

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**BAHARATLARDA KULLANILAN YASAKLI BOYA SUDAN I'IN TAYİNİ İÇİN  
BASİT BİR SPEKTROFLORİMETRİK METOT**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Kimyager OSMAN CAN ÇAĞILCI**

**HAZİRAN 2017**

**TRABZON**



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



**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce**

**Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /**

**Tezin Savunma Tarihi : / /**

**Tez Danışmanı :**

**Trabzon**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

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

**Jüri Üyeleri**

**Başkan :** .....

**Üye :** .....

**Üye :** .....

**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

Gıda boyaları insanoğlunun uzun yıllar önce besinlerde kullanmaya başladığı katkı maddeleridir. Bu boyalar ilk zamanlarda doğal renklendiriciler olarak bitkilerden üretilirken teknolojinin gelişmesiyle birlikte yapay olarak üretilmiştir. Besinlere renk vermenin yanında onların raf ömürlerini uzatmaya yarayan ve kimi zamanda lezzet veren bu boyalar pek çok sağlık sorununu da beraberinde getirmektedir.

Yapılan bu çalışmada, desteğini, bilgisini ve ilgisini benden esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Ümmühan OCAK'a, çalışmalarım esnasında her zaman deneyimlerinden istifade ettiğim sayın Prof. Dr. Miraç OCAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Aynı laboratuvarında çalıştığım arkadaşlarım sayın Yeşim TOPALOĞLU'na, Nurhayat ÖZBEK'e, Tuğba AK'a ve Abidin GÜMRÜKÇÜOĞLU'na teşekkür ederim.

Lisans dönemimden bu yana her anımda yanımda olan, destekçim Elvan VANLI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tüm eğitim-öğretim hayatım boyunca sevgilerini, maddi ve manevi desteklerini ve kıymetli zamanlarını benim için harcayan canım aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca Yüksek Lisans eğitimim boyunca maddi destek aldığım TÜBİTAK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Osman Can ÇAĞILCI

Trabzon 2017

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Baharatlarda Kullanılan Yasaklı Boya Sudan I'nin Tayini için Basit Bir Spektroflorimetrik Metot” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Ümmühan OCAK'ın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneylerle ilgili her bir çalışmayı laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

09/06/2017

Osman Can ÇAĞILCI

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET .....	VIII
SUMMARY .....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ .....	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Gıda Boyaları.....	1
1.1.1. Gıda Boyalarının Tarihi Süreci .....	3
1.2. Uluslararası Numaralandırma Sistemine Göre Gıda Boyalarının Kodları .....	4
1.3. Gıda Boyalarının İnsan Sağlığına Etkileri.....	4
1.4. Gıda Boyalarının Elde Edildikleri Kaynaklara Göre Sınıflandırılması.....	5
1.4.1. Doğal Kaynaklardan Elde Edilen Gıda Boyaları.....	5
1.4.1.2. Doğal Gıda Boyalarının Özellikleri ve Kullanım Alanları.....	6
1.4.2. Sentetik Olarak Elde Edilen Gıda Boyaları.....	7
1.4.2.1. Azo Boyalar .....	7
1.4.1.3. Sudan Boyaları .....	8
1.4.1.4. Sudan Boyalarının Tayini İçin Kullanılan Bazı Yöntemler .....	9
1.5. Ekstraksiyon .....	9
1.5.1. Katı- Sıvı Ekstraksiyonu.....	10
1.5.2. Bitkisel Materyallere Laboratuvarında Uygulanan Ekstraksiyon Teknikleri.....	11
1.6. Moleküler Lüminesans Spektroskopisi .....	12
1.6.1. Floresansın Esası .....	13
1.6.2. Floresans Sönüm .....	14
1.6.3. Floresansı Etkileyen Faktörler.....	15
1.6.4. Florimetre ve Spektrofluorimetre .....	16
1.6.5. Floresans Analiz Cihazı Bileşenleri .....	16

1.6.5.1.	Işın Kaynağı.....	16
1.6.5.2.	Filtre ve Monokromatörler .....	17
1.6.5.3.	Dedektörler .....	17
1.6.5.4.	Hücreler ve Hücre Bölümleri .....	17
1.6.5.5.	Floresent Moleküller.....	17
1.7.	Metot Validasyonu .....	18
1.7.1.	Doğruluk.....	18
1.7.2.	Keskinlik ve Tekrarlanabilirlik.....	18
1.7.3.	Seçimlilik ve Duyarlılık .....	19
1.7.4.	Gözlenebilme Sınırı (GS, LOD).....	19
1.7.5.	Tayin Sınırı (TS, LOQ) .....	19
1.7.6.	Çalışma Aralığı.....	20
1.8.	Floresans Spektrometrisi ile Kantitatif Tayin.....	20
1.8.1.	Dış Kalibrasyon Doğrusu Yöntemi .....	20
1.8.2.	Standart Ekleme Yöntemi.....	20
1.9.	Literatürde Sudan (I-IV) Boyalarının Tayini .....	21
1.10.	Yapılan Çalışmanın Amacı.....	23
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	24
2.1.	Kullanılan Cihazlar ve Diğer Malzemeler.....	24
2.2.	Kullanılan Kimyasallar.....	24
2.3.	Analitik Çalışmalar.....	25
2.4.	Numunelerin Hazırlanması.....	25
2.4.	Ölçüm Şartları .....	26
2.5.	Sudan I Boyasının Tayini İçin Önerilen Metot .....	26
2.6.	Sabit Sudan I Konsantrasyonunun Optimizasyonu .....	27
3.	BULGULAR .....	28
3.1.	Artan Konsantrasyon ile Sudan I'in Floresans Spektrumundaki Değişim.....	28
3.2.	Sudan I için Doğrusal Aralık.....	28
3.3.	Sudan I Tayini İçin Uygulanan Modifiye Standart Ekleme Yöntemi .....	30
3.4.	Kırmızı Pul Biber Numunesinde Sudan I'in Tayini .....	30
3.5.	Sumak Numunesinde Sudan I'in Tayini.....	32
3.6.	Kimyon Numunesinde Sudan I'in Tayini.....	34
3.7.	Sudan I Tayini İçin Metot Validasyonu .....	36

3.7.1.	Doğrusal Aralık .....	36
3.7.2.	Gözlenebilme Sınırı (GS, LOD) ve Tayin Sınırı (TS, LOQ) .....	36
3.7.3.	Doğruluk.....	37
3.7.4.	Kesinlik.....	37
4.	TARTIŞMALAR.....	38
5.	SONUÇLAR.....	42
6.	KAYNAKLAR.....	43

ÖZGEÇMİŞ





Yüksek Lisans Tezi

## ÖZET

### BAHARATLARDA KULLANILANYASAKLI BOYA SUDAN I'İN TAYİNİ İÇİN BASİT BİR SPEKTROFLORİMETRİK METOT

Osman Can ÇAĞILCI

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı  
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ümmühan OCAK  
2017, 48 Sayfa

Bu çalışmada baharatlarda kullanılan yasaklı Sudan I boyasının tayini için bir spektrofotometrik metot geliştirilmiştir. Geliştirilen metotta modifiye bir standart ekleme yöntemi kullanılarak kırmızı pul biber, sumak ve kimyon numunelerinde Sudan I tayini yapılmıştır. Çalışmada kullanılan gıda numuneleri yerel marketlerden temin edilmiştir. Önerilen metotta çözücü olarak toksik olmayan etanol kullanılmıştır. Numunelere değişen miktarlarda Sudan I boyası spayk edilmiş ve etanolle ekstrakte edilerek analize hazırlanmıştır. Geliştirilen metodun doğrusal aralığı, doğruluğu, gözlenebilme sınırı (LOD), tayin sınırı (LOQ) ve kesinliği belirlenerek metot valide edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Sudan I, spektrofotometre, kırmızı pul biber, sumak, kimyon.

Master Thesis

## SUMMARY

### A SIMPLE SPECTROFLUORIMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF THE BANNED SUDAN DYE I IN SPICES

Osman Can ÇAĞILCI

Karadeniz Technical University  
Institute of Natural Sciences  
Department of Chemistry  
Supervisor: Prof. Dr. Ümmühan OCAK  
2017, 48 Pages

In this study, a spectrofluorimetric method was developed for the identification of the banned Sudan I dye in spices. Sudan I was applied to red pepper, sumac and cumin samples using a modified standard addition method in the developed method. Food samples used in the study were obtained from local markets. Non-toxic ethanol was used as solvent in the proposed method. The samples were spiked with varying amounts of Sudan I and analyzed by ethanol extraction. The method has been validated by determining the linear range, accuracy, detection limit (LOD), detection limit (LOQ) and accuracy of the developed method.

**Key Words:** Sudan I, spectrofluorimetric, red pepper, sumac, cumin.

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Gıda katkı maddelerinin ilk kez kullanımı .....	3
Şekil 2. Sudan I, II, III ve IV boyalarının molekül yapıları .....	9
Şekil 3. Katı-sıvı ekstraksiyon şeması .....	10
Şekil 4. Elektronik yapıların gösterimi.....	13
Şekil 5. Jablonski diyagramı.....	14
Şekil 6. Floresans cihazı bileşenleri .....	16
Şekil 7. Bazı floresent gruplar .....	18
Şekil 8. Artan konsantrasyonlarda Sudan I'in etanoldeki floresans spektrumları.....	28
Şekil 9. Artan Sudan I konsantrasyonu ile 330 nm'deki floresans şiddetinin değişimi ....	29
Şekil 10. Sudan I tayini için doğrusal aralık.....	29
Şekil 11. Sudan I tayini için uygulanan modifiye standart ekleme yöntemi .....	30
Şekil 12. Kırmızı pul biberde Sudan I tayini için modifiye standart ekleme yöntemi .....	31
Şekil 13. Kırmızı pul biberde Sudan I tayini için kullanılan çözeltilerin floresans spektrumları.....	31
Şekil 14. Kırmızı pul biberde Sudan I tayini için çizilen modifiye standart ekleme grafiği .....	32
Şekil 15. Sumakta Sudan I tayini için modifiye standart ekleme yöntemi.....	33
Şekil 16. Sumakta Sudan I tayini için kullanılan çözeltilerin floresans spektrumları.....	33
Şekil 17. Sumakta Sudan I tayini için çizilen modifiye standart ekleme grafiği .....	34
Şekil 18. Kimyonda Sudan I tayini için modifiye standart ekleme yöntemi.....	35
Şekil 19. Kimyonda Sudan I tayini için kullanılan çözeltilerin floresans spektrumları .....	35
Şekil 20. Kimyonda Sudan I tayini için çizilen modifiye standart ekleme grafiği.....	36

## TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. AB ve ABD yetkili kuruluşları tarafından onaylanan bazııda boyaları .....	6
Tablo 2. Numuneler için Sudan I boyasının analiz sonuçları .....	37
Tablo 3. Sudan I tayini için önerilen spektroförimetrik yöntemin özellikleri .....	39
Tablo 4. Baharatlarda sudan I tayini için literatürdeki yöntemler ve önerilen yöntemin karşılaştırılması .....	40



## SEMBOLLER DİZİNİ

%BSS:	Bağıl Standart Sapma
AB:	Avrupa Birliği
ABD:	Amerika Birleşik Devletleri
F:	Floresans Şiddeti
FAO:	Gıda ve Tarım Örgütü
JECFA:	Gıda Katkı Maddeleri için Ortak Uzmanlar Komitesi
LOD:	Gözlenebilme Sınırı (Limit of Detection)
LOQ:	Tayin Sınırı ( Limit of Quantification)
$\mu\text{g/mL}$ :	Mikrogram/mililitre
M.Ö. :	Milattan Önce
nm:	Nanometre
$R^2$ :	Korelasyon Katsayısı
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Gıda Boyaları

Çağımızda besinlerin üretim ve tüketimi arasındaki ilişki gıda katkı maddelerinin kullanımını bir zorunluluk olarak ortaya koymaktadır. Teknolojinin gelişmesiyle birlikte gıda endüstrisindeki üretim faaliyetleri artmış, bu durum da gıda katkı maddelerinin kullanımını yaygınlaştırmıştır. Çalışan nüfusun giderek artması, beslenme alışkanlıklarının değişmesi ve besin hazırlarken fazla vakit harcamama isteği de bu katkı maddelerinin kullanılmasını kaçınılmaz kılmıştır. Mevsimlik gıdaların her daim tüketilmek istenmesi, ürünlerin piyasada daha uzun kalmasını sağlamak amacıyla raf ömürlerinin uzatılması ve tüketicilerin bilinçlenmesi gıda sanayisinde kullanılan tekniklerin yanında gıda katkı maddelerinin de kullanımını zorunlu hale getirmiştir [1].

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'ne göre gıda katkı maddeleri şöyle tanımlanmaktadır: Tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıda ham maddesi olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan, seçilen teknoloji gereği kullanılan maddelerdir. Ayrıca işlem veya imalat sırasında kalıntı ve türevleri mamul maddede bulunabilen, gıdanın üretilmesi, tasnifi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması sırasında gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek veya istenmeyen değişikliklere engel olmak ve düzeltmek amacıyla tercih edilen maddelerdir [2].

Besinlerde kullanılan gıda katkı maddelerinin beslenme kalitesini sağlaması, işlenmeye yardımcı olması ve üründe dayanıklılığı artırması aranan özelliklerdir. Bir katkı maddesi gıdalarda yapılan üretim hatalarını gizlememeli, tüketicileri kandırmamalı ve besin değerini düşürmemelidir [3]. Ayrıca kullanılan katkıların analiz edilebilir olması ve analiz sonuçlarının ölçülebilir olması gerekmektedir [4].

Bazı gıda katkı maddelerine duyarlı olan insanlar çeşitli reaksiyonlar verebilirler. Avrupa'da yapılan araştırmalara göre nüfusun %0,03-0,10'unun katkı maddelerine karşı duyarlı olduğu saptanmıştır. Öyle ki, bu gıda katkı maddeleri deri dökülmesi, astım, migren ve hiperaktiviteye yol açabilirler [3].

Gıda katkı maddeleri üzerine yapılan ilk sistematik çalışma 1956 yılında WHO (Dünya Sağlık Örgütü) ve FAO (Gıda ve Tarım Örgütü) tarafından 43 ülke üzerinde

yapılmıştır. Çalışmada 200 adet kimyasal maddenin gıdalarda katkı maddesi olarak kullanıldığı tespit edilmiştir. 1962 yılında FAO ve WHO kuruluşlarının uzman araştırmacıları tarafından JECFA (Gıda Katkı Maddeleri için Ortak Uzmanlar Komitesi) oluşturulmuştur. JECFA; günümüzde de katkı maddesi olarak kullanılan her türlü kimyasal madde için toksikolojik çalışmaların düzenlenmesini ve sonuçlarının değerlendirilmesini üstlenmiştir [5].

Yaygın olarak kullanılan gıda katkı maddelerinden biri renk katkı maddeleridir. Bu katkı maddeleri başlangıçta doğal yollarla elde edilirken, ilerleyen süreçlerde sentezlenerek yapay olarak elde edilmeye başlanmıştır.

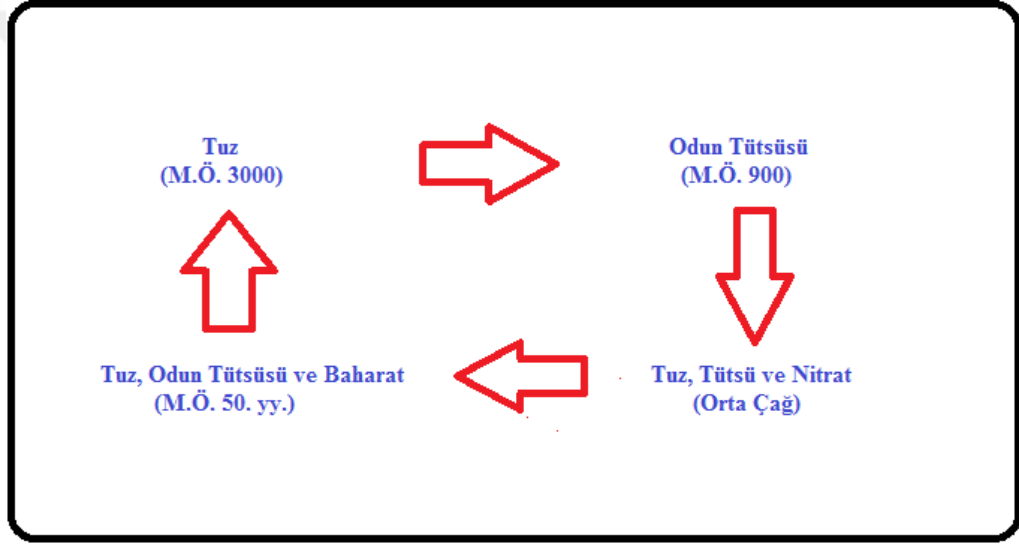
Renk katkı maddeleri gıda sanayisinde birçok amaç için kullanılırlar. Bu katkılar besinlerde istenilen rengi sağlamaya, ürüne özgü rengi korumaya veya yoğunlaştırmaya, lezzet değerini artırmaya, renk değişimini engelleyerek görünüşü standart hale getirmeye, süsleyici özellikler kazandırarak daha cazip ürünler meydana getirmeye ve çeşitli renkte ürünler oluşturmaya yardımcı olurlar [6].

Kullanımına izin verilen gıda boyalarının sayısı ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir. Örneğin; İskandinav ülkelerinden Norveç ve İsveç sırasıyla 1978 ve 1980 yıllarında her türlü sentetik boyanın gıda maddelerine katılmasını tamamen yasaklarken, Avusturya’da, 8’i sentetik olmak üzere toplam 27 boyaya müsaade etmektedir [7]. Ülkemizde de gıda boyalarının kullanılmasına ilişkin kurallar Sağlık Bakanlığı’na belirlenmektedir. Bu doğrultuda “Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği” hazırlanmıştır. Türkiye’de Sağlık Bakanlığı tarafından oluşturulmuş Gıda Katkıları Teknik Komisyonu, Kodeks Alimentarius Komisyonu raporları, AB mevzuatı ve çeşitli ulusal gıda yasalarını değerlendirmiştir [8].

Ülkeler tarafından birçok önlemler alınmasına ve cezai yaptırımlar uygulanmasına rağmen besinlere zararlı boyar maddelerin katılması kötü niyetli üreticilerin vazgeçemediği bir durumdur. Çünkü gıdaların albenisini artıran özelliği rengidir. Her gıdanın alışılmış bir rengi vardır ve tüketiciler tarafından ilk aşamada dikkati çeken aynı rengin mevcudiyetidir. Ancak gıda maddeleri fabrikalar gibi üretim merkezlerinde birçok işleme maruz bırakılmakta ve dolayısıyla renk kaybı yaşanmaktadır. Yine ürünlerin taşınması ve depolanması esnasında geçen sürede renk değişimleri oluşabilmektedir [9]. Tüm bu sebeplerle rengi değişen ürünler tüketiciler tarafından tercih edilmemektedir.

### 1.1.1. Gıda Boyalarının Tarihi Süreci

Gıdalarda kimyasal madde kullanımının tarihsel süreci incelendiğinde, M.Ö. 3000 yıllarında et ürünlerini saklamak için tuzun kullanıldığına, M.Ö. 900 yıllarında ise odun tütsüsünün kullanıldığı bilgisine ulaşılmaktadır. İlerleyen zamanlarda ise etin rengini olumlu yönde değiştirmek amacıyla nitratın da kullanıldığı bilinmektedir [10]. Yine 3500 yıl önce gıda katkı maddesi olarak boyar maddeleri kullanan Mısırlılar, Khand adını verdikleri renkli şekerler üretmişlerdir. Daha sonra Hindistan ve Çin’de deriler, sebze ve baharat özleriyle boyanarak ticarete sunulmuştur [11].



Şekil 1. Gıda katkı maddelerinin ilk kez kullanımı [12].

Teknolojinin gelişmesiyle birlikte yeni katkı maddeleri hayatımızda büyük bir yer edinmeye başlamıştır. Tatlandırıcılar, renklendiriciler ve lezzet verici katkı maddeleri cazip görünmelerine karşın insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Her zaman daha iyisini ve daha güzelini arzu eden insanoğlu zamanla gıdaların genetik yapısını bile değiştirip bozmaya başlamıştır. Gıdaların tohumuna, çekirdeğine ve hatta hücrelerine kadar inen ve onları değiştirmeyi amaçlayan bu gıda endüstrisi birçok hastalığa zemin oluşturmaktadır.

Gıda katkı maddelerinden en çok kullanılanı ise şüphesiz boyar maddelerdir.



Sokaktaki bakkaldan, büyük marketlere kadar gıda satışı yapan tüm yerlerde renklendirilmiş gıdalara rastlanmaktadır.

Gıda boyalarının geçmişine bakıldığında ilk olarak hayvan ve bitkilerden doğal yollarla elde edilen boyalar zamanla sentetik olarak elde edilmeye başlanmıştır. Üretilen ilk sentetik boya siyah anilinden elde edilmiştir. Sir William Henry Perkins tarafından 1856 yılında üretilen bu boya, endüstri haline gelen gıda boyar madde üretiminin temelini oluşturmaktadır [12].

## **1.2. Uluslararası Numaralandırma Sistemine Göre Gıda Boyalarının Kodları**

Avrupa Birliği'nde kullanımına izin verilen maddeler "European" kelimesinin baş harfi olan E kodu alırlar. Bütün gıda katkı maddelerinin uluslararası alanda kabul görmüş bir numarası vardır. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde çeşitli amaçlarla kullanılan yaklaşık üç yüz civarında gıda katkı maddesi yer almaktadır.

Gıda katkı maddelerinin E kodu sınıflandırmasına göre; renklendiriciler; E100- E180; koruyucular; E200- E285, E330; antioksidanlar; E300 – E321; kalınlaştırıcı, jelleştiriciler; E400 – E495; tatlandırıcılar; E950 – E959 şeklinde adlandırma yapılmıştır [13].

Gıda renkleri sadece verilen E numarası ile değerlendirilir ve bu numaralar Avrupa güvenlik onayını gösterir. İzinli gıda boyar maddeleri için kullanışlı bir etiketleme modelidir. Gıda renklerinin spesifik isimleri veya E numaralarıyla gıda bileşenleri etiketinde bulunması, tüketicilerin bilinçli seçim yapmalarını sağlar [14].

## **1.3. Gıda Boyalarının İnsan Sağlığına Etkileri**

Yasaklanan gıda renklendiricileri kesinlikle toksik ve kansere sebep olan maddelerdir. Diğer renklendiriciler ise hassas kişilerde genellikle deri dökülmeleri, astım ve alerji gibi rahatsızlıklara sebebiyet verebilir [15].

Shaywitz, 1997 yılında çocuk yiyeceklerinde kullanılan gıda boyalarından mavi, kırmızı, yeşil, turuncu ve sarı renklerin zararlarını tespit etmek için bir dizi çalışma yapmıştır. Çalışma neticesinde bu gıda boyalarının çocuklarda hiperaktivite oluşturduğu ve sıçanlarda yapılan deneyde hiperaktiviteyi tetiklediği görülmüştür. Yine aynı araştırmacı tarafından yapılan bir çalışmada hiperaktivite ve dikkat eksikliği gibi davranışları gösteren

çocukların diyetlerinden sentetik boyalar kaldırıldığında çok belirgin gelişmeler olduğunu ileri sürmüştür. Ayrıca bu gıda boyalarının bazı test hayvanlarında üremeyi dönüşümlü olarak inhibe ettiği görülmüştür [16].

#### **1.4. Gıda Boyalarının Elde Edildikleri Kaynaklara Göre Sınıflandırılması**

Gıda boyaları, doğal kaynaklardan ve sentetik olarak elde edilenler şeklinde ikiye ayrılmaktadır.

##### **1.4.1. Doğal Kaynaklardan Elde Edilen Gıda Boyaları**

Doğal boyalar bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilen maddelerdir. Gıdalarda doğal halde bulunan bu renklendiriciler, farklı kimyasal özelliklerinden dolayı bir kısmı suda çözünürken pek çoğu ise suda çözünmemektedir. Doğal boyalar ısı, sıcaklık, pH gibi etkilere maruz bırakıldıklarında kararlılıkları çok düşüktür ve gıdalarda kullanımları çeşitli sorunlara yol açabilir. Ancak bu olumsuzluklara rağmen yapılan araştırmalar sonucu bu renklendiricilerin sağlık üzerine olumlu etkiler yaptığı görülmüştür [17].

Doğal olarak elde edilen boya maddelerinden en önemli olanları safran, roko boyası, havaciva, klorofil, karamel, zerdeçal, sumak, kızkök boyası, karoten ve karotenoidlerdir [18].

Doğal boyalar, doğal yollarla elde edilmelerine karşın insan sağlığına olumsuz etkiler de gösterebilirler. Bu nedenle pek çok uluslararası kuruluş bu boyaları incelemekte ve bu boyaların kullanımına ilişkin raporlar yayımlamaktadır. Tablo 1'de AB ve ABD yetkili kuruluşları tarafından onaylanan bazı gıda boyaları gösterilmiştir.

Tablo 1. AB ve ABD yetkili kuruluşları tarafından onaylanan bazıgıda boyaları [19].

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

Doğal olarak oluşan başlıca pigmentler antosiyaninler, karotenoitler, klorofiller olarak üç grup altında incelenmektedir. Bunlara ilave olarak betalainler, naftokinonlar, fikosiyaninler, iridoitler, antrokinonlar, hayvansal pigmentler, karamelizasyon ve maillard reaksiyonları sonucu oluşanlar da bilinmektedir [20].

#### 1.4.1.2. Doğal Gıda Boyalarının Özellikleri ve Kullanım Alanları

Son yıllarda gıda boyaları üzerine birçok çalışma yapılmıştır. 1990-1995 yılları arasında alınmış patent sayısı 1969-1976 yılları arasında elde edilenden daha fazladır. Doğal boyalara ait patent sayısı da sentetik boyalara ait olandan 5 kat daha fazladır. Tek başına klorofile ait patent sayısı bile 16'dan çoktur [21]. Her ne kadar sentetik renk maddeleri doğal renklendiricilerin yerini almış olsa da, çok bilinen bazı doğal boyalar ilaç, kozmetik ve gıda sektöründe hala kullanılmaktadır. Bu maddeler, 1960 yılında ABD Gıda

ve İlaç Kozmetik Yasası'nda yapılan değişiklik ile sertifikalı maddeler listesinden çıkartılarak, sürekli kullanılma ihtimali olan maddeler listesine aktarılmıştır [22].

### 1.4.2. Sentetik Olarak Elde Edilen Gıda Boyaları

Sentetik boyalar potansiyel olarak daha toksik maddeler oldukları için resmi kurumlar tarafından kullanım alanları sınırlandırılmıştır [23]. Buna rağmen sentetik boyaların doğal boyalara göre pek çok avantajı bulunmaktadır. Bunlar;

- Sentetik boyalar, iyi çözünmeleri, yoğun renkler vermeleri, ısı işlemlere dayanıklı olmaları ve geniş renk tonlarına sahip olduklarından dolayı üreticiler tarafından daha çok tercih edilmektedir [24]. Bunun yanında, yapay renklendiricilerin kararlılığı ısı, ışık, tuz, asit, pH ve koruyucular gibi faktörlerden etkilenebilmektedir [25].
- Doğal gıda boyalarının bileşimleri, kullanılan bitkinin türü, mevsimler ve coğrafi özelliklere göre değişiklik gösterirken sentetik boyalarda böyle bir dezavantaj sözü konusu değildir. Bu yüzden doğal kaynaklar tarafından elde edilen boyalarda her seferinde aynı standardı yakalamak mümkün değildir. Yine doğal boyaların renk katma özellikleri de yapay boyalara göre daha düşüktür [26].
- Sentetik boyaların üretim masrafları doğal boyalardan daha düşüktür [27].

#### 1.4.2.1. Azo Boyalar

Azo boyalar, sentetik renklendiricilerin önemli bir sınıfını oluştururlar. Bu boyalar, gıda maddeleri, tekstil, katkı maddeleri, plastik, oyuncak, ilaç ve kozmetik ürünlerinde yaygın olarak kullanılırlar. Azo boyalar; N=N kromofor grubu ya da azo bağı ile karakterize edilmektedirler. Adlandırmaları yapılırken azo bağlarının sayısına bakılır ve monoazo, diazo ve poliazo diye adlandırılırlar [28].

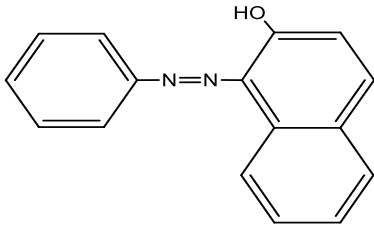
Azo boyalar diazolaştırılan aromatikaminin başka bir naftol veya amin fenolle birleşmesinden elde edilir. Bunlardan bazik amin veya dialkil amin grubu ihtiva edenlere bazik azo boyar maddeleri, en az bir sülfü grubu içerenlere ise asidik azo boyar maddeleri denilir. İlk keşfedilen asidik azo boyar maddesi  $\beta$ -naftoloranjdir. Bazik azo boyar madde olarak ilk keşfedilen ise aminoazo-benzendir [29].

Endüstriyel olarak kullanılan sentetik renklendiricilerin yaklaşık %50'lik bölümünü ve dispers boyamada kullanılan renklendiricilerin de yaklaşık %80'lik kısmını azo boyar maddeleri oluşturmaktadır. İlk zamanlarda azo grupları; benzen ve naftalin halkalarına bağlı olmalarına rağmen son yıllarda aromatik heterosiklik halkalara ve enol tipinde alifatik halkalara da bağlı azo grubu içeren sentetik boyar maddeler de sentezlenmiştir [30].

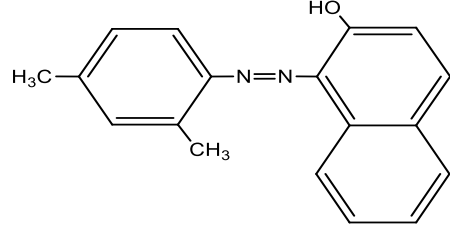
Yapılan deneysel çalışmalar sonucu azo boyaların gıdalarda kullanımına yasalar doğrultusunda belirli sınırlar getirilmiştir. Bu boyaların gıdalarda kullanımına getirilen limit değerler boyar maddenin türüne ve yapısına göre farklılıklar göstermektedir. Sunset Yellow, Allura Red ve Ponceau 4 gibi sentetik gıda boyalarının yasal limitler kapsamında kullanımına izin verilirken Sudan I-IV gibi azo boyaların kullanımına hiçbir şekilde izin verilmemektedir [31].

#### **1.4.1.3. Sudan Boyaları**

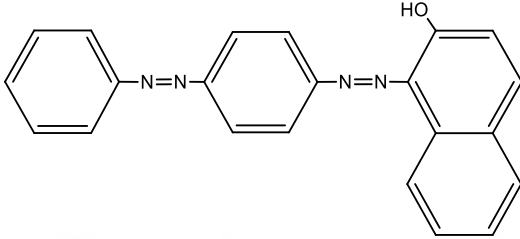
Sudan boyaları endüstride renklendirici sentetik azo boyar maddeleri olarak kullanılırlar. Ancak sudan boyalarının gıdalarda kullanımı kanserojen oldukları gerekçesiyle yasaklanmıştır. Bu boyalar doğrudan karaciğer hücrelerinde etkili olarak toksik karaciğer hastalığına neden olabilen aromatik aminlere indirgenir ve aynı zamanda hücrede mutasyona sebebiyet verebilirler [32]. Bu olumsuz etkilerinden dolayı AB ülkeleri ve ABD'de yasaklanan sudan boyaları yine bu bölgelerde sıkı bir denetim altındadır [33]. 2003/460/AB sayılı Komisyon Kararına göre tüm biber ve biber ürünlerinde ve palm yağlarında Sudan I, II, III ve IV boyalarının olmadığına dair sertifika alma zorunluluğu vardır [34-35]. Bütün bu kontrol ve denetlemelere rağmen Avrupa Birliği Gıda ve Yem için hızlı alarm sistemi tarafından pek çok gıdada bu boyaların varlığı tespit edilmiştir [36]. Yaygın kullanılan Sudan boyalarının açık yapıları Şekil 2'de verilmiştir.



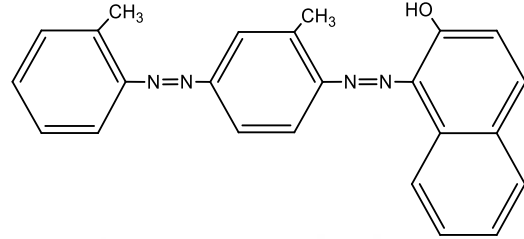
**Sudan I** (1-fenilazo-2-naftol)



**Sudan II** (1-[(2,4-dimetilfenil)azo]-2-naftalenol)



**Sudan III** (1-[(4-(fenilazo)fenil)azo]-2-naftalenol)



**Sudan IV** (1-2-metil-4-[(2-metilfenil)azo]-2-naftalenol)

Şekil 2. Sudan I, II, III ve IV boyaalarının molekül yapıları

#### 1.4.1.4. Sudan Boyalarının Tayini İçin Kullanılan Bazı Yöntemler

Gıda maddelerinde Sudan boyaalarının tespiti için birçok sistem geliştirilmiştir. Bu sistemler içinde en yaygın olanı ise yüksek performanslı sıvı kromatografisidir [37]. Son yıllarda elektroanalitik teknikler [38] ve UV-Visible,  $^1\text{H-NMR}$  ve Raman [39] gibi spektroskopik yöntemlerle de sudan boyaalarının analizleri yapılmaktadır. Floresans spektroskopisi de sudan boyaalarının belirlenmesinde kullanılan önemli bir spektroskopik yöntemdir [40].

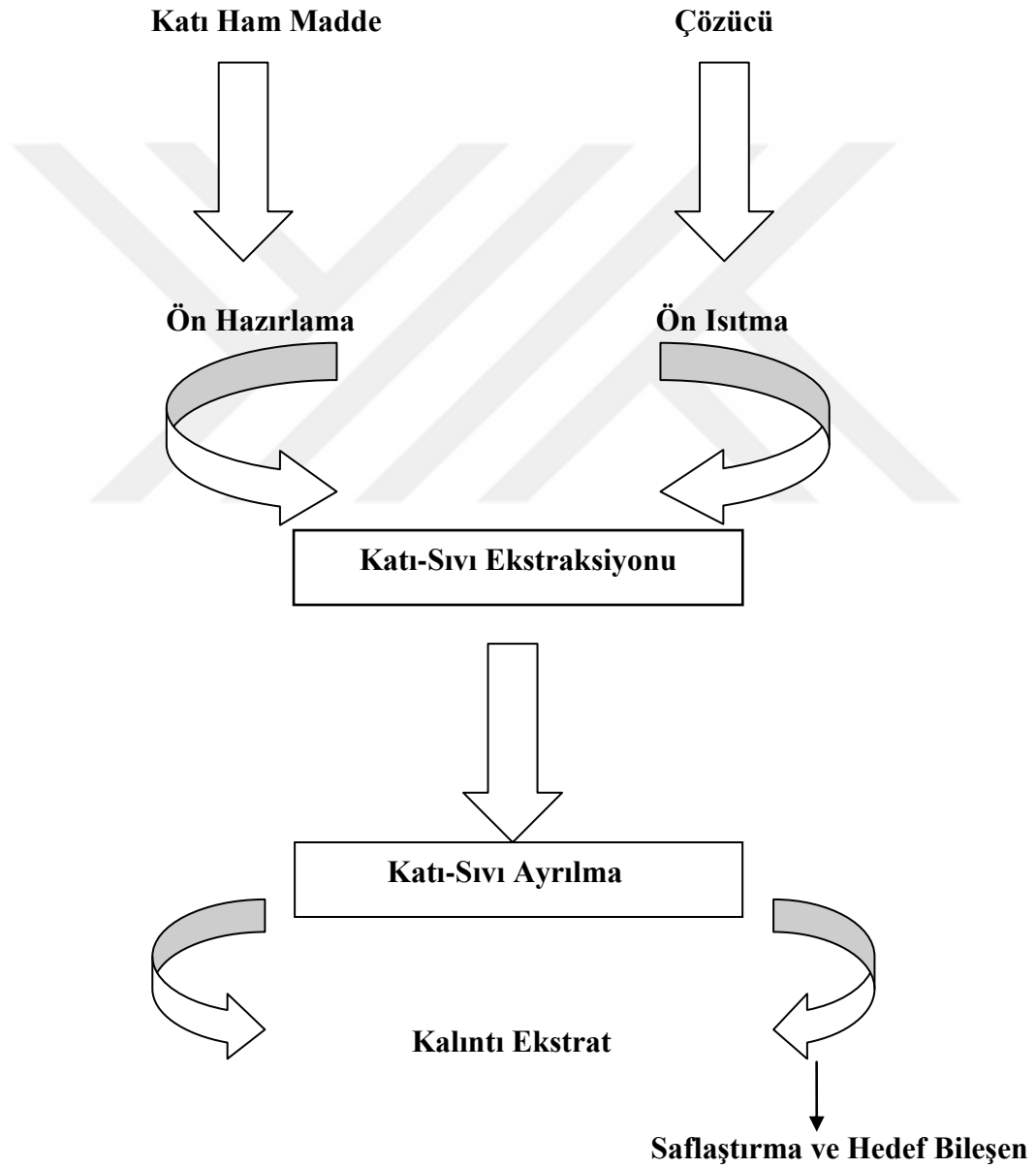
Floresans spektroskopisi hızlı, hassas ve maddeye zarar vermeyen bir analitik tekniktir. Son yıllarda floresans spektroskopisi gıdaların doğrudan analizi için kullanılmaktadır [41].

### 1.5. Ekstraksiyon

Ekstraksiyon; herhangi bir karışımdan istenilen maddeyi seçimli olarak çözünebildiği bir çözücünden, onunla temas halinde olan diğer bir çözücü içerisine taşınması işlemidir [42].

### 1.5.1. Katı- Sıvı Ekstraksiyonu

Katı-sıvı ekstraksiyonu, katı maddelerden biyoaktif maddelerin elde edilmesinde kullanılan çok eski bir işlemdir. Mezopotamya’da yapılan kazı çalışmalarında M.Ö. 3500 yıllarında kozmetik ve tıbbi alanda kullanılan bitki ekstraktlarına rastlanmıştır. Ayırma işlemlerinde kullanılan en yaygın yöntem katı-sıvı ekstraksiyonudur. Katı-sıvı ekstraksiyonuna ait şema Şekil 3’te verilmiştir [43].



Şekil 3. Katı-sıvı ekstraksiyon şeması [42].

Ekstraksiyon işlemini kısa sürede ve yüksek ekstrakt verimi ile sonuçlandırmak için hedef maddenin seçilen çözücünde çok iyi çözülmüş olması gerekmektedir. Ekstraksiyon verimini etkileyen en önemli etkenlerden birisi kullanılan çözücünün akış hızı ve viskozitesidir [44]. Katı-sıvı oranı ve partikül boyutu da ekstrakt verimini etkileyen önemli parametrelerdendir. Küçük partiküllerin yüzey alanları fazla olduğu için, katı ve sıvı arasındaki temas fazla olur, yüzeye ulaşan difüzyon yolu ortadan kalkarak hızlı bir ekstraksiyon meydana gelir. Katı-sıvı ekstraksiyonunu etkileyen diğer parametreler ise sıcaklık, katının hazırlanması ve malzemenin nemliliğidir [45].

Katı-sıvı ekstraksiyonunda çözücü seçimi çok önemlidir. Çözücünün fizikokimyasal özelliklerine, toksisitesine ve maliyetine bakılarak en uygun olanı seçilir. Çözücü seçimi arayüzey gerilimi, kararlılık, reaktivite, viskozite ve maliyet gibi özelliklerin yanı sıra çözünen maddenin çözünürlüğüne ve seçimliliğine bağlıdır. Bazı organik çözücüler toksisiteyi yüzünden, gıda endüstrisinde sınırlı olarak kullanılmalıdır. Gıda İlaç Dairesine (FDA) göre, aseton, etanol, etilasetat ve 1-propanol gibi çözücülerin küçük miktarda yüzdeleri kullanılabilir ve bu çözücüler üçüncü sınıf çözücülerdir. Asetonitril, kloroform, toluen, hekzan, metanol, etil metil keton ve diklorometan toksisiteyi sebebiyle ikinci sınıfa girmektedir. Birinci sınıf çözücüler ise çevreyi tahrip eden ve aşırı toksisitesi olan benzen, karbon tetraklorür, 1,2-dikloroetan ve 1,1-dikloroetan'dır [46].

### **1.5.2. Bitkisel Materyallere Laboratuvarda Uygulanan Ekstraksiyon Teknikleri**

Geleneksel olarak kullanılan yöntemler maserasyon, kinetik maserasyon, perkolasyon, geri döngülü sürekli ekstraksiyon (Soxhlet) ve süperkritik akışkan ekstraksiyondur [47].

Maserasyon; uygun çözücü içerisine alınan numunenin belirli bir süre oda sıcaklığında bekletilmesidir. Hammaddenin çözücü içerisinde karıştırılmasıyla yine oda sıcaklığında gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemine ise kinetik maserasyon adı verilir. Maserasyon işlemi oldukça yaygın kullanılmaktadır [48].

Perkolasyon; porselen, cam, paslanmaz çelik gibi maddelerden yapılmış perkolatör adı verilen tanklarda uygulanmaktadır. Bu ekstraksiyon yöntemindeki esas, hammaddenin içinden sürekli olarak çözücü geçirilmesidir [48].

Soxhlet yöntemi uzun süredir kullanılan standart bir yöntemdir ve katı-sıvı ekstraksiyon metotlarının performansını belirlemede referans olarak kullanılmaktadır [49].



Bu sistemde numune hazne içine yerleştirilir ve bir balon içerisine çözücü konularak ısıtıcıya yerleştirilir. Kaynama başladığı an çözücü çıkış borusundan çözücü buharları yükselmeye başlar, soğutucuda yoğunlaşarak hammadde üzerinde birikmeye başlar. Ekstraktördeki çözücü seviyesi sifon borusu seviyesine geldiği zaman sifon gerçekleşir ve ekstre balona döner. Bu şekilde işlem ekstraksiyon tamamlanıncaya kadar belli miktar çözücü ile devam eder [50].

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu, bitkilerden uçucu bileşenlerin, hoş kokulu bileşiklerin ve esansiyel yağların endüstriyel çapta ekstraksiyonunda uzun yıllardır kullanılmaktadır [51].

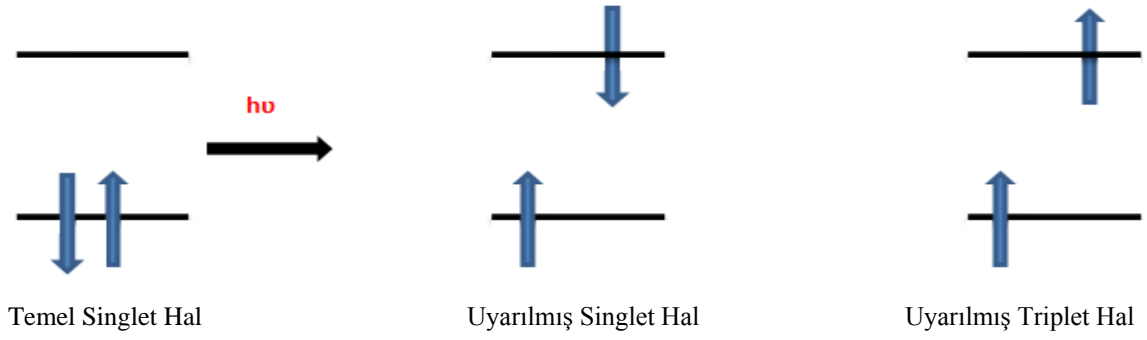
### **1.6. Moleküler Lüminesans Spektroskopisi**

Temel enerji düzeyindeki bir molekül, uyarıldığında bir üst enerji seviyesine yükselir. Bu molekül tekrar temel enerji düzeyine dönerken enerjisinin bir kısmını ya da tamamını ışımaya enerjisi olarak geri verir. Bu olaya emisyon ya da lüminesans adı verilir [52].

Moleküler floresans, moleküler fosforesans ve kemilüminesans maddenin birbirine yakın üç ayrı fiziksel özelliğidir. İlk iki metotta maddenin çözeltisine ışın enerjisi gönderilerek uyarılması sağlanır. Uyarılan bu maddenin aldığı enerjiyi geri vererek ilk haline dönmesi esnasındaki davranışları incelenir. Böylece madde hakkında kalitatif ve kantitatif değerlendirmeler yapılır. Maddeyi uyararak için gönderilen ışınlar; ultraviyole, görünür alan ve infrared ışınlarıdır. Bu ışınlar madde tarafından kısa bir süre absorplanır ve daha sonra floresans ve fosforesans ışınları halinde yayılırlar [53].

Madde tarafından absorplanan bir ışımaya, aynı veya daha uzun dalga boyunda bir ışımaya olarak geri verilir. Bu olaya fotolüminesans denir. Floresans ve fosforesans olmak üzere ikiye ayrılır. Bir ışın maddeye gönderildiğinde floresans özelliği başlar ve ışın kesildiği anda bu özellik kaybolur. Fosforesans özelliği ise maddeye ışın gönderildiği anda başlar ve gönderilen ışın kesildiği halde bir süre devam eder [54].

Ultraviyole ve görünür bölge ışınının bir molekül tarafından absorpsiyonu, bir elektronun, başlangıçta düşük enerjili ve dolu elektronlu orbitalden, daha yüksek enerjili ve boş bir orbitale geçerek uyarılmış olmasıdır [55]. Moleküllerin uyarılmış halleri kararsız olduğu için temel hallerine dönmek isterler. Bu dönüş sırasında sistemin aldığı enerjiyi ısı olarak verdiği ışımsız geçişler vardır. Floresans ve fosforesans ise ışımlı geçişlerdir [56].



Şekil 4. Elektronik yapıların gösterimi [55].

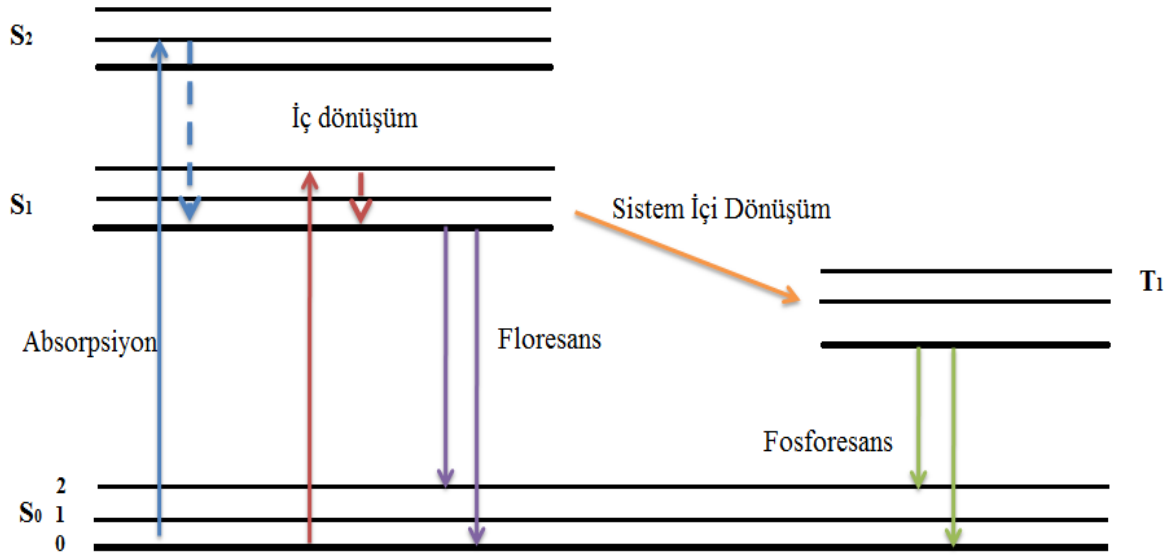
Singlet uyarılmış halden temel singlet hale geçişi floresans, triplet uyarılmış halden singlet temel hale geçişe ise fosforesans ifade etmektedir (Şekil 4). Elektron spinleri singlet uyarılmış halde iken zıt yönlü, triplet uyarılmış halde iken paralel olarak yönlendirilmiştir [55].

### 1.6.1. Floresansın Esası

Floresans, yaygın olarak kullanılan lüminesans işlemlerinden biridir. Floresans olayında molekül, mekaniksel, kimyasal ya da fiziksel mekanizmalar sonucu oluşturulan uyarılmış halden elektriksel olarak ışın yayar [57].

Elementel parçacıkların tamamına yakını oda sıcaklığında temel halde bulunurlar. Jablonski diyagramında (Şekil 5) molekülün ışını absorplaması sonucu oluşacak fotofiziksel işlemler gösterilmiştir. Diyagram, molekülün çeşitli enerji seviyelerini içermektedir. Fotonun absorpsiyonu sonucu elektronlar temel halden ( $S_0$ ), uyarılmış hallere ( $S_1$ ,  $S_2$  vb.) geçerler [58].

Fotonun absorpsiyonu ile; iç dönüşüm, floresans, sistemler arası geçiş, fosforesans, geciktirilmiş floresans ve triplet-triplet geçişler meydana gelir [58]. Bir molekülde uyarılma sırasında oluşan işlemler Polonyalı bilim adamı Alexander Jablonski tarafından Jablonski Diyagramı'nda belirtilmiştir. Jablonski Diyagramı Şekil 5'te gösterilmektedir [59].



Şekil 5. Jablonski diyagramı

Genel olarak ışık absorpsiyonu sonucu floresan madde S<sub>1</sub> veya S<sub>2</sub> gibi bir titreşim seviyesine uyarılır (Şekil 5). Moleküller hızla S<sub>1</sub>'in en düşük titreşim seviyesine düşer. Buna iç dönüşüm denir ve çoğunlukla 10<sup>-12</sup> saniye gibi kısa bir sürede gerçekleşir [60]. İç dönüşüm esnasında ışınım olmadığı için uyarılma enerjisi ısı enerjisi şeklinde dağılır. Floresans emisyonu da ısı dengeye ulaşmış S<sub>1</sub> halinin en düşük titreşim seviyesinden temel hale dönmesi sırasında gerçekleşir. S<sub>1</sub> seviyesindeki moleküller spin yönlerini değiştirdiklerinde ilk triplet (T<sub>1</sub>) haline geçebilirler. Fosforesans emisyonu da bu T<sub>1</sub> halinden temel hale dönme sırasındaki emisyonla verilir [59]. Molekül tarafından absorplanan enerjinin bir kısmı iç dönüşüm sırasında kaybolur. Bunun sonucunda emisyon spektrumu ile absorpsiyon spektrumu arasında enerji farkı meydana gelir. Emisyon enerjisinin absorpsiyon enerjisinden daha az olması sonucu emisyon spektrumu daha büyük dalga boylarına kayar. Buna "Stokes Kayması" adı verilir [61].

### 1.6.2. Floresans Sönüm

Molekülün floresans şiddetini azaltan birçok etken vardır. Moleküller yönlendirme değişiklikleri uyarılmış hal süresince gerçekleşir. Bu değişiklikler; enerji transferleri, temel hal kompleks oluşumu ve çarpışmalı sönüm gibi çeşitli moleküler etkileşimler sonucu gerçekleşebilmektedir.

Floresans sönüm, mekanizmasına göre statik veya dinamik olarak sınıflandırılır. Florofor ile söndürücü molekülleri arasındaki çarpışma sonucu dinamik sönüm meydana gelmektedir. Statik sönüm ise kompleks oluşumundan kaynaklanmaktadır. Statik sönüm sırasında söndürücü ile florofor arasında floresans özelliğe sahip bir kompleks oluşur. Statik ve dinamik sönümün gerçekleşmesi için florofor ile söndürücü temas halinde olmak zorundadır. Çarpışma sonucunda sönüm meydana gelebilmesi için söndürücünün, uyarılmış hal sürecinde florofora ulaşmış olması gerekir.

Statik sönüm farklı şekillerde meydana gelebilmektedir. Florofor (F) ile söndürücü (Q) arasında temel halde, floresans özelliği olmayan bir kompleks oluşabileceği gibi floresans özelliği olmayan bu kompleks florofor uyarıldıktan sonra da oluşabilmektedir. Stern-Volmer eşitliği ile floresans sönüm verileri *Eşitlik (1)* ile incelenebilir [57].

$$F_0 / F = 1 + K_{SV} [Q] = 1 + \tau_0 k_q [Q] \quad (1)$$

### 1.6.3. Floresansı Etkileyen Faktörler

Floresansı etkileyen birçok faktör vardır. Bunlar yapı, yapısal rijitlik, pH, sıcaklık, çözücünün polarlığı, çözünmüş oksijen, gelen ışının dalga boyu ve şiddeti ve konsantrasyon olarak sıralanabilir.

Yapının etkisi; düzlemsellik, halka yapısının artması, konjügasyon ve dönmenin engellenmiş olması genel olarak molekülün floresans şiddetini artırmaktadır. Elektron yoğunluğunu artıran substitüentlerin halkada bulunması da floresans veriminin artmasına sebebiyet vermektedir. Sistemler arası geçişin artmasına neden olan halojenürler ise yapının floresansını düşürmektedir.

Yapısal rijitliğin etkisi; molekülün yapısı rijit ise floresans şiddeti artar.

pH etkisi; molekülün veya ortamın ihtiva ettiği asit baz içeriğine göre floresans değişmektedir.

Sıcaklığın etkisi; uyarılmış haldeki atomların çarpışma olasılığı sıcaklığın yükseltilmesi sonucu artmaktadır. Çarpışma olasılığı artınca iç dönüşüm de artar ve iç dönüşümün artması floresansı azaltmaktadır.

Çözücünün polarlığının etkisi; kullanılan çözücünün polarlığı arttıkça floresans özellik de artış göstermektedir.

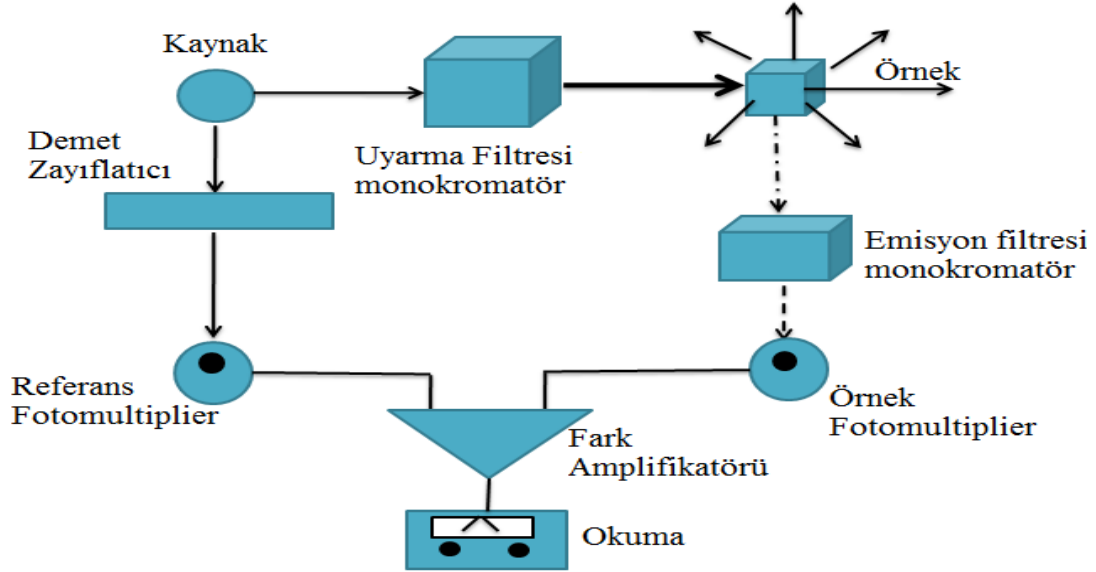
Çözünmüş oksijenin etkisi; çözünmüş oksijenin varlığı genel olarak floresansı azaltmaktadır.

Gelen ışığın dalga boyu ve şiddetinin etkisi; floresansı oluşturan ışığın dalga boyunun alt sınırı 250 nm'dir. Gelen ışığın şiddetinin artması floresansın da artmasını sağlamaktadır.

Konsantrasyonun etkisi; çözelti içerisindeki floresent maddenin konsantrasyonu arttıkça genellikle floresans özellik artar.

#### 1.6.4. Florimetre ve Spektroflorimetre

Floresans ışının şiddetini ölçmek için kullanılan cihazın kısımları; ışın kaynağı, örnek küveti, uyarma ve emisyon dalga boylarını seçecek bir çift filtre veya monokromatör ve floresansı ölçecek olan dedektörden oluşmaktadır (Şekil 6).



Şekil 6. Floresans cihazı bileşenleri [62].

#### 1.6.5. Floresans Analiz Cihazı Bileşenleri

##### 1.6.5.1. Işın Kaynağı

Işın kaynağı olarak düşük basınçlı civa ark lambaları ve yüksek basınçlı ksenon ark

lambaları kullanılır. Filtreli florimetre cihazı için ise erimiş silika pencereci, düşük basınçlı civabuhar lambası kullanılır. Uyarma kaynağı olarak kullanılan lazerler azot gazı lazeri veya Nd-YAG lazeridir [62,63].

### **1.6.5.2. Filtre ve Monokromatörler**

Florometrelerde girişim ve absorpsiyon filtrelerinin her ikisi de kullanılmıştır. Çünkü hem uyarma demeti hem de oluşan floresans ışınının dalga boyu seçilmiştir. Spektroflorimetrelerin çoğu en az bir optik ağı monokromatör ile donatılmıştır [62,63].

### **1.6.5.3. Dedektörler**

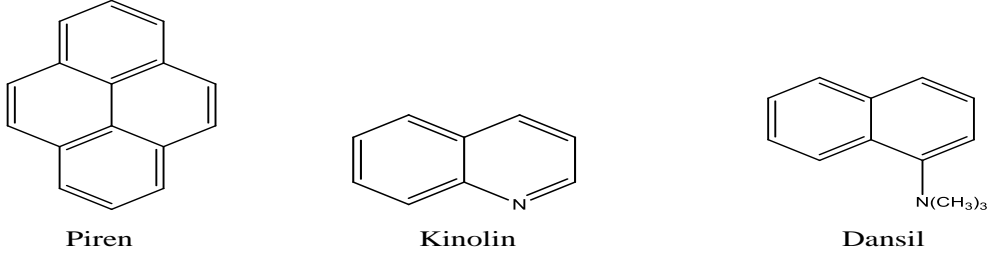
Lüminesans sinyalleri genellikle düşük şiddetlidir ve ölçülebilmeleri için yükseltilmeleri gerekir. Duyarlı ölçümler alınan floresans cihazlarında fotoçoğaltıcı tüpler en yaygın kullanılan dedektörlerdir. Bunlar genel olarak artırılmış sinyal/gürültü oranları elde etmek için foton sayım modunda çalıştırılırlar. Sinyal/gürültü oranlarını artırmak için dedektörlerin soğutulması da gerekebilir [62,63].

### **1.6.5.4. Hücreler ve Hücre Bölümleri**

Ölçümler için cam veya silisten yapılmış silindirik ve dikdörtgen prizması şeklinde hücreler kullanılır [62,63].

### **1.6.5.5. Floresent Moleküller**

Genellikle çok sayıda konjüge çifte bağları içeren yüksek aromatikliğe sahip yapılar floresans özellik gösterir. Böyle gruplara floresent gruplar denir. Yaygın olarak kullanılan bazı floresent gruplar Şekil 7'de gösterilmiştir. Sudan boyalarının yapıları incelendiğinde (Şekil 2) N=N grubunun da konjügasyonu artırdığı görülmektedir. Bu nedenle yüksek floresans özellik göstermeleri beklenir.



Şekil 7. Bazı floresent gruplar

### 1.7. Metot Validasyonu

Bazı yöntemlerle analitik kimyacıların laboratuvarlarda elde ettikleri sonuçların doğru olup olmadığı tespit edilebilir. Analizci elde ettiği sonuçları rakamla ifade ederken yaptığı işlemler sırasında mümkün olabilecek hata kaynaklarını ve bu hataların sonuç üzerindeki etkisini de belirtmelidir. Analiz en az 3 farklı numuneyle tekrarlanmalıdır ve metot validasyonu yapılmalıdır. Bir analitik metodun geçerli olduğunu gösteren işlemlere metot validasyonu denir. Validasyon; metodun doğrusalılığı, özgünlüğü, kesinliği, doğruluğu, doğrusal aralığı, gözlenebilme ve tayin sınırı gibi parametrelerin belirlenmesiyle sağlanır [64].

#### 1.7.1. Doğruluk

Analiz sonucunun gerçek değere ne kadar yakın olduğunun ifadesine doğruluk (accuracy) denir. % Hata olarak ifade edilen doğruluk; ölçümlerin aritmetik ortalamasının doğru değere yakınlığı olarak *Eşitlik (2)*'de verildiği gibi tanımlanır.

$$\% \text{ Hata} = \frac{(X_G - X_{ORT})}{X_G} \times 100 \quad (2)$$

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

#### 1.7.2. Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Bulunan bir değerlerin tekrarlanabilme kabiliyetine ya da bireysel test sonuçlarının birbirine yakınlığının derecesine yöntem kesinliği adı verilir. Yöntem kesinliği, ölçüm

sonuçlarının birbirine olan yakınlığıdır. Kesinlik % bağıl standart sapma ile ifade edilmektedir. Kesinlik analit derişimine, analiz yöntemine bağılıdır ve bağıl standart sapma %2'den %20'ye kadar çeşitlilik göstermektedir. Tekrarlanabilirlik, kesinliğin bir göstergesi olarak kabul edilir ve gün içi ve günler arası kesinlik olmak üzere iki şekilde hesaplanır.

### 1.7.3. Seçimlilik ve Duyarlılık

Seçimlilik; numunede varlığı tespit edilen analiti, analit ile girişim yapabilen diğer bileşenlerden farklı olarak tespit etme yeteneğidir. Yoğun matriks ortamına sahip numunelerde analiz edilecek maddelerin doğru ve özgün olarak belirlenebilmesi analitik yöntemlerin seçimliliğini gösterir. Duyarlılık ise analiz işleminin konsantrasyonundaki küçük değişimleri kaydetme kapasitesi olarak tanımlanır ve kalibrasyon eğrisinin eğimi olarak ifade edilir [65].

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

Analitik yöntemlerde performans genel olarak gözlenebilme sınırı ile ölçülür. Gözlenebilme sınırı *Eşitlik (3)*'te verildiği gibi ifade edilir ve konsantrasyon birimleri ile temsil edilir. Konsantrasyonun çok düşük olduğu analitik ölçümlerde tanık ile aynı değerde cevap alınır. Pratik olarak gözlenebilme sınırı, en az on tanık çözelti için ölçülen sinyallerin standart sapma değerlerinin üç katının eğime oranı olarak hesaplanır [64].

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

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

### 1.7.5. Tayin Sınırı (TS, LOQ)

Gözlenebilme sınırında tekrarlanabilirliğin çok düşük olması sebebiyle gerçek tayinlerde LOD değerinin kimi zaman 5 kimi zaman 9 ya da 10 katı alınır ve bu değere tayin sınırı adı verilir (*Eşitlik (4)*). Kabul edilebilir bir bağıl standart sapma değeri bu sınır için önemli bir ölçüttür. Sağlıklı bir tayin için tayin sınırının en az 3 katı kadar konsantrasyon gereklidir [64].



$$LOQ = \frac{9\sigma}{m} \quad (4)$$

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

### 1.7.6. Çalışma Aralığı

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

## 1.8. Floresans Spektrometrisi ile Kantitatif Tayin

Çoğu spektroskopik yöntem standartlarla yapılan kalibrasyona dayalıdır. Floresans spektroskopisinde kantitatif tayinler de kalibrasyonu gerektirir. Analitik sinyal ile analit konsantrasyonu arasındaki ilişki kalibrasyon ile belirlenir. Kalibrasyonda dış kalibrasyon doğrusu yöntemi ve standart ekleme yöntemi en sık kullanılan iki yöntemdir.

### 1.8.1. Dış Kalibrasyon Doğrusu Yöntemi

Floresans spektroskopisinde Lambert-Beer yasasından faydalanarak kantitatif analizler yapılır. Uygun bir kalibrasyon doğrusu elde edebilmek için konsantrasyonları bilinen standart çözeltilerin floresans şiddetleri kaydedilir ve analit konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilir. Analizi yapılan maddenin floresans şiddeti ölçülür ve grafik kullanılarak konsantrasyonu bulunur.

### 1.8.2. Standart Ekleme Yöntemi

Analizi yapılan numunenin matriksi tam olarak bilinemeyebilir. Fiziksel ve kimyasal girişimlere neden olabilecek bu matriksler analiz sonuçlarına etki edebilir. Bu durumda standart ekleme yöntemi kullanılır. Numunenin en az üç kısma ayrıldığı bu yöntemde, birinci kısmın hacmi saf su ile tamamlanır. İkinci ve üçüncü kısımlara ise artan miktarlarda standart çözeltiler eklenir ve son hacim birinci kısım ile aynı değere gelecek şekilde saf su ile tamamlanır. Hazırlanan her çözeltinin floresans şiddeti ya da absorbansı ölçülerek okunan değerler eklenen standart konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilir. Kalibrasyon

doğrusunun yatay eksenini kestiği noktanın negatif işaretlisi, çözelti içindeki bilinmeyen maddenin konsantrasyonuna karşılık gelir.

### 1.9. Literatürde Sudan (I-IV) Boyalarının Tayini

Yassine Benmassaoud ve arkadaşları 2017 yılında Sudan (I-IV) boyalarını tayin etmek için katı faz ekstraksiyonunu ve sıvı kromatografisi yöntemini tercih etmişlerdir. Her iki yöntemde de tarımsal atıklardan geri dönüştürülen nanoadsorbe maddesi olarak ağartılmış nanoselüloz kullanmışlardır. Önerilen iki yöntemle barbekü ve ketçap sosu örneklerinde sudan boyalarının %93,4 ile %109,6 arasında geri kazanımı sağlanmıştır [66].

Zhang ve arkadaşları 2012 yılında Sudan I boyasının biber sosu örneklerinde ekstraksiyonunu yapmak için katı faz ekstraksiyonu yöntemini kullanmışlardır. Sorbent olarak Sudan I boyası için moleküler baskılanmış polimer sentezlemişlerdir. Bu yöntemle birlikte Sudan I boyasını HPLC ile analiz etmişlerdir [67].

Carolina V. Di Anibal ve arkadaşları 2015 yılında baharatlara katılan Sudan boyalarının tayinini yapmak için sabit dalga boylu senkron floresans spektroskopisine dayanan bir tarama yöntemi geliştirmişlerdir. Önerilen bu yöntemle birlikte gıdalara çok az miktarda ilave edilen Sudan boyalarının bile miktarlarını tespit etmişlerdir. Kullandıkları bu yöntemi basit, hızlı ve uygulanabilir olarak belirtmişlerdir [68].

Liu W. ve arkadaşları 2007 yılında Sudan (I-IV) boyalarını tayin etmek için HPLC-UV kullanmışlardır. Bunun için ilk olarak Triton X-100 yüzey aktif maddesini kullanarak bulutlanma noktası ekstraksiyonunu gerçekleştirerek zenginleştirmişlerdir. Bu yöntem doğrultusunda toz bibere ekledikleri Sudan boyalarını %80-%85 oranında geri kazanımla elde etmişlerdir [69].

Michalina Oplatowska ve arkadaşları 2011 yılında Sudan I boyasının tayinini yapmak için yeni bir metot geliştirmişlerdir. Baharat ve soslara ilave edilen Sudan I boyasının tespiti için enzim bağlantılı immunosorbent analiz (ELISA) ile birleştirilen basit bir jel nüfuz temizleme prosedürü kullanmışlardır. Sudan boyaları ailesinin en çok suistimal edilmiş olan Sudan I boyasını doğrudan ELISA ile analiz etmişlerdir. Bu yöntem Sudan I boyası için oldukça özgül poliklonal antikorlara dayanmaktadır [70].

Zhixiang, X. ve arkadaşları 2010 yılında toz biber ve ördek yumurtası gibi gıdalardaki Sudan boyalarını analiz etmek için HPLC kullanmışlardır. Bunun öncesinde katı faz ekstraksiyonu yöntemini kullanarak Sudan boyaları için zenginleştirme

yapmışlardır. 196-991 arasında değişen zenginleştirme faktörü elde ettikleri bu yöntemde sorbent olarak aktif silikayı tercih etmişlerdir. Çalışılan gıda örneklerine eklenen Sudan boyalarını %70,3-%95,2 oranında geri kazanmışlardır [71].

Zhang L. ve arkadaşları 2012 yılında bir nanopartikül sentezleyerek Sudan boyalarının ekstraksiyonunu hedeflemişlerdir. Ekstrakte edilen Sudan boyaları belli oranda zenginleştirilerek ultra hızlı sıvı kromatografisi ile tayin edilmiştir. Sentezledikleri bu sorbentin yüksek tutma kapasitesine sahip olduğunu belirtmişlerdir [72].

Leung ve arkadaşları 2013 yılında Sudan boyalarını dipersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu yöntemini kullanarak ekstrakte etmişler ve bu boyaları zenginleştirme işleminden sonra LC-DAD ile analiz etmişlerdir. Üç farklı iyonik sıvıyı ekstraksiyon çözücüsü olarak kullandıkları bu yöntemde iyonik sıvıların etkinliğini birbirleriyle karşılaştırmışlardır [73].

Wang H. ve arkadaşları 2011 yılında Sudan boyalarını tayin etmek için sosis ürünlerini kullanmışlardır. Moleküler baskılı sorbent hazırlayarak analizden önce boyaları zenginleştirmişlerdir. Dipersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemini kullanarak zenginleştirme işlemini gerçekleştirmişlerdir [74].

Santosh Lohumi ve arkadaşları 2016 yılında özellikle kırmızı pul biberlere katılan Sudan I boyasının tayini için FTIR spektroskopisi kullanmışlardır. Gıda ürünlerinin kalite kontrollerinin tespiti için FTIR spektroskopisinin çok iyi bir analitik teknik olduğunu savunmuşlardır. Sudan boyasının konsantrasyonunu tayin edebilmek için literatürde hibrit doğrusal analiz olarak geçen net analit sinyali tabanlı yöntem FTIR spektrum verilerine uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre kalibrasyon verileri incelenmiş ve korelasyon katsayısı  $R^2=0,98$  olarak hesaplanmıştır. Yöntemin sıvı kromatografi (LC) yöntemlerine oranla daha basit ve düşük maliyetli olduğunu ileri sürmüşlerdir [75].

Wenhua Ji ve arkadaşları 2017 yılında katı faz ekstraksiyonu ile Sudan boyalarını ekstrakte etmişlerdir. Bunun için moleküler baskılanmış katı faz ekstraksiyonunu (MISPE) kullanmışlardır. Altın nanoparçacıklar, sülfidril ve  $Au^{3+}$  arasındaki kovalent bağlanma yoluyla silika jelin yüzeyine konuşlandırılmıştır. Daha sonra işlevsel monomer olarak moleküler baskılanmış polimerler altın nanopartiküller kullanarak grafit polimerizasyonu ile hazırlamışlardır. FTIR spektroskopisi kullanılarak korelasyon katsayısı  $R^2 > 0,999$  olarak tespit edilmiş ve Sudan boyaları için %87,2-%94,7 oranında geri kazanım elde etmişlerdir [76].

Chengjiang Zhang ve arkadaşları 2015 yılında Sudan boyalarını tayin etmek için yeni bir hidrazon bağlı kovalent organik polimer adsorban basit bir Schiff bazı reaksiyonuna dayalı olarak sentezlenmiştir. Sentezlenen bu ürün iyi adsorpsiyon performansına sahip olarak nitelendirilmiştir. Daha sonra mikro-katı faz ekstraksiyonu ( $\mu$ -SPE) kullanılarak Sudan boyaları zenginleştirilmiştir. Kullanılan bu adsorbentın ticari olarak kullanılan adsorbentlerin çoğundan 1 ile 11 kat daha iyi netice verdiğini tespit etmişlerdir. Sudan boyalarının tespiti için de yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılmıştır. Yöntem, biber tozu ve sosis örneklerinin analizi için başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Bir toz biber örneğinde Sudan II ve Sudan III, sırasıyla 8,3 ve 6,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  konsantrasyonlarında tespit edilmiştir. Biber tozu ve sosis örneklerinin geri kazanımları ise sırasıyla %75,8 ve %73,8 olarak hesaplanmıştır. Önerilen yöntemle gıda örneklerinde Sudan boyalarının analizinin doğru, güvenilir ve kullanışlı olarak yapıldığını göstermişlerdir [77].

### **1.10. Yapılan Çalışmanın Amacı**

Sudan boyaları gıdalara renk ve tat vermek amacıyla eser miktarlarda ilave edilen bir gıda katkı maddesidir. Bu boyaların Sudan I, II, III ve IV gibi çeşitli türevleri vardır. Bununla birlikte gıdalarda en fazla kullanılanı ise Sudan I boyasıdır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve bunun gibi uluslararası kuruluşlar tarafından kanserojen katkı maddeleri sınıfına dahil edilen Sudan I boyasının analizi için pek çok yöntem geliştirilmiş ve literatüre kazandırılmıştır. Bu maksatla Sudan I boyasının analizi için HPLC, floresans spektroskopisi, FTIR spektroskopisi, sıvı kromatografisi (LC) kullanılmıştır. Yapılan çalışmaların hemen hepsinde adsorbent maddeler sentezlenmiş ve Sudan I boyası zenginleştirme işleminden sonra analiz edilebilmiştir. Bu da analizci için ilave zaman ve maddi kayıplar ortaya çıkarmıştır. Önerilen yöntemde ise basit ekstraksiyon yöntemleri kullanılmış ve zenginleştirme işlemlerine gerek duyulmamıştır. Floresans spektroskopisi ile kırmızı pul biber, kimyon ve sumak gibi numuneler analiz edilmiş ve %96,6-%97,6 arasında değişen geri kazanımlar elde edilmiştir. Geliştirilen yöntem numune matriksi ortamında Sudan I'in floresans şiddetinin ölçülmesine dayanan ve baharatlarda Sudan I'in hassas tayini için uygulanabilen oldukça basit bir yöntemdir. Bu yöntemde ekstraksiyon çözücüsü olarak etanol kullanılarak yöntemin çevreci ve sağlığa zararsız olması da amaçlanmıştır.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Kullanılan Cihazlar ve Diğer Malzemeler

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

### 2.2. Kullanılan Kimyasallar

Ticari yoldan Sudan I (Sigma) boyası satın alındı. Boyar maddeyi çözünürleştirmek için Merck marka etanol kullanıldı. Trabzon yerel marketlerinden alınan kırmızı pul biber, sumak ve kimyon numune olarak kullanıldı. Analiz öncesinde spayk edilen bu numunelerden Merck marka etanol ile Sudan I boyası ekstrakte edildi.

### 2.3. Analitik Çalışmalar

Sudan I'in spektrofotometrik yöntemle tayini için boyanın kendine has floresans özelliğinin kullanılması amaçlandı. Bu amaçla kullanılabilen uygun bir çalışma aralığının tespit edilmesi için standart Sudan I boyası ile bir kalibrasyon grafiği oluşturulacak şartlar belirlendi.

Kalibrasyon grafiğinin hazırlanması: Boyar madde olarak kullanılan Sudan I'in etanolde 500 µg/mL'lik 100 mL çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözümden 1-50 µg/mL'lik olacak şekilde seyreltilerek kalibrasyon grafiği için standart çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerin 300 nm'de uyarılarak floresans spektrumları alındı (Şekil 8). Artan Sudan I konsantrasyonu ile 330 nm'deki floresans şiddetleri grafiğe geçirildi (Şekil 9). Böylece çizilen grafikte doğrusal aralığın 0,1-30 µg/mL arasında olduğu tespit edildi (Şekil 10).

### 2.4. Numunelerin Hazırlanması

Analiz edilecek kimyon, kırmızı pul biber ve sumak numuneleri Sudan I spayklı ve Sudan I spayksız olarak iki şekilde hazırlandı.

Sudan I spayksız numuneler: Bunun için 5'er g tartılarak alınan örnekler öğütücüye aktarıldı ve 1'er dakika süreyle öğütücüde toz haline getirildi. Daha sonra örnekler balon jöjelere konularak hacimleri 100 mL'ye tamamlandı. 5 dakika ultrasonik banyoda tutulan örnekler çalkalayıcıya alınarak 20 dakika çalkalandıktan sonra 0,45 µm'lik filtrelerden geçirildi ve şişelenerek karanlıkta saklandı.

Sudan I spayklı numuneler: 5'er g tartılan örnekler öğütücüye aktarıldı ve 1'er dakika süreyle öğütücüde toz haline getirildi. Behere alınan numunelere Sudan I'in son konsantrasyonu 10 µg/mL olacak şekilde standart Sudan I çözeltisinden uygun hacimde ilave edildi ve karışımın hacmi balon jöjede 100 mL'ye tamamlandı. Ultrasonik banyoda 5 dakika tutulduktan sonra 20 dakika çalkalayıcıda çalkalandı. Önce adi süzgeç kâğıdından sonra 0,45 µm'lik filtrelerden süzüldü. Süzüntü analiz için karanlıkta saklandı.

## 2.5. Ölçüm Şartları

Floresans ölçümleri 1,0 nm'lik slit aralığı ile 1 mL'lik kuvars hücre kullanılarak yapıldı. Dış kalibrasyon grafiği kullanıldığında kabul edilebilir geri kazanım değerleri elde edilemediğinden modifiye bir standart ekleme yöntemi geliştirilmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda her bir numune matriksi için optimum uyarma dalga boyunun farklı olduğu belirlenmiştir. Optimum uyarma dalga boyunun belirlenmesinde maksimum emisyon şiddetinin elde edildiği dalga boyu kullanılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda en uygun uyarma dalga boylarının kırmızı pul biber için 300 nm, sumak için 350 nm ve kimyon için 400 nm olduğu belirlenmiştir. Her bir numune matriksi için ölçüm yapılan emisyon dalga boyları da optimize edilmiştir. Bu dalga boyları kırmızı pul biber için 330 nm, sumak için 417 nm ve kimyon için 465 nm olarak belirlenmiştir.

## 2.6. Sudan I Boyasının Tayini için Önerilen Metot

Numunelerde Sudan I boyası tayini için modifiye edilmiş bir standart ekleme yöntemi kullanılmıştır. Şekil 12 uygulanan modifiye standart ekleme yöntemini temsil etmektedir. Bunun için her bir deney tüpüne sabit konsantrasyonda Sudan I çözeltisi ve 500 µL Sudan I spayksız numuneden (matriks) ilave edildi. Sonra birinci tüp hariç diğer tüplere aynı hacimde Sudan I spayk edilmiş numune eklendi. Üçüncü tüpe ve sonraki tüplere artan konsantrasyonlarda standart Sudan I çözeltisi ilave edildi. Bütün tüplerin son hacmi etanolle 1 mL'ye tamamlandı ve floresans şiddeti ölçüldü. Hazırlanan tüpler şematik olarak Şekil 12'de gösterilmiştir. Burada  $F_0$  ve  $F_1$  sırasıyla birinci ve ikinci tüplerin floresans şiddetleri  $F_2, F_3$  vb., ise sonraki tüplerin floresans şiddetleridir. Tüplerdeki Sudan I miktarı  $C_x$  Eşitlik (5) ile hesaplanmıştır.

$$C_x = (F_0 - F_1) / m \quad (5)$$

Burada  $m$  modifiye standart ekleme yöntemi grafiğinin eğimidir.  $F_0$  ve  $F_1$  arasındaki fark, spayk edilmiş numunelerin Sudan I konsantrasyonu ile ilişkilidir.

Uygulanan bu yöntemde kullanılan sabit konsantrasyondaki Sudan I miktarı en önemli parametredir ve her bir numune matriksi için optimize edilmiştir.

## 2.7. Sabit Sudan I Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Geliştirilen yöntemde kullanılan sabit konsantrasyondaki Sudan I miktarının doğru sonuçların alınmasında belirleyici olduğu tespit edilmiştir. Bu amaçla kullanılacak optimum sabit Sudan I konsantrasyonu her bir numune matrisi için belirlenmiştir. Sabit konsantrasyonda Sudan I miktarının belirlenmesi için 0,5-10 µg/mL aralığında bir seri konsantrasyon denenmiştir. Optimum sabit Sudan I konsantrasyonu kırmızı pul biber tayini için 3 µg/mL, sumak tayini için 6 µg/mL ve kimyon tayini için 5 µg/mL olarak belirlenmiştir.

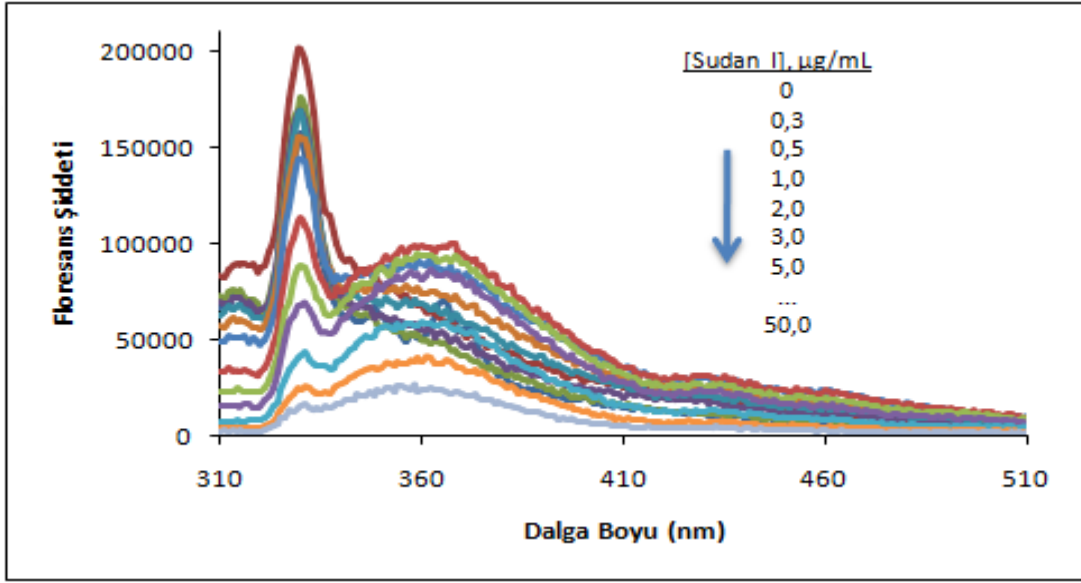




### 3. BULGULAR

#### 3.1. Artan Konsantrasyon ile Sudan I'in Floresans Spektrumundaki Değişim

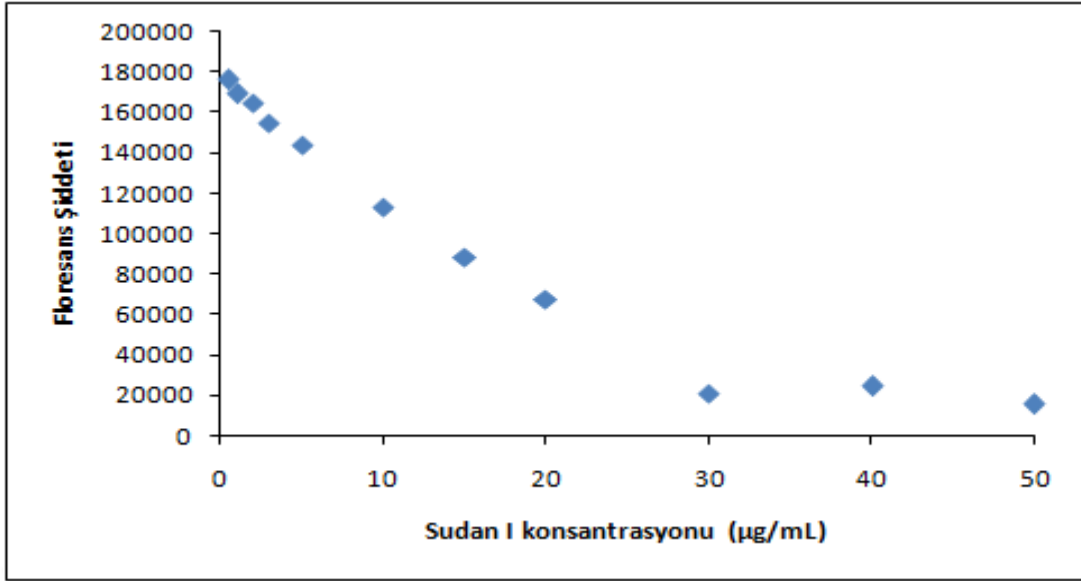
Etanolde 0,3-50  $\mu\text{g/mL}$  arasında değişen konsantrasyonlarda bir seri Sudan I çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltilerin floresans spektrumları 300 nm ile uyarılarak kaydedildi (Şekil 8).



Şekil 8. Artan konsantrasyonlarda Sudan I'in etanoldeki floresans spektrumları

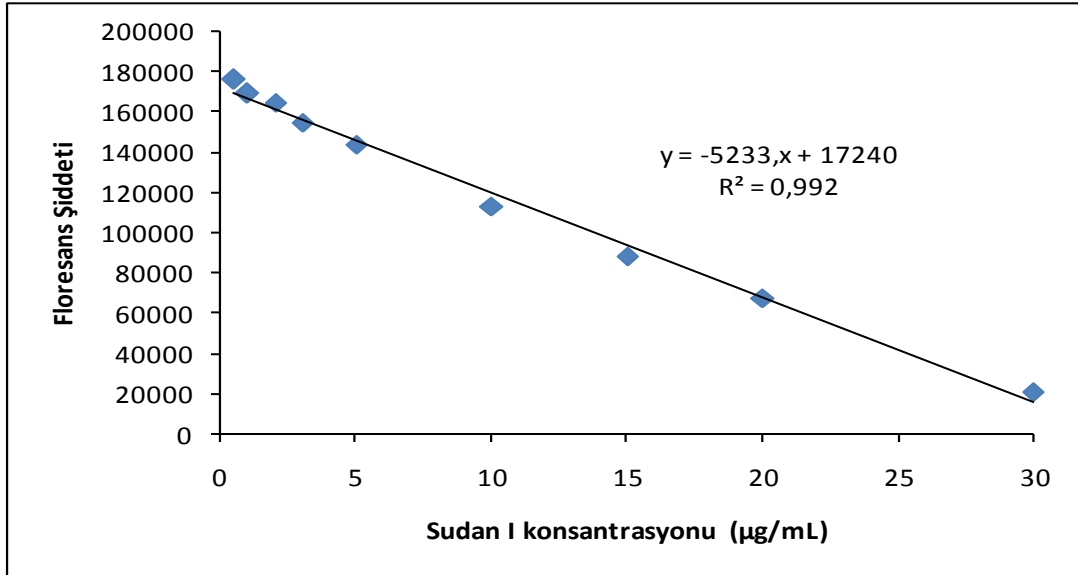
#### 3.2. Sudan I İçin Doğrusal Aralık

Artan Sudan I konsantrasyonuna bağlı olarak boyanın 330 nm'deki floresans şiddetinin 30  $\mu\text{g/mL}$ 'ye kadar düzenli olarak azaldığı ve bu konsantrasyondan sonra Beer Kanunu'ndan sapma olduğu gözlenmiştir. Sudan I konsantrasyonuna karşılık floresans şiddetindeki bu azalma ve Beer Kanunu'ndan sapma Şekil 9'da gösterilmiştir.



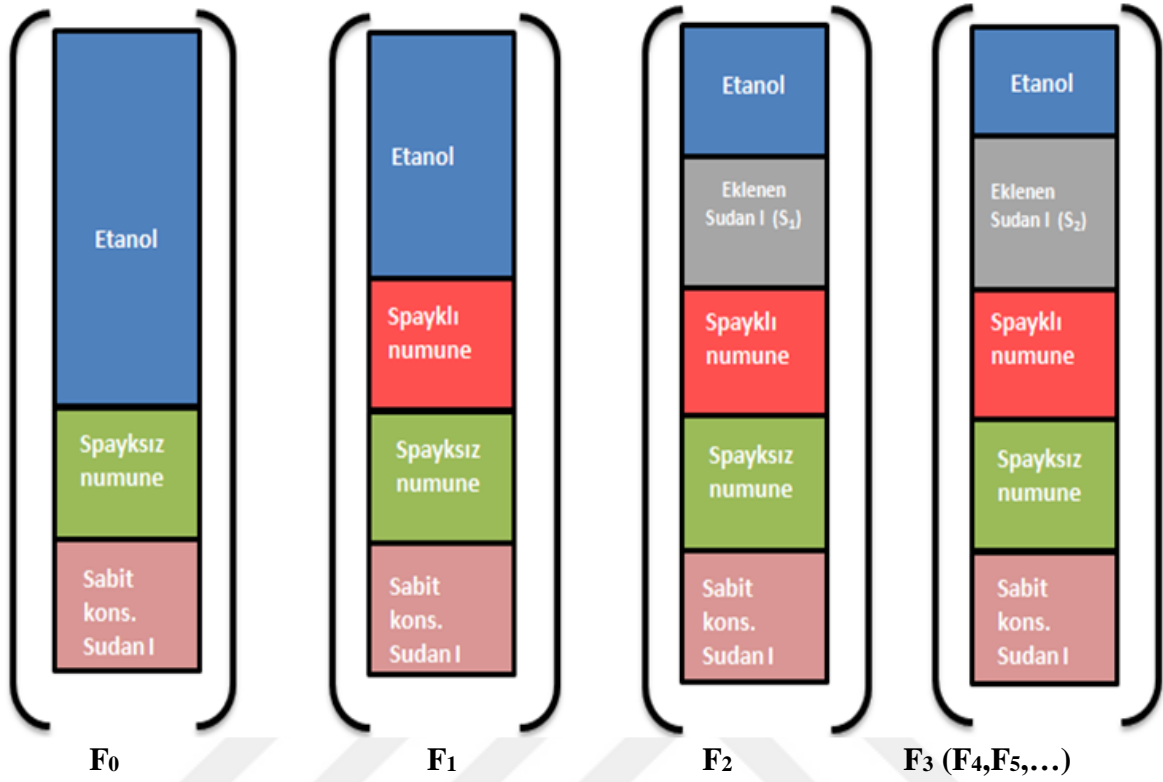
Şekil 9. Artan Sudan I konsantrasyonu ile 330 nm'deki floresans şiddetinin değişimi

Şekil 10 Sudan I tayini için belirlenen doğrusal aralığı göstermektedir. Şekil 10'da görüldüğü gibi doğrusal aralık için yüksek  $R^2$  (0,992) değeri elde edilmiştir.



Şekil 10. Sudan I tayini için doğrusal aralık

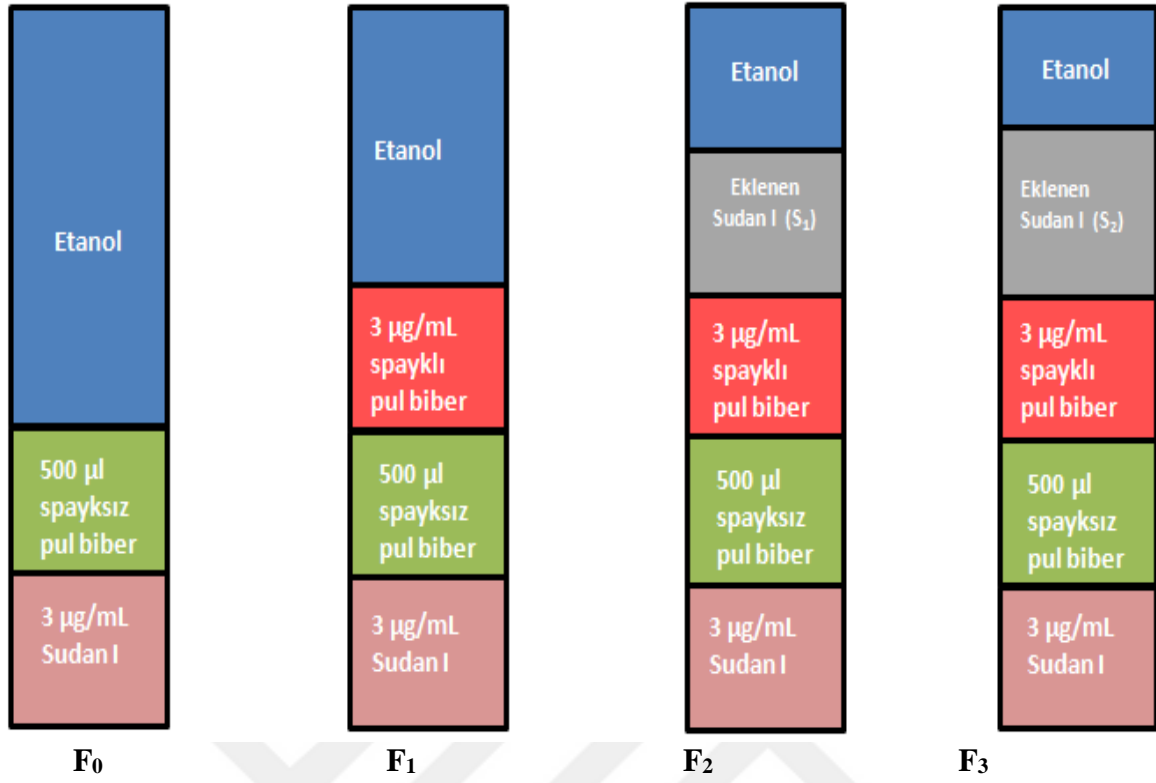
### 3.3. Sudan I Tayini için Uygulanan Modifiye Standart Ekleme Yöntemi



Şekil 11. Sudan I tayini için uygulanan modifiye standart ekleme yöntemi

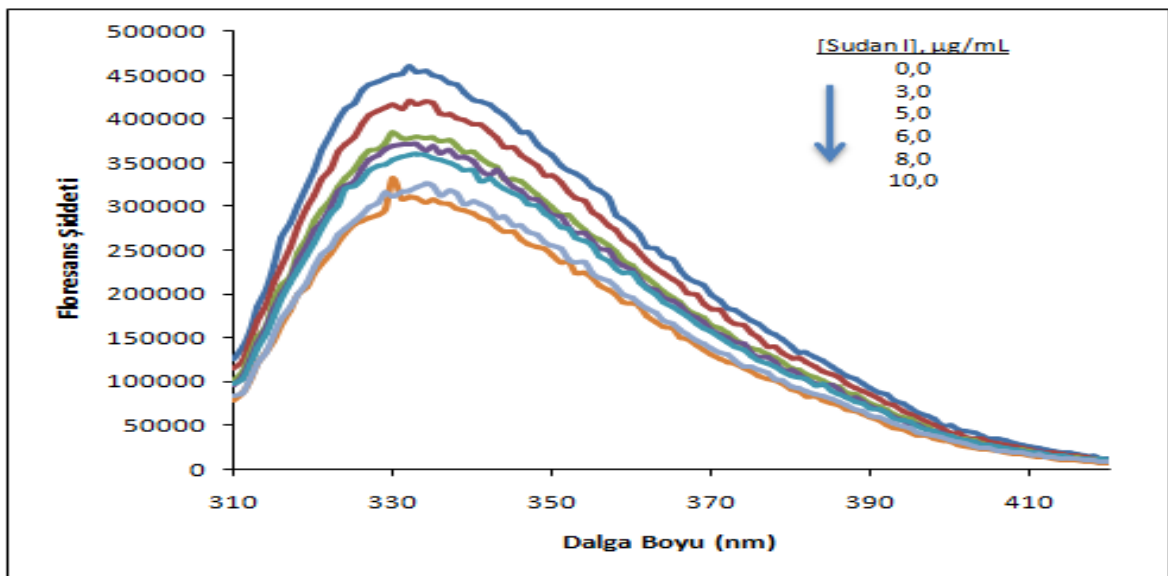
### 3.4. Kırmızı Pul Biber Numunesinde Sudan I'in Tayini

Şekil 12 kırmızı pul biberde Sudan I tayini için uygulanan modifiye standart ekleme yöntemini şematik olarak göstermektedir. Bu tayinde kullanılan sabit miktardaki Sudan I konsantrasyonu 3 µg/mL'dir. 3µg/mL olacak şekilde spayk edilen numuneler tayin edilmiştir.



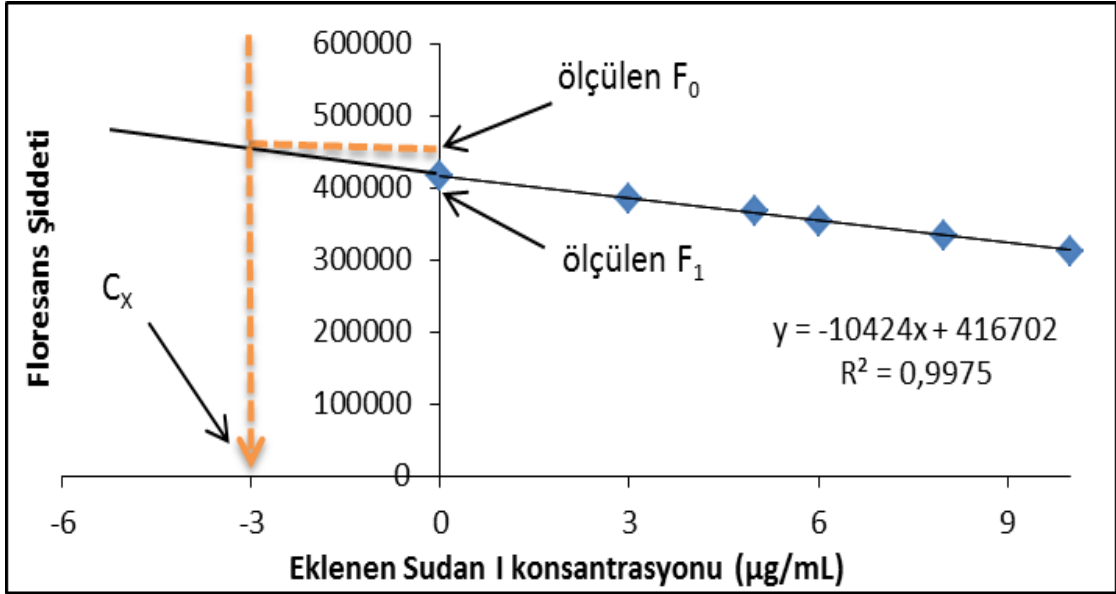
Şekil 12. Kırmızı pul biberde Sudan I tayini için modifiye standart ekleme yöntemi

Çözeltiler 300 nm ile uyarılarak floresans spektrumları alınmıştır. Şekil 13 bu tüplerdeki çözeltilerin floresans spektrumlarını göstermektedir.



Şekil 13. Kırmızı pul biberde Sudan I tayini için kullanılan çözeltilerin floresans spektrumları

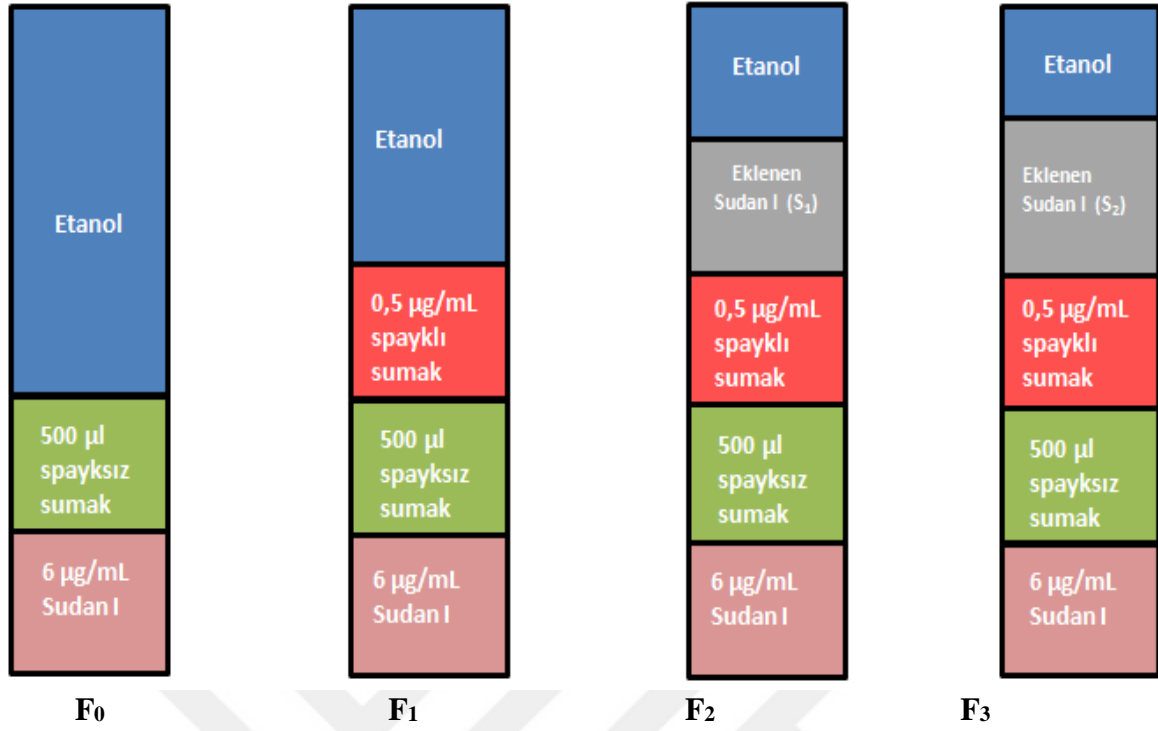
330 nm'deki floresans şiddetlerindeki azalma artan Sudan I konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilerek modifiye standart ekleme grafikleri çizilmiştir. Şekil 14, 3 µg/mL olacak şekilde spayk edilmiş kırmızı pul biberde Sudan I tayini için çizilen modifiye standart ekleme grafiğini göstermektedir.



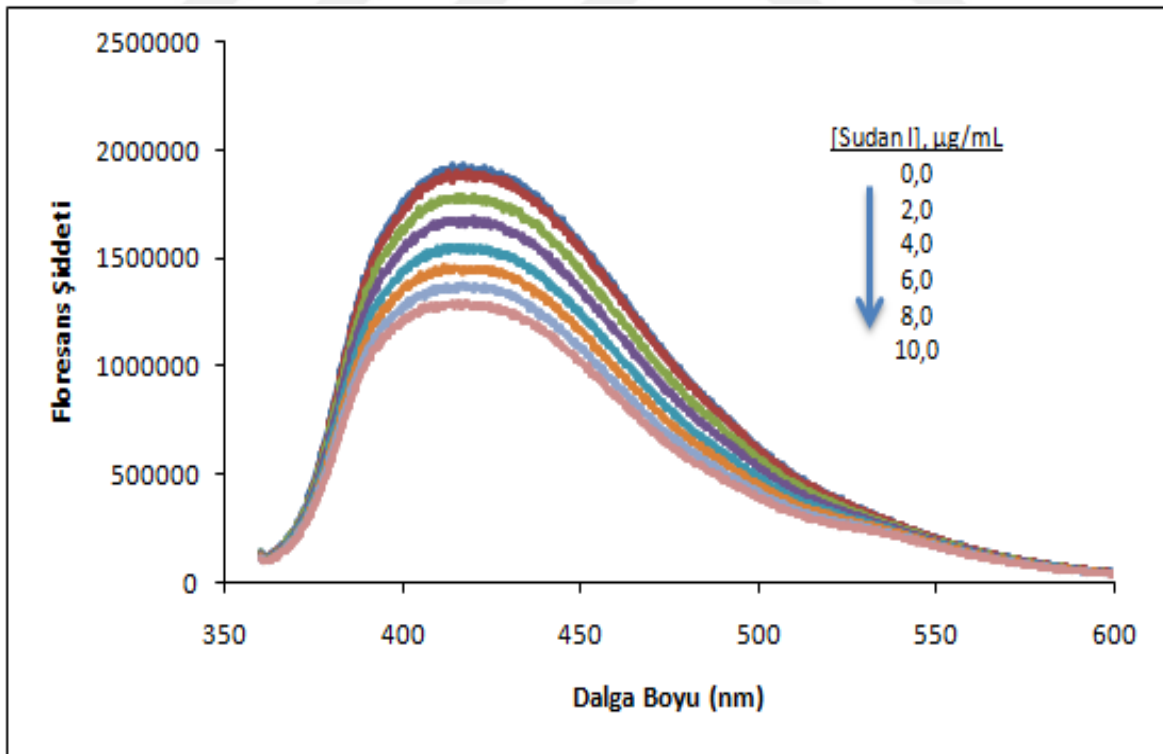
Şekil 14. Kırmızı pul biberde Sudan I tayini için çizilen modifiye standart ekleme grafiği

### 3.5. Sumak Numunesinde Sudan I'in Tayini

Şekil 15 sumakta Sudan I tayini için uygulanan modifiye standart ekleme yöntemini şematik olarak göstermektedir. Sumakta Sudan I tayini için kullanılan sabit konsantrasyondaki Sudan I çözeltisi 6 µg/mL'dir. 0,5 µg/mL Sudan I içeren sumak numunesi analiz edilmiştir. Bütün tüplerin floresans spektrumları 350 nm ile uyarılarak kaydedilmiştir. Şekil 16 bu tüplerdeki çözeltilerin floresans spektrumlarını göstermektedir.

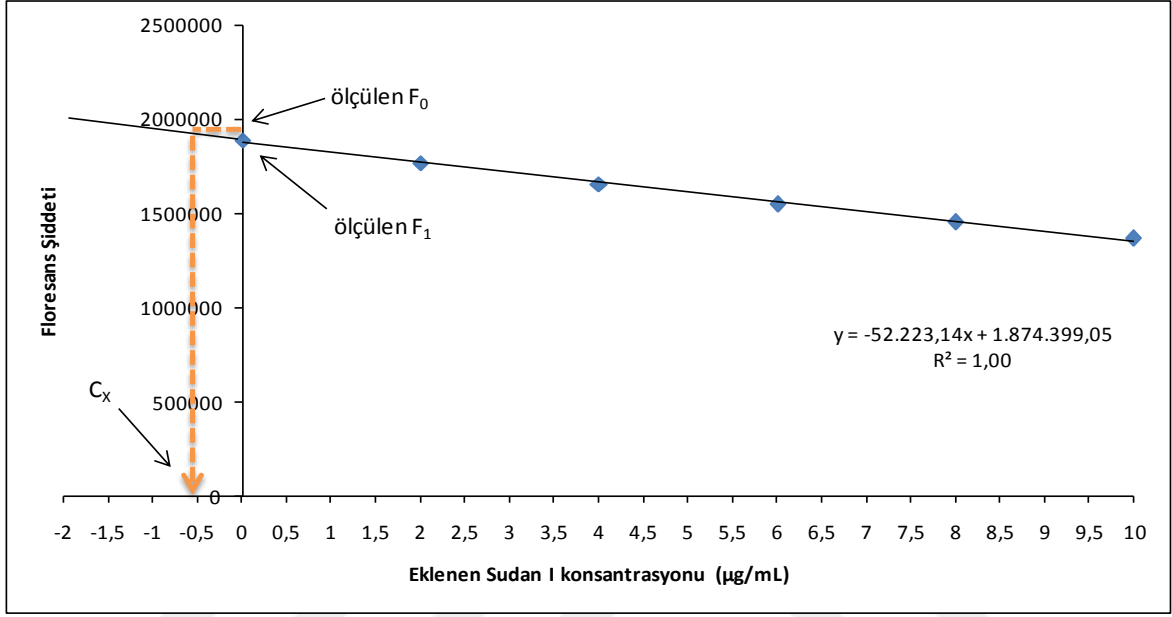


Şekil 15. Sumakta Sudan I tayini için modifiye standart ekleme yöntemi



Şekil 16. Sumakta Sudan I tayini için kullanılan çözeltilerin floresans spektrumları

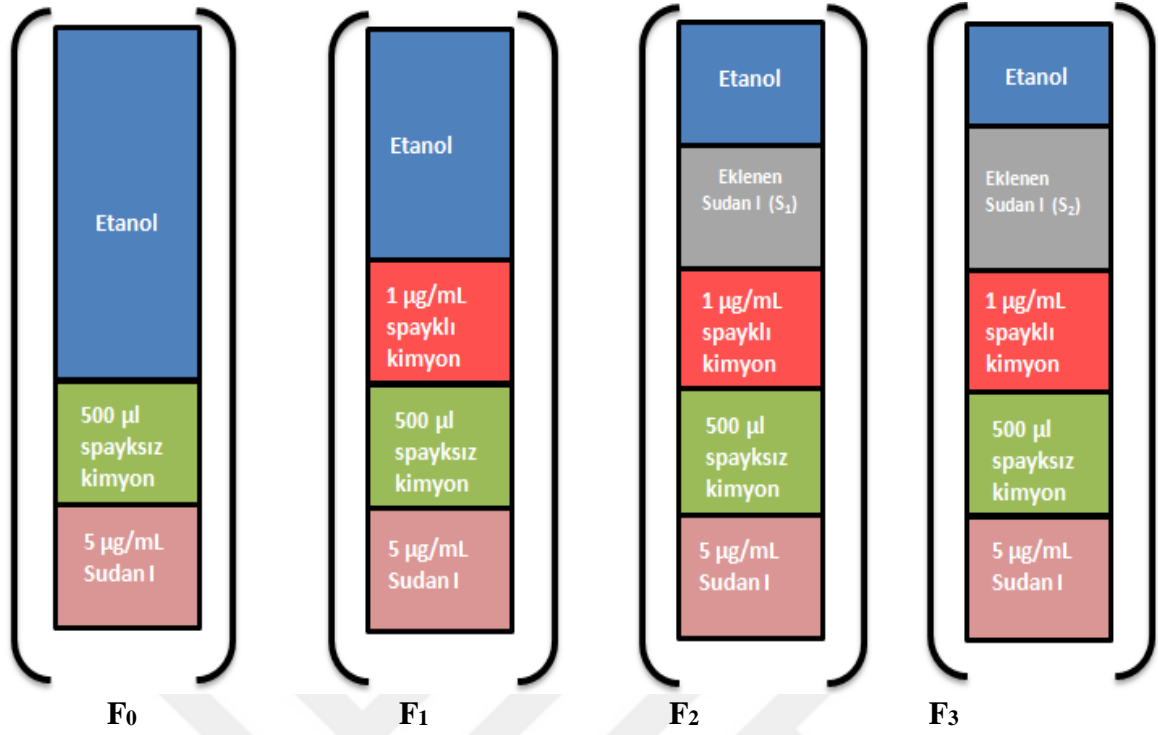
417 nm'deki floresans şiddetlerindeki azalma artan Sudan I konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilerek modifiye standart ekleme grafikleri çizilmiştir. Şekil 17, 0,5 µg/mL olacak şekilde spayk edilmiş kırmızı pul biberde Sudan I tayini için çizilen modifiye standart ekleme grafiğini göstermektedir.



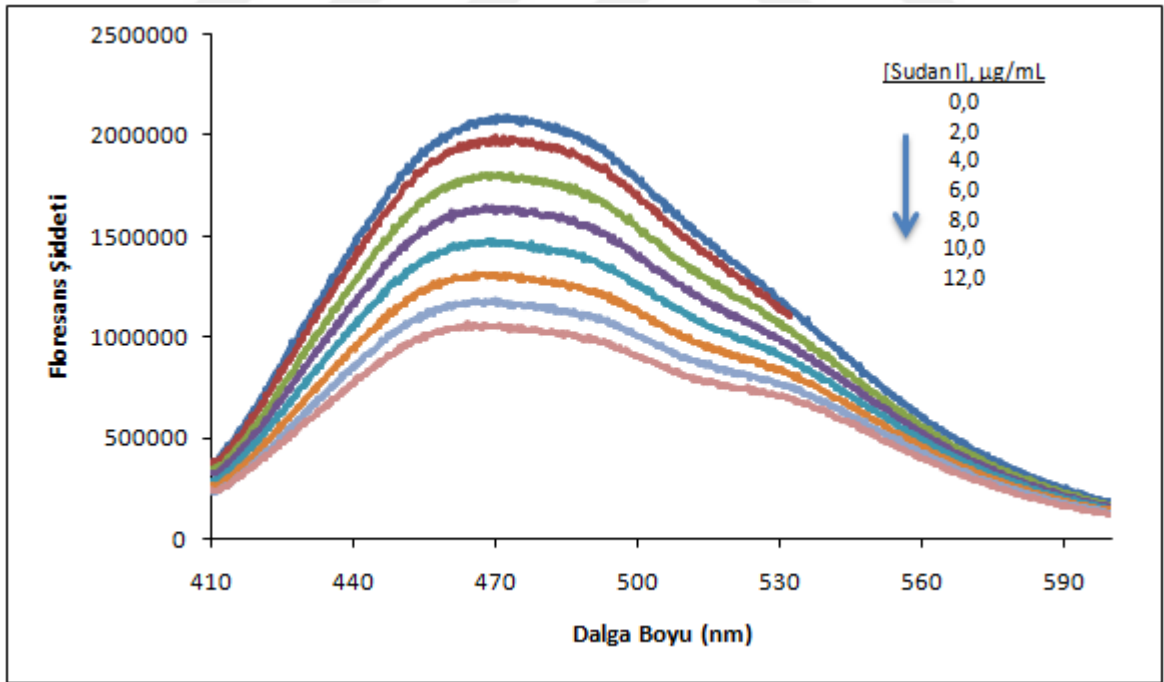
Şekil 17. Sumakta Sudan I tayini için çizilen modifiye standart ekleme grafiği

### 3.6. Kimyon Numunesinde Sudan I'in Tayini

Şekil 18 kimyonda Sudan I tayini için uygulanan modifiye standart ekleme yöntemini şematik olarak göstermektedir. Kimyonda Sudan I tayini için kullanılan sabit konsantrasyondaki Sudan I çözeltisi 5 µg/mL'dir. 1 µg/mL Sudan I içeren kimyon numunesi analiz edilmiştir. Bütün tüplerin floresans spektrumları 400 nm ile uyarılarak kaydedilmiştir. Şekil 19 bu tüplerdeki çözeltilerin floresans spektrumlarını göstermektedir.



Şekil 18. Kimyonda Sudan I tayini için modifiye standart ekleme yöntemi

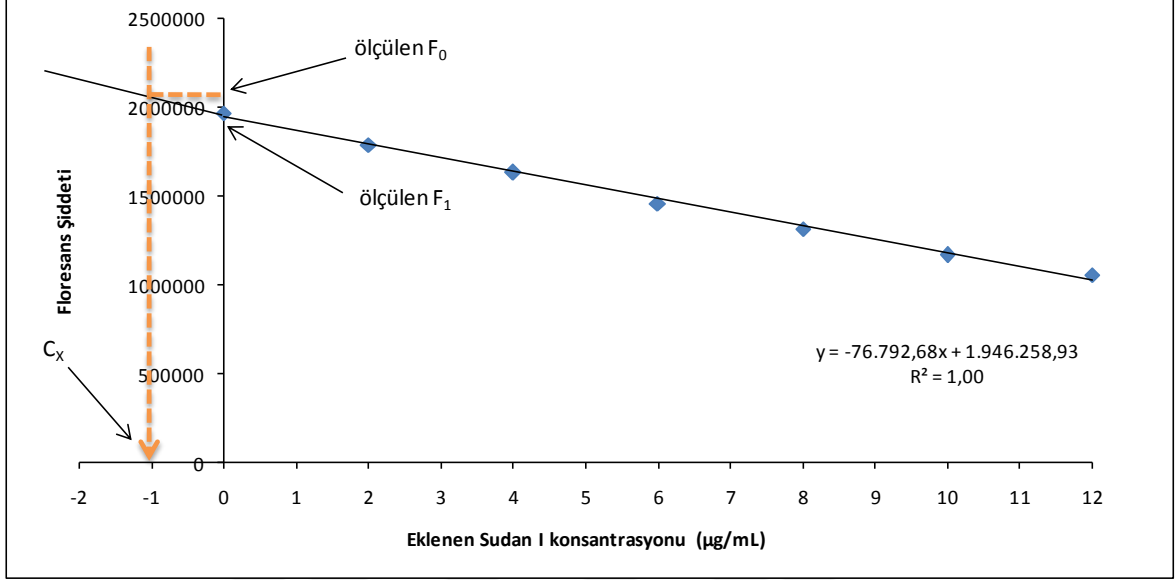


Şekil 19. Kimyonda Sudan I tayini için kullanılan çözeltilerin floresans spektrumları

465 nm'deki floresans şiddetlerindeki azalma artan Sudan I konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilerek modifiye standart ekleme grafikleri çizilmiştir. Şekil 20, 1 µg/mL



olacak şekilde spayk edilmiş kimyonda Sudan I tayini için çizilen modifiye standart ekleme grafiğini göstermektedir.



Şekil 20. Kimyonda Sudan I tayini için çizilen modifiye standart ekleme grafiği

### 3.7. Sudan I Tayini İçin Metot Validasyonu

#### 3.7.1. Doğrusal Aralık

Kullanılan modifiye standart ekleme yönteminde kırmızı pul biber için Sudan I konsantrasyonunun 3 µg/mL ile 10 µg/mL arasında doğrusal olduğu, sumak için bu değer 0,5 µg/mL ile 10 µg/mL ve kimyon için 1 µg/mL ile 12 µg/mL arasında olduğu tespit edilmiştir. Bu doğrusal aralıklarda üç numunenin R<sup>2</sup> değerlerinin kırmızı pul biber için 0,9975, sumak ve kimyon için ise 1,00 olduğu belirlenmiştir.

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

Her bir numune için 11 paralel çalışma yapılarak tanığın floresans şiddetinin (F<sub>0</sub>) standart sapması hesaplanmıştır. Daha sonra standart sapmanın 3 katı modifiye standart ekleme grafiğinin eğimine bölünerek gözlenebilme değeri hesaplandı. Numunelerin gözlenebilme sınırı değerlerinin 3 katı alınarak tayin sınırları hesaplanmıştır.

### 3.7.3. Doğruluk

Metodun doğruluğu ekleme-geri kazanım çalışmaları ile gösterilmiştir. Bunun için her bir numune matrisi için spayk edilmiş numuneler önerilen yöntemle analiz edilmiş ve Sudan I için % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Her bir numune için 3 paralel (n=3) çalışma yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Numuneler için Sudan I boyasının analiz sonuçları

Numune	Eklene (µg/mL)	Bulunan (µg/mL) ( $X_{ORT}$ , %BSS)	Geri kazanım (%)
Kırmızı pul biber	3,0	2,90, %3,08	97,6
Sumak	0,5	0,48, %4,27	96,6
Kimyon	1	1,03, %2,24	96,8

### 3.7.4. Kesinlik

Önerilen yöntemin kesinliği için her bir numune matrisi ile gün içi ve günler arası ölçümler yapılmıştır. Sonuçlar % bağıl standart sapma (%BSS) olarak ifade edilmiştir. Gün içi kesinlik 3 µg/mL Sudan I içeren kırmızı pul biber için % 3,08 ve günler arası kesinlik 4 µg/mL Sudan I içeren kırmızı pul biber için % 3,66 olarak bulunmuştur. Gün içi kesinlik 0,5 µg/mL Sudan I içeren sumak için % 4,28 ve günler arası kesinlik 1 µg/mL Sudan I içeren sumak için % 4,72 olarak bulunmuştur. 1 µg/mL Sudan I içeren kimyon için gün içi kesinlik % 2,24 ve 1,5 µg/mL Sudan I içeren kimyon için günler arası kesinlik % 2,36 olarak bulunmuştur.

#### 4. TARTIŞMALAR

Gıda katkı maddelerinin insan sağlığına zararlarının belirlenmesi önemli bir araştırma konusudur. Özellikle kötü niyetli üreticiler tarafından insan hayatı hiçe sayılarak her türlü katkı maddesi kullanılmakta ve bunların birçoğu kanserojen özellik göstermektedir. Gıda boyaları da kullanılan bu katkıların önemli bir sınıfını oluşturmaktadır. Tüketiciler bir ürün alırken önce rengine bakmaktadır. Bu yüzden besin maddelerini cazip hale getiren boyalar üretici firmalarca kullanılmaktadır.

Gıda boyaları doğal kaynaklardan üretildiği gibi sentetik olarak da üretilmektedir. Doğal yollardan elde edilen boyalar insan sağlığını daha az etkilerken, sentetik gıda boyaları pek çok hastalığa zemin hazırlamaktadır. Bu zararlı boyaların tehlikeli olduğu uluslararası kuruluşlar tarafından deneylerle ispatlanmıştır. Sonuç olarak bazı boyaların kullanımına yasal sınırlar getirilmiştir. Ancak bazı boyaların kullanımı ise tamamen yasaklanmıştır. Bu çalışmada, tayini için yeni bir yöntem geliştirilen Sudan I boyası da Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yasaklanan gıda katkı maddelerinden birisidir ve laboratuvarlar tarafından fareler üzerinde yapılan deneylerde bu boyaların kanserojen oldukları tespit edilmiştir [78].

Sudan I boyası özellikle baharat ürünleri için kullanılan bir gıda katkı maddesidir. Yoğun kırmızı renginden dolayı baharatlarda görüntü kalitesini artırdığı gibi tat verici özelliği de bulunan bu boyalar özellikle baharat üretimi yapan Orta Asya ülkelerinde merdiven altı üretimde yaygın olarak kullanılmaktadır. Üretimi artırmak için biberler çekirdekleri ile birlikte öğütülmekte ve beyaz olan kısımlar da üreticinin tepkisini çekmemek adına Sudan I boyasıyla boyanmaktadır. Mutfakta sıkça kullanılan bu baharatlar da kanserojen özellikler taşıdığından dolayı insanlar için ölümcül sonuçlar doğurmaktadır.

Literatürde Sudan I boyalarını tayin etmek için pek çok yöntem geliştirilmiştir. Gaz kromatografisi (GC), sıvı kromatografisi (LC), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), FTIR spektroskopisi gibi yöntemler bu boyanın tayini için önerilmiştir. Kullanılan bu yöntemler pahalı analiz yöntemleri olduğu için cihazlara ulaşım güçtür. Bu çalışmada pahalı olan bu metotlar yerine daha ucuz ve basit olan spektrofotometrik yöntemler önerilmektedir.

Kırmızı pul biber, kimyon ve sumak gibi numunelerin etanoldeki ekstraktları doğal

yapılarında bulunan floresant bileşiklerden dolayı yüksek floresans özellik göstermektedirler. Sudan I'in kendi floresans özelliği de kullanılarak yeni ve basit tayin yöntemlerinin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Sudan I boyasının etanol varlığında artan konsantrasyonlarının floresans şiddetini düzenli olarak azalttığı belirlenmiştir. Yani önerilen yöntemler hem ekstraktların hem de Sudan I'in floresans özelliğine dayanmaktadır.

Yöntemin doğruluğu ekleme-geri kazanım çalışmaları yapılarak gösterilmiştir. Bunun için spayk edilen kırmızı pul biber, sumak ve kimyon numuneleri önerilen yöntemle analiz edilmiştir. Bulunan % geri kazanım değerleri Tablo 2'den görüldüğü gibi % 96,6'nın üzerindedir.

Tablo 3 önerilen spektrofotometrik yöntemin analitik parametrelerini göstermektedir. Tablo 3'ten görüldüğü gibi önerilen yöntemin hassasiyeti oldukça yüksektir. Çalışılan numunelerden özellikle sumakta tayin sınırının 0,5 µg/mL'a kadar indiği görülmektedir.

Tablo 3. Sudan I tayini için önerilen spektrofotometrik yöntemin özellikleri

Parametreler	Kırmızı pul biber	Sumak	Kimyon
Uyarma dalga boyu	300 nm	350 nm	400 nm
Emisyon dalga boyu	330 nm	417 nm	465 nm
Gözlenebilme sınırı	1 µg/mL	0,16 µg/mL	0,33 µg/mL
Tayin sınırı	3 µg/mL	0,5 µg/mL	1 µg/mL
Tayin aralığı	3-10 µg/mL	0,5-10 µg/mL	1-12 µg/mL
Toplam hacim	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Çözücü ortamı	Etanol	Etanol	Etanol
Korelasyon katsayısı (R <sup>2</sup> )	0,997	1,00	1,00

Tablo 4'te Sudan I'in çeşitli baharatlarda tayini için literatürde bildirilen yöntemlerin ve bu çalışmada önerilen yöntemin karşılaştırılması verilmiştir.

Tablo 4. Baharatlarda sudan I tayini için literatürdeki yöntemler ve önerilen yöntemin karşılaştırılması

Reaktif, Metot	Numune	Numune Hazırlama	Ölçüm Öncesi İşlemler	Doğrusal Aralık (µg/mL)	LOQ (µg/mL)	Referans
Sudan I,SF	Acı kırmızı pul biber	İzopropil alkol ortamında 15 dakika çalkalama	-	-	-	68
Sudan I, HPLC (UV)	Pul biber	Su, aseton ve Triton X-100 kullanarak bulutlanma noktası ekstraksiyonu ile 20 kat zenginleştirme		-	0,01	69
Sudan I, ELISA	Çeşitli pul biberler	Asetonitril ile 15 dakika ekstraksiyon, 5 dakika santrüfuj sonrası metanolle seyreltme		0,0312-0,0717	-	70
Sudan I, HPLC	Pul biber	n-Heksan ile 15 dakika ultrasonik işleminden sonra ekstraktın iki kez n-heksan ile ekstraksiyon	Moleküler baskılama katı faz ekstraksiyon metodu (MISPE)	0,005–5,0	0,0155	76
Sudan I, SF	Kırmızı pul biber, sumak, kimyon	5 dakika ultrasonik işlemden sonra 20 dakika etanolle ekstraksiyon	-	3-10 (pul biber) 0,5-10 (sumak) 1-12 (kimyon)	3 0,5 1	Önerilen metot

Anibal vd.'nin yaptığı çalışmada üç farklı konsantrasyon seviyesinde (0,5, 1, 5 µg/mL) senkronize floresans ölçümleri yapılmıştır [68]. Bu çalışmada Sudan I tayini için doğrusal aralık, gözlenebilme sınırı ve tayin sınırı belirtilmemiştir. Liu vd.'nin önerdiği metodun tayin sınırı 0,01 µg/mL olmakla birlikte analiz öncesinde su, aseton ve Triton X-100 surfaktanı karışımı kullanılarak bulutlanma noktası ekstraksiyonu uygulanmıştır [69]. Böylece HPLC tayini öncesinde numunenin 20 kat zenginleştirilmesi sağlanmıştır [69]. Oplatowska vd.'nin önerdiği metotta ise tayin sınırı belirtilmemiştir [70]. Doğrusal aralık oldukça dar olup, boyanın ekstraksiyonu için metanol ve asetonitril gibi toksik çözücüler kullanılmıştır. Ji vd.'nin rapor ettiği metod moleküler baskılama katı faz materyalinin kullanımına dayanır. Ayrıca n-heksan ile boya ekstraksiyonu uygulanmıştır.

Sonuç olarak Sudan I'in çeşitli baharatlarda tayini için literatürdeki metotlar n-heksan, metanol ve asetonitril gibi toksik çözücülerin kullanımına dayalıdır. Bu çalışmada önerilen metotta ise çözücü olarak toksik özellik göstermeyen etanol kullanılmıştır. Ayrıca literatürdeki metotlar genellikle pahalı kromatografik sistemlerin kullanımını gerektirir. Sunulan çalışmada ise pahalı olmayan spektroflorimetrik bir yöntem geliştirilmiştir. Önerilen metotta standart Sudan I boyasından başka bir kimyasal madde veya materyal kullanılmamaktadır. Analiz öncesinde herhangi bir ön deriştirme veya zenginleştirme basamağı da uygulanmadığından literatürdeki yöntemlere göre önemli avantajlara sahiptir.

## 5. SONUÇLAR

Yapılan çalışmada, kırmızı pul biber, sumak ve kimyonda yasaklı gıda boyası olan Sudan I'in tayini için yeni bir spektrofiorimetrik yöntem geliştirilmiştir. Bu metotta analiz öncesinde numunelere herhangi bir zenginleştirme veya ön deriştirme işlemi uygulanmamış ve etanolik ekstraktlar direkt olarak spektrofiorimetrik yöntemle tayin edilmiştir. Ekstraksiyon zcs olarak etanol kullanılmıştır. Bu nedenle önerilen metot basit ve çevreci bir metottur.

Uygulanan standart ekleme yöntemi oldukça pratik ve hızlıdır. Spektrofiorimetrik lme dayalı olması ve kimyasal madde olarak herhangi bir reaktif kullanılmaması, ekstraksiyon zcs olarak etanolün kullanılması sebebiyle literatürdeki metotlara göre maliyeti çok düşük bir yöntemdir.

## 6.KAYNAKLAR

1. Erdoğan, Ş.,Ankara Piyasasında Satışa Sunulan Bazı Gıdalarda Sentetik Boya Miktarlarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Analizleri ve Beslenme Bilim Dalı, Ankara, 2007.
2. T.C. Resmi Gazete, Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, 16 (1997) 23172.
3. Katkı Maddeleri, www.diyetuzmani.com/beslenme/beslenme-bilgileri/gida-katkı-maddeleri.phpGıda 20.03.2017.
4. Yılmaz, E., Etiketlerde “E”leri Görmeye Alıştık. Bilim, Teknik Dergisi (1999) 94-97.
5. Karaali, A.,Gıda Katkı Maddeleri, GTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü, Gıda Teknolojileri Anabilim Dalı, Kocaeli,2006.
6. Gül, İ., Gıda Katkı Maddeleri, Ön Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Meslek Yüksek Okulu, Bursa, (2004).
7. Karaali, A. ve Özçelik B.,Gıda Katkı Maddeleri, Gıda Katkı Maddesi Olarak Doğal ve Sentetik Boyalar. Gıda, 18(2006) 389-396.
8. T.C. Resmi Gazete, Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, Gıdalarda Kullanılan Renklendiriciler Tebliği, Yetki Kanunu, (2002) 55.
9. Çakmakçı S. ve Çelik, İ., Gıda Katkı Maddeleri, , Gıda Bilimi ve Teknolojisi Yayını, No:2, ATAUNİ Basımevi, Erzurum, (1994) 212.
10. Altuğ, T., Gıda Katkı Maddeleri, Meta Basım, İzmir, (2001).
11. Saldamlı, İ.,Gıda Katkı Maddeleri ve İngrediyenler, Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara, (1985).
12. Yaralı, E., Gıda Katkı Maddeleri. Adnan Menderes Üniversitesi, Süleyman Pekgüzel Kampüsü, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü, Çine, Aydın,(2014).
13. Yurttagün, M.,Gıda Katkı Maddeleriyle İlgili Geniş Kapsamlı Bir Araştırma, (2010). www.saglikvakfi.org.tr/html/gkm.asp
14. Boyalarda E Kodu, www.kimyaevi.org/results.asp, 20,02.2017.
15. Adams EJ., Nutritional Care in Food Allergy and Food in Tolerance. In:Mohan., Arlin M. (Ed): Food Nutritional Food Therapy. Philadelphia: WB Saunders; (1992).
16. Shaywitz., Food Colorings given Following Birth Generate Attention Deficit Disorder Symptoms. Neurobehavioral Toxicology,1(1997) 41-47.
17. Kucharska, M. and Grabka,J., A Review of Chromatographic Methods for Determination of Synthetic Food Dyes. Talanta, 80, 3(2010) 1045-1051.



18. El-Hatib E., Türkiye’de Bazı Besinlere Katılan Sentetik Organik Boyaların Saptanması Üzerine Araştırmalar, Ankara,(1974).
19. Socaciu, C., Food Colorants Chemical and Functional Properties.Synthetic Colorants 604 (2008) 7.
20. Özcan, M. ve Akgül, A., Gıdalar için Doğal Renk Maddeleri-I, Gıda, 20,4 (1995) 209-213.
21. Özçelik B., Yeşil Bitkilerden Elde Olunacak Klorofilin Kompozisyon ve Stabilité Açısından Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 1995.
22. Çakmakçı S. ve Çelik İ., Gıda Katkı Maddeleri. Atatürk Üniversitesi Gıda Bilimi ve Teknolojisi, Erzurum, 1994.
23. Ekşi, A., Ankara Piyasasından Sağlanan Pasta Süsleri ve Bazı Şekerlerde Sentetik Boya Miktarlarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1996.
24. Crosby, N.T., Food Packaging Requirements,In Food Packaging Materials Aspects of Analysis and Migration of Contaminants, (1981) 9-18.
25. Thakur, B.R. and Arya, S.S., Stability of Sunset Yellow F.C.F and Tartrazine in Liquid Model Food System. Die Nahrung, 37,1 (1993) 15-19.
26. Taylor, A.J. and Clydesdale, F.M.,. Assesment of Tinctorial Power of Food Clourants. Food Chemistry, 26 (1986) 1-10.
27. Özcan, M. ve Akgül A., Gıdalar için Doğal Renk Maddeleri I, Gıda, 20,4 (1995) 209213.
28. Punj, S., Characterization of Azo Dye Reduction in Enter Ococcus Faecalis: Pro Quest, (2008).
29. Noonan, J.E., Meggos, H. and Furia, T.E.,. Synthetic Food Colors, CRC Handbook of Food Additives, Ed: Furia, T.E., CRC Press (1980) 339-383.
30. Song. H., Chen, K. and Tian., Synthesis of Novel Dyes derives from 1-ethyl-3-cyano-6-hydroxy-4-methly-5-amino-2-pyridone.Dyes and Pigments, 53 (2002) 257-262.
31. European Commission, Commission Decision of 23 May 2005 on Emergency Measures Regarding Chilli, Chill Products, Curcuma and Palm Oil,Official Journal of the European Union, (2005) 135/34.
32. Fonovich, 2013. Stiborova et al., 2009; Xu, Heinze, Paine, Cerniglia, & Chen, 2010.
33. National Toxicology Program (NTP), Carcino Genesis Bio Assay of C.I. Solvent Yellow 14 (1982) 226.
34. Commission Decision of 21 January2004 on Emergency Measures Regarding Hot Chilli and Hot Chilli Products 2003/460/EC, Off J Eur Union (2003) 23:52-54.

35. Commission Decision of 23 May 2005 on Emergency Measures Regarding Chilli, Chilli Products, Curcuma and Palmoil 2005/402/EC, Off J Eur Union (2005) 135:34-36.
36. Rapid Alert System For Food and Feed (RASFF), Annual Report on the Functioning of the RASFF, (2004).
37. Rebane, R., Leito, I., Yurchenko, S. and Herodes, K., A Review of Analytical Techniques for Determination of Sudan I-IV Dyes in Food Matrixes, Journal of Chromatography A, 127 (2010) 2747-2757.
38. Wu, M., Tang, W., Gu, J., Wang, Q., He, P. and Fang, Y., Electro Chemical Detection of Sudan I Using a Multi-Walled Carbon Nanotube/Chitosan Composite Modified, (2013).
39. Di Anibal, C. V., Ruis, S. I., Fernandez, M., Forteza, R., Cerd, V. and Callao, M. P.2. Standardization of UV-visible Data in a Food Adulteration Classification Problem, Food Chemistry, 134 (2012) 2326-2331.
40. Chen, N. Y., Li, H. F., Gao, Z. F., Qu, F., Li, N.B. and Luo, H. Q. Utilizing Polyethyleneimine-Capped Silver Nanoclusters as a New Fluorescence Probe for Sudan I-IV Sensing in Ethanol Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer, International Journal of Environmental Research and Public Health, 13,3 (2014) 334.
41. Christensen, J., Norgaard, L., Bro, R. And Engelsen, S. B. 2006. Multi Variate of Intact Food Systems. Chemical Reviews, (1994) 106.
42. Güngör, A., Bazı Metal Katyonlarının Katı-Sıvı Ekstraksiyonu, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, 2000.
43. Schönbacher, A., Thermische Verfahrens Technik, 1st. ed., Springer, Berlin, Heidelberg, (2002).
44. Gertenbach, DD., Solid-liquid Extraction Technologies for Manufacturing Nutraceuticals from Botonicals, CRC Press, New York, (2001).
45. İlbay Z., Turunçgil Meyve ve Yapraklarının Farklı Ekstraksiyon Yöntemleriyle Ekstraksiyonu ve Matematik Modellenmesi, Doktora Tezi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Temel İşlemler ve Termodinamik Programı, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 2016.
46. Ahuja, S. and Alsante, K.M., Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceuticals, San Diego, California, (2003).
47. Kaufmann, B and Christen, P., Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwave-assisted Extraction and Pressurized solvent Extraction, Phytochemical Analysis, 13 (2002) 105-113.
48. List, P. H. and Schmidt, P.C., Phytopharmaceutical Technology, CRC Press, Florida, U.S.A, (2006).

49. Wang, L. and Weller, C.L., Recent Advances in Extraction of Nutraceuticals from plants, Trends in Food Science & Technology, 17 (2006) 300-312.
50. Hasbay, A.İ., Pressurized Liquid Extraction of Phenolic Compunds from Fruit Pomaces, Doktora Tezi, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2006.
51. Heim, K.E., Tagliaferro, A.R. and Bobilya, D.J., Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Strucutre-activity Relationships, Journal of Nutritional Biochemistry, 13 (2002) 572-584.
52. Baki, S., Spektroflorimetrik Analiz Yöntemlerinin Toplam Antioksidan Kapasite Tayinlerine Uygulanması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2009.
53. Gündüz, T., İnrümentel Analiz, Altıncı Baskı, Gazi Kitap Evi Tic. Ltd. Şti., Ankara, (2002) 1357.
54. Baki, S., Spektroflorimetrik Analiz Yöntemlerinin Toplam Antioksidan Kapasite Tayinlerine Uygulanması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2009.
55. Turro, N. J., Modern Molecular Photochemistry, Benjamin/Cummings Publishing Company, New York, (1978) 286.
56. Gündüz, T., İnrümentel Analiz, 6. Baskı, s. 1357, Gazi Kitap Evi Tic. Ltd. Şti, Ankara, 2002.
57. Lakowicz, J.R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, Springer Science &Business Media, (2007) 980.
58. Maraba, A., Azaflavanon-3-ol bileşiği İle Yeni Bir Spektroflorimetrik Demir Tayini Metodunun Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, 2014.
59. Jain, A., Blum, C. and Subramaniam, V. Fluorescence Lifetime Spectroscopy and Imaging of Visible Fluorescent Proteins. In: Advances in Biomedical Engineering Elseiver, , London, (2009) 145-174.
60. Lakowicz, J. R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2<sup>nd</sup> Edition, Kluwer/Plenum, New York, (2007) 367-391.
61. Krishnamoorthy, G. Fluorescence Spectroscopy in Molecular Description of Biological Processes. Indian J. Biochem. Bi., 40,3 (2003) 147-159.
62. [www.bayar.edu.tr/besergil/10-Bolum-7.pdf](http://www.bayar.edu.tr/besergil/10-Bolum-7.pdf). Erişim Tarihi: 17 Haziran 2016.
63. Skoog, D. A., Holler F. J., Nieman, T. A., Enstrümentel Analiz İlkeleri, 1. Baskı, Bilim Yayıncılık, Ankara, (1998).
64. Harris, D. C.,Freeman, W. H., Quantitative Chemical Analysis, New York, (1995) 750.

65. Ertaş Söğüt, Ö. ve Kayalı, A., Analitik Yöntem Geçerliliğine Genel Bir Bakış, Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi, Ankara (2005) 34 41-57.
66. Benmassaoud, Y. And Maria J. V., Magnetic/non-magnetic Argan Press Cake Nanocellulose for the Selective Extraction of Sudan Dyes in Food Samples Prior to the Determination by capillary Liquid Chromatography, Talanta, (2017) 166 63-69.
67. Zhang, Z., Xu, S., Li, J., Xiong, H., Peng, H. and Chen, L. Selective solid-phase Extraction of Sudan I in Chilli Sauce by Single-hole Hollow Molecularly Imprinted Polymers, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60,1 (2011) 180-187.
68. Carolina V., Di Anibal, M., Susana Rodriguez, Liliana Albertengo, Synchronous Fluorescence and Multivariate Classification Analysis as a Screening Tool for Determining Sudan I Dye in Culinary Spices, Food Control, (2015) 56 18-23.
69. Liu, W., Zhao, W. J., Chen, J. B. and Yang, M. M., A Cloud Point Extraction Approach Using Triton X-100 for the Separation and Preconcentration of Sudan Dyes in Chilli Powder, Analytica Chimica Acta, (2007) 605 1 41-45.
70. Michalina O., Paul J. S., Claudia, S., Lutz, H. and Christopher T. E., Development of a Simple Gel Permeation Clean-up Procedure Coupled to a Rapid Disequilibrium Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) for the Detection of Sudan I Dye in Spices and Sauces, Anal Bioanal Chem, (2011) 401 1411-1422.
71. Zhixiang, X., Shuo, W., Guozhen, F., Jijia, S. and Yan, Z., On-line SPE Coupled with LC for Analysis of Traces of Sudan Dyes in Foods. Chromatographia, 5,6 (2010) 397-403.
72. Jiang, C., Sun, Y., Yu, X., Zhang, L., Sun, X. and Gao, Y., Removal of Sudan Dyes from Water with C18-functional Ultrafine Magnetic Silica Nanoparticles. Talanta, (2012) 89, 38-46.
73. Ho, Y.M., Tsoi, Y.K. and Leung, K.S.Y., Ionic-liquid-based dispersive Liquid-liquid Microextraction for High-through Put Multiple Food Contaminant Screening. Journal of Separation Science, 36,23 (2013) 3791-3798.
74. Yan, H., Wang, H., Qiao, J. and Yang G., Molecularly Imprinted Matrix Solid Phase Dispersion Combined with Dispersive Liquid-liquid Microextraction for the Determination of Four Sudan Dyes in Egg Yolk, Journal of Chromatography A, 1218,16 (2011) 2182-2188.
75. Santosh, L., Ritu, J., Lalit, M. K., Hoonsoo, L., Moon, S., Kim, H. C., Changyeun, Mo., Young-Wook, S., Anisur, R. and Byoung, K. C., Quantitative Analysis of Sudan Dye Adulteration in Paprika Powder Using FTIR Spectroscopy. Journal of Food Additives & Contaminants: Part A, (2017).
76. Wenhua, J., Mingming, Zhang., Tao, W., Xiao, W., Zhenjia, Z. and Junjie G., Molecularly Imprinted Solid-phase Extraction Method Based on SH-Au Modified Silica Gel for the Detection of Six Sudan Dyes in Chilli Powder Samples, Talanta 165 (2017) 18-26.

77. Chengjang, Z., Gongke, L. and Zhuomin, Z., A Hydrazone Covalent Organic Polymer Based Micro-solid Phase Extraction for Online Analysis of Trace Sudan Dyes in Food Samples, Journal of Chromatography A, 1419 (2015) 1-9.
78. The Government of the Hong Kong Special Administrative Region, Centre for Food Safety, August (2006).



## ÖZGEÇMİŞ

20.05.1991 yılında Trabzon'da doğdu. İlköğrenimini Trabzon Cudibey İlköğretim Okulu'nda tamamladı. 2009 yılında Trabzon Cumhuriyet Lisesi'nden mezun olduktan sonra aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2013 yılında bitirdikten sonra aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Analitik Kimya Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2014 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi'nden C sınıfı iş güvenliği uzmanı sertifikası aldı.

