde edilmesi esasına dayanır. Bu elde edilen doğrular kurulacak kalibrasyonun koordinat sistemidir.

Burada açıklanan PCR algoritması Martens ve Naes (1984) tarafından verilen şemaya göre açıklanmaktadır. PCR kalibrasyonu kurulmasındaki basamaklar aşağıdaki biçimdedir:

Analiz edilecek maddenin derişim ve absorbans verilerinin varyans-kovaryansı bulunur. Varyans-kovaryans saçılma matriksinin öz vektörleri ve öz değerleri hesaplanır. Seçilen öz değere (eigenvalue) karşılık gelen öz vektör (eigen vector) kalibrasyonun lineer bileşenidir.

PCR algoritmasında genel lineer regresyon denklemi aşağıdaki biçimde yazılabilir:

$$C = a + b \cdot A \quad (1.7)$$

Burada C analiz edilecek maddenin derişimidir, a sabit sayı, b ise temel bileşenlerin ve C- loading matriksinin (q) çarpımından elde edilir:

$$b = P \cdot q \quad (1.8)$$

Burada P öz vektörlerin matriksidir. Öz vektörler kolon matriksi en uygun öz değere (faktöre) ya da öz değerlere (faktörlere) karşılık gelmektedir. Burada q vektörü C-loading olarak adlandırılır ve T (sayı matriksi) üzerinden C' nin regresyonu ile tayin edilir.

$$q = D \cdot T^T \cdot Y_0 \quad (1.9)$$

Burada D diagonal matriks olup her bir öz değer tersine eşittir. t<sub>1</sub> sayı matriksi aşağıdaki eşitlikten elde edilebilir:

$$t_1 = A_0 \cdot P_1 \quad (1.10)$$



Ortalanmış absorbans ve derişim,  $A_o$  ve  $C_o$  ile gösterilebilir. Burada  $a$  sabiti genel lineer regresyon denklemi kullanılarak aşağıdaki eşitlikten hesaplanabilir:

$$a = C_o - A_o^T \cdot b \quad (1.11)$$

Her bir aşamada elde edilen değerler denklemde yerine konarak numunede bilinmeyen derişimi hesaplanabilir.

a) Yöntemin avantajları; *i*) dalga boyu seçimi gerektirmez, genellikle bütün spektral alan ya da bu spektral alanın geniş bir bölgesi kullanılabilir, *ii*) çoklu bileşen analiz için kullanılabilir, *iii*) PCR veri işlemleri için ve kalibrasyondaki katsayılarının hesaplanmasında ILS regresyon işleminin kullanılmasına olanak tanır. *iv*) analiz edilecek bileşenlerin bilinmesi şartıyla çok kompleks karışımlar için kullanılabilir, *v*) bazen orijinal kalibrasyon karışımlarında bulunan fakat numunede bulunmayan bileşenli numunelerin miktar tayininde kullanılabilir, *vi*) kalibrasyon için ölçülen absorbansların dekompozisyon işleminden sonra uygun öz vektörlere karşılık seçilen öz değerlerin deneysel ortamdan ve ölçüm aletlerinden gelen gürültünün eliminasyonuna olanak tanır.

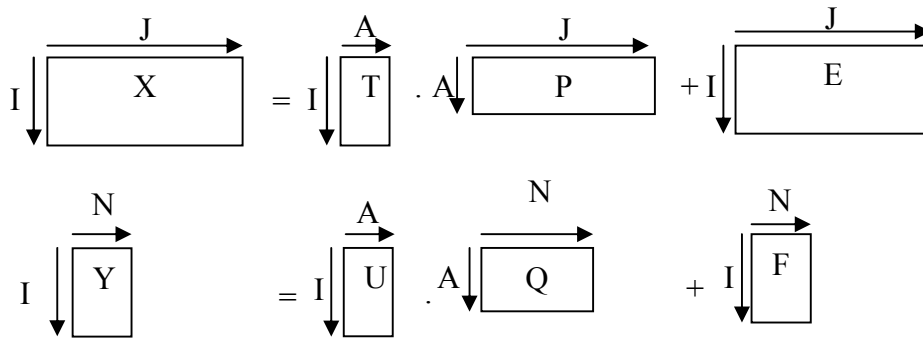
b) Yöntemin dezavantajları; *i*) hesaplamalar klasik yöntemlere göre daha yavaştır, *ii*) yöntemin optimizasyonu temel kalibrasyon komponentlerinin bazılarının bilinmesini gerektirir (anlaşılması ve yorumlanması çok kompleks modeller için), *iii*) kalibrasyon için temel alınan vektörler analiz edilecek bileşenlere karşılık gelmeyebilir, *iv*) genellikle çok sayıda kalibrasyon numunesinin kullanılması doğru bir kalibrasyon için gereklidir, *v*) kalibrasyon numunelerinin hazırlanması bileşenlerin derişimleri ile doğrusallıktan uzaklaşmaları nedeniyle zordur (Dinç, 2007).

### **1.10.1.3. Kısmi en küçük kareler yöntemi (Partial least squares regression method)**

Kemometrik kalibrasyonlardan en yaygın ve popüler olanı PLS yöntemidir. PLS yönteminde kalibrasyonun kurulması için kullanılan PLS algoritmalarına göre,

ortogonalize edilmiş PLS algoritması (orthogonalized PLS algorithm) ve ortogonalize olmayan PLS algoritması (non-ortogonalized PLS algorithm) gibi şekilleri vardır. Ortogonalize PLS ve ortogonalize olmayan PLS kalibrasyonunun PLS<sub>1</sub> ve PLS<sub>2</sub> şeklinde iki tipi söz konusudur. PLS<sub>1</sub> de bir bileşik model içerisinde iken; PLS<sub>2</sub> de bütün bileşikler modele dahil edilmektedir.

Wold ve Martens tarafından verilen PLS algoritması en genel olanlarıdır. PLS kalibrasyonu, sayı vektörleri vasıtasıyla X- ve Y- blokları arasındaki ilişkiye dayanır. PLS algoritmasına göre sıfır etrafında merkezleştirilmiş X- değişkeninin matrisi ve sıfır etrafında merkezleştirilmiş Y- değişkeninin parçalanması aşağıdaki biçimde verilir.



Şekil 1.12  
PLS2 kalibrasyonu

$$X = T.P^T + E \quad (1.12)$$

$$Y = U.Q^T + F$$

$$Y = X.B + F$$

$$B = W (P^T.W)^{-1} . Q^T$$

Burada X= bağımlı değişken (absorbans verileri), Y= bağımsız değişken (örneğin derişim), T= X için sayı matrisi, U= Y için sayı matrisi , P= X için yük matrisi, Q= Y için yük matrisi, E= X-kalıntı matrisi , F= Y-kalıntı matrisi , W= max (kovaryans (E,F) )

PCR algoritmasında olduğu gibi bu katsayılar (B) linear regresyon denkleminde yerine konursa analiz edilecek numunenin absorbans değerleri bu eşitlikte yerine yazılarak hesaplanabilir.

a) Yöntemin avantajları ; *i*) PLS kalibrasyon işlemi CLS ve ILS hesap tekniklerini kapsamaktadır, *ii*) tek aşamalı bir dekompozisyon ve regresyon işlemi gerektirir, kalibrasyonda kullanılan öz vektörler analiz edilen bileşenler ile en geniş ortak spektral değişimin olduğu bölgede doğrudan ilişkilidir, *iii*) kalibrasyonlar genellikle kalibrasyon setinin bilinmeyen numunelerden beklenen değişik derişimlerini yansıtması daha fazla güvenilirlik sağlayacaktır, *iv*) yalnızca analiz edilecek bileşenlerin bilinmesi şartıyla kompleks karışımlar için kullanılabilir, *v*) bazı durumlarda orijinal kalibrasyon karışımlarında bulunan fakat numunede olmayan bileşenli numunelerin miktar tayininde kullanılabilir, *vi*) bu tekniklerin hepsi spektral kantitatif analiz için uygulanırken literatürdeki sebepler genellikle PLS' nin tahmin gücünün yüksek olduğunu göstermektedir. Birçok durumda PLS metodları PCR' den daha iyi sonuçlar verir.

b) Yöntemin dezavantajları; *i*) PLS hesaplamaları klasik metodlardan daha yavaştır, *ii*) PLS modellerin anlaşılması ve yorumlanması zor olup son derece soyuttur, *iii*) genellikle çok sayıda numune için doğru bir kalibrasyon gereklidir, *iv*) kalibrasyon numunelerinin hazırlanması bileşenlerin derişimleri ile doğrusallıktan uzaklaşmaları nedeniyle zordur (Dinç, 2007).

#### **1.10.1.4. Çok değişkenli doğrusal regresyon (MLR)**

Çoklu doğrusal regresyon, regresyon eşitliğinin  $C_i = b_{0i} + b_{1i}A_1 + b_{2i}A_2 + b_{3i}A_3 + \dots + b_{ni}A_n$  şeklinde bulunmasını içerir. MLR yapmak için kalibrasyon örneklerinin sayısının tahmin edici sayısından daha fazla olması gerekmektedir.

Tek değişkenli regresyonda olduğu gibi, atıkların (kalıntıların) analizi modelin değerlendirilmesi açısından önemlidir. Kalıntılar rastgele ve normal olarak dağılmalıdır. Tahmini değerler ölçülen değerlere karşı grafiğe geçirilir ve incelenir. Noktalar şüpheli bir değer olmaksızın yaklaşık bir doğru oluştururlar.

Tahmin performansının geçerliliği bir çapraz geçerlilik (birini dışarıda bırak) yöntemi kullanılarak gösterilebilir. Burada tahminsel kalıntısız hata, PRESS, (karelerin tahmin (tayı) hatalarının toplamı) hesaplanır. Bu değerin sıfıra yakın olması kullanılan modelin tahmin gücünün iyi olduğunu gösterir (Uyanık, 2008).

### **1.10.2 Kalibrasyon (derişim) setinin tasarımı**

Kemometrik kalibrasyonlar için kalibrasyon seti ya rasgele (randomly) yada analizi yapılacak numunede yer alan maddelerin derişimlerini içerecek şekilde kalibrasyon (derişim) setinin tasarımı yapılır. Simetrik kalibrasyon setinin planlanmasında analiz edilecek maddelerin derişimleri, kalibrasyon setinin içinde ana kümenin permütasyonları şeklinde alt kümeler oluşturmalıdır. Kemometrik çalışmalarda rasgele kalibrasyon setinin hazırlanmasından ziyade, analiz edilecek maddelerin derişimlerine göre simetrik ve hataların minimize edilmesi açısından tercih edilecek bir durumdur. Çalışmalarda derişim seti hazırlanmasında, çeşitli tasarım şekilleri verilmekle birlikte rastgele hazırlanan derişim setleri de kullanılmaktadır (Dinç, 2007).

### **1.10.3. Çapraz validasyon işlemi (Cross-validation procedure)**

Kemometrik kalibrasyonların validasyonu için kalibrasyonu ve tayin basamaklarında kalibrasyonun standart hatası (Standard error of calibration→ SEC) ve tayinin (tahminin) standart hatası (Standard error of prediction→ SEP) gibi parametreler kullanılmaktadır. SEC ve SEP değerlerini minimum yapan kalibrasyon koşulları ve F-istatistiği kullanılır. Kalibrasyon performanslarını değerlendirmek için, kemometrik kalibrasyonların SEC ve SEP değerleri yanında, bilinen ve tahmin edilen derişim değerlerinin lineer regresyon analizi yapılarak, korelasyon katsayısı , doğrunun eğim (m) ve kesim (n) değerleri kullanılır.

PCR ve PLS kalibrasyonlarının kurulmasında faktör seçimi için çapraz validasyon işlemi (Cross-validation procedure) kullanılır. Bunun için karelerin tahmin (tayı) hatalarının toplamı (prediction error sum of squares→PRESS) hesaplanır. Optimal

faktör sayısını bulmak için önerilen kriterler minimum PRESS değeri ve F-istatistiğidir (Dinç, 2007).

#### **1.10.4.Kemometrik kalibrasyon yöntemlerinin uygulamaları**

##### **1.10.4.1. Kemometrik yöntemlerin uygulama alanları**

Analitik kimyadaki miktar tayini çalışmalarında, kemometrik kalibrasyon yöntemleri yada çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri IR spektrofotometre, UV- görünür alan spektrofotometre, spektroflorimetre, HPLC ve kapiler elektroforez gibi analitik cihazlardan elde edilen analitik veriler uygulanmaktadır. Analitik kimyanın prensip ve yöntemleri çok değişik komşu disiplin tarafından kullanılmaktadır. Bu da analitik kimyanın biyoloji, tıp, ziraat, gıda ve eczacılık gibi alanlarda geniş bir uygulama alanı olduğunu göstermektedir.

Analitik çalışmalarda kemometrik yöntemlerin uygulamaları anorganik analiz, organik analiz, ilaç analizi, klinik ve biyolojik numunelerin analizi, gıda ve su analizleri, çevre analizleri ve stabilite tayinleri, çözünme hızı testleri şeklinde özetlenebilir (Dinç, 2007).

##### **1.10.4.2. Çoklu bileşen analizi (Multicomponent analysis)**

Son yıllarda, çoklu bileşen analizi, analitik kimyacılar için en önemli konulardan birisi olmuştur. Bu bağlamda, aynı anda miktar tayinlerinin klinik kimyası, ilaç analizi, kirlilik kontrolü vb. gibi değişik disiplinler ile ilgili aktif bileşikler içeren karışımların kantitatif analizi için oldukça kullanışlı olduğu kanıtlanmıştır. Çok değişkenli kalibrasyonların absorban sinyallerine uygulanmasıyla çoklu bileşen analizlerinden elde edilen sonuçların doğruluğu, yöntem ve kullanılan analitik sinyallere bağlıdır.

##### **1.10.4.3.Organik bileşiklerin kantitatif analizi**

- Farmasotik analizdeki uygulamalar
- Gıdalardan renk maddelerinin analizi

- Biyolojik sıvılardaki uygulamalar
- Çevre analizindeki uygulamalar
- Anorganik analizlerdeki uygulamalar (Dinç, 2007).

### 1.10.5. Varyans analizi (ANOVA)

Varyans analizi tekniği kullanılarak grup ortalamaları arasındaki farklılığın veya farklı analitik yöntemler ile elde edilen analiz sonuçlarının ortalamaları arasındaki farklılığın önemli olup olmadığına bakılabilir. Bir araştırmada k tane işlemin ( veya k tane yöntemin) n tekrarının sonunda elde edilen veriler bir tabloda özet haline getirilir. Sonra kontrol ve karşıt hipotezi aşağıdaki şekilde kurulur.

$H_0$  : İşlemlerin temsil ettiği popülasyon ortalamaları arasındaki fark tesadüften ileri gelmektedir. İşlem ortalamaları arasındaki gözlenen fark sıfır kabul edilebilir:

$$\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k \text{ dir.}$$

$H_1$  : En az iki muamele grubunun ortalaması arasında gözlenen fark tesadüften ileri gelmektedir. En az iki işlem grubunun incelenen özellik üzerine olan etkileri birbirinden farklıdır, yani aralarındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

Karşıt hipotez kurulurken en az iki işlem arasındaki fark önemlidir denilmektedir. Çünkü kontrol hipotezinin yapılan analiz sonucunda reddedilmesi için denemede dikkate alınan k tane işlemin birbirinden farklı olması gerekmez. En az iki işlem arasındaki farklılık kontrol hipotezinin reddedilmesine sebep olabilir.

Yapılan hipotez kontrolü sonucunda karşıt hipotez kabul edilmiş ise bu en az iki grup ortalaması arasındaki farklılığın önemli olduğu “çoklu karşılaştırma yöntemleri” kullanılarak araştırılır.

Gruplar arası, gruplar içi serbestlik dereceleri ve gruplar arası- gruplar içi kareler toplamı hesaplanır. Bu değerlerin oranlanmasıyla F değeri elde edilir. Elde edilen F değeri F değeri F tablosundan ( $\alpha:0,05$ ) okunan değerle kıyaslanır.

Varyans analiz çizelgesi (ANOVA testi çizelgesi = ANalysis Of VAriation )

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F-değeri
Yöntemler arası (Gruplar arası)	$k-1$	$\sum_{i=1}^k n_i (\bar{X}_i - \bar{X})^2$	$\sum_{i=1}^k n_i (\bar{X}_i - \bar{X})^2 / (k-1)$	$F = \frac{\sum_{i=1}^k n_i (\bar{X}_i - \bar{X})^2}{k-1} \div \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (X_{ij} - \bar{X}_i)^2}{k(n-1)}$
Yöntemler içi (Gruplar içi)	$k(n-1)$	$\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (X_{ij} - \bar{X}_i)^2$	$\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (X_{ij} - \bar{X}_i)^2 / (k(n-1))$	
Genel varyasyon	$nk-1$	$\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (X_{ij} - \bar{X})^2$		

(Dinç,2009).

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1.UV/VIS Spektrofotometri Yöntemiyle Yapılan Çalışmalar

Bouhsain and Garrigues (1997) bu çalışmada basit ve hızlı bir analitik metot önermişlerdir. Bu metotta, 216-300 nm arasında 5 nm aralıklarla spektrofotometrik absorbanslarla PLS ile ilaçlarda olan parasetamol, asetilsalisilik asit ve kafeinin eş zamanlı tayini yapılmıştır. Üç bileşiğin sekiz standart karışımının kullanılmasını içeren metot, iki derişim seviyesinde ölçülmüştür ve %20 etanol-su karışımında örneklerin absorbanslarının ölçümü önceden incelenmiştir. Gerçek ve sentetik değerlerin analizinde, gerçek ve tahmini değerler örneklerin dayanma seviyesi olarak % 5 den daha düşük varyasyon katsayısı ve doğruluk hatası durumlarında önceki yöntemle bulunmuştur.

Yongnian and Gong (1997), bu çalışmada tartrazin, sunset yellow, ponso 4R, amarant ve brilliant blue içeren karışımların kimyasal ön ayırması olmaksızın spektrofotometrik olarak eş zamanlı analizleri bu metotla yapılmışlardır. Deneylelerden elde edilen veriler , CLS, PCR, PLS ve ITTFA gibi kemometrik yaklaşımlarla incelenmiştir. Bu işlem sırasında normal absorbans spektrumu ve 1. ve 2. türev spektrumları kullanılmıştır. Renklendiricilerin tamamından oluşan farklı derişimler içeren 16 sentetik karışımı incelenmiştir. Sonuçların farklı kemometrik yaklaşımlarla karşılaştırılarak uygulaması sağlanmıştır. ITTFA yönteminin PCR, PLS ve CLS den daha iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Kalibrasyonlar ilk türevlere dayandırılmıştır. Önerilen metotla, bazı ticari gıda ürünlerindeki renk maddelerinin belirlenmesi sağlanmıştır.

Berzas Nevado et al. (1998), yaptıkları çalışmada çok basit olan bir spektrofotometrik metot denemişlerdir. Bu metotta, sıfır kesişme dalgaboyunda yapılan ölçümlerle oran spektrumunun ilk türevi kullanılarak tartrazin, sunset yellow ve ponso 4R , renk maddelerinin çoklu karışımları incelenmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafikleri 20 mg/L tartrazin (E-102), 40 mg/L sunset yellow (E-110), 32 mg/L ponso 4R (E-124) e kadar doğrusaldır. 8 mg/L tartrazin , 8 mg/L sunset yellow ve 8 mg/L ponso 4R nin dokuz standardı için sırasıyla % 0,9 ; % 0,8 ve % 2,4 standart sapmaları elde edilmiştir. Bu metotta % 94-105 oranında geri kazanım



hesaplanmıştır ve bu oran bu renklendiricileri farklı oranlarda içeren sentetik karışımlara uygulanabilirliği gösterir. Ayrıca metot ayrılma basamağı gerektirmeyen üç renk maddesini içeren üç ayrı ticari örneğe de uygulanmıştır. Sonuçlar, HPLC ile karşılaştırılmıştır ve elde edilen sonuçlar benzerdir.

Capitán-Valley et al. (1998), yaptıkları çalışmada gıdalarda renk maddesi olarak kullanılan tartrazin(TT), sunset yellow (SY) ve ponso 4R (PR) nin eş zamanlı tayini için bir metot geliştirmişlerdir. Renklendiriciler, pH:2,0 da Sephadex DEAE A-25 jelinde kararlı hale getirilmiştir ve daha sonra 1 mm silika hücresinde paketlenmişlerdir. Katı destekle karşılaştırılan analitlerin spektrumları 400-800 nm arasında köre karşı okunarak kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçların hesaplanmasında kısmi en küçük kareler metodu (PLS) kullanılmıştır. Üç renk maddesi için kalibrasyon grafiklerinin, lineer oranı 50-650 mg/mL dir. Bu oranlar PLS-1 algoritması kullanılarak kalibrasyon matriksinin optimizasyonuna karşı alınmıştır. Kalibrasyon matriksi için faktörlerin optimum miktarını gösteren deneysel sonuçlar, bütün örneklerde dördü ve bağıl standart sapmalar, SY için 5,5267; TT için 6,3878 ve PR için 6,9816 dır. Korelasyon katsayısının karesi, sırasıyla SY, TT, PR için 0,9977; 0,9978; 0,9954 dür. Metot, gıdalarda bulunan renk maddelerine uygulanmıştır ve sonuçlar referans metot olarak HPLC ile elde edilen sonuçlarla kıyaslanmıştır. Hesaplanan sonuçlar, dokuz ticari örnekten sekizinde kabul edilebilirdir. Bağıl standart sapmalar ise 0,5-10,8 arasındadır.

Berzas et al. (1999), bu çalışmada dört spektrofotometrik metot geliştirmişlerdir ve bu metotlar tartrazin, patent blue V ve indigo karmin gibi gıda boyalarının çoklu karışımlarını çözmek için uygulanmıştır. Bu üç renk maddesinin eş zamanlı tayini, üç ticari üründe farklı oranlarda olan bu renklendiricilerin sentetik karışımlarının en iyi şekilde belirlenmesi için kullanılan ilk türev ve oran spektrum-sıfır kesişme türevi kullanılarak iki türev metodu ile başarılmıştır. Bileşiklerin direk absorpsiyon spektrumu, PLS-1 ve PCR la kalibrasyon uygulamak için spektrum verilerini optimize etmek için kullanılmıştır. Kalibrasyon metotlarının her ikisi de iç validasyonla, çapraz-validasyonla ve dış validasyonla değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme, hem sentetik hem de ticari numunelere uygulanmıştır. Tanımlanan

dört metotta da, herhangi bir ön ayırma işlemi yapılmamıştır. Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik dört spektrofotometrik metotta %95 güven sınırında çok farklılıkların olmadığını gözlenmiştir. İki türev ve çok bileşenli kalibrasyon sonuçları arasındaki kıyaslamada, değerlerin uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Chaloosi et al. (2001), bu çalışmada siklo-1,3,5-trimetilen-2,4,6- trinitroamin (RDX) ve siklo-1,3,5,7- tetrametilen-2,4,6,8- tetranitroamin (HMX) in UV-absorpsiyon spektrumlarını incelemişlerdir. Bu spektrumlar, kuvvetli bir şekilde üst üste örtüşür ve alışılmış metotlarla ön ayırma olmaksızın direk olarak belirlenmesi zordur. Deneysel kalibrasyon matrisi, 15 örnekle düzenlenmiştir. Derişim, HMX için, 0,584 µg/mL ve 10,220 µg/mL arasında, RDX için 0,400 µg/mL ve 8,00 µg/mL arasında değişmektedir. Çapraz-validasyon metodunda faktörlerin miktarı kullanılmıştır. Önerilen metodun doğruluğunu kontrol etmek için uygun model olan PLS-2 endüstriyel örneklerde RDX ve HMX bileşenlerinin tayini için uygulanmıştır.

Altınöz and Toptan (2002), yaptıkları çalışmada ikili karışımlardaki tartrazin ve ponso 4R nin belirlenmesi için bir metot önermişlerdir. Bu metot, sakkaroz ve sitrik asit içeren çeşitli ticari gıda örneklerindeki iki renk maddesinin eş zamanlı belirlenmesini sağlamıştır. İlk türev UV spektrofotometrik metodu, 300-700 nm dalgaboyu aralığında ve pH: 7,0 de fosfat tamponu ile çalışılmıştır. Doğrusallık oranı, 1,00-60,00 µg/mL tartrazin, 1,00-52,00 µg/mL ponso 4R olarak Vierordt's metodu ile ve ilk türev UV spektrofotometrik metoduyla bulunmuştur. Değerler; farklı metotlarla ve HPLC için verilen literatür verileriyle kıyaslanmıştır. Bu metotlarda istatistik olarak çok büyük farklılıklar yoktur. Geliştirilen Vierordt's metodu ile ve ilk türev UV spektrofotometrik metodu doğru, kesin, tekrarlanabilir ve gıda örneklerine kolayca bulunmuştur.

Dinç ve Baleanu (2002), bu çalışmada tabletlerdeki silazapril ve hidroklorotiazid in eşzamanlı tayininde farklı kemometrik metotlar uygulamışlardır. CLS, ILS, PCR ve PLS metotları ile karışımdaki iki ilacın üst üste çakışan spektrumlarının ön ayrılmasına gerek kalmamıştır. 0,1 M HCl ve 1:1 metanolle iki ilacın rastgele karışımını içeren kalibrasyon setleri hazırlanmıştır. UV spektrumundaki absorpsiyon

verileri,  $\Delta\lambda$ : 4 nm aralıklarla 210-290 nm spektrumda 222 nm den 276 nm ye kadar 15 dalgaboyu noktasında ölçülmüştür. Geliştirilen metotların kalibrasyonu yalnızca absorbans ve derişim verilerinin matrislerini içermektedir. Geliştirilen kalibrasyonlar iki ilacın sentetik karışımları ile test edilmiştir ve Maple V programı ile kemometrik kalibrasyonlar oluşturulmuştur. Metotların sonuçları HPLC metodu ile elde edilen sonuçlarla kıyaslanmıştır.

Dinç et al. (2002), yaptıkları bu çalışmada çift ayrımlı-oran spektral türevi (grafiksel metot), CLS ve PCR metotları, kimyasal ayırma gerektirmeksizin üç renk maddesinin sentetik karışımlarında ve toz içeceklerin spektrofotometrik çok bileşenli analizi için geliştirilmiştir. Grafiksel metot, çift ayırım kullanılarak oran spektrumlarının türev sinyallerinin kullanılmasına dayandırılmıştır. Bu metotta, doğrusal belirleme oranları, 2-8  $\mu\text{g/mL}$  sunset yellow, 4-18  $\mu\text{g/mL}$  tartrazin, 2-8  $\mu\text{g/mL}$  allura reddir. Numerik metotlarda, training seti, 0-8  $\mu\text{g/mL}$  sunset yellow, 0-18  $\mu\text{g/mL}$  tartrazin, 0-8  $\mu\text{g/mL}$  allura red arasında 18 tane örneğin kullanılmasıyla hazırlanmıştır. Kemometrik kalibrasyonlar, 325-584 nm arasında 375 den 50 ye kadar 7 noktada absorbanslar ve kullanılan tahmini training seti hesaplanmıştır. Önerilen metot, toz içeceklerde bulunan 3 renk maddesinin eş zamanlı tayini için uygulanmıştır. Bulunan sonuçlar, istatistiksel olarak birbiri ile kıyaslanmıştır.

González et al. (2002) bu çalışmada diot sıralı dedektörlerle sıvı kromatografisi gibi pahalı enstrümental yöntemlerinin azaltılması için gıdalarda sentetik ve doğal olarak bulunan renk maddelerinin tayini için basit bir yöntem geliştirmişlerdir. Hızlı akım sistemi yalnızca sentetik karışımların alıkondduğu ve sulu amonyakla daha sonra ayrıldığı yün/pamuk kolondan geçirilen asetik asit ortamında sentetik ve doğal renklendiricileri içeren örnekleri incelemeyi amaçlamışlardır. Spektrofotometrede sırasıyla sarı, kırmızı ve yeşil-mavi-kahverengi eklemelerle 400, 530, 610 nm de gözlemler yapılmıştır. Doğal ve sentetik renklendiricilerin arasında tamamen ayrılma, sentetik renklendiricilerin dedeksiyon limitinin 2000 (sarı), 2000 (kırmızı), 10.000 (kahverengi) nin üstünde doğal renklendiricilerin molar derişimleri bulunmuştur. Metotta, sentetik renklendiriciler olan tartrazin, eritrosin B, brilliant black BN nin 5 derişiminde tahminler yapılmıştır. İki dedeksiyon limitinin derişimi

için hatalı negatif yüzde oranları, %8 den %12 ye kadardır. Sonuç olarak, metot bazı meyveli içeceklere uygulanmıştır ve 10 /saat sürekli örneklendirmeyele sentetik renklendiriciler belirlenmiştir.

Dinç and Üstündağ (2003), bu çalışmada ilaç tabletlerinin bulunan hidroklorothazin ve spironolaktonun spektrofotometrik eşzamanlı tayinini yaparak sonuçları, CLS, ILS, PCR ve PLS ile değerlendirmişlerdir. Kemometrik analiz metotları, ön ayırma gerektirmez. İlaçların ikisini de içeren 25 standart karışımın çalışma seti, karışım dizaynına göre 2-20 µg/mL derişim aralığında hazırlanmıştır. Çoklu kalibrasyonlar, çalışma seti kullanılarak 220 den 290 nm ye kadar 15 noktada ilk türev absorbansları ölçülmüştür. Çok bileşenli analiz metotlarının validasyonu, hidroklorothazin ve spironolaktonun sentetik karışımları analiz edilerek incelenmiştir. Sentetik karışımlar ve tabletlerden elde edile sonuçlar, tekyollu ANOVA testi ile istatistiksel olarak kıyaslanmıştır. Kemometrik analiz metotları, farmakolojik tablet bileşimindeki hidroklorothazin ve spironolaktonun eş zamanlı tayini için uygun görülmüştür.

López-Martínez et al. (2003), bu çalışmada PLS-1 kullanarak kahve ve çay örneklerinde kafein (CF) ve theobromine (TB) nin eş zamanlı tayinini yapmışlardır. Kafein ve theobromidin HPLC ile dört derişimi kahve ve çay için universal kalibrasyon matrislerini düzenlemede kullanılmıştır. Theobromidin düşük seviyesinden dolayı (1000:1) kafeinle karıştırılmıştır. Metot, HPLC standardıyla istatistiksel olarak farklılıklar göstermemiştir.

Yongnian et al. (2003), yaptıkları bu çalışmada gıda maddelerindeki glukoz , fruktoz ve laktozun eş zamanlı nicel tayini için farklı bir spektrofotometrik metot geliştirmişlerdir. Bu metot, oksidant olarak potasyumferrisiyanürün ve oksidatif reaksiyonda analitlerin farklı kinetik oranlarına dayanmaktadır. Reaksiyon verileri, potasyumferrisiyanürün spektrumunun 420 nm analitik dalga boyunda kaydedilmiştir. Glukoz, fruktoz ve laktozun kinetik hızlarının üst üste çakışmasıyla, deneysel şartların optimizasyonu ile veri matrisi için hesaplanmıştır. 80°C ve 1,5 mol/L değerinde NaOH ın sıcaklık ve derişimi seçilmiştir. Doğrusal kalibrasyon grafikleri, glukoz, fruktoz ve laktoz için sırasıyla 2,96-66,7; 3,21-67,1; 4,66-101

mg/L derişim oranında elde edilmiştir. Şekerlerin sentetik karışımları hazırlanmıştır. Elde edilen veriler, normal ve ilk türev kinetik verileri kullanılarak, PLS, PCR, BP-ANN, RBF-ANN gibi kemometrik metotlarla değerlendirilmiştir. Sonuçlar, RBF-ANN nin 5 kemometrik metodunun en düşük tahmini hatalarını verdiğini göstermektedir. Önerilen metodun validasyonu incelenerek, bazı ticari gıda örneklerinde bu üç şekerin tayini uygulanmaktadır ve bütün örneklerde standart ekleme metodu uygun sonuçlar vermiştir.

Abdollahi and Bagheri (2004), yaptıkları bu çalışmada cloud point ekstraksiyonunu kullanarak verileri PLS ile değerlendirmişlerdir. Cloud point ekstraksiyonu, surfaktan olarak oktilfenoksipolietoksietanolun (Triton-X-114) kullanıldığı genetik algoritma-PLS ile anilin reaksiyonundan eş zamanlı spektrofotometrik analizden sonra vitamin K<sub>3</sub> ve 1,4-naftokinonun ön derişimi için kullanılmıştır. Metodolojinin analitik performansını etkileyen kimyasal değişkenlerle çalışır ve optimizasyon sağlanır. Optimum koşullar altında örnek çözeltinin 15 mL sinin ön derişimleri, sırasıyla vitamin K<sub>3</sub> ve 1,4-naftokinon için 0,05 ve 0,08 µg/mL olarak dedeksiyonla sağlanır. PLS, GA-PLS, ITTFA ve PC-ANN nin tahmini yeteneği, iki kinolinin eş zamanlı tayini için kontrol edilmektedir. GA-PLS; kimyasal sistem hakkında kullanılabilen bileşimin olduğu, tahmini kapasitenin eksikliği olmaksızın genetik algoritma kullanılan PLS kalibrasyonunda dalgaboyu seçinine bağlı olarak uygulanan diğer çok bileşenli analiz yöntemlerine göre üstünlük göstermektedir.

Abbaspour and Mirzajani (2004), bu çalışmada β-düzeltilme spektrumları kullanılarak kalibrasyon matrisi uygulandığında V(V) ve Al (III) un eş zamanlı tayinini, yapay sinir ağlarının uygulanmasıyla sağlamışlardır. V(V) ve Al (III) un arasında alizarin kırmızısı (ARS) nin ligandlığıyla incelenmektedir. Bu metal iyonlarının simultane spektrofotometrik tayini uygulanmıştır. Sistemin davranışının kontrolündeki parametreler seçilmiştir. Yapay sinir ağları metodu, optimum koşullar altında karışımlarda nicel olarak bulunan metal iyonlarını bulur. Sigmoidal fonksiyon gizli kullanılmıştır. Tayinler, V(V) in 0,90-7,80 µg/mL, Al (III) un 0,11-4,20 µg/mL derişim oranlarında yapılmıştır. Toplam bağlı standart sapma hatası, %4,02 den daha

az olan bazı sentetik çözeltilerde olan bu metal iyonlarının eş zamanlı tayini için iyi sonuçlar veren bir yöntemdir.

Palabıyık et al. (2004) bu çalışmada, spektrofotometrik metotlar, psedöfedrin hidroklorik ve ibuprofenin eş zamanlı tayini yapılmıştır. Elde edilen veriler, 5 farklı metot kullanılarak değerlendirilmiştir. İlk metot, oran spektral türev spektrofotometrisidir. Ve bu yöntemde analitik sinyaller, 0,1 M HCl çözeltisinde her bir spektrum kullanılarak elde edilen oran spektrumunun ilk türev spektrumunda, iki ilaç için hem maksimum hem minimuma bağlı olarak dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Diğer dört spektrofotometrik metot, kemometrik metotlardır. Bu metotlar, klasik kalibrasyon metodu, ters faz kalibrasyonu, bileşen regresyonu (PCR) ve kısmi en küçük kareler metodu (PLS) dir. Bu yöntemlerde, derişim veri matrisi, metanol:0,1 M HCl de (3:1) bu ilaçların sentetik karışımları kullanılarak hazırlanmıştır. Derişim veri matrisiyle ilgili olarak absorpsiyon veri matrisleri, zero-order spektrumunda 18 dalgaboyunda 2,5 nm aralıklarla 240-285 nm aralığında absorpsiyon ölçümleriyle elde edilmiştir. Kalibrasyon veya regresyon, karışımda psedöfedrin hidroklorik ve ibuprofenin bilinmeyen derişimlerinin tahmini için absorpsiyon veri matrisi ve derişim veri matrisi kullanılarak elde edilmiştir. Yöntemler, herhangi bir ayırma basamağı gerektirmez. Doğrusal oran, bütün beş metotta da ibuprofen için 300-1300 µg/mL, psedöfedrin HCl için 100-1300 µg/mL olarak bulunmuştur. Metodun kesinliği ve tahmini belirlenir ve analiz edilen sentetik karışımlarla kontrol yapılır. Beş metotta başarılı olarak tabletlere uygulanmıştır.

Dinç et al. (2005), bu çalışmada üst üste çakışan spektrumların olduğu efervesan tabletlerde askorbik asit (AA) ve asetilsalisilik asit (ASA) eş zamanlı spektrofotometrik tayini ; sürekli dalgaboyu transferi (CWT) , türev spektrofotometresi (DS), PLS ile herhangi bir ön ayırma işlemi olmaksızın başarıyla yapılmıştır. CWT ve DS, AA ve ASA nın kalibrasyon eşitlikleridir. AA ve ASA için CWT ve DS kalibrasyon eşitlikleri, sırasıyla çizilen sürekli dalgaboyu katsayıları ve ilk türev absorbans değerlerine karşı dalgaboylarıyla sağlanan spektrumun sıfır-kesişme noktalarıyla ölçülen CWT ve DS boşluklarıyla bulunmuştur. PLS kalibrasyonu 210-310 nm oranında 220 den 305 nm ye kadar 850 noktanın bütün

absorbans verileri ve derişim seti kullanılarak şekillendirilmiştir. Bu üç metot, yukarıdaki ilaçların sentetik karışımları analiz edilerek test edilmiştir ve konu olan ilaçların iki ticari karışımını içeren gerçek örneklere uygulanmıştır. Karşılaştırma çalışması, üç analitik metodun metodolojisi ve doğru sonuçların bulunmasından elde edilen deneysel sonuçlarla desteklenmiştir.

Dinç et al. (2005), yaptıkları bu çalışmada parasetamol (PAR), asetilsalisilik asit (ASP) ve kafeinin (CAF) için çoklu karışımları ve nicel olarak çözülebilen tabletlerinde, oran-spektrum ilk türev-sıfır kesişmesi ve oran-spektrum sürekli dalgaboyu transferi metotları (CWT) gibi iki grafiksel transform metoduyla, üst üste çakışan spektrumlar verdiklerinden dolayı başarıyla incelenmişlerdir. Bu çalışmada, oran-spektrum ilk türev-sıfır kesişmesi ve oran-spektrum sürekli dalgaboyu transferi metotları, ölçülen  $dA / d\lambda$  ve sıfır kesişme noktalarına karşı oran spektrumunun transform sinyallerine dayandırılmıştır. Bulunan kalibrasyonlar, sentetik karışımlar ve standart ekleme tekniği kullanılarak test edilmiştir ve ticari ilaç numunelerinde PAR, ASP ve CAF in eşzamanlı tayinine uygulanmıştır. Sonuçlar, HPLC metodundan elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

Espinosa-Mansilla et al. (2005), bu çalışmada çok bileşenli kalibrasyon metotlarını, çok kararlı dedeksiyonla spektroskopik verilerin analizine uygulamışlardır. Spektrofotometrik ve fluorimetrik sinyallerin dayandırıldığı iki yöntem, iki florokinolonun (siproflaksin ve oflaksin) ve iki steroid içermeyen ateş düşürücü ilacın (diklorofenac ve metenamic) eş zamanlı tayini için kullanılmıştır. Spektrofotometrikmetotta, ters iyon olarak trioktilmetilamonyumklorit-adojenin kullanıldığı klororoformla ekstrakte etme yöntemi, idrar örneklerinden ve matris girişimlerinden elimine edilen analit ile optimize edilir. Ayırmadan sonra, organik fazın absorpsiyon spektrumu PLS metodunda analitik sinyal olarak kullanılmıştır. Ekstraksiyon emisyon floresans matrislerinin kullanıldığı spektroflorimetrik metot (PIF), ön ekstraktif temizleme basamağı olmaksızın idrar örneklerinde oflaksin, siproflaksin, diklorofenac analizinin amacıyla üç yollu kemometrik kalibrasyon uygulanması amaçlanmıştır. Her iki yöntem için, geri kazanım değerleri bütün analitler için % 100 dür. PIF üç yollu kemometrik metodu, en duyarlı ve seçici

metottur. Bu metot, üç yollu kemometrik metot kullanılarak, idrar numunesi analiz edilmiştir.

Güler (2005), yaptığı bu çalışmada Türkiyede Türk tatlılarının 140 örneğinde ve 96 toz örnekte, hem nicel hem de nitel olarak UV-VIS spektrofotometrik tayinlerinde renklendiriciler analiz etmiştir. 5 ve 6 sentetik renk maddesi, sırasıyla şekerlemelerde ve toz örneklerde tayin edilmiştir. Eritrosin hariç şekerlemelerde bulunan bütün renk maddeleri analiz edilmiştir. Bu renk maddeleri, Türk Gıda Kodeksi ve Avrupa Komitesinin kullanım için izin verdiği ölçüdedir. İzin verilen renk maddeleri % 43,7 dir. Toz örnekler için % 36,45 dir.

Longares-Patrón and Cañizares-Macías (2005), bu çalışmada vanilya tohumundan vanilya ve p-hidroksibenzaldehit (PHB) nin hızlı ekstraksiyonu için hızlı bir metot önerilmiştir. Hızlandırılan ekstraksiyon prosesi ve fotometrik denetleme için mikrodalga enerjisiyle aydınlatılan örnekler sırasıyla vanilya ve p-hidroksibenzaldehit (PHB) için 348nm ve 329 nm dir. Ekstraktlardan vanilya ve p-hidroksibenzaldehit (PHB) eş zamanlı tayini için % 2,5 dan daha az olarak açıklanan bağıl standart sapmaları olan Vierordt's Metodu uygulanmıştır. Mikrodalga aydınlatma tozu, aydınlatmanın miktarı ve aydınlatmayan devirler, aydınlatma zamanı ve etanol derişimi, aydınlatma tozu ve aydınlatma devir miktarının vanilya ekstraksiyon prosesinde en önemli şartlar olduğunu gösteren çoklu ortalama optimize edilmiştir. Odaklanmış mikrodalga destek ekstraksiyonu; ticari, iyofilize ve kuru vanilya örneklerine uygulanmıştır. Ticari vanilya örneklerinde vanilya ve PHB nin ekstraksiyonu, kuru ve iyofilize örneklerden daha yüksek sonuçlar vermiştir. Ekstraksiyon zamanında artışla/azalışla amaçlanan FMAE ile vanilya ve PHB derişimleri arasında %40-%50 oranında nokta vardır.

Sorouraddin et al. (2005), yaptıkları bu çalışmada PLS ve PCR metotlarını, pridoksin (PY) ve melatonin (MT) in eş zamanlı spektroflorimetrik ve spektrofotometrik tayini için kullanmışlardır. Bu ilaçların üst üste çakışan emisyon ve absorpsiyon spektrumlarından dolayı, PY ve MT ne florimetrik ne de spektrofotometrik metotlarla direk olarak tayin edilemez. Tüm-spektrum çok



bileşenli kalibrasyon PLS ve PCR metotları, hem florimetrik hem de spektrofotometrik olarak geliştirilmiştir. Şartlar, florimetrik olduğu kadar spektrofotometrik tayin içinde optimize edilmiştir. PY ve MT nin simultane tayini, florimetri için 324-500 nm arasında emisyon floresans spektrumu kaydedilmiş, spektrofotometre için 250-350 nm arasında absorpsiyon spektrumu kaydedilen örnekle çalışılmıştır. Deneysel kalibrasyon matrisleri, dikey olarak dizayn edilmiştir. Uygun şartlarda, dinamik oran, florimetri için 0,04 - 1,4 ve 0,1 - 4,0 µg/mL dir, spektrofotometri için 1 – 22 µg/mL ve 1 – 24 µg/mL dir. Bu değerler sırasıyla MT ve PY içindir. Kalibrasyon derişimleri, dinamik oranda hazırlanmıştır. MT ve PY nin simultane tayini için kemometrik yöntemlerin parametreleri optimize edilir ve önerilen metot, tahmini setle validasyon yapılmıştır. Sonuç olarak yöntemler, sentetik karışımlar ve farmakolojik formülasyonda PY ve MT nin tayini için oldukça başarılıdır.

Yongnian et al. (2005), bu çalışmada gıda katkı maddeleri olan maltol (MAL), etilmaltol (EMA), Vanilin(VAN) ve etilvanilin (EVA)nın UV spektrumu ile tayinin yapmışlardır. Bu maddeler üst üste çakışan spektrum veren türlerdir ve ön ayırma olmaksızın karışımlarından tek tek belirlenmeleri zordur. Bu çalışmada kemometrik yaklaşımlar, bu bileşiklerin eşzamanlı olarak tayini için üst üste çakışan spektrumların çözülmesi ile uygulanmıştır. 200-350 nm arasında, absorpsiyon spektrumlarını içeren, ortogonal verilerin kullanılmasıyla bu dört bileşiğin analizi, bu bileşiklerin karışımını içeren kalibrasyon setinden sağlanmıştır. CLS, PCR, PLS, ANN gibi farklı metotlarla incelenmişlerdir. Kemometrik modeller, dört bileşiğin sentetik çözeltilerinden yapılandırılan validasyonun kullanılmasıyla test edilmiştir. Kemometrik metotların analitik performansı, bağıl tahmin hataları (RPE) ve geri kazanımlar ile karakterize edilmiştir. Önerilen metodun ticari gıda ürünlerinin analizine uygulanması başarılıdır. RBF-ANN, kemometrik metotlardan en iyi sonuç verendir. CLS ve DCLS zayıf sonuçlar verirken, PLS, PCR, DPLS ve DPCR daha iyi sonuçlar vermektedir. Dört bileşiğin 1,0-20,0 mg/L derişim oranında doğrusallığı vardır. Dedeksiyon limiti (LOD) ise MAL, EMA, VAN, EVA için 0,39; 0,56; 0,49; 0,38 mg/L dir.

Aktaş and Pekcan (2006), bu çalışmada ANN yöntemini sunset yellow, tartrazin ve allura red karışımlarının spektrofotometrik verilerini değerlendirmek için kullanmışlardır. Network yapısının optimize edilmesiyle, doğruluk elde edilmiştir. Bu çalışmanın amacı, katı faz spektrofotometresi kullanarak ticari ürünlerde renklendiricilerin karışımlarını çözmek için ANN metodunun uygulanmasıdır. Önerilen metot hızlı ve kolay uygulanabilir. Ayrıca duyarlılığı ve seçiciliği yüksektir.

Aktaş et al (2006), Yapay Sinir Ağı (YSA) yöntemi başarıyla çok doğal sularda iki bileşen içeren farklı maddelerin bileşen analizine uygulanmıştır. Bu uygulamada YSA yöntemi bu maddelerin karışımlarının kantitatif çözünürlük ve bu yaklaşım herhangi bir ayırma ve ekstraksiyon adımları gerektirmez uygundur. Yöntem sentetik karışıma ve numuneye uygulanmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Dinç and Baleanu (2006), bu çalışmada fonksiyonel dalgaboyu transferinin (FWT) yeni bir uygulaması, enjeksiyon için farmakolojik kombinasyonda ampicillin (AP) ve sulbactam (SB) in eşzamanlı tayini önerilmiştir. FWT nin yaklaşımı, absorpsiyon spektrumundan konuyla ilgisiz bilgiyi ve gürültüyü kaldırmaktadır. Spektrum oranının, yüksek pik genişliği, elimine edilen gürültü ve genişletilen keskin piklere ait en önemli bilgi, orijinal absorpsiyon spektrumları için FWT yönteminin uygulaması ile sağlanmıştır. Bu çalışmada, FWT; 211,5-313-8 nm dalgaboyu aralığında SB ve AP den sağlanan UV-sinyallerinin veri vektörlerine bağlıdır. Türev transform, FWT nin genelleştirilmesi ile orijinal absorpsiyon sinyaline uygulanmıştır. AP ve SB nin kalibrasyon grafikleri, sıfır-kesişme noktasında FWT ölçümünden ve genel türev genişliğinden bulunmuştur. Metot validasyonu, sentetik karışımlar kullanılarak yapılmıştır. Amaç, FWT metodunun kemometrik metotlarla ve genel türev spektrofotometrisiyle kıyaslanmasıdır. Oldukça iyi sonuçlar elde edilmiştir.

Afkhami et al. (2007), bu çalışmada PLS-1 kalibrasyon modelini  $CN^-$  ve  $SCN^-$  nin eşzamanlı tayini için spektrofotometrik yöntemden elde edilen sonuçlara uygulamışlardır. Bu metot, 30 °C de pH: 4,0 tamponunda kloramin-T ile  $CN^-$  ve

SCN<sup>-</sup> iyonları arasındaki reaksiyonun oranında farklılıklar içermektedir. Retilen siyonojen klorit (CNCl); piridinle reaksiyona sokulmuş ve ürün, barbitürik asitle yoğunlaştırılmış ve son renk maddesi ile biçimlendirilmiştir. Çözeltilerin absorpsiyon kinetik profilleri, iki saniye aralıklarla reaksiyonun başlangıcından sonra 20-180 saniye zaman aralığında 578 nm de ölçülen absorbanslarla görüntülenmiştir. PLS-1 kalibrasyonu için deneysel kalibrasyon matriksi 31 örnekle düzenlenmiştir. Cross-validasyon metodu, faktörlerin seçilen sayısı için kullanılmıştır. Sonuçlar, sırasıyla CN<sup>-</sup> ve SCN<sup>-</sup> iyonları için 10,0-900 ng/mL ve 50-1200 ng/mL oranında uygulandığını göstermiştir. Önerilen metot, su örneklerinde CN<sup>-</sup> ve SCN<sup>-</sup> in eşzamanlı tayinine uygulanmıştır.

Hemmateenejad et al. (2007), bu çalışmada PLS ve PCR üstünlüğü sorgulanan çok bileşenli analiz için kemometride önemi dikkat vurgulanmıştır. Dalgaboyu seçiminin etkisi hesaba katılarak, anilin, fenol, difenilamin (DPA) nın eşzamanlı spektrofotometrik tayiniyle PCR ve PLS metotları arasında bir kıyaslama yapılmıştır. Analitlerin UV absorbans spektrumları, 1,0-10,0 µg/mL derişim oranlarında ölçülmüş ve sonuçlar PLS ve PCR ye tabi tutulmuştur. Modellere, cross-validasyonla validasyon işlemi yapılmıştır. Modifiye edilen değişen hareket pencereleri ile, her bir analit için daha iyi spektral bölge seçimi amaçlanmıştır. Daha güvenilir sonuçların olduğu regresyon metotları için tahminlerin dalga sayısı seçimi ile gelişen niteliği doğrusal komşu dalgaboyunun taşınması ile bulunmuştur. Sonuçlandırılan veriler, bütün spektrumlar kullanıldığında çok veya az sonuçlar üreten PLS ile açıklanmıştır. Fakat seçilen dalgaboyu aralıkları durumunda benzer sonuçlar üretilmiştir. Ana fark PCR için faktörlerin yüksek miktarlarıyla sağlanmıştır. Bu büyük bir sorun oluşturmamıştır.

Liao et al. (2007), bu çalışmada zayıf asit karışımlarının eş zamanlı tayini için kemometri ile birleştirilen yeni spektrofotometrik titrasyon metodu geliştirilmiştir. Bu metotta, titrant olarak sodyum hidroksit-asit/baz indikatörü karışımı kullanılmıştır. İndikatör, titrasyon yöntemini denetlemek için kullanılmıştır. Titrasyon yönteminde, her bir titrasyon noktasında titrant ve çözünen sitin eklenen hacimleri, least square algoritmasıyla absorbans spektrumundan simultane olarak

hesaplanmıştır. Sonra karışımdaki her bileşenin derişimleri, PCR ile titrasyon eğrisinden bulunmuştur. Metot, analitik sonuçların elde edilmesi için bilgi gerektirir ve hacim ölçümlerinden bağımsızdır. Analizler , titrasyonun son noktasından bağımsızdır. İndikatör ve asitlerin kararlılık sabitlerinin doğru değerlerini gerektirmektedir. Metot, mükemmel sonuçlarla benzoik asit, salisilik asit karışımlarının ve fenol, o-klorofenol ve p-klorofenol karışımlarının eş zamanlı analizi için uygulanmıştır.

## **2.2. HPLC Yöntemi İle Yapılan Çalışmalar**

Chen et al. (1998) bu çalışmada sekiz renk maddesi, görünür absorbands dedektörle bir anyon değiştirici analitik kolonda yüksek performans iyon kromatografisi ile belirlenmiştir. HCl-Asetonitrilden oluşan gradient çözelti, hem bu renklendiricilerin kromatografik ayrılması ile hem de analitik kolonun sürekli temizlenmesi ile sonuçlandırılmıştır. Analitik kolon rutin analizler için avantajlıdır. Yüksek performans iyon kromatografisi, bazı suda çözünenler için kromatografik analizler için uygundur. Metot, içecek ve toz içeceklerdeki renklendiricilerin tayinine uygulanmıştır. Alışılmış sıvı kromatografisi gibi zaman harcanmaz.

Dinç et al. (2001), bu çalışmada çoklu karışımlar ve tabletlerdeki parasetamol, kafein ve propilferazonun tayini için iki metot kullanmışlardır. Türev oran spektrum-sıfır keşişme yöntemi, oran spektrumunun ilk türevinin simultane kullanımına ve sıfır keşişme noktasına bağlı analitik türev oran sinyallerinin ölçümüne bağlıdır. Ayırıcı olarak propilferazonun kullanıldığı, çoklu karışımlardaki parasetamol ve kafeinin miktarları, sırasıyla kafein için 242,8 nm, parasetamol için 251,2 nm olan ilk türev oran genişliğinin ölçümüyle belirlenmiştir Ayırıcı olarak parasetamol kullanılırsa, bu defa kafein için 244,8-274,0 nm, propilferazon için 250,6-274,0 nm elde edilir. HPLC yöntemi için nükleosil C18 kolon ve su-metanol (20:80) mobil fazı, iç standart olarak setrimide kullanılmıştır. Akış oranı, 254 nm de UV dedektörle 1,0 mL/dak. dır. Metotların her ikisinde, sentetik ve tabletlere uygulanır. Analitik sonuçlar oldukça iyidir.

Dinç et al. (2005), bu çalışmada yeni sıvı kromatografik (LC) kemometrik yaklaşıma değinmişlerdir. Bu yaklaşım, ticari ürünlerdeki SUN ve TAR in tayini için geliştirilmiştir. LC ve CLS, PCR, PLS gibi kemometrik yöntemler kullanılır. LC-kemometrik yaklaşımların birleştirilmesi ile çoklu dalga boyunda PDA dedektörle LC-CLS, LC-PLS, LC-PCR belirtilmiştir. İç standart olarak allura red'in varlığında SUN ve TAR in optimum kromatografik ayrılması, C18 kolonda asetonitril-metanol-saf su oranında, 0,2 M asetat tamponu (pH:5,0) ile sağlanmıştır. İç standart pik alanı için analit pik alanlarının oranının LC verileri, beş dalga boyunda PDA dedektörle sağlanmıştır. SUN ve TAR için LC-kemometrik kalibrasyonları, her renk maddesi için deneme setinde ve pik oranı arasındaki bağlantı kullanılarak yapılandırılmıştır. LC-kemometrik yaklaşımları IS varlığında SUN ve TAR içeren farklı sentetik karışımlar için test edilmiştir. Bu LC-kemometrik yaklaşımı için deneysel sonuçlar, tek dalga boyunda dedektör kullanılarak klasik LC metoduyla bulunmuştur.

Dinç and Üstündağ (2005), bu çalışmada çok dalga boylu PDA dedektörleri HPLC için uygulamışlardır. PLS, PCR, CLS ve ILS gibi çok bileşenli kalibrasyon teknikleri HCT ve LST içeren sentetik ikili karışımlarda ve ticari tabletlerin simultane nicel analizleri için HPLC verilerine bağlıdır. HPLC ve çok bileşenli kalibrasyonların birleştirilmesi, HPLC-CLS, HPLC-ILS, HPLC-PCR, HPLC-PLS leri göstermektedir. İç standartın enalapril maleate olduğu ve iki aktif bileşiğin başarılı kromatografik ayrımı, C18 kolonda 60:40 asetat tamponu ve asetonitril olan mobil fazla yapılmıştır. 15 pik alanı için analit pik alanlarının oranının dayandırıldığı HPLC verileri, beş dalgaboyunda PDA dedektörle sağlanmıştır. HCT ve LST nin HPLC-CLS, HPLC-ILS, HPLC-PCR, HPLC-PLS kalibrasyon çizimleri, her aktif bileşiğin derişimlerine bağlı pik alan oranlarının kullanılmasıyla ayrımı düzenlemektedir. HPLC çok bileşenli kalibrasyonları, IS nin varlığında HCT ve LST içeren farklı sentetik karışımlar için test edilmiştir. Bu çoklu kromatografik metotlara HCT ve LST içeren ticari farmokolojik doz uygulanmıştır. Çoklu kalibrasyondan elde edilen sonuçlar, tek dalga boyu dedeksiyonunun kullanıldığı metotlarla karşılaştırılmıştır.

García-Falcón and Simal-Gándara (2005), yaptıkları bu çalışmada en küçük temizlemeyle sıvı kromatografisiyle doğal renklendiricilerle toz içeceklere eklenen

beş sentetik ieeğinin tayini için metodun optimizasyonu ve karakterizasyonu amalanmışlardır. Metot, basit, hızlı, ucuzdur. Tartrazin, kinolin sarısı, sarı-turuncu, azo-rubine ve ponso'yu gösteren bazı sonuçlar, düşük seviyede belirlenmiştir. Metot, çizilen kalibrasyon grafiği, geri kazanma, tahminlerin ölümü, nicel ve dedeksiyon limitinin ölümü ile değerlendirilmiştir. Metot, tek dalga boyunda görünür dedeksiyonla ters-faz HPLC analizi için içecek zeltisinin enjeksiyonunu direkt olarak gerektirmektedir. Toz içeceklerdeki sentetik renklendiricilerin tayini, meyve sulu ve lezzet verici ekstratlı içeceklerde bulunan sonuçlar, önerilen metodun iyi çalıştığını, toz örneklerdeki sentetik renklendiricilerin eklenmesiyle ve seri kontroller için kullanışlı olduğunu göstermektedir. Metot, sentetik renk maddeleri kullanılarak, toz içecek üreticilerinin nicel bölümünde kullanılmıştır.

Dinç et al. (2005), bu çalışmada PDA dedektörle HPLC metodu kullanılarak yeni kemometrik yaklaşım, tabletlerdeki enalapil maleate (EA) ve hidroklorothiazide (HCT) nin simultane tayini yapılmıştır. CLS, PCR, PLS gibi kemometrik kalibrasyon teknikleri, çok dalga boylu PDA dedektör cevaplarında pik alanına bağlıdır. HPLC ve kemometrik kalibrasyon tekniklerinin birleşimi, HPLC-CLS, HPLC-PCR, HPLC-PLS olarak adlandırılmaktadır. Karşılaştırma amaçları için, HPLC metodu, birleştirilen HPLC-kemometrik kalibrasyon tekniklerinden bulunan sonuçların doğrulanması ile klasik HPLC metodu olarak adlandırılmaktadır. İki ilaç ve iç standart arasındaki iyi derecede kromatografik ayırma, C18 kolonda mobil faz olarak asetonitril-saf su (60:40) oranında, 0,2 M asetat tamponu (pH:5,0) ile yapılmıştır. Çok dalga boylu PDA dedeksiyon, beş farklı dalga boyunda yapılmıştır ve pik alanı, mobil fazda derişim seti için kaydedilmiştir.  HPLC metodu, losartan potasyum (IS) varlığında EA ve HCT nin analiz edilen sentetik karışımı ile test edilmiştir. Amaçlanan metotlar, mevcut iki ilacın gerçek örneklerine uygulanmıştır. Bulunan sonuçlar, birbiri ile istatistiksel olarak kıyaslanmıştır.

Dinç et al. (2006), bu çalışmada PDA ile HPLC yöntemini, tabletlerdeki naproksen sodyum ve psedfedrinin simultane tayini için uygulamışlardır. CLS, PCR, PLS gibi kemometrik kalibrasyon teknikleri, çok dalga boylu PDA dedektör cevaplarında pik alanına bağlıdır. Kemometrik metotlarla birleştirilen HPLC teknikleri, HPLC-

CLS, HPLC-PCR, HPLC-PLS olarak adlandırılmıştır. Karşılaştırma amaçları için, HPLC metodu, birleştirilen HPLC-kemometrik kalibrasyon tekniklerinden bulunan sonuçların doğrulanması ile klasik HPLC metodu olarak adlandırılmıştır. İç standart olarak losertan potasyumun kullanıldığı iki ilaç arasındaki iyi bir kromatografik ayırma, C18 kolonda mobil faz olarak asetonitril-saf su (60:40) oranında, 0,2 M asetat tamponu (pH:5,0) ile yapılmıştır. Çok dalga boylu PDA dedektörle, beş farklı dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Kromatogramlar, mobil fazda deneme seti olarak kaydedilmiştir. Üç kemometrik kalibrasyon ve klasik HPLC metodu, iç standart varlığında naproksen sodyum ve psedöfedrin HCl nin sentetik karışımlarında test edilmiştir. HPLC-kemometrik yaklaşımları, ilaçların gerçek örneklerine uygulanmıştır. HPLC-kemometrik kalibrasyonlarından sağlanan sonuçlar, klasik HPLC metodu ile kıyaslanmıştır.

Dinç et al. (2006) bu çalışmada ikili karışımlar ve ticari ürünlerdeki allura red ve tartrazinin derişimleri, kemometrik kalibrasyonlar ve HPLC metotlarının birleştirilmesi ile tayin edilmiştir. Bu çalışmada, çok dalga boylu HPLC verilerine dayandırılan PLS, PCR ve CLS ile çok bileşenli kalibrasyon teknikleri kullanılarak CPLS, CPCR, CCLS gibi metotlarla kıyaslama yapılmıştır. Çok dalga boylu pik alanı verileri (x-blok) ve derişim seti (y-blok) arasındaki bağlantı, kromatografik çoklu kalibrasyonları elde etmek için kullanılmıştır. Çok dalga boylu kromatogramlar ve çok dalga boylu pik alanı verileri, fotodiyot array dedektörlerle (PDA) elde edilmiştir. İç standart olarak sunset yellow'un varlığında TAR ve ALL arasında iyi bir kromatografik ayırma sağlamak için 1,9 mL/dak akış oranında 55:20:10 (v/v/v) asetonitril-metanol-saf su oranında, 0,2 M asetat tamponu (pH:5,0) kombinasyonu ile C18 kolon kullanılmıştır. Bu kromatografik çok bileşenli analiz teknikleri, farklı sentetik karışımlar analiz edilerek ve standart ekleme teknikleri kullanılarak validasyon yapılmıştır. Bu metotlar, TAR ve ALL içeren ticari toz örneklere uygulanmıştır. Bu kromatografik çok bileşenli analiz teknikleri, alternatif tek HPLC metodundan sağlananlar kadar iyi sonuçlar vermiştir.

Dinç et al. (2006), bu çalışmada tabletler ve insan kanındaki klorozoxazone (C2X) ve parasetamol (PAR) ın HPLC tayini için yeni kemometrik yaklaşımlar tanıtılmıştır.

Çok dalga boylu HPLC piki için CLS,PCR vePLS kalibrasyonlarını içeren kemometrik yaklaşımlar, beş dalga boyunda çizilen kromatogramlarla bulunmuştur. Çoklu kromatogramlar, 225-240-255-270-280 nm de PDA dedektör kullanılarak yapılmıştır. PLS, CLS, PCR nin algoritmasıyla HPLC-CLS, HPLC-PCR ve HPLC-PLS kalibrasyonlarını yapılandırmak için çoklu kromatogram verileri uygulanmıştır. 0,8 mL/dak. akış hızında C18 kolonda asetonitril ve 0,1 M amonyum karbonat karışımı, örneklerde C2X ve PAR ı tayin etmek için mobil faz olarak kullanılmıştır. Bu kromatografik ayırmalarda iç standart olarak hidroklorothiazide kullanılmıştır. HPLC kemometrik kalibrasyonları, yüksek kesinlik ve doğrulukla ticari ilaç ve kan örneklerinde araştırılan ilaçların nicel analizine başarı ile uygulanmıştır.

López-Cervantes et al. (2006), bu çalışmada Karides atıklarının hidroksilate sıvı fraksiyonunda retinol,  $\alpha$ -tokoferol ve kolesterolün simultane nicel analizini yapmak için HPLC metodunu kullanmışlardır. Bu metot, n-heksanla ekstraksiyonu ve mikroscale saponificationu içermektedir. Yağda çözünebilen vitaminler ve kolesterol, 36 °Cde kolon sıcaklığında 1,4 mL/dak akış hızında, 68:28:4 (v/v/v) metanol:asetonitril:su mobil fazında 25cm x 0,46cm SS Exil ODS 5  $\mu$ m kolonunda HPLC-UV dedektörle HPLC ile tayin edilmişlerdir. Dedeksiyon,  $\alpha$ -tokoferol ve kolesterol için 208 nm de, retinol için 325 nm'de diot-array spektrofotometresinin iki kanalı kullanılarak düzenlenmiştir. Bu şartlarda, ayrıntılı geri kazanımlar, sırasıyla retinol,  $\alpha$ -tokoferol ve kolesterol için % 95,7; % 100,8; % 98 dir. Bu metotta bağlı standart sapmalar, retinol için %1,83,  $\alpha$ -tokoferol için %2,32 ve kolesterol için 1,98 dir. Bu metot, karides atıklarının laktik asit fermantasyonu süresinde hidroksilate analizini sağlamıştır. Hidroksilate, balık ürünlerinde önemli besin değerlerinden biridir.

Ma, M. et al. (2006), bu çalışmada gıdalarda sentetik çözünebilen renklendiriciler olarak bulunan tartrazin, amaranth, poceau 4R, sunset yellow FCF, fat-sudan (I-IV) in eş zamanlı tayini yapılmıştır. Bu metotta, örnek hazırlama prosesinde ekstraksiyon çözültisi olarak dimetilsülfoksit kullanılmıştır. HPLC-DAD-Kütle spektrometresinin uygulaması ise analitik teknik olarak kütle spektral verilerini elde etmek için pozitif/negatif iyon değişimli metotta iyon seçici olarak uygulanmıştır. Derişim



büyükliğünde üç doğrusallık vardır. Araştırılan boyalarda dedeksiyon ve nicel limitleri, sırasıyla 0,09-4 ve 0,03-11,2 mg olarak bulunmuştur. Dört matriste sekiz renk maddesinin geri kazanımları %93,1-%108,3 oranında elde edilmiştir. %8,2 den az bağıl standart sapmalar elde edilmiştir. Bu metot, toz örneklerde, lezzetli zencefil ve yağda çözünen boyalarda ve suda çözünen renklendiricilerin tayininde başarıyla uygulanmıştır.

Özdemir et al. (2006), bu çalışmada öksürük şurubundaki guaifenesin ve dekstromethorphanın tayini için florimetrik dedeksiyonla pratik sıvı-performans kromatografik metodu tanımlamışlardır. Geliştirilen metot, diğer türlerin varlığıyla örneklerde aktif bileşiklerin ayrılması ve simultane tayini için basit, doğru ve hızlı örnek hazırlama basamakları içermektedir. Amilorid (AM), çalışılan dalgaboyu bölgesinde floresans karaktere sahip iç standart (IS) olarak kullanılmıştır. İlaçların ve iç standardın iyi kromatografik ayrımı, C18 kolonda fosfat tamponu varlığında asetonitril-metanol içeren mobil fazla ayrılmıştır. Eluentler, sırasıyla 277 ve 588 nm dalgaboylarında floresans dedektörlerle incelenmiştir. Tanımlanan koşullar altında, bulunan kalibrasyon grafikleri, guaifenesin ve dekstromethorphan için sırasıyla 0,052-2 µg/mL ve 1,2-2,4 µg/mL derişim oranında doğrusaldır ve regresyon katsayıları da 0,999 dan büyüktür. Validasyon çalışması, seçicilik, doğrusallık, tahmin, doğruluk ve duyarlılığı içeren temel kriterleri karşılayan yeni analitik metotları geliştirmek için ICH rehberliğini yapar.

Dinç et al. (2007), bu çalışmada fraksiyonel dalgaboyu transferi, sinyal ve tahmini analizi için yeni bir matematiksel model geliştirmişlerdir. Bu çalışmada, ikili karışımdaki bileşiklerin sinyallerinin çalışmada fraksiyonel dalgaboyu analileri yapılmıştır. Hidroklorotiazid ve silazoprilin nicel dengesinde, PLS kalibrasyonları, deneysel koşulları uygun hale getirdikten sonra fraksiyonel dalgaboyu katsayıları için uygulanmıştır. PLS yaklaşımının validasyonu, aktif bileşenleri içeren farklı sentetik karışımlarının analizinde kullanılmıştır. Gerçek örneklerde hidroklorotiazid ve silazopril, ön ayırma olmaksızın fraksiyonel dalga boyu katsayılarına dayandırılan PLS kullanılarak analiz edilmiştir. Birleştirilen metot, potansiyel yeni kemometrik yaklaşımdır ve örneklerdeki bileşenlerin nicel analizi için uygundur.

Dinç et al. (2007), bu çalışmada kıyaslamalı kromatografik çalışma, veteriner formülasyonlarındaki trimethoprim (TMP) ve sulfometoksiazole (SMX) in simultane nicel çözümü için geliştirilmiştir. Çok dalga boyulu kromatogramlar, 220, 230, 240, 250 ve 260 nm de DAD dedektörler kullanılarak kaydedilmiştir. İlk basamakta, her bir ilaç için yukarıdaki dalgaboylarında beş farklı eşitlik, derişim ve pik alanı arasındaki bağıntı kullanılarak elde edilmiştir. Bu kalibrasyon grafikleri, örneklerde TMP ve SMX in nicel değerlendirilmesi için kullanılmıştır. Tek dalga boyu uygulamaları, geleneksel LC metodu olarak adlandırılmıştır. İki basamakta, PCR, PLS kalibrasyonları çok dalgaboylu kromatogramlara uygulanmıştır. Örneklerde araştırılan iki ilacın miktarı, PCR ve PLS kalibrasyonları ile yapılmıştır. Kemometrik yaklaşımlar ve kromatografik çoklu yaklaşımlarla bulunan her bir dalgaboyunun kalibrasyon grafiklerinden karşılaştırmalı olarak elde edilen deneysel sonuçlar, geleneksel LC metodundan daha iyi sonuçlar vermektedir.

Miniotti et al. (2007), bu çalışmada 13 tane sentetik renk maddesinin başarılı ayırımı ve tayini için ters faz sıvı kromatografisi yöntemini geliştirmişlerdir. AC 18 sabit fazı kullanılır ve mobil faz olarak %20:80 asetonitril-metanol karışımı ve % 1 (m/v) amonyum asetat tamponu (pH:7,5) kullanılmıştır. Başarılı ayırma, 29 dakikayla uygun eğitimli elüsyon kullanılan bütün bileşikler için sağlanmıştır. Diot-array dedektörler, 350-800 nm arasında renklendiricileri denetlemek için kullanılmıştır. Metotta, dikkatle validasyon yapılmıştır. Bütün bileşiklerin dedeksiyon limitleri, 1,59 µg/L (E142), 22,1 µg/L( E124) arasında değişmektedir. Gün içi tahmini % 0,37 den % 4,8 e kadar sıralanır ve meyveli içeceklerdeki E122 için %0,86, reçeldeki E142 için %10 dur. Geri kazanımlar, reçeldeki E142 için %94 den şekerdeki E131 için %102 bulunur. Metot, içecekler, alkollü içecekler, reçeller, tatlı şekerlemeler ve şekerlerde ön ayırma olmaksızın uygulanmıştır. Bu tür gıdalar, suda çözünebilen gıdalardır.

Tosun et al. (2007), yaptıkları bu çalışmada umbelliferaenin kök ve hava ile ilgili (-) anomalin (ANO) ve deltoin (DEL) in tayini için sıvı-kromatografik-kemometrik metotları geliştirmişlerdir. İlk olarak, kemometrik şartlar, en iyi ayırımı ve geri

kazanım sonuçlarını elde etmek için normal faz kolonu kullanılarak farklı dalga boylarında çeşitli akış hızlarıyla çözücülerin çeşitli oranlarında farklı mobil fazlar test edilerek optimize edilmiştir. Sonuç olarak, ortam sıcaklığında yukarıdaki kolon sisteminde 0,8 mL/dak sabit akış oranında, n-heksan ve etilasetatın (75:25) bulunduğu mobil fazda, örneklerde ANO Ve DEL in iyi ayırımı ve tayini için optimal kromatografik şartlar bulunmuştur. 50-400 ng/mL derişim oranlarında ANO ve DEL bileşiklerini içeren derişim seti için çoklu kromatogramlar, seçilen beş dalga boyunda DAD sistem kullanılarak bulunmuştur. Üç LC kemometrik yaklaşımında kemometrik verileri yapılandırmak için çok kromatogramlı veriler kullanılmıştır. Alternatif bir metot olarak, aynı dalga boyunda alışılmış LC ile bitki ekstraktlarındaki bağlantılı bileşiklerin analizi yapılmıştır. Metotta, analiz edilen çeşitli sentetik ANO-DEL karışımlarıyla validasyonu yapılmıştır. Alışılmış ve kemometrik LC metotlarına, *S.resinosum* kök ve hava parçalarından ekstraktları içeren gerçek örnekler uygulanmıştır. LC-kemometrik yaklaşımıyla bulunan sonuçlar, alışılmış LC ile bulunanlarla kıyaslanmıştır.

### **2.3. Potansiyometri İle Yapılan Çalışmalar**

Aktaş and Yaşar (2004), bu çalışmada 2-hidroksisinnamik asit ve 2-hidroksi benzoik asit, 25°C de azot atmosferinde 2-propanolde tetra amonyum hidroksit kullanılarak potansiyometrik olarak titre edilmiştir. ANN, potansiyometrik asit-baz titrasyonlarında çoklu kalibrasyon gibi davranan veriler için uygulanmıştır. Geri yayılım öğrenimi ile denenen ANN, p-kumarik asit, sinapik asit, vanillik asit, izovanilik asidin derişimleri arasındaki kompleks non-doğrusal olmayan bağıntı ve eklenen farklı hacimlerdeki çözeltilerin mV değerleri için kullanılmıştır. mV matrisinin ana bileşenleri, network girişi olarak kullanılmıştır. Uygun network, sentetik karışımlarda asitlerin derişimlerini tayin edilmiştir. Sonuçlar, % 4,18 den daha az ortalama bağlantılı hatalarla titrasyon verilerinin ilettilmesinde kullanılmıştır.

Akhound et al. (2006), yaptıkları bu çalışmada PLS modelini, potansiyometrik titrasyonla askorbik asit, sitrik asit ve tartarik asitlerin karışımının analizinde

kullanmışlardır. Askorbik asit, sitrik asit ve tartarik asitlerinin çoklu karışımları kadar tartarik ve sitrik asitin ikili karışımları, potansiyometrik olarak NaOH ile titre edilmiştir. Titrant hacmi ve analit derişimi arasındaki doğrusal ilişki PLS ile elde edilmiştir. Bileşiklerin derişimlerini tahmin etmek için daha sonra dizayn edilen model, bilinmeyen örneklerdir. Bu metodun pratik yararı,  $4 \times 10^{-4}$ - $2 \times 10^{-3}$  M derişim arasında ikili ve çoklu karışım sistemlerinde asitlerin simultane tayini için yapılandırılmış ve kabul edilebilir sonuçlar elde edilmiştir.

Aktaş and Ertokus Pekcan (2008), bu çalışmada, üç anti-inflamatuar ilaç türünü, yani ibuprofen, indometazin ve naprokseni potansiyometrik olarak tetrabutyl amonyum hidroksit çözücüsü ile bir azot atmosferi altında 25 °C de asetonitril ortamında elde ettikleri potansiyometrik titrasyon verilerini MATLAB 7.0 yazılımı ile kemometrik olarak hesaplamaya tabi tutmuşlardır. Yapay sinir ağı (YSA) ile ibuprofen, indometazin ve naproksen karışımlarının derişimleri ve milivolt değerleri arasında doğrusal bir ilişki modeli kurulmuştur. Optimize edilmiş ağı, sentetik karışımlarda ajanların derişimleri öngörülmüştür. Yapay sinir ağlarına göre az %2,30 tahmin ortalama bağıl hata hesaplama yapılmıştır.

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

Bu çalışmada, UV/VIS spektrofotometrisi, yüksek performans sıvı kromatografisi ve potansiyometrik yöntemlerle dört bileşenli bir gıda maddesindeki renk maddelerinin nicel olarak tayini yapılmıştır. Bu renk maddeleri karamel (Gurme), allura red (Sigma), sunset yellow (Fluka), tartrazin (Fluka)dır. Elde edilen veriler, PCA, PCR, PLS, MLR gibi kemometrik yöntemlerle değerlendirilmiştir. Önce tek tek sonra farklı oranlarda hazırlanan sentetik karışımların spektrumları alınmıştır. Son işlem olarak da ticari olarak alınan farklı gıda örneklerinde ölçümler yapılmıştır.

Elde edilen veriler, Minitab 15, Panorama, XLSTAT Solo adı verilen kemometrik programlar ile değerlendirilmiştir. Temelde bu programlar,

- Veri ve Dosya Yönetimi
- Temel İstatistikler
- Regresyon Analizi
- Varyans Analizi (ANOVA)
- İstatistiksel Süreç Kontrolü (Statistical Process Control - SPC)
- Deney Tasarımı
- Güvenilirlik Analizleri
- Çok Değişkenli Analiz
- Zaman Serileri ve Kestirim
- Simülasyonlar ve Dağılımlar

özelliklerini içermektedir.

#### **3.2. Kullanılan Cihazlar**

##### **3.2.1. UV-görünür spektrofotometre cihazı**

UV – Vis spektrumları, bilgisayar tarafından kontrol edilen 1 cm uzunluğundaki hücre ile donatılan UV 1700 PHARMASPEC SHIMADZU spektrofotometresi kullanılarak belirlenen spektrum değerleri gıda maddelerindeki renk maddelerinin miktarını belirlemek için kemometrik metoda uygulanmıştır.

### 3.2.2. Yüksek performans sıvı kromatografisi cihazı

SHIMADZU HPLC;

Dedektör: Diode Array Dedektör

Pompa: LC-10ADvp

Degasser: DGU- 14A

Column oven: CTO-10ACvp

Kolon: Luna C18 250\*4.6mm 5 micron

Mobil faz: 0,2M asetat tamponu(pH:5):55 ACN:20 MeOH:15 Su:10

Akış Hızı: 1,5 mL / dakika

Kolon sıcaklığı : 25°C

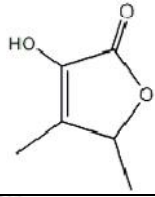
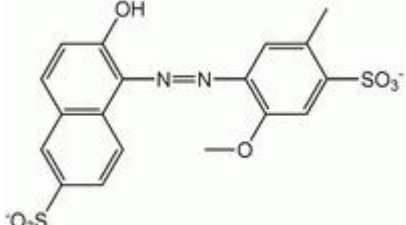
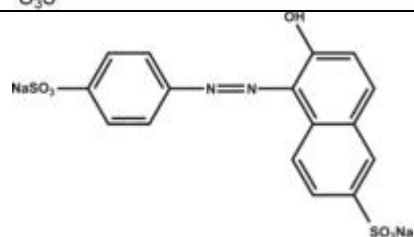
### 3.2.3. Potansiyometri cihazı

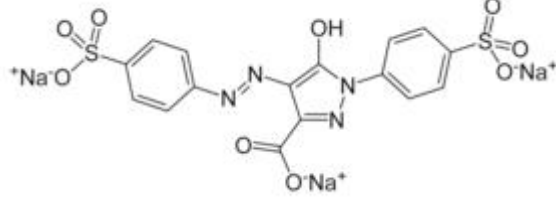
ORION 5 STAR pH/iyon cihazı

### 3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneylerde analitik saflıkta olan kimyasallar kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan kimyasallar Çizelge 3.1.' de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve formülleri

BİLEŞİĞİN ADI	BİLEŞİĞİN FORMULÜ
Karamel	
Allura Red	
Sunset Yellow	

Tartrazin	
-----------	------------------------------------------------------------------------------------

Su , 0,05 S. cm<sup>-1</sup> den düşük kondüktiviteye sahip , Milli – Q su arıtma (Millipore Corp.) sisteminden sağlanmıştır.

### 3.3.1 Kullanılan çözeltiler

Çalışmada spektrofotometrik ölçümler için :

Bütün renk maddelerinin 10 mg / 100 mL olacak şekilde stok çözeltileri hazırlanmıştır.

#### Stok Karamel Çözeltisi

Karamel maddesinden 0,0108 g tartılarak bir miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim 100 mL ye tamamlanmıştır.

#### Stok Allura Red Çözeltisi

Allura red maddesinden 0,0104 g tartılarak bir miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim 100 mL ye tamamlanmıştır.

#### Stok Sunset Yellow Çözeltisi

Sunset Yellow maddesinden 0,0105 g tartılarak bir miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim 100 mL ye tamamlanmıştır.

#### Stok Tartrazin Çözeltisi

Tartrazin maddesinden 0,0104 g tartılarak bir miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim 100 mL ye tamamlanmıştır.

#### Ticari numune

- Sıvı gazlı içecek: Ticari olarak satın alınan sıvı gazlı içecek bir saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır ve 20 dakika kadar 90°C de ısıtılmıştır. Bu işlem

sonucunda yapısında bulunan karbondioksit uzaklaştırılmıştır. Sonra süzülerek 0,1-1,0 mL alınarak son hacim 0,1 M HCl ile 25 mL ye tamamlanmıştır (Yedigün Kan Portakalı).

### **3.4. Yöntem**

#### **3.4.1. UV/VIS spektroskopisi yöntemi**

Bu çalışmada, spektrofotometrik ölçümlerle renk maddelerinin stok çözeltilerinin spektrumları okunmuştur. Bu işlem için önce tek tek sonra farklı oranlarda hazırlanan sentetik karışımların spektrumları alınmıştır. Son işlem olarak da ticari olarak alınan farklı gıda örneklerinde ölçümler yapılmıştır. Elde edilen veriler, farklı kemometrik yöntemlerle değerlendirilmiştir. İlk basamakta, UV spektrofotometre cihazının kalibrasyonu (sıfırlama işlemi) yapılmıştır. Kalibrasyon işlemi önce her iki hücre boş bırakılarak havaya karşı yapılmıştır. Sonra aynı işlem bu kez her iki ışık yoluna saf su ile hazırlanan kör numunesi konularak yapılmıştır. Bütün okumalarda hep kör bu şekilde hazırlanmıştır. Kör olarak sadece saf su kullanılmasının nedeni bu çalışmada genel olarak çözücümüz saf su olduğu içindir. Kör seçimi yapılırken girişim etkilerini yok etmek için, kör olarak çözücü tercih edilmiştir. İkinci basamakta, saf renk maddelerinin tek tek spektrumları alınmıştır. Bu işlem esnasında stok renk maddelerinden derişimleri 2-10 ppm arasında olacak şekilde 0,5-2,5 mL arasında saf maddeler stoklardan alınarak toplam hacim 25 mL ye tamamlanarak çözeltileri hazırlanmıştır ve UV spektroskopisinde absorbans okumaları yapılmıştır. Üçüncü basamakta, her bir madde ayrı bir dalga boyunda maksimum verdiği için saf renk maddelerinden oluşturulan sentetik karışımların UV spektroskopisinde absorbans okumaları yapılmıştır ve birbiri yanında herhangi bir ön ayırma işlemine gerek olmaksızın renk maddeleri incelenmiştir. En son basamakta ise, ticari numunelerden hazırlanan çözeltiler incelenmiştir. *Sıvı gazlı içecek*: Dört ayrı renk maddesi içerir. Bunlar; karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellowdur.

#### **3.4.2. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi**

*Yüksek performans sıvı kromatografisinde (HPLC)*, Kolon olarak Luna C18 250\*4.6mm 5 micron tercih edilmiştir. Mobil faz olarak 0.2M asetat tamponu(pH:5):55 ACN:20 MeOH:15 Su:10 kullanılmıştır. Numunelerin stok



çözeltileri 25 mg/mL olarak 0.2 M asetat tamponunda (pH=5) hazırlanmıştır. *Sıvı gazlı içecek* için, brilliant blue (IS) iç standart olarak kullanılmıştır. İç standartin 10 µg/mL bulunduğu ortam için 0,4-16 µg/mL aralığında olacak şekilde diğer renk maddeleri eklenerek karışımlar hazırlanmıştır. HPLC kemometrik analizi süresince, PDA dedektör kullanılarak beş dalga boyunda IS e karşı analiz edilen renk maddelerinin pik alanlarının oranları karşılaştırılmıştır. IS den 10 µg/mL kromatografik çalışma için enjeksiyon sistemine eklenmiştir. Dedektörün cevabı pik alanı olarak ölçülmüştür. Kemometrik kalibrasyon, HPLC çoklu kalibrasyonu ile birleştirilen yöntemle yapılmıştır. Ticari ürünlerin analizinde ise, 2000 mg örnek 100 mL 0,2 M asetat tamponunda (pH=5) çözülmüştür ve 20 dakika 5000 rpmde santrifüjlenerek kromatogramı alınmıştır.

### **3.4.3. Potansiyometrik yöntem**

Saf haldeki renk maddelerinin *potansiyometrik yöntemle* analizi yapılmıştır. Bu çalışma esnasında önce renk maddelerinin saf numuneleri (2-10 ppm) hazırlanarak potansiyometrik olarak değerlendirilmiştir. Sonraki aşamada hazırlanan renk numunelerinden belli hacimlerde alınarak çoklu karışımlar hazırlanmıştır. Son olarak da ticari olarak satılan numuneler incelenmiştir. Renk maddeleri fenolik yapıda olduklarından 0, 1 M NaOH ile titrasyon yapılmıştır.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. UV Spektroskopisi

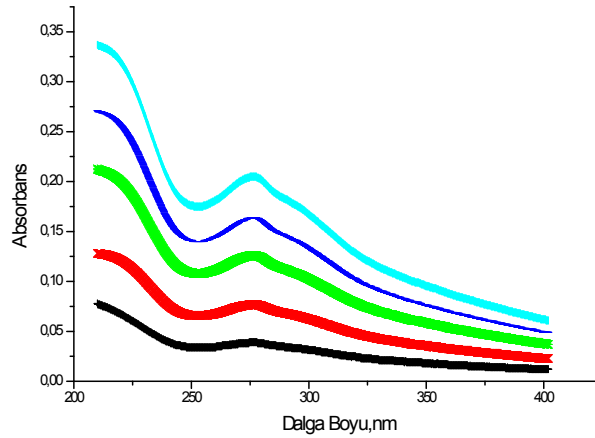
Önce her bir renk maddesinin saf halde ~ 10 mg/100 mL saf suda standart çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra 0,5-2,5 mL arasında saf maddeler stoklardan alınarak toplam hacim 25 ml'ye tamamlanmıştır. Bu işlem sonrası absorbanslar ölçülerek kaydedilmiştir. Her bir renk maddesinin derişimleri ppm olarak hesaplanmış ve absorbanslardan yararlanılarak molar absorpsiyon katsayıları belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Renk maddelerinin spektroskopik özellikleri

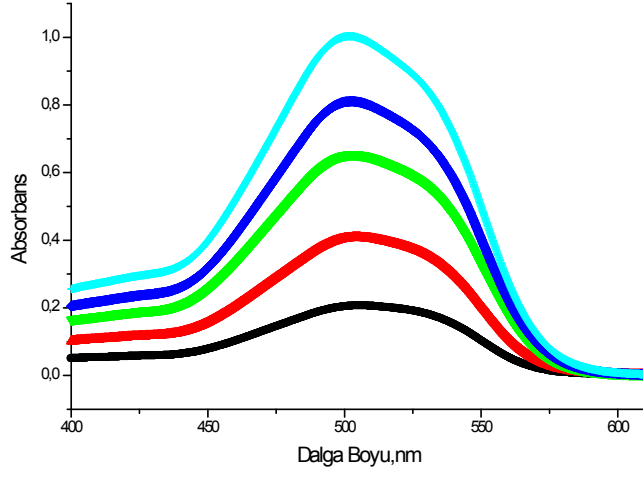
RENK MADDESİ	MAK. ABS. YAPTIĞI DALGABOYU	MOLAR ABSORPSİYON KATSAYISI	KALİBRASYON DENKLEMİ	KORELASYON KATSAYISI
Karamel	276,80 nm	0.021	$y = 0,021x - 0,0035$	0,9985
Allura Red	506,20 nm	0.0991	$y = 0,0991x + 0,0186$	0,9953
Sunset Yellow	483,60 nm	0.1054	$y = 0,1054x + 0,0075$	0,9997
Tartrazin	428,00 nm	0.0987	$y = 0,0987x - 0,0188$	0,9997

Her bir renk maddesinin saf halde yani tekli durumda spektrumları alınır. Bu spektrumlar alınırken karamel için derişim aralığı 4-20 µg / mL, allura red için 0,4-1,6 µg / mL, tartrazin için 0,8-3,2 µg / mL, sunset yellow için 0,4-1,6 µg / mL dir. Bu derişim aralığı, tayin edilecek renk maddeleri için doğrusalığın olduğu bölgedir.

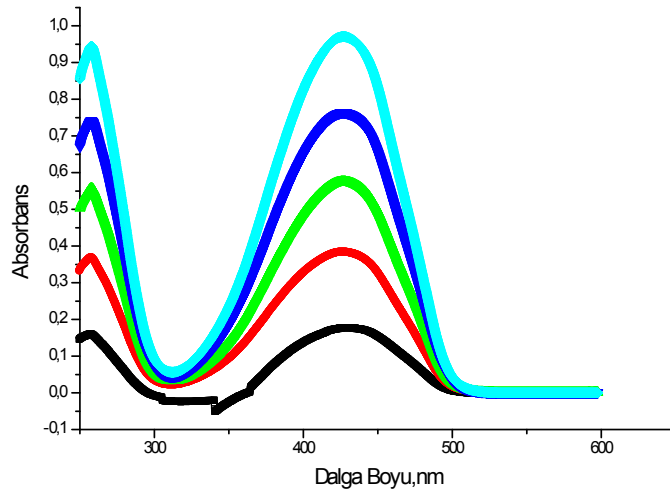
#### 4.1.1. Saf halde renk maddelerinden elde edilen spektrumlar



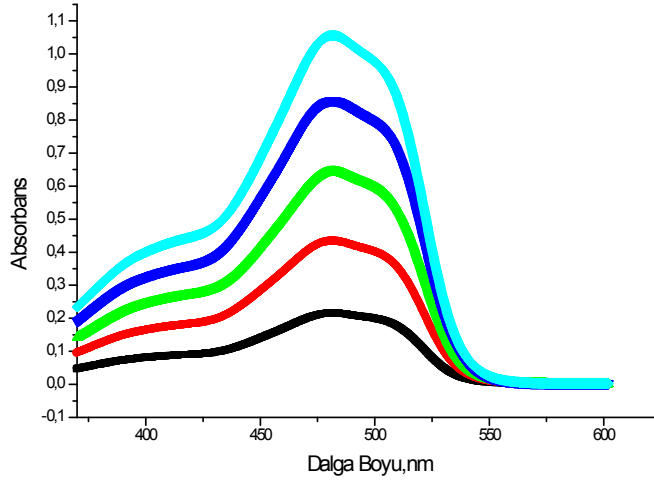
Şekil 4.1. Karamel maddesinin absorpsiyon spektrumu



Şekil.4.2. Allura red maddesinin absorpsiyon spektrumu



Şekil. 4.3. Tartrazin maddesinin absorpsiyon spektrumu

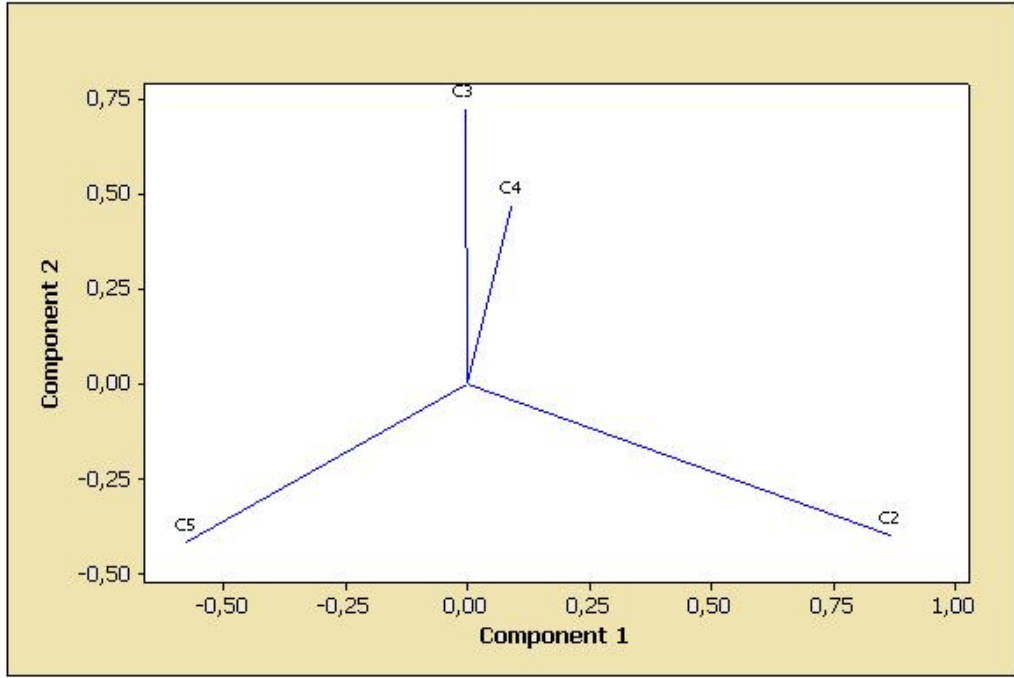


Şekil 4.4. Sunset yellow maddesinin absorpsiyon spektrumu

Her bir madde ayrı bir dalga boyunda maksimum absorpsiyon vermektedir. Daha sonra bundan yararlanılarak sentetik karışımlar hazırlanmıştır ve birbiri yanında herhangi bir ön ayırma yapmaksızın renk maddeleri incelenmiştir. Renk maddeleri ayrıca sürekli spektrum göstermektedir ve üst üste örtüşen spektrumlar gözlenmektedir.

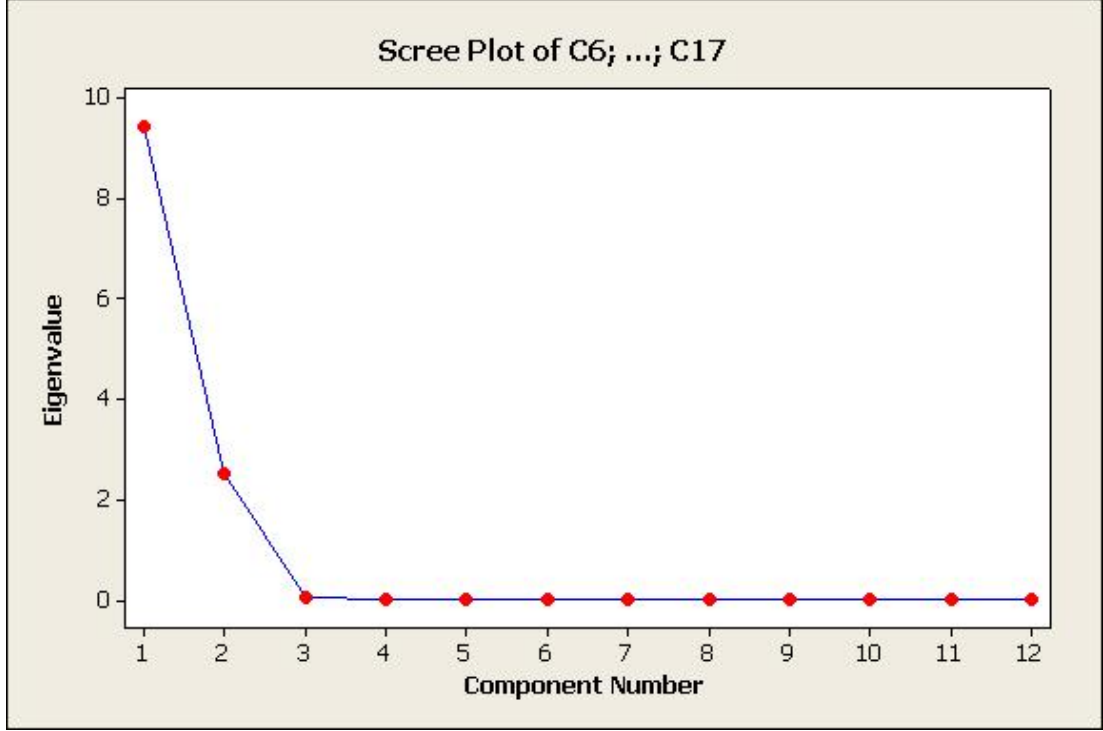
#### 4.1.2. Temel bileşen analizi (PCA)

Sentetik çözeltilerde hesap yaparken programın kendi içinde ilk yaptığı işlem temel bileşen analizi yapmaktır. Temel bileşen analizi uygulanmasının amaçları, bir orijinal değişkeni temsil eden  $n$  sayıda orijinal aksı (doğruyu) yeni akslar haline dönüştürmektir. Bu dönüşüm işleminde yeni akslar, verilerin maksimum varyans yönelleri boyunca uzanır ve yeni aksların özelliği, ortogonal olmalarıdır ve bu yeni değişkenler arasında korelasyon yoktur. Numune verilerinin varyansının çoğunu açıklamak için ihtiyaç olan yeni değişkenlerin sayısı ( $p$ ),  $n$  sayıdaki orijinal akslardan daha azdır. Temel bileşen analizi, çok değişkenli verilerin boyutunu indirgemek veya verileri azaltmak için bir yöntem olarak kabul edilir. Aynı zamanda değişkenlerin doğrusal bileşenlerini ortaya çıkarır.



Şekil 4.5. Değişkenlerin doğrusal bileşenleri

Şekil 4.5. e bakıldığında programa yüklediğimiz verilerden birinci temel aks ve ikinci temel aks üzerinden doğrusal bileşenler bulunmuştur. İşlemlerin doğruluğu ölçüsünde doğrusal bileşenler elde edilmiştir. Bu grafik varyans-kovaryans matrisinin elemanlarının orijinin merkezine olan büyük aks birinci temel bileşeni (C2) ve bu bileşene 90 °C lik açı ile ikinci temel bileşen (C3) uzanmaktadır. Bir kare matris için , varyans-kovaryans matrisinin elemanları koordinat sisteminin orijini boyunca uzanır. Büyük aksın eğimi, birinci temel bileşen ile birleştirilmiş özvektör (eigenvector)dür. Bu “özvektöre” karşılık gelen “özdeğer” (eigenvalue) Şekil 4.5. deki büyük aksın uzunluğudur. Şekil 4.6. da özdeğerlerin grafiği görülmektedir. Özdeğerlerin simetrik bir veri matrisinden çıkarılması kısmi en küçük kareler yöntemi ve temel bileşen analizi için önemlidir. Özdeğerler ve özvektörler elde edildikten sonra yapılacak işlem diğer kemometrik hesaplamalara geçiştir. Temel bileşen analizi ile elde edilen temel bileşenler yardımıyla oluşturulan korelasyon matrisi diğer kemometrik regresyonlara (PLS, PCR... ) ışık tutmaktadır.



Şekil 4.6. Kemometrik verilerden elde edilen özdeğerlerin grafiği

Şekil 4.6. de belirgin bir şekilde görüldüğü gibi özdeğerler 2. değerden 3. değere doğru düşmüştür. İlk iki faktör, toplam varyansın % 99'undan daha fazla güvenilirdir.

#### 4.1.2.1. Kalibrasyon yönteminin validasyonu

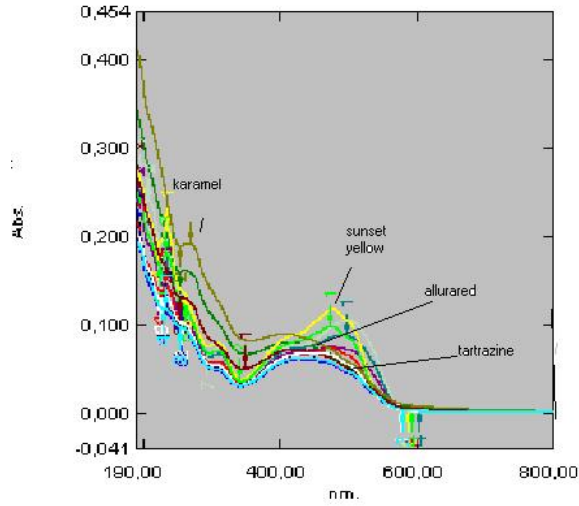
Temel Bileşen Analizi için 0,4-16 µg / mL doğrusal çalışma aralığında karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow içeren çözeltilerin standart serisi stok çözeltilerinden yararlanılarak hazırlanmıştır. Renk maddelerini içeren 16 adet yapay karışım çözeltilerinden ibaret olan bir kalibrasyon seti (Çizelge 4.2.) hazırlanmıştır. Önce saf maddelerle çalışılarak her bir bileşenin hangi aralıkta spektrum verdiği belirlenmiştir (Bölüm 4.1.1.). Ölçümler 200-800 nm arasında yapılmıştır. Daha sonra aralık kalibrasyon seti için ve kullanılacak olan istatistik programı doğrultusunda dalga boyu aralığı 260 nm- 560 nm olarak daraltılmıştır. Kalibrasyon seti hazırlanırken saf halde alınan spektrumların absorpsanlarıyla ilişkili değerlendirme yapılmıştır.

Çizelge 4.2. Karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow karışımlarını içeren kalibrasyon seti

No	Karamel ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Allura Red ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Tartrazin ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Sunset Yellow ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )
1	4	0,4	0,8	0,4
2	8	0,4	0,8	0,4
3	12	0,4	0,8	0,4
4	16	0,4	0,8	0,4
5	4	0,4	0,8	0,4
6	4	0,8	0,8	0,4
7	4	1,2	0,8	0,4
8	4	1,6	0,8	0,4
9	4	0,4	0,8	0,4
10	4	0,4	0,8	0,8
11	4	0,4	0,8	1,2
12	4	0,4	0,8	1,6
13	4	0,4	0,8	0,4
14	4	0,4	1,6	0,4
15	4	0,4	2,4	0,4
16	4	0,4	3,2	0,4

**Sentetik Karışımlar:**

Karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellowdan oluşur.



Şekil 4.7. Sentetik karışımın absorpsiyon spektrumu.

#### **4.1.3. Kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS)**

Kısmi en küçük kareler yönteminde Çizelge 4.2 göre hazırlanan kalibrasyon seti kullanılmıştır. Ölçümler 200-800 nm arasında yapılmıştır. Daha sonra aralık kalibrasyon seti için ve kullanılacak olan istatistik programı doğrultusunda dalga boyu aralığı 260 nm- 560 nm olarak daraltılmıştır. 260,280,300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 460, 480, 500, 520, 540, 560 nm' ye karşılık gelen 16 noktada absorbans okunmuştur. PLS kalibrasyon için hazırlanan kalibrasyon setinin 250-330 nm dalga boyu aralığında  $\Delta\lambda= 0,1$  nm aralıklarla absorbans okundu. Kullanılan istatistik program ile kalibrasyon setinin absorbans ve derişim değerlerinin varyans-kovaryans matrisleri hesaplanmıştır. Derişimler arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı PLS kalibrasyonu kurulmuştur. Karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow içeren karışımların yukarıda belirtilen dalga boylarındaki absorbans değerleri okunarak PLS kalibrasyonunda bu renk maddelerinin miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir.

#### **4.1.3.2. Kalibrasyon yönteminin validasyonu**

PLS yöntemini valide etmek amacıyla karamel için 4-16  $\mu\text{g/mL}$ , allura red için 0,4-1,6  $\mu\text{g/mL}$ , tartrazin için 0,8-3,2  $\mu\text{g/mL}$  ve sunset yellow için 0,4-1,6  $\mu\text{g/mL}$  çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı derişimlerde 16 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir set hazırlanmıştır. Hazırlanan bu validasyon seti (Çizelge 4.2) kullanılarak kurulan PCR kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edilmiştir. Geri kazanım (GK) değerleri; karamel için % 100,064, allura red için % 98,9042 , tartrazin için % 98,8317, sunset yellow için % 99,9983 olarak bulunmuştur. Bağlı standart sapma değerleri karamel için % 1,93, allura red için %2,11 , tartrazin için % 1,94, sunset yellow için % 0,019 olarak hesaplanmıştır. PLS kalibrasyon yönteminin sentetik karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3. de gösterilmiştir.



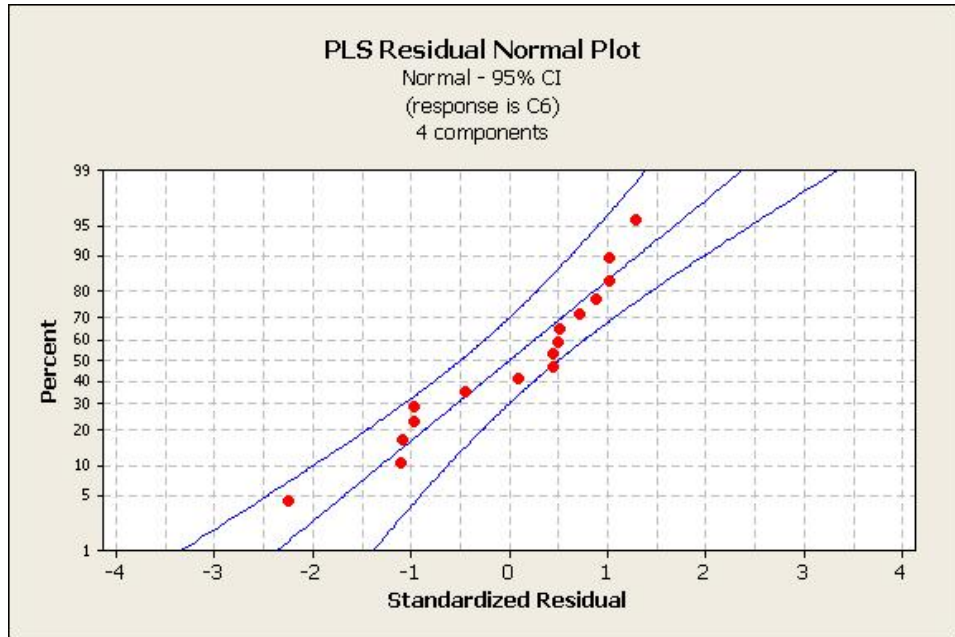
Çizelge 4.3. Sentetik olarak hazırlanan karışımındaki renk maddelerinin PLS kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları

Karışım No	Karamel UV Sonuçları			Allura Red UV Sonuçları		
	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım
1	4	4,0438	101,0950	0,4	0,3994	99,8500
2	8	8,0631	100,7888	0,4	0,4005	100,1250
3	12	12,064	100,5333	0,4	0,3921	98,0250
4	16	15,9798	99,8738	0,4	0,4071	101,7750
5	4	4,0582	101,4550	0,4	0,3969	99,2250
6	4	4,0017	100,0425	0,8	0,8044	100,5500
7	4	3,9700	99,2500	1,2	1,1777	98,1417
8	4	3,8911	97,2775	1,6	1,5636	97,7250
9	4	3,9289	98,2225	0,4	0,3832	95,8000
10	4	3,9252	98,1300	0,4	0,4029	100,7250
11	4	4,0377	100,0425	0,4	0,3911	97,7750
12	4	4,1971	104,9275	0,4	0,3990	99,7500
13	4	3,9692	99,2300	0,4	0,3737	93,4250
14	4	4,0910	102,2900	0,4	0,4037	100,9250
15	4	3,9728	99,3200	0,4	0,3969	99,2250
16	4	3,9058	97,6450	0,4	0,3977	99,4250
			x =100,064 SS = 1,93 BSS =% 1,93			x = 98,9042 SS = 2,09 BSS = %2,11
Karışım No	Tartrazin UV Sonuçları			Sunset Yellow UV Sonuçları		
	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım
1	0,8	0,7988	99,8500	0,4	0,4000	100,00
2	0,8	0,7807	97,5875	0,4	0,4000	100,00
3	0,8	0,7900	98,7500	0,4	0,3999	99,9750
4	0,8	0,7701	96,2625	0,4	0,4001	100,0250
5	0,8	0,7790	97,3750	0,4	0,4000	100,00
6	0,8	0,7848	98,1000	0,4	0,4000	100,00
7	0,8	0,7709	96,3625	0,4	0,4001	100,025
8	0,8	0,8065	100,8125	0,4	0,3999	99,9750
9	0,8	0,8014	100,1750	0,4	0,3998	99,9500
10	0,8	0,7734	96,6750	0,8	0,8000	100,00
11	0,8	0,8294	103,6750	1,2	1,1999	99,9917
12	0,8	0,7964	99,5500	1,6	1,6001	100,0063
13	0,8	0,7851	98,1375	0,4	0,4000	100,00
14	1,6	1,5727	98,2938	0,4	0,4001	100,0250
15	2,4	2,3956	99,8167	0,4	0,4000	100,00
16	3,2	3,1963	99,8844	0,4	0,4000	100,00
			x = 98,8317 SS = 1,92 BSS =%1,94			x =99,9983 SS = 0,019 BSS =% 0,019

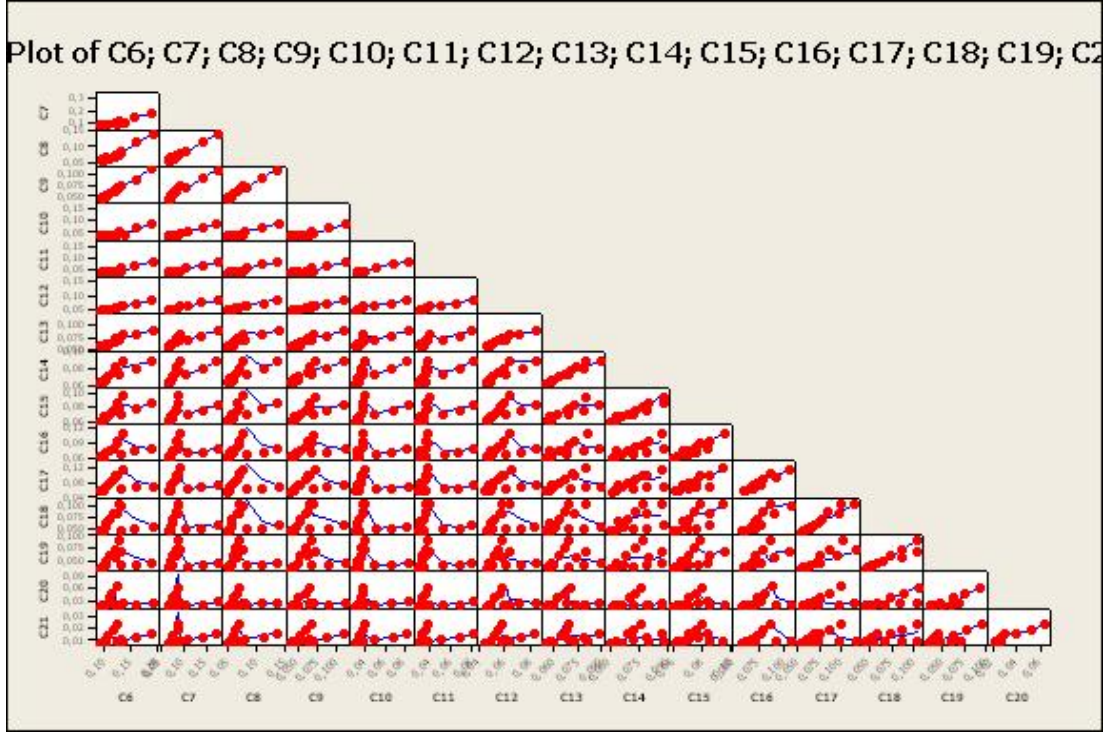
#### 4.1.3.3. PLS yöntemi için ANOVA testi

PLS kalibrasyon yönteminin doğruluk ve kesinliğini valide etmek amacıyla elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulanmıştır. Gruplar arası serbestlik derecesi=19, grup içi serbestlik derecesi=12 % 95 güven aralığında F-tablo değeri 2,31 olmasına karşılık karamel için hesaplanan F-test değeri 0,82 ve p-değeri 0,62, allura red için hesaplanan F-test değeri 1,89 ve p-değeri 0,08 olarak, tartrazin için hesaplanan F-test değeri 1,32 ve p-değeri 0,08, sunset yellow için hesaplanan F-test değeri 1,56 ve p-değeri 0,56 bulunmuştur.

ANOVA testinde  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  ve  $p\text{-değeri} > p=0,05$  olduğu için % 95 güven aralığında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Varyans analizinde iki serbestlik derecesi kullanılır. Gruplar arası serbestlik derecesi=19 Grup içi serbestlik derecesi=12. .  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  ve  $p\text{-değeri} > p=0,05$  olduğu için bu kalibrasyon modeli ticari numunenin incelenmesinde kullanılabilir olduğu karar verilmiştir.



Şekil 4.8. Atık değerlerinin dağılımı



Şekil 4.9. Kemometrik hesaplamalar esnasında oluşturulan matris

Kemometrik hesaplamalar esnasında elde edilen atık değerleri Şekil 4.8. de görülmektedir ve standart eğride dağılım göstermektedir.

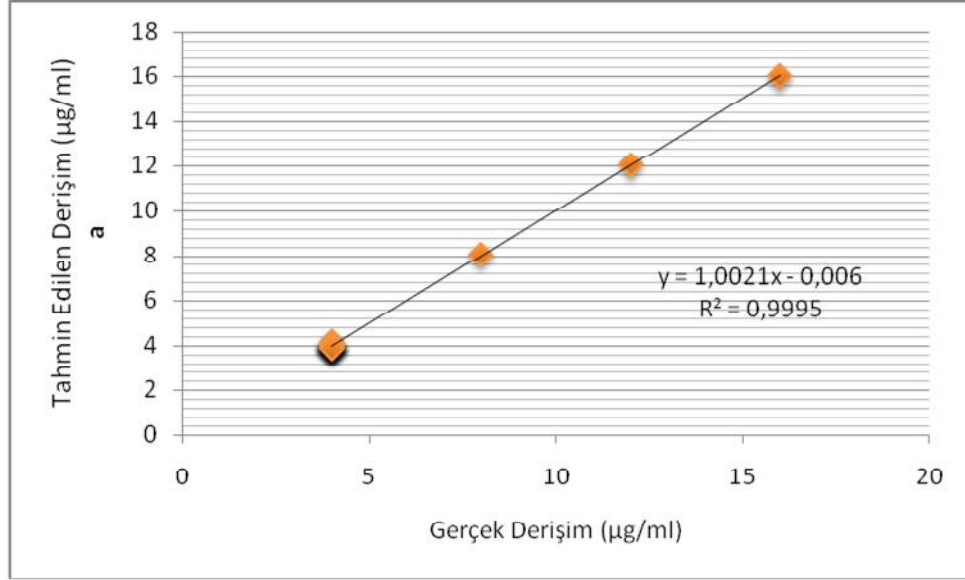
Hesaplamaların doğru ve güvenilir elde edilmesi için simetrik bir matris oluşturulması gerekmektedir. Şekil 4.9. da oluşturulan kare matrisin verilerle dağılımı görülmektedir.

#### 4.1.3.4. PLS yönteminde istatistiksel analiz

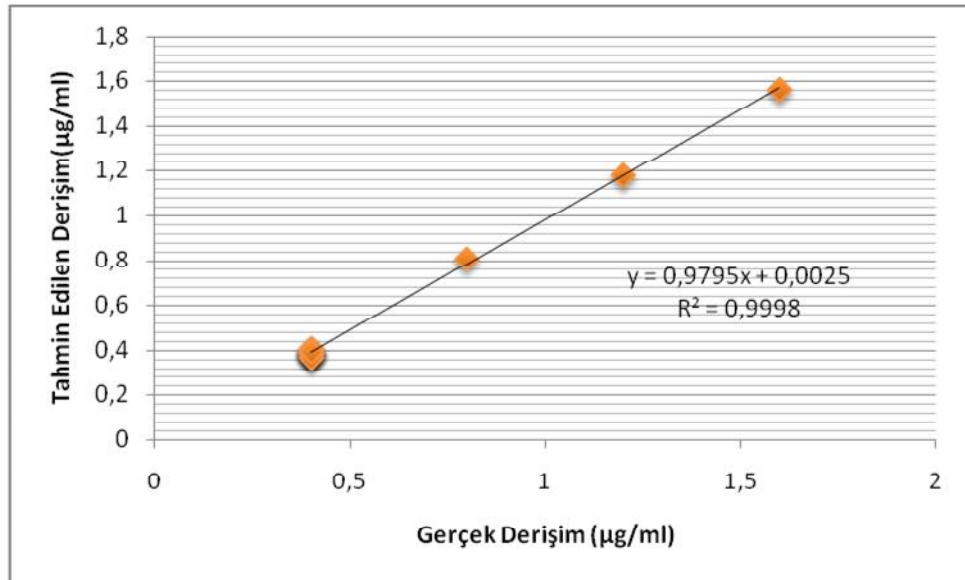
##### 4.1.3.4.a. Kalibrasyonun Standart hatası

Dört renk maddesini içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için PLS kalibrasyonun kurulmasında çapraz validasyon işleminde tahmin edilen hataların karelerinin toplamının (Predicted Residual Error Some of Squares→ PRESS) minimal değerleri elde edilmiştir. Renk maddeleri için kurulan PLS kalibrasyonunda PRESS değeri karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow için sırasıyla 0,108; 0,1639; 0,020024; 0,0211834 olarak hesaplanmıştır. PRESS değerinin sıfıra yakın olması doğruluk derecesini arttırmaktadır. Elde edilen PRESS değerleri yeterince

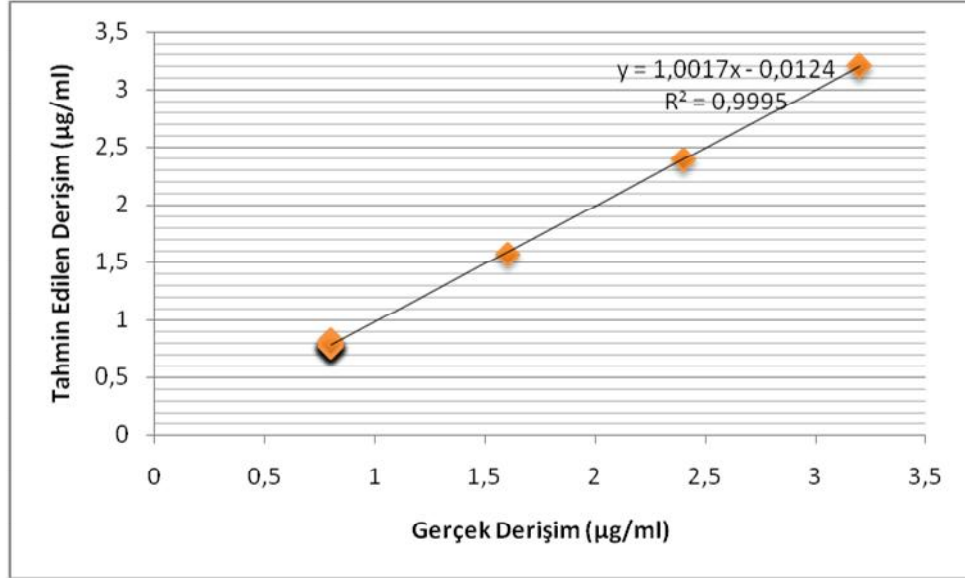
küçüktür. Kalibrasyonun standart hatası (Standard error of calibration →SEC), gerçek ve tahmin edilen derişim arasındaki ilişkiye dayalı olarak hesaplanmıştır ve karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow için sırasıyla 0,077575; 0,006548; 0,500661; 0,0578 olarak bulunmuştur.



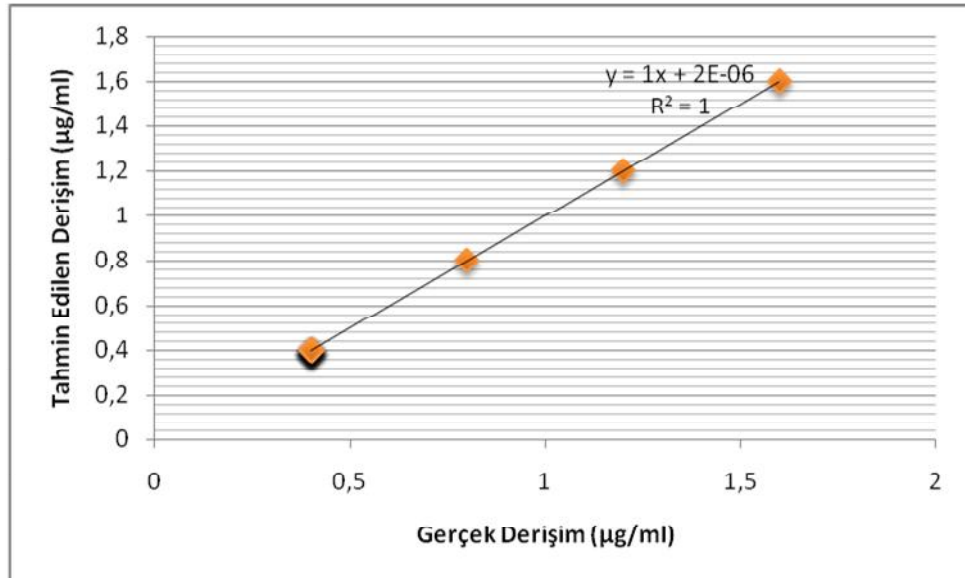
Şekil 4.10. PLS kalibrasyon basamağında karamel için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 4.11. PLS kalibrasyon basamağında allura red için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 4.12. PLS kalibrasyon basamağında tartrazin için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 4.13. PLS kalibrasyon basamağında sunset yellow için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar

Karamel, allura red, tartrazin, sunset yellow içeren karışımlarda bu maddelerin konulan ve hesaplanan verilerinden PLS kalibrasyonu için tayinin standart hatası (Standard Error of Prediction→SEP), değerleri karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow için sırasıyla 0,0665; 0,0060; 0,0590; 0,0430 olarak bulunmuştur.

#### 4.1.3.5. Kısmi En Küçük Kareler Yönteminin Ticari Numuneye Uygulanması

Ticari numunenin tayini için 260-560 dalga boyu bölgesinde  $\Delta\lambda= 0.1$  nm aralıklarla ölçülen absorban değerlerine PLS algoritması uygulanmıştır ve içecek içeriğindeki renk maddeleri hesaplanmıştır.

Çizelge 4.4. Ticari numunede bulunan renk maddelerinin PLS kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları

UV Metodu İle Elde Edilen Sonuçlar				
Numune No	Karamel ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Allura Red ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Tartrazin ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Sunset Yellow ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )
1	0,050	5,23	0,84	0,33
2	0,051	5,44	0,75	0,42
3	0,049	5,35	0,88	0,36
	$x = 0,050$	$x = 5,34$	$x = 0,82$	$x = 0,37$
	$SS = 1,0 \cdot 10^{-3}$	$SS = 0,105$	$SS = 0,067$	$SS = 0,046$
	BSS: % 2,0	BSS: %1,97	BSS: % 8,14	BSS: % 12,43
	$GS = 0,05 \pm 1,13 \cdot 10^{-3}$	$GS = 5,34 \pm 0,119$	$GS = 0,82 \pm 0,076$	$GS = 0,37 \pm 0,052$

*GS % 95 Esas alınarak hesaplanmıştır.*

#### **4.1.4. Temel bileşen regresyonu yöntemi (PCR)**

PCR yöntemi kalibrasyon seti için ölçülen absorbans matrisinin parçalanmasıyla elde edilen temel bileşen regresyonuna dayalı bir yöntemdir. Yöntemin algoritması Bölüm 1.10.1.2. de ayrıntılı olarak verilmiştir.

PCR kalibrasyon için hazırlanan kalibrasyon setinin 260-560 nm dalga boyu aralığında  $\Delta\lambda = 0,1$  nm aralıklarla absorbans değerleri okunmuştur. Bölüm 1.10.1.2. de açıklanan PCR algoritmasına göre kalibrasyon setinin absorbans ve derişim değerlerinin varyans-kovaryans matrisleri hesaplanmıştır. Kalibrasyon seti için absorbansların varyans-kovaryans matrisinin dekompozisyon işlemine tabi tutulmasından sonra derişimleri arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı PCR kalibrasyonu kurulmuştur. Renk maddelerini içeren karışımların yukarıda belirtilen dalga boylarındaki absorbans değerleri okunarak PCR kalibrasyonunda bu etken maddelerin miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir.

#### **4.1.4.2. Kalibrasyon yönteminin validasyonu**

PCR yöntemini valide etmek amacıyla karamel için 4-16  $\mu\text{g/mL}$ , allura red için 0,4-1,6  $\mu\text{g/mL}$ , tartrazin için 0,8-3,2  $\mu\text{g/mL}$  ve sunset yellow için 0,4-1,6  $\mu\text{g/mL}$  çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı derişimlerde 16 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir set hazırlanmıştır. Hazırlanan bu validasyon seti (çizelge 4.2.) kullanılarak kurulan PCR kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edilmiştir. Geri kazanım (GK) değerleri; karamel için % 99,6694, allura red için % 99,1872 , tartrazin için % 99,4778, sunset yellow için % 99,9983 olarak bulunmuştur. Bağlı standart sapma değerleri karamel için % 0,70, allura red için % 1,32 , tartrazin için % 1,50, sunset yellow için % 0,019 olarak hesaplanmıştır. PCR kalibrasyon yönteminin sentetik karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5. de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Sentetik olarak hazırlanan karışımındaki renk maddelerinin PCR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları

Karışım No	Karamel UV Sonuçları			Allura Red UV Sonuçları		
	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım
1	4	4,0001	101,0250	0,4	0,4000	100,00
2	8	8,0000	100,00	0,4	0,3903	97,575
3	12	12,001	100,0083	0,4	0,3903	97,575
4	16	15,998	99,9875	0,4	0,4012	100,300
5	4	3,9989	99,9725	0,4	0,3922	98,05
6	4	4,0000	100,00	0,8	0,8000	100,000
7	4	3,9900	99,75	1,2	1,1971	99,7583
8	4	3,9801	99,5025	1,6	1,5606	97,5375
9	4	3,9300	98,25	0,4	0,3876	96,9000
10	4	3,9800	99,5	0,4	0,4008	100,200
11	4	4,0111	100,2775	0,4	0,3976	99,4000
12	4	4,0000	100	0,4	0,3998	99,9500
13	4	3,9999	99,9975	0,4	0,3876	96,9000
14	4	4,0076	100,19	0,4	0,4037	100,9250
15	4	3,9800	99,5	0,4	0,3982	99,5500
16	4	3,9100	97,75	0,4	0,4000	100,00
			x =99,6694 SS = 0,70 BSS =% 0,70			x = 99,1872 SS = 1,31 BSS = %1,32
Karışım No	Tartrazin UV Sonuçları			Sunset Yellow UV Sonuçları		
	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım
1	0,8	0,7988	99,8500	0,4	0,4000	100,00
2	0,8	0,7917	98,9625	0,4	0,4000	100,00
3	0,8	0,7999	99,9875	0,4	0,4012	100,300
4	0,8	0,7901	98,7625	0,4	0,4001	100,0250
5	0,8	0,7890	98,6250	0,4	0,4000	100,00
6	0,8	0,7876	98,4500	0,4	0,4000	100,00
7	0,8	0,7909	98,8625	0,4	0,4001	100,025
8	0,8	0,8065	100,8125	0,4	0,3999	99,9750
9	0,8	0,8014	100,1750	0,4	0,4030	100,75
10	0,8	0,7734	96,6750	0,8	0,8000	100,00
11	0,8	0,8294	103,6750	1,2	1,1997	99,975
12	0,8	0,7964	99,5500	1,6	1,5999	99,9338
13	0,8	0,7851	98,1375	0,4	0,4000	100,00
14	1,6	1,5887	99,2938	0,4	0,4001	100,0250
15	2,4	2,3986	99,9417	0,4	0,4000	100,00
16	3,2	3,1963	99,8844	0,4	0,4000	100,00
			x = 99,4778 SS = 1,49 BSS =%1,50			x =100,0652 SS = 0,092 BSS =% 0,092



#### 4.1.4.3. PCR yöntemi için ANOVA testi

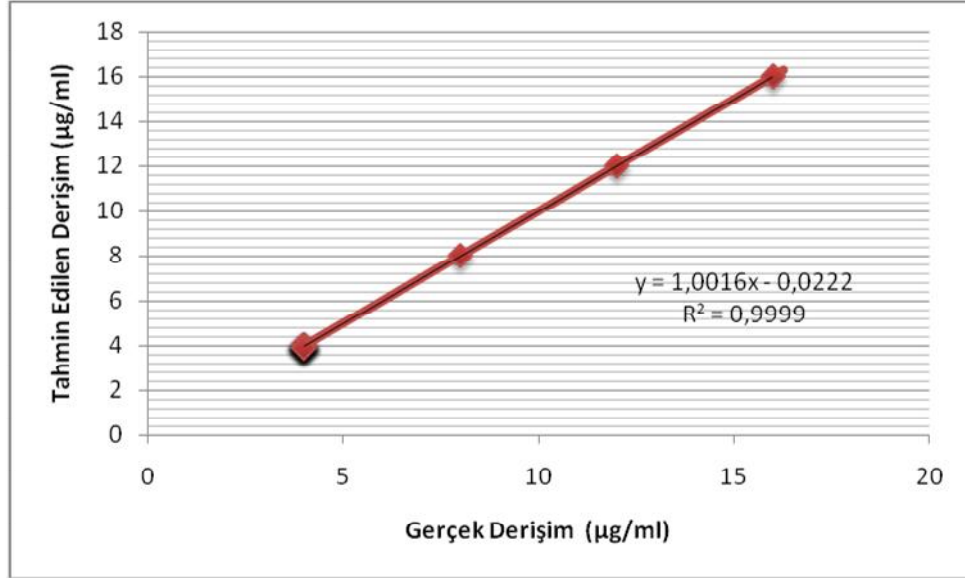
PCR kalibrasyon yönteminin doğruluk ve kesinliğini valide etmek için elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulanmıştır. Gruplar arası serbestlik derecesi=19, grup içi serbestlik derecesi=12 % 95 güven aralığında F-tablo değeri 2,31 olmasına karşılık karamel için hesaplanan F-test değeri 0,93 ve p-değeri 0,76, allura red için hesaplanan F-test değeri 1,91 ve p-değeri 0,08 olarak, tartrazin için hesaplanan F-test değeri 1,31 ve p-değeri 0,08, sunset yellow için hesaplanan F-test değeri 1,42 ve p-değeri 0,06 bulunmuştur.

ANOVA testinde  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  ve  $p > 0,05$  olduğu için % 95 güven aralığında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Varyans analizinde iki serbestlik derecesi kullanılır. Gruplar arası serbestlik derecesi=19 Grup içi serbestlik derecesi=12.  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  ve  $p > 0,05$  olduğu için bu kalibrasyon modeli ticari numunenin incelenmesinde kullanılabileceğine karar verilmiştir.

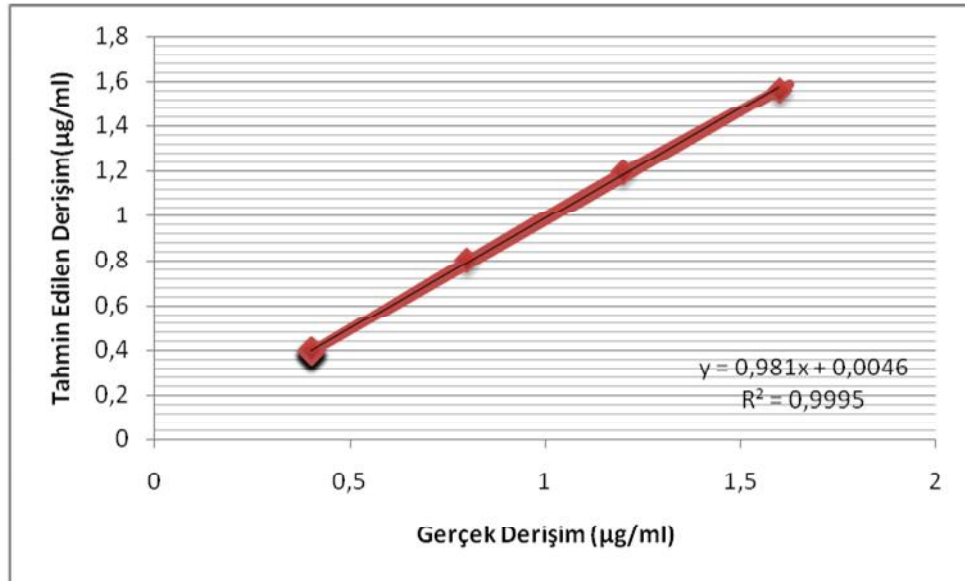
#### 4.1.4.4. PCR yönteminde istatistiksel analiz

##### 4.1.4.4.a. Kalibrasyonun standart hatası

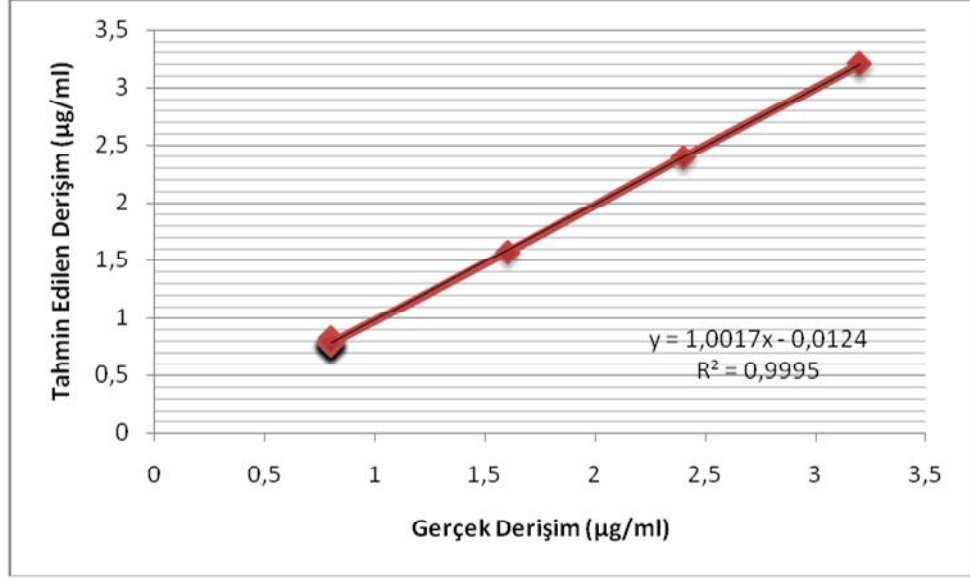
Dört renk maddesini içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için PLS kalibrasyonunun kurulmasında çapraz validasyon işleminde tahmin edilen hataların karelerinin toplamının (Predicted Residual Error Some of Squares → PRESS) minimal değerleri elde edilmiştir. Renk maddeleri için kurulan PLS kalibrasyonunda PRESS değeri karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow için sırasıyla 0,280; 0,202; 0,052; 0,027 olarak hesaplanmıştır. PRESS değerinin sıfıra yakın olması doğruluk derecesini arttırmaktadır. Elde edilen PRESS değerleri yeterince küçüktür. Kalibrasyonun standart hatası (Standard error of calibration → SEC), gerçek ve tahmin edilen derişim arasındaki ilişkiye dayalı olarak hesaplanmıştır ve karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow için sırasıyla 0,0125; 0,0123; 0,006475; 0,004560 olarak bulunmuştur.



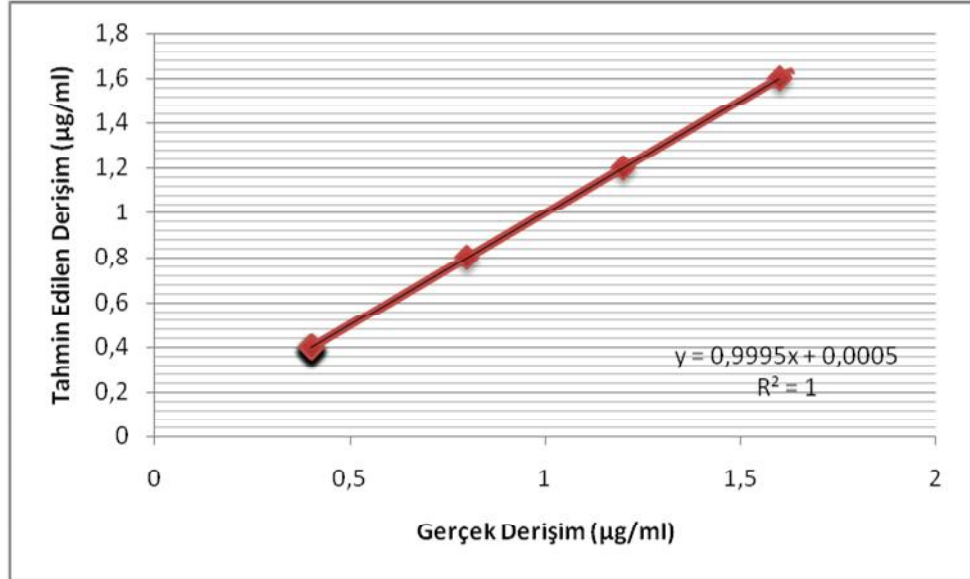
Şekil 4.14. PCR kalibrasyon basamağında karamel için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 4.15. PCR kalibrasyon basamağında allura red için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 4.16. PCR kalibrasyon basamağında tartrazin için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 4.17. PCR kalibrasyon basamağında sunset yellow için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar

Karamel, allura red, tartrazin, sunset yellow içeren karışımlarda bu maddelerin konulan ve hesaplanan verilerinden PCR kalibrasyonu için tayinin standart hatası (Standard Error of Prediction→SEP), değerleri karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow için sırasıyla 0,056; 0,0078; 0,034; 0,045 olarak bulunmuştur.

#### 4.1.4.5. Temel bileşen regresyon yönteminin ticari numuneye uygulanması

Ticari numuneyi analiz etmek amacıyla 260-560 dalga boyu bölgesinde  $\Delta\lambda= 0.1$  nm aralıklarla ölçülen absorbans değerlerine PCR algoritması uygulanmıştır ve içecek içeriğindeki renk maddeleri hesaplanmıştır.

Her bir renk maddesi için türetilen kalibrasyon eşitlikleri şu şekildedir:

$$C_{\text{caramel}} = 5,86 - 218 A_1 + 10,2 A_2 - 569 A_3 + 909 A_4 + 782 A_5 - 186 A_6 - 1313 A_7 \\ + 1660 A_8 + 84,0 A_9 - 1024 A_{10} + 428 A_{11} - 212 A_{12} + 383 A_{13} - 611 A_{14} \\ + 213 A_{15}$$

$$C_{\text{album red}} = - 2,75 + 127 A_1 + 150 A_2 + 144 A_3 - 411 A_4 - 290 A_5 + 67,7 A_6 + 505 A_7 \\ - 959 A_8 + 158 A_9 + 413 A_{10} - 191 A_{11} + 30,7 A_{12} - 88,1 A_{13} + 280 A_{14} \\ - 134 A_{15}$$

$$C_{\text{sunset yellow}} = 2,18 - 136 A_1 - 44,4 A_2 - 25,4 A_3 + 27,9 A_4 + 274 A_5 - 19,1 A_6 - 90,9 A_7 \\ + 331 A_8 + 46,2 A_9 - 283 A_{10} + 28,5 A_{11} + 88,7 A_{12} + 157 A_{13} - 255 A_{14} \\ + 98,0 A_{15}$$

$$C_{\text{tartrazine}} = - 12,8 + 819 A_1 + 64,5 A_2 - 397 A_3 + 500 A_4 - 1342 A_5 - 106 A_6 + 836 A_7 \\ - 1272 A_8 - 77,0 A_9 + 678 A_{10} - 30,0 A_{11} - 534 A_{12} - 488 A_{13} + 961 A_{14} \\ - 561 A_{15}$$

Elde edilen kalibrasyon eşitliklerine absorbans değerleri uygulanarak ticari numunedeki miktarlar hesaplanmıştır. Burada derişim ile absorbans arasındaki ifade de ters kalibrasyon yapılmıştır. Ters kalibrasyonun avantajları şu şekildedir:

- Numune için ölçülen absorbans değeri, formülde yerine konulduğu zaman doğrudan derişimi hesaplamak mümkündür, bu durum hesaplamalarda zaman kaybını ortadan kaldırır.
- Analiz edilen bileşiklerin bilinmesi şartıyla bu kalibrasyon modeli çok kompleks karışımların analizine olanak tanır.

Çizelge 4.6. Ticari numunede bulunan renk maddelerinin PCR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları

UV Metodu İle Elde Edilen Sonuçlar				
Numune No	Karamel ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Allura Red ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Tartrazin ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Sunset Yellow ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )
1	0,050	5,20	0,83	0,33
2	0,050	5,41	0,82	0,41
3	0,049	5,36	0,80	0,35
	$x = 0,050$	$x = 5,32$	$x = 0,82$	$x = 0,36$
	$SS = 2,58 \cdot 10^{-4}$	$SS = 0,040$	$SS = 0,0058$	$SS = 0,015$
	BSS: % 0,516	BSS: % 0,75	BSS: % 0,70	BSS: % 0,042
	$GS = 0,05 \pm 1,3 \cdot 10^{-4}$	$GS = 5,32 \pm 0,020$	$GS = 0,82 \pm 0,0028$	$GS = 0,36 \pm 0,00735$

*GS % 95 Esas alınarak hesaplanmıştır.*

#### 4.1.5. Çok değişkenli regresyon yöntemi (MLR)

MLR yöntemi kalibrasyon seti için ölçülen absorbans matrisinin parçalanmasıyla elde edilen temel bileşen regresyonuna dayalı bir yöntemdir. Yöntemin algoritması Bölüm 1.10.1.4 de ayrıntılı olarak verilmiştir.

MLR kalibrasyon için hazırlanan kalibrasyon setinin 260-560 nm dalga boyu aralığında  $\Delta\lambda = 0,1$  nm aralıklarla absorbans değerleri okunmuştur. Renk maddelerini içeren karışımların yukarıda belirtilen dalga boylarındaki absorbans değerleri okunarak MLR kalibrasyonunda bu etken maddelerin miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir.

##### 4.1.5.1. Kalibrasyon yönteminin validasyonu

MLR yöntemini valide etmek için karamel için 4-16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , allura red için 0,4-1,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , tartrazin için 0,8-3,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ve sunset yellow için 0,4-1,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı derişimlerde 16 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir set hazırlanmıştır. Hazırlanan bu validasyon seti (Çizelge 4.2.) kullanılarak kurulan MLR kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edilmiştir. Geri kazanım (GK) değerleri; karamel için % 99,3014, allura red için % 98,6523, tartrazin için % 100,3765, sunset yellow için % 99,8151 olarak bulunmuştur. Bağlı standart

sapma değerleri karamel için % 1,05, allura red için % 1,71, tartrazin için % 0,53, sunset yellow için % 1,08 olarak hesaplanmıştır. MLR kalibrasyon yönteminin sentetik karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar izelge 4.7. de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. Sentetik olarak hazırlanan karışımındaki renk maddelerinin MLR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları

Karışım No	Karamel UV Sonuçları			Allura Red UV Sonuçları		
	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım
1	4	4,0000	100,00	0,4	0,3912	97,800
2	8	8,0000	100,00	0,4	0,3921	98,025
3	12	12,001	100,0083	0,4	0,3921	98,025
4	16	15,987	99,9187	0,4	0,4036	100,900
5	4	3,9789	99,4725	0,4	0,3892	97,3000
6	4	4,0000	100,00	0,8	0,8037	100,4625
7	4	3,8900	97,2500	1,2	1,1832	98,6
8	4	3,9789	99,4725	1,6	1,5736	100,4625
9	4	3,9720	99,3000	0,4	0,3876	98,6000
10	4	3,9100	97,7500	0,4	0,4077	98,3500
11	4	4,0000	100,00	0,4	0,4014	100,600
12	4	4,0000	100,00	0,4	0,4024	97,125
13	4	3,8760	96,900	0,4	0,3885	97,8000
14	4	4,0000	100,00	0,4	0,3912	96,000
15	4	3,9800	99,500	0,4	0,3840	96,000
16	4	3,9700	99,250	0,4	0,3931	98,275
			x = 99,3014 SS = 1,04 BSS = % 1,05			x = 98,6523 SS = 1,68 BSS = % 1,71
Karışım No	Tartrazin UV Sonuçları			Sunset Yellow UV Sonuçları		
	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım
1	0,8	0,8086	101,075	0,4	0,3942	98,5500
2	0,8	0,8070	100,875	0,4	0,4003	100,075
3	0,8	0,8010	100,125	0,4	0,3922	98,0500
4	0,8	0,8023	100,2875	0,4	0,3903	97,575
5	0,8	0,8065	100,8125	0,4	0,4043	101,075
6	0,8	0,8069	100,8625	0,4	0,4044	101,1
7	0,8	0,8034	100,425	0,4	0,4031	100,775
8	0,8	0,8001	100,0125	0,4	0,4042	101,05
9	0,8	0,8089	100,1125	0,4	0,4007	100,175
10	0,8	0,8052	100,650	0,8	0,7934	99,175
11	0,8	0,8032	100,400	1,2	1,1855	98,7917
12	0,8	0,8005	100,0625	1,6	1,6036	100,225
13	0,8	0,8043	100,5375	0,4	0,4003	100,075
14	1,6	1,5891	99,3188	0,4	0,4007	100,175
15	2,4	2,3964	99,4333	0,4	0,4003	100,075
16	3,2	3,2011	100,0344	0,4	0,4004	100,1
			x = 100,3765 SS = 0,53 BSS = % 0,53			x = 99,8151 SS = 1,08 BSS = % 1,08

#### **4.1.5.2. MLR yöntemi için ANOVA testi**

MLR kalibrasyon yönteminin doğruluk ve kesinliğini valide etmek için elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulanmıştır. Gruplar arası serbestlik derecesi=19, grup içi serbestlik derecesi=12 % 95 güven aralığında F-tablo değeri 2,31 olmasına karşılık karamel için hesaplanan F-test değeri 0,89 ve p-değeri 0,08 , allura red için hesaplanan F-test değeri 0,90 ve p-değeri 0,08 olarak, tartrazin için hesaplanan F-test değeri 1,23 ve p-değeri 0,08, sunset yellow için hesaplanan F-test değeri 1,31 ve p-değeri 0,07 bulunmuştur.

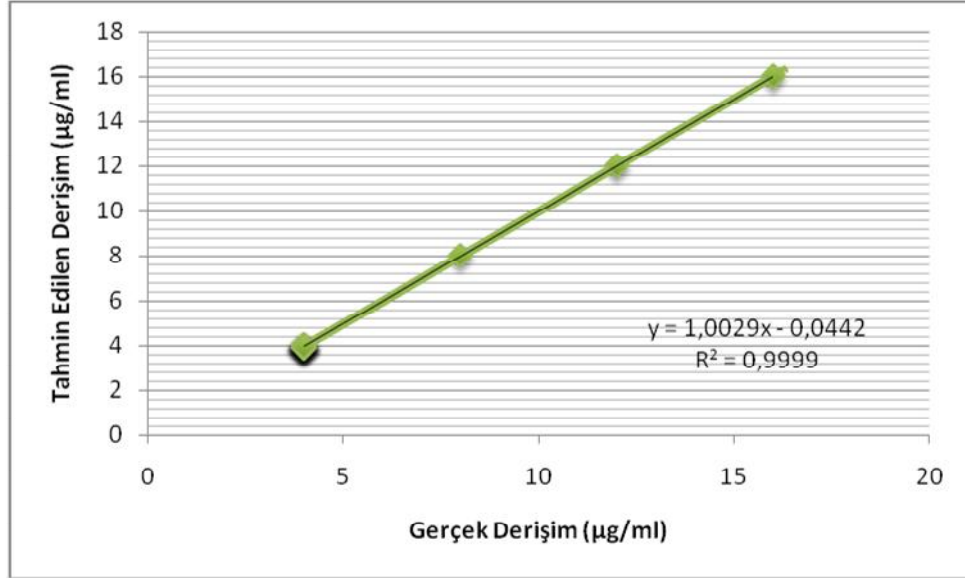
ANOVA testinde  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  ve  $p > 0,05$  olduğu için % 95 güven aralığında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Varyans analizinde iki serbestlik derecesi kullanılır. Gruplar arası serbestlik derecesi=19 Grup içi serbestlik derecesi=12.  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  ve  $p > 0,05$  olduğu için bu kalibrasyon modeli ticari numunenin incelenmesinde kullanılabilir olduğuna karar verilmiştir.

#### **4.1.5.3. MLR yönteminde istatistiksel analiz**

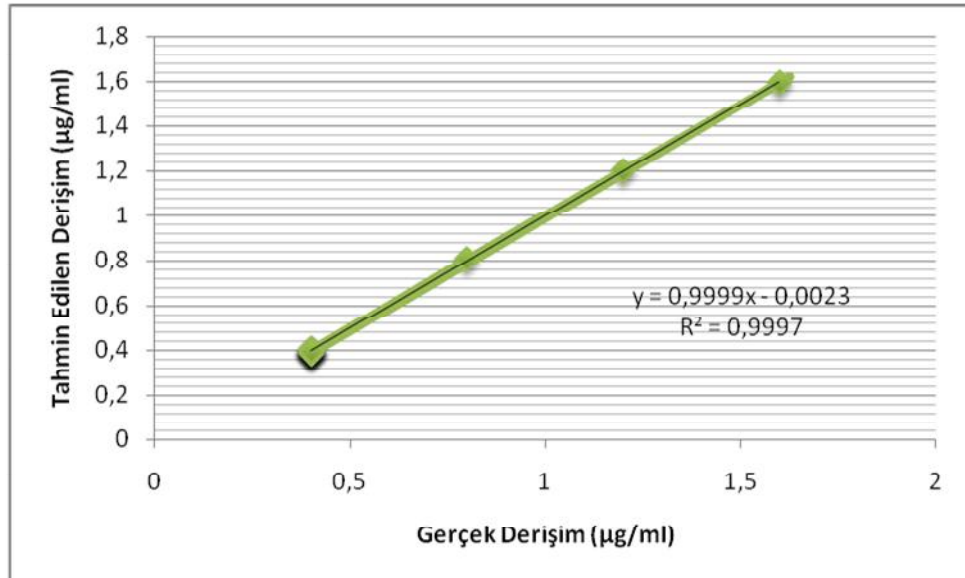
##### **4.1.5.3.a. Tahminsel kalıntısız hata (PRESS)**

Dört renk maddesini içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için MLR kalibrasyonun kurulmasında çapraz validasyon işleminde tahmin edilen hataların karelerinin toplamının (Predicted Residual Error Some of Squares → PRESS) minimal değerleri elde edilmiştir. Renk maddeleri için kurulan MLR kalibrasyonunda PRESS değeri karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow için sırasıyla 0,070; 0,102; 0,069; 0,054 olarak hesaplanmıştır . PRESS değerinin sıfıra yakın olması doğruluk derecesini arttırmaktadır. Elde edilen PRESS değerleri yeterince küçüktür.

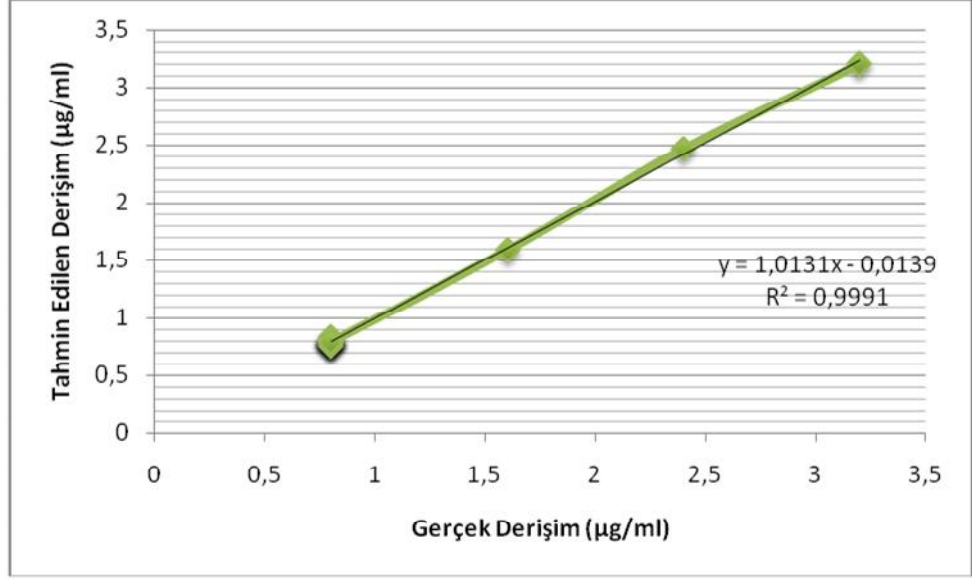




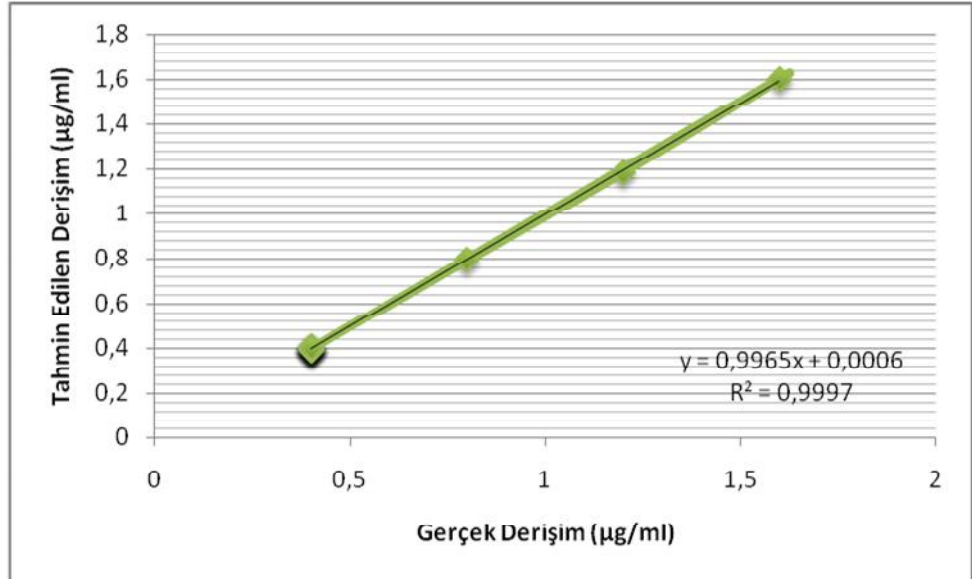
Şekil 4.18 MLR kalibrasyon basamağında karamel için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 4.19 MLR kalibrasyon basamağında allura red için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 4.20. MLR kalibrasyon basamağında tartrazin için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 4.21. MLR kalibrasyon basamağında sunset yellow için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar

#### 4.1.5.4. Çok değişkenli regresyon yönteminin ticari numuneye uygulanması

Ticari numunenin analizinde 260-560 dalga boyu bölgesinde  $\Delta\lambda= 0.1$  nm aralıklarla ölçülen absorbans değerlerine MLR algoritması uygulanmıştır ve içecek içeriğindeki renk maddeleri hesaplanmıştır.

Çizelge 4.8. Ticari numunede bulunan renk maddelerinin MLR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları

UV Metodu İle Elde Edilen Sonuçlar				
Numune No	Karamel ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Allura Red ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Tartrazin ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Sunset Yellow ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )
1	0,050	5,19	0,80	0,33
2	0,050	5,35	0,82	0,41
3	0,050	5,40	0,80	0,36
	$x = 0,050$	$x = 5,32$	$x = 0,81$	$x = 0,37$
	SS= 0,000	SS= 0,0016	SS= 0,0045	SS= 0,0022
	BSS: % 0,000	BSS: % 0,030	BSS: % 0,55	BSS: % 0,060
	GS= 0,05 $\pm$ 0,000	GS= 5,32 $\pm$ 0,00078	GS= 0,81 $\pm$ 0,0022	GS= 0,37 $\pm$ 0,0011

*GS % 95 Esas alınarak hesaplanmıştır.*

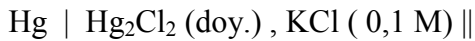
## 4.2. Potansiyometrik Yöntem

### 4.2.1. Elektrot kalibrasyonu

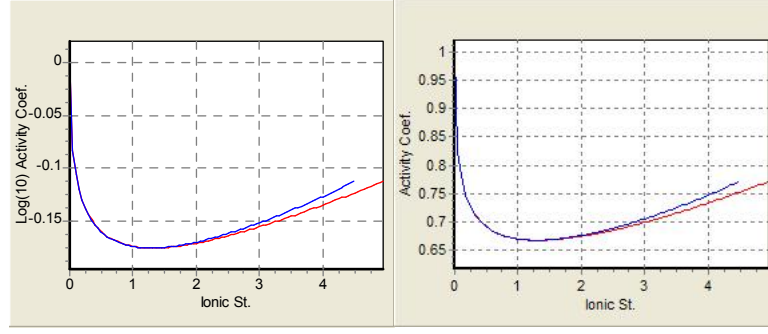
İlk olarak potansiyometrik ölçümlerin yer aldığı Gran metodu ile elektrot kalibrasyonu yapılır. Kalibrasyon, derişimi iyi bilinen güçlü bir asit (0,1 M HCl) çözeltisiyle iyonik şiddeti belli bir çözeltinin (0,1 M NaCl) titrasyonudur. Deney sonucunda kalibrasyon grafiğı çizilir.  $E^\circ$  değerleri hesaplanır. Kalibrasyon ve titrasyon süresince pH skalası yerine mV skalası kullanılır. Elektrot kalibrasyonunun yapılmasındaki amaç standart elektrot potansiyeli olan  $E^\circ$  değerinin bulunmasıdır. Standart elektrot potansiyeli ; sıvı temas potansiyeli, sınır potansiyeli, asimetri potansiyeli, aktivite katsayısı kavramlarını kapsar. Bu kavramalar ne teorik olarak ölçülebilir ne de doğrudan ölçülebilir. Bu büyüklükler hesaplanamadığından deneysel olarak bulunur. Bu işlem sonrasında elektrodun cevabı, analitin derişimi türünden değil , analit aktivitesi cinsinden olur. Aktivite terimi (a) ; bir dengede yer alan türlerin belirli bir iyonik şiddetteki etkin derişimini kantitatif olarak ifade edilmesidir. İyonik şiddet ( $\mu$ ) ise ortama ilave edilen elektrolitin denge üzerine yaptığı etkinin ifadesidir.

$$a_x = \gamma_x [X] \quad \gamma: \text{Aktivite katsayısı}$$

Dikkat edilmesi gereken nokta kalibrasyonda kullanılan titrant ve analitin iyonik şiddetlerinin eşit olması gerekir. Çünkü ;  $E^\circ$  , sıvı temas potansiyeline bağlıdır. Sıvı temas potansiyeli sabit kabul edilir. Eğer elektrot dolgu çözeltisi ile ortamın iyonik şiddeti farklı olursa sıvı temas potansiyeli sabit olmaz. Bu çalışmada 0,1M NaCl çözeltisi ve kalomel elektrot kullanılmıştır. NaCl tek yüklü iyonlardan oluşan kuvvetli bir elektrolittir. Bu nedenle iyonik şiddeti , bu çözeltideki tuzun molar derişimi ile aynıdır. Kalomel elektrotun elektrot şeması ise şu şekildedir:



Çözeltide KCl ün molar derişimi 0,1 M dır. Her iki türün de molar derişimleri aynıdır. NaCl için iyonik şiddetin aktivite katsayısı ile değışimi şu şekildedir.



Şekil 4.22. NaCl için iyonik şiddetin aktivite katsayısı ile değişimi

HCl çözeltisinin hidrojen iyonu aktivitesi ( $a$ ) ve  $E^\circ$  değeri kullanarak pH şu şekilde hesaplanır.

$$E = E^\circ - 0,059 \log a_{H^+}$$

$$E = E^\circ - 0,059 \text{ pH}$$

$$\text{pH} = (E - E^\circ) / 0,059$$

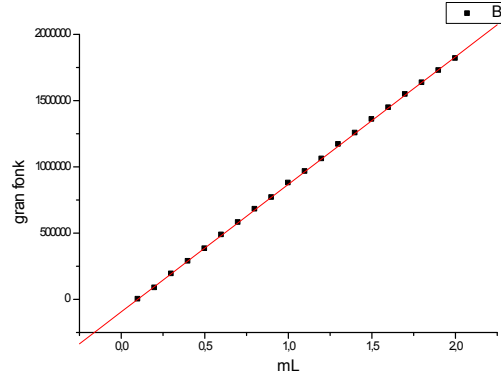
$E$  : Deney sırasında ölçülen mV değeridir.

Kalibrasyon sonuçları regresyon analizi ile değerlendirilir. Regresyon analizi, aralarında sebep – sonuç ilişkisi bulunan iki veya daha fazla değişken arasındaki ilişkiyi, o konu ile ilgili hesaplamalar ve değerlendirme yapabilmek amacıyla kullanılır. Kalibrasyon grafiklerinin eldesinde, noktalardan geçen en iyi doğru türetilir. Bu doğru en küçük kareler yöntemi ile incelenir. Bu yöntemle incelemek için bu doğruyu elde edebilecek bir eşitlik verilir.

$$Y = A + B * X$$

R:Korelasyon katsayısı

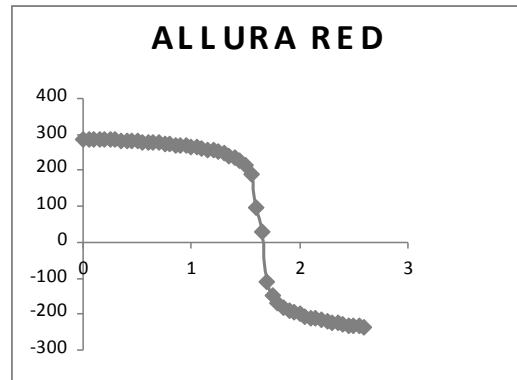
Bu doğruyu oluşturan eksenler arasında doğrusal bir ilişki olmalıdır. Bu yöntemle ayrıca korelasyon katsayısı hesaplanır. Kalibrasyonun doğruluğunun yeterli olup olmadığına karar vermede korelasyon katsayısına bakılır. Korelasyon katsayısı, değişkenlerin yönü ve etkileşimlerin nasıl olduğu hakkında bilgi verir. Korelasyon katsayısı  $0 < R \leq 1$  aralığında değişir. Elde edilen R değerlerinin özellikle  $\sim 0,999$  olması yeterlidir



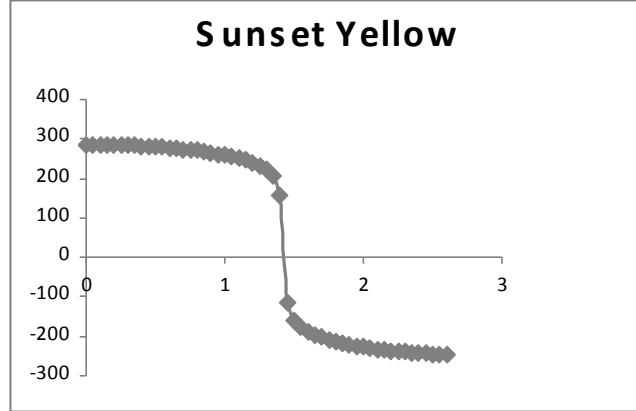
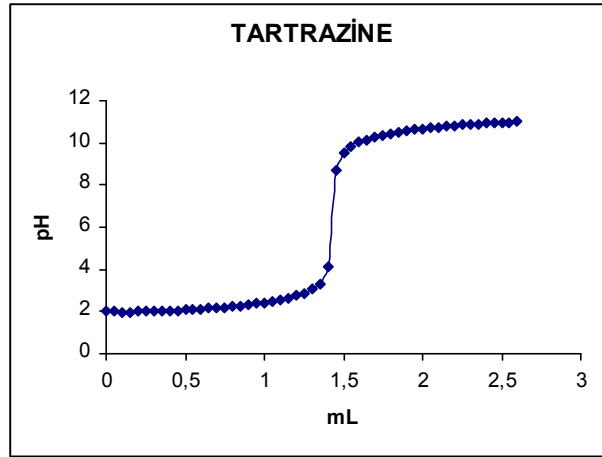
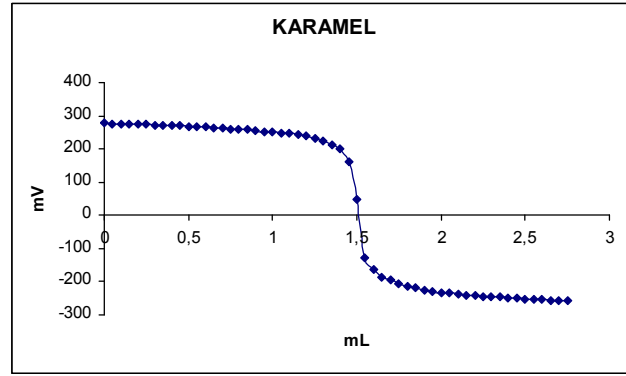
Şekil 4.23. Gran Fonsiyonu Grafiği.

Gran Metodu, titrasyon eğrilerinin çizimi tipik olarak okunan potansiyelin titrant hacmine karşı grafiğe alınmasıyla gerçekleştirildiği gibi, titrasyonda ortamda kalan analit derişimine ( $V_{tot} \cdot 10^E/g$ : Gran Fonksiyonu) karşı grafiğe alınmasıyla incelenen metottur. Yukarıdaki şekilde Gran Fonksiyonuna ait bir grafik görülmektedir.

Daha sonraki işlemdede elektrot kalibrasyonundan sonra kalibrasyon çözeltilisine standart numune çözeltilisi ilave edildi. Sonra 0,01 mL aralıklarla 0,01 M NaOH ilavesi yapılmıştır. Standart numune olarak önce her bir maddenin saf bileşenleri eklenmiştir. Bunlara ait grafikler Şekil 4.24. de verilmiştir.



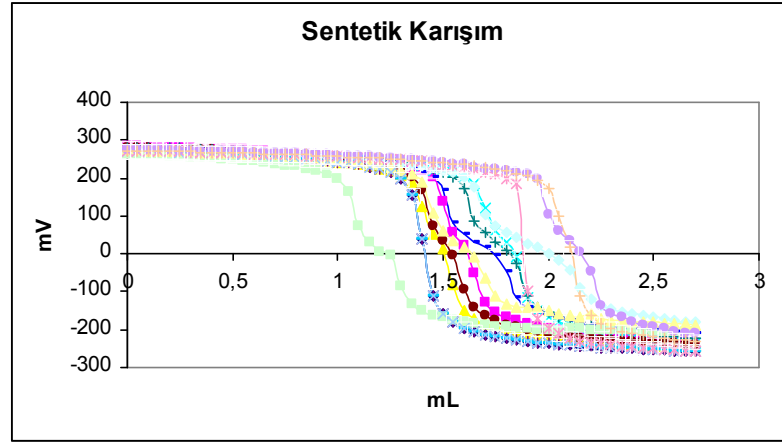
Şekil 4.24. Saf renk maddelerinin mV /pH-mL titrasyon eğrileri a)Allura Red  
b)Karamel c) Tartrazin d) Sunset Yellow



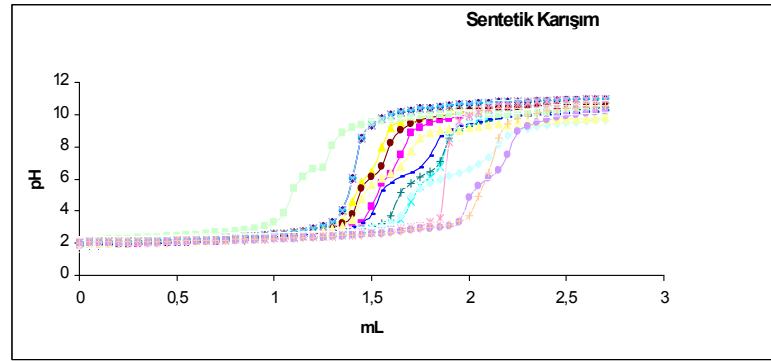
Şekil 4.24. Saf renk maddelerinin mV /pH-mL titrasyon eğrileri a)Allura Red b)Karamel c) Tartrazin d) Sunset Yellow (devam)

Saf renk maddelerinin tek tek titrasyonu yoluyla dönüm noktaları belirlenmiştir. Çünkü bu renk maddeleri tayin edilecek ticari numunede yer almaktadır.

Daha sonra her bir saf maddeden uygun bir derişim seti hazırlanmıştır. Oluşan sentetik karışımların baza karşı titrasyonu yapılmıştır.



Şekil 4.25. Hazırlanan sentetik karışımın titrasyon eğrisi (mV-mL)



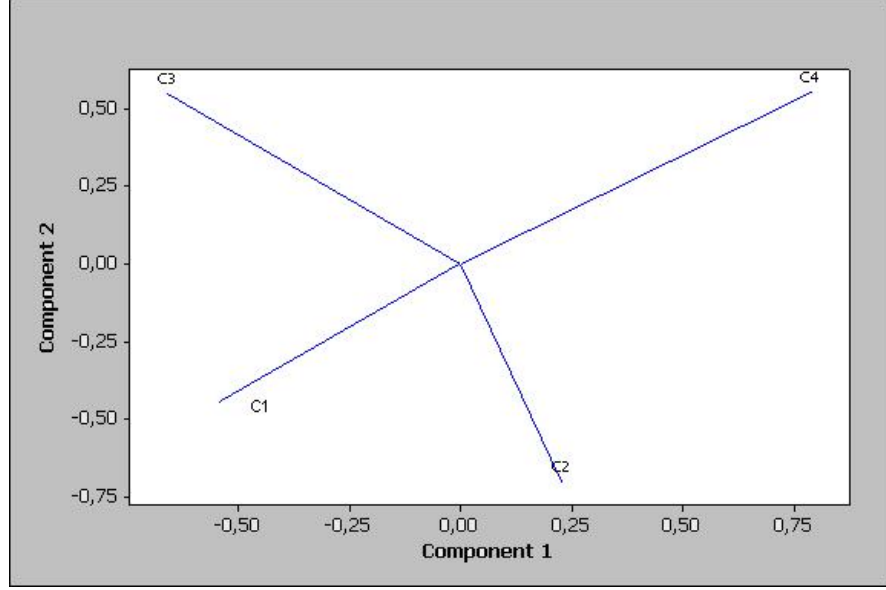
Şekil 4.26. Hazırlanan sentetik karışımın titrasyon eğrisi (pH-mL)

Kemometrik hesaplamalar yapılırken ve kalibrasyon eşitlikleri türetilirken 0,6 mL ve 2,2 mL de ve arasında bulunan pH değerleri alınmıştır.

#### 4.2.2. Temel bileşen analizi (PCA)

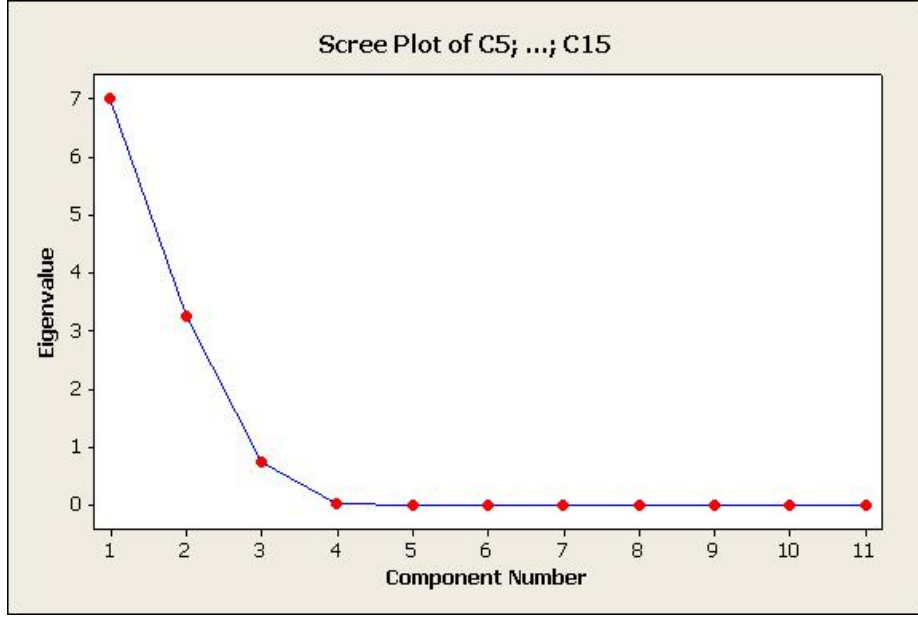
UV yönteminde olduğu gibi PLS, PCR tipi kemometrik hesaplamalara geçmeden önce programın kendi içinde ilk yaptığı işlem yine temel bileşen analizi yapmaktır. UV yönteminde belirtildiği gibi temel bileşen analizi uygulanmasının amaçları, bir orijinal değişkeni temsil eden n sayıda orijinal aksı (doğruyu) yeni akslar haline dönüştürmektir. Şekil 4. 27' de oluşturulan akslar görülmektedir.





Şekil 4.27. Değişkenlerin doğrusal bileşenleri

Şekil 4.27. e bakıldığında programa yüklenen verilerden birinci temel aks ve ikinci temel aks üzerinden doğrusal bileşenler bulunmuştur. İşlemlerin doğruluğu ölçüsünde doğrusal bileşenler elde edilmiştir. Bu grafik varyans-kovaryans matrisinin elemanlarının orijinin merkezine olan büyük aks birinci temel bileşeni (C2) ve bu bileşene 90 °C lik açı ile ikinci temel bileşen (C3) uzanmaktadır. Şekil 4.28. de özdeğerlerin grafiği görülmektedir. Özdeğerlerin simetrik bir veri matrisinden çıkarılması kısmi en küçük kareler yöntemi ve temel bileşen analizi için önemlidir. Özdeğerler ve özvektörler elde edildikten sonra yapılacak işlem diğer kemometrik hesaplamalara geçiştir. Temel bileşen analizi ile elde edilen temel bileşenler yardımıyla oluşturulan korelasyon matrisi diğer kemometrik regresyonlara (PLS, PCR... ) ışık tutmaktadır.



Şekil 4.28. Kemometrik verilerden elde edilen özdeğerlerin grafiği

Şekil 4.28. de belirgin bir şekilde görüldüğü gibi özdeğerler 2. değerden 3. değere doğru düşmüştür. İlk iki faktör, toplam varyansın %99'undan daha fazla güvenilirdir.

#### 4.2.2.1. Kalibrasyon yönteminin validasyonu

Temel Bileşen Analizi için 0,4-16  $\mu\text{g} / \text{mL}$  doğrusal çalışma aralığında karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow içeren çözeltilerin standart serisi stok çözeltilerinden yararlanılarak hazırlanmıştır. Renk maddelerini içeren 16 adet yapay karışım çözeltilerinden ibaret olan bir kalibrasyon seti (Çizelge 4.2.) hazırlanmıştır. Önce saf maddelerle çalışılarak her bir bileşenin dönüm noktaları belirlenmiştir. Ölçümler 0-2,7 ml arasında yapılmıştır. Daha sonra aralık kalibrasyon seti için ve kullanılacak olan istatistik programı doğrultusunda titrant aralığı kemometrik hesaplamalar yapılırken ve kalibrasyon eşitlikleri türetilirken 0,6 mL ve 2,2 mL de ve arasında bulunan pH değerleri olarak daraltılmıştır.

#### 4.2.3. Kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS)

Kısmi en küçük kareler yönteminde Çizelge 4.2. göre hazırlanan kalibrasyon seti kullanılmıştır. Ölçümler 0,0-2,2 mL arasında yapılmıştır. Daha sonra aralık kalibrasyon seti için ve kullanılacak olan istatistik programı doğrultusunda 0,6-2,2 mL aralığında PLS kalibrasyon için hazırlanan kalibrasyon setinin mL aralığında

$\Delta\lambda= 0,05$  mL aralıklarla mV değerleri okunmuştur. Kullanılan istatistik program ile kalibrasyon setinin pH ve derişim değerlerinin varyans-kovaryans matrisleri hesaplanmıştır. Derişimler arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı PLS kalibrasyonu kuruldu. Karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow içeren karışımların yukarıda belirtilen mL/pH değerleri okunarak PLS kalibrasyonunda bu renk maddelerinin miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir.

#### **4.2.3.2. Kalibrasyon yönteminin validasyonu**

PLS yöntemini valide etmek amacıyla karamel için 4-16  $\mu\text{g/mL}$ , allura red için 0,4-1,6  $\mu\text{g/mL}$ , tartrazin için 0,8-3,2  $\mu\text{g/mL}$  ve sunset yellow için 0,4-1,6  $\mu\text{g/mL}$  çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı derişimlerde 16 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir set hazırlanmıştır. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan PLS kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edilmiştir. Geri kazanım (GK) değerleri; karamel için % 99,4411, allura red için % 99,4235, tartrazin için % 98,9494, sunset yellow için % 99,3190 olarak bulunmuştur. Bağıl standart sapma değerleri karamel için % 1,96, allura red için % 2,13, tartrazin için % 1,38, sunset yellow için % 0,85 olarak hesaplanmıştır. PLS kalibrasyon yönteminin sentetik karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar izelge 4.9. da gösterilmiştir.

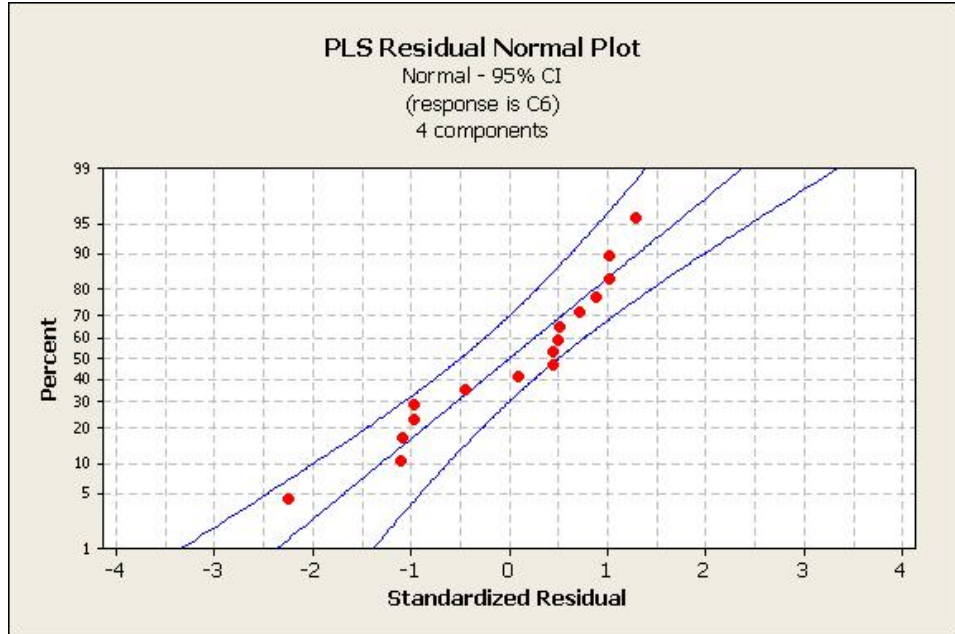
Çizelge 4.9. Sentetik olarak hazırlanan karışımındaki renk maddelerinin PLS kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları

Karışım No	Karamel Potansiyometri Sonuçları			Allura Red Potansiyometri Sonuçları		
	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım
1	4	3,9478	98,6950	0,4	0,3980	99,4925
2	8	7,9594	99,4925	0,4	0,4088	102,1900
3	12	12,3312	102,7600	0,4	0,3948	98,6900
4	16	15,8896	99,3100	0,4	0,4060	101,4975
5	4	3,9477	98,6925	0,4	0,3980	99,4925
6	4	3,9904	99,7600	0,8	0,8089	101,1063
7	4	3,8545	96,3625	1,2	1,2092	100,7683
8	4	3,8277	95,6925	1,6	1,5818	98,8606
9	4	3,9477	98,6925	0,4	0,3980	99,4925
10	4	3,9915	99,7875	0,4	0,4014	100,3500
11	4	4,0314	100,7850	0,4	0,3988	99,6975
12	4	4,0634	101,5850	0,4	0,3750	93,7475
13	4	3,9477	98,6925	0,4	0,3980	99,4925
14	4	3,9028	97,5700	0,4	0,4070	101,7350
15	4	4,0314	100,7850	0,4	0,3888	97,2000
16	4	4,0958	102,3950	0,4	0,3879	96,9625
			x =99,4411 SS = 1,95 BSS = %1,96			x = 99,4235 SS = 2,11 BSS = %2,13
Karışım No	Tartrazin Potansiyometri Sonuçları			Sunset Yellow Potansiyometri Sonuçları		
	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım
1	0,8	0,7891	98,6325	0,4	0,3951	98,775
2	0,8	0,7714	96,4200	0,4	0,3971	99,275
3	0,8	0,8021	100,2638	0,4	0,4000	100,00
4	0,8	0,8017	100,2075	0,4	0,4014	100,3425
5	0,8	0,7891	98,6325	0,4	0,3951	98,775
6	0,8	0,8020	100,2450	0,4	0,4003	100,075
7	0,8	0,7804	97,5488	0,4	0,3956	98,9
8	0,8	0,7711	96,3925	0,4	0,3922	98,06
9	0,8	0,7891	98,6325	0,4	0,3951	98,775
10	0,8	0,8051	100,6350	0,8	0,8044	100,5475
11	0,8	0,8029	100,3663	1,2	1,2013	100,1117
12	0,8	0,7823	97,7913	1,6	1,5889	99,305
13	0,8	0,7897	98,6325	0,4	0,3951	98,775
14	1,6	1,6005	100,0319	0,4	0,4024	100,6
15	2,4	2,3879	99,4967	0,4	0,3947	98,6825
16	3,2	3,1764	99,2613	0,4	0,3924	98,105
			x = 98,9494 SS = 1,37 BSS = % 1,38			x =99,3190 SS = 0,84 BSS = % 0,85

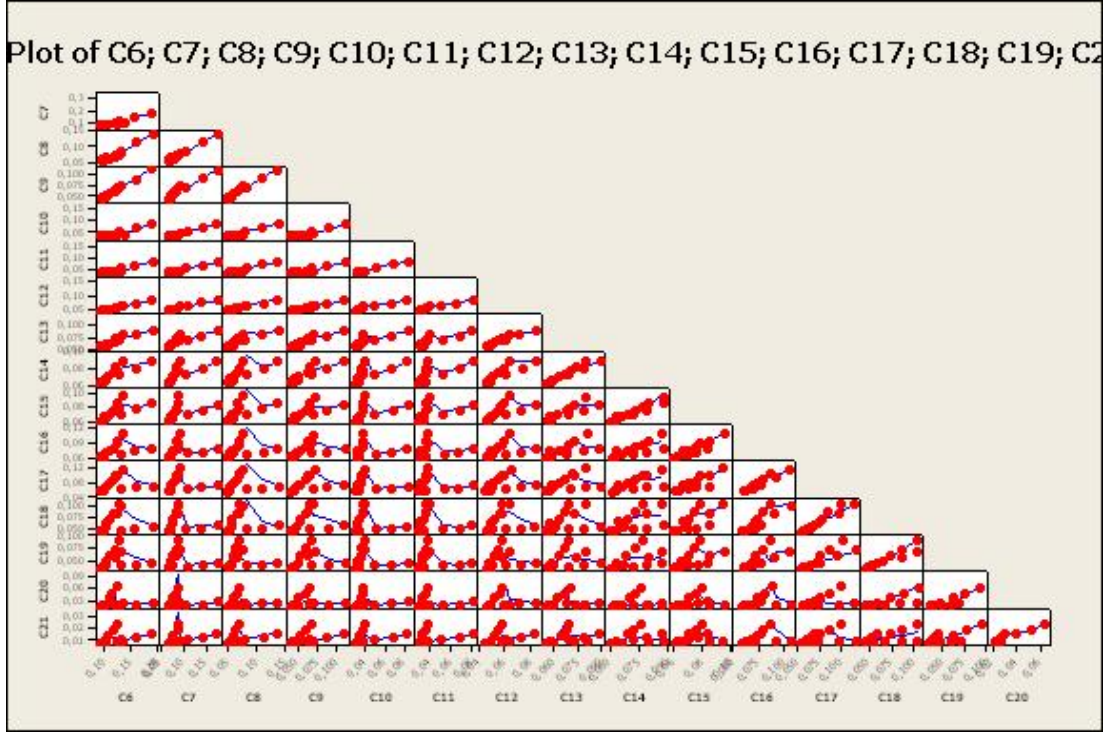
#### 4.2.3.3. PLS yöntemi için ANOVA testi

PLS kalibrasyon yönteminin doğruluk ve kesinliğini valide etmek için elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulandı. Gruplar arası serbestlik derecesi=19, grup içi serbestlik derecesi=12 % 95 güven aralığında F-tablo değeri 2,31 olmasına karşılık karamel için hesaplanan F-test değeri 0,91 ve p-değeri 0,7 , allura red için hesaplanan F-test değeri 1,87 ve p-değeri 0,08 olarak, tartrazin için hesaplanan F-test değeri 1,43 ve p-değeri 0,08, sunset yellow için hesaplanan F-test değeri 1,61 ve p-değeri 0,06 bulunmuştur.

ANOVA testinde  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  ve  $p\text{-değeri} > p=0,05$  olduğu için % 95 güven aralığında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Varyans analizinde iki serbestlik derecesi kullanılır. Gruplar arası serbestlik derecesi=19 Grup içi serbestlik derecesi=12 dir.  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  ve  $p\text{-değeri} > p=0,05$  olduğu için bu kalibrasyon modeli ticari numunenin incelenmesinde kullanılabilir olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 4.29. Atık değerlerinin dağılımı



Şekil 4.30. Kemometrik hesaplamalar esnasında oluşturulan matris

Kemometrik hesaplamalar esnasında elde edilen atık değerleri Şekil 4.29. de görülmektedir ve standart eğride dağılım göstermektedir.

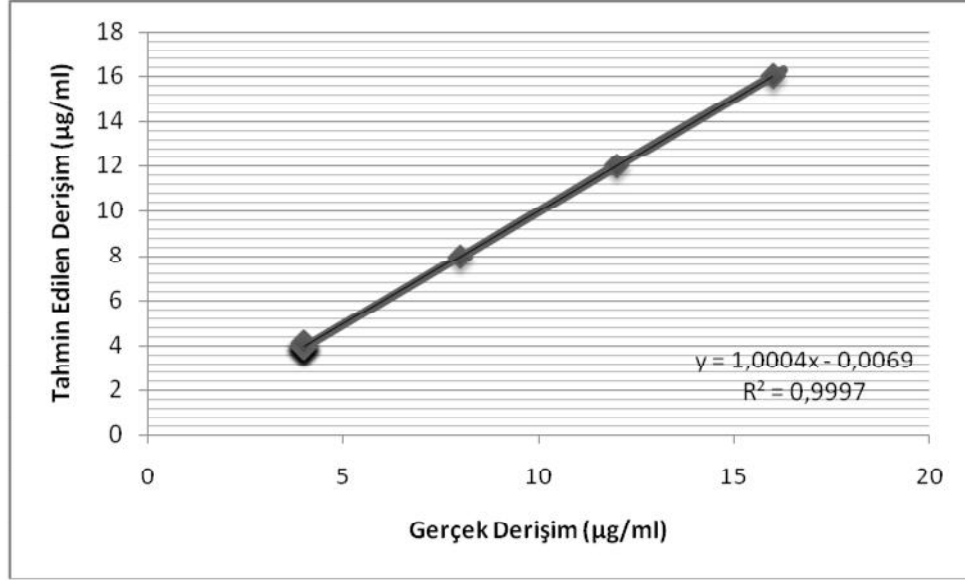
Hesaplamaların doğru ve güvenilir elde edilmesi için simetrik bir matris oluşturulması gerekmektedir. Şekil 4.30 da oluşturulan kare matrisin verilerle dağılımı görülmektedir.

#### 4.2.3.4. PLS yönteminde istatistiksel analiz

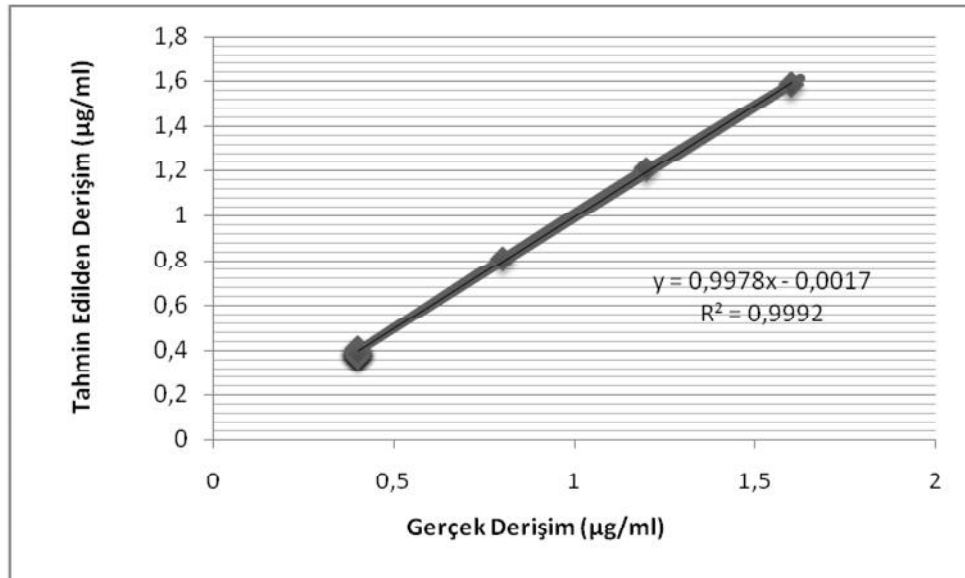
##### 4.2.3.4.a. Kalibrasyonun standart hatası

Dört renk maddesini içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için PLS kalibrasyonun kurulmasında çapraz validasyon işleminde tahmin edilen hataların karelerinin toplamının (Predicted Residual Error Some of Squares→ PRESS) minimal değerleri elde edilmiştir. Renk maddeleri için kurulan PLS kalibrasyonunda PRESS değeri karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow için için sırasıyla 0,080; 0,159; 0,034; 0,031 olarak hesaplanmıştır. PRESS değerinin sıfıra yakın olması doğruluk derecesini arttırmaktadır. Elde edilen PRESS değerleri yeterince

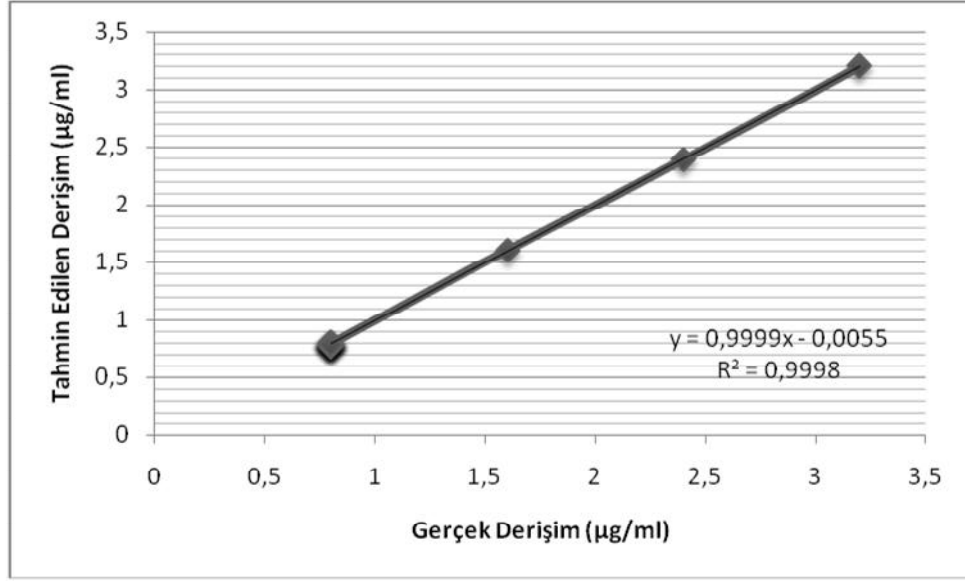
küçüktür. Kalibrasyonun standart hatası (Standard error of calibration →SEC), gerçek ve tahmin edilen derişim arasındaki ilişkiye dayalı olarak hesaplanmıştır ve karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow için sırasıyla 0,079585; 0,005578; 0,1008; 0,0868 olarak bulunmuştur.



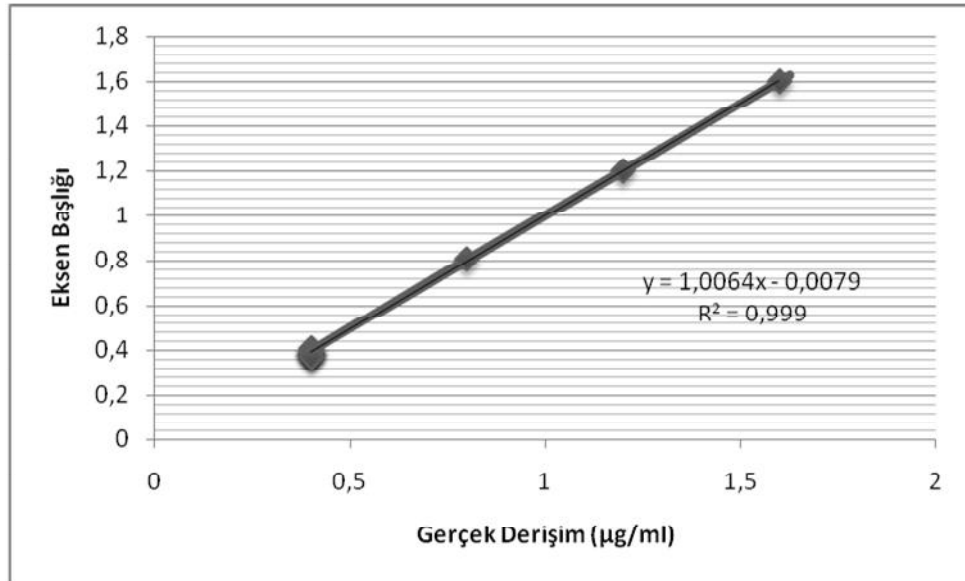
Şekil 4.31. PLS kalibrasyon basamağında karamel için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 4.32. PLS kalibrasyon basamağında allura red için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 4.33. PLS kalibrasyon basamağında tartrazin için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 4.34. PLS kalibrasyon basamağında sunset yellow için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar

Karamel, allura red, tartrazin, sunset yellow içeren karışımlarda bu maddelerin konulan ve hesaplanan verilerinden PLS kalibrasyonu için tayinin standart hatası (Standard Error of Prediction→SEP), değerleri karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow için sırasıyla 0,0785; 0,0053; 0,0610; 0,0560 olarak bulunmuştur.



#### 4.2.3.4. Kısmi en küçük kareler yönteminin ticari numuneye uygulanması

Ticari numuneyi analiz etmek amacıyla 0,6-2,2 mL aralığında  $\Delta\lambda = 0,05$  mL aralıklarla okunan mV değerleri PLS algoritmasına uygulanmıştır ve içecek içeriğindeki renk maddeleri hesaplanmıştır.

Çizelge 4.10. Ticari Numunede Bulunan Renk Maddelerinin PLS Kalibrasyonu İle Hesaplanan Sonuçları

Potansiyometri Metodu İle Elde Edilen Sonuçlar				
Numune No	Karamel ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Allura Red ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Tartrazin ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Sunset Yellow ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )
1	0,049	5,39	0,83	0,35
2	0,051	5,47	0,84	0,40
3	0,051	5,50	0,89	0,38
	$x = 0,050$	$x = 5,45$	$x = 0,85$	$x = 0,38$
	$SS = 1,41 \cdot 10^{-3}$	$SS = 0,057$	$SS = 0,032$	$SS = 0,025$
	BSS: % 2,82	BSS: %1,05	BSS: % 3,81	BSS: %6,71
	$GS = 0,05 \pm 1,60 \cdot 10^{-3}$	$GS = 5,45 \pm 0,064$	$GS = 0,85 \pm 0,036$	$GS = 0,38 \pm 0,028$

*GS % 95 Esas alınarak hesaplanmıştır.*

#### **4.2.4. Temel bileşen regresyonu yöntemi (PCR)**

PCR yöntemi kalibrasyon seti için ölçülen mV matrisinin parçalanmasıyla elde edilen temel bileşen regresyonuna dayalı bir yöntemdir. Yöntemin algoritması Bölüm 1.10.1.2. de ayrıntılı olarak verilmiştir.

PCR kalibrasyon için hazırlanan kalibrasyon setinin 0,6-2,2 mL aralığında  $\Delta\lambda= 0,1$  nm aralıklarla mV değerleri okunmuştur. Bölüm 1.10.1.2. de açıklanan PCR algoritmasına göre kalibrasyon setinin pH ve derişim değerlerinin varyans-kovaryans matrisleri hesaplanmıştır. Kalibrasyon seti için absorbansların varyans-kovaryans matrisinin dekompozisyon işlemine tabi tutulmasından sonra derişimler arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı PCR kalibrasyonu kurulmuştur. Renk maddelerini içeren karışımların yukarıda belirtilen eklenen titrant hacimlerindeki mV değerleri okunarak PCR kalibrasyonunda bu etken maddelerin miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir.

##### **4.2.4.1. Kalibrasyon yönteminin validasyonu**

PCR yöntemini valide etmek amacıyla karamel için 4-16  $\mu\text{g/mL}$ , allura red için 0,4-1,6  $\mu\text{g/mL}$ , tartrazin için 0,8-3,2  $\mu\text{g/mL}$  ve sunset yellow için 0,4-1,6  $\mu\text{g/mL}$  çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı derişimlerde 16 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir set hazırlanmıştır. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan PCR kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edilmiştir. Geri kazanım (GK) değerleri; karamel için % 100,288, allura red için % 99,4055 tartrazin için % 100,4751 sunset yellow için % 99,2810 olarak bulunmuştur. Bağlı standart sapma değerleri karamel için % 1,64 allura red için % 1,47 tartrazin için % 1,11 sunset yellow için %1,14 olarak hesaplanmıştır. PCR kalibrasyon yönteminin sentetik karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4.11. de gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. Sentetik olarak hazırlanan karışımındaki renk maddelerinin PCR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları

Karışım No	Karamel Potansiyometri Sonuçları			Allura Red Potansiyometri Sonuçları		
	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım
1	4	4,0479	101,1975	0,4	0,4002	100,0500
2	8	8,0633	100,7913	0,4	0,3996	99,9000
3	12	12,1618	101,3483	0,4	0,3919	97,9750
4	16	15,9829	99,89313	0,4	0,4075	101,8750
5	4	4,0621	101,5525	0,4	0,3975	99,3750
6	4	4,046	101,15	0,8	0,8057	100,7125
7	4	4,0294	100,735	1,2	1,1964	99,7000
8	4	3,9847	99,6175	1,6	1,5836	98,9750
9	4	3,927	98,175	0,4	0,3927	98,1750
10	4	3,9802	99,505	0,4	0,4031	100,7750
11	4	4,0709	101,7725	0,4	0,3910	97,7500
12	4	4,1000	102,5	0,4	0,3995	99,8750
13	4	3,8994	97,485	0,4	0,3837	95,9250
14	4	4,0959	102,3975	0,4	0,4042	101,0500
15	4	3,9725	99,3125	0,4	0,3965	99,1250
16	4	3,887	97,175	0,4	0,3970	99,2500
			x = 100,288 SS = 1,64 BSS = % 1,64			x = 99,4055 SS = 1,46 BSS = % 1,47
Karışım No	Tartrazin Potansiyometri Sonuçları			Sunset Yellow Potansiyometri Sonuçları		
	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım
1	0,8	0,8042	100,525	0,4	0,3935	98,375
2	0,8	0,8095	101,1875	0,4	0,396	99,000
3	0,8	0,804	100,5	0,4	0,3984	99,6
4	0,8	0,8033	100,4125	0,4	0,4005	100,125
5	0,8	0,8098	101,225	0,4	0,3932	98,3
6	0,8	0,807	100,875	0,4	0,3908	97,7
7	0,8	0,83	103,75	0,4	0,4007	100,175
8	0,8	0,7941	99,2625	0,4	0,3964	99,1
9	0,8	0,8004	100,05	0,4	0,4089	102,225
10	0,8	0,8093	101,1625	0,8	0,7871	98,3875
11	0,8	0,8025	100,3125	1,2	1,2088	100,7333
12	0,8	0,7949	99,3625	1,6	1,5872	99,2
13	0,8	0,8009	100,1125	0,4	0,3963	99,075
14	1,6	1,5970	99,8125	0,4	0,3940	98,5
15	2,4	2,3717	99,208	0,4	0,3987	99,675
16	3,2	3,2074	100,2313	0,4	0,3933	98,325
			x = 100,4751 SS = 1,12 BSS = % 1,11			x = 99,2810 SS = 1,13 BSS = % 1,14

#### 4.2.4.2. PCR yöntemi için ANOVA testi

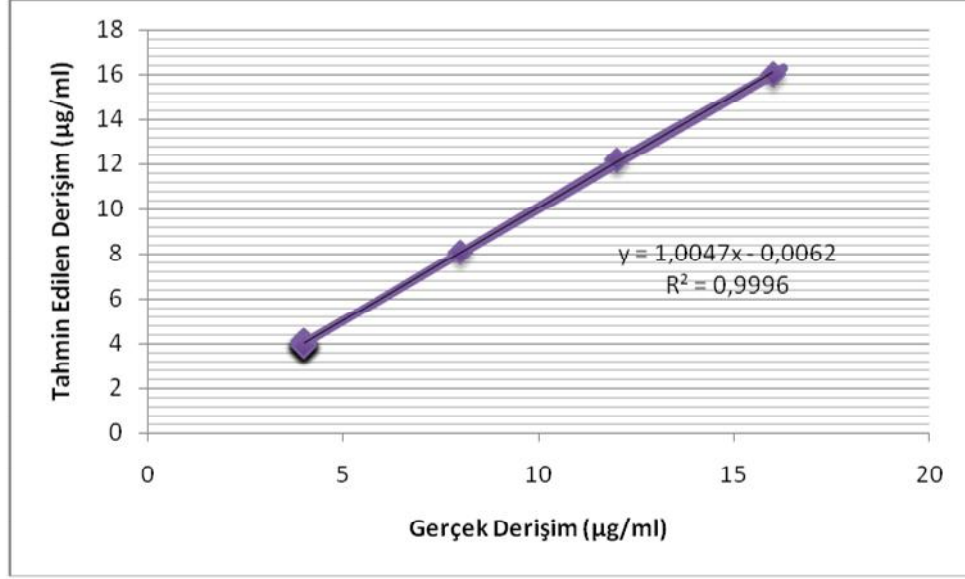
PCR kalibrasyon yönteminin doğruluk ve kesinliğini valide etmek amacıyla elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulanmıştır. Gruplar arası serbestlik derecesi=19, grup içi serbestlik derecesi=12 % 95 güven aralığında F-tablo değeri 2,31 olmasına karşılık karamel için hesaplanan F-test değeri 0,86 ve p-değeri 0,06, allura red için hesaplanan F-test değeri 1,78 ve p-değeri 0,08 olarak, tartrazin için hesaplanan F-test değeri 1,65 ve p-değeri 0,06 sunset yellow için hesaplanan F-test değeri 1,67 ve p-değeri 0,06 bulunmuştur.

ANOVA testinde  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  ve  $p > 0,05$  olduğu için % 95 güven aralığında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Varyans analizinde iki serbestlik derecesi kullanılır. Gruplar arası serbestlik derecesi=19 Grup içi serbestlik derecesi=12.  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  ve  $p > 0,05$  olduğu için bu kalibrasyon modeli ticari numunenin incelenmesinde kullanılabilir olduğuna karar verilmiştir.

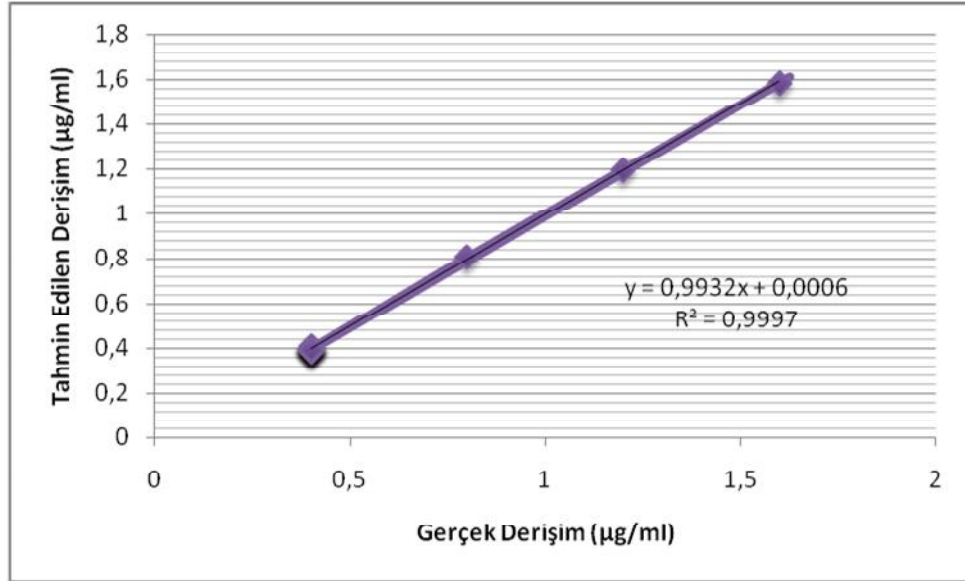
#### 4.2.4.3. PCR yönteminde istatistiksel analiz

##### 4.2.4.3.a. Kalibrasyonun standart hatası

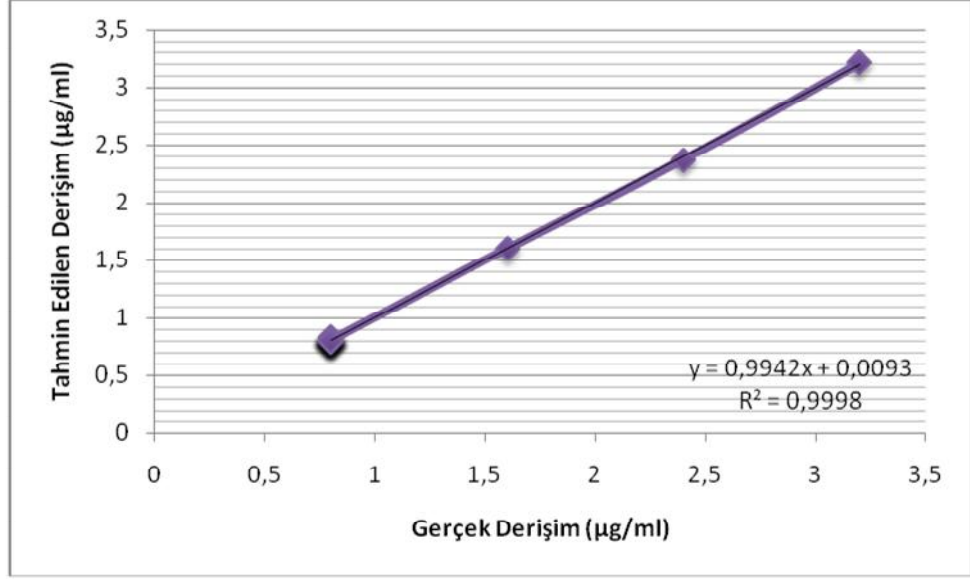
Dört renk maddesini içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için PCR kalibrasyonunun kurulmasında çapraz validasyon işleminde tahmin edilen hataların karelerinin toplamının (Predicted Residual Error Some of Squares → PRESS) minimal değerleri elde edilmiştir. Renk maddeleri için kurulan PCR kalibrasyonunda PRESS değeri karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow için sırasıyla 0,230; 0,102; 0,152; 0,057 olarak hesaplanmıştır. PRESS değerinin sıfıra yakın olması doğruluk derecesini arttırmaktadır. Elde edilen PRESS değerleri yeterince küçüktür. Kalibrasyonun standart hatası (Standard error of calibration → SEC), gerçek ve tahmin edilen derişim arasındaki ilişkiye dayalı olarak hesaplandı ve karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow için sırasıyla 0,00905; 0,0134; 0,00565; 0,00560 olarak bulunmuştur.



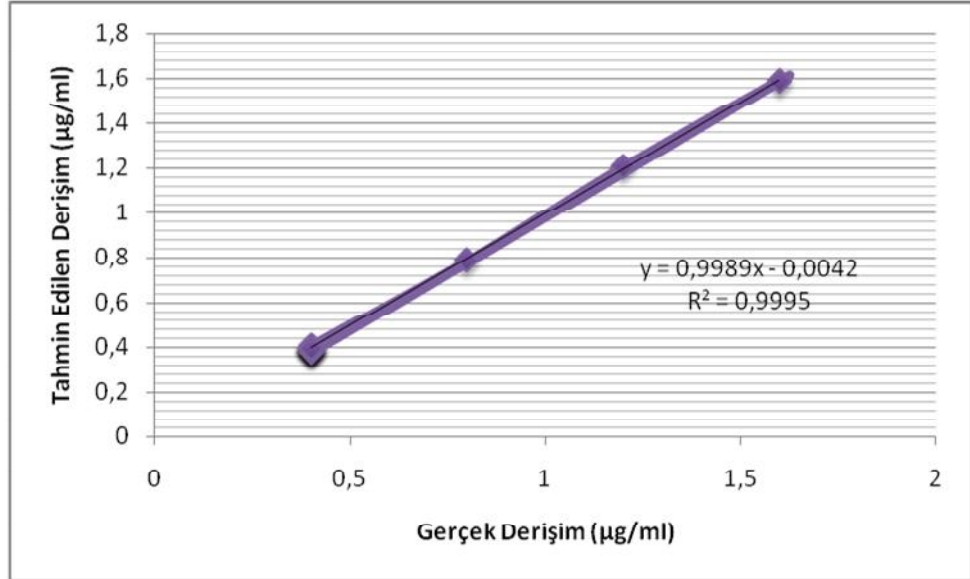
Şekil 4.35. PCR kalibrasyon basamağında karamel için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 4.36. PCR kalibrasyon basamağında allura red için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 4.37. PCR kalibrasyon basamağında tartrazin için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 4.38. PCR kalibrasyon basamağında sunset yellow için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar

Karamel, allura red, tartrazin, sunset yellow içeren karışımlarda bu maddelerin konulan ve hesaplanan verilerinden PCR kalibrasyonu için tayinin standart hatası (Standard Error of Prediction→SEP), değerleri karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow için sırasıyla 0,045; 0,0098; 0,036; 0,084 olarak bulunmuştur.

#### 4.2.4.4. Temel bileşen regresyon yönteminin ticari numuneye uygulanması

Ticari analiz numunesi için 0,6-2,2 mL aralığında  $\Delta\lambda= 0,05$  mL aralıklarla okunan mV değerleri PCR algoritmasına uygulandı ve içecek içeriğindeki renk maddeleri hesaplandı.

Çizelge 4.12. Ticari numunede bulunan renk maddelerinin PCR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları

Potansiyometri				
Metodu İle Elde Edilen Sonuçlar				
Numune No	Karamel ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Allura Red ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Tartrazin ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Sunset Yellow ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )
1	0,050	5,21	0,80	0,34
2	0,047	5,37	0,81	0,40
3	0,048	5,36	0,80	0,36
	$x = 0,048$	$x = 5,31$	$x = 0,80$	$x = 0,36$
	$SS = 1,58 \cdot 10^{-3}$	$SS = 0,089$	$SS = 7,07 \cdot 10^{-3}$	$SS = 0,031$
	BSS: % 3,29	BSS: % 1,69	BSS: % 0,88	BSS: % 0,087
	$GS = 0,05 \pm 1,78 \cdot 10^{-3}$	$GS = 5,32 \pm 0,100$	$GS = 0,82 \pm 1,8 \cdot 10^{-3}$	$GS = 0,36 \pm 0,035$

*GS % 95 Esas alınarak hesaplanmıştır.*

Aşağıda elde edilen eşitliklerde ters kalibrasyon yapılmıştır. Böylelikle hata en aza indirilmeye çalışılmıştır.

- Karamel için türetilen kalibrasyon eşitliği,

$$C_{\text{Karamel}} = - 28,7 + 275 \text{ pH}_1 - 856 \text{ pH}_2 + 437 \text{ pH}_3 + 452 \text{ pH}_4 - 334 \text{ pH}_5 + 153 \text{ pH}_6 - 14,3 \text{ pH}_7 - 110 \text{ pH}_8 + 11,8 \text{ pH}_9 - 1,14 \text{ pH}_{10} - 2,93 \text{ pH}_{11} + 5,69 \text{ pH}_{12}$$

- Allura Red için türetilen kalibrasyon eşitliği,

$$C_{\text{Allura Red}} = - 9,19 + 1,08 \text{ pH}_1 + 46,8 \text{ pH}_2 - 75,9 \text{ pH}_3 + 44,1 \text{ pH}_4 - 36,7 \text{ pH}_5 + 31,3 \text{ pH}_6 + 3,65 \text{ pH}_7 - 10,4 \text{ pH}_8 + 0,235 \text{ pH}_9 - 0,370 \text{ pH}_{10} + 0,766 \text{ pH}_{11} - 0,110 \text{ pH}_{12}$$

- Sunset Yellow için türetilen kalibrasyon eşitliği,

$$C_{\text{Sunset Yellow}} = - 4,24 - 22,0 \text{ pH}_1 + 35,0 \text{ pH}_2 - 4,50 \text{ pH}_3 + 2,98 \text{ pH}_4 - 10,2 \text{ pH}_5 - 6,56 \text{ pH}_6 + 3,41 \text{ pH}_7 + 5,17 \text{ pH}_8 - 1,61 \text{ pH}_9 + 0,706 \text{ pH}_{10} - 0,368 \text{ pH}_{11} + 0,0621 \text{ pH}_{12}$$

- Tartrazin için türetilen kalibrasyon eşitliği,

$$C_{\text{Tartrazin}} = 61,2 - 74,1 \text{ pH}_1 - 3,30 \text{ pH}_2 + 141 \text{ pH}_3 - 49,6 \text{ pH}_4 - 68,9 \text{ pH}_5 + 29,7 \text{ pH}_6 \\ + 9,44 \text{ pH}_7 - 12,1 \text{ pH}_8 + 0,421 \text{ pH}_9 + 1,06 \text{ pH}_{10} + 0,0259 \text{ pH}_{11} - 0,203 \text{ pH}_{12}$$

Derişimlerin bilinmediği ticari numune için, ticari numunenin titrasyonu ile elde edilen ilgili ml noktalarındaki pH değerleri yerine konularak gerekli derişimler elde edilir.

#### 4.2.5. Çok değişkenli regresyon yöntemi (MLR)

MLR yöntemi kalibrasyon seti için ölçülen absorbans matrisinin parçalanmasıyla elde edilen temel bileşen regresyonuna dayalı bir yöntemdir. Yöntemin algoritması Bölüm 1.10.1.4 de ayrıntılı olarak verilmiştir.

MLR kalibrasyon için hazırlanan kalibrasyon setinin 0,6-2,2 mL aralığında MLR kalibrasyon için hazırlanan kalibrasyon setinin mL aralığında  $\Delta\lambda = 0,05$  mL aralıklarla mV değerleri okunmuştur. Renk maddelerini içeren karışımların yukarıda belirtilen yukarıda belirtilen mL/pH değerleri okunarak MLR kalibrasyonunda bu renk maddelerinin miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir.

##### 4.2.5.1. Kalibrasyon yönteminin validasyonu

MLR yöntemini valide etmek amacıyla karamel için 4-16  $\mu\text{g/mL}$ , allura red için 0,4-1,6  $\mu\text{g/mL}$ , tartrazin için 0,8-3,2  $\mu\text{g/mL}$  ve sunset yellow için 0,4-1,6  $\mu\text{g/mL}$  çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı derişimlerde 16 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir set hazırlanmıştır. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan MLR kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edilmiştir. Geri kazanım (GK) değerleri; karamel için % 99,4861 allura red için % 99,0044 tartrazin için % 100,5346 ve sunset yellow için % 100,0682 olarak bulunmuştur. Bağlı standart sapma değerleri karamel için % 0,89 allura red için % 1,69 tartrazin için % 0,52 ve sunset yellow için % 1,10 olarak hesaplanmıştır. MLR kalibrasyon



yönteminin sentetik karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4.13. de gösterilmiştir.

Çizelge 4.13. Sentetik olarak hazırlanan karışımındaki renk maddelerinin MLR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları

Karışım No	Karamel Potansiyometri Sonuçları			Allura Red Potansiyometri Sonuçları		
	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım
1	4	4,0013	100,0325	0,4	0,3928	98,200
2	8	8,0017	100,0213	0,4	0,3937	98,425
3	12	12,0023	100,0192	0,4	0,3937	98,425
4	16	15,988	99,9269	0,4	0,4052	101,3
5	4	3,9802	99,505	0,4	0,3908	97,7
6	4	4,0012	100,03	0,8	0,8053	100,6625
7	4	3,9913	99,2825	1,2	1,1848	98,733
8	4	3,9802	99,505	1,6	1,5752	98,45
9	4	3,9733	99,3325	0,4	0,3892	97,300
10	4	3,9113	97,7825	0,4	0,4093	102,325
11	4	4,0010	100,025	0,4	0,4030	100,750
12	4	4,0011	100,0275	0,4	0,4040	101,00
13	4	3,8773	96,9325	0,4	0,3901	97,525
14	4	4,0014	100,035	0,4	0,3928	98,200
15	4	3,9813	99,5325	0,4	0,3856	96,400
16	4	3,9712	99,28	0,4	0,3947	98,675
			x =99,4861 SS = 0,89 BSS =% 0,89			x = 99,0044 SS = 1,67 BSS = %1,69
Karışım No	Tartrazin Potansiyometri Sonuçları			Sunset Yellow Potansiyometri Sonuçları		
	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım
1	0,8	0,8098	101,225	0,4	0,3954	98,8375
2	0,8	0,8082	101,025	0,4	0,4015	100,363
3	0,8	0,8022	100,275	0,4	0,3935	98,337
4	0,8	0,8035	100,4375	0,4	0,3915	97,865
5	0,8	0,8077	100,9625	0,4	0,4055	101,365
6	0,8	0,8081	100,0125	0,4	0,4055	101,387
7	0,8	0,8046	100,575	0,4	0,4043	101,063
8	0,8	0,8013	100,1625	0,4	0,4054	101,338
9	0,8	0,8101	100,2625	0,4	0,4019	100,463
10	0,8	0,8064	100,800	0,8	0,7946	99,3190
11	0,8	0,8044	100,550	1,2	1,1867	98,8875
12	0,8	0,8017	100,2125	1,6	1,6048	100,297
13	0,8	0,8055	100,6875	0,4	0,4015	100,363
14	1,6	1,5903	99,3938	0,4	0,4019	100,463
15	2,4	2,3976	99,9000	0,4	0,4015	100,363
16	3,2	3,2023	100,0719	0,4	0,4016	100,388
			x = 100,5346 SS = 0,52 BSS =%0,52			x =100,0682 SS = 1,10 BSS =% 1,10

#### 4.2.5.2. MLR yöntemi için ANOVA testi

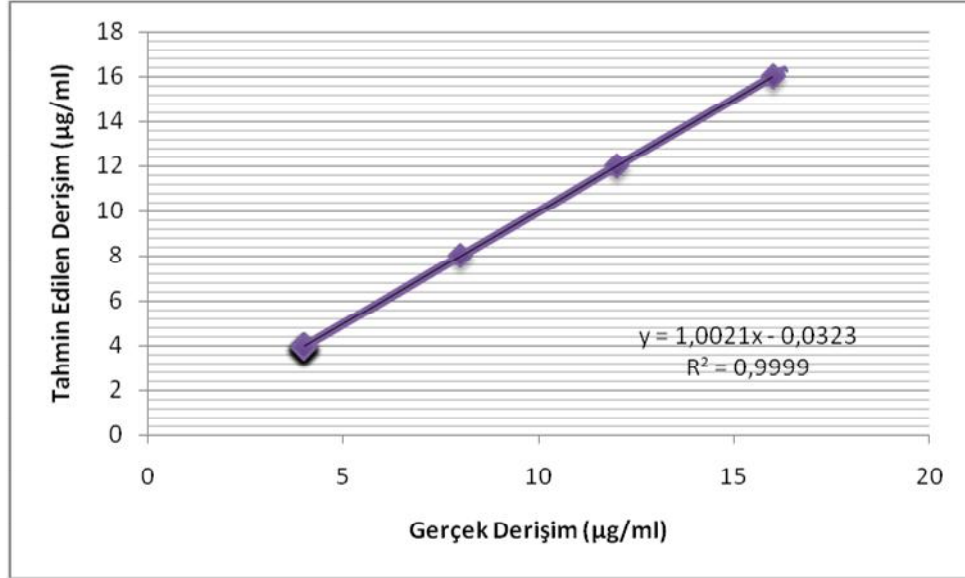
MLR kalibrasyon yönteminin doğruluk ve kesinliğini valide etmek amacıyla elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulanmıştır. Gruplar arası serbestlik derecesi=19, grup içi serbestlik derecesi=12 % 95 güven aralığında F-tablo değeri 2,31 olmasına karşılık karamel için hesaplanan F-test değeri 0,91 ve p-değeri 0,08 allura red için hesaplanan F-test değeri 0,88 ve p-değeri 0,06 olarak, tartrazin için hesaplanan F-test değeri 1,12 ve p-değeri 0,08, sunset yellow için hesaplanan F-test değeri 1,21 ve p-değeri 0,07 bulunmuştur.

ANOVA testinde  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  ve  $p\text{-değeri} > p=0,05$  olduğu için % 95 güven aralığında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Varyans analizinde iki serbestlik derecesi kullanılır. Gruplar arası serbestlik derecesi=19 Grup içi serbestlik derecesi=12 dir.  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  ve  $p\text{-değeri} > p=0,05$  olduğu için bu kalibrasyon modeli ticari numunenin incelenmesinde kullanılabilir olduğuna karar verilmiştir.

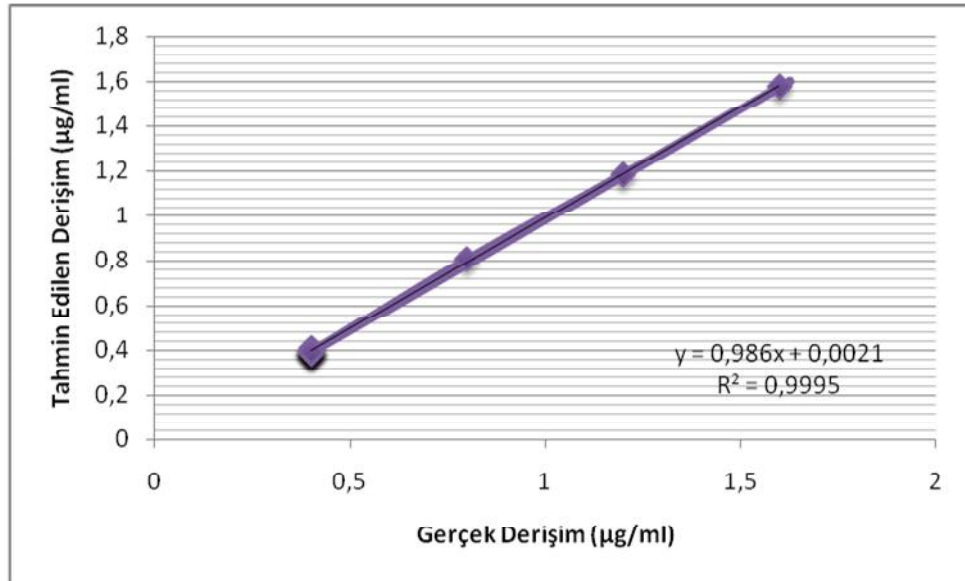
#### 4.2.5.3. MLR yönteminde istatistiksel analiz

##### 4.2.5.3.a. Tahminsel kalıntısız hata (PRESS)

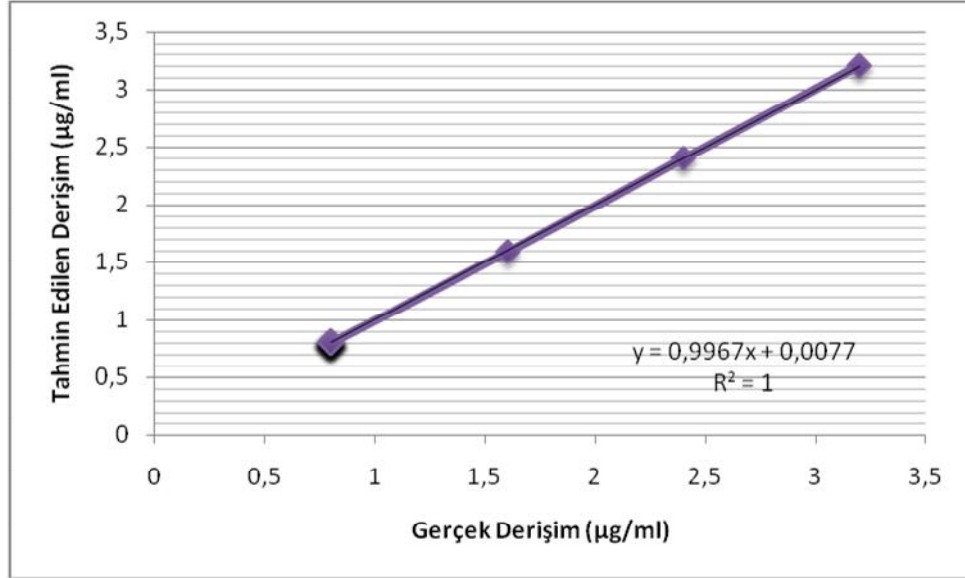
Dört renk maddesini içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için MLR kalibrasyonun kurulmasında çapraz validasyon işleminde tahmin edilen hataların karelerinin toplamının (Predicted Residual Error Some of Squares → PRESS) minimal değerleri elde edilmiştir. Renk maddeleri için kurulan MLR kalibrasyonunda PRESS değeri karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow için sırasıyla 0,051; 0,098; 0,054; 0,062 olarak hesaplanmıştır. PRESS değerinin sıfıra yakın olması doğruluk derecesini arttırmaktadır. Elde edilen PRESS değerleri yeterince küçüktür.



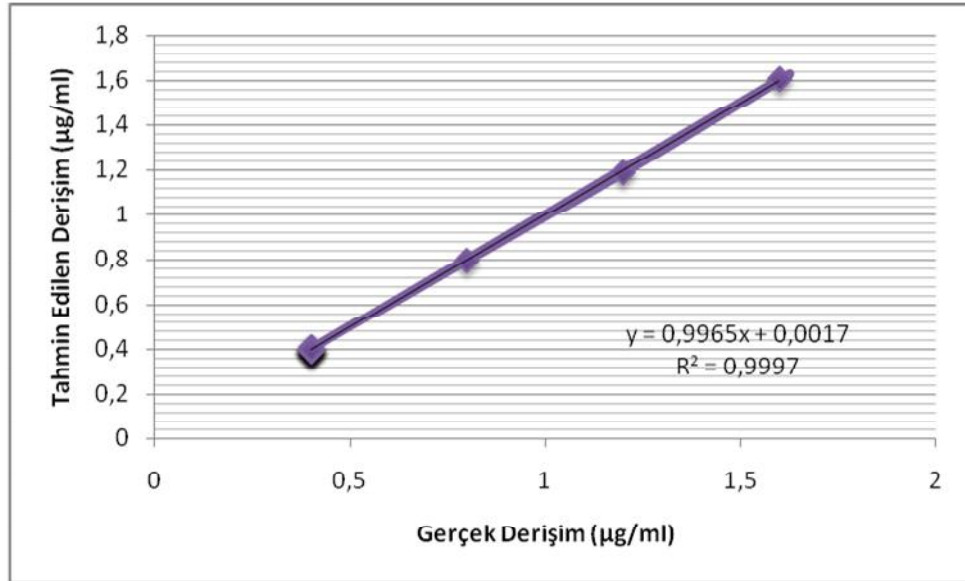
Şekil 4.39. MLR kalibrasyon basamağında karamel için gerçekte ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 4.40. MLR kalibrasyon basamağında allura red için gerçekte ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 4.41. MLR kalibrasyon basamağında tartrazin için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 4.42. MLR kalibrasyon basamağında sunset yellow için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar

#### 4.2.5.4. Çok değişkenli regresyon yönteminin ticari numuneye uygulanması

Ticari numune için 0,6-2,2 mL mL aralığında  $\Delta\lambda= 0,05$  mL aralıklarla okunan mV değerleri PLS algoritmasına uygulandı ve içecek içeriğindeki renk maddeleri hesaplanmıştır.

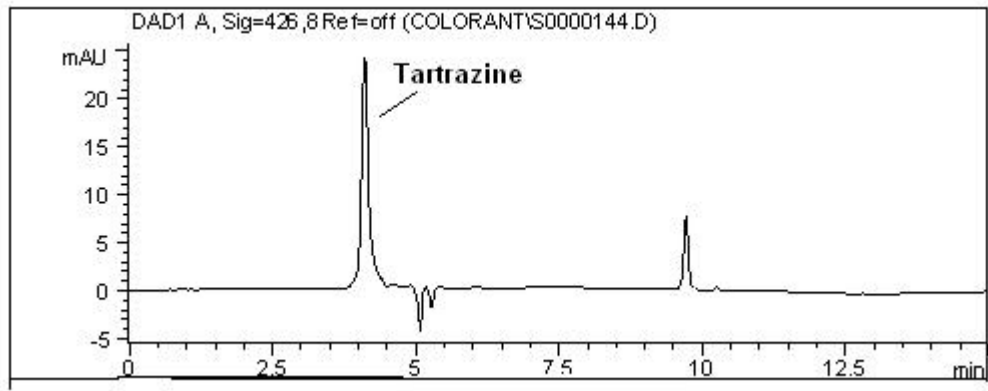
Çizelge 4.14. Ticari numunede bulunan renk maddelerinin MLR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları

Numune No	Potansiyometri Karamel ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Metodu İle Allura Red ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Elde Edilen Tartrazin ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Sonuçlar Sunset Yellow ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )
1	0,0512	5,191	0,8	0,32
2	0,05	5,361	0,81	0,37
3	0,051	5,399	0,81	0,4
	$x = 0,051$	$x = 5,32$	$x = 0,81$	$x = 0,37$
	SS= 0,00064	SS= 0,11	SS= 0,0058	SS= 0,0040
	BSS: % 1,25	BSS: % 2,06	BSS: % 0,72	BSS: % 1,08
	GS= 0,051 $\pm$ 7,24.10 <sup>-4</sup>	GS= 5,32 $\pm$ 0,124	GS= 0,81 $\pm$ 6,56.10 <sup>-3</sup>	GS= 0,37 $\pm$ 4,53.10 <sup>-3</sup>

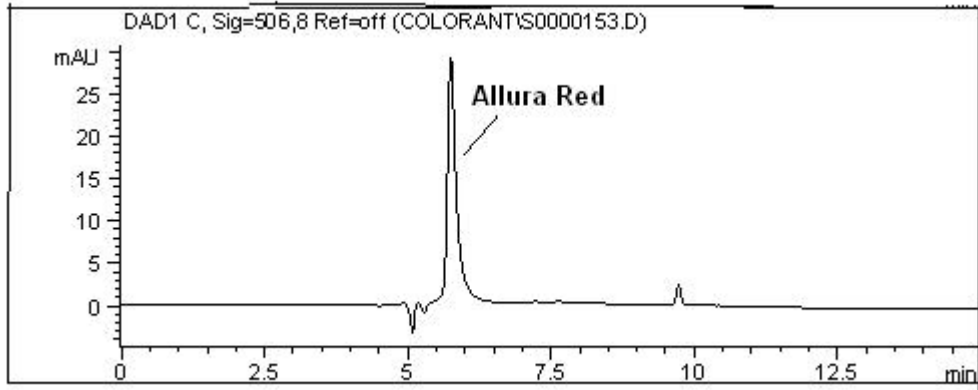
GS % 95 Esas alınarak hesaplanmıştır.

### 4.3. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC)

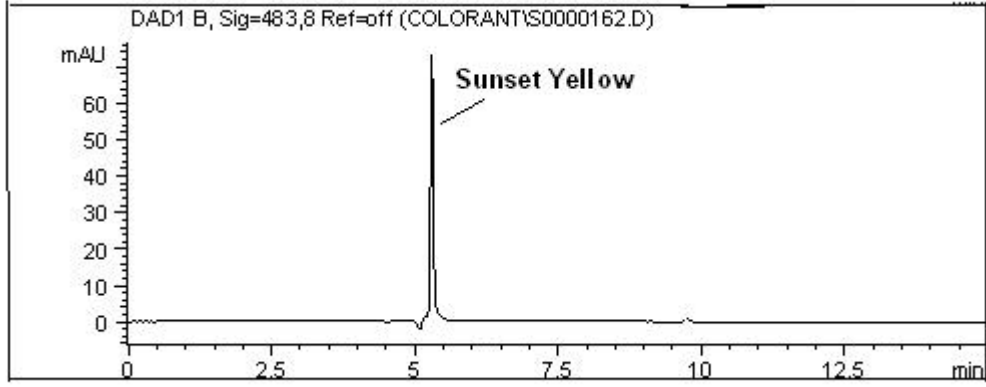
Renk maddelerinin standart çözeltileri verilen şartlarda 20 µL olarak kolona enjekte edilmiştir. Kullanılan DAD dalga boyları DAD1 A, Sig=465 nm, DAD1 B, Sig=470 nm, DAD1 C, Sig=475 nm, DAD1 D, Sig=480 nm, DAD1 E, Sig=485 nm dir. Karamelledeksiyon limitinin altında kaldığı için pik vermemiştir. Kemometrik HPLC analizi süresince, DAD dedektör varlığında 5 dalgaboyunda iç standart varlığında renk maddelerinin pik alanlarının oranı hesaplanmıştır. Saf renk maddelerinin kromatogramları ve kalibrasyon grafikleri alttaki şekillerde verilmiştir.



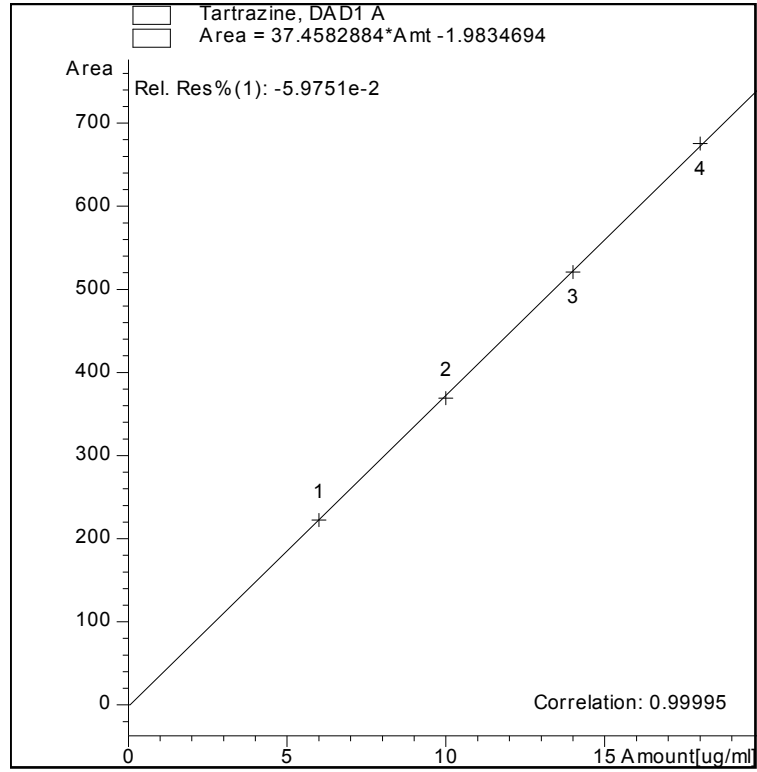
Şekil 4.43. Tartrazin maddesinin kromatogramı



Şekil 4.44. Allura red maddesinin kromatogramı

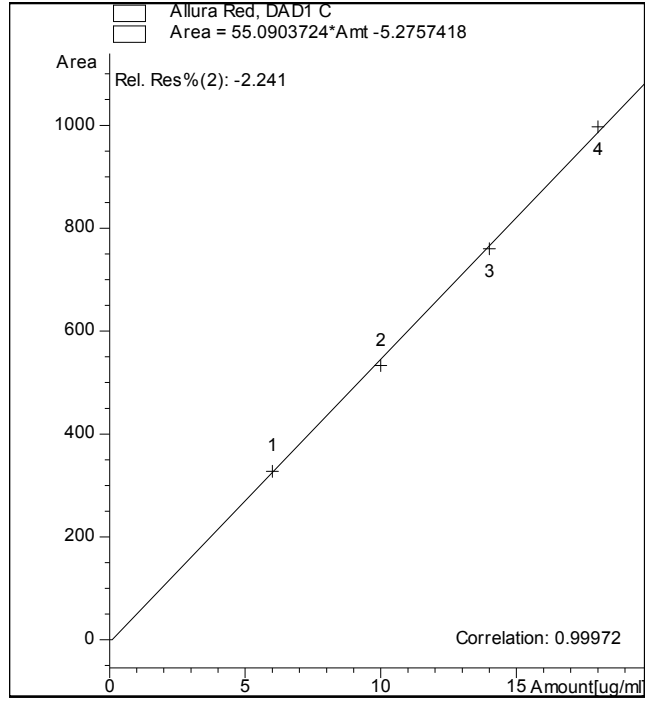


Şekil 4.45. Sunset yellow maddesinin kromatogramı

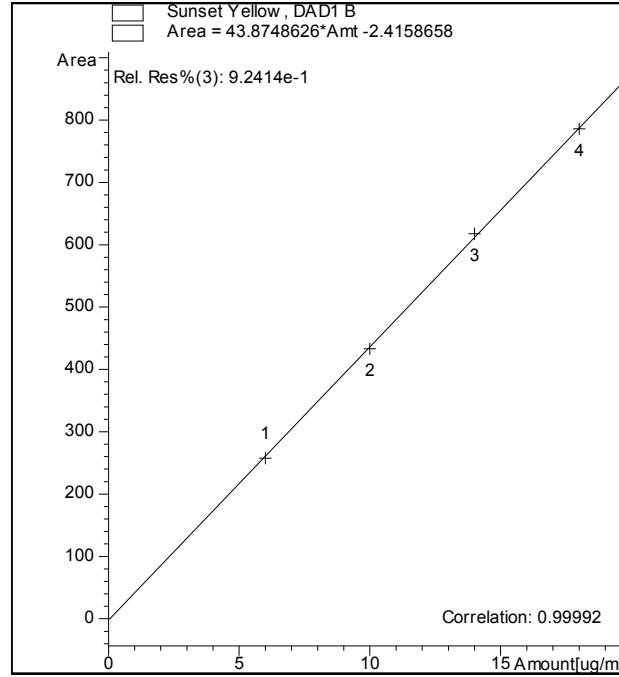


Şekil 4.46. Tartrazin maddesinin kalibrasyon grafiği



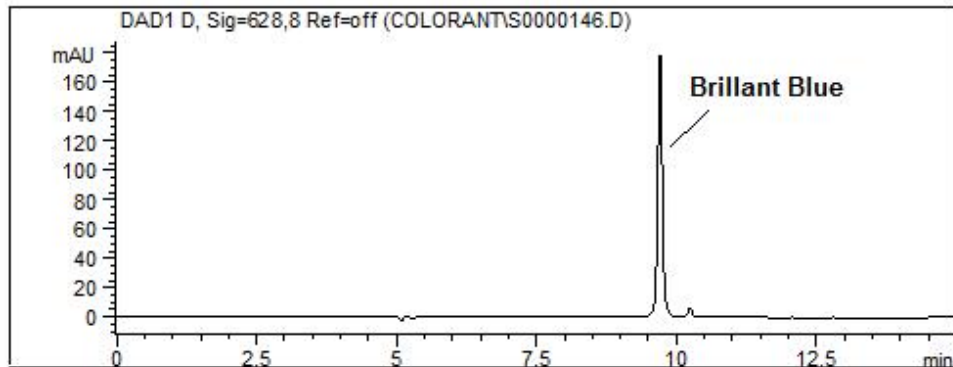


Şekil 4.47. Allura red maddesinin kalibrasyon grafiği



Şekil 4.48. Sunset yellow maddesinin kalibrasyon grafiği

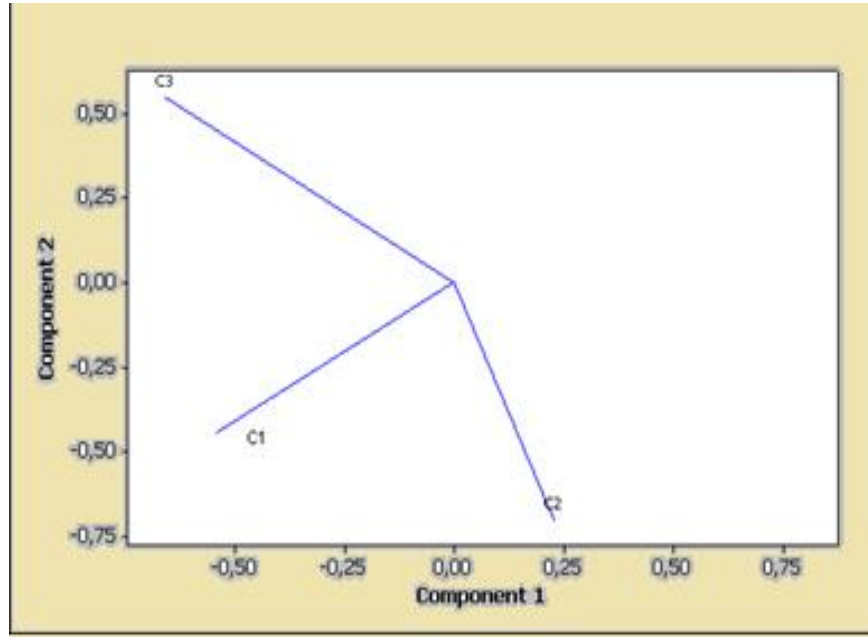
Kalibrasyon grafikleri incelendiğinde korelasyon katsayısı değerleri tartrazin için 0,99995 allura red için 0,99972 ve sunset yellow için 0,99992 dir. Bu değerler tek tek kromatogramları alınan renk maddelerinin pik alanı ve derişimleri arasında doğru bir bağıntı olduğunu gösterir. Bu çalışmada iç standart olarak brilliant blue kullanılmıştır. Her bir renk maddesinin pik alanı, IS (brilliant blue) 'ın pik alanına oranlanmıştır.



Şekil 4.49. İç standart (Brilliant blue) maddesinin kalibrasyon grafiği

#### 4.3.1. Temel bileşen analizi (PCA)

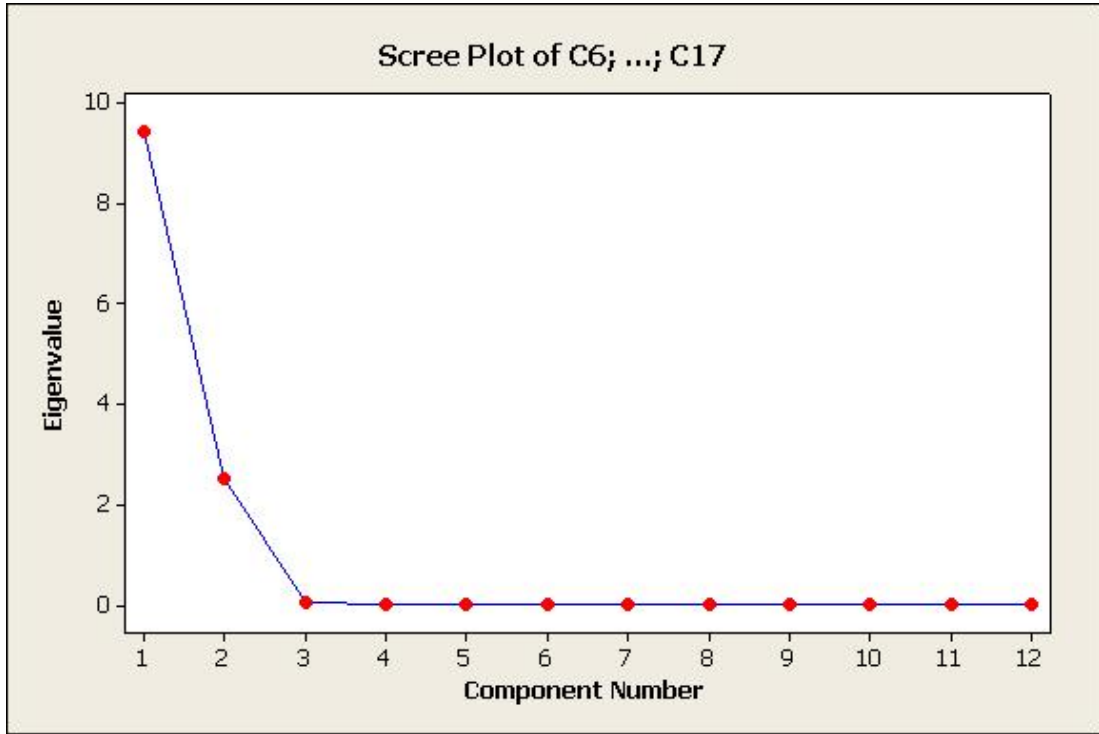
UV ve potansiyometri yöntemlerinde olduğu gibi PLS, PCR tipi kemometrik hesaplamalara geçmeden önce programın kendi içinde ilk yaptığı işlem yine temel bileşen analizi yapmaktır. Diğer yöntemlerde belirtildiği gibi temel bileşen analizi uygulanmasının amaçları, bir orijinal değişkeni temsil eden n sayıda orijinal aksı (doğruyu) yeni akslar haline dönüştürmektir. Şekil 4.50. de oluşturulan akslar görülmektedir.



Şekil 4.50. Değişkenlerin doğrusal bileşenleri

Şekil 4.50. e bakıldığında programa yüklenen verilerden birinci temel aks ve ikinci temel aks üzerinden doğrusal bileşenler bulunmuştur. İşlemlerin doğruluğu ölçüsünde doğrusal bileşenler elde edilmiştir. Bu grafik varyans-kovaryans matrisinin elemanlarının orijinin merkezine olan büyük aks birinci temel bileşeni (C2) ve bu bileşene 90 °C lik açı ile ikinci temel bileşen (C3) uzanmaktadır. Şekil 4.51. de özdeğerlerin grafiği görülmektedir. Özdeğerlerin simetrik bir veri matrisinden çıkarılması kısmi en küçük kareler yöntemi ve temel bileşen analizi için önemlidir. Özdeğerler ve özvektörler elde edildikten sonra yapılacak işlem diğer kemometrik hesaplamalara geçiştir. Temel bileşen analizi ile elde edilen temel

bileşenler yardımıyla oluşturulan korelasyon matrisi diğer kemometrik regresyonlara (PLS, PCR... ) ışık tutmaktadır.



Şekil 4.51. Kemometrik verilerden elde edilen özdeğerlerin grafiği

Şekil 4.51. de belirgin bir şekilde görüldüğü gibi özdeğerler 2. değerden 3. değere doğru düşmüştür. İlk iki faktör, toplam varyansın %99'undan daha fazla güvenilirdir.

#### 4.3.2. Kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS)

Kısmi en küçük kareler yönteminde Çizelge 4.2. göre hazırlanan kalibrasyon seti kullanılmıştır.

Derişimler arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı PLS kalibrasyonu kurulmuştur. Karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow içeren karışımların pik alanı değerleri belirlenerek PLS kalibrasyonunda bu renk maddelerinin miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir.

##### 4.3.2.1. Kalibrasyon yönteminin validasyonu

PLS yöntemini valide etmek için, allura red için 0,4-1,6 µg/mL, tartrazin için 0,8-3,2 µg/mL ve sunset yellow için 0,4-1,6 µg/mL çalışma aralığı içinde olacak şekilde

farklı derişimlerde 16 adet yapay karışım çözeltilisinden ibaret olan bir set hazırlanmıştır. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan PLS kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edilmiştir. Geri kazanım (GK) değerleri; allura red için % 98,9107 tartrazin için % 100,4751 ve sunset yellow için % 99,8231 olarak bulunmuştur. Bağıl standart sapma değerleri, allura red için % 2,14 tartrazin için % 1,12 ve sunset yellow için % 0,61 olarak hesaplanmıştır. PLS kalibrasyon yönteminin sentetik karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4.15. de gösterilmiştir.

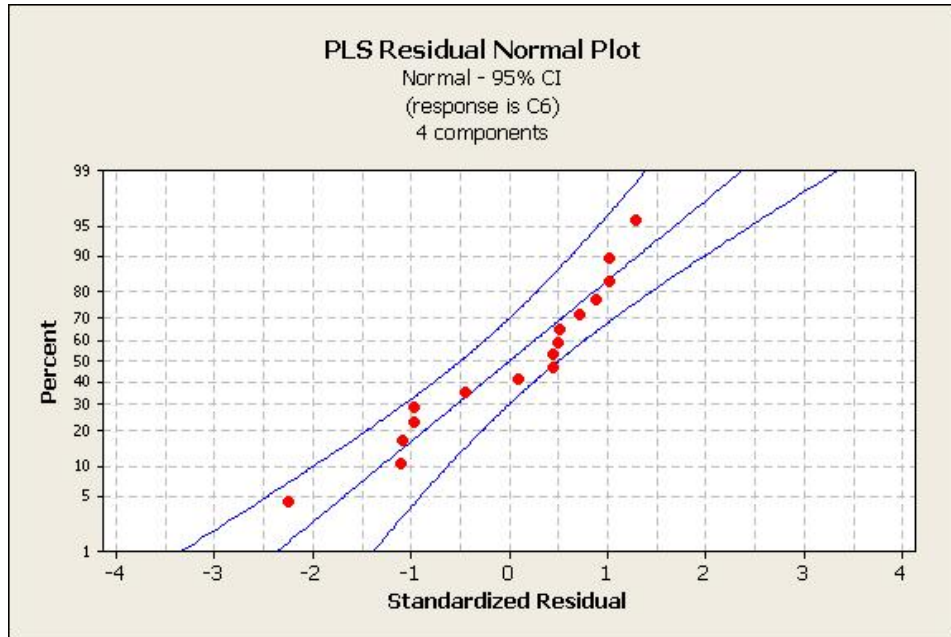
Çizelge 4.15. Sentetik olarak hazırlanan karışımındaki renk maddelerinin PLS kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları

Karışım No	Karamel HPLC Sonuçları			Allura Red HPLC Sonuçları		
	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım
1	4	-	-	0,4	0,4002	100,0500
2	8	-	-	0,4	0,3996	99,9000
3	12	-	-	0,4	0,3919	97,9750
4	16	-	-	0,4	0,4075	101,8750
5	4	-	-	0,4	0,3975	99,3750
6	4	-	-	0,8	0,8057	100,7125
7	4	-	-	1,2	1,1764	98,0333
8	4	-	-	1,6	1,5636	97,7250
9	4	-	-	0,4	0,3827	95,4250
10	4	-	-	0,4	0,4031	100,7750
11	4	-	-	0,4	0,3910	97,7500
12	4	-	-	0,4	0,3995	99,8750
13	4	-	-	0,4	0,3737	93,4250
14	4	-	-	0,4	0,4042	101,0500
15	4	-	-	0,4	0,3965	99,1250
16	4	-	-	0,4	0,3970	99,2500
			x = .... SS = ... BSS = ....			x = 98,9107 SS = 2,14 BSS = % 2,17
Karışım No	Tartrazin HPLC Sonuçları			Sunset Yellow HPLC Sonuçları		
	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım
1	0,8	0,8042	100,5250	0,4	0,3995	99,8750
2	0,8	0,8095	101,1875	0,4	0,3960	99,0000
3	0,8	0,8040	100,5000	0,4	0,3984	99,6000
4	0,8	0,8033	100,4125	0,4	0,4005	100,1250
5	0,8	0,8098	101,2250	0,4	0,3982	99,5500
6	0,8	0,8070	100,8750	0,4	0,3998	99,9500
7	0,8	0,8300	103,7500	0,4	0,4067	101,6750
8	0,8	0,7941	99,2625	0,4	0,3964	99,100
9	0,8	0,8004	100,0500	0,4	0,4000	100,00
10	0,8	0,8093	101,1625	0,8	0,8000	100,00
11	0,8	0,8025	100,3125	1,2	1,2000	100,00
12	0,8	0,7949	99,3625	1,6	1,5999	99,9938
13	0,8	0,8009	100,1125	0,4	0,3963	99,075
14	1,6	1,597	99,8125	0,4	0,3989	99,725
15	2,4	2,3717	98,8208	0,4	0,3987	99,675
16	3,2	3,2074	100,2313	0,4	0,3993	99,825
			x = 100,4751 SS = 1,12 BSS = 1,12			x = 99,8231 SS = 0,61 BSS = % 0,61

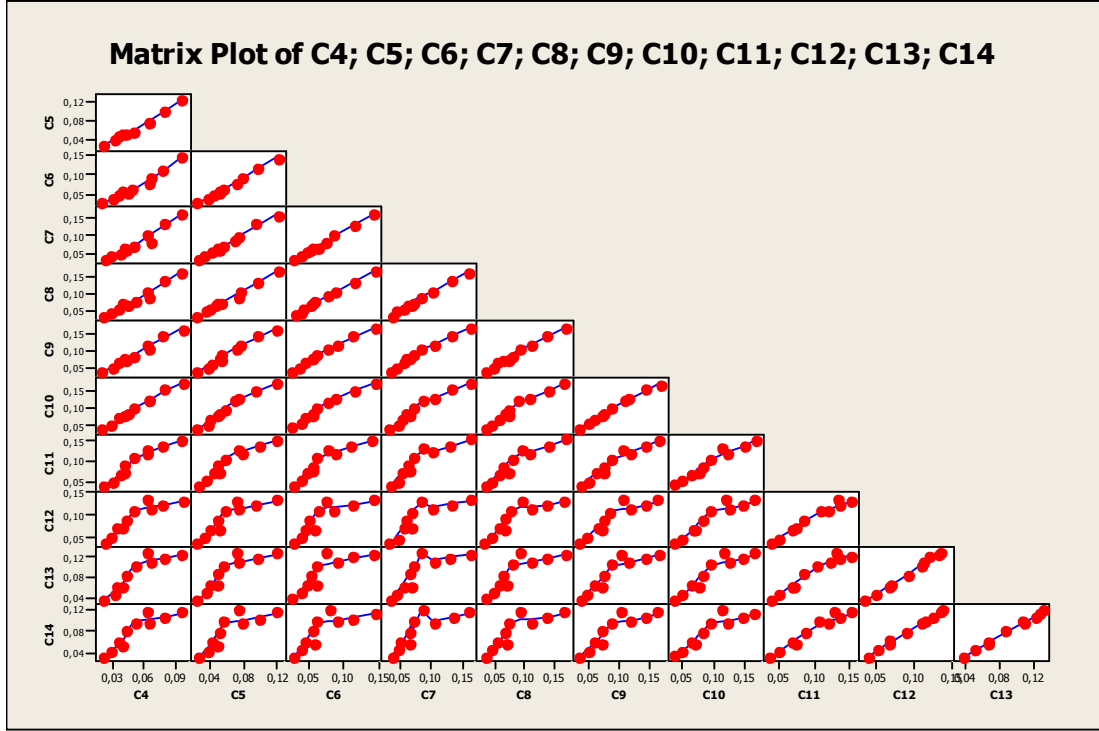
#### 4.3.2.2. PLS yöntemi için ANOVA testi

PLS kalibrasyon yönteminin doğruluk ve kesinliğini valide etmek amacıyla elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulandı. Gruplar arası serbestlik derecesi=19, grup içi serbestlik derecesi=12 % 95 güven aralığında F-tablo değeri 2,31 olmasına karşılık allura red için hesaplanan F-test değeri 1,75 ve p-değeri 0,08 olarak, tartrazin için hesaplanan F-test değeri 1,67 ve p-değeri 0,06, sunset yellow için hesaplanan F-test değeri 1,62 ve p-değeri 0,06 bulunmuştur.

ANOVA testinde  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  ve  $p\text{-değeri} > p=0,05$  olduğu için % 95 güven aralığında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Varyans analizinde iki serbestlik derecesi kullanılır. Gruplar arası serbestlik derecesi=19 Grup içi serbestlik derecesi=12 dir.  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  ve  $p\text{-değeri} > p=0,05$  olduğu için bu kalibrasyon modeli ticari numunenin incelenmesinde kullanılabilir olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 4.52. Atık değerlerinin dağılımı



Şekil 4.53. Kemometrik hesaplamalar esnasında oluşturulan matris

Kemometrik hesaplamalar esnasında elde edilen atık değerleri Şekil 4.52. de görülmektedir ve standart eğride dağılım göstermektedir.

Hesaplamaların doğru ve güvenilir elde edilmesi için simetrik bir matris oluşturulması gerekmektedir. Şekil 4.53. da oluşturulan kare matrisin verilerle dağılımı görülmektedir.

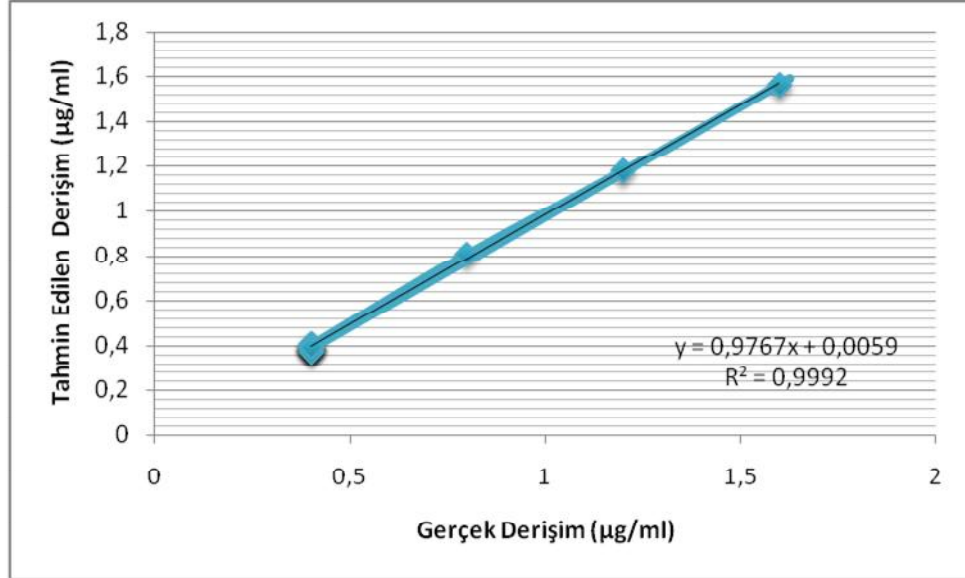
#### 4.3.2.3. PLS yönteminde istatistiksel analiz

##### 4.3.2.3.a. Kalibrasyonun standart hatası

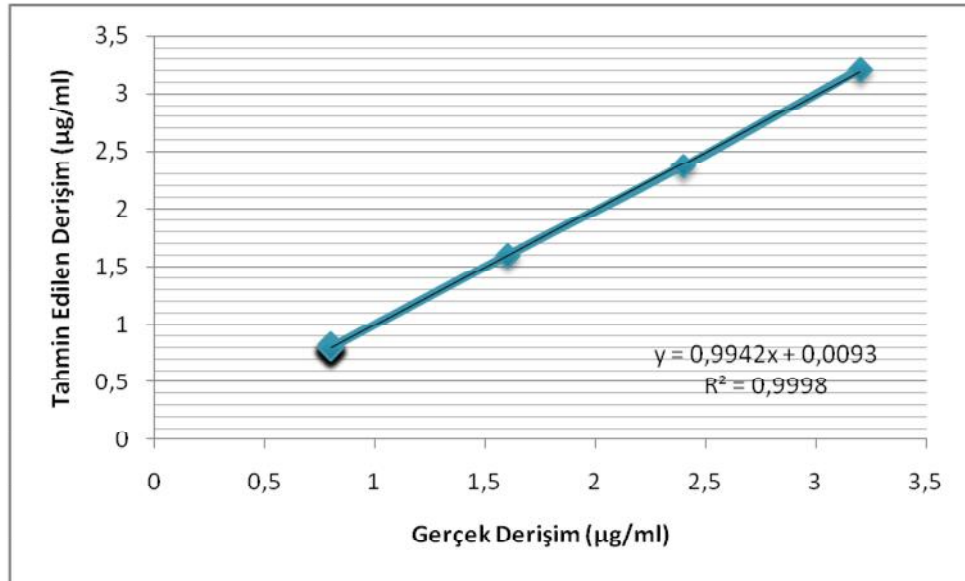
Dört renk maddesini içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için PLS kalibrasyonun kurulmasında çapraz validasyon işleminde tahmin edilen hataların karelerinin toplamının (Predicted Residual Error Some of Squares→ PRESS) minimal değerleri elde edilmiştir. Renk maddeleri için kurulan PLS kalibrasyonunda PRESS değeri allura red, tartrazin ve sunset yellow için sırasıyla 0,090; 0,078; 0,067 olarak hesaplanmıştır. PRESS değerinin sıfıra yakın olması doğruluk derecesini arttırmaktadır. Elde edilen PRESS değerleri yeterince küçüktür.



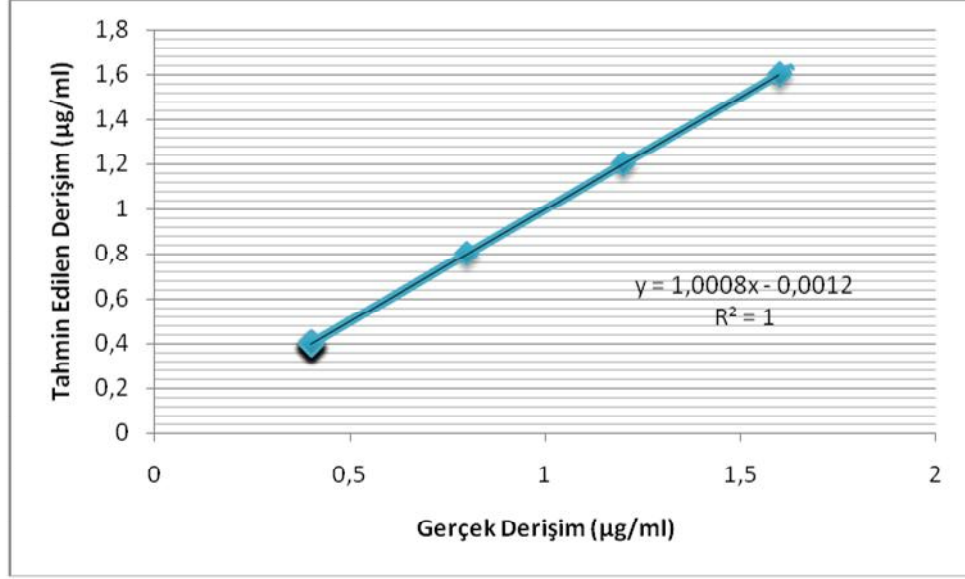
Kalibrasyonun standart hatası (Standard error of calibration →SEC), gerçek ve tahmin edilen derişim arasındaki ilişkiye dayalı olarak hesaplandı ve allura red, tartrazin ve sunset yellow için sırasıyla 0,08976; 0,0908; 0,0873 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.54. PLS kalibrasyon basamağında allura red için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 4.55. PLS kalibrasyon basamağında tartrazin için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 4.56. PLS kalibrasyon basamağında sunset yellow için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar

Karamel, allura red, tartrazin, sunset yellow içeren karışımlarda bu maddelerin konulan ve hesaplanan verilerinden PLS kalibrasyonu için tayinin standart hatası (Standard Error of Prediction→SEP), değerleri allura red, tartrazin ve sunset yellow için sırasıyla 0,0674; 0,0437; 0,0872; 0,0540 olarak bulunmuştur.

#### 4.3.2.4. Kısmi en küçük kareler yönteminin ticari numuneye uygulanması

Ticari numune için seçilen dalga boylarında DAD dedektörle ölçümleri yapıldı ve elde edilen değerler PLS algoritmasına uygulandı ve içecek içeriğindeki renk maddeleri hesaplanmıştır.

Çizelge 4.16. Ticari numunede bulunan renk maddelerinin PLS kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları

Numune No	HPLC Metodu İle Elde Edilen Sonuçlar			
	Karamel ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Allura Red ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Tartrazin ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Sunset Yellow ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )
1	-	5,21	0,90	0,36
2	-	5,26	0,82	0,41
3	-	5,34	0,88	0,33
	x= . . . .	x= 5,27	x= 0,87	x= 0,37
	SS= . . . .	SS= 0,066	SS= 0,044	SS= 0,041
	BSS: . . . .	BSS: % 1,25	BSS: % 5,06	BSS: %10,98
	GS= . . . .	GS= 5,27 $\pm$ 0,075	GS=0,87 $\pm$ 0,050	GS=0,37 $\pm$ 0,047

*GS % 95 Esas alınarak hesaplanmıştır.*

#### 4.3.3. Temel bileşen regresyonu yöntemi (PCR)

PCR yöntemi kalibrasyon seti için ölçülen absorbans matrisinin parçalanmasıyla elde edilen temel bileşen regresyonuna dayalı bir yöntemdir. PCR kalibrasyon için hazırlanan kalibrasyon setinin beş farklı dalga boyunda DAD dedektör yardımıyla pik alanları ölçülmüştür. Kullanılan istatistik programı ile kalibrasyon setinin pik alanı oranı (renk maddesi/IS) ve derişim değerlerinin varyans-kovaryans matrisleri hesaplandı. Derişim-pik alanı oranı arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı PCR kalibrasyonu kurulmuştur.

Bölüm 1.10.1.2. de açıklanan PCR algoritmasına göre kalibrasyon setinin absorbans ve derişim değerlerinin varyans-kovaryans matrisleri hesaplanmıştır. Kalibrasyon seti için absorbansların varyans-kovaryans matrisinin dekompozisyon işlemine tabi tutulmasından sonra derişimler arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı PCR kalibrasyonu kurulmuştur. Renk maddelerini içeren karışımların belirtilen dalga boylarındaki absorbans değerleri okunarak PCR kalibrasyonunda bu etken maddelerin miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir.

#### **4.3.3.1. Kalibrasyon yönteminin validasyonu**

PCR yöntemini valide etmek için karamel için 4-16 µg/mL, allura red için 0,4-1,6 µg/mL, tartrazin için 0,8-3,2 µg/mL ve sunset yellow için 0,4-1,6 µg/mL çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı derişimlerde 16 adet yapay karışım çözeltilisinden ibaret olan bir set hazırlanmıştır. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan PCR kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edilmiştir. Geri kazanım (GK) değerleri; allura red için % 99,2622 tartrazin için % 100,021 ve sunset yellow için % 99,9534 olarak bulunmuştur. Bağlı standart sapma değerleri allura red için % 1,11 tartrazin için % 1,10 ve sunset yellow için % 0,23 olarak hesaplanmıştır. PCR kalibrasyon yönteminin sentetik karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4.17. de gösterilmiştir.

Çizelge 4.17. Sentetik olarak hazırlanan karışımdaki renk maddelerinin PCR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları

Karışım No	Karamel HPLC Sonuçları			Allura Red HPLC Sonuçları		
	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım
1	4	-	-	0,4	0,3962	99,0500
2	8	-	-	0,4	0,3971	99,2750
3	12	-	-	0,4	0,3956	98,9000
4	16	-	-	0,4	0,4006	100,150
5	4	-	-	0,4	0,3919	97,9750
6	4	-	-	0,8	0,8007	100,0875
7	4	-	-	1,2	1,1932	99,4330
8	4	-	-	1,6	1,5936	99,6000
9	4	-	-	0,4	0,3976	99,4000
10	4	-	-	0,4	0,4017	100,425
11	4	-	-	0,4	0,4014	100,350
12	4	-	-	0,4	0,4004	100,100
13	4	-	-	0,4	0,3985	99,6250
14	4	-	-	0,4	0,3982	99,5500
15	4	-	-	0,4	0,3840	96,0000
16	4	-	-	0,4	0,3931	98,2750
			x = .... SS = ... BSS = ....			x = 99,2622 SS = 1,11 BSS = % 1,12
Karışım No	Tartrazin HPLC Sonuçları			Sunset Yellow HPLC Sonuçları		
	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım
1	0,8	0,8006	100,0750	0,4	0,3982	99,5500
2	0,8	0,8017	101,2125	0,4	0,4000	100,0000
3	0,8	0,8001	100,0125	0,4	0,3982	99,5500
4	0,8	0,8023	100,2875	0,4	0,3983	99,5750
5	0,8	0,8065	100,8125	0,4	0,4003	100,0750
6	0,8	0,8099	101,2375	0,4	0,4004	100,1000
7	0,8	0,8034	100,4250	0,4	0,4001	100,0250
8	0,8	0,8001	100,0125	0,4	0,4002	100,0500
9	0,8	0,7996	99,9500	0,4	0,4	100,00
10	0,8	0,8052	100,6500	0,8	0,7984	99,7917
11	0,8	0,8032	100,4000	1,2	1,1975	100,0625
12	0,8	0,8005	100,0625	1,6	1,601	100,0750
13	0,8	0,8043	100,5375	0,4	0,4003	100,1750
14	1,6	1,5391	96,1938	0,4	0,4007	100,3250
15	2,4	2,3864	99,4333	0,4	0,4013	100,1000
16	3,2	3,2011	100,0344	0,4	0,4004	99,5500
			x = 100,021 SS = 1,10 BSS = 1,10			x = 99,9534 SS = 0,23 BSS = % 0,23

#### **4.3.3.2. PCR yöntemi için ANOVA testi**

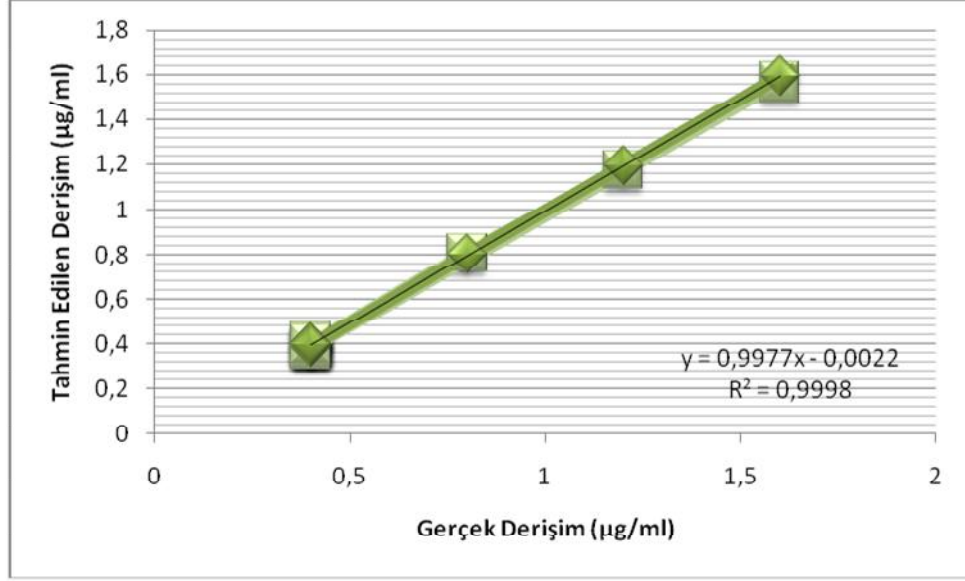
PCR kalibrasyon yönteminin doğruluk ve kesinliğini valide etmek için elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulanmıştır. Gruplar arası serbestlik derecesi=19, grup içi serbestlik derecesi=12 % 95 güven aralığında F-tablo değeri 2,31 olmasına karşılık, allura red için hesaplanan F-test değeri 1,76 ve p-değeri 0,06 olarak, tartrazin için hesaplanan F-test değeri 1,24 ve p-değeri 0,08, sunset yellow için hesaplanan F-test değeri 1,69 ve p-değeri 0,08 bulunmuştur.

ANOVA testinde  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  ve  $p\text{-değeri} > p=0,05$  olduğu için % 95 güven aralığında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Varyans analizinde iki serbestlik derecesi kullanılır. Gruplar arası serbestlik derecesi=19 Grup içi serbestlik derecesi=12.  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  ve  $p\text{-değeri} > p=0,05$  olduğu için bu kalibrasyon modeli ticari numunenin incelenmesinde kullanılabilir olduğuna karar verilmiştir.

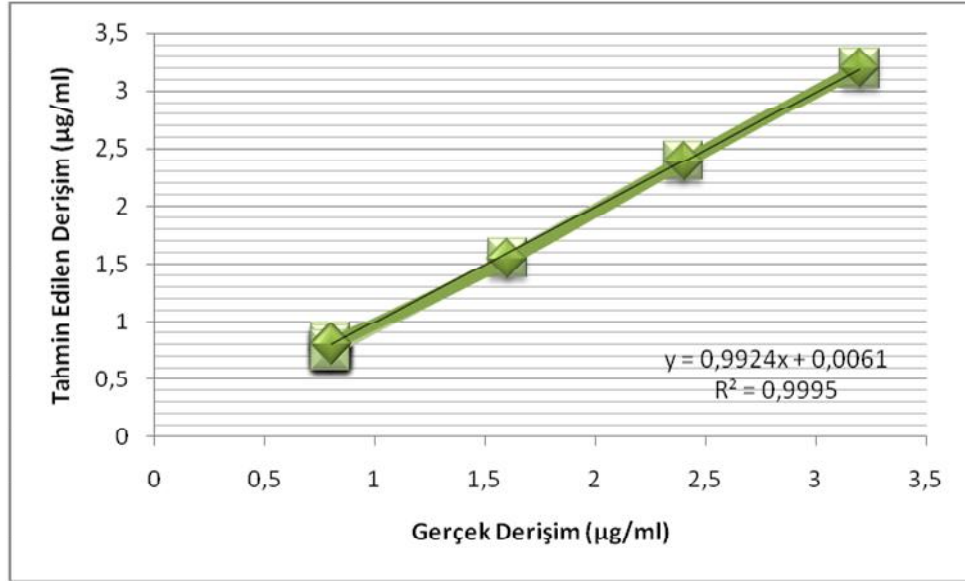
#### **4.3.3.3.PCR yönteminde istatistiksel analiz**

##### **4.3.3.3.a. Kalibrasyonun standart hatası**

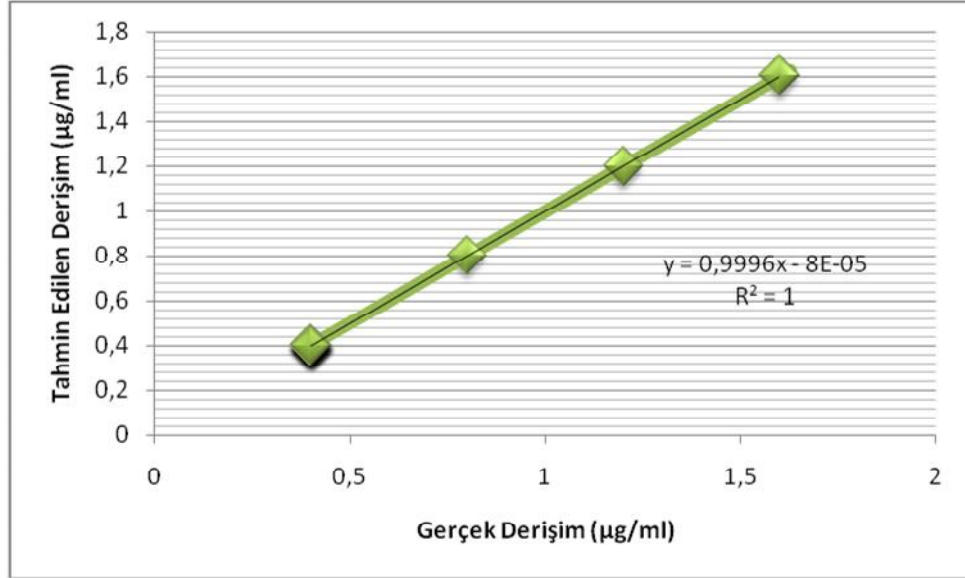
Dört renk maddesini içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için PLS kalibrasyonun kurulmasında çapraz validasyon işleminde tahmin edilen hataların karelerinin toplamının (Predicted Residual Error Some of Squares→ PRESS) minimal değerleri elde edilmiştir. Renk maddeleri için kurulan PCR kalibrasyonunda PRESS değeri karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow için sırasıyla 0,256; 0,235; 0,067; 0,032 olarak hesaplanmıştır. PRESS değerinin sıfıra yakın olması doğruluk derecesini arttırmaktadır. Elde edilen PRESS değerleri yeterince küçüktür. Kalibrasyonun standart hatası (Standard error of calibration →SEC), gerçek ve tahmin edilen derişim arasındaki ilişkiye dayalı olarak hesaplanmıştır ve karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow için sırasıyla 0,0156; 0,0136; 0,00564; 0,00238 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.57. PCR kalibrasyon basamağında allura red için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 4.58. PCR kalibrasyon basamağında tartrazin için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 4.59. PCR kalibrasyon basamağında sunset yellow için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar

Karamel, allura red, tartrazin, sunset yellow içeren karışımlarda bu maddelerin konulan ve hesaplanan verilerinden PCR kalibrasyonu için tayinin standart hatası (Standard Error of Prediction→SEP), değerleri karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow için sırasıyla 0,050; 0,0069; 0,026; 0,059 olarak bulunmuştur.

#### 4.3.3.4. Temel Bileşen Regresyon Yönteminin Ticari Numuneye Uygulanması

Ticari numunenin seçilen dalga boylarında DAD dedektörle ölçümleri yapıldı ve elde edilen değerler PLS algoritmasına uygulanmıştır ve içecek içeriğindeki renk maddeleri hesaplanmıştır.

Her bir renk maddesi için türetilen kalibrasyon eşitlikleri şu şekildedir:

$$C_{\text{allura red}} = -0,0884 - 40,2 PA_1 + 13,3 PA_2 + 56,9 PA_3 - 99,8 PA_4 + 18,6 PA_5 + 67,8 PA_6 - 33,3 PA_7 - 45,5 PA_8 + 117 PA_9 - 60,3 PA_{10} + 27,4 PA_{11} + 87,8 PA_{12} + 31,6 PA_{13} + 40,5 PA_{14} - 78,5 PA_{15}$$

$$C_{\text{tartrazin}} = 1,12 + 119 PA_1 + 400 PA_2 - 1181 PA_3 + 1132 PA_4 + 229 PA_5 - 759 PA_6 + 198 PA_7 + 553 PA_8 - 1432 PA_9 + 402 PA_{10} + 96,9 PA_{11} + 1553 PA_{12} - 1432 PA_{13} + 402 PA_{14} + 96,9 PA_{15}$$

$$C_{\text{sunset yellow}} = 0,930 - 674 PA_1 + 1123 PA_2 - 666 PA_3 + 1069 PA_4 - 665 PA_5 + 159 PA_6 - 756 PA_7 + 1674 PA_8 - 2746 PA_9 - 472 PA_{10} + 1558 PA_{11} + 1386 PA_{12} + 38,3 PA_{13} - 872 PA_{14} - 91,1 PA_{15}$$



Elde edilen kalibrasyon eşitliklerine absorbanans değerleri uygulanarak ticari numunedeki miktarlar hesaplanmıştır.

Çizelge 4.18. Ticari numunede bulunan renk maddelerinin PCR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları

Numune No	Karamel ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Allura Red ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Tartrazin ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Sunset Yellow ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )
1		5,12	0,81	0,35
2	-	5,34	0,80	0,415
3	-	5,24	0,80	0,345
	-	$\bar{x} = 5,23$	$\bar{x} = 0,803$	$\bar{x} = 0,37$
	$x = \dots$	SS= 0,110	SS= 0,0058	SS= 0,0039
	SS= $\dots$	BSS: % 2,11	BSS: % 0,72	BSS: % 1,05
	BSS: $\dots$	GS= 5,23 $\pm$ 0,124	GS= 0,82 $\pm$ 6,56.10 <sup>-3</sup>	GS= 0,36 $\pm$ 4,41.10 <sup>-3</sup>

*GS % 95 Esas alınarak hesaplanmıştır.*

#### **4.3.4. Çok değişkenli regresyon yöntemi (MLR)**

MLR yöntemi kalibrasyon seti için ölçülen absorbans matrisinin parçalanmasıyla elde edilen temel bileşen regresyonuna dayalı bir yöntemdir. Yöntemin algoritması Bölüm 1.10.1.4 de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Ölçümler beş farklı dalgaboyunda DAD dedektör yardımıyla ölçülmüştür. Burada elde edilen analitik sinyal pik alanıdır. Derişimler arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı MLR kalibrasyonu kurulmuştur. Karamel, allura red, tartrazin ve sunset yellow içeren karışımların pik alanı değerleri belirlenerek MLR kalibrasyonunda bu renk maddelerinin miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir.

##### **4.3.4.1. Kalibrasyon yönteminin validasyonu**

MLR yöntemini valide etmek amacıyla karamel için 4-16 µg/mL, allura red için 0,4-1,6 µg/mL, tartrazin için 0,8-3,2 µg/mL ve sunset yellow için 0,4-1,6 µg/mL çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı derişimlerde 16 adet yapay karışım çözeltilisinden ibaret olan bir set hazırlanmıştır. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan MLR kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edilmiştir. Geri kazanım (GK) değerleri; allura red için % 99,5149, tartrazin için % 100,5517, sunset yellow için % 100,0447 olarak bulunmuştur. Bağlı standart sapma değerleri allura red için %1,53, tartrazin için % 0,52, sunset yellow için % 0,69 olarak hesaplanmıştır. MLR kalibrasyon yönteminin sentetik karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4.19. de gösterilmiştir.

Çizelge 4.19. Sentetik olarak hazırlanan karışımındaki renk maddelerinin MLR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları

Karışım No	Karamel HPLC Sonuçları			Allura Red HPLC Sonuçları		
	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım
1	4	-	-	0,4	0,3941	98,5350
2	8	-	-	0,4	0,3950	98,7600
3	12	-	-	0,4	0,3952	98,7630
4	16	-	-	0,4	0,4065	101,635
5	4	-	-	0,4	0,3921	98,0350
6	4	-	-	0,8	0,8066	100,830
7	4	-	-	1,2	1,1861	98,8450
8	4	-	-	1,6	1,5765	98,4500
9	4	-	-	0,4	0,3905	97,6350
10	4	-	-	0,4	0,4106	102,660
11	4	-	-	0,4	0,4043	101,085
12	4	-	-	0,4	0,4050	101,335
13	4	-	-	0,4	0,3914	97,8600
14	4	-	-	0,4	0,3941	98,5350
15	4	-	-	0,4	0,3969	99,2350
16	4	-	-	0,4	0,3998	99,9600
			x = .... SS = ... BSS = ....			x = 99,5149 SS = 1,53 BSS = %1,54
Karışım No	Tartrazin HPLC Sonuçları			Sunset Yellow HPLC Sonuçları		
	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım	Konulan (µg/ml)	Bulunan (µg/ml)	% Geri Kazanım
1	0,8	0,8099	101,245	0,4	0,3963	99,0750
2	0,8	0,8084	101,045	0,4	0,4004	100,100
3	0,8	0,8024	100,295	0,4	0,3985	99,6250
4	0,8	0,8037	100,457	0,4	0,3963	99,0750
5	0,8	0,8079	100,982	0,4	0,4006	100,150
6	0,8	0,8083	100,032	0,4	0,4052	101,300
7	0,8	0,8047	100,595	0,4	0,4053	101,325
8	0,8	0,8014	100,182	0,4	0,4007	100,175
9	0,8	0,8103	100,282	0,4	0,4000	100,00
10	0,8	0,8064	100,800	0,8	0,7956	99,4500
11	0,8	0,8044	100,550	1,2	1,1878	98,9833
12	0,8	0,8018	100,232	1,6	1,6077	100,481
13	0,8	0,8057	100,707	0,4	0,4008	100,200
14	1,6	1,5905	99,4035	0,4	0,4000	100,00
15	2,4	2,3977	99,9065	0,4	0,4012	100,300
16	3,2	3,2025	100,0768	0,4	0,4019	100,475
			x = 100,5517 SS = 0,52 BSS = %0,52			x = 100,0447 SS = 0,69 BSS = % 0,70

#### **4.3.4.2. MLR yöntemi için ANOVA testi**

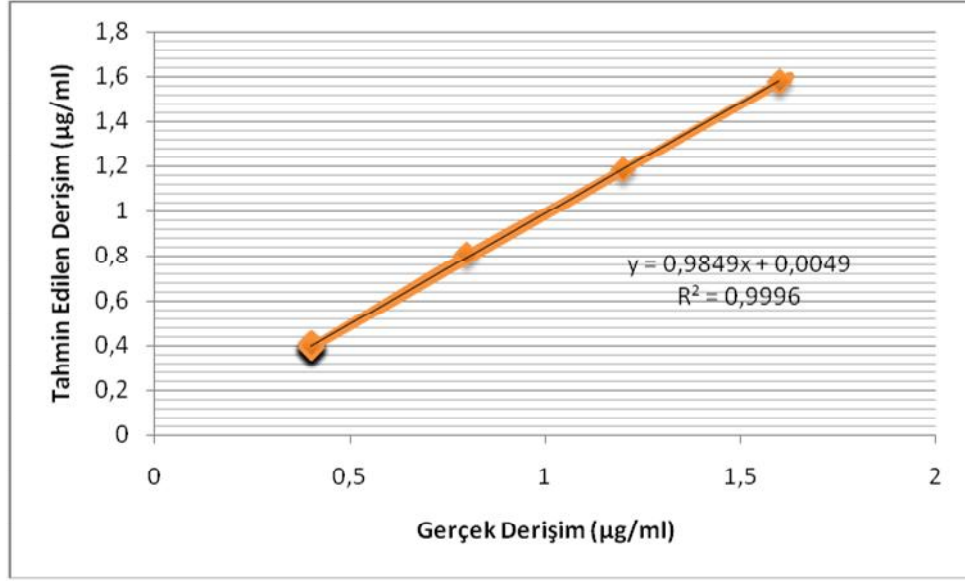
MLR kalibrasyon yönteminin doğruluk ve kesinliğini valide etmek için elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulandı. Gruplar arası serbestlik derecesi=19, grup içi serbestlik derecesi=12 % 95 güven aralığında F-tablo değeri 2,31 olmasına karşılık allura red için hesaplanan F-test değeri 0,72 ve p-değeri 0,08 olarak, tartrazin için hesaplanan F-test değeri 1,09 ve p-değeri 0,08, sunset yellow için hesaplanan F-test değeri 1,31 ve p-değeri 0,07 bulunmuştur.

ANOVA testinde  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  ve  $p\text{-değeri} > p=0,05$  olduğu için % 95 güven aralığında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Varyans analizinde iki serbestlik derecesi kullanılır. Gruplar arası serbestlik derecesi=19 Grup içi serbestlik derecesi=12 dir.  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  ve  $p\text{-değeri} > p=0,05$  olduğu için bu kalibrasyon modeli ticari numunenin incelenmesinde kullanılabilir olduğuna karar verilmiştir.

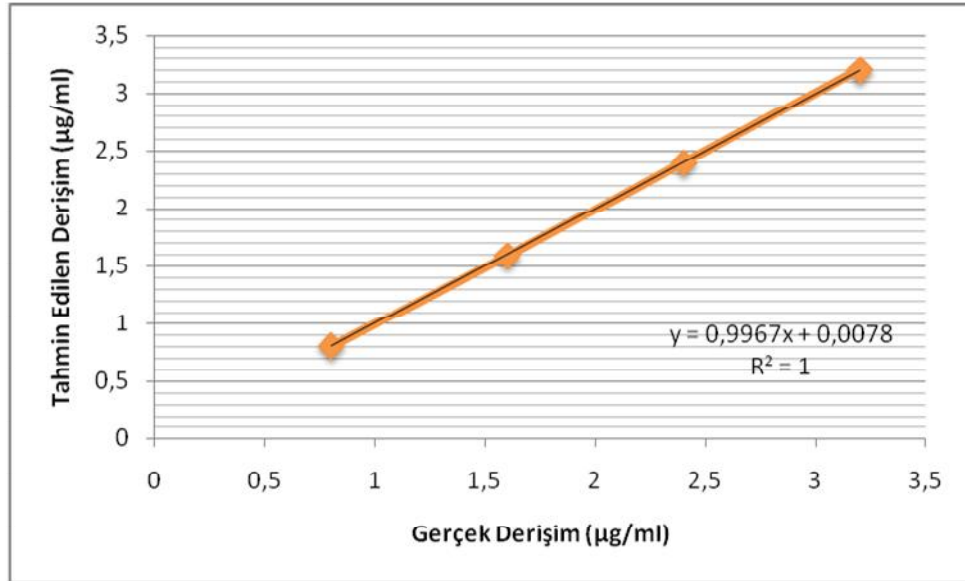
#### **4.3.4.3. MLR yönteminde istatistiksel analiz**

##### **4.3.4.3.a. Tahminsel kalıntısız hata (PRESS)**

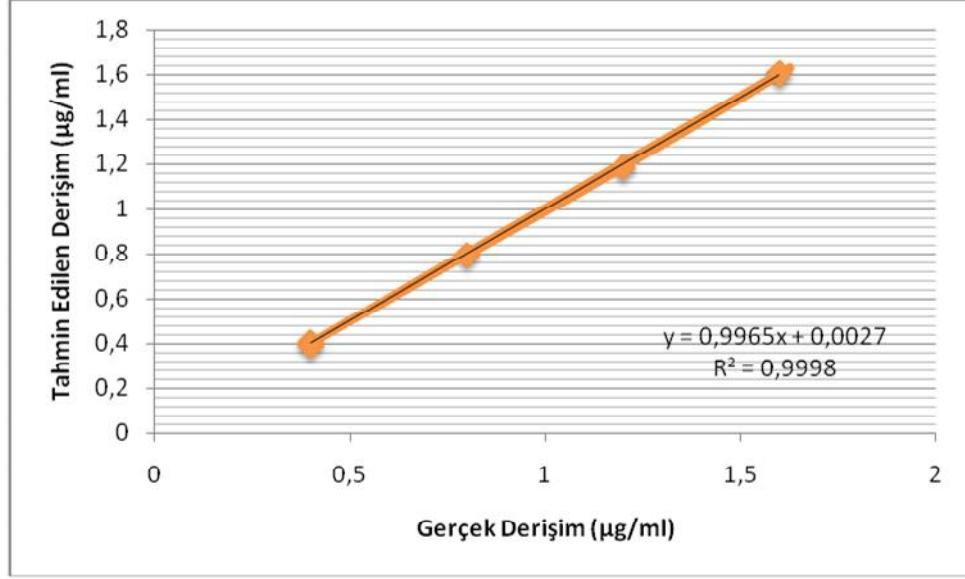
Dört renk maddesini içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için MLR kalibrasyonunun kurulmasında çapraz validasyon işleminde tahmin edilen hataların karelerinin toplamının (Predicted Residual Error Some of Squares → PRESS) minimal değerleri elde edilmiştir. Renk maddeleri için kurulan MLR kalibrasyonunda PRESS değeri allura red, tartrazin ve sunset yellow için için sırasıyla 0,072; 0,033; 0,071 olarak hesaplanmıştır . PRESS değerinin sıfıra yakın olması doğruluk derecesini arttırmaktadır. Elde edilen PRESS değerleri yeterince küçüktür.



Şekil 4.60. MLR kalibrasyon basamağında allura red için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 4.61. MLR kalibrasyon basamağında tartrazin için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 4.62. MLR kalibrasyon basamağında sunset yellow için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar

#### 4.3.4.4. Çok değişkenli regresyon yönteminin ticari numuneye uygulanması

MLR yönteminin karbondioksitli içecek numunesine uygulanmasında ticari olarak satın alınan sıvı gazlı içecek bir saat manyetik karıştırıcıda karıştırılır ve 20 dakika kadar ısıtılır. Bu işlem sonucunda yapısında bulunan karbondioksit uzaklaştırılır. Sonra süzülme işlemi yapılır. Bu çözeltiden 0,1-1,0 mL alınarak son hacim saf su ile 25 mL ye tamamlanır.

Çizelge 4.20. Ticari numunede bulunan renk maddelerinin MLR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları

HPLC Metodu İle Elde Edilen Sonuçlar				
Numune No	Karamel (µg / mL)	Allura Red (µg / mL)	Tartrazin (µg / mL)	Sunset Yellow (µg / mL)
1	-	5,20104	0,8092	0,3298
2	-	5,37094	0,8008	0,3612
3	-	5,4088	0,8004	0,3902
	x = .. . . .	x= 5,3269	x= 0,8034	x= 0,3604
	SS= . . . . .	SS= 0,11	SS= 0,0050	SS= 0,03021
	BSS: . . . . .	BSS: % 2,06	BSS: % 0,62	BSS: % 8,38
	GS= . . . . .	GS= 5,32± 0,12	GS= 0,8034± 5,65.10 <sup>-3</sup>	GS= 0,3604± 0,034

GS % 95 Esas alınarak hesaplanmıştır.

#### 4.4. Yöntemlerin gıda Numunesine Uygulanmasıyla Elde Edilen Bulgular

Kesinlik, doğruluk ve tekrarlanabilirliğin her üç yöntemdeki karşılaştırılması ile ticari gıda numunesinden elde edilen sonuçlar şu şekildedir.

Çizelge 4.21. Ticari numunede bulunan renk maddelerinin kemometrik olarak hesaplanan sonuçları (PLS Yöntemi)

<b>UV Metodu İle Elde Edilen Sonuçlar</b>				
Numune No	Karamel	Allura Red	Tartrazin	Sunset Yellow
1	0,050	5,23	0,84	0,33
2	0,051	5,44	0,75	0,42
3	0,049 x = 0,050 SS= 1,0.10 <sup>-3</sup> BSS: % 2,0 GS= 0,05± 1,13.10 <sup>-3</sup>	5,35 x= 5,34 SS= 0,105 BSS: %1,97 GS= 5,34± 0,119	0,88 x= 0,82 SS= 0,067 BSS: % 8,14 GS= 0,82± 0,076	0,36 x= 0,37 SS= 0,046 BSS: % 12,43 GS= 0,37± 0,052
Numune	Karamel	Allura Red	Tartrazin	Sunset Yellow
1	0,049	5,39	0,83	0,35
2	0,051	5,47	0,84	0,40
3	0,051	5,50	0,89	0,38
	x= 0,050	x= 5,45	x= 0,85	x= 0,38
	SS= 1,41.10 <sup>-3</sup>	SS= 0,057	SS= 0,032	SS= 0,025
	BSS: % 2,82	BSS: %1,05	BSS: % 3,81	BSS: %6,71
	GS= 0,05± 1,60.10 <sup>-3</sup>	GS= 5,45± 0,064	GS= 0,85± 0,036	GS= 0,38± 0,028
Numune	Karamel	Allura Red	Tartrazin	Sunset Yellow
1	-	5,21	0,90	0,36
2	-	5,26	0,82	0,41
3	-	5,34	0,88	0,33
	x= . . . .	x= 5,27	x= 0,87	x= 0,37
	SS= . . . .	SS= 0,066	SS= 0,044	SS= 0,041
	BSS: . . . .	BSS: % 1,25	BSS: % 5,06	BSS: %10,98
	GS= . . . .	GS= 5,27±0,075	GS=0,87± 0,050	GS=0,37 ± 0,047



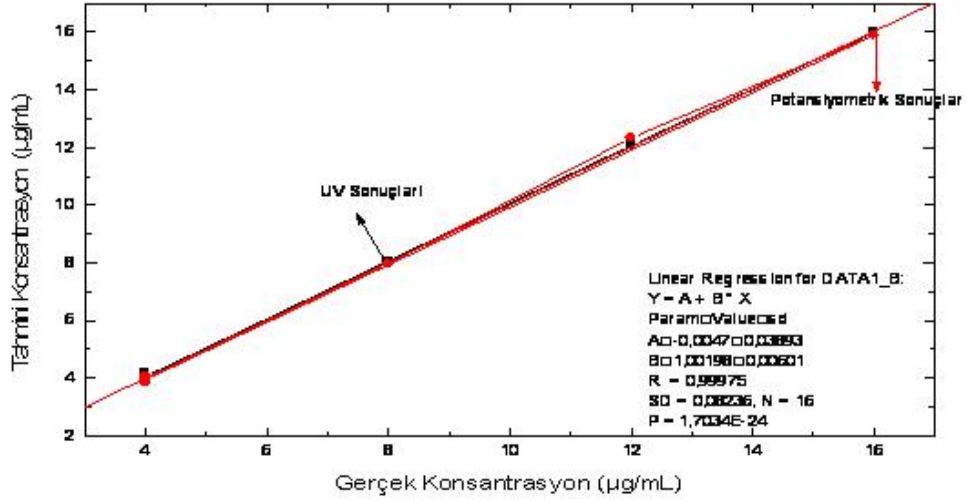
Çizelge 4.22. Ticari numunede bulunan renk maddelerinin kemometrik olarak hesaplanan sonuçları (PCR Yöntemi)

<b>UV Metodu İle Elde Edilen Sonuçlar</b>				
Numune No	Karamel	Allura Red	Tartrazin	Sunset Yellow
1	0,050	5,20	0,83	0,33
2	0,050	5,41	0,82	0,41
3	0,049 x = 0,050 SS= 2,58.10 <sup>-4</sup> BSS: % 0,516 GS= 0,05± 1,3.10 <sup>-4</sup>	5,36 x= 5,32 SS= 0,040 BSS: % 0,75 GS= 5,32± 0,020	0,80 x= 0,82 SS= 0,005: BSS: % 0,70 GS= 0,82± 0,0028	0,35 x= 0,36 SS= 0,015 BSS: % 0,042 GS= 0,36± 0,00735
Numune No	Karamel	Allura Red	Tartrazin	Sunset Yellow
1	0,050	5,21	0,80	0,34
2	0,047	5,37	0,81	0,40
3	0,048 x = 0,048 SS= 1,58.10 <sup>-3</sup> BSS: % 3,29 GS= 0,05± 1,78.10 <sup>-3</sup>	5,36 x= 5,31 SS= 0,089 BSS: % 1,69 GS= 5,32± 0,100	0,80 x= 0,80 SS= 7,07.10 <sup>-3</sup> BSS: % 0,88 GS= 0,82± 1,8.10 <sup>-3</sup>	0,36 x= 0,36 SS= 0,031 BSS: % 0,087 GS= 0,36± 0,035
Numune No	Karamel	Allura Red	Tartrazin	Sunset Yellow
1	-	5,12	0,81	0,35
2	-	5,34	0,80	0,415
3	-	5,24	0,80	0,345
	x= . . . .	x= 5,23	x= 0,803	x= 0,37
	SS= . . . .	SS= 0,110	SS= 0,0058	SS= 0,0039
	BSS: . . . .	BSS: % 2,11	BSS: % 0,72	BSS: % 1,05
	GS= . . . .	GS= 5,23±0,124	GS= 0,82± 6,56.10 <sup>-3</sup>	GS= 0,36± 4,41.10 <sup>-3</sup>

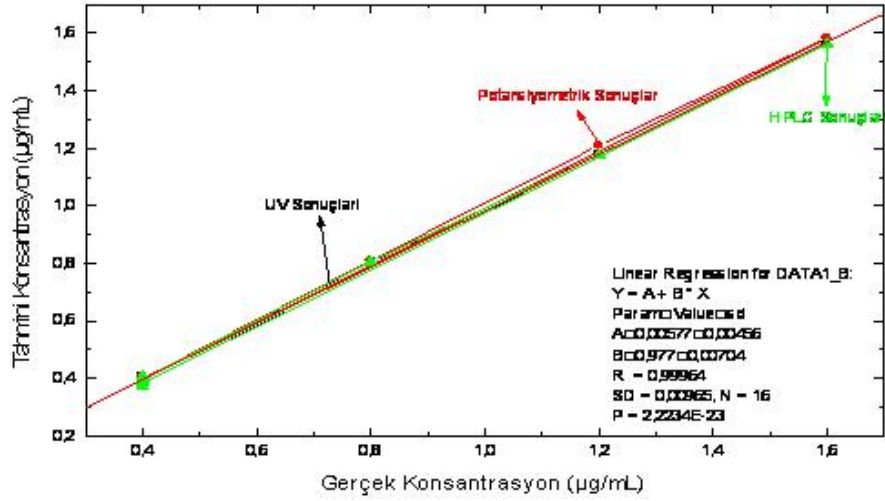
Çizelge 4.23. Ticari numunede bulunan renk maddelerinin kemometrik olarak hesaplanan sonuçları (MLR Yöntemi)

Numune No	UV Metodu İle Elde Edilen Sonuçlar			
	Karamel	Allura Red	Tartrazin	Sunset Yellow
1	0,050	5,19	0,80	0,33
2	0,050	5,35	0,82	0,41
3	0,050 x = 0,050 SS= 0,000 BSS: % 0,000 GS= 0,05± 0,000	5,40 x= 5,32 SS= 0,0016 BSS: % 0,030 GS= 5,32± 0,00078	0,80 x= 0,81 SS= 0,0045 BSS: % 0,55 GS= 0,81± 0,0022	0,36 x= 0,37 SS= 0,0022 BSS: % 0,060 GS= 0,37± 0,0011
	<b>Potansiyometri</b>	<b>Metodu İle</b>	<b>Elde Edilen</b>	<b>Sonuçlar</b>
Numune No	Karamel	Allura Red	Tartrazin	Sunset Yellow
1	0,0512	5,191	0,8	0,32
2	0,05	5,361	0,81	0,37
3	0,051 x = 0,051 SS= 0,00064 BSS: % 1,25 GS= 0,051± 7,24.10 <sup>-4</sup>	5,399 x= 5,32 SS= 0,11 BSS: % 2,06 GS= 5,32± 0,124	0,81 x= 0,81 SS= 0,0058 BSS: % 0,72 GS= 0,81± 6,56.10 <sup>-3</sup>	0,4 x= 0,37 SS= 0,0040 BSS: % 1,08 GS= 0,37± 4,53.10 <sup>-3</sup>
	<b>HPLC Elde</b>	<b>Metodu İle</b>	<b>Edilen</b>	<b>Sonuçlar</b>
Numune No	Karamel	Allura Red	Tartrazin	Sunset Yellow
1	-	5,20104	0,8092	0,3298
2	-	5,37094	0,8008	0,3612
3	- x = . . . . . SS= . . . . . BSS: . . . . . GS= . . . . .	5,4088 x= 5,3269 SS= 0,11 BSS: % 2,06 GS= 5,32± 0,12	0,8004 x= 0,8034 SS= 0,0050 BSS: % 0,62 GS= 0,8034± 5,65.10 <sup>-3</sup>	0,3902 x= 0,3604 SS= 0,03021 BSS: % 8,38 GS= 0,3604± 0,034

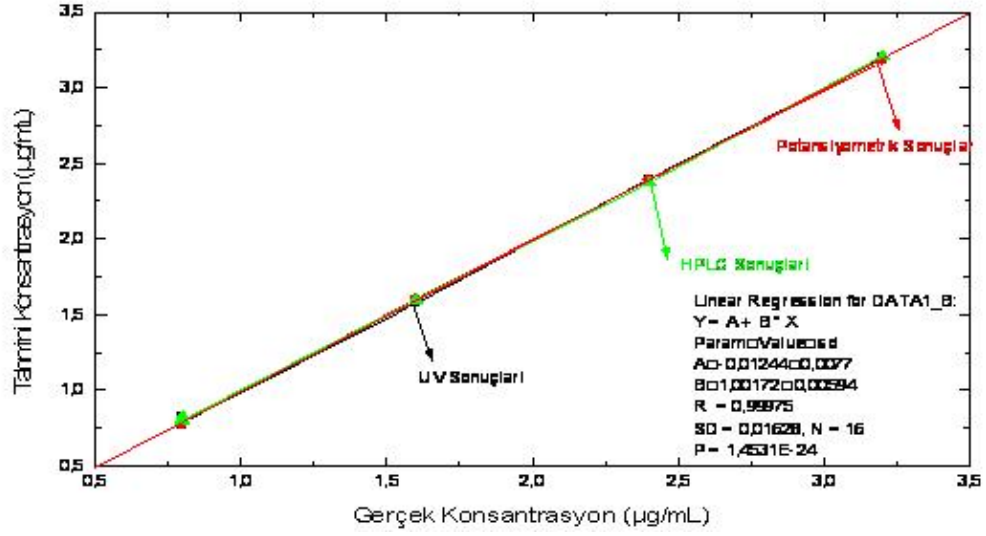
PLS yöntemi ile her üç yöntem için elde edilen sentetik karışım verilerin tek bir grafikte incelenirse, elde edilen değerlerin aynı doğru üzerinde üst üste örtüştüğü görülmektedir. Yani değerler birbirinden çok sapmamaktadır.



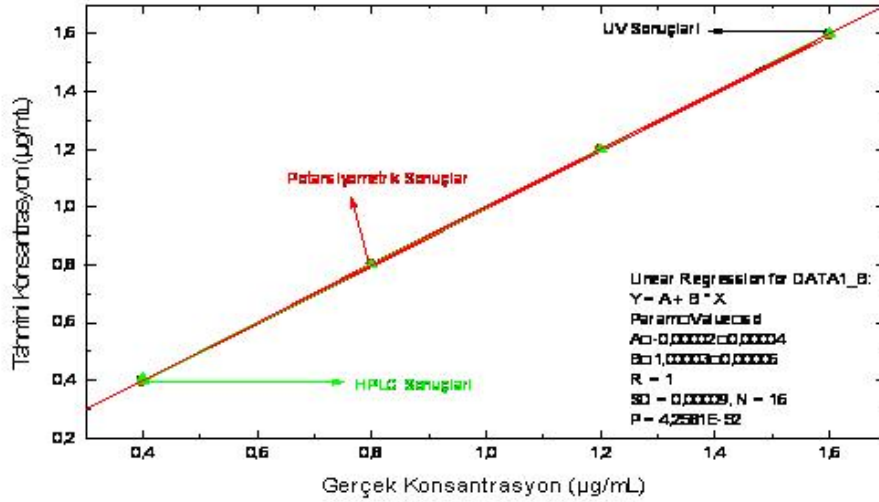
Şekil 4.63. Karamel renk maddesinin gerçek ve tahmini derişimleri arasındaki doğrusal ilişki



Şekil 4.64. Allura red renk maddesinin gerçek ve tahmini derişimleri arasındaki doğrusal ilişki

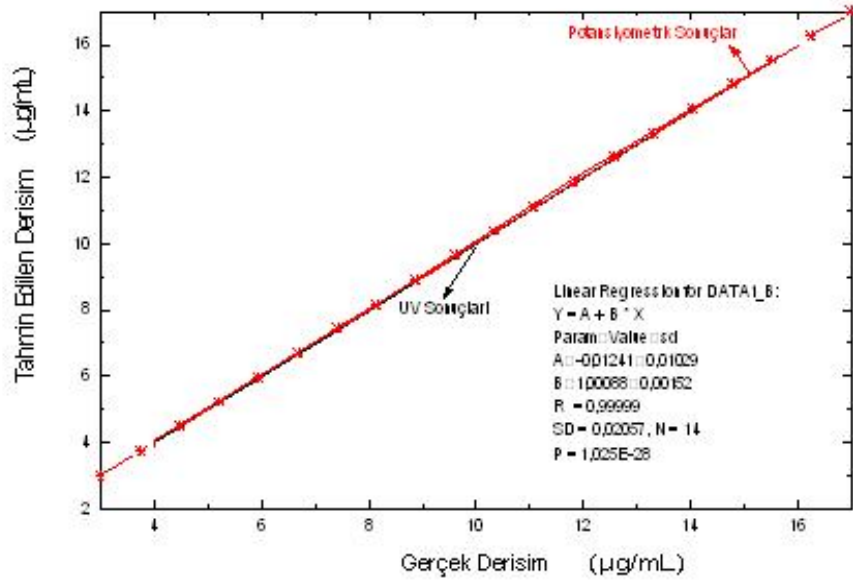


Şekil 4.65. Tartrazin renk maddesinin gerçek ve tahmini derişimleri arasındaki doğrusal ilişki

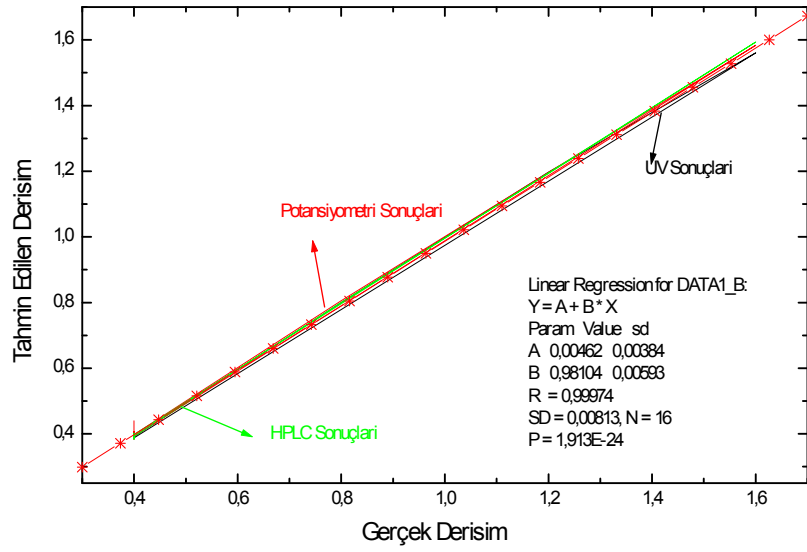


Şekil 4.66. Sunset Yellow renk maddesinin gerçek ve tahmini derişimleri arasındaki doğrusal ilişki

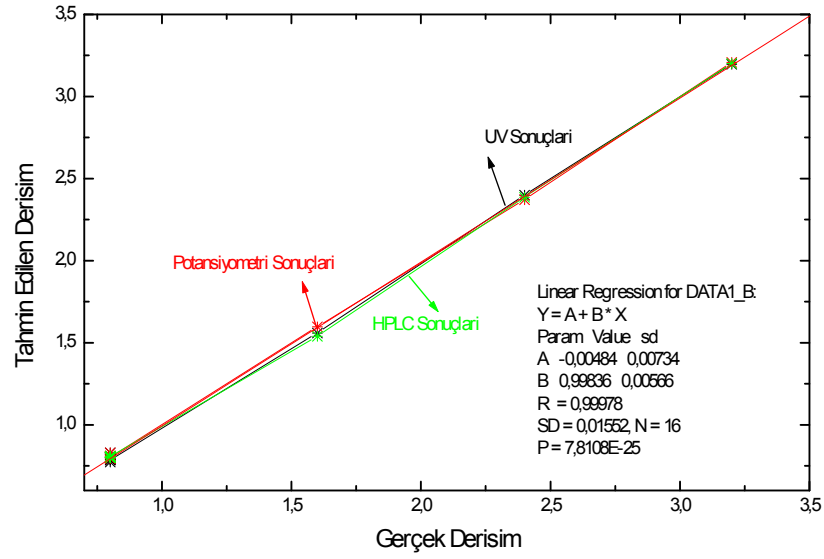
PCR yöntemi ile her üç yöntem için elde edilen sentetik karışım verilerin tek bir grafikte incelenirse, elde edilen değerlerin aynı doğru üzerinde üst üste örtüştüğü görülmektedir. Yani değerler birbirinden çok sapmamaktadır.



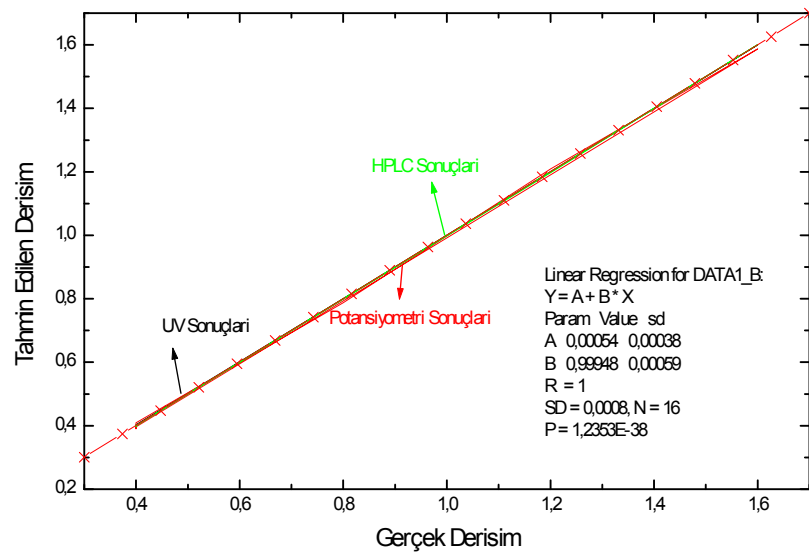
Şekil 4.67. Karamel renk maddesinin gerçek ve tahmini derişimleri arasındaki doğrusal ilişki



Şekil 4.68. Allura red renk maddesinin gerçek ve tahmini derişimleri arasındaki doğrusal ilişki

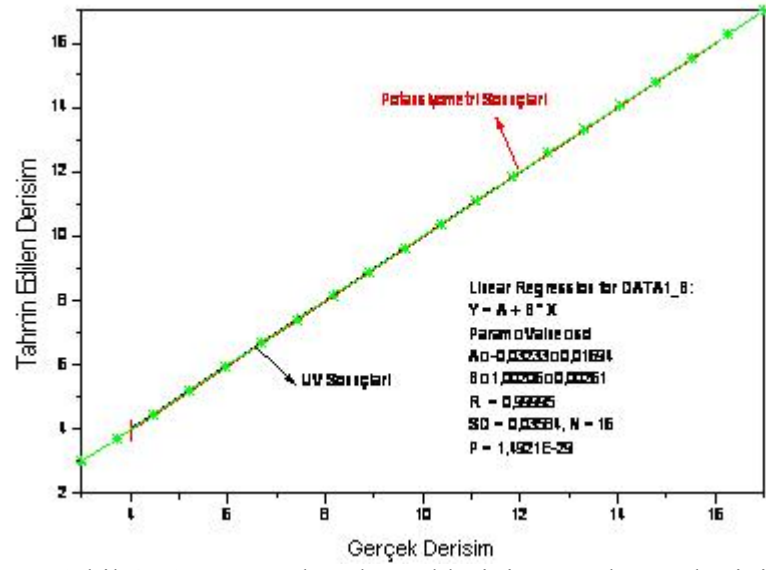


Şekil 4.69. Tartrazin renk maddesinin gerçek ve tahmini derişimleri arasındaki doğrusal ilişki

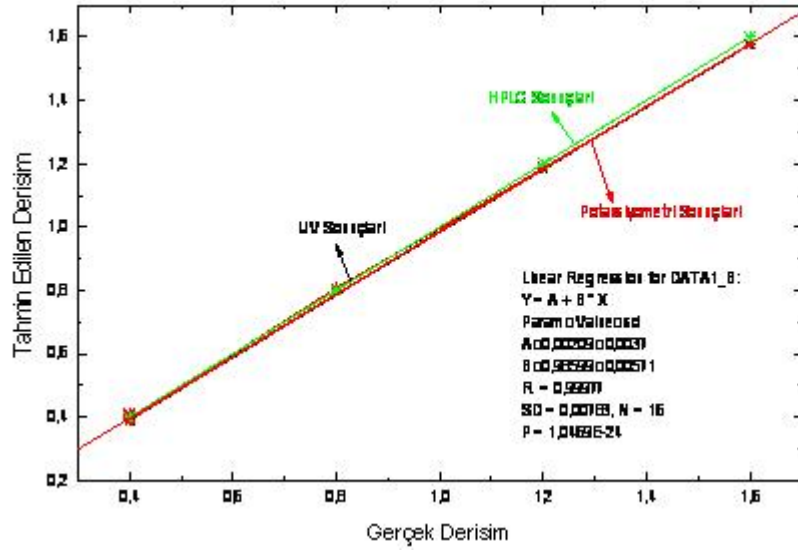


Şekil 4.70. Sunset yellow renk maddesinin gerçek ve tahmini derişimleri arasındaki doğrusal ilişki

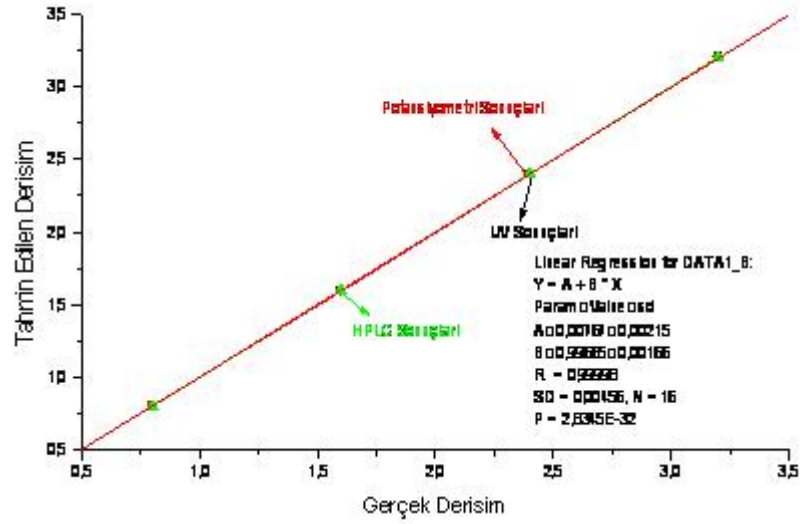
MLR yöntemi için de yine değerler incelendiğinde elde edilen değerlerin aynı doğru üzerinde üst üste örtüştüğü görülmektedir. Yani değerler birbirinden çok sapmamaktadır.



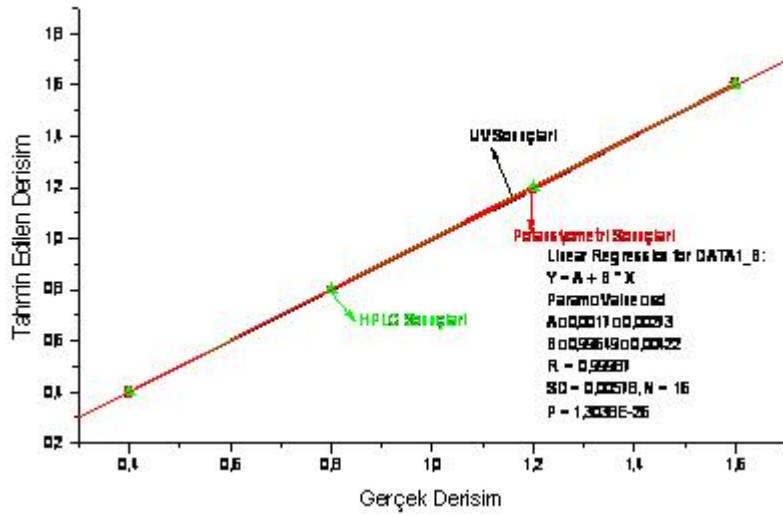
Şekil 4.71. Karamel renk maddesinin gerçek ve tahmini derişimleri arasındaki doğrusal ilişki



Şekil 4.72. Allura red renk maddesinin gerçek ve tahmini derişimleri arasındaki doğrusal ilişki



Şekil 4.73. Tartrazin renk maddesinin gerçek ve tahmini derişimleri arasındaki doğrusal ilişki



Şekil 4.74. Sunset yellow renk maddesinin gerçek ve tahmini derişimleri arasındaki doğrusal ilişki



## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Piyasada satılan gıda maddelerinde sıkça rastlanan gıda boya boyalarından olan karamel, allura red, tartrazin, sunset yellow karışımlarındaki boya miktarlarının analizi için kaynaklarda rastlanmayan dört bileşeni analiz etmeye yönelik çalışmada Ultra-Viyole Görünür Alan Spektroskopisi, Potansiyometri ve Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemleri geliştirilmeye çalışılmıştır.

Karamel, allura red, tartrazin, sunset yellow boya standart maddelerinin UV spektrumları alınarak, çalışma yapılabilecek saflıkta olduğu belirlenmiş ve analiz çalışmaları gerçekleştirilmiştir. UV ve potansiyometri ile bu maddelerden karamelın tayini yapılabilmemiş yalnız HPLC ile tayini tam olarak gerçekleştirilememiştir.

Karamel, allura red, tartrazin, sunset yellow karışımı için, UV ve potansiyometri yöntemi geliştirilerek, bulgular HPLC yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Geliştirilen yöntemlerin ve HPLC yönteminin standart eğrilerinin regresyon analizi yapılarak sonuçlar istatistik hesaplanmıştır. Oluşturulan eğrilerin bir doğru olup olmadığını anlamak, bulunan doğrusallık sınırının uygun olup olmadığını belirlemek için doğrusallıktan ayrılışın önem testi yapılmıştır.  $F_H < F_T$  olduğundan, doğrusallıktan sapmanın önemsiz olduğu bulunmuştur.

Kemometrik program kullanılırken de yine F testi göz önüne alınmıştır. Ticari numuneye geçmeden önce yapılan deneysel tasarım esnasında hazırlanan sentetik modelde de sonuçlar kıyaslanmıştır. Sentetik modele ilave ettiğimiz madde miktarları ile kemometrik programdan elde ettiğimiz deneysel sonuçlar kıyaslanmıştır. Grup içi ve gruplar arası serbestlik dereceleri yardımıyla F testi yapılmıştır. F testi sonucuna göre kullandığımız modeli ticari numuneye uygulayıp uygulayamayacağımıza karar verilmiştir.  $F_H < F_T$  olduğunda model uygulanmıştır.

Karamel, allura red, tartrazin, sunset yellow boya boyaları için doğruluk ve kesinlik değerleri saptanmıştır. Bu değerlerde SS ve BSS değerleri küçük olduğu için geliştirilen yöntemlerin kesin ve doğru bir yöntem olduğuna karar verilmiştir.

Çizelge 4.21., çizelge 4.22. ve çizelge 4.23. de görüldüğü gibi aynı numuneye 3' er kez UV, potansiyometri ve HPLC uygulanmış, sonuçlar karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmanın varyans analizi yapılarak, yöntemler arasında fark bulunmadığı, istatistiksel olarak saptanmıştır. Sonuç olarak UV, potansiyometri ve HPLC yöntemi arasında önemli bir fark yoktur.

Çizelge 4.21 incelendiğinde Allura Red miktar tayininde en düşük bağıl standart sapmaların, potansiyometri yönteminde bulunduğu görülmüştür. Bu çizelgedeki değerler kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS) ile hesaplanmıştır.

Çizelge 4.22. incelendiğinde Sunset Yellow miktar tayininde en düşük bağıl standart sapmaların, potansiyometri yönteminde bulunduğu görülmüştür. Bu çizelgedeki değerler temel bileşen regresyonu (PCR) ile hesaplanmıştır.

Çizelge 4.23. incelendiğinde Allura Red miktar tayininde en düşük bağıl standart sapmaların, potansiyometri yönteminde bulunduğu görülmüştür. Bu çizelgedeki değerler çok değişkenli doğrusal regresyon (MLR) ile hesaplanmıştır.

UV, potansiyometri ve HPLC de karamel, allura red, tartrazin, sunset yellow için % geri kazanım değerleri ortalama olarak gerek sentetik karışım için, gerekse ticari numune için bulunmuştur. Her üç yöntem içinde geri kazanımlar yüksek değerlerde bulunmuştur.

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğinin Gıdalarda Kullanılan Renklendiriciler Tebliğine (01.11.2007- 26687, Tebliğ No: 2007/49) göre içecekteki boyalar 100mg/L den fazla olmamalıdır. Piyasadan alınarak analiz edilen CO<sub>2</sub>'li içecek numunesinden elde edilen miktarlar uygun sınırlar içindedir.

UV, potansiyometri yöntemi ile HPLC yöntemi karşılaştırıldığında, HPLC yönteminin daha spesifik ve ayırıcı karakterine karşılık zorluğu ve pahalılığı bir dezavantaj olarak görülmektedir. UV ve potansiyometri yöntemleri ise daha ucuz ve kolay yöntemlerdir.

Kullanılan yöntemlerin tekrarlanabilir sonuçlar vermesi, yüksek duyarlılık ve doğruluğun yanı sıra hızlı oluşu ve dördü boya karışımlarının analizi için önerilecek yöntem olmalarını sağlamaktadır.

Geliştirilen yöntemler, tekrarlanabilir, duyarlı ve doğru sonuç veren yöntemler olup karamel, allura red, tartrazin, sunset yellow içeren gıda numunelerinin analizinde önerilebilir.

## KAYNAKLAR

- Abbaspour, A., Mirzajani, R., 2004. Application of the spectral correction method and “neural networks” for simultaneous determination of V(V) and Al (III). *Talanta*, 64, 435-441.
- Abdollahi, H., Bagheri, L., 2004. Simultaneous spectrophotometric determination of vitamin K<sub>3</sub> and 1,4-naphthoquinone after cloud point extraction by using genetic algorithm based wavelength selection- partial least squares regression. *Analytica Chimica Acta*, 514, 211-218.
- Afkhami, A., Sarlak, N., Zarei, A.R., 2007. Simultaneous kinetic spectrophotometric determination of cyanide and thiocyanate using the partial least squares (PLS) Regression. *Talanta*, 71, 893-899.
- Akhound, M., Tashkhourian, J., Hemmateenejad, B., 2006. Simultaneous determination of ascorbic, citric and tartaric acids by potentiometric titration with PLS calibration. *Journal Of Analytical Chemistry*, 61(8), 804-808.
- Aktaş, A.H., Ertokuş, G.P., 2008, Potentiometric determination of ibuprofen, indomethacin and naproxen by artificial neural network calibration, *Journal of Serbian Chemical Society*, 73(1), 87-95.
- Aktaş, A.H., Pekcan, G., 2006. Simultaneous spectrophotometric determination of tartrazin, sunset yellow and allura red in commercial products by artificial neural network calibration. *Asian Journal Of Chemistry*, 18(3), 2025-2031.
- Aktaş, A.H., Şener, M., Ertokuş Pekcan, G., 2006. Artificial neural network calibration for the simultaneous determination of calcium and magnesium in natural waters, *Revista De Chimie*, 57(12): 1287-1290
- Aktaş, A.H., Yaşar, S., 2004. Potentiometric titration of some hidroxylyated benzoic acids and cinnamic acids by artificial neural network calibration. *Acta Chim. Slovenica.*, 51, 273-282.
- Altınöz, S., Toptan, S., 2002. Determination of tartrazin, ponso 4R in various food samples by vierordt’s method and ratio spectra first-order derivative UV spectrophotometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 667-683.
- Aydoğdu, S., 2007. Gıdalar içindeki maltol, etil maltol, vanilin ve etil vanilinin yapay sinir ağırları yöntemi ile kalibrasyonu ve simultane spektrofotometrik tayinleri. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 43s, Isparta.
- Berzas Nevado, J.J., Rodríguez Flores, J., Guiberteau Cabanillas, C., Villaseñor

- Llerena, M.J., Contento Salcedo, A., 1998. Resolution of ternary mixtures of tartrazin, sunset yellow and ponso 4R by derivative spectrophotometric ratio spectrum-zero crossing method in commercial foods. *Talanta*, 46, 933-942.
- Berzas, J.J., Rodríguez Flores, J., Villaseñor Llerena, M.J., Rodríguez Fariñas, N., 1999. Spectrophotometric resolution of ternary mixtures of tartrazin, patent blue V and indigo carmine in commercial products. *Analytica Chimica Acta*, 391, 353-364.
- Bouhsain, Z., Garrigues, S., 1997. PLS - UV spectrophotometric method for simultaneous determination of paracetamol, acetylsalicylic acid and caffeine in pharmaceutical formulations. *Journal of Analytical Chemistry*, 357, 973-976.
- Capitán-Valley, L.F., Fernández, M.D., De Orbe, I., Avidad, R., 1998. Simultaneous determination of colorants tartrazin, ponso 4R and sunset yellow FCF in foodstuffs by solid phase spectrophotometry using partial least squares multivariate calibration. *Talanta*, 47, 861-868.
- Chaloosi, M., Gholamian, F., Zarei, A., 2001. Determination of binary mixtures of nitramines by a spectrophotometric method using partial least squares multivariate calibration. *Propellants, Explosives, Pyrotechnics*, 26,21-25.
- Chen, Q., Mou, S., Hou, X., Riviello, J.M., Ni, Z., 1998. Determination of eight synthetic food colorants in drinks by high performance ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 827, 73-81.
- Dinç, E., 2007. Kemometri çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri, 27(1), 61-92.
- Dinç, E., 2009. Kemometrik işlem ve yöntemlerin analitik kimyadaki tipik uygulamaları, *Uygulamalı Kemometri Yaz Okulu Notları*, 13-17.
- Dinç, E., Aktaş, A.H., Baleanu, D., 2006. Simultaneous determination of tartrazin and allura red in commercial preparation by chemometric HPLC method. *Journal Of Food And Drug Analysis*, 14(3), 284-291.
- Dinç, E., Aktaş, A.H., Üstündağ, Ö., 2005. New Liquid chromatography-chemometric approach for the determination of sunset yellow and tartrazin in commercial preparation. *Journal of Aoac International*, 88(6), 1748-1755.
- Dinç, E., Baleanu, D., 2002. Spectrophotometric quantitative determination of cilazapril and hydrochlorothiazide in tablets by chemometric methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 715-723.
- Dinç, E., Baleanu, D., 2006. A new fractional wavelent approach for the simultaneous determination of ampicillin sodium and sulbactam sodium in a binary mixture. *Spectrochimica Acta Part A* ,63, 631-638.

- Dinç, E., Baleanu, D., Taş, K., 2007. Fractional wavelent analysis of the composite signals of two-component mixture by multivariate spectral calibration. *Journal of Vibration and Control*, 13(9-10), 1283-1290.
- Dinç, E., Bilgili, A., Hanedan, B., 2007. Simultaneous determination of trimethoprim and sulphamethoxazole in veterinary formulation by chromatographic multivariate methods. *Pharmazie*, 62(3), 179-184.
- Dinç, E., Kökdil, G., Onur, F., 2001. Derivative ratio spectra-zero crossing spectrophotometry and LC method applied to the quantitative determination of paracetamol, propyphenazone and caffeine in ternary mixtures. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26, 769-778.
- Dinç, E., Özdemir, A., Aksoy, H., Baleanu, D., 2006. Chemometric approach to simultaneous chromatographic determination of paracetamol and chlorzoxazone in tablets and spiked human plasma. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 29, 1803-1822.
- Dinç, E., Özdemir, A., Aksoy, H., Üstündağ, Ö., Baleanu, D., 2006. Chemometric determination of naproxen sodium and pseudoephedrine hydrochloride in tablets by HPLC. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 54(4), 415-421.
- Dinç, E., Üstündağ, Ö., 2003. Spectrophotometric quantitative resolution of hydrochlorothiazide and spiro lactone in tablets by chemometric analysis methods. *II Farmaco*, 58, 1151-1161.
- Dinç, E., Üstündağ, Ö., 2005. Application of multivariate calibration techniques to HPLC data for quantitative analysis of a binary mixture of hydrochlorothiazide and losartan in tablets. *Chromatographia*, 61, 237-244.
- Dinç, E., Üstündağ, Ö., Özdemir, A., Baleanu, D., 2005. A New application of chemometric techniques to HPLC data for the simultaneous of a two-component mixture. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28, 2179-2194.
- Dinç, E., Baydan, E., Kanbur, M., Onur, F., 2002. Spectrophotometric multicomponent determination of sunset yellow, tartrazin and allura red in soft drink powder by double divisor-ratio spectra derivative, Inverse Least-Squares And Principal Component Regression Methods. *Talanta*, 58, 579-594.
- Dinç, E., Özdemir, A., Baleanu, D., 2005. An application of derivative and continuous wavelent transforms to the overlapping ratio spectra for the quantitative multiresolution of a ternary mixtures of paracetamol, acetylsalicylic acid and caffeine in tablets. *Talanta*, 65, 36-47.
- Dinç, E., Özdemir, A., Baleanu, D., 2005. Comparative study of the continuous wavelent transform, derivative and partial least squares methods applied to

the overlapping spectra for the simultaneous quantitative resolution of ascorbic acid and acetylsalicylic acid in effervescent tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37, 569-575.

- Eren, S., 1993. Kadife Çiçeğinden (*Tagetes L.*) Ekstraksiyon yöntemi ile lutein üretimi. Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 67s, İstanbul.
- Espinosa-Mansilla, A., Muñoz De La Peña, A., Cañada- Cañada, F., González Gómez, D., 2005. Determinations of fluroquinolnes and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in urine by extractive spectrophotometry and photoinduced spectrofluorimetry using multivariate calibration. *Analytical Biochemistry*, 347, 275-286.
- García-Falcón, M.S., Simal-Gándara, J., 2005. Determination of food dyes in soft drinks containing natural pigments by liquid chromatography with minimal clean-up. *Food Control*, 16, 293-297.
- González, M., Gallego, M., Valcárcel, M., 2002. Automatic screening method for the rapid and simple discrimination between synthetic and natural colorants in foods. *Analytica Chimica Acta*, 464, 237-247.
- Güler, Z., 2005. Determination of synthetic colorants in confectionery and instant drink powders consumed in turkey using UV/VIS spectrophotometry. *Journal of Food Quality*, 28, 98-108.
- Hemmateenejad, B., Akhond, M., Samari, F., 2007. A comparative study between PCR and PLS in simultaneous spectrophotometric determination of diphenylamine, aniline and phenol: effect of wavelength selection. *Spectrochimica Acta Part A, Molecular And Biomolecular Spectroscopy*, 67, 958-965.
- Liao, L., Yang, J., Yuan, J., 2007. Process monitored spectrophotometric titration coupled with chemometrics for simultaneous determination of mixtures of weak acids. *Analytica Chimica Acta*, 591, 123-131.
- Longares-Patrón, A., Cañizares-Macías, M.P., 2005. Focused microwaves-assisted extraction and simultaneous spectrophotometric determination of vanillin and p-Hidroxybenzaldehyde from vanilla fragans. *Talanta*, 69(4), 882-887.
- López - Cervantes, J., Sánchez - Machado, D.I., Ríos - Vázquez, N.J., 2006. High performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of retinol,  $\alpha$ -tocopherol and cholesterol in shrimp waste hydrolysate. *Journal of Chromatography A*, 1105, 135-139.
- López - Martínez, L., López – de - Alba, P.L., García -Campos, R., León-Rodríguez,

- L.M.D., 2003. Simultaneous determination of methylxanthines in coffees and teas by UV-Vis spectrophotometry and partial least squares. *Analytica Chimica Acta*, 493, 83-94.
- Ma, M., Luo, X., Chen, B., Su, S., Yao, S., 2006. Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1103, 170-176.
- Miniotti, K.S., Sakellariou, C.F., Thomaidis, N.S., 2007. Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reverse-phase high performance liquid chromatography coupled with diode array detector. *Analytica Chimica Acta*, 583, 103-110.
- Özdemir, A., Aksoy, H., Dinç, E., Baleanu, D., Dermis, S., 2006. Determination of guaifenesin and dextromethorphan in a cough syrup by HPLC with fluorometric detection. *Revue Roumaine De Chimie*, 51(2), 117-122.
- Palabıyık, I.M., Dinç, E., Onur, F., 2004. Simultaneous spectrophotometric determination of pseudoephedrine hydrochloride and ibuprofen in a pharmaceutical preparation using ratio spectra derivative spectrophotometry and multivariate calibration techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34, 473-483.
- Saldamlı, İ., 1998. Gıda kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 520s, Ankara.
- Sardohan, T., 2006. Bazı kinolonların iyonlaşma sabitlerinin su-metanol ve su asetonitril ikili karışımlarında potansiyometrik yöntem ile tayini. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 180s, Isparta.
- Sorouraddin, M.H., Rashidi, M.R., Ghorbani - Kalhor, E., Asadpour - Zeynali, K., 2005. Simultaneous spectrofluorimetric and spectrophotometric determination of melatonin and pyridoxine in pharmaceutical preparations by multivariate calibration methods. *II Farmaco*, 60, 451-458.
- Şener, M., 2006. İçme sularında kalsiyum ve magnezyumun spektrofotometrik metotla simultane tayini ve yapay sınır ağları ile kemometrik analizi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 40s, Isparta.
- Toptan, S., 1999. Sitrik asit ve sakaroz içeren gıdalarda kullanılan ikili boyakarışımlarının analizi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 132s, Ankara.
- Tosun, A., Bahadır, Ö., Dinç, E., 2007. Determination of anomalin and deltoin in seseli resinum by LC combined with chemometric methods. *Chromatographia*, 66, 677-683.
- Uyanık, A., 2008. Analitik kimyacılar için istatistik ve kemometri, 254-259.



- Yıldız, A., Genç, Ö., Enstrümenal analiz, Hacettepe Üniversitesi Yayınları A-64, 1993, ISBN : 975-491-028-6, sayfa 421-438.
- Yongnian, N., Gong, X., 1997. Simultaneous spectrophotometric determination of mixtures of food colorants. *Analytica Chimica Acta*, 354, 163-171.
- Yongnian, N., Huang, C., Kokot, S., 2004. Application of multivariate calibration and artificial neural networks to simultaneous kinetic-spectrophotometric determination of carbamate pesticides. *Chemometrics And Intelligent Laboratory Systems*, 71, 177-193.
- Yongnian, N., Huang, C., Kokot, S., 2003. A kinetic spectrophotometric methods for the determination of ternary mixtures of reducing sugars with the aid of artificial neural networks and multivariate calibration. *Analytica Chimica Acta*, 480, 53-65.
- Yongnian, N., Zhang, G., Kokot, S., 2005. Simultaneous spectrophotometric determination of maltol, ethyl maltol, vanillin, ethyl vanillin in foods by multivariate calibration and artificial neural networks. *Food Chemistry*, 89, 465-473.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Güzide Pekcan Ertokuş

Doğum Yeri ve Yılı: Isparta- 13.04.1980

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce



Eğitim Durumu

Lise: Isparta Gazi Lisesi 1994 - 1998

Lisans: Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi 1998 - 2002

Yüksek Lisans: Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen-Bilimleri Enstitüsü 2002 - 2005

Çalıştığı Kurum ve Yıl

Süleyman Demirel Üniversitesi, Arş.Gör., 2002- devam ediyor.

Yayınları

1. Pekcan, G., Aktaş, A.H., 2006, Spectrophotometric Determination of pKa Values for some Benzoic Acid Compounds in Acetonitrile-Water Mixtures, Asian Journal of Chemistry, Asian Journal of Chemistry, 18(3) 2168-2178.
2. Aktaş, A.H., Pekcan. G., 2006, Simultaneous Spectrophotometric Determination of Tartrazin, Sunset Yellow and Allura Red in Commercial Products by Artificial Neural Network Calibration, Asian Journal of Chemistry, Asian Journal of Chemistry, 18(3) 2025-2031.
3. Aktaş, A.H., Şanlı, N, Pekcan. G., 2006. Spectrometric Determination of pKa Values for Some Phenolic Compounds in Acetonitrile-Water Mixtures, Acta Chimica Slovenica, 53, 214-218.
4. Aktaş, A.H., Şener, M., Ertokuş, G.P.,2006, Artificial neural network calibration for the simultaneous determination of calcium and magnesium in natural waters, Revista De Chimie, 57(12): 1287-1290
5. Aktaş, A.H., Ertokuş, G.P., 2008, Potentiometric determination of ibuprofen, indomethacin and naproxen by artificial neural network calibration, Journal of Serbian Chemical Society, 73(1), 87-95.

6. Ertokuş Pekcan, G., Aktaş, A.H., 2008, Ionization constants and partition coefficient of some anti-inflammatory agents in non-aqueous media, *Asian Journal of Chemistry*,20(4) 3042-3048.
7. Ertokuş Pekcan, G., Aktaş, A.H., 2009, Potentiometric Determination of pKa Values for Benzoic Acid and Substitue Benzoic Acid Compounds in Acetonitrile - Water Mixtures, *Asian Journal of Chemistry*,21(5), 3825-3835.
8. Aktaş, A.H., Ertokuş, G.P., 2010. Spectral Simultaneous Determination of Tartrazin, Allura Red, Sunset Yellow and Caramel in Drink Sample by Chemometric Method. *Reviews in Analytical Chemistry*, 29(2), 107 - 116.
9. Ertokuş, G.P.,Aktaş, A.H.,2010, Determination of Dissociation Constant of Some Substitued Phenols by Potentiometric Method in Acetonitrile-Water Mixtures. *SDU Journal of Science (E-Journal)*, 2010,5(1):60-66.



