

**GIDA KATKI MADDESİ OLARAK KULLANILAN MONOSODYUM
GLUTAMATIN ÇEŞİTLİ GIDA MADDELERİNİN İÇİNDEKİ
MİKTARININ TAYİNİ**
Doktora Tezi

Murat SOYSEVEN
Eskişehir 2018

**GIDA KATKI MADDESİ OLARAK KULLANILAN MONOSODYUM
GLUTAMATIN ÇEŞİTLİ GIDA MADDELERİNİN İÇİNDEKİ
MİKTARININ TAYİNİ**

Murat SOYSEVEN

DOKTORA TEZİ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Göksel ARLI

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ağustos 2018

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1507S562 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Murat SOYSEVEN'in "Gıda Katkı Maddesi Olarak Kullanılan Monosodyum Glutamat'ın Çeşitli Gıda Maddelerinin İçindeki Miktarının Tayini" başlıklı tezi 10.08.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek 'Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin' ilgili maddeleri uyarınca, Analitik Kimya Anabilim dalında doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı-Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı): Prof. Dr. Göksel ARLI

Üye : Prof. Dr. Zeki ATKOŞAR

Üye : Prof. Dr. Osman Sermet KABASAKAL

Üye : Doç. Dr. Bülent ERGUN

Üye : Doç. Dr. Fatma TÜMSEK

Prof. Dr.

Nalan GÜNDOĞDU-KARABURUN

Enstitü Müdürü



ÖZET

GIDA KATKI MADDESİ OLARAK KULLANILAN MONOSODYUM GLUTAMATIN ÇEŞİTLİ GIDA MADDELERİNİN İÇİNDEKİ MİKTARININ TAYİNİ

Murat SOYSEVEN

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağustos 2018

Danışman: Prof. Dr. Göksel ARLI

Tüm dünyada ve ülkemizde pratik ve kolay tüketilebilen ürünlere talep gün geçtikçe artmaktadır. Bu durum hazır gıda sektörünü, gıda katkı maddelerini ve dolayısıyla lezzet arttırıcı maddeleri kullanmaya sevk etmektedir. Monosodyum glutamat (MSG) en yaygın kullanılan lezzet arttırıcılardan biridir ve gıdalar içerisinde bulunan MSG miktarının belirlenmesi önem arz etmektedir.

Bu çalışmada, lezzet arttırıcı olarak yaygın şekilde kullanılan MSG'nin cips, hazır çorba, et bulyon, tavuk bulyon, pizza sosu, çeşni ve çiğ köfte gibi gıda maddeleri içerisindeki miktarının tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır. MSG tayinleri, ultraviyole/foto diyot dizisi (UV/DAD), floresans (FLD) ve evaporatif ışık saçılım dedektörü (ELSD) olmak üzere 3 farklı dedektör aracılığı ile gerçekleştirilmiştir.

Ayırımlarda C₁₈ (150 mm, 4.6 mm, 2.7 µm) ve C₁₈ (150 mm, 4.6 mm, 3 µm) boyutlarına sahip kolonlar kullanılmış olup, UV/DAD ve FLD yöntemlerinde MSG tayini için sırasıyla ortofitaldialdehit (OPA) ve dansil klorür (DNS-Cl) reaktifleri ile kolon öncesi türevlendirme işlemi uygulanırken, YPSK-ELSD için türevlendirme işlemi yapılmaksızın analiz gerçekleştirilmiştir. Yöntemin doğrusalılığı, saptama ve tayin limitleri, tekrar edilebilirliği, doğruluğu ve sağlamlığı incelenmiştir. İncelenen gıdalarda bulunan MSG miktarları mevzuata uygunluk açısından değerlendirilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Monosodyum Glutamat (MSG), Glutamik Asit (GLU), YPSK, ELSD, UV/DAD, FLD

ABSTRACT

DETERMINATION OF MONOSODIUM GLUTAMATE USED AS FOOD ADDITIVES IN VARIOUS FOOD STUFFS

Murat SOYSEVEN

Department of Analytical Chemistry

Anadolu University, Graduate School of Health, August 2018

Supervisor: Prof. Dr. Göksel ARLI

The demand for practical and easily consumable products is increasing day by day in all over the world and in our country. This leads the ready-to-eat food industry to use food additives and therefore flavor enhancers. Monosodium glutamate (MSG) is one of the most popular flavor enhancers and it is important to determine the amount of MSG present in the foods.

In this study, it was aimed to develop a high performance liquid chromatography (YPSK) method to determine the amount of MSG commonly used as flavor enhancer in food stuffs such as chips, ready soup, meat bullion, chicken bullion, pizza sauce, condiment and raw meatballs. MSG determination was carried out through three different detectors including ultraviolet/photo diode array (UV/DAD), fluorescence (FLD) and evaporative light scattering detector (ELSD). Columns with dimensions of C₁₈ (150 mm, 4.6 mm, 2.7 µm) and C₁₈ (150 mm, 4.6 mm, 3 µm) were used in the discrimination and orthophthaldialdehyde (OPA) and dansyl chloride (DNS-Cl) reagents were used for MSG determination in UV/DAD and FLD methods. The analysis was carried out for YPSK- ELSD without derivatization. The linearity, detection and determination limits, reproducibility, accuracy and stability of the method were examined. The amounts of MSG found in the examined greenhouses were evaluated in terms of compliance with legislation.

Keywords: Monosodium Glutamate (MSG), Glutamic Acid (GLU), HPLC, ELSD, UV/DAD, FLD

10/08/2018

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmanın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan ‘bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve hiçbir görselde ‘intihal içermediğini’ beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Murat SOYSEVEN

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada, beni öğrencisi olarak değil her zaman oğlu olarak gören, kararlılığını, duruşunu, bilimsel yaklaşımlarını, pratikliğini, tecrübelerini, örnek aldığım, bana hep bir sonraki adım için tüm içtenliği ile yol gösteren, her an güvenini yanımda hissettiğim ve desteklerini saymakla bitiremeyeğim çok kıymetli hocam, Yunus Emre Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu müdürü sayın **Prof. Dr. Göksel ARLI**'ya,

Tüm çalışmalarım boyunca akademik desteklerini ve yönlendirmelerini esirgemeyen sayın hocalarım **Prof. Dr. Zeki ATKOŞAR** ve **Doç. Dr. Bülent ERGUN**'a, Analitik Kimya anabilim dalında bulunan sayın hocalarım, çalışma arkadaşlarım ile Yunus Emre Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulunda bulunan çalışma arkadaşlarıma,

Her an yanımda olan, bana destek vermekten hiç çekinmeyen, biricik eşim, hayat yoldaşım, Yüksek Kimya Mühendisi Özlem SOYSEVEN'e, Bugünlere gelmemde en büyük rolü oynayan, beni her konuda destekleyen canımdan çok sevdiğim, Ayşe Nihal SOYSEVEN, Remzi SOYSEVEN ve canım ablam Özlem PAZARCIOĞLU'na

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Murat SOYSEVEN

Ağustos 2018

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
GÖRSELLER DİZİNİ.....	xvii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GIDA KATKI MADDELERİ.....	3
2.1. Gıda Katkı Maddelerinin Tarihçesi.....	5
2.2. Gıda Katkı Maddelerinin Kullanım Amaçları.....	6
2.3. Gıda Katkı Maddeleri Konusunda Çalışan Uluslararası Kuruluşlar.....	7
2.3.1. Uluslararası Gıda Kodeks komisyonu (CAC).....	7
2.3.2. Gıda katkıları FAO/WHO ortak komitesi (JEFCA).....	7
2.3.3. Gıda Katkıları ve kontaminasyonları komitesi (CCFAC).....	8
2.3.4. Pestisit FAO/WHO ortak toplantısı (JMPR).....	8
2.3.5. Avrupa Gıda Güvenliği otoritesi (EFSA).....	8
2.3.6. Birleşik Devletler gıda ve ilaç dairesi (FDA).....	8
2.4. Gıda Katkı Maddeleri İle İlgili Yasal Düzenlemeler.....	9
2.4.1. Türk Gıda Kodeksi.....	10
2.4.2. Gıda katkı maddeleri ile ilgili terim ve kısaltmalar.....	11
2.5. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması.....	13
2.5.1. Lezzet arttırıcılar.....	15
2.5.1.1. Lezzet arttırıcıların tarihçesi.....	15
2.5.1.2. Lezzet arttırıcıların maddelerin sınıflandırılması.....	16

2.5.1.3. Lezzet arttırıcı maddeler ile ilgili yasal düzenlemeler.....	18
2.5.1.4. Umami.....	18
2.5.2. Monosodyum glutamat (MSG).....	20
2.5.2.1. Monosodyum Glutamatın tarihçesi.....	24
2.5.2.2. Monosodyum Glutamatın ticari olarak üretimi.....	25
2.5.2.3. Monosodyum Glutamatın gıdalarda kullanımı.....	25
2.5.2.4. Monosodyum Glutamat ile ilgili yasal düzenlemeler.....	26
2.5.2.5. MSG'nin gıdalardaki miktar tayini ile ilgili çalışmalar.....	27
2.5.2.6. MSG'nin sağlık üzerine etkileri ve ilgili çalışmalar.....	31
2.5.2.7. Çin restoranı sendromu.....	34
3. DENEYSEL YÖNTEMLER.....	36
3.1. Kromatografi.....	36
3.1.1. Kromatografinin mekanizma yönünden sınıflandırma.....	36
3.1.1.1. Dağılma kromatografisi.....	37
3.1.1.2. Adsorbsiyon kromatografisi.....	37
3.1.1.3. İyon değiştirme kromatografisi.....	37
3.1.1.4. İyon çifti kromatografisi.....	37
3.1.1.5. Molekül seçme kromatografisi	37
3.1.1.6. Affinite kromatografisi.....	37
3.1.2. İki fazın polarlık durumuna göre sınıflandırma.....	38
3.1.3. Fazların fiziksel şekline göre sınıflandırılma.....	38
3.1.4. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK).....	38
3.1.4.1. YPSK sisteminde kullanılan dedektörler.....	39
3.1.4.1.1. Ultraviyole/Görünür (UV/VIS) ve foto diyod dizisi dedektörü (DAD).....	40
3.1.4.1.2. Floresans dedektör.....	41
3.1.4.1.3. Evaporatif ışık saçılım dedektörü.....	41
4. MATERYAL VE METOT.....	43
4.1. MSG Analizinde Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	43
4.2. MSG Analizinde Kullanılan Cihazlar.....	46
4.3. Yöntemler.....	46
4.3.1. YPSK-UV/DAD ile MSG tayini.....	47
4.3.1.1. Standart çözeltilerin ve türevlendirme ajanının hazırlanması.....	47

4.3.1.2. Mobil fazın hazırlanması.....	48
4.3.1.3. Numunelerin hazırlanması.....	48
4.3.2. YPSK-UV/DAD ile MSG Tayin Yöntemi Geliştirilmesi.....	48
4.3.2.1. Sistem uygunluk testleri.....	49
4.3.2.2. Yöntem geçerliliğinin tespiti (Validasyon).....	51
4.3.2.3. Doğruluk.....	51
4.3.2.4. Kesinlik.....	52
4.3.2.5. Seçicilik.....	52
4.3.2.6. Teşhis sınırı.....	52
4.3.2.7. Tayin alt sınırı.....	52
4.3.2.8. Doğrusallık.....	53
4.3.2.9. Aralık.....	53
4.3.2.10. Sağlamlık.....	53
4.3.3. YPSK-UV/DAD ile MSG tayini için kolon öncesi (pre – kolon) türevlendirilme işlemi basamakları	53
4.3.4. YPSK-FLD ile MSG tayini.....	56
4.3.4.1. Standart çözeltinin hazırlanması.....	56
4.3.4.2. Mobil fazın hazırlanması.....	56
4.3.4.3. Numunelerin hazırlanması.....	56
4.3.4.4. Türevlendime ajanının hazırlanması ve kolon – öncesi (pre – kolon) MSG türevlendirme işlemi.....	57
4.3.5. YPSK-FLD ile analiz yöntemi.....	59
4.3.6. YPSK-ELSD ile MSG tayini.....	59
4.3.6.1. Standart çözeltinin hazırlanması.....	59
4.3.6.2. Mobil fazın hazırlanması.....	59
4.3.6.3. Numunelerin hazırlanması.....	60
4.3.7. YPSK-ELSD ile analiz yöntemi	61
4.4. MSG ve L-GLU için Seçici Moleküler Baskılanmış Polimerlerin (MIPs) Hazırlanması.....	62
4.4.1. MIP'ler kullanılarak L-GLU ve MSG'nin sulu çözeltilerden ekstraksiyonu.....	64
5. BULGULAR ve SONUÇLAR.....	65
5.1. YPSK-UV/DAD ile Gıdalarda Bulunan MSG Miktarı Tayini	65

5.1.1. YPSK-UV/DAD ile yapılan SUT çalışmaları.....	73
5.1.2 YPSK-UV/DAD ile yapılan doğruluk çalışmaları.....	74
5.1.3. YPSK-UV/DAD ile yapılan kesinlik çalışmaları.....	75
5.1.4. YPSK-UV/DAD ile yapılan seçicilik çalışmaları.....	77
5.1.5. YPSK-UV/DAD ile yapılan doğrusallık çalışmaları.....	77
5.1.6. YPSK-UV/DAD ile yapılan sağlamlık çalışmaları.....	78
5.2. YPSK-FLD ile Gıdalarda Bulunan MSG Miktarı Tayini	82
5.2.1. YPSK-FLD ile yapılan SUT çalışmaları.....	87
5.2.2 YPSK-FLD ile yapılan doğruluk çalışmaları.....	88
5.2.3. YPSK-FLD ile yapılan kesinlik çalışmaları.....	89
5.2.4. YPSK-FLD ile yapılan seçicilik çalışmaları.....	92
5.2.5. YPSK-FLD ile yapılan doğrusallık çalışmaları.....	92
5.2.6. YPSK-FLD ile yapılan sağlamlık çalışmaları.....	93
5.3. YPSK-ELSD ile MSG Tayini	98
5.3.1. YPSK-ELSD ile yapılan SUT çalışmaları.....	115
5.3.2 YPSK-ELSD ile yapılan doğruluk çalışmaları.....	116
5.3.3. YPSK-ELSD ile yapılan kesinlik çalışmaları.....	117
5.3.4. YPSK-ELSD ile yapılan seçicilik çalışmaları.....	117
5.3.5. YPSK-ELSD ile yapılan doğrusallık çalışmaları.....	117
5.3.6. YPSK-ELSD ile yapılan sağlamlık çalışmaları.....	118
5.4. Moleküler Baskılanmış Polimer (MIPs) ile L-GLU ve MSG'nin Saflaştırma Çalışmaları.....	119
6. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	121
KAYNAKÇA.....	126
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Türk Gıda Kodeksine göre kullanılan gıda katkı maddeleri ve kodları.....	4
Tablo 2.2. Gıdalar bulunan serbest glutamik asit miktarları.....	23
Tablo 2.3. Glutamik asit ve glutamatların maksimum kullanım miktarları.....	26
Tablo 2.4. Ülkemizde üretilen bazı geleneksel ürünler ve bunlarda kullanılması yasaklanan gıda katkı maddeleri.....	27
Tablo 3.1. YPSK kullanılan detektör tipleri.....	40
Tablo 4.1. Çalışmalarda kullanılan kimyasal malzemeler listesi.....	44
Tablo 4.2. Çalışmalarda kullanılan cihazların marka ve modelleri.....	46
Tablo 4.3. Ters faz kromatografide kullanılan bazı reaktiflerin spesifikasyonlar.....	49
Tablo 4.4. Sistem uygunluk testleri için kullanılan parametreler ve testleri.....	50
Tablo 5.1. YPSK-UV/DAD ile MSG ve analizleri için belirlenen koşullar.....	70
Tablo 5.2. OPA/βME ile türevlendirilerek hazırlanan MSG kromatogramlarının pik alanları.....	73
Tablo 5.3. YPSK-UV/DAD SUT çalışmaları sonuçları.....	74
Tablo 5.4. Standart MSG ve numunelere spiked işlemi yapılarak elde edilen geri kazanım değerleri.....	75
Tablo 5.5. 100 ppm MSG standart çözeltisinden elde edilen gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları değerlendirmesi.....	76
Tablo 5.6. OPA/βME/RTU ile türevlendirilmiş MSG'nin gün içi ve günler arası elde edilen doğrusallık çalışma sonuçları.....	78
Tablo 5.7. YPSK-UV/DAD sistemi ile elde edilen sağlamlık sonuçları.....	79
Tablo 5.8. Analizi yapılan numunelerin elde edilen MSG miktarları (ppm).....	80
Tablo 5.9. YPSK-FLD ile MSG tayini için belirlenen koşullar.....	85
Tablo 5.10. DNS-Cl türevi ile elde edilen standart MSG kromatogram alanları.....	86
Tablo 5.11. YPSK-FLD sistemi için yapılan SUT çalışmaları sonuçları.....	88
Tablo 5.12. Standart MSG ve numunelere zenginleştirme (spiked) işlemi uygulanarak elde edilen YPSK-FLD geri kazanım değerleri.....	89
Tablo 5.13. 10 ppm MSG standart çözeltisinden elde edilen gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları değerlendirmesi.....	90
Tablo 5.14. YPSK-FLD doğrusallık çalışma sonuçları.....	93

Tablo 5.15. YPSK-FLD ile sağlanlık testinden elde edilen sonuçlar.....	93
Tablo 5.16. YPSK-FLD sistemi ile analizi yapılan gıda numunelerinden elde edilen MSG miktarları	94
Tablo 5.17. Mobil faz su oranındaki değişikliğe karşı elde edilen pik alanları.....	101
Tablo 5.18. 10 µg/ml olan NaCl, Na ₂ CO ₃ , Na ₂ SO ₄ , NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O, Na ₃ PO ₄ .12H ₂ O ile L-GLU ve MSG standartlarının tutunma zamanları.....	105
Tablo 5.19. ELSD Nebulazier sıcaklık değişimi ile oluşan pik alanı değerleri.....	105
Tablo 5.20. ELSD azot gazı basıncı değişimi ile oluşan pik alanı değişimi.....	107
Tablo 5.21. YPSK-ELSD ile MSG analiz koşulları.....	110
Tablo 5.22. YPSK-ELSD sistemine enjekte edilen MSG ve L-GLU derişimleri.....	111
Tablo 5.23. YPSK-ELSD sistemi ile MSG standartları ile elde edilen alıkonma zamanları.....	113
Tablo 5.24. Sisteme enjekte edilen MSG derişimlerinin logaritmaları ile elde edilen alanların logaritma değerleri.....	114
Tablo 5.25. YPSK-ELSD ile elde edilen SUT çalışma sonuçları; analizde kullanılan kolon: Raptor C18 150x4.6 mm., 3 µm/ hareketli faz Su:ACN (94:5:1, <i>h/h</i>).....	116
Tablo 5.26. Standart MSG çözeltilerine zenginleştirme (spiked) işlemi uygulanarak elde edilen geri kazanım değerleri.....	117
Tablo 5.27. 500 ppm MSG standart çözeltilisinden elde edilen gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları.....	117
Tablo 5.28. YPSK-ELSD ile yapılan doğrusallık çalışma sonuçları.....	118
Tablo 5.29. YPSK-ELSD yöntemi ile sağlanlık testinden elde edilen sonuçlar.....	118
Tablo 5.30. 1000 ppm MSG'nin MIP ile muamele edilmesinden sonra elde edilen Q ve (%) azalma değerleri.....	120

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Umami tadının tat prizmasındaki yeri.....	20
Şekil 2.2. MSG molekül yapısı ve özellikleri.....	22
Şekil 3.1. YPSK-ELSD sistemi çalışma prensibi.....	42
Şekil 4.1. L-Glutamik asit ile OPA/βME/RTU reaksiyonu.....	54
Şekil 4.2. a) OPA/βME reaktifi hazırlanması b) Numune hazırlanması, türevlendirilmesi ve enjeksiyonu.....	55
Şekil 4.3. DNS-CI ile MSG'nin türevlendirme reaksiyonu.....	57
Şekil 4.4. a) DNS-CI türevlendirme ajanı hazırlanması b) Numunelerin ve standart çözeltilerin hazırlık basamakları.....	58
Şekil 4.5. a) ELSD için stok MSG ve L-Glu hazırlanması b) Numunelerin ELSD ile analizi için hazırlanma basamakları	61
Şekil 4.6. MSG ve L-GLU' ya özgü MIP sentez basamakları.....	63
Şekil 4.7. MSG baskılanmış polimer sentezi.....	64
Şekil 5.1. MeOH ve EtOH ile PBS tampon çözelti karışımı ile oluşturulan mobil fazların YPSK sisteminde oluşturduğu ortalama basınç değerleri	65
Şekil 5.2. OPA/βME türevlendirme ajanı 336 nm'da dalga boyunda gözlenen kromatogram.....	66
Şekil 5.3. OPA/βME türevlendirme ajanı 254 nm'da dalga boyunda gözlenen kromatogram	67
Şekil 5.4. 100 ppm MSG'nin OPA/βME ile türevlendirilmiş 254 nm dalga boyunda gözlenen kromatogram	67
Şekil 5.5. 100 ppm MSG'nin OPA/βME ile türevlendirilmiş 336 nm dalga boyunda gözlenen kromatogram	68
Şekil 5.6. OPA/βME ile türevlendirilmiş 50 ppm MSG kromatogramı Mobil Faz: Mobil Faz: Su:MeOH(75:25, <i>h/h</i>) Kolon:Restek Raptor™ C18 (2.7 µm, 150×4.6 mm).....	68
Şekil 5.7. OPA/βME ile türevlendirilmiş 50 ppm MSG kromatogramı Mobil Faz: 10 mM PBS pH 5.1:MeOH (75:25, <i>h/h</i>) Kolon: Restek Raptor™ C18 (2.7 µm, 150×4.6 mm).....	69
Şekil 5.8. 15 °C – 45 °C arasında gözlenen sıcaklık-kolon basıncı değişim grafiği.....	70

Şekil 5.9. YPSK-UV/DAD ile elde edilen 1 ppm, 2.5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm derişimlerine ait MSG kromatogramları.....	72
Şekil 5.10. MSG derişimleri-Kromatgoram alanları ile elde edilen kalibrasyon grafiğı (n=3).....	73
Şekil 5.11. 1. gün sonunda elde edilen OPA/βME/RTU ile türevlendirilmiş MSG kromatogramı.....	76
Şekil 5.12. 2. gün sonunda elde edilen OPA/βME/RTU ile türevlendirilmiş MSG kromatogramı	77
Şekil 5.13. YPSK saflıktaki su içerisinde hazırlanarak elde edilen 6 nolu numune kromatogramı türevlendirilmesi ile elde edilen kromatogramı.....	83
Şekil 5.14. %2'lik NaHCO ₃ içerisinde hazırlanarak elde edilen 6 nolu numune kromatogramı.....	83
Şekil 5.15. 25 ppm derişime sahip MSG'nin DNS-CI ile türevlendirilmesinden elde edilen kromatogram.....	84
Şekil 5.16. YPSK – FLD ile MSG ayrımı için 15 °C – 45 °C arasında gözlenen kolon basıncı değışimi.....	84
Şekil 5.17. 100 ppb – 100 ppm arası DNS-CI türevlendirilmesi sonucu elde edilen MSG kromatogramları	86
Şekil 5.18. DNS-CI türevi ile elde edilen standart MSG standartlarına ait kalibrasyon grafiğı.....	87
Şekil 5.19. 10 ppm DNS-CI türevi MSG'nin 1. gün sonunda elde edilen kromatogramı.....	90
Şekil 5.20. 10 ppm DNS-CI türevi MSG'nin 2. gün sonunda elde edilen kromatogramı.....	91
Şekil 5.21. 25 ppm DNS-CI türevi MSG'nin 1. gün sonunda elde edilen kromatogramı.....	91
Şekil 5.22. 25 ppm DNS-CI türevi MSG'nin 2. gün sonunda elde edilen kromatogramı.....	92
Şekil 5.23. YPSK-ELSD ile elde edilen 1000 ppm L-GLU standardı	98
Şekil 5.24. YPSK-ELSD ile elde edilen 1000 ppm MSG MeOH:Su (50:50, h/h) Nebulazier Sıcaklığı 40 °C, Gain:5 Filter:1 Azot gazı basıncı: 350 kPa.....	99

Şekil 5.25. YPSK-ELSD ile elde edilen 500 ppm MSG MeOH:Su (50:50, <i>h/h</i>) Nebulazier Sıcaklığı 40 °C, Gain:5 Filter:1 Azot gazı basıncı: 350 kPa.....	99
Şekil 5.26. YPSK-ELSD ile elde edilen 50 ppm MSG MeOH:Su (80:20, <i>h/h</i>) Nebulazier Sıcaklığı: 40 °C, Gain:5 Filter:1 Azot gazı basıncı: 350 kPa...	100
Şekil 5.27. 1000 ppm MSG ACN:Su:FA (5:94:1, <i>h/h/h</i>) Nebulazier Sıcaklığı 40 °C, Gain:5 Filter:1 Azot gazı basıncı: 350 kPa	101
Şekil 5.28. YPSK-ELSD sisteminde kullanılan mobil fazdaki su oranı ile pik alanı arası ilişki.....	102
Şekil 5.29. 10 µg/ml NaCl kromatogramı ACN:Su:FA (5:94:1, <i>h/h/h</i>) Nebulazier sıcaklığı: 40 °C Gain:5 Filter :1 Azot gazı basıncı: 350 kPa	102
Şekil 5.30. 10 µg/ml Na ₂ CO ₃ kromatogramı ACN:Su:FA (5:94:1 <i>h/h/h</i>) Nebulazier sıcaklığı: 40 °C Gain:5 Filter :1 Azot gazı basıncı: 350 kPa.....	103
Şekil 5.31. 10 µg/ml Na ₃ PO ₄ .12H ₂ O kromatogramı ACN:Su:FA (5:94:1, <i>h/h/h</i>) Nebulazier sıcaklığı: 40 °C Gain:5 Filter :1 Azot gazı basıncı: 350kPa....	103
Şekil 5.32. 10 µg/ml NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O kromatogramı ACN:Su:FA (5:94:1, <i>h/h/h</i>) Nebulazier sıcaklığı: 40 °C Gain:5 Filter :1 Azot gazı basıncı: 350 kPa...	104
Şekil 5.33. 10 µg/ml Na ₂ SO ₄ kromatogramı ACN:Su:FA (5:94:1, <i>h/h/h</i>) Nebulazier sıcaklığı: 40 °C Gain: 5 Filter: 1 Azot gazı Basıncı: 350 kPa.....	104
Şekil 5.34. Evaporatif ışık saçılım dedektörü sıcaklık değişimi-pik alanı ilişkisi.....	106
Şekil 5.35. 1000 ppm MSG ACN:Su:FA (5:94:1, <i>h/h/h</i>) Nebulazier sıcaklığı: 70 °C Gain: 5 Filter: 1 Azot gazı Basıncı: 350 kPa.....	106
Şekil 5.36. 1000 ppm MSG (ACN:Su:FA):(%5:%94:%1) Nebulazier sıcaklığı: 40 °C Gain:5 Filter:1 Azot gazı Basıncı: 350 kPa.....	107
Şekil 5.37. ELSD Azot Gazı Basıncı (kPa) değişimi ile oluşan pik alanı değişimi ACN:Su:FA (5:94:1, <i>h/h/h</i>) Nebulazier sıcaklığı: 40 °C Gain: 5 Filter: 1 Azot gazı basıncı: 350kPa).....	108
Şekil 5.38. YPSK-ELSD sisteminde kolon sıcaklığı pik alanı ilişkisi.....	108
Şekil 5.39. YPSK-ELSD sisteminde gain değeri ELSD sinyal ilişkisi.....	109
Şekil 5.40. YPSK-ELSD sisteminde filter değeri ELSD sinyali ilişkisi.....	109
Şekil 5.41. 1000 ppm – 25 ppm arası elde edilen MSG standartları ACN:Su:FA (5:94:1, <i>h/h/h</i>) Nebulazier sıcaklığı: 40 °C Gain: 5 Filter: 1 Azot gazı basıncı: 350 kPa.....	111

Şekil 5.42. 1000 ppm – 25 ppm arası elde edilen L-GLU standartları ACN:Su:FA (5:94:1, <i>h/h/h</i>) Nebulazier sıcaklığı: 40 °C Gain: 5 Filter: 1 Azot gazı basıncı: 350 kPa.....	112
Şekil 5.43. YPSK-ELSD ile elde edilen derişim – alan grafiğı.....	114
Şekil 5.44. YPSK-ELSD ile elde edilen log ₁₀ derişim – log ₁₀ pik alanı grafiğı.....	114
Şekil 5.45. 1000 ppm MSG'nin MIP ile etkileşiminden önce ve sonra elde edilen YPSK-ELSD kromatogramı ACN:Su:FA (5:94:1, <i>h/h/h</i>) Nebulazier sıcaklığı: 40 °C.Gain: 5 Filter: 1 Azot gazı Basıncı: 350 kPa.....	120
Şekil 6.1. Et ve Tavuk bulyonlarda tespit edilen MSG miktarları (g/kg).....	122
Şekil 6.2. 25 adet cips örneğinin içerisinde bulunan MSG miktarları (g/kg).....	123
Şekil 6.3. Hazır çorbalar içerisinde bulunan MSG miktarları (g/kg).....	124
Şekil 6.4. Etsiz çiğ köfte içerisinde bulunan MSG miktarları (g/kg).....	125

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 2.1. Monosodyum Glutamat görseli.....	21
Görsel 5.1. MSG'ye özgü sentezlenen MIP	118

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Seçicilik faktörü
$\alpha_{0,05}$	: Pikin %5 yüksekliğindeki ilk yarısının pik genişliği
ACN	: Asetonitril
ACT	: Aseton
ADI	: Önerilen Günlük Tüketim Miktarı
AET	: Avrupa Ekonomik Topluluğu
As	: Asimetri faktörü
BSS	: Bağlı standart sapma
CAC	: Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu
ÇRS	: Çin Restoran Sendromu
DAD	: Diyod dizisi dedektör
dk	: Dakika
DMF	: N, N – Dimetilformamid
DNS-Cl	: Dansil klorür
EC	: European Community
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
ELSD	: Evaporatif ışık saçılım dedektörü
Em	: Emisyon dalga boyu (Emission)
EU	: Avrupa Birliği
Ex	: Uyarılma dalga boyu (Excitation)
FA	: Formik Asit

FASEB	: Amerikan Deneysel Biyoloji Birlikleri Federasyonu
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	: Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi
FLD	: Floresans dedektör
GKM	: Gıda Katkı Maddeleri
GKMY	: Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği
GRAS	: Genel olarak güvenilir kabul edilen
GAA	: Glasiyel Asetik Asit
ICH	: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
JECFA	: Gıda Katkı Maddeleri Ortak Uzmanlar Komitesi
k'	: Kapasite faktörü
L-GLU	: Glutamik asit
LOD	: Saptama sınırı
LOQ	: Tayin alt sınırı
mAU	: Miliabsorbans birimi
µL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
MeOH	: Metanol
MPI	: Birey başına göre hesaplana doz
MPL	: MPI değerinin gıda faktörüne oranı
MRL	: Maximum Residue Level- Maksimum Kalıntı Limiti
MIP	: Moleküler Baskılanmış Polimer

MSG	: Monosodyum Glutamat
N	: Teorik tabaka sayısı
NE	: Tahmini Olmayan
UV	: Mor ötesi
NOAEL	: Herhangi bir Toksik Etkinin Gözlenmediği Düzey
OPA/βME	: Ortafitaldialdehit Merkaptotanol
QS	: Belirlenmeyen Maksimum Düzey
PDA	: Foto diyod dizisi dedektörü
PVDF	: Poliviniliden florür
RTU	: Kullanıma hazır (Ready to use)
R _s	: Ayırım gücü
r	: Korelasyon katsayısı
rpm	: Dakika başına dönüş sayısı
sn	: Saniye
SCF	: Bilimsel Gıda Komitesi
SS	: Standart Sapma
T	: Kuyruklanma faktörü
t _R	: Alıkonma zamanı
t _{Rp}	: Önceli pikin alıkonma zamanı
TMRI	: Teorik maksimum kalıntı miktarı
TS	: Türk Standardı
TGK	: Türk Gıda Kodeksi

WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
W	: Pik genişliği
W_p	: Önceki pikin genişliği
$W_{0,05}$	: Pikin %5 yüksekliğindeki pik genişliği
X_{ort}	: Ortalama değer
YPSK	: Yüksek performanslı sıvı kromatografi

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Canlılar yaşamlarını devam ettirmek için en temel madde olan gıdaya sahip oldukları fizyolojilerine göre ulaşırlarken, insanlar tarih boyunca çok çeşitli yöntemler ile besinlerini temin etmişlerdir. Hızla artış gösteren nüfus ile gıdaya olan talebin artmasına ve ticari fırsat ile birlikte çok geniş bir sektör haline gelmiştir. Bu sektörün meydana getirdiği olanaklar çerçevesinde rekabet artmış ve tüketiciler hem daha güvenli hem de daha lezzetli olan ürünlere yönelmişlerdir. Aynı zamanda artan nüfusun taleplerine yetişmek için üretilen gıda ürünlerinin daha lezzetli olması ile birlikte, daha uzun raf ömrüne sahip olması ve yüksek karlar elde etmesi temel hedef haline gelmiş bulunmaktadır [1].

Gıda katkı maddeleri tatlandırma, renklendirme ve ürünlerin raf ömrünü arttırma amacıyla modern sanayi ülkelerinde yüzyılı aşkın bir süredir yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Marketlerde birçok farklı ülkeden gelen meyve, sebze, et, balık, hazır çorbalar, hazır yemekler, yemek sosları, şekerlemeler, içecekler, soğutulmuş ve dondurulmuş hazır gıdalar vs. gibi ürünler bulunmaktadır. Tüm bu ürünlerin hasatından paketlenmesine kadar olan süreçte tüketiciye uygun, yeterli bir raf ömrü ve lezzeti beraberinde sunmak gerekmektedir. Özellikle son dönemlerde, birçok markette hazır gıdaların yağları, enerji miktarları, yağ düzeyleri ve tuz içerikleri, katkı maddeleri ve besin değerleri gibi özellikleri dikkate alındığından, gıda katkı maddeleri, gıda endüstrisi için oldukça önemli yere sahiptir [2].

İnsanoğlu gıdaların hasat sonrası tazeliğinin korunması, raf ömrünün uzaması ve sonrasında yenilebilir duruma gelmesi için kurutma, tuzlama, tütsüleme ve fermantasyon gibi birçok yöntem uygulamışlardır. Milattan önceki dönemlerde et ürünlerini kürlemek için odun tütsüsü kullanılmışlardır. Baharatlardan lezzet verici, gıda boyalarından ise 3500 yıl kadar önce Mısırlıların renklendirici olarak yararlandığı bilinmektedir [3].

Özellikle son yıllarda tüketilen gıdalarda bulunan katkı ve lezzet maddelerinin neler olduğu, hangi sıklıkla kullanıldığı, hangi sağlık sorunlarına yol açabileceği gibi konular ile ilgili çalışmalar artış göstermekte ve bunlar tüketiciler oldukça büyük bir önem arz etmektedir. Bu çalışmada çeşitli gıdalarda bulunan monosodyum glutamat'ın (MSG) tayini için analitik yöntemler geliştirilmiştir. Bu tayinler için Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi cihazı ile entegre Ultraviyole/Foto diyot dizisi dedektörü (YPSK-UV/DAD), YPSK-Floresans dedektörü (YPSK-FLD) ve YPSK-Evaporatif Işık Saçılım dedektörü (YPSK-ELSD) aracılığı ile tayinleri gerçekleştirilmiş olup, çeşitli gıdalar

içerisindeki miktar tayinleri yapılmıştır. YPSK-UV/DAD ve YPSK-FLD ile MSG tayini için kolon öncesi türevlendirme işlemi yapılmış ancak YPSK-ELSD sistemi için türevlendirme işlemine gerek kalmadan MSG tayini gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen analiz yöntemleri L-Glutamik asit (L-GLU) ve MSG tayinleri için kolaylıkla uygulanabilir bir yöntem özelliği taşımaktadır. Uygulanan gıda örnekleri arasında çeşitli aromalara sahip patates cipsleri, mısır cipsleri, hazır çorbalar, tavuk ve et bulyonlar, pizza sosları, çeşitli baharatlar, soslar ve çiğ köfteler bulunmaktadır. Ayrıca Asya ve Güney Amerika bölgelerinden temin edilen gıda numuneleri de incelenmiştir. Elde edilen MSG miktarlarının Türk Gıda Kodeksi (TGK)'ne göre uygunluğu araştırılmıştır.

2. GIDA KATKI MADDELERİ

Günümüzde gıda içeriklerinde, gıdaların çeşitli özelliklerini arttırmak amacıyla pek çok kimyasal madde kullanılmaktadır. Bu maddelerin çoğu gıdanın doğal bileşenleri olup karbonhidratlar, proteinler, vitaminler, mineraller ve yağlar olarak sınıflandırılmaktadır. Bu doğal bileşenlerin yanında gıda işleme işlemleri sırasında gıdaya bilerek katılan veya istemediği halde bulaşı yoluyla giren bazı maddeler de bulunmaktadır [4].

Gıda katkı maddelerinin birçok kaynakta farklı tanımları bulunmaktadır. Gıda katkı maddelerinin, Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization – WHO) ve Gıda Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization – FAO) ’nün ortak çalışmaları ile meydana gelmiş Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (Codex Alimentarius Commission – CAC)’ na göre ortak tanımı; “gıda katkı maddesi tek başına gıda olarak kullanılmayan ve gıdanın tipik bir bileşeni olmayan, besleyici değeri olsun veya olmasın, üretim, işleme, uygulama, hazırlama, işleme, paketlenme, ambalajlama, taşıma, muhafaza ve depo aşamalarında gıdalarda teknolojik (organoleptik dahil) amaçla katılan ya da bu gıdaların içinde veya yan ürünlerinde bir bileşeni haline gelen veya bunların karakteristiklerini değiştiren maddeler” şeklindedir [5]. Daha basit bir tanımla ise; doğal olarak besinlerin bileşiminde bulunan veya besinlerden çeşitli yöntemlerle saf olarak elde edilen veya kimyasal olarak yapıldıktan sonra, çeşitli amaçlar için besinlere katılan öğelere gıda katkı maddeleri denir.

Gıdanın miktar veya kimyasal olarak var olmayan bir ögesi olan gıda katkı maddeleri, en geniş anlamıyla gıdaya eklenen herhangi bir maddeyi ifade etmektedir [6]. Yasal olarak gıda katkı maddeleri, direk ve indirek olarak sınıflandırılır. Eğer bu maddeler gıdalara bilerek ve isteyerek ilave ediliyor ise, bu direk ilave yöntemini ifade eder ve bu durumda ürün paketlerinin üzerinde eklenen gıda katkı maddelerinin türü ve miktarı yazılmak zorundadır. İndirek durumda ise, gıdaların üretim, işleme, saklama, paketlenme ve taşınması gibi aşamalarda istenmeden ürüne ilave olan maddelerdir.

Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)’ ne göre ise, gıda katkı maddeleri, belirli fiziksel veya teknik etkiler için gıdalara eklenen maddeler olarak tanımlanmaktadır. Gıda katkı maddeleri, ürünlerdeki düşük kaliteyi gizlemek için değil, onların besin değerini, kalitesini, görünüşünü, dokusunu ve lezzetini attırmak için kullanılmaktadır. Gıda katkı maddeleri, gıdalar üzerinde birçok teknik fonksiyona sahiptir [7].

Başka bir deyişle, gıda katkı maddesi, bir ürünün ana bileşeni olmayan fakat o ürünün işlenmesi, ambalajlanması veya depolanması ile ilgili farklı amaçlar için ürüne ilave edilen kimyasal madde veya maddeler karışımıdır.

Gıda katkı maddeleri kullanımı ile ilgili sınıflandırmalar yapmak amacıyla farklı topluluk ve komisyonlarca listeler oluşturulmuştur. Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu tarafından önerilen listeler Avrupa Topluluğu (EC) tarafından da benimsenmiş olup, bu topluluğun da benzer listeleri mevcuttur. Ülkemizde de kullanımı uygun görülen gıda maddeleri CAC ve EC tarafından oluşturulan listelerden titizlikle seçilmektedir [8]. Bu listelerde kullanımına izin verilen gıda katkı maddelerini belirtmek amacı ile kod numaraları kullanılır. Avrupa Ekonomik Topluluğunda kullanımına izin verilen katkı maddelerine E kodu verilmiştir. Numaranın başındaki "E", EU (Avrupa Birliği) simgelemektedir. E kodu, Avrupa Birliği tarafından her bir katkı maddesi için farklı olacak şekilde belirlenir. Doğal veya sentetik gıda maddelerinde kullanılan ve katkı maddesi olarak tanımlanan tüm kimyasallar bu kodlama sisteminin içindedir. Ülkemizde de AET'ye uyum programı uygulandığı için aynı isimlendirme kullanılmaktadır [9]. Tablo 2.1.'de Türk Gıda Kodeksine göre kullanılan gıda katkı maddelerine verilen E kodları listelenmiştir.

Tablo 2.1. *Türk Gıda Kodeksine göre kullanılan gıda katkı maddeleri ve kodları* [10].

Katkı Maddesi	Kodu
Renklendiriciler	(E100-199)
Koruyucular	(E200-299)
Antioksidanlar, asitlik düzenleyiciler	(E300-399)
İnceltici, emülgatör ve stabilizatörler	(E400-499)
Asit-baz sağlayıcılar	(E500-599)
Tatlandırıcılar, koku verenler	(E600-699)
Antibiyotikler	(E700-799)
Geniş amaçlı diğerleri	(E900-999)
Diğer kimyasallar	(E1000-1999)

Tablo 2.1.'de "E" kullanım kodları ile belirtilen gıda katkı maddeleri genel olarak 4 grup altında toplanır [11]. Katkı maddeleri, kaliteyi koruyarak raf ömrünü uzatan (koruyucu) katkı maddeleri, yapı, hazırlama ve pişme özelliğini geliştiren katkı maddeleri, aroma ve renk geliştiren katkı maddeleri, besin değerini koruyan ve geliştiren katkı maddeleri olmak üzere dört ana başlık altında toplanabilir.

- 1) Kaliteyi koruyarak raf ömrünü uzatan (koruyucu) katkı maddeleri
 - a) Antimikrobiyaller (nitrit, nitrat, benzoik asit, sorbik asit, probiyonik asit vb.)
 - b) Antioksidanlar (bütillenmiş hidroksianazol-BHA, bütillenmiş hidroksitolüen- BHT, askorbik asit, kükürt dioksit)
- 2) Yapı, hazırlama ve pişme özelliğini geliştiren katkı maddeleri
 - a) pH ayarlayıcılar (asetik asit, propionik asit, kalsiyum karbonat)
 - b) Topaklanmayı önleyenler (silikat, magnezyum oksit, magnezyum karbonat...)
 - c) Emülsiyonu sağlayanlar (lesitin, mono ve digliseritler...)
 - d) Mayalanmayı sağlayanlar
 - e) Nem ayarlayıcılar
 - f) Olgunlaştırıcılar
 - g) Ağartıcılar, dolgu maddeleri, köpük ayarlayıcılar, parlaticılar
 - h) Stabilizörler kıvam arttırıcılar, tatlandırıcılar
- 3) Aroma ve renk geliştiren katkı maddeleri
 - a) Çeşni arttırıcılar (Monosodyum glutamat-MSG, inisitol)
 - b) Çeşni vericiler (aroma maddeleri)
 - c) Renklendiriciler (tartrazin, indigotin, β -karoren)
- 4) Besin değerini koruyan, geliştiren katkı maddeleri
 - a) Diyetle eksik olabilecek besin öğelerini ekleme (A, D vitaminleri)
 - b) İşleme sırasında kaybolan besin öğelerini yerine koyma (B1, B2, niyasin)

Ülkemizde yaklaşık 300 adet gıda katkı maddesinin kullanımına izin verilmekte olup, Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanımına izin verilen gıda katkı maddesi 2018 yılı itibariyle yaklaşık olarak 2800'dür [12].

2.1. Gıda Katkı Maddelerinin Tarihçesi

Tarihsel olarak, gıdada belirli bir özelliğin meydana gelmesi için gıda maddelerine katkı yapmak geçmişten günümüze kadar süregelen bir durumdur. Katkı maddelerinin kullanımına dair ilk izler, M.Ö. 1500 dolaylarında Eski Mısır'a kadar uzanmaktadır. Yapılan çalışmalar, eski Mısır'da gıdalarda lezzeti arttırma ve daha güzel bir hale getirmek için baharat kullanıldığına işaret etmektedir. M.Ö. 3000 yıllarında, et ürünlerini kürlenmede tuzdan yararlanıldığı, M.Ö. 9000 yıllarında ise tuz ve odun tütsüsünün gıda saklama yöntemleri olarak kullanıldıkları görülmektedir. Orta çağda etlere koruyucu amaçla tuz ve tütsünün yanı sıra katılan nitratın etin rengini olumlu yönde değiştirmek ve

bozulmayı önlemek amacıyla da kullanıldığı bilinmektedir. M.Ö. 50. yüzyılda tuz, odun tütüsü ve baharatlardan lezzet verici olarak yararlanılmıştır. 19. yüzyılda, İngiltere'de ilk modern kabartma tozu geliştirilmiştir. Bu yüzyılda, gıdalara katılmaya başlayan benzoik asit, sodyum karbonat, sakarin gibi maddeler, günümüzde de gıda katkısı olarak kullanılmaktadır. 20. yüzyılda gıda üretiminin artması ile gıda katkı maddelerinin kullanımında da önemli artışlar gözlenmiştir [13].

Katkı maddelerinin sistematik bir şekilde ilk ele alınması ise, 1956'da WHO ve FAO tarafından, 43 dünya ülkesini kapsayan bir tarama çalışması ile gerçekleşmiştir. Bu çalışmada, 200'e yakın kimyasal maddenin gıda maddelerinde bu amaçla kullanımda olduğu tespit edilmiştir.

Son yıllarda, gıda bilimi ve teknolojisinde hızlı gelişmeler olmuş ve gıda veya gıda katkı maddelerindeki fonksiyonları yerine getirmek için kullanılan maddelerin sayısında ve çeşitliliğinde artışa neden olmuştur. İnsanların toplu halde yaşamaya başlamaları ile birlikte gıdaların korunması amacıyla güvenilir yöntemlerin kullanılması gereksinimi ortaya çıkmıştır [4]. Günümüzde, 322 farklı gıda katkı maddesi Avrupa Birliği'nde kullanılmak üzere onaylanmıştır [14].

2.2. Gıda Katkı Maddelerinin Kullanım Amaçları

Gıda katkı maddeleri, tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıda ham ya da yardımcı maddesi olarak kullanılmayan, besleyici değeri olan veya olmayan, seçilen teknoloji gereği kullanılan, işlem veya imalat sırasında kalıntı veya türevleri mamul maddede bulunabilen, gıdanın üretilmesi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması sırasında gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek veya istenmeyen değişikliklere engel olmak amacıyla kullanılmasına izin verilen maddelerdir. Nüfusun talebine yetişmek için üretilen gıda ürünlerinin raf ömrü uzun, üretime giren ham maddenin bol, ürünün ise ticari olarak yüksek kâr elde etmesi sektörün ana hedefleri içinde bulunmaktadır [15].

Gıda sektörüne yeni ve üstün teknolojilerin kazandırdığı değişik üretim teknikleri, bununla birlikte ürünlerin çeşitlenmesi, tüketici beğenisinin değişmesi ve bilinçlenmesi, mevsimlik gıdaların yılın her döneminde tüketilme eğilimlerinin artması, ürünlerde raf ömrünün uzatılması ve kalitede standardizasyon zorunluluğu, daralan gıda kaynaklarının rasyonel kullanımı gibi durumlar, gıda endüstrisinde kullanılan tekniklerin yanı sıra gıda

katkı maddelerinin kullanımını zorunlu hale getirmiştir [16]. Günümüzde uygulanan üretim teknikleri sayesinde gıda sektöründe verim artışı kayıpların en aza indirilmesi, ürün kalitesinin arttırılması ve standartlara uygun hale getirilmesi, ürünlerin dayanma sürelerinin arttırılması, değişik formüllere sahip yeni gıdaların üretilmesi gibi uygulamalar gerçekleştirilebilmektedir [4].

2.3. Gıda Katkı Maddeleri Konusunda Çalışan Uluslararası Kuruluşlar

Gıda üretiminin standartlaştırılması ve güvenli hale getirilmesi uluslararası ölçekte bir konudur. Gıda sanayinin hızla ilerlemesi nedeniyle katkı maddelerinin kullanımlarındaki hızlı artış, uluslararası yapılanmaların oluşmasına neden olmuştur. Gıda katkı maddeleri konusunda çalışmalar yapan uluslararası kuruluşların genel amacı, gıda katkı maddelerini sağlık açısından değerlendirerek, kullanımları için kritik limitler belirlemektir. Bu kuruluşlar, kendilerine bağlı üniversite, sanayi kuruluşları ve diğer kurumlarla iş birliği yaparak bünyelerindeki bilimsel komiteler tarafından yapılan çalışmalar ve hazırlanan raporlar sonucunda aldığı kararları, ülkeler arası uyulması gereken kurallar haline getirmekte ve aynı zamanda gıda güvenliğinin temelini oluşturmaktadır [15]. Türkiye’de de bu kurumların oluşturmuş olduğu dokümanların bazıları referans olarak kullanılmaktadır.

2.3.1. Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (CAC)

Birleşmiş milletlere bağlı olarak çalışan bir kuruluş olan Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonunun görevi, dünyada gıda ile ilgili uygulamaların teknoloji ve sağlık açısından standardize edilmesidir. WHO ve FAO tarafından oluşturulan Gıda Kodeks Komisyonu 1963 yılında kurulmuştur. Kodeks standartları, ülkeler için zorunlu standartlar değildir. Kuruluşun hazırladığı dokümanlar tüm dünya ülkeleri için güvenli gıda üretiminde referans olarak kullanılmaktadır [17].

2.3.2. Gıda Katkıları FAO/WHO Ortak Uzmanlar Komitesi (JECFA)

Gıda Katkıları FAO/WHO Ortak Uzmanlar Komitesi, 1956 yılında kurulmuştur. Komiteler, gıda katkı maddelerinin toksikolojik açıdan güvenirliliği ile ilgili çalışmalar yapmakta ve bu maddelerle ilgili ADI (Acceptable Daily Intake – Kabul edilebilir günlük alım miktarı) değerlerini ve tespit etmektedir.

2.3.3. Gıda Katkı Ve Kontaminantları Kodeksi Komitesi (CCFAC)

Gıda Katkı ve Kontaminantları Kodeksi Komitesinin amacı, gıda katkıları ile ilgili sınırlamalar getirmek ve bu maddelerin gıdalarda bulunmasına izin verebilecek maksimum miktarlarını belirlemektedir [18].

2.3.4. Pestisit FAO/WHO ortak toplantısı (JMPR)

JMPR, gıda ürünlerindeki pestisit kalıntılarını değerlendiren ve MRL (Maximum Residue Level- Maksimum Kalıntı Limiti) değerlerinin tespiti ile görevli FAO, WHO ortak oluşumdur ve 1961 yılından bu yana görev yapmaktadır.

2.3.5. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA)

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi EFSA), Avrupa Birliği (AB) Komisyonu tarafından 2000 yılında yayınlanan —White Paper on Food Safety isimli belgeye uygun olarak 2002 yılında kurulmuştur. EFSA, gıda zincirindeki her risk ile ilgili değerlendirme ve iletişim yapmakla görevlidir. Avrupa Komisyonu'na ve Avrupa Parlamentosu 'na bilimsel danışmanlık yaparak gıda konusundaki politikaların ve Avrupa Topluluğu Direktifleri 'nin oluşturulmasına yardımcı olur. EFSA'dan önce Avrupa Birliği'nin gıdalarla ilgili toksikoloji, hijyen ve beslenme, konularında yetkili komitesi 1974 yılında kurulan Avrupa Komisyonu Gıda Maddeleri Bilimsel Komitesinin görevi Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA)'nın kurulması ile bu komitenin görevi sonlandırılmıştır [17].

2.3.6. Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)

Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), gıda katkı maddeleriyle ilgili benzer amaçlı kurulan kuruluşlar arasında en eski tarihe sahip olan kuruluştur. Amerika Birleşik Devletleri'nin Sağlık Bakanlığı'na bağlı; gıda, diyet eklentileri, ilaç, biyolojik medikal ürünler, kan ürünleri, medikal araçlar ve kozmetiklerden sorumlu bürosudur. ABD'nin ulusal kuruluşu olsa da tüm dünyada referans olarak gösterilen bir kurumdur [19].

2.4. Gıda Katkı Maddeleriyle İlgili Yasal Düzenlemeler

Gıda katkı maddeleri, fazla miktarda ya da duyarlı risk grupları tarafından tüketildiğinde toksikolojik açıdan tehlikeli olabilmektedirler. Herhangi bir katkı maddesinin herkes için ve her türlü kullanımında güvenilir olduğunu söylemek mümkün değildir. Bu nedenle bir katkının güvenilirliğine ilişkin herhangi bir belirsizlik tüketicinin risk konusunda şüphelerini artırır. Katkı maddelerinin yarattığı riskler bazen uzun dönemde ortaya çıkmakta ve daha çok kronik hastalıklara yol açmaktadırlar. Bu nedenle gıda endüstrisinde kullanılacak katkı maddelerinin, kısa ve uzun vadede vücutta birikme olasılıklarının yaratacağı zararların ortaya konması ve ona göre de dozunun ayarlanması gerektiği bildirilmiştir. Bu gereklilik sonucunda, gıda katkı maddelerinin kullanımı ile ilgili sınırlandırmaların belirlenmesi ihtiyacı ortaya çıkmıştır.

Her ülkede katkı kullanımını düzenleyen bir ulusal mevzuat ve bunu uygulayan resmi kuruluşlar bulunmaktadır. Türkiye’de Avrupa Topluluğu mevzuatının bir uyarlaması olan Türk Gıda Kodeksi ve ilgili tebliğleri yürürlüğe konulmuştur.

Dünyada gıda katkı maddeleri ile ilgili yasal düzenlemeleri CAC, FAO/WHO Ortak Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (JECFA) ve Katkı Maddeleri ve Kontaminantları Codex Komitesi (CCFAC) yaparken; ülkemizde TGK Yönetmeliği’ne uygun olarak üretim ve denetim yapılmaktadır [20].

Gıda katkı maddeleri, Türk Gıda Kodesi (TGK) yönetmeliğine göre, tek başına gıda olarak tüketilmeyen, gıda ham veya yardımcı maddesi olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan, seçilen teknoloji gereği kullanılan işlem veya üretim sırasında kalıntı veya türevleri işlenmiş maddede bulunabilen, gıdanın hazırlanması, tasnifi, işlenmesi, ambalajlanması, taşınması, depolanması ve dağıtımı sırasında gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek veya istenmeyen değişikliklere engel olmak amacıyla kullanılmasına izin verilen maddeler olarak tanımlanır [9].

Buna ek olarak, TGK’da şarküteri gıdalarında MSG’ye izin verilmemektedir. MSG’nin sağlık üzerindeki potansiyel etkisini gösteren araştırma bulguları göz önünde bulundurulduğunda, gıda maddelerinde MSG’nin tespiti ve ölçümü için etkili ve sağlam yöntemlerin geliştirilmesi ve uygulanması halk sağlığı için önemlidir [21].

2.4.1. Türk Gıda Kodeksi

30 Haziran 2013 tarih ve 28693 sayılı Resmi Gazetede yayımlanarak yürürlüğe giren Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliğinde, gıda katkı maddeleri, “Besleyici değeri olsun veya olmasın, tek başına gıda olarak tüketilmeyen ve gıdanın karakteristik bileşeni olarak kullanılmayan, teknolojik bir amaç doğrultusunda üretim, muamele, işleme, hazırlama, ambalajlama, taşıma veya depolama aşamalarında gıdaya ilave edilmesi sonucu kendisinin ya da yan ürünlerinin, doğrudan ya da dolaylı olarak o gıdanın bileşeni olması beklenen maddeler” olarak tanımlanmıştır. Türk Gıda Kodeksine göre bir gıda katkı maddesi;

- a) Mevcut bilimsel kanıtlara dayalı olarak önerilen katkı maddesinin kullanım miktarı tüketici sağlığı açısından güvenlik riski doğurmuyorsa,
- b) Ekonomik ve teknolojik açıdan uygulanabilir başka yöntemlerle gerçekleştirilemeyecek, makul teknolojik bir ihtiyaç bulunuyorsa,
- c) Kullanımı tüketiciyi yanıltmıyorsa, katkı maddesinin gıdalarda kullanımına izin verilir [10].

Gıda katkı maddelerinin Türk Gıda Kodeksi gıda katkı maddeleri yönetmeliği eklerinde yer alabilmesi için, tüketicilere yönelik avantajları ve yararları olması ve buna bağlı olarak aşağıdaki amaçların biri veya birden fazlasını karşılaması zorunludur:

- Gıdanın besin değerini koruması,
- Özel beslenme ihtiyaçları olan tüketici gruplarına yönelik olarak üretilen gıdalar için gerekli bileşenleri ve öğeleri sağlaması,
- Gıdanın doğasını, içeriğini veya kalitesini tüketiciyi yanıltacak şekilde değiştirmemek koşuluyla, kalitesinin ve stabilitesinin korunmasına katkı sağlaması veya organoleptik özelliklerini geliştirmesi,
- Kusurlu hammaddenin kullanımının veya hijyenik olmayan uygulama ve yöntemler dahil olmak üzere istenmeyen uygulama ve yöntemlerin etkilerini maskelemek amacıyla kullanılmaması koşuluyla; gıdaların, gıda katkı maddelerinin, gıda enzimlerinin ve gıda aroma vericilerinin üretimi, işlenmesi, hazırlanması, muamelesi, ambalajlanması, taşınması veya depolanmasında yardımcı olmasıdır [10].

Gıda katkı maddelerinin kullanımları ile ilgili olarak CAC ve TGK tarafından belirlenen ilkeler aşağıdaki gibi sıralanabilmektedir.

a) Halen kullanılmakta olan veya kullanılması önerilen tüm katkı maddelerine toksikolojik değerlendirme uygulanmalıdır ve yalnızca JECFA tarafından elde edilen veriler doğrultusunda önerilen düzeylerde kullanıldıklarında tüketici sağlığına zarar vermeyecekleri belirlenen katkı maddelerinin kullanımına izin verilmelidir.

b) Bir katkı maddesinin tavsiye listesinde veya gıda standardında yer alabilmesi için, söz konusu katkı için belirlenen ADI (Acceptable Daily Intake – kabul edilebilir günlük alım miktarı) veya buna benzer eş değer değerlendirmeyle birlikte tüm kaynaklardan günlük olarak vücuda alımı mümkün olan miktarının da dikkate alınması gerekmektedir. Gıda katkı maddesinin özel tüketici grupları tarafından tüketilmesi söz konusu olduğunda, bu gruptaki tüketicilerin bu katkıyı günlük olarak tahmini tüketme miktarı göz önünde bulundurulmalıdır.

c) Gıda katkı maddelerinin kullanımları, bu kullanımın bir yarar sağlaması tüketici sağlığına zarar vermemeleri, tüketiciyi yanıltmamaları ve CAC tarafından belirlenen bir veya daha fazla teknolojik fonksiyonu yerine getirmeleri ve aşağıda sıralanan mevcut ekonomik ve teknolojik olanaklarla karşılanması mümkün olmayan amaçlar için onaylanabilmektedir [22].

Türk Gıda Kodeksine göre, bir gıda katkı maddesinin kullanım miktarı belirlenirken;

1) Gıda katkı maddesi için oluşturulmuş kabul edilebilir günlük alım miktarları veya buna eşdeğer bir değerlendirme ve bu katkı maddesinin bütün kaynaklardan alınacak muhtemel günlük alım miktarları,

2) Gıda katkı maddesinin özel tüketici grupları tarafından tüketilen gıdalarda kullanılması durumunda, bu katkı maddesinin bu tüketici grupları tarafından günlük alınması muhtemel olan miktarları, dikkate alınır [19].

2.4.2. Gıda katkı maddeleri ile ilgili terimler ve kısaltmalar

WHO ve FAO tarafından hazırlanan, General Standard For Food Additives Codex Stan 192-1995 standardı tüm gıdalarda gıda katkı maddelerinin kullanılabileceği koşulları belirler. Gıda katkı maddeleri için genel standartlarda geçen bazı kısaltmalar açıklamaları ile birlikte aşağıda verilmiştir [23].

NOAEL, deney hayvanlarında saptanabilir ters bir etki oluşturmayan, kg-vücut ağırlığı başına düşen maksimum mg madde miktarıdır.

ADI, insanlarda güvenli olan doza ulaşılabilmesi için; NOAEL değeri, emniyet faktörüne bölünür. Emniyet faktörü genellikle 100 olarak belirlenmiştir. Diğer bir deyişle deney hayvanlarında hiçbir yan etki yaratmayan dozun yüzde biri insanlarda güvenli olarak kabul edilmiştir. Bu yöntem 1954 yılından bu yana gıda katkıları için uygulanmaktadır. Geride kalan 40 yılı aşkın sürede edinilen deneyimler bu uygulamanın yeterli koruma sağladığını göstermektedir. ADI değeri insanlarda güvenli doz olarak kabul edilir. NOAEL değerinden ADI değerine aşağıdaki işlem yapılarak ulaşılır.

$$ADI = (mg/kg) NOAEL/Emniyet faktörü (100) \quad (2.1)$$

MPI: MPI' in ADI değerinden farkı, değerin kg insan ağırlığı başına değil, birey başına hesaplanmasıdır. Hesaplama ortalama insan canlı ağırlığı 60 kg olarak kabul edilmiştir. Günlük alınmasına izin verilebilir madde miktarıdır. (ADI x 60 mg/ kg/gün)

MPL: Her gıda aynı oranlarda tüketilmemektedir. Örneğin baharatta bulunan bir kontaminat ile tahılda bulunan bir kontaminatın kalıntı limiti hesaplanırken gıda faktörü olarak adlandırılan günlük tüketim miktarları hesaba katılmalıdır. MPI değerinin gıda faktörüne bölünmesi ile MPL değerine ulaşılır. Bu değer gıdada bulunmasına izin verilen maksimum düzeydir. Bu değerler, ADI gıda faktörü ve 60 kg olarak kabul edilen yetişkin vücut ağırlığı dikkate alınarak hesaplanmaktadır. Gıda faktörü kg olarak söz konusu gıdanın günlük tüketim miktarıdır.

$$MPL (Tolerans, mg/kg) = MPI/Gıda Faktörü \quad (2.2.)$$

TMRI: Teorik maksimum kalıntı miktarıdır. MPI' yı geçmesine izin verilmez.

GRAS: Genel olarak güvenilir zararsız kabul edilen anlamına gelmektedir. FDA bazı katkı maddelerini sadece belirli amaçlar için ve belirli şartlara uyulduğunda GRAS olarak kabul etmiştir. GRAS olarak nitelenen her bir katkı maddesini GRAS olarak nitelenmeyen muhtemel diğer versiyonlarından ayıracak tüm özellikler açık bir şekilde tanımlanarak yayımlanmıştır.

Bu standardın hükümleri ADI değerleri atanmış gıda katkı maddeleri veya diğer kriterlere dayanarak, gıda için güvende olmak üzere belirlenmiştir [24].

2.5. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması

Gıda katkı maddeleri, kullanım amacı veya üretiminde kullanıldığı gıdaya göre farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır. Gıda katkı maddelerinin fonksiyonel sınıfları, 30 Haziran 2013 tarih ve 28693 sayılı Resmi Gazetede yayımlanarak yürürlüğe giren Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliğinde aşağıda belirtildiği gibidir [10].

1. Tatlandırıcılar: Sofralık tatlandırıcılarda veya gıdalarda tat vermek amacıyla kullanılan maddeler,
2. Renklendiriciler: Gıdalara renk veren veya rengini geri kazandıran, gıdaların doğal bileşenlerini ve genel olarak olduğu gibi gıda olarak tüketilmeyen doğal kaynakları içeren ve genellikle gıdanın karakteristik bir bileşeni olarak kullanılmayan maddeler ve Gıda maddelerinden ve diğer yenilebilir doğal kaynaklardan fiziksel ve/veya kimyasal ekstraksiyonla elde edilen diğer besleyici veya aromatik bileşenleri içermeyecek şekilde pigmentlerin selektif ekstraksiyonuyla oluşturulan preparatlar,
3. Koruyucular: Gıdaları, mikroorganizmaların sebep olduğu bozulmalara ve/veya patojen mikroorganizmaların gelişmelerine karşı koruyarak raf ömürlerinin uzatılmasını sağlayan maddeler,
4. Antioksidanlar: Yağların acılaşması ve renk değişikliği gibi oksidasyonun neden olduğu bozulmalara karşı koruyarak, gıdaların raf ömürlerinin uzatılmasını sağlayan maddeler,
5. Taşıyıcılar: Gıdalara besinsel veya fizyolojik amaçlarla ilave edilen gıda katkı maddelerini veya aroma vericileri, gıda enzimlerini, besin maddelerini ve/veya diğer maddeleri; bu maddelerin teknolojik fonksiyonlarını değiştirmeden ve birbirleri ile herhangi bir teknolojik etki göstermeden çözmek, seyreltmek, disperse etmek veya fiziksel yollarla modifiye ederek, bu maddelerin işleme, uygulama ve kullanımını kolaylaştıran maddeleri,
6. Asitler: Asitliği arttıran ve/veya gıdada ekşi bir tat oluşumunu sağlayan maddeler,
7. Asitlik düzenleyiciler: Gıdaların asitlik veya alkaliliğini değiştiren veya kontrol eden maddeler,
8. Topaklanmayı önleyiciler: Gıda parçacıklarının birbirine yapışma eğilimini azaltan maddeler,
9. Köpüklenmeyi önleyiciler: Köpüklenmeyi azaltan veya önleyen maddeler,
10. Hacim arttırıcılar: Gıdaların mevcut enerji değerini önemli oranda arttırmadan, gıdaların hacmini artıran maddeler,

11. Emülgatörler: Bir gıda maddesinde, yağ ve su gibi birbiri ile karışmayan iki veya daha fazla fazın homojen bir karışım oluşturmalarını veya oluşan homojen karışımın sürekliliğini sağlayan maddeler,
12. Emülsifiye edici tuzlar: Peynirde bulunan proteinleri dispers hale getirerek yağ ve diğer bileşenlerin homojen dağılımını sağlayan maddeler,
13. Sertleştiriciler: Meyve ve sebzelerin dokularını sert veya gevrek hale getiren veya koruyan veya jelleştiriciler ile etkileşerek jel oluşumunu sağlayan veya güçlendiren maddeler,
14. Aroma arttırıcılar: Gıdanın mevcut tat ve/veya kokusunu artıran maddeler,
15. Köpük oluşturunucular: Sıvı veya katı gıdalarda gaz fazın homojen dağılımını sağlayan maddeler,
16. Jelleştiriciler: Jel oluşumu ile gıdada farklı bir yapı oluşturan maddeler,
17. Parlaticılar: Yağlayıcılar/kaydırıcılar da dahil gıdaların dış yüzeyine uygulandığında parlak bir görünüm veren veya koruyucu bir tabaka sağlayan maddeler,
18. Nem vericiler: Gıda maddelerinin düşük nemli ortamdan etkilenip kurummasını önleyen veya toz gıdaların sıvı ortamlarda çözünmesini kolaylaştıran maddeler,
19. Modifiye nişastalar: Fiziksel veya enzimatik uygulamaya ve asit veya alkali ile inceltmeye veya ağartmaya tabi tutulmuş olabilen yenilebilir nişastaların bir veya daha fazla kimyasal işleme tabi tutulması ile elde edilen maddeler,
20. Ambalajlama gazları: Gıda maddesi kaba yerleştirilmeden önce, yerleştirilirken veya yerleştirildikten sonra kap içine verilen hava dışındaki gazlar,
21. İtici gazlar: Gıdanın bulunduğu kaptan dışarı çıkmasını sağlayan hava dışındaki gazlar,
22. Kabartıcılar: Gaz oluşturarak hamurun/yumurtalı soslu hamurun hacmini artıran madde veya madde karışımları,
23. Metal bağlayıcılar: Metalik iyonlarla kimyasal kompleks oluşturan maddeler;
24. Stabilizörler: Gıdaların fiziko-kimyasal durumlarını korumalarını sağlayan, gıdada bulunan iki veya daha fazla birbiri ile karışmayan fazın homojen dağılımının sürekliliğini sağlayan, gıdaların var olan renklerini koruyan veya kuvvetlendiren, proteinler arası çapraz bağ oluşturarak gıda parçacıklarının bağlanmasını sağlayan, gıdaların bağlanma kapasitelerini artıran maddeler,
25. Kıvam arttırıcılar: Gıdanın kıvamını arttıran maddeler,

26. Un işlem maddeleri: Una veya hamura pişirme kalitesini geliştirmek amacı ile ilave edilen emülgatör dışındaki maddeler, olarak 26 ana başlıkta gruplanabilirler [10].

2.5.1. Lezzet arttırıcılar

Lezzet arttırıcı maddeler, tek başlarına lezzetleri olmamasına rağmen, katıldıkları gıda maddelerinin lezzetlerini arttıran katkı maddeleridir. Çok az miktarlarda kullanıldıkları zaman bile etkileri fazla olan lezzet arttırıcıların bu etkiyi nasıl sağladıkları konusunda farklı teoriler bulunmaktadır. Bu teorilerden bir tanesine göre, lezzet arttırıcı maddeler dildeki tat alma tomurcuklarının hassasiyetlerini arttırarak lezzeti zenginleştirmektedir. Bir diğer teoriye göre, lezzet arttırıcı maddeler, tükürük salgısını arttırarak gıdaların lezzetinin artmasını sağlamaktadır.

Gıdanın lezzeti, tüketilebilirliği açısından en önemli duyuşal niteliklerden birisidir. Lezzet arttırıcı katkı maddeleri besleyici değer ve enerji verici özellik taşıyamalarına rağmen, beslenmenin tamamlayıcı maddeleridir.

Lezzet arttırıcı maddeler, gıda sanayinde, katkı maddeleri arasında en ağırlıklı ve en önemli grubu oluşturmaktadır. Kullanımında son ürünün taşınması gereken niteliklere göre katılacak miktarlar belirlenmekte ve ürünün tekstürü (katı-sıvı, viskozite durumu, su ve yağ içeriği), rengi, asitliği, alkol ve karbondioksit miktarları dikkate alınmaktadır [25].

2.5.1.1. Lezzet arttırıcı maddelerin tarihçesi

Lezzet arttırma uygulamaları, yemek pişirme işlemi kadar eskiye dayanmak ile birlikte bu amaçla kullanılan maddelerin tanımlanmaları 20. yüzyılda başlamıştır. İlk kez 1866 yılında Ritthausen adındaki Alman kimyacı glutamik asidi laboratuvarında elde etmiş, daha sonra başka bir kimyacı bu asidi sodyum tuzuna dönüştürerek MSG 'yi elde etmiştir. Yaklaşık 40 yıl kadar sonra, 1908 yılında Japon araştırmacılar, 1907 yılında esmer su yosununda (Laminariaceae), çorbalarda benzersiz tada neden olan maddeleri belirlemek için bir araştırma yapmıştır. Bu çalışmalarında, yosunda acı, ekşi, tuzlu veya tatlı olarak bilinen temel tatlar dışında kalan ve bu kategorilerden birine girmeyen bir veya birden fazla tat maddelerinin var olabileceği incelenmiştir. Bu beşinci temel tada “umami” ismini verilmiştir. Çalışma sonuçlarının insan beslenmesinin gelişimine katkıda bulunan bir baharat gibi ticari uygulamalarının gerçekleştirilebileceğini düşünmüştür. 1908’de umami tat bileşeninin yosunda bulunan L-glutamat olduğunu rapor etmiştir. Deniz yosunundan

MSG' yi izole edilmiş ve böylece monosodyum glutamat 1909 yılında ticari olarak üretilmeye başlanmıştır. Kimyasal ve farmasötik endüstri alanlarında tanınan bir bilim adamı olan Saburousuke Suzuki, Ikeda ile birlikte bu yeni baharatın üretimi ve ticarileştirilmesi için ortaklık yapmışlardır. 1909 yılında ticari olarak üretilmeye başlanmıştır [25].

Gıda katkı maddelerinin Türkiye'de kullanılmaya başlanması, 20. yüzyılın başlarına dayanmakta olup, TKG Yönetmeliği' nde izin verilen lezzet arttırıcılar nükleotidler ve MSG'dir. Gıda endüstrisi açısından lezzet arttırıcı maddeler, günümüzde önemli bir paya sahip katkı maddesi haline gelmiştir. Teknolojinin gelişmesiyle birlikte değişik üretim teknikleri buna bağlı olarak tüketici beğenisi çeşitlilik kazanmıştır [26].

Lezzet arttırıcı maddelerin, şekerlemeler ve alkolsüz içeceklerden tahıllara, keklere ve yoğurtlara kadar birçok gıda içerisinde kullanıldığı belirtilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda umami uyarısının tat prizmasının dışında kaldığı ve bağımsız bir tat olduğu gözlenirken, doğal olarak MSG içeren hayvansal maddelerden yapılan çorbaların da dört temel tat prizmasının dışında umamiye yakın bir yerde olduğu saptanmıştır [27].

2.5.1.2. Lezzet arttırıcı maddelerin sınıflandırılması

Lezzet arttırıcı maddeler geniş ve çeşitli malzeme gruplarından oluşur. Lezzet arttırıcı maddelerin genel özellikleri;

- a) Gıdada doğal olarak oluşması imkânsız yapay maddeler,
- b) Normalde gıda olarak tüketilmeyen doğal malzemeler, bunlardan türetilen ürünler ve eşdeğer doğala özdeş lezzetlendiricileri,
- c) Bitkiler ve baharatlar, bunlardan türetilmiş ürünler ve eşdeğer doğala özdeş lezzetlendiricileri,
- d) İşlenmiş veya işlenmemiş gıda olarak normalde tüketilen bitkisel ve hayvansal ürünlerden elde edilmiş doğal lezzet verici maddeler ve bunların sentetik eşdeğerleri [25].

Lezzet arttırıcı maddeler olarak kullanılabilirler. Kendilerine ait bir tada sahip olmayan ancak ilave edildiklerinde gıdanın lezzetini arttıran lezzet arttırıcı maddeler, kimyasal yapılarına göre 3 gruba ayrılmaktadırlar. Bunlar; 5 tane C atomu içeren L – amino asitler, 6 – hidroksipürin içeren 5' – nükleotidlerdir ve maltoldur.

Aminoasitler grubunda MSG, ibotenik asit ve trikolomik asit yer alır. Aminoasitler sınıfında, uzun yıllardan bu yana sadece glutamik asidin lezzet arttırıcı etkisi olduğu bilinmesine rağmen, günümüzde iki yeni amino asit olan ibotenik asit ve trikolomik asidin de söz konusu aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. Glutamik asit (GLU), ibotenik asit ve trikolomik asit genellikle monosodyum tuzu olarak kullanılırken, inosin – 5' – mono fosfat (IMP), guanosin – 5' mono fosfat (GMP), ksantosin – 5' – mono fosfat (XMP), disodyum tuzu olarak kullanılır. GLU, dikarboksilik amino asit yapısında olup doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Pek çok protein ve peptidin ana bileşeni olan GLU, birçok hücrede serbest formdadır. GLU ve tuzları uzun yıllardır gıda endüstrisinde gıdaların duyusal karakteristiklerini geliştirmek amacıyla kullanılmaktadır. Beyin metabolizmasında önemli rol oynadığından ve zeka gücünü arttırdığından dolayı zeka asidi olarak da bilinir [26]. En fazla kullanılan ve en çok bilinen lezzet arttırıcı MSG olup, 5' – nükleoidler de lezzet arttırıcı olarak kullanılan maddelerdir.

Nükleotitler gurubunda, GMP, IMP, XMP yer alır. Nükleotitler en fazla hazır çorbalar, konserve etler süt ürünleri, konserve ve dondurulmuş sebzeler, tahıllar, taneli gıdalar ve diğer bazı gıdalarda kullanılmaktadır. Nükleotitler, 5'-nükleotidlerin esas kaynağı balık kasları olmasına rağmen bu kaynaktan elde edilmeleri ekonomik olmadığından laboratuvarlarda sentezlenmektedir.

Maltol ($C_6H_6O_3$), 1942'de lezzet arttırıcı olarak kullanılmaya başlanmıştır. 3-hidroksi-2 metil-4 piron yapısında bir madde olan maltol, soya proteini ve glutininin fermentasyonu ile oluşan, beyaz renkte, kristal yapıda, hoş kokulu, suda çözünen bir tozdur. Maltol, öncelikle bir aroma arttırıcı olarak kullanılan, doğal olarak oluşan bir organik bileşiktir. Maltol'un tatlılığı, taze pişmiş ekmeğin kokusuna katkıda bulunur ve ekmek ve keklerde bir lezzet arttırıcı (E numarası E636) olarak kullanılır. Maltollar, yumuşak içecekler, meyveli içecekler, reçeller, jelatin ve karbonhidratça zengin gıdalarda kullanılır. Kullanıldığı ürünlerde tatlılığı artırır. 5 – 75 ppm arası bir miktarda kullanılmaktadır.

TGK yönetmeliği'nde izin verilen MSG ve nükleotidler başta olmak üzere önemli lezzet arttırıcılar; nükleotidler, maltol, dioktil sodyum sülfosüksinat, totiletilendiamin, siklamik asit' tir [19].

2.5.1.3. Lezzet arttırıcı maddeler ile ilgili yasal düzenlemeler

Lezzet arttırıcı maddeler, sayıca fazla olmaları, çok düşük dozlarda istenilen etkiyi oluşturmaları, birçoğunun doğada ve doğal gıdalarda bulunmaları gibi nedenlerle diğer katkı maddelerinden farklı olarak değerlendirilmektedir. Katkı maddeleri ve lezzet arttırıcı maddeler arasındaki en büyük fark lezzet arttırıcı maddelerin çok düşük konsantrasyonlarda kullanılmaları ve yüksek dozlarda kabul edilebilirliklerinin azalması nedeniyle “kendi kendilerini sınırlama” özelliklerinin bulunmasıdır. Bu nedenle günümüzde CAC, AB ve FDA gibi yasal kuruluşlar lezzet maddelerini gıda katkı maddelerinden farklı bir sınıflandırma yöntemi olan bir yönetmelik ile değerlendirmektedirler.

Lezzet arttırıcı maddelerin kullanımlarının sınırlarını belirleyen bu yönetmeliğe göre gıda katkı maddelerinin hizmet etmesi gereken amaçlar:

- Gıdaların besin kalitesini korunması,
- Özel ihtiyaçları olan tüketici grupları için üretilen gıdaların gerekli bileşenlerini sağlanması,
- Gıdaların kalitesini veya stabilitesinin artırılması, olarak 3’e ayrılabilir.

Yönetmeliğe göre, lezzet arttırıcı maddelerin doğası gereği sahip olduğu organoleptik özelliklerin iyileştirilmesi için gıda katkı maddeleri ilavesiyle tüketiciyi yanıltmak için kullanılmamalıdır. Gıda katkı maddesinin hatalı ürünlerin veya istenmeyen herhangi bir durumun etkilerini gizlemek için kullanılmaması koşuluyla, gıda katkı maddeleri, gıda enzimleri ve gıda aromaları da dahil olmak üzere gıdaların üretimi, işlenmesi, hazırlanması, arıtılması, paketlenmesi, taşınması veya depolanmasına yardımcı olmalıdır. Bunlar, gıdalarda uluslararası standartlardan sorumlu ortak FAO/WHO organı olan Codex Alimentarius' da yer alan ilkelere benzer niteliktedir [28].

2.5.1.4. Umami

Son yıllarda, standart temel tatlara ek olarak (tatlı, ekşi, tuzlu ve acı), umami tadı beşinci temel tadı olarak sınıflandırılmıştır. Tipik umami tadı, birçok kültürde birçok gıdayı çeşnilendirmek için kullanılan monosodyum L-glutamattır.

Umami tadı, sağlayan gıda katkı maddeleri, glutamat tuzu olan MSG, monoamonyum glutamat, monopotasyum glutamat ve ribonükleotid bileşikler, yani IMP ve GMP olan bir lezzet arttırıcı olarak kategorize edilir [29]. L-konfigürasyonunda sadece

glutamatın serbest biçimi, lezzet arttırıcı özellikler gösterir ve bu nedenle, gıda endüstrisinde bir lezzet arttırıcı olarak yaygın şekilde kullanılır [30].

Bugün tüketimi yılda 2,5 milyon tonu geçmekte ve yılda birkaç yüzdeyle artmaya devam etmektedir. MSG' nin bu yaygın ve artan kullanımı, MSG' nin, oral duyuşal tatlandırıcı rolüne ek olarak, metabolizmada hem fizyolojik hem de beslenme rollerini oynadığını göstermektedir [31].

MSG, diğler gıdalar tarafından sağlanamayan bir lezzet üretir. Japonca “ıştah” olarak çevrilen umami olarak tarif edilen bir tadı ortaya çıkarır [32].

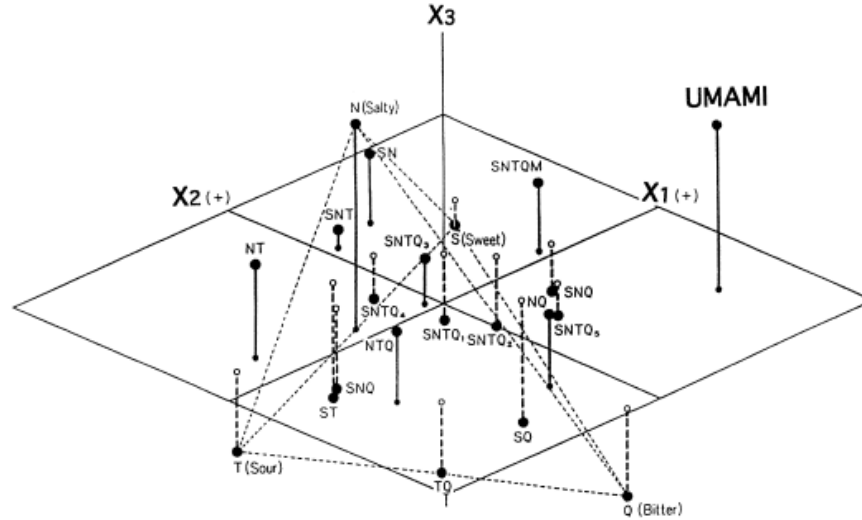
Umami, glutamat ve inosinat ve guanilat gibi 5'-ribonükleotidlerin verdiği karakteristik bir tada sahiptir. Glutamat ve nükleotitler birçok gıdada bulunur ve gıdaların tadı, lezzeti ve kabul edilebilirliğinde önemli rol oynamaktadır. Bu ayırt edici tadı ilk olarak 1908 yılında, onu tanımlamak için “umami” terimini kuran Ikeda tarafından keşfedilmiştir. Ikeda, balık ve et gibi gıdalarda lezzeti oluşturan bileşenlerin içinde dört temel tattan farklı bir uyarı olduğunu ve bu uyarının glutamik asit tarafından oluşturulduğunu saptayarak bu yeni tada umami adını vermiştir. Ikeda, 1908'de “umami” terimini icat etmesine rağmen, uluslararası bir şekilde temel bir tat olarak kabul edilmesinin 75 yıl sürdüğü görülmüştür.

Umaminin temel tadı olarak kabulü ve sınıflandırılması nispeten yeni bir gelişme olmasına rağmen, umami maddeler bakımından zengin gıdalar ve içerikler tarih boyunca kullanılmıştır. Antik Yunanistan ve Roma'da fermente edilmiş balık sosu kullanımı belgelenmiştir [32].

5. temel form olarak kabul edilen umami tadının esas olarak glutamat için G protein-bağı mGluR4 ve heterometrik T1R1+T1R3 reseptörlerin tanımlanmasıyla ilişkilendirilmiştir. Umami gıda baharatları için oldukça önemli bir yere sahiptir ve gıda üretiminde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [33].

İnsanlara uygulanan fizyolojik testler umami uyarısının dört temel tattan farklı olduğunu ortaya koymuştur. Yapılan çalışmalar sonucunda umami uyarısının tat prizmasının dışında kaldığı ve bağımsız bir tat olduğu gözlenmiştir [34]. Şekil 2.1'de umaminin tat prizması içindeki yeri gösterilmiştir. 21 tat uyararı arasındaki benzerlikler için üç boyutlu M-D-SCAL çözümü, dört temel zevkin dört köşede yer aldığını ortaya koyan üç boyutlu bir tetrahedrondur. İki, üç ve dört temel tatların tüm karışımları kenarlarda, yüzlerde, içeride veya en azından çevresinde bulunur. Monosodyum

glutamat, tetrahedrondan açıkça ayrılmıştır. Bu, umaminin dört temel zevke sahip olmadığı anlamına gelir [24, 30, 35].



Şekil 2.1. Umami tadının tat prizmasındaki yeri [5]

MSG, “lezzetli” tatlardan sorumlu olan umamiyi geliştirir. MSG, bir lezzet arttırıcı olarak bilinir, çünkü glutamat tek başına bir lezzet uyandırmaz, ancak mevcut lezzetleri arttırır [36]. MSG, tuz ile kombine edilebilir, bu uygulama aromayı arttırır ve tuz ihtiyacını azaltır [37].

2.5.2. Monosodyum glutamat (MSG)

MSG dünyada en çok bilinen ve gıda üretimlerinde yaygın şekilde kullanılan bir lezzet arttırıcı katkı maddesi olup, esansiyel olmayan L-Glutamik asidin sodyum tuzudur [38,39]. Birçok gıda maddesi ve insan vücudunda proteinlerin yapı taşı olan amino asit formunda veya serbest halde bulunmaktadır [40].

MSG, kırmızı et, balık, tavuk eti, çok sayıda sebze, sos, çorba ve terbiye karışımlarıyla uyum gösterir. Bir aroma olarak MSG doğru miktarda kullanıldığında tatla etkinleşen diğer bileşenleri iyileştirerek belirli yemeklerin genel tadını dengeleyip birleştiren bir özelliğine sahiptir [41].

MSG, birçok gıdaya eklenen, ancak doğal olarak da ortaya çıkan bir lezzet arttırıcıdır. Ayrıca MSG, kendinden özel bir lezzet katmaksızın, gıdanın doğal lezzetini kuvvetlendirerek gizli lezzet karakteristiklerini ortaya çıkarmakta, zayıf lezzet

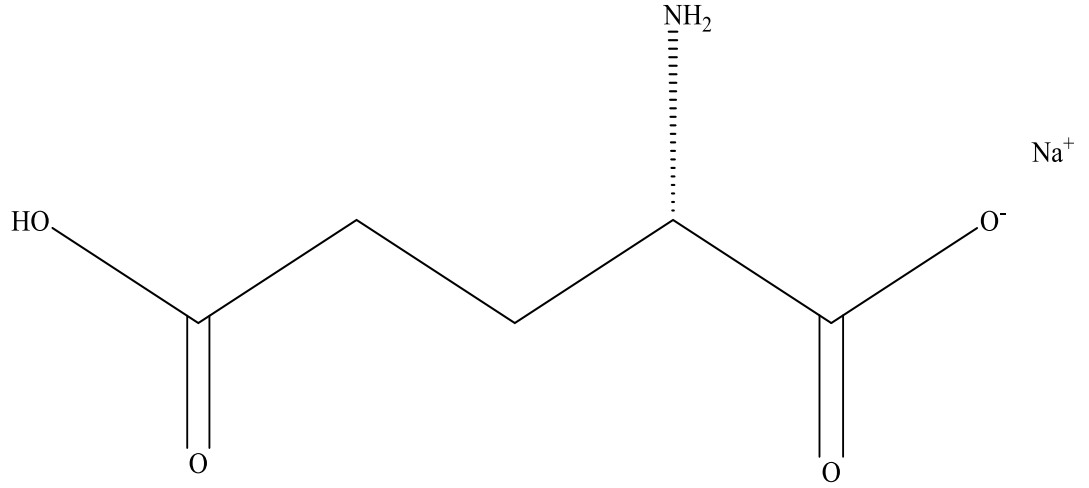
karakteristiklerini arttırmakta, ağızda doluluk ve süreklilik gibi gıdaya özgü kalite karakteristiklerini geliştirmektedir [42,43].

Gıda katkı maddesi olarak E 621 koduyla bilinen monosodyum glutamatın kimyasal adı, monosodyum L-glutamat monohidrattır ($C_5H_8NNaO_4 \cdot H_2O$) ve 187,13'lük bir moleküler ağırlığa sahiptir. MSG'nin IUPAC adı Sodyum 2-Aminopentandioat'dır. Pratik olarak kokusuzdur. Suda serbestçe çözünür, etanol içinde az çözünür ve eterde pratik olarak çözünmez [44]. Beyaz kristal bir toz olan MSG görseli, Görsel 2.1.'de verilmiştir.



Görsel 2.1. *Monosodyum Glutamat görseli* [45]

Sodyum glutamat veya MSG olarak da bilinen monosodyum glutamat; doğal olarak en fazla ortaya çıkan gerekli olmayan amino asitlerden biri olan L-GLU'nun sodyum (Na^+) tuzudur. MSG'nin molekül yapısı ve kimyasal özellikleri Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2. *MSG molekül yapısı*

MSG'nin E numarası E 621'dir. MSG glutamati, diğer gıdalardaki umami tadınının aynısını vermektedir. Kimyasal olarak her ikisi de aynı yapıya sahiptir. Endüstriyel gıda üreticileri, diğer tatların genel algısını dengelediği, harmanladığı ve birleştirdiği için MSG'yi aroma artırıcı olarak pazarlamakta ve kullanmaktadır. Monosodyum glutamatın ticari adları arasında AJINOMOTO, Vetsin ve Ac'cent bulunmaktadır [46]. Gıdalarda bulunan serbest Glu miktarları Tablo 2.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. *Gıdalar bulunan serbest glutamik asit miktarları [47].*

Gıda türü	Serbest glutamik asit (mg/100 g)
Et ve Kümes hayvanları	
Sığır	10
Domuz	9
Tavuk	22
Deniz yiyecekleri	
İstiridye	140
Yengeç	19
Mavi yengeç	43
Alaska büyük yengeç	72
Karides	20
Sebzeler	
Kabak	50
Ispanak	48
Domates	246
Yeşil kuşkonmaz	49
Mısır	106
Bezelye	106
Soğan	51
Patates	10
Mantar	42
Soyasoslari	
Çin	926
Japonya	782
Kore	1264
Filipin	412
Meyveler	
Avokado	18
Elma	4
Üzüm	5
Kivi	5

Tablo 2.2. devamı. *Gıdalar bulunan serbest glutamik asit miktarı* [47].

Gıda türü	Serbest glutamik asit (mg/100 g)
Peynir	
Parmesan	1680
Çedar peyniri	182
Süt	
İnek	1
Keçi	4
Anne sütü	19
Balık sosları	
Çin	828
Japon	1383
Endonezya	727
Malezya	621
Myanmar	948
Filipinler	988
Tayland	950
Vietnam	1370
Fermente fasulye	
Soya fasulyesi (Japonya)	136
Soya fasulyesi (Batı afrika)	965
Keçi boynuzu (Batı Afrika)	1700
Soya fasulyesi (Çin)	476

2.5.2.1. *Monosodyum glutamatın tarihçesi*

MSG'nin gıdalarda kullanımı, deniz yosunları kullanımı ile başta Çin ve Japon mutfakları olmak üzere, Türkiye de dahil birçok ülkede hazır gıdalarda yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. 1907-1908 yılında Kikunae Ikeda, Japonca “kombu” olarak adlandırılan yosundaki (Laminariaceae) farklı ve lezzetli tadı bulmak için çalışmalara başlamıştır. Ikeda, yosuna bu tadı veren içeriği saflaştırmak istemiş ve nihayet 1908 yılında bunu başarmıştır [48].

MSG ile ilgili araştırmalarda söz konusu aminoasidin sadece “L” formunun lezzet artırıcı aktiviteye sahip olduğu, “D” formunun ise aktivitesinin olmadığı saptanmıştır. MSG saf olarak veya maya ekstraktlarının gizli içeriği olarak veya hidrolize protein olarak ve yüksek oranlarda glutamat içerecek şekilde besinlere eklenebilir [49].

Ikeda, iyonize glutamatın umami tadını ortaya çıkardığını kanıtlamak için kalsiyum, potasyum, amonyum ve magnezyum glutamat gibi çok sayıda glutamat tuzunun tat özellikleri üzerinde çalışmalar yapmıştır. Tüm tuzlarda diğer mineraller nedeniyle belirli bir metal tadına ek olarak umami tadı ortaya çıkmıştır. Bu tuzlar arasında en fazla çözülebilen, yenilebilir lezzette ve kolaylıkla kristalize olanı sodyum glutamattır. Profesör Ikeda bu ürünü monosodyum olarak adlandırmış ve MSG üretim patentini almıştır.

Bu baharat 1909 yılında, kimyasal ve farmasötik endüstrisinde çok iyi tanınan girişimci Saburousuke Suzuki tarafından, AJI-NO-MOTO adıyla markalaştırılmıştır. MSG, genel olarak düzenli gıda işleme koşulları altında istikrarlıdır. Pişirme sırasında MSG çözülmez, ancak diğer amino asitlerde olduğu gibi çok yüksek ısılarda şekerin varlığında esmerleşme veya Maillard reaksiyonları ortaya çıkar [50].

2.5.2.2. Monosodyum glutamatın ticari olarak üretimi

MSG genel olarak, tuz ile kombine halde kullanılır ve genelde eklenen oranın %10 – 20 kadarı tuz olacak şekilde hazırlanır. Kristal halde bulunan ham glutamik asit öncelikle su içerisine süspanse halde tutunur, daha sonra çözünür, nötralize hale gelir ve içeriğe sodyum hidroksit eklenmesi ile monosodyum tuzu haline gelir. Çözelti aktif karbon kullanılarak renksizleştirilir ve gerekli ise soğutma işleminden önce vakum altında 60°'de konsantre hale getirilir ve hazırlanmış olur [51].

2.5.2.3. Monosodyum glutamatın gıdalarda kullanımı

MSG, doğada en yaygın olarak bulunan amino asitlerden biridir ve birçok protein, peptid ve dokularda bulunur. Glutamat vücutta üretilir. Yapısal bir protein oluşturmak için diğer amino asitlerle bağlanır [52]. Glutamat protein molekülüne bağlandığında, tatsızdır ve yemeğe umami tadını vermemektedir. Bununla birlikte, fermentasyon, yaşlanma, olgunlaşma ve ısı pişirme işlemi sırasında gerçekleşen protein hidrolizi, glutamatı serbest bırakır [53]. Glutamat, peynir, deniz ürünleri, et suyu ve diğer birçok gıda için önemli bir bileşendir [54]. MSG tüketimi geçmişten günümüze artarak devam etmektedir [55].

2.5.2.4. Monosodyum Glutamat ile ilgili yasal düzenlemeler

Tüm gıda katkı maddelerinin mevcudiyeti, gıda katkı maddelerinin kullanıldıkları yiyeceklerin içerik listesi sürekli gözetim altında tutulmalıdır. Değişen kullanım koşulları ve yeni ışığın ışığında gerektiğinde yeniden değerlendirilmelidir

Genel olarak, gıda katkı maddelerinin doğaya ve insan sağlığına zarar vermemesi için, JECFA gibi uluslararası ve TGK gibi yerel prosedürlerin verdiği günlük alım miktarı ve maksimum kullanım miktarları göz önüne alınarak kullanılmalıdır [56].

Avrupa ülkelerinde, tüketime hazır ürünlerdeki MSG içeriği, 10 g/kg aşmaması gerekmektedir. Türkiye’de kullanıma izin verilen glutamik asit ve glutamatların maksimum kullanım miktarları Tablo 2.3’de gösterilmiştir [57, 58].

Tablo 2.3. Glutamik asit ve glutamatların maksimum kullanım miktarları [10].

E-kodu	Adı	Maksimum miktar
E 620	Glutamik asit	
E 621	Monosodyum glutamat	10 g/kg, tek
E 622	Monopotasyum glutamat	başına veya
E 623	Kalsiyum diglutamat	birlikte,
E 624	Monoamonyum glutamat	glutamik asit
E 625	Magnezyum diglutamat	cinsinden

Tablo 2.3’e göre E 620 ve E 625 arasında E kodu bulunan glutamat türevleri için Türk Gıda Kodeksine göre kullanılmasına izin verilen maksimum miktar 10 g/kg dır. Bazı geleneksel ürünlerin ve kullanılması yasaklanan gıda katkı maddeleri Tablo 2.4.’de verilmiştir.

Tablo 2.4. Ülkemizde üretilen bazı geleneksel ürünler ve bunlarda kullanılması yasaklanan gıda katkı maddeleri [10]

Gıdalar	Yasaklanan gıda katkı maddelerinin adı/kategorileri
Fermente Sucuk	E 620–625: Glutamik asit—glutamatlar E 626 – 635: Ribonükleotitler E 251–252: Nitratlar Renklendiriciler
Isıl İşlem Görmüş Sucuk	E 620–625: Glutamik asit—glutamatlar E 626 – 635: Ribonükleotitler Renklendiriciler
Pastırma	E 620–625: Glutamik asit—glutamatlar E 626 – 635: Ribonükleotitler E 251–252: Nitratlar Renklendiriciler (yenilebilir dış kaplamaları hariç)
Döner	E 620–625: Glutamik asit—glutamatlar E 626 – 635: Ribonükleotitler E 249–250: Nitritler Renklendiriciler
Kanatlı Döner	E 620–625: Glutamik asit—glutamatlar E 626 – 635: Ribonükleotitler E 249–250: Nitritler Renklendiriciler
Köfte	E 620–625: Glutamik asit—glutamatlar E 626 – 635: Ribonükleotitler E 249–250: Nitritler Renklendiriciler
Pekmez	Tümü
Çiğ köfte ve mezeler (haydari, arnavut ciğeri, bakla fava, şakşuka, humus ve benzeri)	Tümü (sitrik asit hariç)
Pide, bazlama	Tümü

Glutamat, birçok gıdada doğal olarak ortaya çıkmasına rağmen, sıklıkla bir lezzeti arttırmak için ilave olarak eklenir. Domates, mantar ve peynir gibi büyük miktarlarda serbest glutamat içeren gıdalar geleneksel olarak tuzlu yemek elde etmek için kullanılır [59]. Gıdalara glutamat eklendiğinde, doğal olarak meydana gelen serbest glutamat benzeri bir lezzetlendirme fonksiyonu sağlar [60]. Bu nedenle, et, çorbalar, kümes hayvanları, deniz ürünleri, aperatifler ve güveçlerin doğal lezzetlerini geliştirmek için kullanılmaktadır [61].

2.5.2.5. MSG' nin gıdalardaki miktar tayini ile ilgili çalışmalar

M.D. Croitoru ve diğerleri, YPSK-UV metodu ile, MSG'nin OPA ile türevlendirilmesi esas alınarak glutamatın et ürünlerinde, çorbalarda ve vejeteryan ürünlerde belirlenmesi için bir YPSK yöntemi geliştirilmiştir [62]. Yöntem daha yaygın olarak YPSK-FLD yönteminden daha az duyarlı iyi bir lineerlik doğruluk ve tekrarlanabilirliğe sahip olsa da en fazla izin verilen miktardan 200 kat daha düşük miktarı tespit edebilmişlerdir. Sosislerde, glutamat miktarını 0,14 g/kg, domuz eti sosisinde ise 2,16 g/kg olarak bulunmuştur. Vejeteryan ürünlerde ve hazır çorbalarda ise, bulunan miktar 80 – 120 g/kg garalıdır. Domuz salamı örneğinde hesaplanan MSG miktarını 18,05 g/kg, sığır salamında 17,99 g/kg, jambonda 12,99 g/kg, sosiste 10,99 g/kg, tavuk jambonunda 10,00 g/kg, hindi jambonunda 17,65 g/kg olarak bulmuşlardır [63].

Buket Er Demirhan ve diğerleri MSG miktarının tavuk ve et suyundaki miktarlarını saptamışlardır. Farklı markaların (a,b,c,d) 122 adet bulyonlarını alıp, YPSK-DAD cihazı ile MSG miktarının bulunması konusunda çalışma yapmışlardır. Yapılan çalışmada, markalardaki ortalama miktarlar arasında önemli farklar görülmüştür. Tavuk sularındaki MSG miktarının et suyundakilerden daha az olarak ölçüldüğü görülmüştür. Glutamik asit OPA ile türevlendirilerek her bir standart YPSK-DAD sistemine enjekte edilmiştir. A, B, C ve D marka örneklerinde ortalama MSG seviyeleri ($\pm$ SE) $14,6 \pm 0,2$ g/kg, $11,9 \pm 0,3$ g/kg, $9,7 \pm 0,1$ g/kg ve $7,2 \pm 0,1$ g/kg olarak hesaplamışlardır. Ayrıca, tavuk bulyonlarda bulunan ortalama MSG miktarının et bulyonlara göre daha az miktarda olduğu görülmüştür.

Tiziana Populin ve diğerleri farklı marketlerden alınan hazır çorba, et suları, çorba sosu ve kremaları ile granül toz soslar ve salata soslarının içerisinde bulunan MSG miktarının tayini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada, örneklerin yapısına göre farklı yöntemler izlenmiş olup, sıvı örnekler (hazır çorbalar) türevlendirme ve YPSK işleminden önce seyreltme işlemine tabi tutulmuşlardır. OPA çözeltisi türevlendirme ajanı olarak kullanılmışlardır. MSG ilave edilmiş olan çorbalarda Glu içeriği 92,7 – 341 mg/100 g olarak hesaplanmıştır. İlave MSG içermeyen gıdalardaki en yüksek Glu miktarları hidrolize proteinler içeren ürünlerde (129 mg/100 g'a kadar) bulunmuştur [64].

Mehreen Lateef ve diğerleri, MSG konsantrasyonları Pakistan'daki 10 farklı baharat içerisindeki MSG miktarını YPSK kullanarak tayin etmişlerdir. Çalışmada, standart MSG ve MSG içeren örnekler kolon öncesi türevlendirme (pre-column) işlemine tabi tutulmuştur. Türevlendirme ajanı olarak 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzen (DNFB)

kullanılmıştır. Farklı örneklerdeki monosodyum glutamat konsantrasyonlarını %2,6 – 7,7 arasında elde etmişlerdir [65].

Oi-Wah Lau ve diğerleri, gıdalardaki MSG miktarını iletkenlik dedekörlü sıvı kromatogorafisi yöntemiyle belirlemişlerdir. Tayin hassasiyetini artırmak için aminoasitin kolon sonrası ya da kolon öncesi türevlendirme işlemine gerek duyulmadığı gözlemlenmiştir. Bu yöntemde kromatografik tayininden önce numune saflaştırmasında kısa bir Dowex SOW-X8 (H⁺) kolonu kullanılmıştır. Önerilen yöntem çeşitli besin örneklerindeki %0,007 (a/a) oranındaki seviyeye kadar olan monosodyum glutamatın miktarını tayin etmek için kullanılabileceğini rapor etmişlerdir. Sonuç olarak yiyecek ürünlerindeki monosodyum glutamat miktarını belirlemek için basit, ucuz ve güvenilir bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde aletli ölçümden önce glutamatik asiti türevlendirmeye gerek olmadığı belirlenmiş böylece türevlendirme sürecinden dolayı oluşan, türevlendirme tepkimesinin tamamlanması, tepkime oranı, kolondaki tepkime ürünüde muhtemel bozulma gibi birçok hatayı yok edilebileceği gözlemlenmişlerdir [66].

Rodriguez ve diğerleri, hamburgerlerin içerisinde bulunan monosodium glutamat'ın miktarının tayini bir YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmalarında MSG'yi türevlendirmek için ajan olarak DNFB kullanmışlardır. 254 nm dalga boyunda gerçekleştirilen YPSK-DAD analizi sonucunda monosodyum glutamatın miktarlarını sırasıyla 100,5 mg/kg, 100,7 mg/kg, 130,3 mg/kg, 217,9 mg/kg, 178,9 mg/kg olarak belirlemişlerdir [67].

Mustafa ve diğerleri geleneksel et yemeklerinde bulunan MSG miktarını belirlemek için YPSK-DAD yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde kolon önceki türevlendirme işlemi için DNFB kullanmışlardır. Yapılan analizler sonucunda geleneksel et yemeklerinde bulunan MSG miktar aralığını yani %0,2 – 0,8 seviyelerinde tespit etmişleridir [68].

Wafaa M. ve diğerleri, Assiut şehrinde bulunan pazardan seçilmiş gıda örneklerinin monosodyum glutamat içeriğini YPSK aracılığıyla belirlemişlerdir. Pirinç baharatları, Indomie erişte; tavuk bulyon ve patates cipsi örneklerinden 3'er adet seçmişler ve monosodyum glutamat tayini gerçekleştirmişlerdir. Analizlerinden elde edilen sonuçlar, MSG'nin, tüm örneklerde mevcut olduğunu göstermişlerdir. Hesaplanan MSG miktarlarını sırasıyla 1,355 g/100 g (%1,35), 7,335 g/100 g (%7,33) ve 2,102 g/100 g (%2,1) olarak hesaplamışlardır [69].

Hnin-Pwint Aunga ve Ute Pyellca, konserve gıda ve diğer işlenmiş gıda örneklerinde monosodyum glutamat (MSG), benzoik asit (BA) ve sorbik asit (SA) hızlı eş zamanlı belirlenmesi için, kapiler elektroforez ile ayırma yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde MSG'nin türevlenmesi için türevlendirme ajanı olarak, 3-merkaptopropiyonik asit (3-MPA) ile birlikte o-fitalaldehit (OPA) kullanmışlardır. Bu yöntemi, soya sosu, balık, istiridye sosu ve tatlı şili sos gibi gerçek örneklerle uygulamışlardır. MSG'nin tayin ve tespit limitlerini sırasıyla 0,46 mg/L ve 0,14 mg/L olarak, örneklerde bulunan MSG miktarlarını ise sırasıyla 2263, 11563, 2590, 53 mg/L olarak tespit etmişlerdir [70].

A. T. Rhys Williams ve diğerleri, gıda örneklerinde bulunan MSG miktarının tayini için yöntem geliştirmişlerdir. MSG'yi FLD ile tayinini gerçekleştirmek için Dansil Klörür'ü türevlendirme ajanı olarak kullanmışlardır. Ortalama %97 geri kazanım yüzdesi ve %3,5 standart sapma ile gerçekleştirdikleri çalışmada, tavuk çorbasında 5,40 g/100g, sığır ve domates çorbası karışımında 4,99 g/100 g, sebze çorbasında 3,79 g/100 g, mantar çorbasında ise 9,87 g/100 g MSG olduğunu tayin etmişlerdir [71].

Chanvorleak Phat ve diğerleri, Kore'de ticari olarak satılan 17 adet yenilebilir mantar, umami tat bileşikleri (5- nükleotitler: AMP, GMP, IMP, UMP, XMP; serbest amino asitler: aspartik, glutamik asit) için analizi gerçekleştirerek elektronik dil sistemi ile ölçümlerine tabi tutmuşlardır. YPSK yöntemi ile analizi gerçekleştirilen bu çalışmada MSG analizi gerçekleştirmek için türevlendirme ajanı olarak OPA kullanmışlardır. Çoğu mantarın yüksek seviyede umami tadı sergilediğini belirtmişlerdir. Amanita virgineoides en yüksek toplam 5' nükleotid içeriğine ($36,9 \pm 1,50$ mg/g) sahipken, monosodyum glutamat benzeri bileşenler ($42,4 \pm 6,90$ mg/g) Agaricus bisporus'ta en yüksek değere sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Eşdeğer umami konsantrasyonu (EUC) $1,51 \pm 0,42$ ila 3890 ± 833 mg MSG/g kuru ağırlık arasında değişmektedir [72].

Nur C. ve diğerleri, tavuk ve et bulyonlar, patates cipsleri, soslar ve çorbalar gibi gıda maddelerinde bulunan monosodyum glutamatın (MSG) incelenmesi amacıyla sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) yöntemini geliştirmişlerdir. LOD ve LOQ değerleri, sırasıyla 1,0 µg/kg, 5,0 µg/kg olarak belirtmişlerdir. Bu LC-MS/MS tekniği, çok çeşitli gıda maddelerinde MSG' nin saptanması için başarıyla uygulanmıştır. MSG içeriği gıda örneklerinde 0,01 g/100 g ila 15,39 g/100 g arasında değişmiştir. Önemli olarak, günlük tüketimde serbest glutamik asitin belirlenmesi ve serbest glutamik asit tüketimi ile ilişkili çeşitli yan etkileri de önlemek amacıyla gıdalardaki tespitlerini gerçekleştirmişlerdir [73].

M. Khairunnisak ve diğerkleri, işlenmiş gıdalarda serbest glutamik asit miktarını ölçmek için YPSK-FLD yöntemi geliştirmişlerdir. Malezya'da bulunan 44 yemek ve 26 baharattan oluşan örneklerde bu yöntemi uygulamışlar. YPSK-FLD sistemi kullanarak bu tayini gerçekleştirmişlerdir. Geri kazananım çalışmaları için örneklere, 6 ila 31 mg/g seviyelerinde glutamik asit ilave edilmiştir. Farklı matrislerde hesaplanan ortalama geri kazanım değerini %88 ila %102 olarak hesaplanmış olup ortalama geri kazanım %97 olarak raporlanmıştır. Araştırmadan elde edilen sonuçlar, işlenmiş gıdalarda ortalama serbest glutamik asit içeriğinin 0,34 ile 4,63 mg/g arasında değiştiğini, hazır yemeklerde ise roti canai (köri soslu ekmek)'de 0,24 mg/g kadar düşük olduğunu ortaya koymuştur. Dim sum (genellikle kıyılmış et, deniz mahsulleri ve sebzeler, buharda veya kızartılmış olarak doldurulmuş küçük bir hamur) içinde 8,16 mg/g glutamik asit içerdiğini hesaplamışlardır. Serbest glutamik asit içeriği, mayonezde 0,28 mg/g tavuk bulyonda ise 170,90 mg/g olarak raporlanmıştır [74].

2.5.2.6. MSG'nin sağlık üzerine etkileri ve ilgili çalışmalar

MSG' nin insan sağlığına etkileri ve güvenli kullanımı, 1980'lerin başından bu yana tartışmalı bir konu olmuştur. Monosodyum tuzu yapısındaki L-GLU, beşinci temel tat olarak bilinen, et aromasına çok benzer olan tipik “umami” aromasını vermesiyle gıda endüstrisinde önemli bir yere sahip olmuştur.

2007 yılında, MSG'nin dünya çapındaki üretiminin 2 milyon ton civarında olduğu tahmin edilmiştir. Artan bu kullanım ile birlikte, gıda sanayisinde çok fazla kullanılan bu maddenin sağlık üzerine etkileri konusunda ise FDA MSG'yi güvenli olarak tanımlamasına rağmen bu konu hakkında görüş bütünlüğü yoktur. MSG'nin çeşitli hastalıklar üzerinde etkili olduğuna, toksik etkiler gösterebildiğine dair literatürde bilgiler yer almaktadır. Bu tür çelişkili bilgiler de MSG'nin güvenli kullanımına yönelik şüphe uyandırmaktadır [46]. MSG'nin gıdalara büyük miktarlarda eklenmesi sağlık sorunlarına yol açabilir [66].

Mehreen ve diğerkleri, MSG için kabul edilebilir günlük alım miktarı belirlenmiştir. Ancak lezzetli dozu 60 mg/kg olarak belirlemiştir [65].

Colucci, P.E ve diğerkleri, MSG'nin obeziteyi, insülin salınımını artırarak, ketogenezi azaltarak ve adolesan dönemde büyüme hormonunun salınımını baskılayarak tetiklediği yapılan araştırmalar sonucu bulunmuşlardır. MSG'nin iştahı artırması üzerine yapılan bir deneyde koyunlara değişik miktarlarda MSG içeren otlar verilmiştir. MSG

miktarı ve ot yeme arasındaki ilişki incelenmiştir. 5 – 40 g/kg oranıyla karıştırılarak verilen MSG'nin koyunlarda %146 iştah arttırdığı gözlenmiştir. Bu çalışmada anlatılan kalitesiz yiyeceklerin kullanımı MSG eklenmesiyle arttırılabilir olduğu gözlemlenmiştir [75].

MSG'nin izin verilen sınırın üzerindeki tüketimi, beyin hücresi hasarı, retina dejenerasyonu, endokrin bozukluğu ve bağımlılık gibi patolojik durumlarla sonuçlanan nörotoksin etkileri ile ilişkilendirilmiştir. Bu sorunlara ilave olarak inme, epilepsi ve beyin travması gibi sağlık sorunlarıyla da ilişkilendirilmiş çalışmalar raporlanmıştır [76].

MSG, umami olarak adlandırılan eşsiz bir tat hissi ortaya çıkarır ve çeşitli mutfaklarda yaygın bir lezzet arttırıcı olarak kullanılması beraberinde bazı sağlık sorunları getirdiğine dair son zamanlar çalışmalar oldukça artmaktadır. Bağırsak mukozasında ve oral kavitede L-glutamat (Glu) ve transdüksiyon molekülleri için reseptörlerin varlığını ortaya koymuştur. Gastrik afferent vagal sinir, özellikle midede Glu tarafından lüminal stimülasyona yanıt verir ve otonomik refleksleri düzenler. MSG'nin intragastrik infüzyonu aynı zamanda birkaç beyin alanını (insular korteks, limbik sistem ve hipotalamus) harekete geçirir ve sıçanlarda aroma tercihi öğrenmeye neden olabilir. Bu sonuçlar, Glu siniri ve viseral yollarla sinyallemenin beyni harekete geçirerek sindirim, emilim, metabolizma ve diğer fizyolojik fonksiyonlarda önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Glutamatın kendisi çoğu durumda çok düşük toksisiteye sahiptir ancak sıçanlar ve fareler için glutamatın oral öldürücü doz miktarı LD₅₀' nin değeri 15,000–18,000 mg/kg vücut ağırlığıdır [77]. Ayrıca glutamat, insan beyninde etkili bir uyarıcı nörotransmitterdir. Glutamat reseptörü inaktivasyonu, sinaptik yarıktaki glutamat gerilimini ile dengelenmemişse, glutamat mayakümüle olur ve nörotoksik hale gelir. Hafıza, öğrenme ve düzenleme süreçlerini etkiler [78]. Amerikan Deneysel Biyoloji Birlikleri Federasyonu (FASEB)'in 1995 tarafından bildirildiği üzere, 0,5 ila 2,4 g dozunda MSG'ye maruz kalmak, kızarma, baş ağrısı, ağızda uyuşma ve diğer semptomlarla karakterize edilen geçici MSG sendromu (Çin restoranı sendromu) ile sonuçlanabilir. Bu nedenle, MSG tüketiminin güvenliği konusunda tartışmalı görüşler olduğu raporlanmıştır [79, 80].

MSG amino asit glutamat'a bağlı, tek sodyum atomlu serbest bir amino asit tuzu olup işlenmiş gıdalarda lezzet arttırıcı olarak sıkça kullanılan gıda takviyesidir. Belirli

MSG miktarının olası toksik etkilerine sahip olduğunu gösteren bazı çalışmalar yapılmıştır. Bu nedenle, gıda bileşeni olarak MSG, sağlık çalışmalarına da konu olmuştur. Hem insan hem de hayvan araştırmalarında MSG tüketimi ile ilgili olarak diyabet ve obezitede denekler gözlenmiştir. MSG, yemeklerin lezzetini artırır ve böylece iştahı olumlu etkilediği ve vücut ağırlığında artışa neden olduğu görülmüştür [81].

Son dönemde yapılan epidemik ve hayvan çalışmaları sonucunda son yıllarda özellikle artış gösteren beden kitle endeksi, obezite ve insülin direnci gibi çeşitli metabolik hastalıkların MSG kullanımı ile ilişkilendirilmiştir [82].

Bununla birlikte, belirli MSG miktarının olası toksik etkilerini gösteren ve miyokardiyal ve hepatik hastalıklarla ilişkili olabileceğini gösteren bazı çalışmalar vardır [83]. MSG nin insan sağlığı üzerine etkileri ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır. Yapılan bu çalışmalar sonucu elde edilen bazı kanıtlar, MSG' nin astımı ve migreni tetikleyebileceğini düşündürmektedir [36]. Aynı zamanda, anektotal raporlara dayanarak, bazı kişilerin, MSG' nin ağızdan alınmasıyla ilgili akut, geçici ve kendi kendini sınırlayan reaksiyonların temsilcisi olduğu düşünülen 'MSG semptom kompleksi' ne neden olan bir MSG intoleransına sahip olabilirler.

MSG' nin insan sağlığına olan etkilerinin gözlemlendiği başka bir çalışmada, optimum miktar üzerinde kullanımlarda, MSG' nin Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi birçok nörolojik bozukluğu şiddetlendirebildiği sonucuna varılmıştır. En sık bildirilen semptomlar baş ağrısı, uyuşma/karıncaalanma, kızarma, kas gerginliği ve halsizliktir [84].

Gıda katkı maddelerinin kullanımında dozaj çok önemlidir. Gıdalardaki katkı maddelerinin düzenli kimyasal analizleri büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, gıda katkı maddelerindeki sınırlamalar, Türk Gıda Kodeksi (TFC) ve Avrupa Birliği Direktiflerine (EC) göre yapılmıştır.

Hashem ve diğerleri, 2012 yılında yaptıkları çalışmada, MSG' nin beyindeki tehlikeli etkileriyle ilgili araştırmalar yapmışlardır. MSG' nin albino sıçanların serebellar korteksindeki nöron ve astrositlerde dejeneratif değişikliklere yol açan nörotoksik etkiye sahip olduğu sonucuna varmışlardır [85].

Umukoro ve diğerleri, 2015 yılında yaptıkları çalışmada, farelere ağızdan verilen düşük dozda MSG'nin, Y labirent testinde önemli bir bozulma yaratmadığını, ancak 500 mg/kg'lık dozda verildikten sonra yapılan yüzme testinde depresif semptomlar meydana geldiğini ve beyin dokusunda bulunan malondialdehid (MDA) düzeyinde artış olduğunu, glutatyon (GSH) seviyesinde ise azalma olduğunu raporlamışlardır [86].

Prastiwi ve diğeri, yaptıkları çalışmada sıçanlara yüksek dozda (3,5 mg/g vücut ağırlığı) MSG verilmesinden sonra motor koordinasyonunda önemli bir azalmaya neden olduğunu belirlemişlerdir [87].

2.5.2.7. Çin restoran sendromu

New England Journal of Medicine dergisinde, 1968 yılında Çin restoranlarında yemek yedikten 15 ila 30 dakika sonra başlayan yaklaşık 2 saat süren hiçbir kalıcı etkisi olmayan bir sendrom tanımı bulunmuştur. Bu belirtiler, iki kol ve sırtta doğru ilerleyen uyuşma, genel halsizlik ve çarpıntı olarak tanımlanmıştır [88]. Bu semptomların nedeninin yemek içinde bulunan tuz, MSG veya alkol gibi çok sayıda faktörün olabileceğini belirtmişlerdir. Bu dönemde ‘Çin Restoran Sendromu (ÇRS)’ kompleks semptomu üzerinde durulmuştur. O zamandan bu yana çok sayıda literatürde, ÇRS için etken olarak MSG’ye odaklanılmıştır. Sürekli artan sayıda çeşitli belirtiler, sonradan ÇRS belirtilerine eklenmiştir. 1995 yılında Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB), FDA komisyonluğunda, MSG ile ilgili raporların gözden geçirme girişiminde bulunulmuştur. MSG’nin ağızdan alımları ile geçici ve kendini sınırlayan akut reaksiyonların temsilcisi olarak kabul edildiği sonucuna varılmıştır. MSG’nin sebep olduğu düşünülen hastalıklar aşağıda verilmiştir.

- ✓ Boyun, göğüs ve kol arasında yanma hissi,
- ✓ Yüz basıncı/ gerginlik,
- ✓ Göğüs ağrısı,
- ✓ Baş ağrısı,
- ✓ Bulantı,
- ✓ Çarpıntı,
- ✓ Sırt, kol ve boyuna doğru uyuşma,
- ✓ Yüz, şakaklar, üst sırt, boyun ve kollarda karıncalanma, hararet, güçsüzlük,
- ✓ Bronkospazm (sadece astımlılarda gözlenen)
- ✓ Uyuşukluk,
- ✓ Halsizlik.

Serbest Glu yutulduğunda, amino asit bir peptide bağlı olmadığından normal sindirim süreçleri meydana gelmez. Bu kandaki serbest glutamik asitte hızlı bir artışa neden olur ve yüksek seviyelerde toksiktir. MSG, tipik olarak baş ağrısı, yanma hissi, yüz baskısı ve göğüs ağrıları ile ilişkili olan ÇRS’nin nedeni olarak tespit edilmiştir [89].

ÇRS' nin ilginç bir özelliği, semptomların çoğu bir veya birçok karakterize belirtilerden herhangi biri ile etkilenen bireyler ile değişir şeklinde tanımlanır olmasıdır. Yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda, en sık rastlanan sübjektif semptomlar; karıncalanma, kızarma, kas sertliği, yaygın halsizlik, baş ağrısı ve uyuşukluktur [90].

MSG için en uygun lezzetlilik konsantrasyonu %0,2 ile %0,8 arasındadır ve insanlar için en büyük lezzetli doz yaklaşık 60 mg/kg vücut ağırlığıdır. MSG, 1980'den beri kullanımı tartışmalı hale gelmiş olup ve o zamandan beri güvenliği konusunda sorular devam etmektedir. ÇRS'nin belirleyici faktörü olarak tanımlanmıştır [91]. Bazı insanlar MSG içeren yiyecekler tükettiğinde, baş ağrısı, bulantı, yüz baskı, sıkışma, göğüs ağrısı ve sıcaklık gibi belirtiler oluşabilir [92]. Ayrıca, uyarıcı amino asitlerin (glutamik ve aspartik asit) Parkinson, hastalığı patofizyolojisinde merkezi bir rol oynayabileceği öne sürülmüştür.

MSG tüketiminde sınır değerlere uyulmadığında ve bilinçsizce tüketildiğinde sağlık üzerinde oluşturabileceği riskler sebebiyle gıdalarda MSG miktarlarının tayini ve TGK'ya uyumluluğunun kontrol edilmesi önem arz etmektedir. Ülkemizde ve dünyada çeşitli yöntemler kullanılarak gıdalarda MSG miktar tayini yapılmaktadır. Titrasyon metodu, enzimatik yöntemler, kağıt kromatografisi, florometrik yöntemler ve gaz ve sıvı kromatografisi yöntemleri analiz için kullanılan yöntemler bunlardan birkaçıdır. YPSK'nın duyarlılığının yüksek olması nedeniyle MSG miktar tayininde kullanılan en yaygın yöntemler arasında gelmektedir [93].

3. DENEYSEL YÖNTEMLER

Yapılan çalışmalar sonucunda, MSG' nin sağlık üzerinde etkilerinin görülmesi ve gıdalarda belirlenen kritik kullanım miktarları ile birlikte MSG tayini önem kazanmıştır. MSG nin tayininde kullanılan yaygın yöntemler kağıt kromatografisi, titrasyon metodu, enzimatik yöntemler, florometrik yöntemler ve gaz ve sıvı kromatografisi analizidir.

3.1.Kromatografi

Kromatografi, karmaşık bileşenlerde kimyasal bileşenlerin ayrılması için en yaygın şekilde kullanılan analitik bir tekniktir. Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir. Akış halinde gaz veya sıvı bir fazla birlikte karışımdaki bileşenler, sabit faz üzerinden geçirilirler; geçirilme esnasında bileşenlerin göç hızlarına bağlı olarak ayırma işlemi gerçekleşir. Bu bilgiler ışığında genel bir tanım yapmaya çalışırsak; kimyasal maddeler sabit bir ortama ilave edip bunların belirli bir hareketli faz yardımıyla bileşenlerin belirli özelliklerine bağlı olarak, sabit ortamdan ayrılma yöntemlerine kromatografi denir.

3.1.1. *Kromatografinin mekanizma yönünden sınıflandırılması*

Mekanizma yönünden sınıflandırılması ayırma ortamında maddelerin ayrımını gerçekleştiren mekanizmayı temel alır. Çok çeşitli mekanizmalar mevcut olduğundan gruplandırmak bir hayli güçtür. Bilinen mekanizmalar göz önüne alındığında kromatografi 6 gruba ayrılmaktadır [94].

1. Dağılma (partisyon)
2. Dışa soğurma (adsorbsiyon)
3. İyon değiştirme
4. İyon – çifti
5. Molekül seçme
6. Afinite kromatografi

3.1.1.1. Dağılma kromatografisi

Örnek içindeki her madde hareketli ve sabit faz arasında Nernst kuralına göre dağılıma uğrar. Dağılma katsayısı (hareketli faz/sabit faz) büyük olan ayırma ortamını önce terk eder.

3.1.1.2. Adsorbsiyon Kromatografisi

Sabit fazın katı olduğu sistemlerde katı yüzeyinde maddenin alıkonulması daha çok fiziksel kuvvetler etkisi sonucu adsorbsiyonla sağlanır. Adsorbsiyon enerjilerinin farklılığı maddelerin ayırma ortamını farklı zamanlarda terk etmelerini sağlar.

3.1.1.3. İyon değiştirme kromatografisi

Sabit fazda anyon ve katyonları değiştirebilen fonksiyonel gruplar bulunmaktadır. İyonik maddelerden oluşan örnek karışım ayırma ortamına verildiği zaman bu iyonlar sabit fazdaki anyon ve katyonlarla yer değiştirerek tutunma gerçekleşir. Sürekli olan akışta olan hareketli faz, iyonun sabit ve hareketli fazda oluşturduğu dengeye göre iyonik maddeyi sürükler. Denge sabitinin büyüklüğü hangi iyonun daha uzun süre sabit fazda alıkonulacağını, hangisinin önce ortamı terk edeceğini belirlemektedir.

3.1.1.4. İyon çifti kromatografisi

Kendileri iyonik olmadıkları halde, bir iyonik madde ile ayırma ortamı öncesi veya ayırma ortamında bir iyonik yapı oluşturarak maddenin alıkonulmasını sağlar.

3.1.1.5. Molekül Seçme Kromatografisi

Sabit faz gözenekli taneciklerden oluşur. Bu gözenekler örnek içindeki maddelerin alıkonma ortamında molekül büyüklüklerine göre bir süre alıkonulmalarını sağlar. Tüm kromatografik yöntemlerde ayırma ortamını önce küçük moleküllü maddeler terk ederken, bu tür kromatografide ise önce büyük moleküller sistemi terk ederler. Sabit fazın küçük gözeneklerine büyük moleküllerin girmemesi buna etkindir.

3.1.1.6. Affinite Kromatografisi

Protein – ligand etkileşimine dayalı, biyolojik moleküllerin ayırımında kullanılan bir yöntemdir. Antijen – antikor, enzim – substrat, reseptör ilaç, gibi oldukça spesifik etkileşimlere dayanmaktadır.

3.1.2. İki Fazın polarlık durumuna göre sınıflandırma

Polarlık yönünden kromatografik yöntemleri;

- a) Normal faz
- b) Ters faz

olmak üzere iki gruba ayırmak mümkündür.

Normal faz, sabit fazın hareketli faza göre daha polar olduğu yöntemdir. Kısaca, polar sabit faz ve apolar veya düşük polariteye sahip hareketli faza sahip yöntemdir.

Ters faz, hareketli fazın sabit faza göre daha polar olduğu yöntemdir. Kısaca, sabit faz apolar, hareketli faz ise polar olan yöntem verilir.

3.1.3. Fazların fiziksel şekline göre sınıflandırılması

Bu sınıflandırma yöntemi en yaygın sınıflandırma yöntemidir. Buna göre kromatografik yöntemler önce hareketli faza göre, gaz kromatografisi ve sıvı kromatografisi olarak ikiye ayrılır. Kromatografik yöntemleri şu şekilde sınıflandırabiliriz;

- a) Kağıt kromatografisi
- b) İnce tabaka kromatografisi
- c) Kolon kromatografisi
- d) Gaz – sıvı kromatografisi
- e) Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

3.1.4. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK)

Gelişen teknoloji ile birlikte son yıllarda bileşenlerin ayrılmasında ve karakterizasyonunda en çok kullanılan yöntem yüksek performanslı sıvı kromatografisidir. Sıvı kromatografisi metodunun özel bir uygulaması olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK-YPSK) metodunda, sabit faz olarak kullanılan dolgu maddelerinin partikül büyüklüğünün küçültülmesi neticesinde hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı genişler ve böylece kolonun etkinliğinin artırılması sağlanır. Çok sıkı olarak doldurulmuş kolondan hareketli (mobil) fazın belli bir hızla yürütülebilmesi için basınç uygulaması gereklidir.

YPSK, yapıları benzer kimyasal türlerin ayrılması ve saflaştırılması işlemlerinde, kalitatif ve kantitatif analizlerinde oldukça yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Az sayıda ve bilinen türleri içeren karışımlardaki bileşenlerin varlığını tanımak amacıyla yaygın bir şekilde kullanılır. [95].

Bu yöntem, özellikle son yıllarda gıdaların içerisindeki zararlı/zararsız bileşenlerinin tayini için oldukça fazla kullanılmakta ve önem arz etmektedir.

3.1.4.1. YPSK sisteminde kullanılan dedektörler

Hareketli fazda meydana gelen fiziksel veya kimyasal değişiklikleri izleyerek kalitatif ve kantitatif analiz yapılmasına olanak sağlayan araçlara dedektör adı verilir. Seçilen dedektör hedef maddenin türüne göre önem arz etmektedir [94]. YPSK sisteminin en kilit bileşeni detektörüdür. Kromatografik yöntem ile ayırımı gerçekleştirilmiş her molekülün değerlendirilmeleri hassas bir şekilde yapılmalıdır. Dedektörün fonksiyonu analizi yapılan maddenin konsantrasyonu ile orantılı olarak bir elektrik sinyali vermektir [96]. YPSK sisteminde kullanılan dedektör tipleri Tablo 3.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. YPSK kullanılan Dedektör tipleri

Ultraviyole/görünür (UV/VİS)
Refraktif İndeks (RI)
Floresans
Elektrokimyasal
*Amperometrik
*Kondüktif
Radyoaktivite
Işık Saçılık
*Çok – Açılı Lazer Işık Saçılımı (MALLS)
*Evaporatif Işık Saçılım (ELSD)
Kütle Spektroskopisi

YPSK için ideal bir dedektör; geniş konsantrasyon aralığında yüksek duyarlılığa, düşük gürültü seviyesine, bilinen seçiciliğe sahip olmalı ve kromatografik çözünürlüğe olumsuz etki etmeksizin kolondan geçen bileşiklere duyarlı olmalıdır. Ayrıca dedektör, sıcaklık ve basınçtaki değişimlere de duyarlı olmamalı, analizi yapılacak örneğin türüne elverişli olmalıdır.

İdeal bir dedektör kullanılan tampon çözeltiler, organik çözücüler gibi elüentlere dair hiçbir sinyal vermemelidir [97]. Sıvı kromatografisinde en çok kullanılan dedektörler, ultraviyole veya görünür ışığın absorpsiyonuna dayanmaktadır [98].

3.1.4.1.1. Ultraviyole/Görünür (UV/VIS) ve foto diyot dizisi dedektörü (DAD)

YPSK sistemlerinde en yaygın kullanılan dedektör çeşididir. Ultraviyole ve görünür bölge spektrofotometresini temel alır. Spektral karakteristiğe uygun bileşenlerin analizi yapıldığı için seçici dedektör sınıfında yer alır. Bu dedektörler Beer's Law yasasına uyar. A, absorbans, ϵ molar absorpsiyon katsayısı, b, hücre uzunluğu (cm), c örnek konsantrasyonu iken eşitlik şu şekildedir;

$$A = \epsilon bc \frac{I_0}{I} \quad (3.1)$$

En yaygın olarak kullanılan tarama dedektör ise foto diyot dizisi dedektörüdür (PDA). "Ters optik" olarak kabul edilen bu sistemde, ışık kaynağından gelen spektrum hücreyi aydınlatmak için kullanılır ve bu ışın foto diyot dizisi üzerine her biri dar bir spektral aralığa sahip olan bir polikromator aracılığı ile dağıtılır.

Türevlendirme işlemi için, 200 – 800 nm dalgaboyundaki ışınların absorblanabilmesi için maddenin kromofor grup içermesi gerekmektedir. Bu grupların molekülde bulunmaması halinde bir önceki başlıkta bahsedilen reaktifler ile uygun bir şekilde tepkimeye sokularak dedeksiyonları gerçekleştirilebilir. Bu işleme türevlendirme (derivatizasyon) adı verilir [94].

Türevlendirme kromatografik ayırım sırasında veya örnek sisteme verilmeden yapılabilir. Kromatografik ayırım esnasında yapılan türevlendirme işlemine *on – line* derivatizasyon, örneğin sisteme verilmeden önce yapılan türevlendirme işlemine ise *off – line* derivatizasyon adı verilir. *On – line* derivatizasyon iki şekilde uygulanır.

- a) Kolon öncesi (pre – kolon)
- b) Kolon sonrası (post – kolon)

3.1.4.1.2. Floresans dedektör

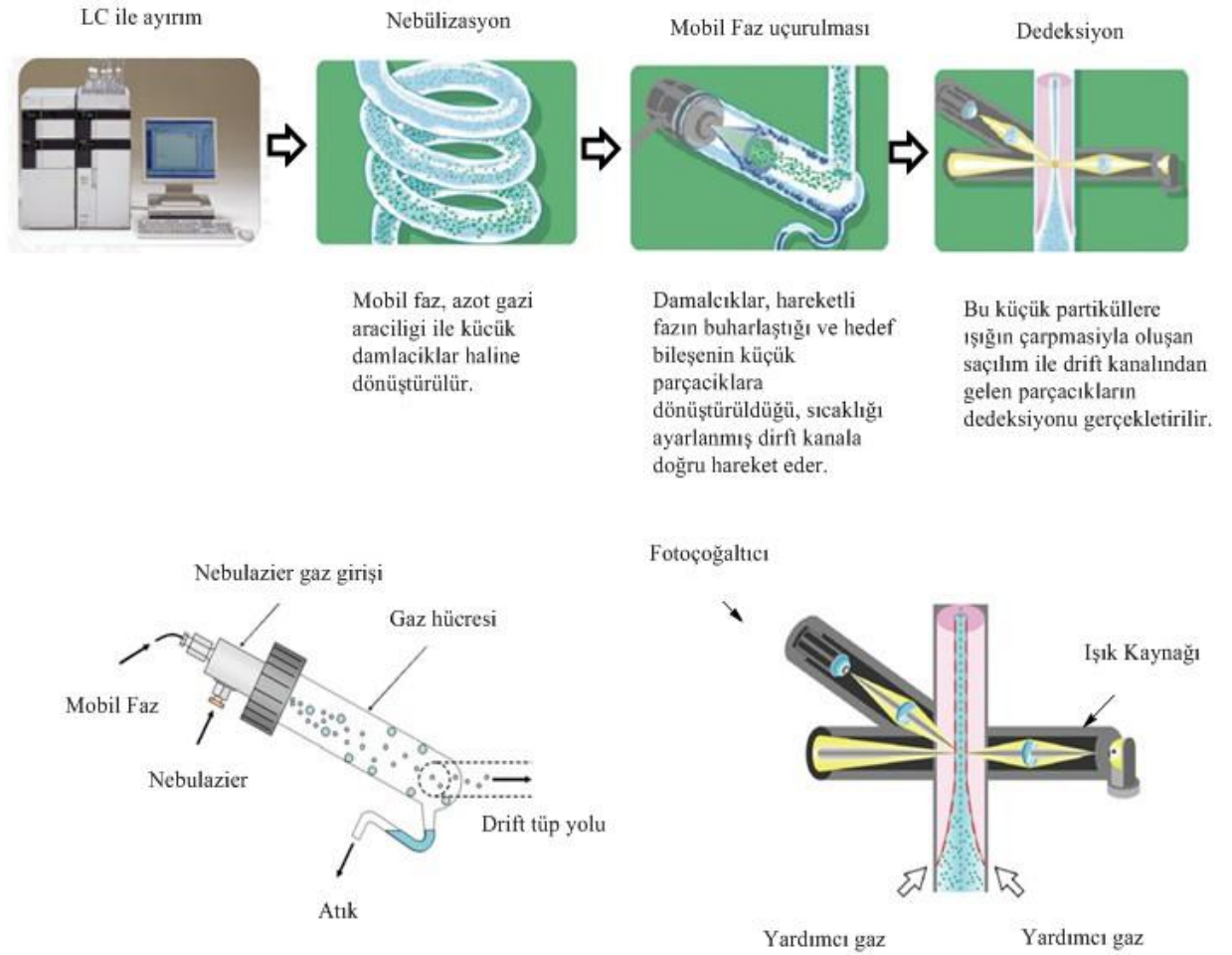
Bazı moleküller doğal olarak floresandır. Bu moleküller uyarım dalga boyu (λ_{ex}) adı verilen speksifik dalga boyundaki enerjiyi absorblarlar. Uyarılmış durumdan temel hale geçişinde bir ışın yayarlar ve burada emisyon (λ_{em}) dalga boyu adı verilir. Floresans dedektörler molekülün λ_{ex} dalgaboyundaki uyarımı ve λ_{em} dalgaboyunda yaydığı floresans'ın dedeksiyonunu esas alır.

Floresans vermeyen birincil aminler, dansil klorür (DNS-Cl), dansil hidrazin, floresamin, o-fitaldehit (OPA) ile floresans dedeksiyonuna uygun hale getirilebilir.

3.1.4.1.3. Evaporatif ışık saçılım dedektörü (ELSD)

ELSD, mobil fazdan daha az uçucu özelliğe sahip bileşiklerin analizinde kullanılan bir yöntemdir. Bu dedektörde hedef bileşenler bir nebulizör aracılığı ile spray haline dönüştürülür ve ısıtıcı yardımı ile mobil faz buharlaştırılarak geriye kalan

maddelerin dedeksiyonu gerçekleştirilir. Bu yöntemin çalışma prensibi şeması Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. YPSK-ELSD sistemi çalışma prensibi [112]

4. MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada, MSG'nin Türkiye'de satışta bulunan 23 adet farklı firmalardan temin edilen çeşitli aromalara sahip patates cipsi ve mısır cipsleri, farklı firmalara ve farklı aromalara sahip 15 adet hazır çorba örneği, 6 adet tavuk bulyon ve 5 adet et bulyon, 1 adet pizza baharatı, 1 adet köfte harcı, 1 adet sebzeli baharat çeşni, Eskişehir'de 6 farklı çiğ köfte üreticisinden temin edilen numuneler ile birlikte çalışmayı zenginleştirmek amacıyla, Asya ve Güney Amerika bölgelerinden temin edilen 3 adet cips ile toplam 61 numune incelenmiştir. MSG tayini YPSK cihazı aracılığı ile gerçekleştirilmiş olup TKG' ya göre MSG miktarlarının uygunlukları değerlendirilmiştir.

4.1. MSG Analizinde Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Analizlerde kullanılan kimyasal malzemelerin markaları ve analitik saflık dereceleri ile birlikte Tablo 4.1.'de gösterilmiştir. Kullanılan tüm malzemelerin analitik saflık derecesinde olmalarına dikkat edilmiştir.

Tablo 4.1. *Çalışmalarda kullanılan kimyasal malzemeler listesi*

Kullanılan Kimyasal Malzeme Adı	Marka	Saflık derecesi
Ortafitaldialdehit katı (OPA)	Sigma – Aldrich (Almanya)	Amino asitlerin YPSK ile florimetrik tayinleri için uygun ≥%99,0 saflık
OPA RTU (Kullanıma hazır)	Sigma – Aldrich (Almanya)	Analitik saflıkta
2-Mercaptoetanol	Sigma – Aldrich (Almanya)	≥%99,0
3-Mercaptopropionik asit	Sigma – Aldrich (Almanya)	≥%99
Dansil Klörür (DNS-Cl)	Sigma – Aldrich (Almanya)	Floresans için uygun BioReagent, ≥%99,0 (YPSK)
Metanol	Sigma – Aldrich (Almanya) ve Carlo Erba (Fransa)	YPSK Saflık, ≥%99,9
Asetonitril	Sigma – Aldrich (Almanya) ve Carlo Erba (Fransa)	YPSK Saflık, ≥%99,9
Aseton	Sigma – Aldrich (Almanya)	Saflık, ≥%99,9
Sodyum klorür	Sigma – Aldrich (Almanya)	%80 (RT)
Sodyum karbonat	Sigma – Aldrich (Almanya)	%99,5-100,5
Kloroform	Sigma – Aldrich (Almanya)	YPSK Saflık, ≥%99,9
İzoproril Alkol	Carlo Erba (Fransa)	YPSK Saflık, ≥%99,0
Toluen	Sigma – Aldrich (Almanya)	YPSK Saflık, ≥%99,9
N, N – Dimetilformamid (DMF)	Sigma – Aldrich (Almanya)	YPSK Saflık, ≥%99,9
Etilenglikol dimetakrilad	Sigma – Aldrich (Almanya)	YPSK Saflık, ≥%99,9
Azobisisobutironitril (AIBN)	Sigma – Aldrich (Almanya)	YPSK Saflık, ≥%99,9
Sodyum fosfat dibasic	Sigma – Aldrich (Almanya)	Analitik saflık %98-100,5
Asetik asit	Sigma – Aldrich (Almanya)	Analitik saflıkta %99,8-100,5
Etanol CHROMASOLV [®] ,	Sigma – Aldrich (Almanya)	YPSK Saflık, ≥%99,8
Sodyum bikarbonat	Sigma – Aldrich (Almanya)	YPSK Saflık, ≥%99,0
Sodyum karbonat	Sigma – Aldrich (Almanya)	Analitik saflıkta %99,5-100,5
Sülfürik asit	Sigma – Aldrich (Almanya)	Analitik saflık %95-97
Dietil eter	Sigma – Aldrich (Almanya)	Analitik saflık %BP, ≥99,5

Tablo 4.1 devamı. Çalışmalarda kullanılan kimyasal malzemeler listesi

Kullanılan Kimyasal Malzeme Adı	Marka	Saflık derecesi
Sodyum hidroksit	Sigma – Aldrich (Almanya)	Analitik saflık %98-100,5, pellet
Water CHROMASOLV®	Sigma – Aldrich (Almanya)	YPSK Saflık, ≥%99,9
Hidroklorik asit	Sigma – Aldrich (Almanya)	≥%37, APHA: ≤10
L-Glutamik asit	Sigma – Aldrich (Almanya)	Farmasötik ikincil standart; USP ve PhEur
Monosodyum glutamat	Sigma – Aldrich (Almanya)	United States Pharmacopeia (USP) Referans Standardı
Whatman® membran filtreler 0,2µm		-
Acetone CHROMASOLV®	Sigma – Aldrich (Almanya)	YPSK Saflık, ≥%99,8
Sodyum klorür	Sigma – Aldrich (Almanya)	≥%99,5
Sodyum fosfat phosphate monobasic dihidrat	Sigma – Aldrich (Almanya)	Analitik saflık %98-100,5
Sodyum di hidrojen fosfat ekstra saf	Sigma – Aldrich (Almanya)	Analitik saflık %98-100,5
FA	Sigma – Aldrich (Almanya)	Analitik saflık %98,0-100
CHROMAFIL kullan at membran filtreler 0,22 µm, 25 mm	MN	Selüloz asetat porlu
L-Glutamik asit monosodyum tuzu monohidrat	Sigma – Aldrich (Almanya)	≥%98,0 (NT)

4.2. MSG Analizinde Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada, MSG tayini için kullanılan cihazlar marka ve modelleri ile Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2. Çalışmalarda kullanılan cihazların marka ve modelleri

Cihaz Adı	Marka/ Model
Yüksek basınçlı sıvı kromatografi cihazı	Marka: Shimadzu (Japonya) Model: Nexera – i (LC – 2040C 3D) (Japonya) Liquid Chromatograph
UV / Foto Diyod Dizisi Dedektörü	Marka: Shimadzu (Japonya) Model: Nexera – i (LC – 2040C 3D) (Japonya)
Floresans dedektör	RF-20A xs Prominence Fluorescence Dedector
Evaporatif Işık Saçılım Dedektörü (ELSD)	Marka: Shimadzu (Japonya) Model: ELSD LT – II Low Temperature Evaporate Ligth Scattering Dedector
Hassas terazi	Model: Ohaus PA214C
pH Metre	Model: Ohaus Starter 3100
Su banyosu	Model: Lab companion BW – 20 H
Vortex cihazı	Model: HEIDOLPH
Mobil faz süzme düzeneği	Marka: BFC Model: BF – S2500 vakum cihazına ile bütünleşik mobil faz süzme düzenek sistemi
Şırınga ve uçları	Part No: SN02522 - P

4.3. Yöntemler

Gıdalarda bulunan MSG miktar tayini için 3 farklı yöntem geliştirilmiştir. MSG tayinleri sırasıyla, YPSK -UV/DAD, YPSK-FLD ve YPSK-ELSD ile gerçekleştirilmiştir. DAD ve FLD ile yapılan çalışmada kolon öncesi türevlendirme (pre – column derivatization) işlemi uygulanmış olup, ELSD aracılığı ile yapılan analizlerde türevlendirmeye gerek kalmaksızın analizleri gerçekleştirilmiştir. Bulunan MSG

miktarlarının TKG değerlerine uygunluğunun incelenmesinin yanı sıra geliştirilen 3 yöntemin birbirlerine olan avantaj ve dezavantajları ele alınmıştır.

MSG tayini ilk olarak YPSK-UV/DAD aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. 200 – 800 nm aralığındaki ışınların absorblanabilmesi için hedef maddenin kromofor grup içermesi gerekmektedir. Bu grup veya gruplar L-GLU ve L-GLU'nun Na⁺ tuzu olan MSG içerisinde bulunmadığından dolayı OPA ile kolon öncesi türevlendirme (pre – column derivatizasyon) işlemi yapılarak kromofor grup oluşması hedeflenmiştir. Birçok dalga boyundaki analizleri karşılaştırılarak incelenmiş olup en iyi rezolüsyonun ve pik keskinliğinin 336 nm dalga boyunda olduğu raporlanmıştır [99, 100].

On line türevlendirme işlemlerinden olan kolon öncesi türevlendirme yöntemi (pre – kolon) seçilmiştir. Bu işlemi uygularken yöntemin hızlı gerçekleşmesine, oluşabilecek olası girişimlerden kaçınmak amacıyla tek ürün oluşmasına, iyi bir ayırım ile kromatogramların oluşması için ilgili optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.3.1. YPSK-UV/DAD ile MSG tayini

4.3.1.1. Standart çözeltilerin ve türevlendirme ajanının hazırlanması

Monosodyum glutamat standart stok çözeltisi hazırlamak için tam olarak 0,0100 g tartım alındı ve 10 mL YPSK saflıkta olan su içerisinde çözüldü. Böylece 10 mg/10 mL olacak şekilde 1000 ppm stok çözelti hazırlanmış oldu. İlgili seyreltmelerin hepsi YPSK saflıkta olan su ile gerçekleştirildi. Hazırlanan çözeltiler kullanıldıktan sonra buzdolabında +4 °C'de saklanmıştır. Çözeltiler her hafta taze olarak hazırlanmış ve ilgili seyreltmeler YPSK saflıktaki su ile yapılmıştır [63,66].

OPA/βME türevlendirme ajanını hazırlamak için o-fitaldialdehit (OPA) katısından 27 mg tartım alınarak üzerine YPSK saflıkta olan 1 mL MeOH ilavesi yapılarak vorteks cihazında 15 sn boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra, üzerine 5 µL merkaptotanol çözeltisi dikkatli bir şekilde ilave edilmiştir. Sonra, üzerine 9 mL sodyum tetraborat tamponu (0,1 M sodyum tetraborat pH 9,3) çözeltisi eklenerek OPA/βME türevlendirme çözeltisi hazırlanmıştır [101]. Daha sonra kullanıma hazır olan (ready to use) OPA/βME türevlendirme çözeltisi ile türevlendirme işlemi gerçekleştirilerek analizler yapılmış ve sonuçlarda bir değişiklik gözlemlenmediği için türevlendirme ajanının her analizde

baştan hazırlanması yerine OPA/βME/RTU (Sigma – Aldrich) türevlendirme çözeltisi türevlendirme ajanı olarak kullanılmıştır [100].

4.3.1.2. Mobil fazın hazırlanması

Analiz boyunca hareketli faz için izokrotik sistem tercih edilmiş olup hareketli faz için MeOH fosfat tamponu 10 mM PBS (pH 5.9):MeOH (75:25, *h/h*) YPSK saflıkta sudan oluşmaktadır. %99,9 saflıkta bulunan NaH₂PO₄ 'ten 1,998 g tartım 1000 mL 'ye tamamlanmıştır. Daha sonra, %99,9'luk Na₂HPO₄ katısından 0.14196 g tartım 100 mL 'ye tamamlanarak ve iki çözelti de çözünmüş gazların uzaklaştırılması amacıyla 10 dakika boyunca ultrasonik banyoda bekletilmiştir. NaH₂PO₄ çözeltisinden %92 ve Na₂HPO₄ çözeltisinden %8 olacak şekilde iki çözelti karıştırılarak tampon çözelti hazırlandıktan sonra 0.1 M Hidroklorik asit (HCl) ile ilgili ayarlamalar yapılarak pH:5,9 olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan tampon çözelti 0.22 µm gözenek boyutlu PVDF selüloz membran filtreden vakum altında, mobil faz süzme düzeneği yardımı ile süzülerek olası kirlilik ve partiküllerden arındırılmıştır. Yukarıda belirtilen çözücülerin istenen oranlarda karıştırılarak sisteme verilmesi YPSK cihazının otomatik pompa ünitesi yardımıyla gerçekleştirilmiştir [42, 100].

4.3.1.3. Numunelerin hazırlanması

Her bir numune bir öğütücü aracılığı ile homojenize toz haline getirildikten sonra hassas bir şekilde 1'er gram tartım alınmıştır. Numunelerin üzerine 0.1 N HCl içeren çözeltiden 100 mL ilave edilerek ve çalkalanmıştır. Daha sonra hazırlanan çözeltiden 50 mL alınarak üzerine 50 mL dietil eter ilavesi yapılarak ve iyice karıştırıldıktan sonra dietil eter uzaklaştırıldı. Böylece yağ asitlerinin uzaklaştırılması için ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiş oldu. Hazırlanan her bir numuneden şırınga filtre yardımı ile 5 mL çekilerek 0,22 µm'luk PVDF membran filtreden süzüldü ve vial'e aktarıldı. Çözeltilerin içerisinde bulunan MSG'nin türevlendirilmesi için standart çözeltilere uygulanan işleminin aynısı numunelere de uygulanmıştır [64, 102].

4.3.2. YPSK-UV/DAD ile MSG tayin yöntemi geliştirilmesi

UV/DAD ile yapılan analizde 200 – 800 nm aralığında 0,1 nm duyarlılıkta spektrum taraması yapılmış olup, 336 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramlar incelenmiştir.

YPSK analizleri için 10 mM PBS (pH 5.9):MeOH (75:25, *h/h*) bileşiminde hazırlanan hareketli faz kolona 0.6 mL/dk akış hızında verilmiştir. Analizler EtOH:PBS sistemi ile de tayini yapılan çalışmalar mevcut olmasına rağmen yapılan analizlerde YPSK'da sistem geri basıncını arttırdığı gözlemlendiğinden dolayı MeOH tercih edilmiştir [100]. Analize başlamadan önce, 10 mM PBS (pH 5.9):MeOH (75:25, *h/h*) sisteme verilirken, oto örnekleyici sistemindeki analizler arası geçişler sırasında kolonda bulunan safsızlıkların ve olası kirliliklerin uzaklaşması için analizler arası 10 dakika akışta bırakıldıktan sonra yeni enjeksiyon işlemi başlamıştır. 20 µL enjeksiyon hacminde sisteme verilen analitler için kolon sıcaklığı 30 °C olarak belirlenmiştir. Analiz boyunca ilgili oranlar sabit tutulmuştur. Bu yöntemle gerçekleştirilen analizlerde sabit faz olarak Restek firmasından temin edilen Raptor™ C₁₈ (2.7 µm, 150×4.6 mm) kolon (Seri no: 16041187S) kullanılmıştır. Tablo 4.3.'de ters faz kromatografide kullanılan bazı reaktiflerin spesifikasyonları verilmiştir. UV gözlenebilme değeri çalışılan dalga boyundan büyük olan çözücüler, yüksek zemin absorbansına yani gürültüye neden olmasından dolayı, mobil faz seçiminde Tablo 4.3.'te gösterilen spesifikasyonlar dikkate alınmıştır.

Tablo 4.3. *Ters faz kromatografide kullanılan bazı reaktiflerin spesifikasyonları* [103,104].

Hareketli faz	Molekül Ağırlığı	Kaynama noktası °C	RI	UV (nm)	Viskozite
Metanol	32	65	1,326	205	0,584
Etanol	46	78	1,359	205	1,19
Asetonitril	41	82	1,341	195	0,358

Yapılan analizler sonucu elde edilen kromatogramlar kullanılarak her bir konsantrasyon için elde edilen alanlar analit yanıtı olarak kabul edilmiştir. Yöntemde, iç standart kullanmaya gerek duyulmamış olup her bir konsantrasyona karşılık gelen alan değerlerinden yararlanılarak yöntem geçerliliği uygulamalarındaki hesaplamalar gerçekleştirilmiştir. Buna ek olarak, yine kromatogramlardan elde edilen pik alanları gıda ürünlerinde MSG miktarının belirlenmesi için kullanılmıştır.

4.3.2.1. Sistem uygunluk testleri

Analizler sırasında kullanılan YPSK cihazının ve analiz kolonlarının performansını gösteren sistem uygunluk parametrelerinin (SUT) hesaplanması yöntem geliştirme

basamağında oldukça önemli bir yere sahiptir. Ayırım gücü (R_s), kuyruklanma (T) ve asimetri faktörü (A_s), teorik tabaka sayısı (N), kapasite faktörü (k) ve seçicilik faktörü (α) gibi parametreler sistem uygunluk parametrelerini hesaplamaları yapılmıştır. Yöntem geliştirme sırasında bu parametrelerin her biri ve yüzde bağıl standart sapmaları (%BSS) tüm MSG standart maddeleri için Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi (USP) metoduna göre Shimadzu LabSolution LC solution veri analiz programı ve Microsoft Excel kullanılarak hesaplanmıştır [105]. Hesaplamalarda kullanılan formüller Tablo 4.4.'de verilmiştir.

Tablo 4.4. Sistem uygunluk testleri için kullanılan parametreler ve formülleri

Parametre	Eşitlik
	T : kuyruklama faktörü
Kuyruklama faktörü	$T = \frac{W_{0.05}}{2 * \alpha_{0.05}}$ $W_{0.05}$: pikin %5 yüksekliğindeki pik genişliği $\alpha_{0.05}$: pikin %5 yüksekliğindeki ilk yarısının pik genişliği R_s: ayırım gücü
Ayırım gücü	$R = 2 * \frac{t_R - t_{Rp}}{W + W_p}$ t_R : alıkonma zamanı t_{Rp} : önceki pikin alıkonma zamanı W: pik genişliği W_p : önceki pikin pik genişliği

Tablo 4.4 devamı. Sistem uygunluk testleri için kullanılan parametreler ve formülleri

		α : bağıl alıkonma zamanı
		k'_1 : birinci pikin kapasite faktörü
		k'_2 : ikinci pikin kapasite faktörü
Bağıl alıkonma zamanı	$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0}$	t_1 : birinci pikin alıkonma zamanı
		t_2 : ikinci pikin alıkonma zamanı
		t_0 : ölü zaman
		t_R = alıkonma zamanı
Teorik Tabaka Sayısı	$N = 16(t_R / W)^2$	W= ppik taban genişliği
		A_s = asimetri faktörü
Asimetri Faktörü	$A_s = B / A$	A ve B= Pik yüksekliğinin %10'una göre orta noktaya olan uzaklıkları
		BSS: Bağıl standart sapma
Elde edilen pik alanını tekrar edilebilirliği	$\%BSS = SS/X_{ort} \times 100$	SS: standart sapma
		X_{ort} =yapılan analiz ortalaması

4.3.2.2. Yöntem geçerliliğinin tespiti (Validasyon)

Uluslararası Harmonizasyon Konferansı'nın (ICH) önerdiği şekilde validasyon işlemleri geliştirilen her YPSK yöntemi için uygulanmıştır. Kullanılan yöntemin analitik bakımdan kabul edilebilir veriler sağladığı raporlanmıştır. Yöntemin validasyonu için ICH kılavuzunda da belirtildiği şekilde, doğruluk kesinlik, doğruluk, doğrusalılık, tayin alt sınırı, saptama sınırı ve sistem uygunluk testleri yapılmıştır [106].

4.3.2.3. Doğruluk

Analizler sonucunda elde edilen verilerin doğru veya gerçek değere yakınlığının ölçüsü doğruluk olarak tanımlanmaktadır. Doğruluk, herhangi bir sistematik hatayı veya tayinde geliştirilen yöntem ile elde edilen verilerin doğru değerden sapması hakkında

bilgi verir. MSG standartlarına ve diğer matriks ortamlarına sahip numunelerden 3'er set hazırlanmış olup standart ekleme (spike) yöntemi ile geri kazanım çalışmaları yapılmıştır.

$$\% \text{ geri kazanım} = \text{hesaplanan miktar} / \text{eklenen miktar} \times 100 \quad (4.1)$$

4.3.2.4. Kesinlik

Tayin için geliştirilen YPSK yönteminin gerçek çalışma koşullarındaki tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür. Geliştirilen yöntem ile elde edilen sonuçların arasındaki yakınlığın ölçüsü olarak da tanımlanır. MSG için gün içi ve günler arası, ortalama derişim (mg/L), SS, %BSS, güven aralığı ($\alpha = 0.05$) değerleri hesaplanarak yöntemin kesinliği belirlenmiştir.

4.3.2.5. Seçicilik

Kromatografik yöntemin seçiciliği analizi yapılacak maddeyle girişim yapabilecek başka bileşenlerin yanında analiz edilmek istenen maddenin ölçülebilme kabiliyetidir. MSG tayini için referans olarak gösterilen değerin ($\alpha > 1$) olduğu SUT testi ile incelenmiştir.

4.3.2.6. Teşhis sınırı

Analizi yapılan örneğin kromatogramdaki pikinin ve yerinin belirlediği yerin ama miktar tayini sınırları içerisine girmeyen en alt derişimdir. Bu yöntemde MSG'nin teşhis sınırı belirlenmesi için hesaplanan standart sapma değerinin kalibrasyon doğrusundan elde edilen eğime oranının 3 katı alınarak hesaplanmıştır.

$$\text{Tayin Sınırı} = 3 \times \sigma / m \quad (4.2)$$

4.3.2.7. Tayin alt sınırı

Kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının belirlenebileceği doğrusallık aralığı dışında olan veya aralığın en alt sınırını oluşturan derişim düzeyidir. Bu yöntemde MSG'nin tayin alt sınırı belirlenmesi için hesaplanan standart sapma değerinin kalibrasyon doğrusundan elde edilen eğime oranının 10 katı alınarak hesaplanmıştır.

$$\text{Tayin Alt Sınırı} = 10 \times \sigma / m \quad (4.3)$$

4.3.2.8. Doğrusallık

Derişime karşı analit sinyalinin geliştirilen yöntemde doğru olarak değişmesi ve çizilen grafikte cevabın korelasyonunun 1'e yakınlığı hesaplanmıştır. 5'er set halinde sisteme verilen standart MSG çözeltileri ile sistemlerin doğrusallığı incelenmiştir.

4.3.2.9. Aralık

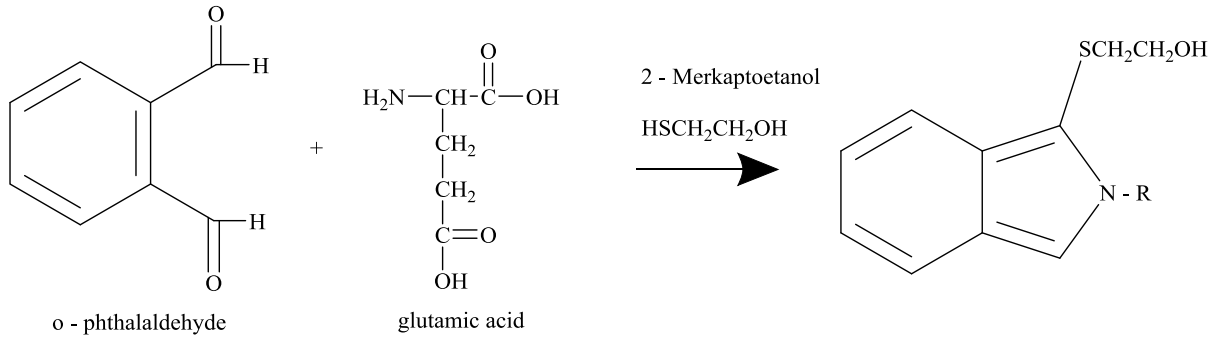
Yöntemin çalışma aralığının belirlenmesinde, analizlerde elde edilecek sinyal büyüklükleri ve onlara karşılık gelen derişimler ve gürültü etkileri göz önüne alınmıştır.

4.3.2.10. Sağlamlık

MSG tayini için geliştirilen kromatografik yöntemde, analiz parametrelerindeki ufak değişimlerden etkilenmeden kalabilme kapasitesi değerlendirilmiştir. Bunun için pH, sıcaklık ve organik çözücünün yüzde değerleri değiştirilerek incelemeleri yapılmıştır.

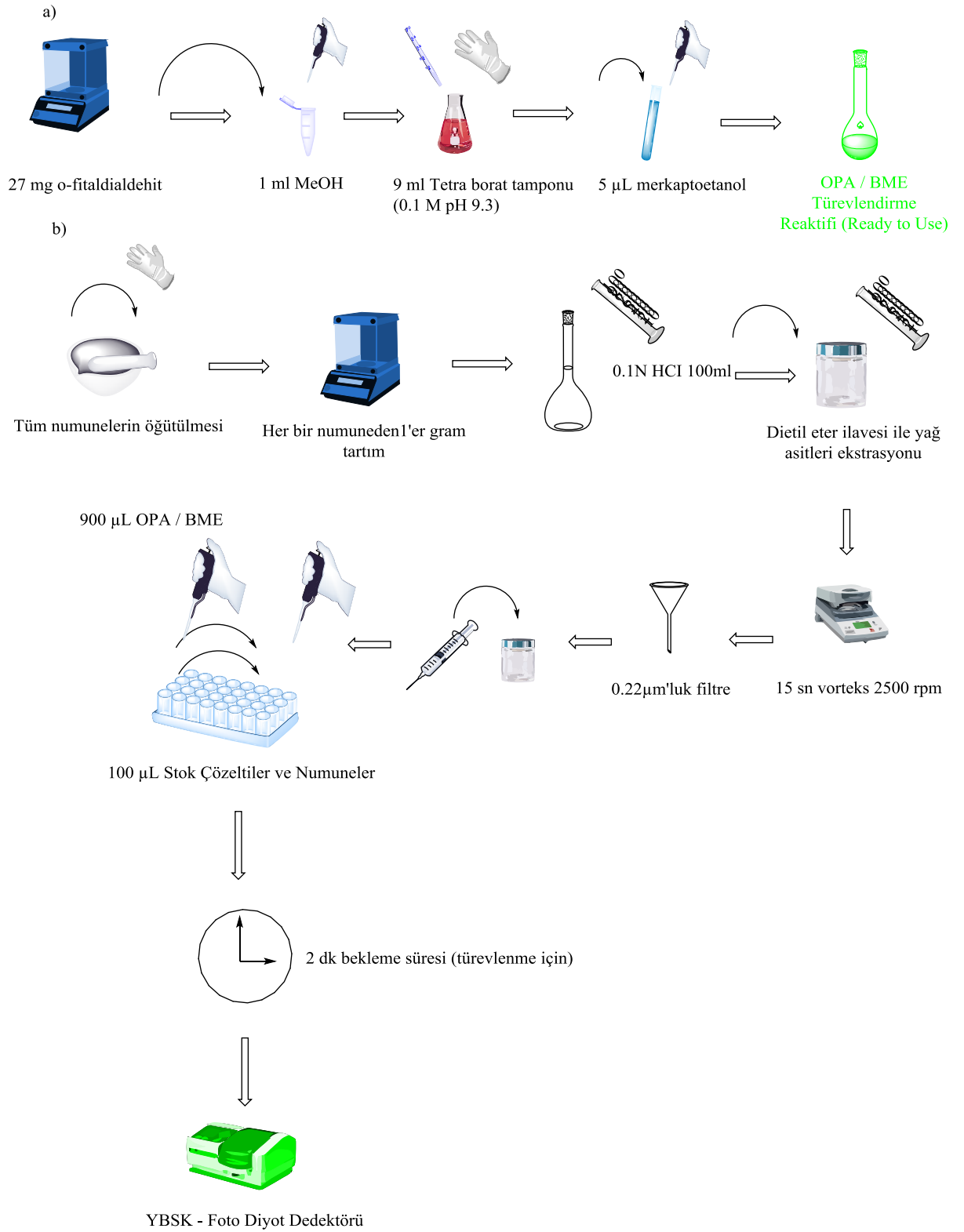
4.3.3. YPSK-UV/DAD ile MSG tayini için kolon öncesi (pre – kolon) türevlendirilme işlemi basamakları

L-glutamik asidin Na⁺ tuzu olan MSG'nin YPSK-DAD ile tayinini gerçekleştirmek için kolon öncesi türevlendirme işlemi, OPA reaktifi ile gerçekleştirildi [63]. Hazırlanan standart MSG çözeltilerden 100 µL alındıktan sonra üzerlerinde 900 µL OPA/βME/RTU türevlendirme ajanı ilave edildi. Vorkteks cihazında 30 sn karıştırıldıktan sonra 5 dakika beklendi ve türevlendirme işlemi tamamlanmıştır. L-GLU ile OPA reaktifi arasında gerçekleşen reaksiyon Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. *L-Glutamik asit ile OPA/βME/RTU reaksiyonu*

Şekil 4.1.'de gösterilen reaksiyon sonucunda oluşan bileşik, YPSK-UV/DAD aracılığı ile tayin edilebilir hale getirilmiştir. OPA/βME/RTU türevlendirme ajanı hazırlanması ve MSG tayini yapılacak numunelerin analiz öncesinde gerçekleştirilen işlem basamakları sırasıyla, Şekil 4.2.a. ve Şekil 4.2.b.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. a) OPA/BME Reaktifi hazırlanması, b) Numune hazırlanması, türevlendirilmesi ve enjeksiyonu

4.3.4. YPSK-FLD ile MSG tayini

4.3.4.1. Standart çözeltilerin hazırlanması

MSG'nin stok çözeltisi %2 sodyum bikarbonat (NaHCO_3) çözeltisi içerisinde hazırlandı. Merck (Almanya) firmasından temin edilen NaHCO_3 katısından hassas bir şekilde 20 g tartım alınarak 1 litre YPSK saflıktaki su içerisinde çözüldü ve pH değeri 9 olarak ölçüldü [107, 108]. Bu çözelti çalkalandıktan sonra sonikatör cihazında 10 dakika bekletilerek hazırlandı. Monosodyum glutamat referans standart katısından 0,0500 g tartım alınarak 10 mL %2'lik NaHCO_3 çözeltisi içerisinde çözüldü (5000 ppm) ve ilgili seyreltmeler yine aynı çözelti içinde yapılarak 10 ppb ile 1000 ppm arasında 10 adet standart çözelti hazırlanmıştır.

4.3.4.2. Mobil fazın hazırlanması

UV/DAD ile yapılan analizden farklı olarak tampon çözelti içeren mobil faza gerek duyulmamıştır. Mobil faz YPSK saflıkta olan Carlo Erba (Fransa) tarafından temin edilen 540 mL su ile 450 mL MeOH Merck (Almanya) ve Sigma Aldrich (Almanya) 10 mL glasiyel asetik asit (GAA) karıştırılmıştır. Çözelti içerisinde oluşabilecek ve analizde istenmeyen sonuçlara yok açabilecek kirliliklerden kurtulmak için vakum altında 0,22 μm 'luk PVDF membran filtreden geçirildikten sonra 15 dakika boyunca sonikatör cihazında bekletilmiştir. Böylece mobil faz Su: MeOH:GAA (54:45:1, h/h/h) oranlarına sahip olacak şekilde hazırlanmıştır [74, 107].

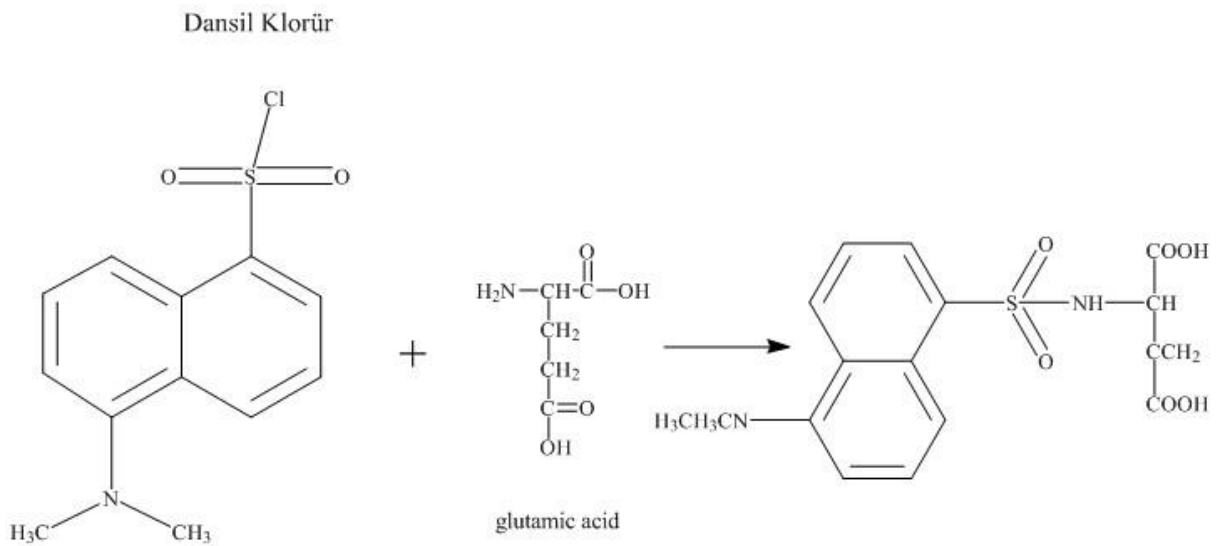
4.3.4.3. Numunelerin hazırlanması

Analizi yapılan tüm numuneler %2'lik NaHCO_3 çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Her bir numune öncelikle bir öğütücü yardımıyla homojenize hale getirildikten sonra hassas bir şekilde 1 g tartım alınarak 100 mL %2'lik NaHCO_3 çözeltisi içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Karıştırma işleminden sonra her bir numune 0,22 μm 'luk PVDF membran filtreden süzölmüştür. Stok çözeltilerde uygulanan türevlendirme işlemi aynı şekilde incelenen tüm numunelere uygulanarak YPSK-FLD sistemine enjekte edilmiştir.

4.3.4.4. Türevlendirme ajanının hazırlanması ve kolon – öncesi (pre – kolon) MSG türevlendirme işlemi

FLD ile MSG tayini için DNS-Cl türevlendirme ajanı hazırlanmıştır. Hassas bir şekilde 20 mg DNS-Cl katısından tartım alındıktan sonra %99 saflıkta bulunan asetondan (ACT) 10 mL ilave edilmiştir. Karışım 30 sn boyunca 2500 rpm devirde vorteks cihazında karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti ışığa karşı hassasiyet gösterdiğinden alüminyum folyo içerisinde muhafaza edilmiştir ve her kullanımdan sonra +4 °C’de saklanmıştır. Bu çözelti aynı şekilde her hafta taze olarak hazırlanmıştır [109].

Kolon öncesi türevlendirme işlemi için hazırlanan stok çözeltilerin her birinden mikro pipet aracılığıyla 200 µL vialle alınarak üzerine 200 µL ACT içerisinde hazırlanmış olan DNS-Cl türevlendirme ajanı ilave edilmiştir. Daha sonra her biri alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Önceden sıcaklığı 95 °C’ye getirilmiş olan su banyosu içerisinde, hazırlanan vialler, beherler yardımıyla içerisine yerleştirilmiştir. 75 dakika boyunca 95 °C’de önceden hazırlanmış olan su banyosunda bekletilen sonra vialler alınarak oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Daha sonra üzerine 50 µL MeOH ve 50 µL GAA ilavesi yapılarak dansilleme işlemi tamamlanmıştır. Bu işlem ile gerçekleştirilen türevlendirme reaksiyonu Şekil 4.3.’de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. DNS-Cl ile MSG'nin türevlendirme reaksiyonu

DNS-Cl türevlendirme reaktifinin hazırlanması ve analiz öncesi MSG standartları ile birlikte tüm numunelere uygulanan işlem basamakları Şekil 4.4.a ve Şekil 4.4.b’de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. a) DNS-Cl türevlendirme ajanı hazırlanması, b) Numunelerin ve standart çözeltilerin hazırlık basamakları

4.3.5. YPSK-FLD ile analiz yöntemi

FLD ile yapılan analizde uyarı dalga boyu (Ex) 328 nm, emisyon (Em) dalga boyu ise 530 nm dalga boyu seçilmiştir. YPSK analizleri için Su:MeOH:GAA (54:45:1, *h/h/h*) bileşiminde hazırlanan hareketli faz kolona 0.5 mL/dk akış hızında verilmiştir. Analize başlamadan önce Su:MeOH:GAA (54:45:1, *h/h/h*) karışımı sisteme verilirken, oto örnekleyici sistemindeki analizler arası geçişler sırasında kolonda bulunan safsızlıkların ve olası kirliliklerin uzaklaşması için analizler arası YPSK sistemi 10 dk akışta bırakıldıktan sonra yeni enjeksiyon işlemi başlamıştır. 20 µL enjeksiyon hacminde sisteme verilen analitler için kolon sıcaklığı 30 °C olarak belirlenmiştir. Analiz boyunca ilgili oranlar sabit tutulmuştur. Analizlerde sabit faz olarak Restek firmasından temin edilen Raptor™ C₁₈ (2.7 µm, 150×4.6 mm) kolon kullanılmıştır. Sistem uygunluk testleri ve validasyon parametreleri YPSK-UV/DAD yönteminde yapılan testler ile aynıdır.

4.3.6. YPSK-ELSD ile MSG Tayini

4.3.6.1. Standart çözeltilerin hazırlanması

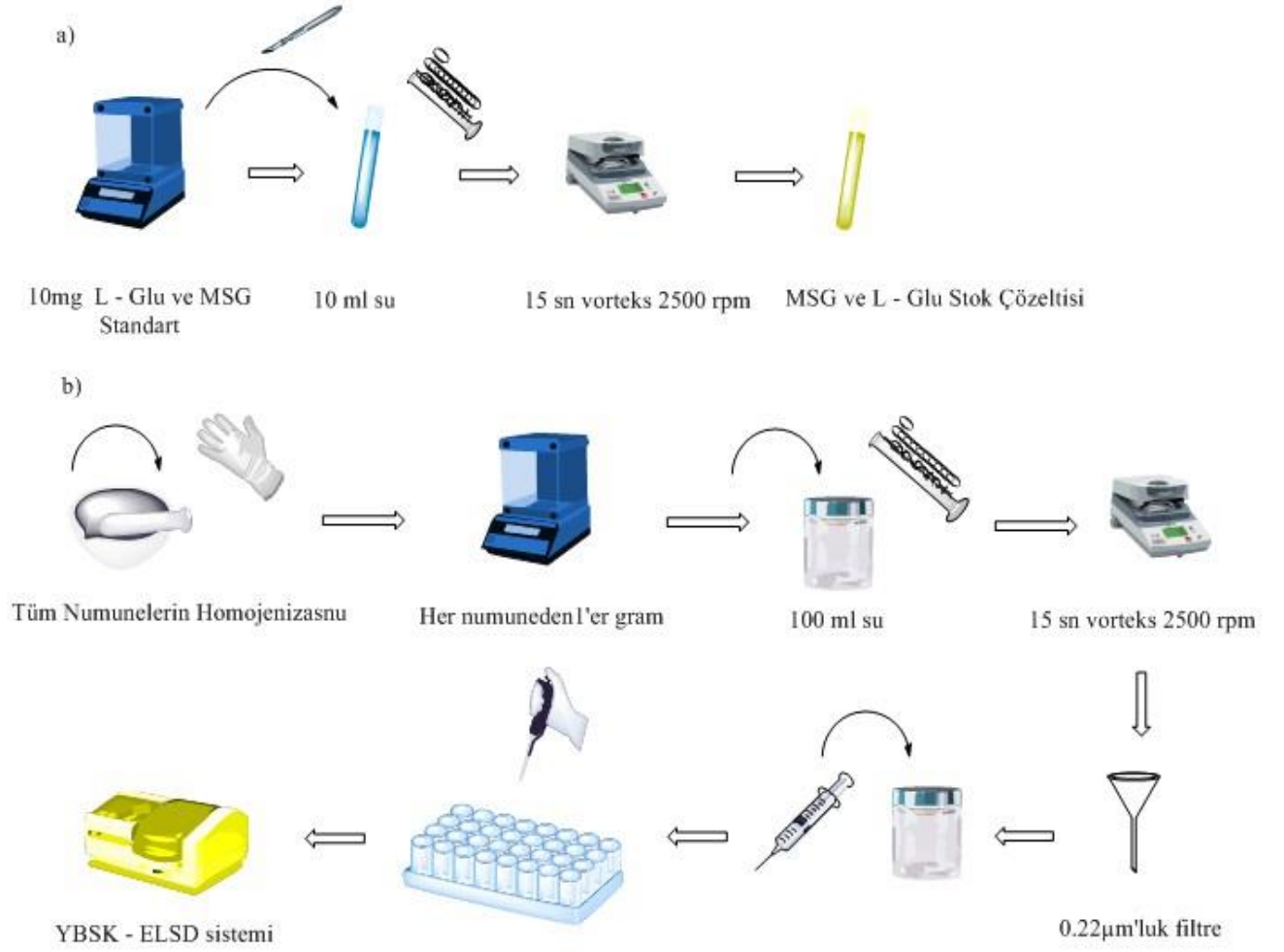
MSG'nin bu yöntem ile tayini için stok çözelti YPSK saflıktaki su içerisinde çözülerek hazırlandı. Hassas bir şekilde 0,0100 g tartım alınarak 10 mL YPSK saflıkta olan su içerisinde çözüldü (10 mg/10 mL) ve derişimi 1000 ppm olan stok çözelti hazırlandı. İlgili seyreltmelerin hepsi aynı saflıkta derecesine sahip su ile gerçekleştirildi. Hazırlanan çözeltiler kullanıldıktan sonra buzdolabında +4 °C'de saklanmıştır. Çözeltiler her hafta taze olarak hazırlanmış ve ilgili seyreltmeler YPSK saflıktaki su ile yapılmıştır.

4.3.6.2. Mobil fazın hazırlanması

ELSD ile yapılan bu tayin için tampon çözelti kullanılmaya ihtiyaç duyulmamıştır. Mobil faz, YPSK saflıkta olan Carlo Erba (Fransa) tarafından temin edilen 940 mL su ile 50 mL ACN Merck (Almanya) ile 10 mL FA karıştırılarak ACN:Su:FA (5:94:1, *h/h/h*) ile hazırlanmıştır. Çözelti içerisinde oluşabilecek ve analizde istenmeyen sonuçlara yok açabilecek kirliliklerden kurtulmak için vakum altında 0,22 µm'luk PVDF filtreden geçirildikten sonra 15 dk boyunca sonikatör cihazında bekletilerek mobil faz ACN:Su:FA (5:94:1, *h/h/h*) karışımı hazırlanmıştır. MeOH, ACN, EtOH ve tampon çözelti ile denemeler yapılarak en iyi sistem basıncının %5 ACN'ye sahip olan mobil fazda olduğu gözlemlenmiştir. Böylece mobil fazın su ve ACN ve FA karışımından kullanılmasına karar verilmiştir.

4.3.6.3. Numunelerin hazırlanması

Analizi yapılan tüm numuneler bir öğütücü yardımıyla homojenize haline getirilmiştir. Toz haline getirilen numunelerden tam olarak 1'er gram tartım alınarak 100 mL YPSK saflıkta olan su içerisinde aktarılmıştır. Karışım manyetik karıştırıcı yardımıyla 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra 10 mL 'lik bir kısmı bir behere aktarılmıştır. Di etil eter ile ekstraksiyon işlemine gerek duyulmamıştır. Ekstraksiyon yapılan numunelerde herhangi bir girişim yapan pik olmaması ve elde edilen başka piklerin hedef maddeye bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Karışım 5 mL 'lik şırınga filtre yardımı ile alındıktan sonra 0,22 µm 'luk PVDF filtreden süzülerek viale aktarılan kısım ELSD sistemine enjeksiyon için hazır hale getirilmiştir. Numunelerin hazırlanması ve YPSK-ELSD analiz basamakları Şekil 4.5.a ve Şekil 4.5.b 'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. a) ELSD için stok MSG ve L – Glu hazırlanması

b) Numunelerin ELSD ile analizi için hazırlık basamakları

4.3.7. YPSK-ELSD İle Analiz Yöntemi

YPSK-ELSD ile yapılan analizlerde Su:ACN:FA (94:5:1, $h:h:h$) bileşiminde hazırlanan hareketli faz kolona 0.4 mL/dk akış hızında verilmiştir. Analize başlamadan önce Su:ACN:FA (94:5:1, $h:h:h$) sisteme verilirken, oto örnekleyici sistemindeki analizler arası geçişler sırasında kolonda bulunan safsızlıkların ve olası kirliliklerin uzaklaşması için analizler arası YPSK sistemi 10 dakika akışta bırakıldıktan sonra yeni enjeksiyon işlemi başlamıştır. 10 µL enjeksiyon hacminde sisteme verilen analitler için kolon sıcaklığı 30 °C olarak belirlenmiştir. Analiz boyunca ilgili oranlar sabit tutulmuştur. Analizlerde sabit faz olarak Restek firmasından temin edilen Raptor TM C₁₈ (3 µm, 150×4.6 mm) kolon kullanılmıştır.

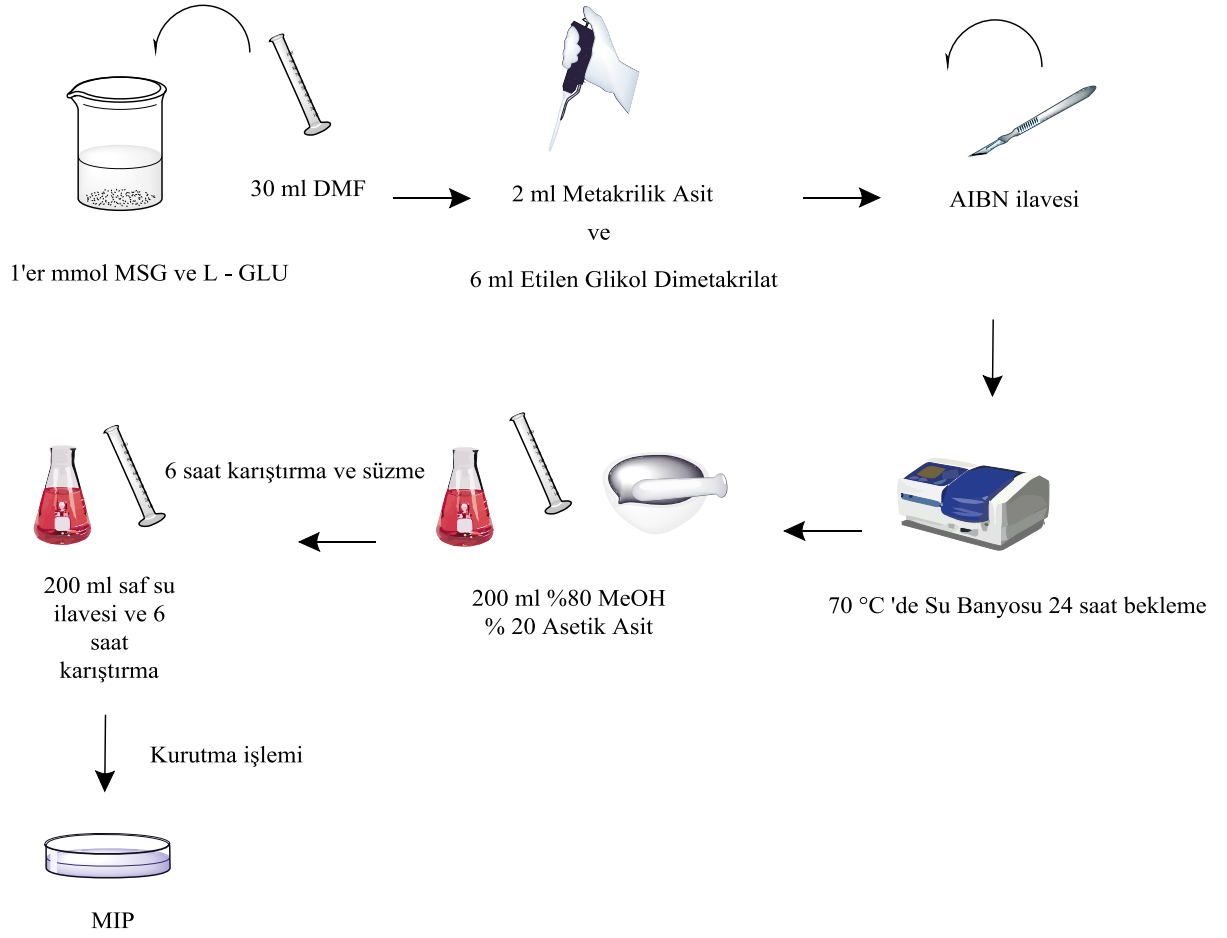
SUT ve validasyon parametreleri YPSK-UV/DAD VE YPSK-FLD yönteminde yapılan testler ile aynıdır.

4.4. MSG ve L-GLU için Seçici Moleküler Baskılanmış Polimerlerin (MIPs) Hazırlanması

MSG ve L-Glu'ya seçici Moleküler Baskılanmış Polimerlerin (MIP) partiküllerinin hazırlanmasında bulk (yığın) polimerizasyon tekniği kullanılmıştır. 30 mL N, N – Dimetilformamid (DMF) çözeltisi içerisinde 1 mmol MSG kalıp molekülleri, fonksiyonel monomer olarak kullanılan 0.1 mmol, 2 mL metakrilik asit ile birlikte 30 dakika boyunca etkileştirildi. Üzerlerine çapraz bağlayıcı olarak 2 mmol derişime sahip 6 mL etilenglikol dimetakrilat ile polimerizasyon başlatıcısı olarak azobisisobutironitril (AIBN) katısından 50 mg eklendi. Buna ek olarak, %80 toluen ile %20 ACN karşımı içeren çözelti içerisinde 1 mmol MSG aynı şekilde hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerin tamamı daha önceden 70 °C'ye ısıtılmış olan su banyosu içerisinde konuldu ve polimerizasyon işleminin gerçekleşmesi için 24 saat beklemeye bırakıldı.

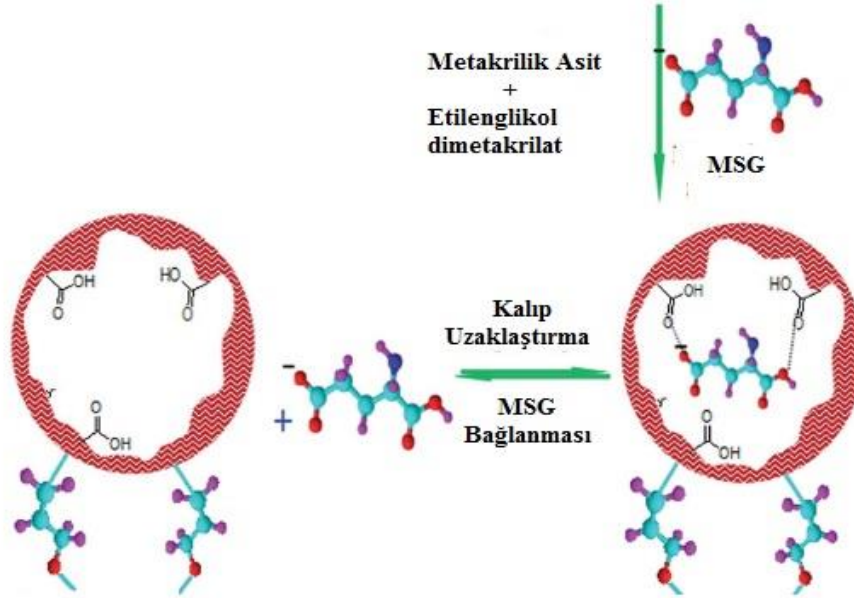
Polimerizasyon sonrası elde edilen monolitik MIP'lerin sıvı kısmı atıldıktan sonra geriye kalan kısım havanda olabildiğince toz haline getirilip kalıp moleküllerin (MSG) polimerik yapıdan uzaklaştırılma işlemi için aşağıda belirtilen prosedür uygulanmıştır [120].

Her bir polimerin üzerine %80 MeOH ve %20 asetik asit içeren çözeltiden 200 mL ilave edilip 50 °C'de 6 saat boyunca karıştırılmıştır. Sonra süzme işlemi yapılarak, üzerlerine 200 mL saf su ilave edildi ve 24 saatlik karıştırılma işleminden sonra sıvı kısım uzaklaştırıldı. Elde edilen MIP'ler 60 °C altında kurumaya bırakıldı ve toz halinde MIP elde edilmiş oldu. Yapılan işlem basamakları Şekil 4.6.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. MSG ve L-GLU'ya özgü MIP sentez basamakları

Hedeflenen kalıp uzaklaştırma işlemi ve MSG bağlanması şematik olarak olarak Şekil 4.7.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. MSG baskılanmış polimer sentezi [120].

4.4.1. MIP'ler kullanılarak L-Glutamik Asit ve Monosodyum glutamatın sulu çözeltilerden ekstraksiyonu

MIP'ler kullanılarak MSG'nin sulu çözeltilerden ekstraksiyonu beher içerisinde kesikli sistemde çalışılmıştır. Bu amaçla, 100 mg MIP bir vial içerisine alınarak üzerine 1000 µL 1000 ppm MSG ilave edilmiştir. Bu karışım oda sıcaklığında 5 saat boyunca karıştırılmış ve elde edilen süzöntü 0,22 µm'luk PVDF membran filtreden geçirildikten sonra YPSK – ELSD sistemi ile analiz edilmiştir. MIP'lere bağlanan MSG miktarının hesaplanmasında aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır.

$$Q = [(C_o - C) \times V] / m \quad (4.4)$$

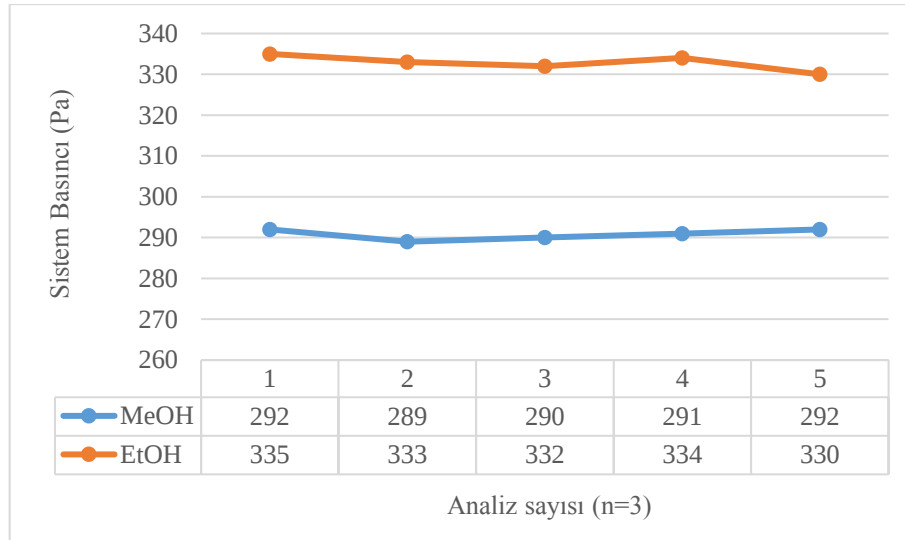
Eşitlik 4.4.'te Q, 1 g polimere bağlanan MSG miktarını (mg/g), C_o ve C sırası ile sulu çözeltideki MSG'nin başlangıç ve son derişim değerlerini (mg/L) ve V sulu çözelti hacmi (mL) ve m ise kullanılan polimerin kütlesini (g) vermektedir.

5. BULGULAR VE SONUÇLAR

5.1. YPSK-UV/DAD ile Gıdalarda Bulunan MSG Miktarları Tayini

YPSK-UV/DAD ile MSG tayin çalışmalarına yöntem geliştirme çalışmaları ile başlanmıştır. MSG tayinine özgün bir analiz yönteminin geliştirilebilmesi için sabit ve hareketli faz seçimi, analize uygun koşulların belirlenmesi ve yöntem geçerliliğinin incelenmesi basamaklarından sonra geliştirilen yöntemin, gerçek numunelere uygulanması aşaması da tamamlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda özgün değeri yüksek ve uygulamada kolaylıkla kullanılabilecek pratik tayinler gerçekleştirilmiştir.

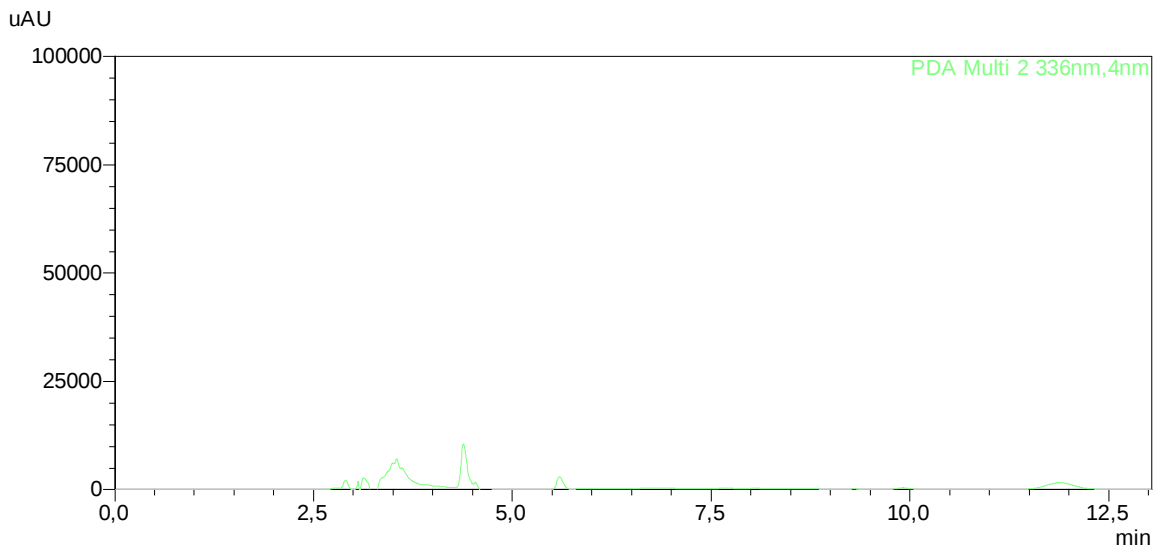
İlk aşamada, daha önce yapılan çalışmalar incelenerek ayırımı en iyi olan mobil faz karışımı belirlenmiştir. İncelenen mobil fazlar arasında EtOH:PBS Tampon pH 5.9 (25:75, *h/h*) ve MeOH:PBS Tampon pH 5.9 (25:75, *h/h*) bulunmaktadır. En iyi ayırımın 10 mM PBS (pH 5.9):MeOH (75:25, *h/h*) mobil fazında olduğunu gözlenmiştir. Her ne kadar bazı çalışmalar EtOH karışımlı mobil fazı tercih etmiş olsa da sistem geri basıncını arttırmamasından ve incelenen reaktiflerin spesifikasyonları göz önüne alındığında kullanılacak mobil fazda organik çözücü olarak MeOH seçilmiştir. Yapılan analizlerde oluşan basınç farklılıkları grafiği Şekil 5.1.'de gösterilmiştir.



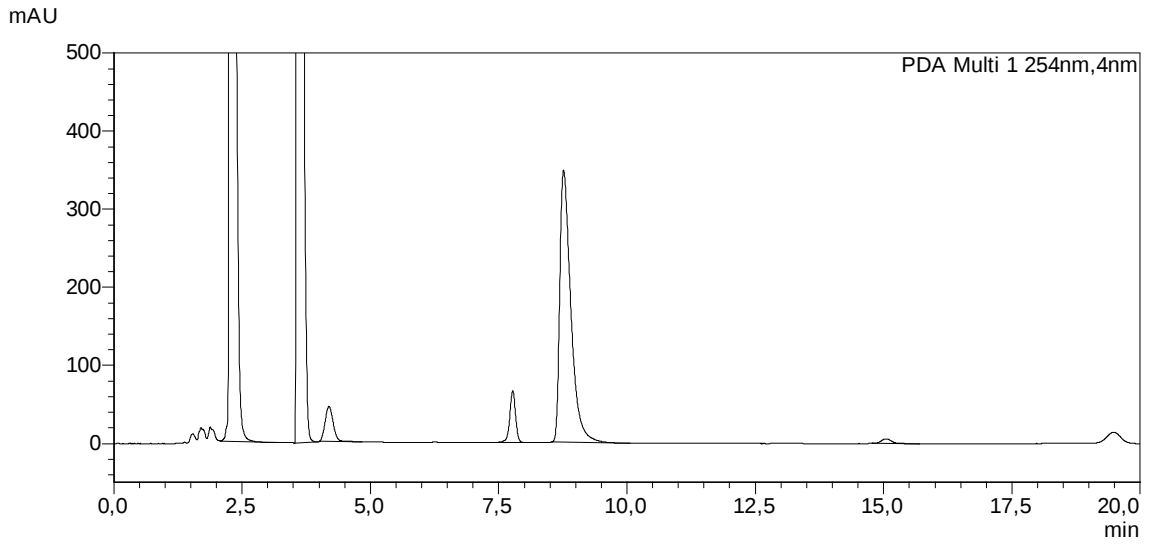
Şekil 5.1. MeOH ve EtOH ile PBS tampon çözelti karışımı ile oluşturulan mobil fazların YPSK sisteminde oluşturduğu ortalama basınç değerleri ($n=3$) (Restek RaptorTM C18 (2.7 μ m, 150 $\times$ 4.6 mm))

Yapılan çalışmalarda, MSG'nin türevlendirilmesi için OPA/ β ME/RTU türevlendirme ajanı tercih edilmiş olup, kromatogramlarda 200 – 800 nm dalga boyundaki taramalar sonucunda oluşan en iyi kromatogramlarının yapılan önceki çalışmalara uygun

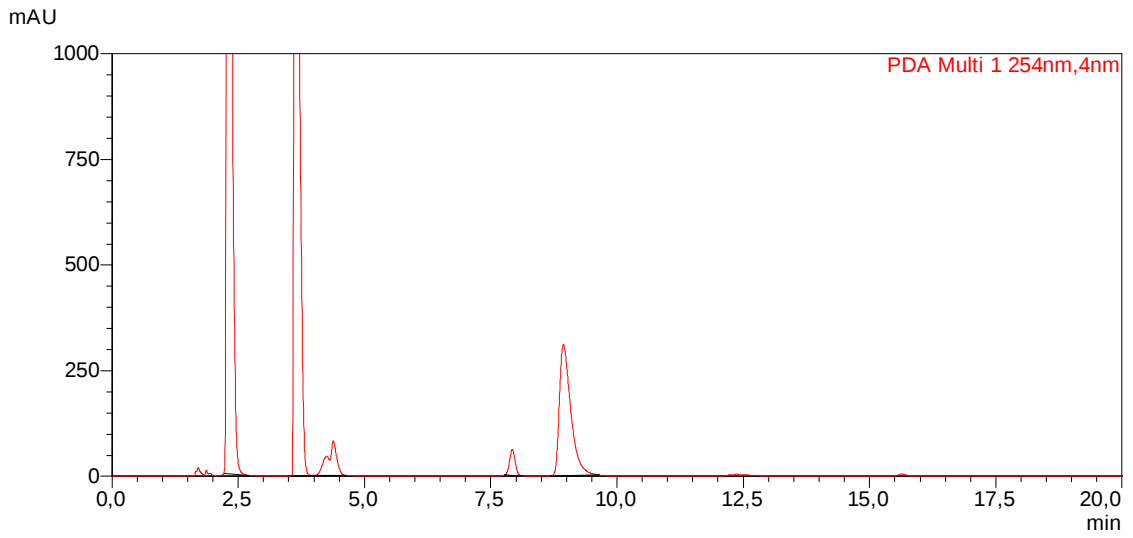
olarak 336 nm dalga boyunda en iyi pik morfolojisine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Raporlanan bazı çalışmalarda dalga boyu 254 nm olarak seçilmiş olsa da bu dalga boyunda elde edilen kromatogramlar MSG 'nin ayrımı için iyi pik rezolüsüsyonuna sahip olmamasının yanı sıra, OPA/βME/RTU ajanının kromatogram gürültüsünün 254 nm dalga boyunda artış gösterdiği ve girişim yapabilecek olası piklerin varlığı gözlenmiştir. OPA/βME/RTU ve 100 ppm derişimine sahip MSG çözeltilerinin 254 nm ve 336 nm dalga boylarında elde edilen kromatogramların görüntüleri sırasıyla Şekil 5.2., Şekil 5.3. Şekil 5.4. ve Şekil 5.5.'de gösterilmiştir.



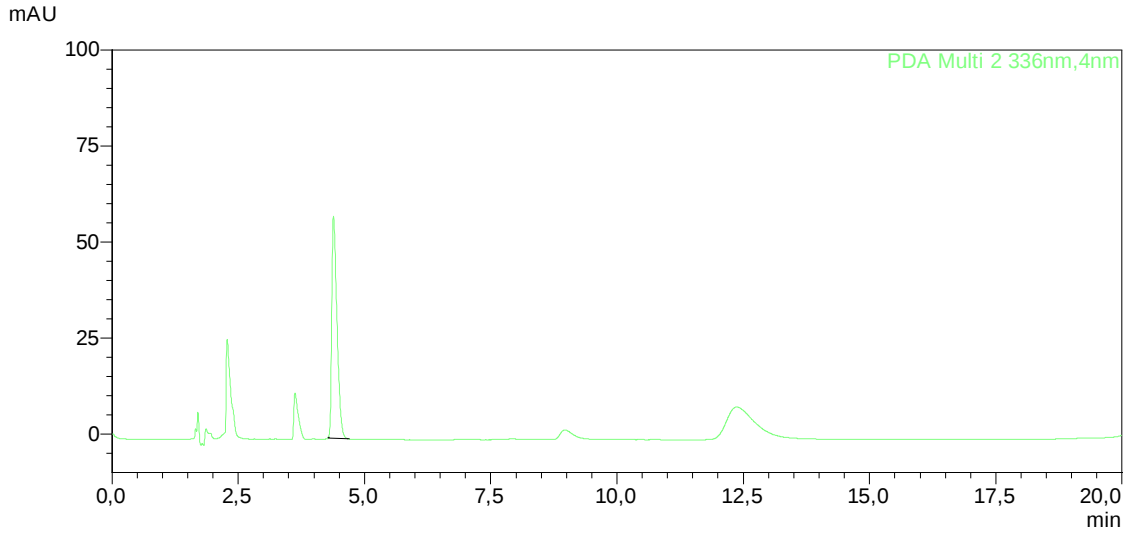
Şekil 5.2. OPA/βME/RTU türevlendirme ajanı 336 nm'da dalga boyunda gözlenen kromatogram 10 mM PBS (pH 5.9):MeOH (75:25, h/h) C₁₈ (2.7 µm, 150×4.6 mm)



Şekil 5.3. *OPA/βME/RTU türevlendirme ajanı 254 nm’da dalga boyunda gözlenen kromatogram 10 mM PBS (pH 5.9):MeOH (75:25, h/h) C₁₈ (2.7 µm, 150×4.6 mm)*

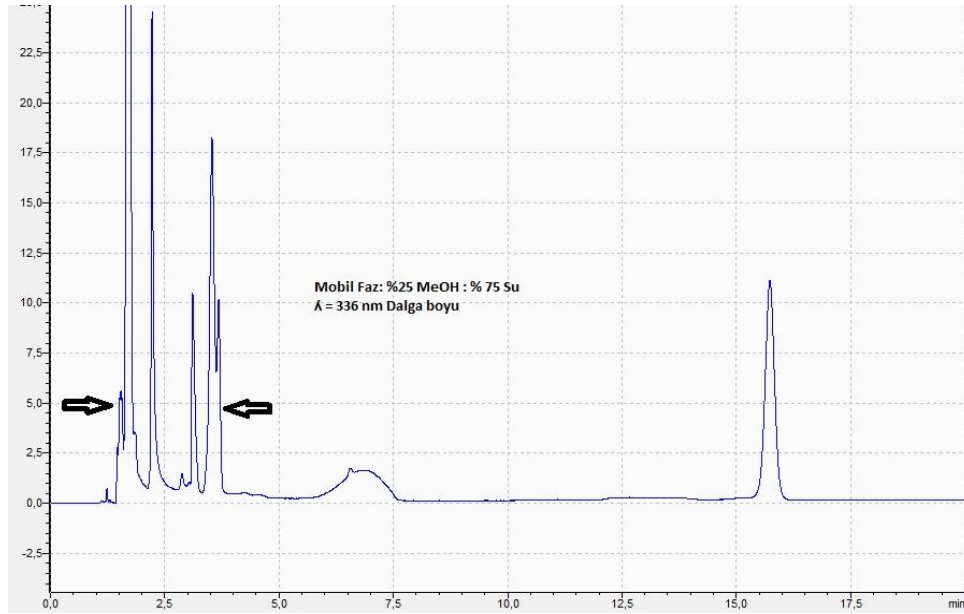


Şekil 5.4. *100 ppm MSG’nin OP /βME/RTU ile türevlendirilmiş 254 nm dalga boyunda gözlenen kromatogram 10 mM PBS (pH 5.9):MeOH (75:25, h/h) C₁₈ (2.7 µm, 150×4.6 mm)*



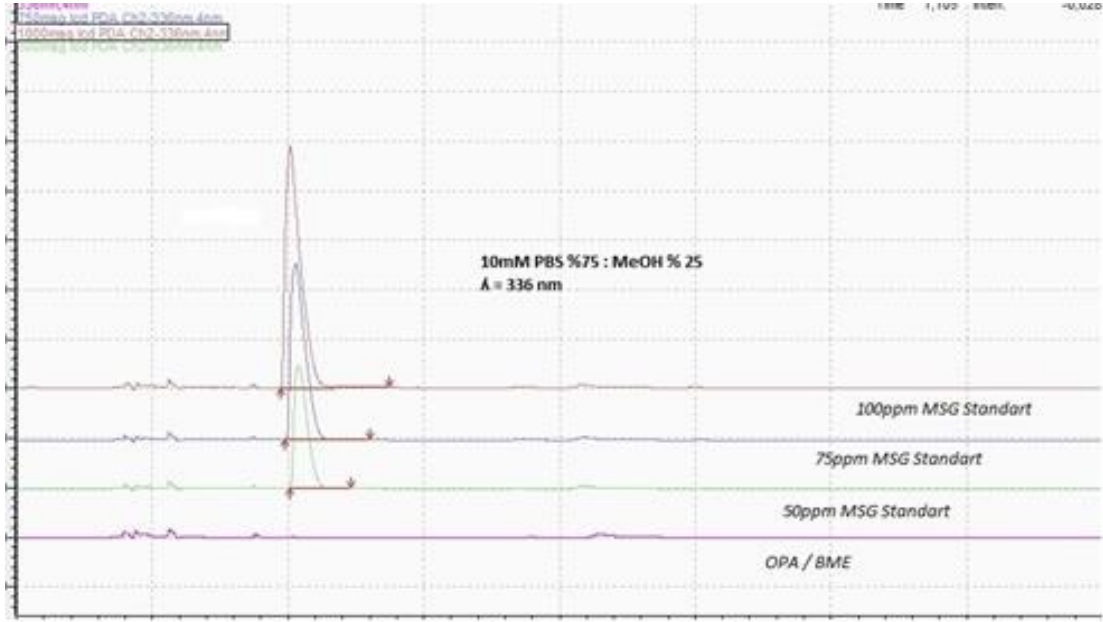
Şekil 5.5. 100 ppm MSG'nin OPA / β ME / RTU ile türevlendirilmiş 336 nm dalga boyunda gözlenen kromatogram 10 mM PBS (pH 5.9):MeOH (75:25, h/h) C_{18} (2.7 μ m, 150 $\times$ 4.6 mm)

YPSK-UV/DAD sisteminde kullanılan mobil fazın içerisindeki PBS tamponu kullanılmadan daha iyi bir ayırımının mümkün olabileceği düşünülmüş ancak yapılan çalışmalarda MSG kromatogramlarında ayırım gözlenmemiştir. İlgili analizlerin hepsi için 10 mM pH:5.9 PBS tamponu kullanılmasına karar verilmiştir.



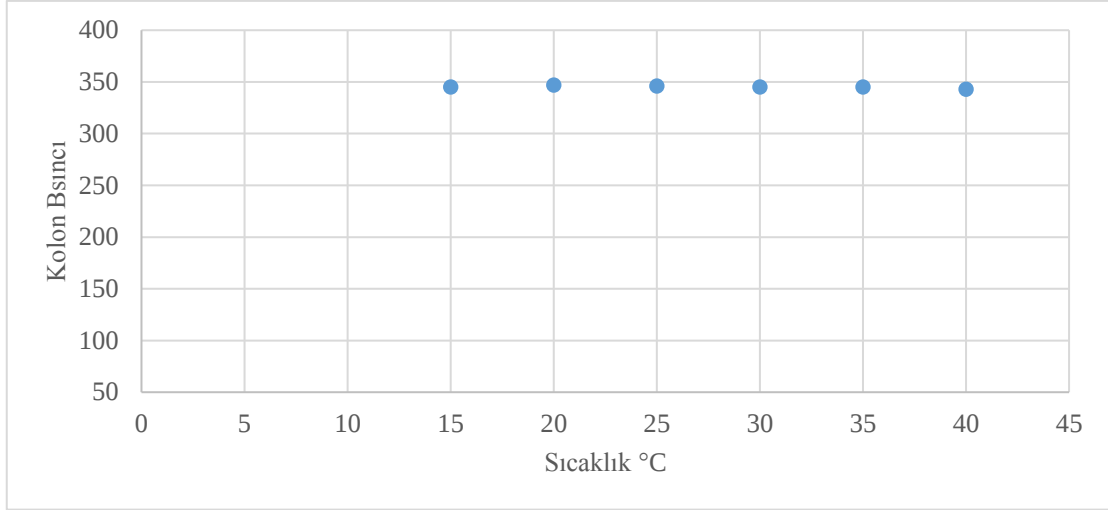
Şekil 5.6. OPA/ β ME/RTU ile türevlendirilmiş 50 ppm MSG kromatogramı Mobil Faz: Su:MeOH (75:25, h/h) Kolon :Restek RaptorTM C_{18} (2.7 μ m, 150 $\times$ 4.6 mm)

Mobil faz içerisinde PBS tamponu kullanılmadan elde edilen 50 ppm MSG kromatogramı Şekil 5.6.'da, PBS tamponu kullanılarak elde edilen standart MSG kromatogramları ise Şekil 5.7.'de gösterilmiştir.



Şekil 5.7. OPA/βME/RTU ile türevlendirilmiş standart MSG kromatogramları Mobil Faz: 10 mM PBS (pH 5.9):MeOH (75:25, h/h) Kolon: Restek Raptor™ C₁₈ (2.7 µm, 150×4.6 mm)

Daha sonra kolon sıcaklığının MSG ayırımına olan etkisi incelenmiş olup, bu etkinin kromatogram morfolojisine, pik alanına ve sistem basıncına dikkate değer bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. Çalışmalarda kullanılacak kolon sıcaklığını belirlemek için 15 °C ila 40 °C aralığında denemeler yapılmış ve bu sıcaklık değişimleri ile gözlenen kolon basıncı Şekil 5.8.'de gösterildiği gibi raporlanmıştır.



Şekil 5.8. 15 °C – 45 °C arasında gözlenen sıcaklık – Kolon basıncı değişim grafiği

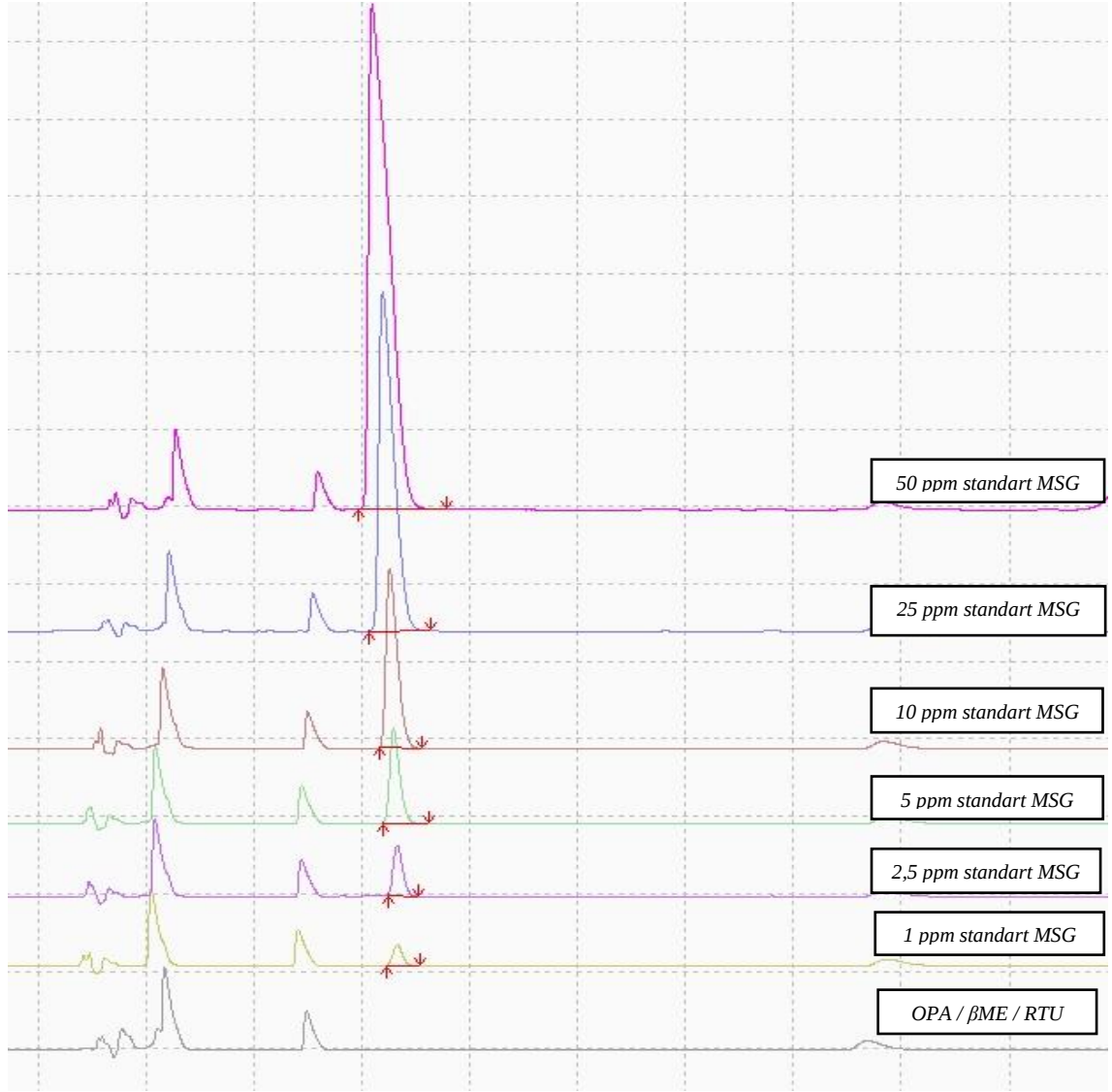
Diğer sıcaklıklara kıyasla anlamlı bir fark gözlemlenmediği için çalışmalarda kullanılacak sıcaklık ile gözlenen kolon basıncı ve kolon kimyası göz önüne alındığında kolon sıcaklığının 25 °C olmasına karar verilmiştir.

Tablo 5.1. YPSK-UV/DAD ile MSG ve analizleri için belirlenen koşullar

Cihaz	Shimadzu, Nexera – i (LC-2040C 3D)
Dedektör	Ultraviyole – Foto Diyot Dizisi Dedektörü
Mobil Faz	10 mM PBS (pH 5.9):MeOH (75:25, h/h)
Dalga Boyu	336 nm
Kolon	Restek Raptor™ C ₁₈ (2.7 µm, 150×4.6 mm) kolon (Seri no: 16041187S)
Akış hızı	0.6 mL/dk
Kolon Sıcaklığı	25 °C
Hücre Sıcaklığı	30 °C
Enjeksiyon Hacmi	20 µl
Enjeksiyon Süresi	20 dk

Yapılan yöntem geliştirme çalışmaları sonucunda YPSK-UV/DAD ile MSG'nin tayini için belirlenen en iyi RP-YPSK-UV/DAD koşullarının Tablo 5.1.'de gösterildiği şekilde ayarlanmasına karar verilmiştir.

MSG standardının analizi için MSG stok çözeltisi, referans katısından 0,0100 g hassas tartım alınarak 10 ml YPSK saflıkta olan su içerisinde çözülerek hazırlanan 1000 ppm'lik MSG stok çözeltisinden sırasıyla 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm ve 10 ppm'lik standart çözeltiler aynı saflık derecesinde bulunan YPSK saflıkta bulunan su ile seyreltilmiştir. Hazırlanan standart çözeltilerin her birinden 100 µL alındıktan sonra üzerlerine 900 µL OPA/βME/RTU türevlendirme çözeltisi ilave edilerek son derişimleri sırasıyla 50 ppm, 25 ppm, 10 ppm, 5 ppm, 1 ppm standart çözeltiler elde edilmiştir. 20 µL enjeksiyon hacmi ile YPSK-UV/DAD sistemine Tablo 5.1.'de belirlenen koşullar altında verilerek elde edilen MSG standartlarının kromatogramları Şekil 5.9.'da gösterilmiştir.



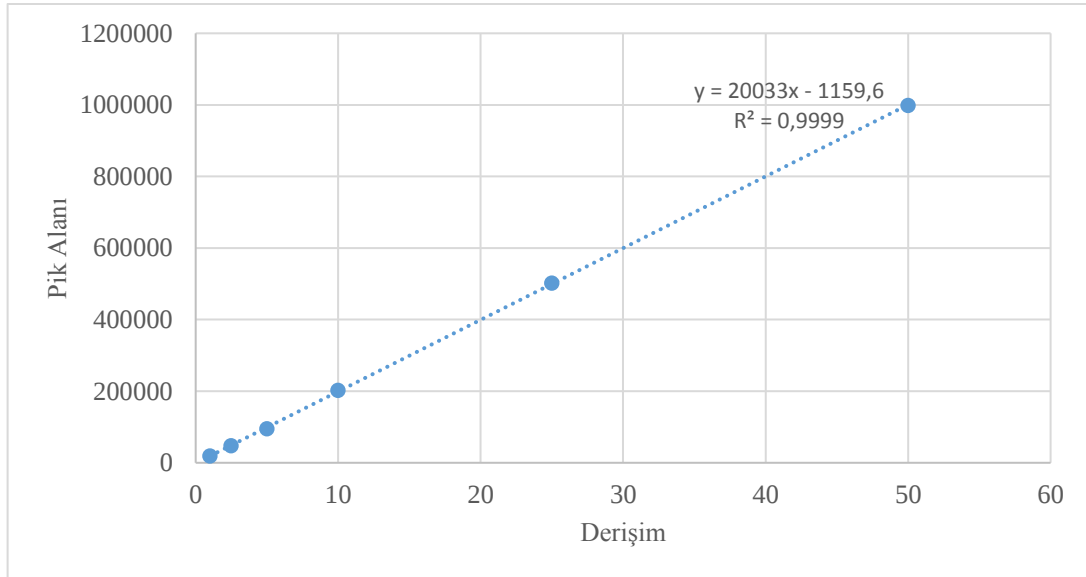
Şekil 5.9. YPSK-UV/DAD ile elde edilen OPA/βME/RTU ve 1 ppm, 2.5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm derişimlerine ait MSG kromatogramları

Şekil 5.9.'da elde edilen kromatogramlara karşılık gelen alanlar ise Tablo 5.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 5.2. OPA/βME/RTU ile türevlendirilerek hazırlanan MSG kromatogramlarının pik alanları

Derişim (ppm)	Pik Alanı ortalamaları (n=3)
1	18978
2,5	47662
5	95500
10	202680
25	502560
50	998764

Tablo 5.2.'de gösterilen veriler doğrultusunda, hazırlanan standart çözeltilere karşılık gelen alanlar ile doğrusal sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonucun Lambert – Beer yasasına uyduğu belirlenmiş ve verilere göre denklemi $y = 20033x - 1159,6$ ve $R^2 = 0,9999$ olan doğrusal bir denklem elde edilmiştir Şekil 5.10'da derişim kromotogram pik alanı kalibrasyon grafiği verilmiştir.



Şekil 5.10. MSG derişimleri – kromatogram alanları ile elde edilen kalibrasyon grafiği (n=3)

5.1.1. YPSK-UV/DAD ile yapılan SUT çalışmaları

Standart çözeltilerin analiz işlemleri gerçekleştirildikten sonra SUT çalışmalarına başlanmıştır. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen alıkonma zamanı, kuyruklanma faktörü (T), ayırım gücü R_s , kapasite faktörü, seçicilik Faktörü (α), teorik tabaka sayısı

(N), asimetri faktörü (As), pik yüksekliğinin / alanın tekrar edilebilirliği (%BSS) değerleri Tablo 5.3.'de gösterilmiştir.

Tablo 5.3. SUT çalışmaları sonuçları (Kolon: RaptorTM C₁₈ 150x4.6 mm., 2.7 µm / Mobil faz: 10 mM PBS (pH 5.9):MeOH (75:25, h/h)

Parametre	Elde edilen değer	Olması gereken/tavsiye edilen değer
Alıkonma zamanı	4,803	-----
Kuyruklanma faktörü (T)	0,55	T<2
Ayırım gücü R _s	5,1	R _s > 2,0
Kapasite faktörü	2,01	k'>2
Seçicilik Faktörü (α)	1,9	α >1
Teorik Tabaka Sayısı (N)	2962,07	N>2000
Asimetri Faktörü (A _s)	1,02	A _s =0,95-1,2
Pik yüksekliğinin veya alanın tekrar edilebilirliği (%BSS)	<1.5	%BSS < 1,5

Yapılan SUT testleri ile elde edilen değerler YPSK-UV/DAD sistemi ile MSG ve L-GLU tayini için iyi bir ayırım gerçekleştirildiğini gösterir niteliktedir. Geliştirilen yöntem, analitik yöntemlerin validasyonu üzerine ICH tarafından yayınlanan kılavuzda belirtilen öneriler doğrultusunda valide edilmiştir. Bunlar sistem uygunluk testleri ile birlikte doğruluk, kesinlik, doğrusalık, aralık, tayin alt sınırı, saptama sınırı, seçicilik, sağlamlıktır.

5.1.2. YPSK-UV/DAD ile yapılan doğruluk çalışmaları

Geliştirilen yöntemde doğruluk çalışmaları, standart MSG çözeltisi ile birlikte cips, hazır çorba ve bulyonlar üzerinde zenginleştirme (spike) işlemi uygulanarak geri kazanım değerlerinin ölçülmesiyle değerlendirilmiştir. Her bir konstantrasyon için 3'er analiz yapılarak ilgili hesaplamalar yapılmıştır. Bu koşullar altında elde edilen geri kazanım, standart sapma ve %RSD değerleri hesaplanmıştır. Bu değerler, Tablo 5.4.'de gösterilmiştir.

Tablo 5.4. Standart MSG ve numunelere zenginleştirme (spiked) işlemi uygulanarak elde edilen geri kazanım değerleri

Numune	Derişim (%)	Zenginleştirme (Spike) edilen miktarı (ng/ml)	Ortalama Geri Kazanım (ng/ml)	Geri Kazanım Değerlerinin Standart Sapması ^a	Geri Kazanım (%)	Ortalama Geri kazanım (%)
Standart MSG	50	10	9,88	0,72	98,8	
	100	25	24,2	0,65	96,8	%98
	150	50	49,2	0,54	98,4	
Cips	50	10	9,92	0,09	99,2	
	100	25	24,5	0,08	98	%98,4
	150	50	49,1	0,14	98,2	
Hazır Çorba	50	10	10,2	0,12	100,2	
	100	25	24,9	0,55	99,6	%100,1
	150	50	50,3	0,42	100,6	
Bulyon	50	10	9,64	0,54	96,4	
	100	25	24,1	0,12	96,4	%97,7
	150	50	50,2	0,24	100,4	

Tablo 5.4.'de verilen zenginleştirme miktarı her bir numuneden 3'er defa ölçüm alınarak hesaplanmış standart sapma değeridir.

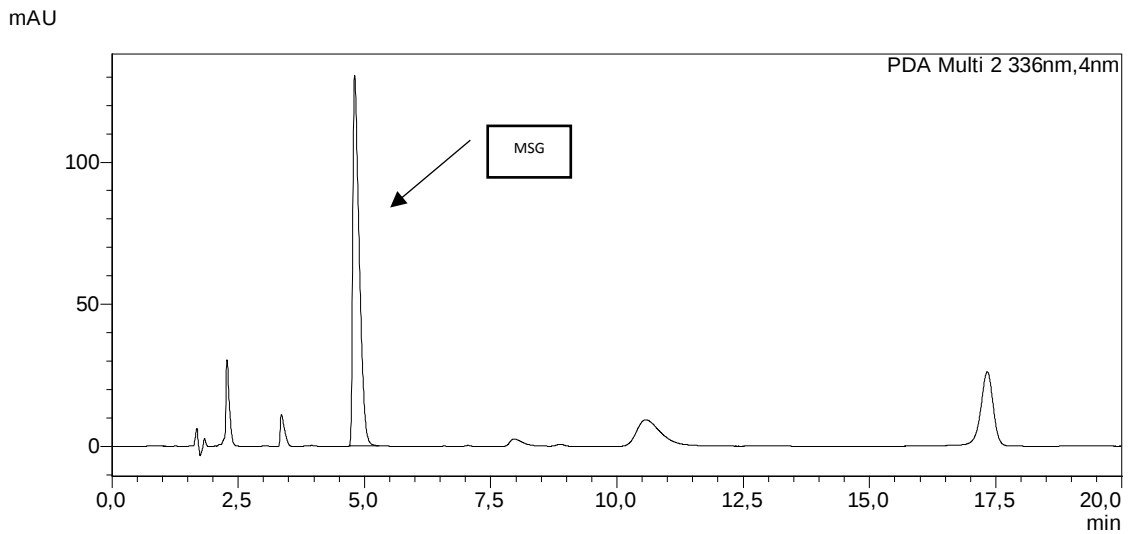
5.1.3. YPSK – UV/DAD ile yapılan kesinlik çalışmaları

YPSK-UV/DAD yöntemi ile 100 mg/L MSG tayininde elde edilen sonuçlar, gün içi ve günler arası olacak şekilde 5'şer set halinde hazırlanmıştır. Her bir gruptan elde edilen değerlerin ortalaması, SS ve %BSS değerleri Tablo 5.5.'de gösterilmiştir.

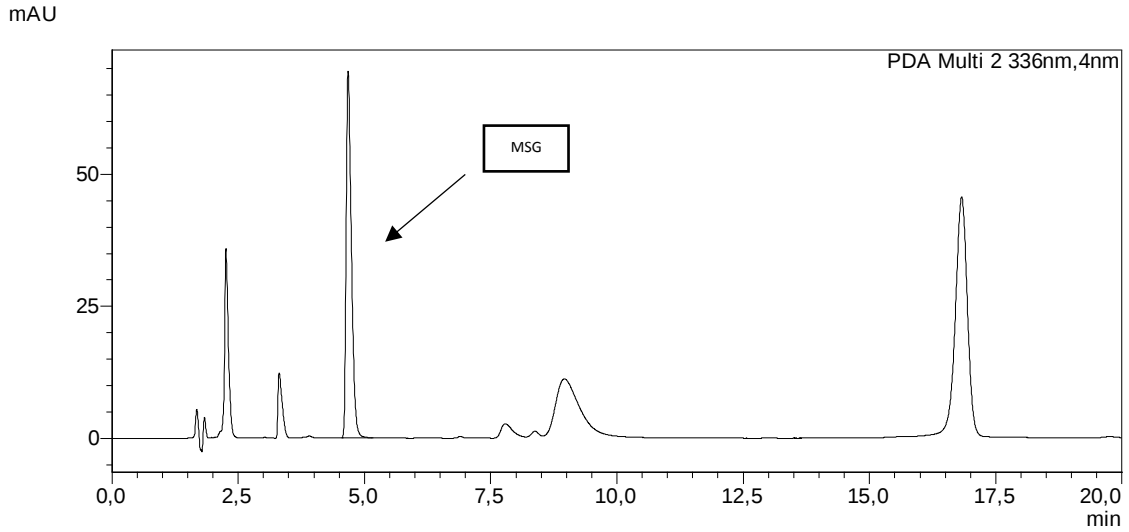
Tablo 5.5. 100 ppm MSG standart çözeltisinden elde edilen gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları

	1.gün (n=5)	2.gün(n=5)	3.gün(n=5)	Günler arası(n=15)
Ortalama derişim(mg/L)	99,54	47,58	47,01	64,71
SS	0,449	0,450	0,204	0,367
%BSS	0,451	0,946	0,433	0,568
Güven Aralığı $\alpha=0.05$	99,54 $\pm$ 0.50	47,58 $\pm$ 0,51	47,01 $\pm$ 0,13	64,71 $\pm$ 0,41

Tablo 5.5.'deki değerler incelendiğinde MSG'nin günler arası analizlerinin derişimlerinde azalma olduğu gözlenmiştir. OPA/ β ME/RTU ile türevlendirme işlemi gerçekleştirildikten sonra aynı gün içerisinde yapılan analizlerde istatistiksel olarak anlamlı farklar olmadığı ancak günler arası yapılan çalışmalarda L-GLU ve MSG standartlarının OPA/ β ME/RTU ile elde edilen türev bileşenlerinin kararlı olmadığı sonucuna varılmıştır. Literatürde, yapılan çalışmalar da bunu doğrular niteliktedir [110,111]. 50 ppm MSG'nin günler arası gerçekleştirilen analizlerdeki elde edilen kromatogramların pik şiddetindeki azalmalar Şekil 5.11. ve 5.12.'de gösterilmiştir. Bu gözlem dikkate alınarak bu yöntem ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. 1. gün sonunda elde edilen MSG sinyali ile 2. gün sonunda elde edilen sinyal arasındaki fark dikkat çekmektedir. Buna karşılık 2. gün sonu ile 3. gün sonunda yapılan analizler arasında elde edilen kromatogramlarda ise farklılık olmadığı gözlemlenmemiştir.



Şekil 5.11. 1. gün sonunda elde edilen 50 ppm OPA/ β ME/RTU ile türevlendirilmiş MSG kromatogramı



Şekil 5.12. 2. gün sonunda elde edilen 50 ppm OPA/βME/RTU ile türevlendirilmiş MSG kromatogramı

Kromatogramlar incelendiğinde, pik şiddetlerinde azalma olduğu ve MSG'nin OPA/βME/RTU türevinin kararlı olmadığı sonucuna varılmıştır. Yapılan analizlerde bu durum dikkate alınarak numunelerin YPSK sistemine enjeksiyonları gerçekleştirilmiştir.

5.1.4. YPSK-UV/DAD ile yapılan seçicilik çalışmaları

MSG tayini yapılırken girişim yapabilecek türlerin varlığında veya numunelerin türevlendirme işleminden sonra olası meydana gelebilecek başka maddelerin varlığında tayininin gerçekleştirilebileceğini göstermek amacıyla seçicilik faktörünün $\alpha > 1$ olması referans olarak alınmış olup daha önce yapılan SUT değerlendirilmesinde gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar referans değere uygunluk göstermesinden dolayı geliştirilen yöntemin seçiciliğinin uygun olduğuna karar verilmiştir.

5.1.5. YPSK-UV/DAD ile yapılan doğrusallık çalışmaları

MSG tayini için geliştirilen YPSK-UV/DAD yönteminin çalışma aralıklarının belirlenmesinde numunelerde elde edilebilecek sinyal büyüklükleri ve gürültü etkileri göz önüne alınmıştır. 1 – 100 ppm derişimleri aralığında hazırlanan standart çözeltilerden gün içi ve günler arası analizleri ile doğrusallık çalışmaları yapılmıştır. Tayin sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ) değerleri bulunan kalibrasyon doğrusunun denklemi aracılığıyla hesaplanmıştır. LOD, standart sapma ve bu doğrudan elde edilen eğimin (m) birbirlerine oranının 3 katı, LOQ ise aynı oranın 10 katı alınarak hesaplanmıştır. Tablo 5.6.'da, gün

İçerik ve günler arası olarak incelenen bu değerler eğim, korelasyon katsayısı ve %95 güven seviyesindeki olası sınırları belirlenmiştir. OPA/βME/RTU türevinin günler arasında meydana gelen şiddetindeki azalma burada da gözlemlenmiştir.

Tablo 5.6. OPA/βME/RTU ile türevlendirilmiş MSG'nin gün içi ve günler arası elde edilen doğrusallık çalışmaları sonuçları

Parametre	1.gün	2.gün	3.gün
Çalışma aralığı(mg/L)	1 - 100		
Eğim	20033	10017	10017
r ²	0,9999	0,9999	0,9999
SS	96,46	77,50	63,90
LOQ (mg/L)	0,015	0,022	0,021
LOD (mg/L)	0,050	0,069	0,070

5.1.6. YPSK-UV/DAD ile yapılan sağlamlık çalışmaları

YPSK-UV/DAD ile MSG tayininin sağlamlık çalışmaları değerlendirilmesi için sistemin akış hızı, kolon sıcaklığı, tampon pH'ı ve hareketli faz yüzdelerinin değişikliklerine karşı elde edilen sonuçlar Tablo 5.7.'de gösterilmiştir. %BSS <2 olması yöntemin sağlamlık açısından uygun olduğunun göstergesidir.

Tablo 5.7. YPSK-UV/DAD sistemi ile elde edilen sağlamlık sonuçları (* önerilen referans değer <2)

Değişiklik yapılan Parametre	1.Deneme	2.Deneme	3.Deneme	%BSS*
Akış hızı (mL/dk)	0,5	0,6	0,7	0,23
Kolon sıcaklığı (°C)	29	30	31	0,79
Tampon pH'ı	5,8	5,1	6	0,73
Hareketli faz tampon yüzdesi (%)	24	25	26	0,61

Geliştirilen YPSK-UV/DAD yöntemi tüm numunelere uygulanarak incelenen gıdalarda bulunan MSG miktarları, ilgili seyreltme faktörleri dikkate alınarak hesaplamalar yapılmıştır. Gıdalarda bulunan MSG miktarları ppm ve g/kg cinsinden Tablo 5.8.'de gösterilmiştir.

Tablo 5.8. Analizi yapılan gıda numuneleriden elde edilen MSG miktarları (ppm) *Asya ve Güney Amerika bölgelerinden temin edilen numune

Numune adedi	Numune Cinsi	Seyreltme faktörü ile birlikte hesaplanan derişim (ppm)	Bulunan MSG miktarı g/(g/kg) cinsinden TGK'ya göre)
1	Sade patates cipsi	24,81563	2,4
2	Baharat çeşnili patates cipsi	45,08418	4,5
3	Fırınlanmış patates cipsi	7,66379	0,7
4	Yoğurt ve mevsim yeşillikleri aromalı patates cipsi	44,9943	4,4
5	Pastırma aromalı patates cipsi	52,57744	5,2
6	Baharat çeşnili mısır cipsi	52,65231	5,2
7	Peynirli mısır cipsi	21,51025	2,1
8	Baharat çeşnili mısır cipsi	29,0684	2,9
9	Acı biber aromalı mısır cipsi	34,97137	3,5
10	Sade patates cipsi	18,74895	1,8
11	Ketçap aromalı patates cipsi	63,64562	6,3
12	Peynir – soğan aromalı patates cipsi	58,22883	5,8
13	Fıstık aromalı cips	7,18061	0,7
14	Peynir aromalı cips	69,73028	6,9
15	Biftek aromalı cips	66,3041	6,6
16	Biftek aromalı cips	22,03037	2,2
17	Fırınlanmış – ketçap aromalı cips	56,44087	5,6
18	Peynir aromalı cips	42,05333	4,2
19	Süt mısır aromalı cips	46,24221	4,6
20	Sade patates cipsi	7,14068	0,7
21	Kekikli patates cipsi	60,71161	6
22	Sade patates cipsi	20,45604	2
23	Barbekü soslu patates cipsi	40,7755	4
24	Tortilla aromalı patates cipsi*	61,34	6,1
25	Yeşillik aromalı patates cipsi*	87,89	8,7
26	Hazır pizza baharatı	169,8	16,9
27	Et bulyon	949,4	94
28	Et bulyon	145,2	145,1
29	Tavuk suyu bulyon	739	73,9
30	Tavuk suyu bulyon	1059	105,9

Tablo 5.8 devamı. Analizi yapılan gıda numunelerinden elde edilen MSG miktarları (ppm)

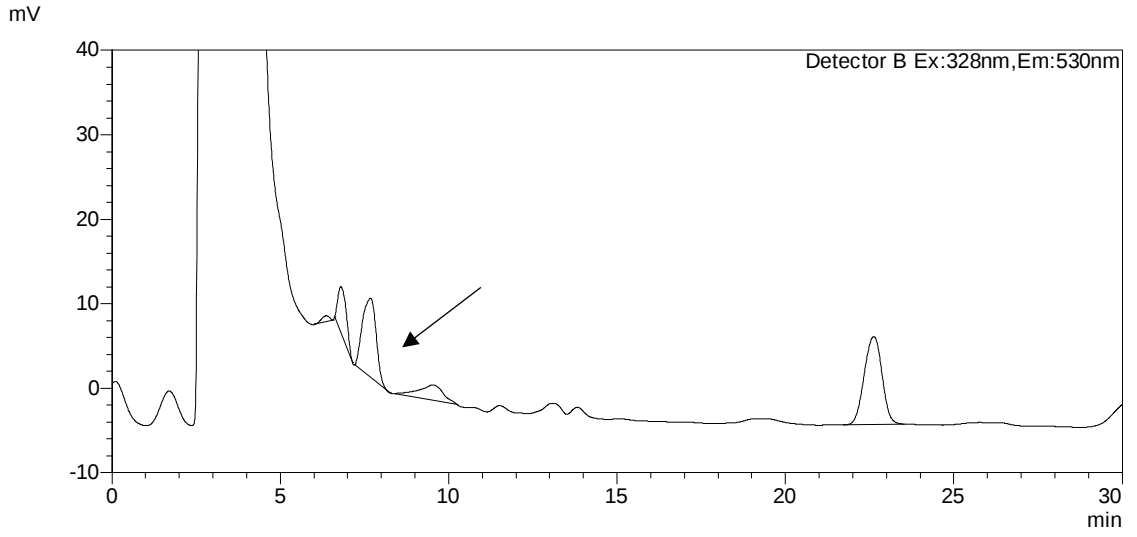
Numune adedi	Numune Cinsi	Seyreltme faktörü ile birlikte hesaplanan derişim (ppm)	Bulunan MSG miktarı g/(g/kg) cinsinden TGK'ya göre)
31	Tavuk suyu bulyon	818,9	81,8
32	Et suyu bulyon	632,1	63,2
33	Tavuk suyu bulyon	1179,1	117,9
34	Toz halinde paketli bulyon	1505,2	150,5
35	Tavuk suyu bulyon	996,6	99,6
36	Hazır Yayla çorbası	282,2	28,2
37	Hazır Ezogelin çorbası	56,27	5,6
38	Hazır Tavuk çorbası	36,79	3,6
39	Hazır Domates çorbası	31,31	3,1
40	Köfte harcı	213,8	21,3
41	Baharatlı patates çipsi*	37,88	3,7
42	Sebzeli baharat çeşni	521,1	52,11
43	Et bulyon	119,58	119,58
44	Tavuk suyu bulyon	1208	120,84
45	Tarhana çorbası MSG yok	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi
46	Domates çorbası MSG yok	75,70	7,57
47	İşkembe çorbası MSG yok	46,17	4,61
48	Yayla çorbası	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi
49	Kremalı tavuk çorbası	14,85	1,48
50	Domates çorbası	34,6	3,46
51	Tarhana çorbası	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi
52	İşkembe çorbası	15,3	1,53
53	Ezogelin çorbası	2,66	0,26
54	Kremalı mantar çorbası	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi
55	Şehriyeli tavuk çorbası	22,59	2,25
56	Çiğ köfte ÇK1	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi
57	Çiğ köfte ÇK2	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi
58	Çiğ köfte ÇK3	4,2	0,42
59	Çiğ köfte ÇK4	0,90	0,09
60	Çiğ Köfte ÇK5	7,20	0,72
61	Çiğ Köfte ÇK6	31,2	3,12

5.2. YPSK-FLD ile Gıdalarda Bulunan MSG Miktarlarının Tayini

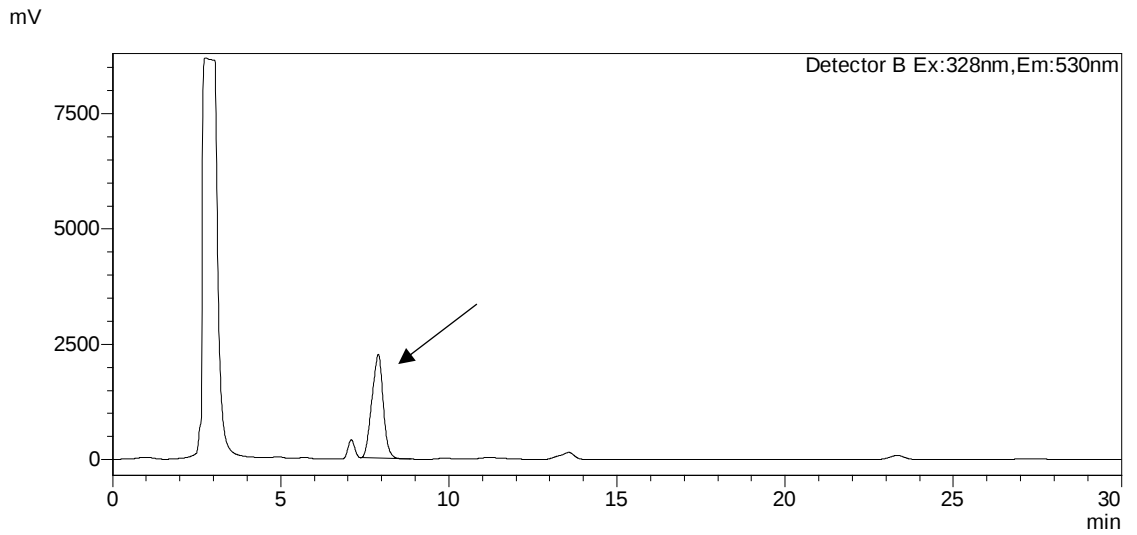
YPSK-FLD ile MSG tayin çalışmalarına daha önce yapılan çalışmalar incelenerek ve çeşitli denemeler yapılarak başlanmıştır. Yöntem geliştirme aşamaları bir önceki yöntemde olduğu gibi sabit ve hareketli faz seçimi ile başlanmıştır. MSG tayinine özgün uygun analiz koşulların belirlenmesi ve yöntem geçerliliğinin araştırılması basamaklarından sonra geliştirilen yöntem, gerçek numunelere uygulanmıştır. Yapılan uygulamalarda kullanılabilecek bir analiz metodu geliştirilmiştir.

MSG tayininde kullanılmak üzere çeşitli mobil fazlar üzerinde incelemeler yapılmıştır. İncelenen mobil fazlar arasında MeOH: Su pH 2.95 % 1.5 Trietilamin ve 5 mmol/l tetrabütülamonyum içeren (35:65, *h/h*) karışım ve MeOH:Su:GAA (45:54:1, *h/h/h*), MeOH:Su (50:50, *h/h*) mobil fazlarının ayırma olan etkileri incelenmiş ve aralarında en iyi pik ayırımı ve morfolojisi MeOH:Su:GAA (45:54:1, *h/h/h*) oranındaki mobil faz ile elde edilmiştir. Bu mobil faz ile yapılan aminoasitlerin dansillenme çalışmaları bunu doğrular niteliktedir [71, 74].

YPSK saflıkta bulunan su ile hazırlanan MSG çözeltileri ve numuler DNS-Cl ile türevlendirilerek farklılıkları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde NaHCO₃ kullanılmadan hazırlanan çözeltiye göre pik rezolüsyonunun sağlanamadığı gözlemlenmiştir. Bu durum DNS-Cl ile türevlendirmenin tam olarak gerçekleşmediğini düşündürmektedir. Bu sebepten dolayı ilgili tayinlerin hepsi için %2'lik NaHCO₃ çözeltisi kullanılmasına karar verilmiştir. %2'lik NaHCO₃ çözeltisi kullanılmadan ve kullanılarak örnek kromatogramlar sırasıyla Şekil 5.13. ve Şekil 5.14.' de gösterilmiştir.

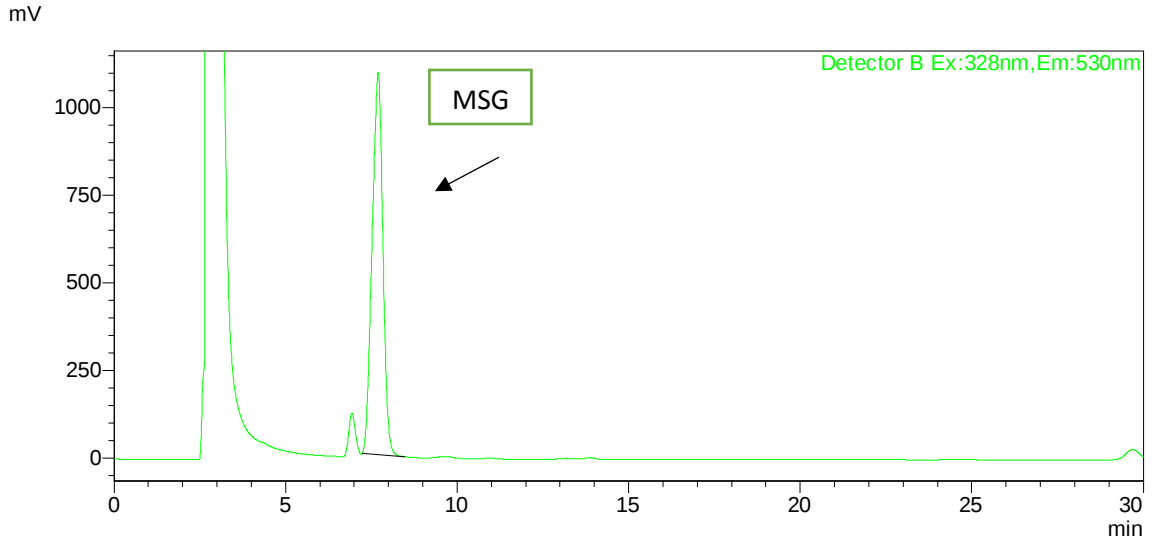


Şekil 5.13. YPSK saflıktaki su içerisinde hazırlanarak elde edilen 6 nolu numune kromatogramı



Şekil 5.14. %2'lik NaHCO_3 içerisinde hazırlanarak elde edilen 6 nolu numune kromatogramı

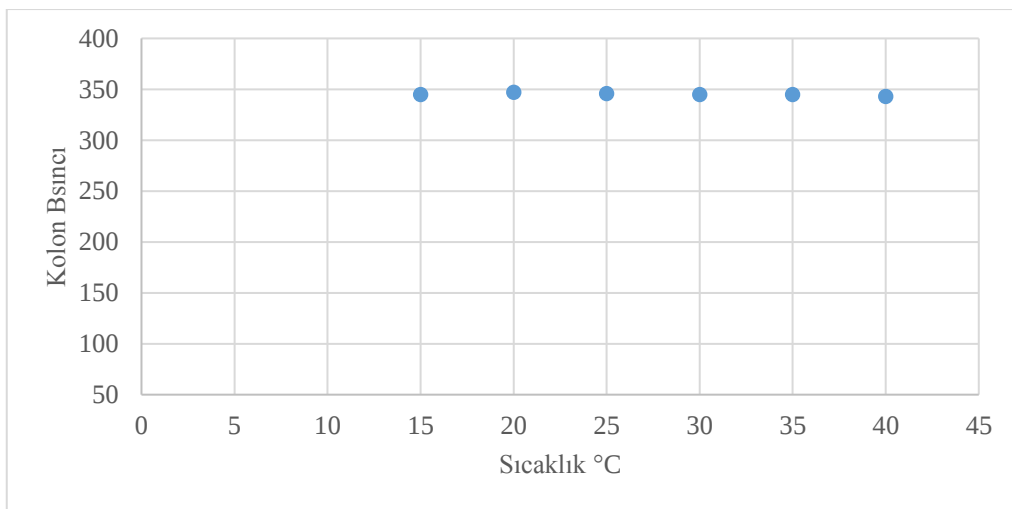
25 ppm derişime sahip MSG standart çözeltisinin DNS-CI ile türevlendirilmesinden elde edilen örnek kromatogram Şekil 5.15.'de gösterilmiştir.



Şekil 5.15. 25 ppm derişime sahip MSG'nin DNS-CI ile türevlendirilmesi ile elde edilen kromatogram

Sistemle kullanılacak uyarılma (excitation) ve emisyon (emission) dalga boyları için sırasıyla 328 nm ve 530 nm olarak belirlenmiştir.

Kolon sıcaklığının MSG ayırımına olan etkisi incelenmiştir. Bir önceki yöntemde olduğu gibi 15 °C – 40 °C aralığında gözlenen kolon basınçları incelenerek elde edilen veriler doğrultusunda istatistiksel olarak bir fark gözlenmediği belirlenmiştir. Bu veriler göz önüne alındığında 25 °C'de çalışılmaya karar verilmiştir. Elde edilen alana karşılık sıcaklık grafiği Şekil 5.16.'de gösterilmiştir.



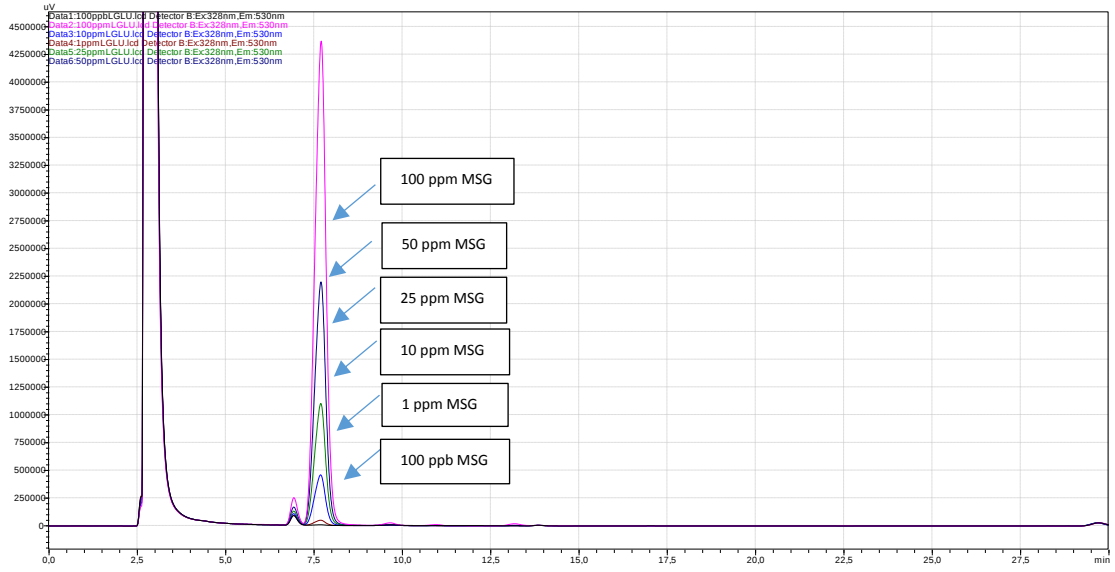
Şekil 5.16. YPSK-FLD ile MSG ayırımı için 15 °C – 45 °C arasında gözlenen sıcaklık – kolon basıncı arası değişim grafiği

Yapılan yöntem geliştirme çalışmaları sonucunda MSG analizinin YPSK – FLD ile tayini için belirlenen en iyi koşullar Tablo 5.9.’de gösterildiği gibi ayarlanmıştır.

Tablo 5.9. YPSK – FLD ile MSG tayini için belirlenen koşullar

Cihaz	Shimadzu, Nexera – i (LC-2040C 3D)
Dedektör	Floresans Dedektör
Excitation (Uyarılma)	328 nm
Emmission (Emisyon)	530 nm
Mobil Faz	Su:MeOH:GAA (54:45:1, <i>h:h:h</i>)
Kolon	Restek Raptor TM C18 (2.7 µm, 150×4.6 mm) kolon (Seri no: 16041187S)
Akış hızı:	0,5 mL/dk
Kolon Sıcaklığı:	25 °C
Hücre Sıcaklığı:	25 °C
Enjeksiyon Hacmi:	20 µl

MSG tayini için referans katısından 0,0100 g hassas tartım alınarak, 10 mL %2 NaHCO₃ tampon çözeltisi içerisinde çözülerek hazırlanan stok çözeltiden ilgili seyreltmeler yapıldı. 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 10 ppm, 1 ppm ve 100 ppb arası standart çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltilerin üzerinin her birinin 100 µL’sine aynı hacimde ACT içerisinde hazırlanmış olan DNS – CI türevlendirme ajanı ilave edildi. Daha sonra 75 dakika boyunca 95 °C’de bekletilen çözeltilerin her birinin üzerine 50’şer µL MeOH ve GAA çözeltisi ilave edildikten sonra Tablo 5.9.’de belirlenen koşullar altında MSG analizi gerçekleştirildi. Elde edilen kromatogramlar Şekil 5.17.’de gösterilmiştir.



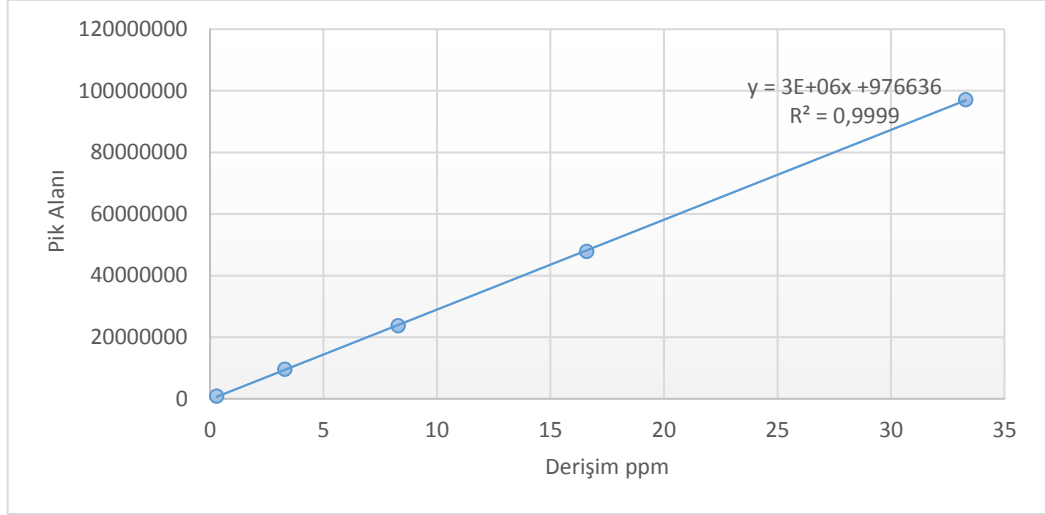
Şekil 5.17. 100 ppb – 100 ppm arası DNS -CI türevlendirilmesi sonucu elde edilen MSG kromatogramları

Çözeltilerin derişimleri hesaplanırken ilgili seyreltmeler göz önüne alınmıştır. Bu derişimlere ait kromatogram pik alan değerleri Tablo 5.10.'da gösterilmiştir.

Tablo 5.10. DNS-CI türevi ile elde edilen standart MSG kromatogram alanları

Derişim (ppm)	Pik Alanı (n=3)
250	208438753
100	97151117
50	47806366
25	23782298
10	9601709
1	863207
0,1	93365

Elde edilen sonuçlara göre çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 5.18.'de gösterilmiş olup denklemi $y = 3 \times 10^6 x - 976636$ ve $R^2 = 0,9999$ olarak elde edilmiştir.



Şekil 5.18. DNS-CI türevi ile elde edilen standart MSG standartlarına ait kalibrasyon grafiği

5.2.1. YPSK-FLD ile yapılan SUT çalışmaları

Standart MSG'nin analizleri gerçekleştirildikten sonra SUT çalışmalarına başlanmıştır. YPSK-FLD sistemi için elde edilen SUT sonuçları Tablo 5.11.'de gösterilmiştir.

Tablo 5.11. YPSK-FLD sistemi için yapılan SUT çalışmaları sonuçları C18 150x4.6 mm.,2.7 µm, Hareketli faz: Su:MeOH:GAA (54:45:1, h:h:h)

Parametre	Elde edilen değer	Olması gereken/tavsiye edilen değer
Alıkonma zamanı	7.899	-----
Kuyruklanma faktörü (T)	0.98	T<2
Ayrırım gücü R_s	1.04	$R_s > 2,0$
Kapasite faktörü	4,2	$k' > 2$
Seçicilik Faktörü (α)	1,16	$\alpha > 1$
Teorik Tabaka Sayısı (N)	6241	N>2000
Asimetri Faktörü (A_s)	0,96	$A_s=0,95-1,2$
Pik yüksekliğinin veya alanın tekrar edilebilirliği (%BSS)	<1.5	%BSS < 1,5

Yapılan SUT testleri sonuçlarına göre elde edilen değerler iyi bir sistemde iyi bir ayırım gerçekleştirildiğini gösterir niteliktedir. Geliştirilen yöntem, analitik yöntemlerin validasyonu üzerine ICH tarafından yayınlanan kılavuzda belirtilen öneriler ile bir önceki yöntemde olduğu gibi YPSK-FLD yöntemi için de valide edilmiştir. Bunlar sistem uygunluk testleri ile birlikte doğruluk, kesinlik, doğrusallık, aralık, tayin alt sınırı, saptama sınırı, seçicilik, sağlamlıktır.

5.2.2. YPSK-FLD ile yapılan doğruluk çalışmaları

Geliştirilen YPSK-FLD yöntemdeki doğruluk çalışmaları, standart MSG çözeltisi ile birlikte cips, hazır çorba ve bulyonlar üzerinde zenginleştirme (spike) işlemi uygulanarak geri kazanım değerleri ölçülerek belirlenmiştir. Her bir konstantrasyon için 3'er analiz yapılarak ilgili hesaplamalar yapılmıştır. YPSK-FLD yöntemi için geri kazanım, standart sapma ve % RSD değerleri hesaplanarak Tablo 5.12.'de gösterilmiştir.

Tablo 5.12. Standart MSG ve numunelere zenginleştirme (spiked) işlemi uygulanarak elde edilen YPSK- FLD geri kazanım değerleri (n=3) ^a

Numune	Derişim (ng/mL)	Zenginleştirme (Spike) edilen miktarı (ng/mL)	Ortalama Geri Kazanım (ng/mL)	Geri Kazanım Değerlerinin Standart Sapması ^a	Geri Kazanım (%)	Ortalama Geri kazanım (%)
Standart MSG	50	10	9,82	0,091	98,2	
	100	25	2,16	0,30	100,64	98,04
	150	50	49,9	0,15	99,8	
Cips	50	10	9,53	0,38	95,3	
	100	25	24,74	0,02	98,96	97,98
	150	50	49,84	0,05	99,68	
Hazır Çorba	50	10	9,73	0,20	97,3	
	100	25	25,04	0,15	100,16	99,17
	150	50	50,03	0,15	100,07	
Bulyon	50	10	9,46	0,072	94,5	
	100	25	24,81	0,005	99,24	97,35
	150	50	49,16	0,47	98,32	

Tablo 5.12.'de verilen spike edilen her bir numuneden 3'er defa ölçüm alınarak hesaplanmış standart sapma değeridir.

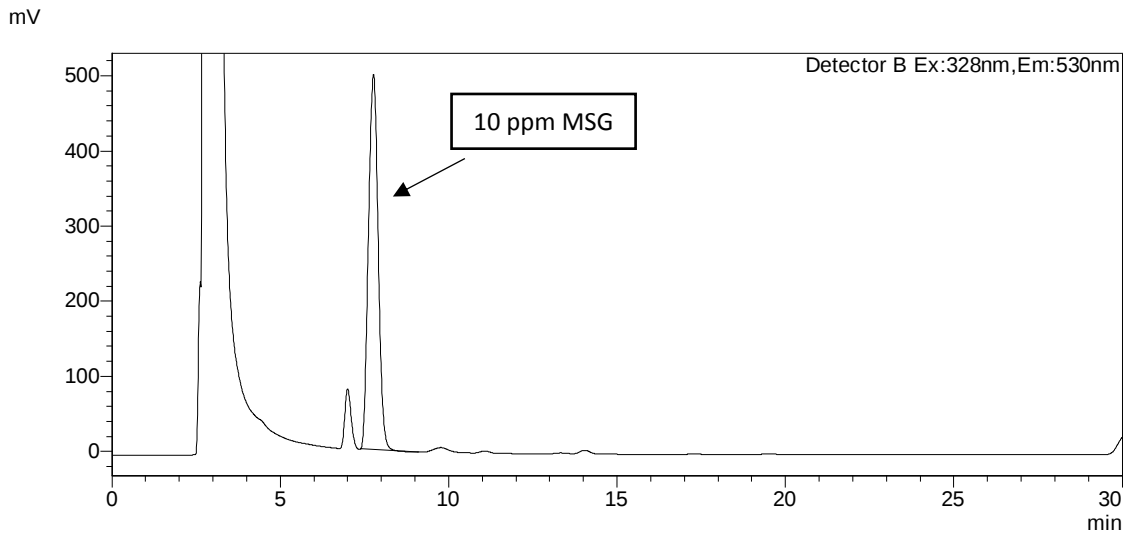
5.2.3. YPSK-FLD ile yapılan kesinlik çalışmaları

10 mg/L (ppm) MSG standart çözeltisi kullanılarak gün içi ve günler arası olacak şekilde 5'er set halinde YPSK-FLD sistemine Tablo 5.13.'de belirtilmiş olan koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem için elde edilen ortalama, SS ve BSS değerleri Tablo 5.13.'de gösterilmiştir.

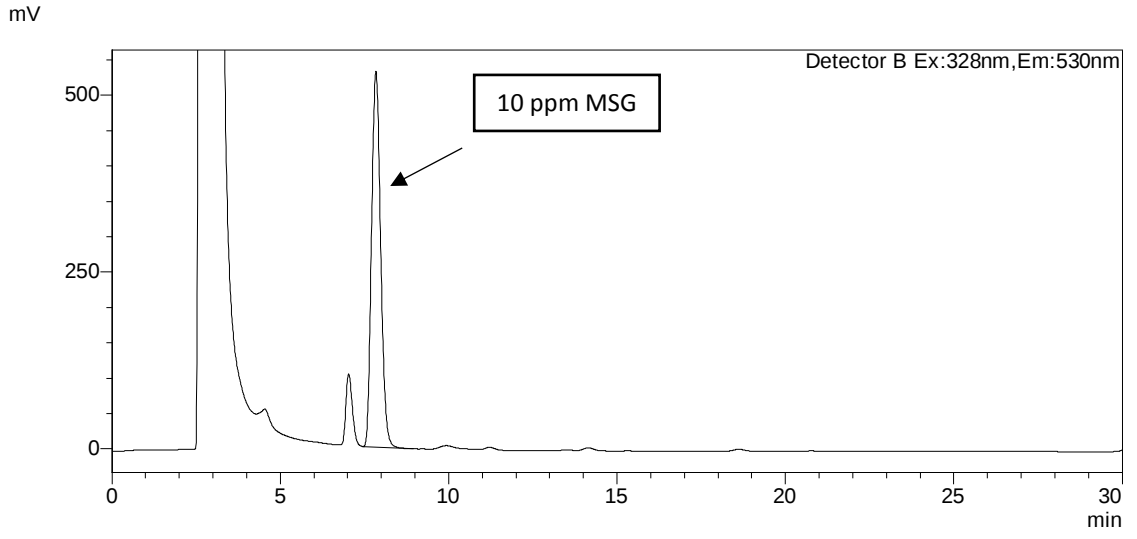
Tablo 5.13. 10 ppm MSG standart çözeltisinden elde edilen gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları değerlendirilmesi

	1.gün (n=5)	2.gün (n=5)	3.gün (n=5)	Günler arası (n=15)
Ortalama derişim(mg/L)	9,98	9,98	9,97	9,976
SS	0,001	0,011	0,015	0,108
%BSS	0,010	0,110	0,150	0,238
%95 Güven aralığı $\alpha=0.05$	9,99	9,99	9,98	9,98

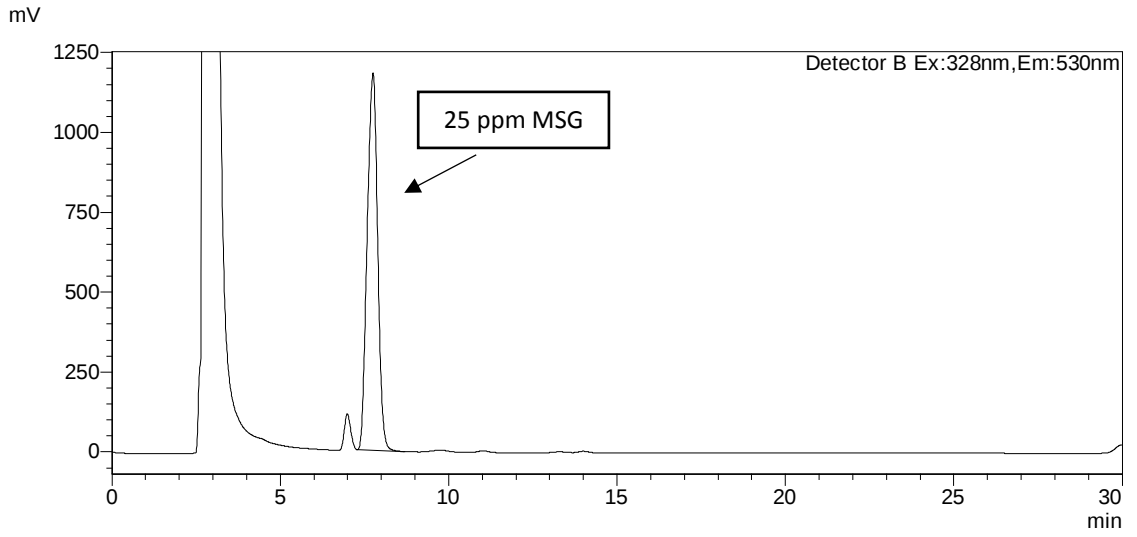
Tablo 5.13.'deki değerler incelendiğinde YPSK-FLD ile gün içi ve günler arası elde edilen sonuçlar MSG' derişimlerinin aynı kaldığını göstermektedir. DNS-CI türevlendirilmesi ile oluşan floresan yapının OPA/BME/RTU türevi ile kıyaslandığında daha kararlı bir yapıda olduğu gözlemlenmiştir. Günler arası gerçekleştirilen analizlerden elde edilen 10 ppm ve 25 ppm derişime sahip MSG kromatogramlarının 1 ve 2. gün sonunda elde edilen kromatogramları sırasıyla Şekil 5.19. ile Şekil 5.22. arasında gösterilmiştir.



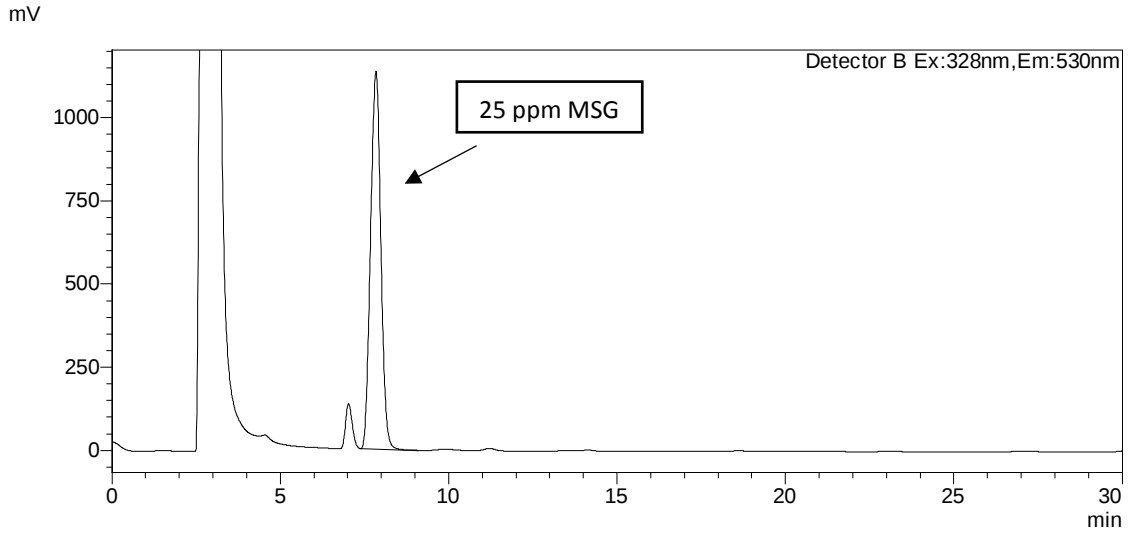
Şekil 5.19. 10 ppm DNS-CI türevi MSG'nin 1. gün sonunda elde edilen kromatogramı



Şekil 5.20. 10 ppm DNS-Cl türevi MSG'nin 2. gün sonunda elde edilen kromatogramı



Şekil 5.21. 25 ppm DNS-Cl türevi MSG'nin 1. gün sonunda elde edilen kromatogramı



Şekil 5.22. 25 ppm DNS-CI türevi MSG'nin 2. gün sonunda elde edilen kromatogramı

5.2.4. YPSK-FLD ile yapılan seçicilik çalışmaları

MSG tayini yapılırken girişim yapabilecek türlerin varlığında veya numunelerin türevlendirme işleminden sonra olası meydana gelebilecek başka maddelerin varlığında tayininin gerçekleştirilebileceğini göstermek amacıyla seçicilik faktörünün $\alpha > 1$ olması referans olarak alınmıştır. Tablo 5.3.'de gösterildiği üzere SUT değerlendirilmesinde elde edilen sonuçlar referans değere uygunluk göstermesinden dolayı geliştirilen yöntemin seçiciliğinin uygun olduğuna karar verilmiştir.

5.2.5. YPSK-FLD ile yapılan doğrusallık çalışmaları

MSG tayini için geliştirilen YPSK-FLD yönteminde çalışma aralıklarının belirlenmesinde numunelerden elde edilebilecek sinyal büyüklükleri ve gürültü etkileri göz önüne alınmıştır. 1 ppb – 100 ppm derişimleri aralığında hazırlanan standart çözeltilerden analizler yapılarak gün içi ve günler arası olacak şekilde doğrusallık çalışmaları yapılmıştır. Gün içi ve günler arası olarak incelenen bu değerler eğim, korelasyon katsayısı ve %95 güven seviyesindeki olası sınırları belirlenmiştir. YPSK-FLD ile yapılan doğruluk çalışmalarının günlere göre sonuçları Tablo 5.14.'de verilmiştir.

Tablo 5.14. YPSK-FLD ile yapılan doğrusallık çalışma sonuçları

Parametre	1.gün	2.gün	3.gün
Çalışma aralığı (mg/L)	0.1 - 100		
Eğim	3E+06x	3E+06x	3E+06x
r ²	0.9999	0.9999	0.0999
SS	1223,9	569.67	714
LOQ (mg/L)	4,07x10 ⁻³	1.89x10 ⁻³	2.38x10 ⁻³
LOD (mg/L)	1,34 x10 ⁻³	6.55x10 ⁻³	7.8x10 ⁻⁴

5.2.6. YPSK-FLD ile yapılan sağlamlık çalışmaları

MSG tayini için geliştirilen YPSK-FLD yöntemi için sağlamlık çalışmalarının değerlendirilmesi, bir önceki yöntemde olduğu gibi sistemin akış hızı, kolon sıcaklığı, hareketli faz yüzdelerinin değişikliklerinin sonuçlara olan etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.15.'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, %BSS < 2 olması yöntemin sağlamlık açısından uygun olduğunun göstergesidir.

Tablo 5.15. YPSK-FLD yöntemi ile sağlamlık testinden elde edilen sonuçlar (*önerilen referans değer <2)

Değişiklik yapılan Parametre	1.Deneme	2.Deneme	3.Deneme	%BSS*
Akış hızı (mL/dk)	0,4	0,5	0,6	0,39
Kolon sıcaklığı (°C)	29	30	31	0,62
Kullanılan su oranı (%)	53	54	55	0,28

YPSK-FLD ile geliştirilen yöntemde ilgili seyreltme faktörleri dikkate alınarak gıdalarda elde edilen ppm ve g/kg cinsinden MSG miktarları Tablo 5.16.'de gösterilmiştir.

Tablo 5.16. YPSK-FLD sistemi ile *analizi yapılan gıda numunelerinden elde edilen MSG miktarları*
**Asya ve Güney Amerika bölgelerinden temin edilen numune*

Numune numarası	Numune Cinsi	Seyreltme faktörü ile birlikte hesaplanan derişim (ppm)	Bulunan MSG miktarı g/ (g/kg) cinsinden TKG'ya göre)
1	Sade patates cipsi	29	2,9
2	Baharat çeşnili patates cipsi	45,97	4,5
3	Fırınlanmış patates cipsi	7,01	0,71
4	Yoğurt ve mevsim yeşillikleri aromalı patates cipsi	44,04	4,40
5	Pastırma aromalı patates cipsi	53,7	5,37
6	Baharat çeşnili mısır cipsi	51,7	5,17
7	Peynirli mısır cipsi	22,26	2,26
8	Baharat çeşnili mısır cipsi	25,9	2,5
9	Acı biber aromalı mısır cipsi	39,2	3,9
10	Sade patates cipsi	31,07	3,07
11	Ketçap aromalı patates cipsi	63,55	6,3
12	Peynir – soğan aromalı patates cipsi	58,4	5,84
13	Fıstık aromalı cips	9,08	0,908
14	Peynir aromalı cips	66,09	6,69
15	Biftek aromalı cips	64,8	6,48
16	Biftek aromalı cips	24,6	2,46
17	Fırınlanmış – ketçap aromalı cips	57,5	5,7

Tablo 5.16. (Devam). YPSK-FLD sistemi ile analizi yapılan gıda numunelerinden elde edilen MSG miktarları *Asya ve Güney Amerika bölgelerinden temin edilen numune

Numune numarası	Numune Cinsi	Seyreltme faktörü ile birlikte hesaplanan derişim (ppm)	Bulunan MSG miktarı g/(g/kg) cinsinden TKG'ya göre)
18	Peynir aromalı cips	44,08	4,40
19	Süt mısır aromalı cips	48,72	4,8
20	Sade patates cipsi	9,5	0,95
21	Kekikli patates cipsi	71,7	7,17
22	Sade patates cipsi	22,7	2,27
23	Barbekü soslu patates cipsi	49,25	4,92
24	Tortilla aromalı patates cipsi*	58,1	5,81
25	Yeşillik aromalı patates cipsi*	79,29	7,92
26	Hazır pizza baharatı	168,8	16,8
27	Et bulyon	911,1	91,1
28	Et bulyon	1462,2	146,2
29	Tavuk suyu bulyon	722,3	72,2
30	Tavuk suyu bulyon	1006	106
31	Tavuk suyu bulyon	926,69	92,69
32	Et suyu bulyon	698	69,8
33	Tavuk suyu bulyon	803,57	80,35
34	Toz halinde paketli bulyon	1475,17	147,5
35	Tavuk suyu bulyon	998,82	99,88
36	Hazır Yayla çorbası	288,5	28,8

Tablo 5.16. (Devam). YPSK-FLD sistemi ile analizi yapılan gıda numunelerinden elde edilen MSG miktarları *Asya ve Güney Amerika bölgelerinden temin edilen numune

Numune numarası	Numune Cinsi	Seyreltme faktörü ile birlikte hesaplanan derişim (ppm)	Bulunan MSG miktarı g/(g/kg) cinsinden TKG'ya göre)
37	Hazır Ezogelin çorbası	59,6	5,9
38	Hazır Tavuk çorbası	37,2	3,7
39	Hazır Domates çorbası	31,5	3,1
40	Köfte harcı	224	22,4
41	Baharatlı patates cipsi*	378	3,78
42	Sebzeli baharat çeşni	521,1	52,11
43	Et bulyon	1191,6	119,1
44	Tavuk suyu bulyon	1239,5	123,95
45	Tarhana çorbası MSG yok	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi
46	Domates çorbası MSG yok	78,7	7,87
47	Işkembe çorbası MSG yok	49,2	4,92
48	Yayla çorbası	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi
49	Kremalı tavuk çorbası	14	1,4
50	Domates çorbası	35,6	3,56
51	Tarhana çorbası	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi
52	Işkembe çorbası	15	1,5
53	Ezogelin çorbası	2,06562	0,20
54	Kremalı mantar çorbası	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi
55	Şehriyeli tavuk çorbası	22,5	2,25
56	Çiğ köfte ÇK1	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi

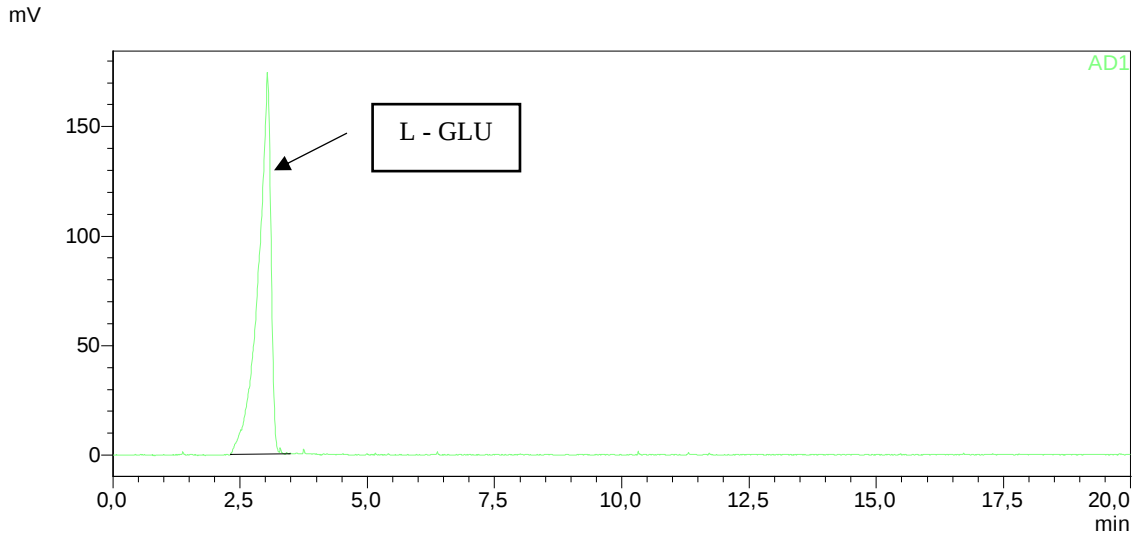
Tablo 5.16. (Devam) YPSK-FLD sistemi ile analizi yapılan gıda numunelerinden elde edilen MSG miktarları *Asya ve Güney Amerika bölgelerinden temin edilen numune

Numune numarası	Numune Cinsi	Seyreltme faktörü ile birlikte hesaplanan derişim (ppm)	Bulunan MSG miktarı g/(g/kg) cinsinden TKG'ya göre)
57	Çiğ köfte ÇK2	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi
58	Çiğ köfte ÇK3	4,19591	0,41
59	Çiğ köfte ÇK4	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi
60	Çiğ Köfte ÇK5	7,2	0,7
61	Çiğ Köfte ÇK6	34,5	3,4

5.3. YPSK-ELSD ile MSG Tayini

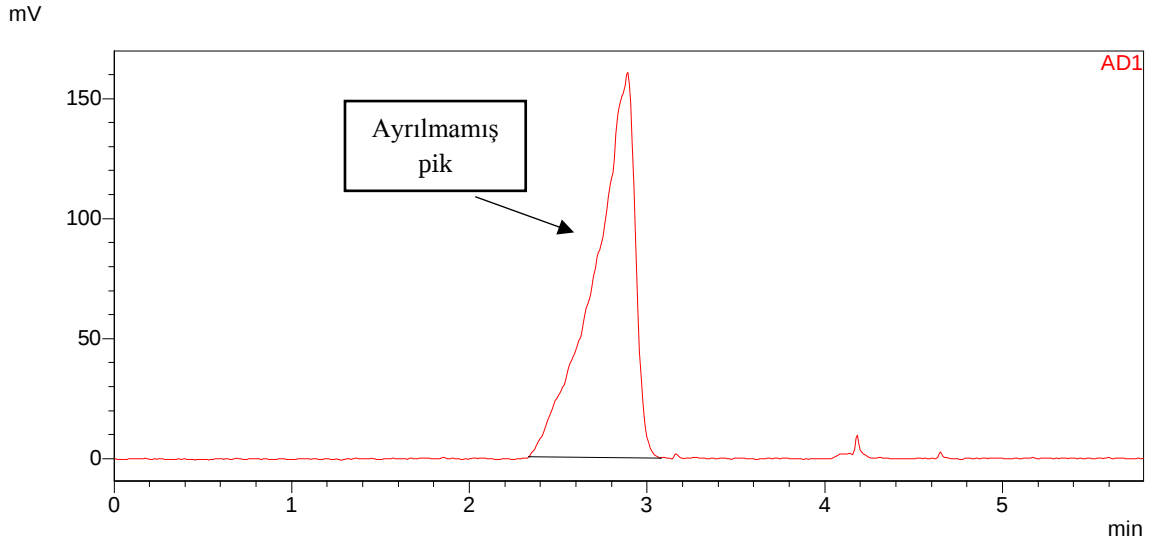
ELSD aracılığı ile MSG tayini çalışmalarına yöntem geliştirme basamağı ile başlanmıştır. YPSK-UV/DAD ve YPSK-FLD sistemleri ile gerçekleştirilen tayinlerin aksine YPSK-ELSD ile yapılan tayinlerinde MSG'nin türevlendirilmesine gerek kalmaksızın analizi gerçekleştirilerek çeşitli gıdalarda bulunan miktarı incelenmiştir. Literatürde ELSD ile L-GLU'yu da içeren amino asit tayinleri olsa da MSG tayini ile ilgili araştırmalar oldukça sınırlıdır. Kullanılan diğer detektörlere kıyasla ELSD daha çok değişkene sahiptir. Bundan dolayı mobil faz, kolon sıcaklığı değerlerinin etkisinin yanı sıra nebulazier sıcaklığı, azot gazı basınç değeri, gain (kazanç), filter (filtre), gibi parametreler incelenerek ve çeşitli denemeler yapılarak en iyi ayırım gerçekleştirilmeye çalışılmıştır.

İncelenen mobil fazlar arasında MeOH:Su (50:50, *h/h*), MeOH:Su:FA (50: 49:1, *h/h/h*), EtOH:Su (50:50, *h/h*) ile çeşitli oranlarda sahip ACN:Su ve ACN:Su:FA mobil fazları denenmiştir. İncelemelere ilk olarak MeOH:Su (50:50, *h/h*) mobil fazı başlanmıştır. Hazırlanan L-GLU ve MSG standartları incelemeler yapılmıştır. Belirtilen koşullar altında elde edilen 1000 ppm derişime sahip L-GLU standardının kromatogramı Şekil 5.23.'de gösterilmiştir.



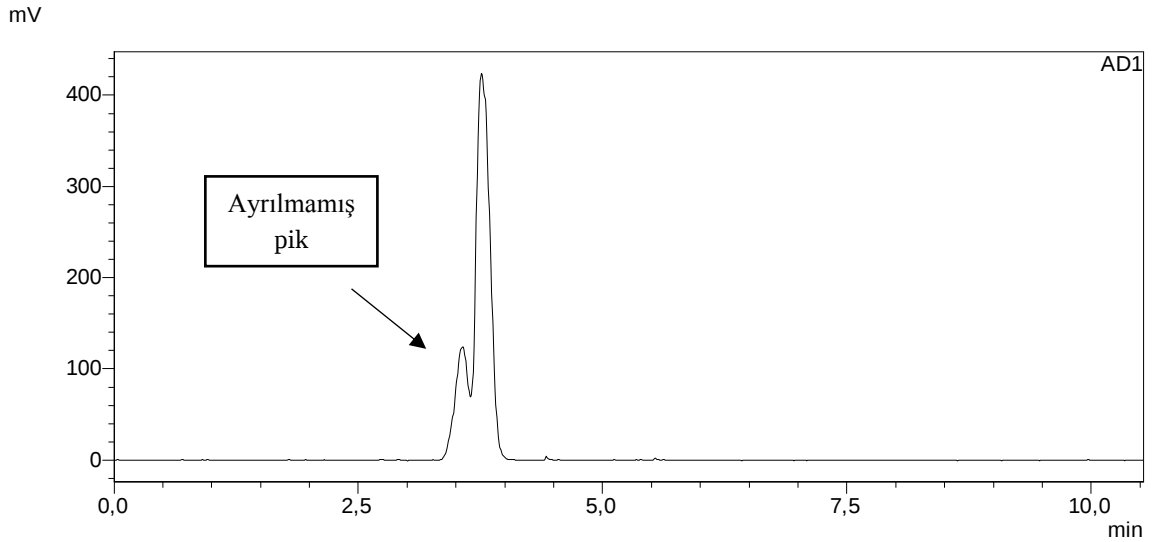
Şekil 5.23. YPSK-ELSD ile elde edilen 1000 ppm L-GLU standardı Mobil faz: MeOH:Su:(50:50, *h/h*) Nebulazier sıcaklığı: 40 °C, Gain:5 Filter:1 Azot gazı basıncı: 350 kPa

L-GLU için iyi bir sinyal gözlemlenmesine karşılık, aynı derişime sahip MSG standardı incelendiğinde iyi bir pik morfolojiye sahip olmadığı gözlemlenmiştir.

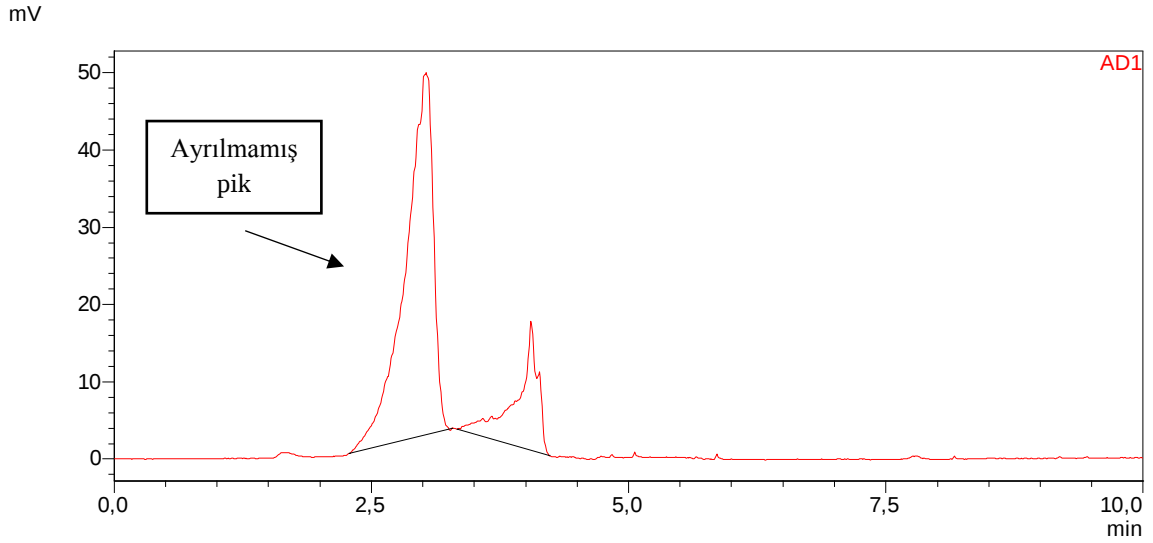


Şekil 5.24. YPSK-ELSD ile elde edilen 1000 ppm MSG standardı Mobil faz: MeOH:Su (50:50, h/h)
Nebulazier sıcaklığı:40 °C, Gain:5 Filter:1 Azot gazı basıncı: 350 kPa

MSG'nin 500 ppm derişimi için MeOH:Su:FA (50:49:1, h/h/h) ve 50 ppm derişime sahip çözeltisi için MeOH:Su (80:20, h/h) oranlarına sahip mobil fazlarda incelemeler yapılmış olup girişim yapan bir pikin olduğu Şekil 5.24., Şekil 5.25. ve Şekil 5.26.' de raporlanmıştır.

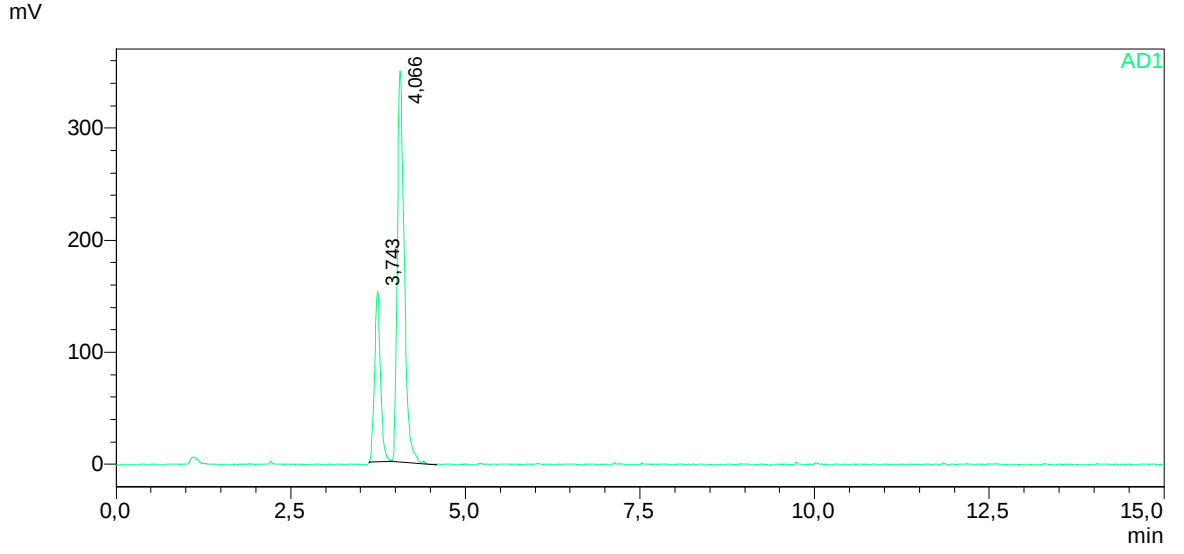


Şekil 5.25. YPSK-ELSD ile elde edilen 500 ppm MSG Mobil faz: MeOH:Su:FA (50:49:1, h/h/h)
Nebulazier sıcaklığı: 40 °C, Gain:5 Filter:1 Azot gazı basıncı: 350 kPa



Şekil 5.26. YPSK-ELSD ile elde edilen 50 ppm MSG Mobil faz: MeOH:Su:FA (50:49:1, h/h/h)
Nebulazier sıcaklığı:40 °C, Gain:5 Filter:1 Azot gazı basıncı: 350 kPa

Her ne kadar L-GLU için iyi bir sonuç elde edilse de MSG’de bu ayırım gerçekleşmediğinden dolayı farklı bir mobil faz seçimine gidilmiştir. Çeşitli oranlarda ACN ve su karışımından oluşan mobil fazlar ile incelemeler yapılmıştır. Analit ile sabit fazın etkileşimini maksimize etmek için, pH’ın hedef bileşiğin pKa’ sı dikkate alınarak gerçekleştirilmesi gerekmektedir. İlave olarak, organik asitler için en iyi ayrımlar %95 veya üstü oranında su içeren saf mobil fazlar belirli sınırlamalar oluşturmalarına rağmen tercih edilmelidir [122,123]. Sırasıyla %30, %50, %60, %85 ve %95 oranlarında su içeren ACN-Su karışımı mobil fazı ile YPSK-ELSD sisteminde L-GLU ve MSG standartları incelenmiştir. Mobil fazdaki su oranının artışı ile elde edilen kromatogramların alanları Şekil 5.27. gösterilmiştir. Bu veriler incelendiğinde en yüksek alanın %95 su oranında olması gerektiği sonucuna varılmıştır. Bu, literatür değerleri ile uyumluluk göstermektedir. Tablo 5.17. incelendiğinde sistemdeki su oranının yükseltilmesi ile elde edilen pik alanı ile doğru orantılı olduğu görülmektedir. En iyi alan ACN:Su (5:95, h/h) mobil fazında elde edilmiştir. Analizlerde daha iyi bir rezolüsyona sahip pikler elde etmek amacıyla ACN:Su (5:95, h/h) mobil fazına %1 FA ilavesi yapılmış ve bu mobil faz diğer tüm analizler için kullanılmıştır. Şekil 5.27. inceleğinde MeOH:Su (50:50, h/h) mobil fazında elde edilen girişim yapmış pike kıyasla iyi bir rezolüsyona sahip 2 pik gözlemlenmiştir.



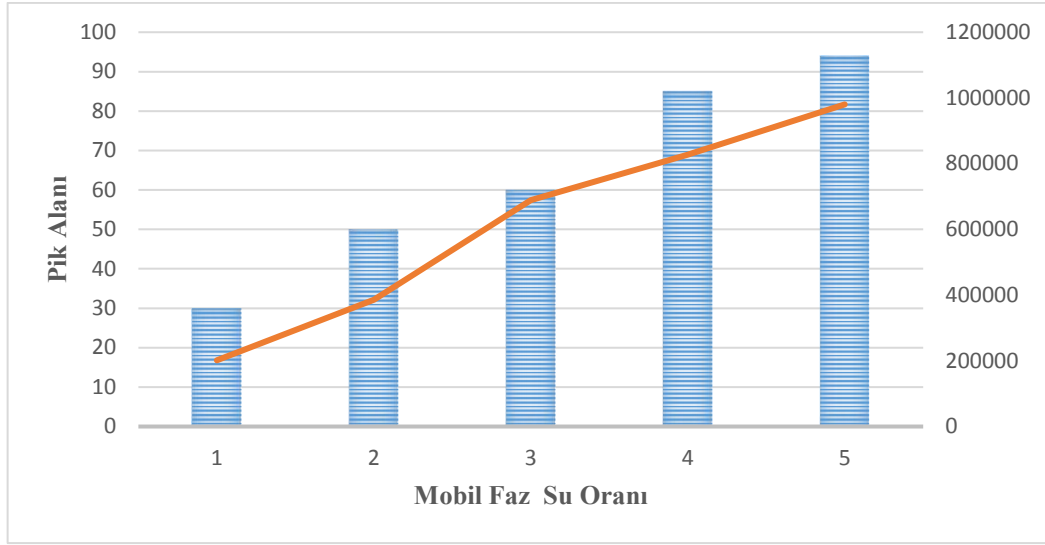
Şekil 5.27. YPSK-ELSD ile elde edilen 1000 ppm MSG kromatogramı Mobil faz: ACN:Su:FA (5:94:1, h/h/h) Nebulazier sıcaklığı: 40 °C Gain: 5 Filter: 1 Azot gazı Basıncı: 350 kPa

Mobil fazdaki su oranını artışının pik alanına olan etkisi Tablo 5.17.'de gösterilmiştir.

Tablo 5.17. Mobil faz su oranındaki değişikliğe karşı elde edilen pik alanları

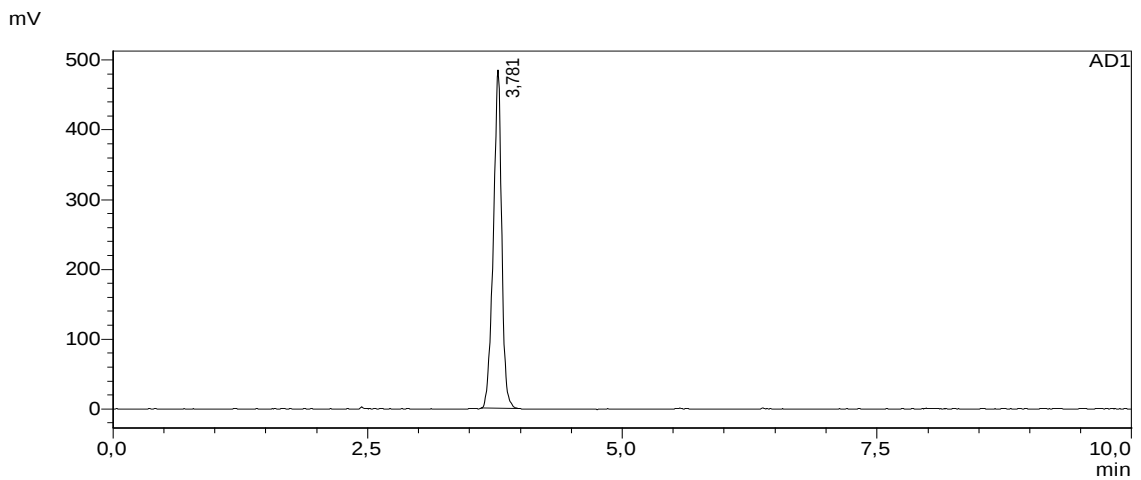
Mobil Faz Su Oranı (%)	Oluşan Pik Alanı
30	201501
50	386104
60	689003
85	827480
94	980320

Mobil fazdaki su oranını artışı ile elde edilen pik alanı doğru orantılı artış gösterdiği raporlanmıştır. Elde edilen artış Şekil 5.28.'de gösterilmiştir.

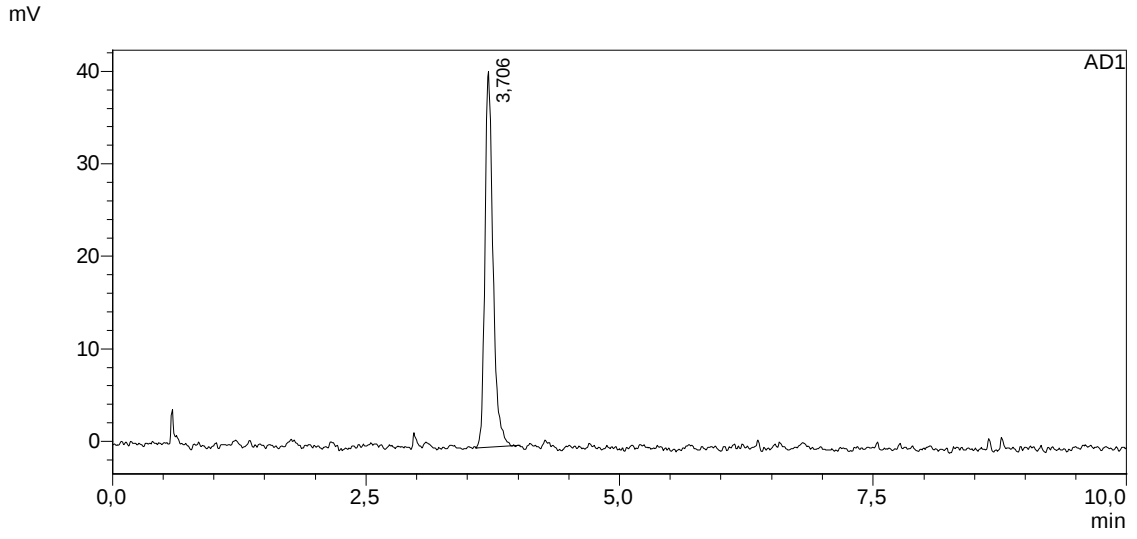


Şekil 5.28. YPSK-ELSD sisteminde kullanılan mobil fazdaki su oranı ile pik alanı arası ilişki

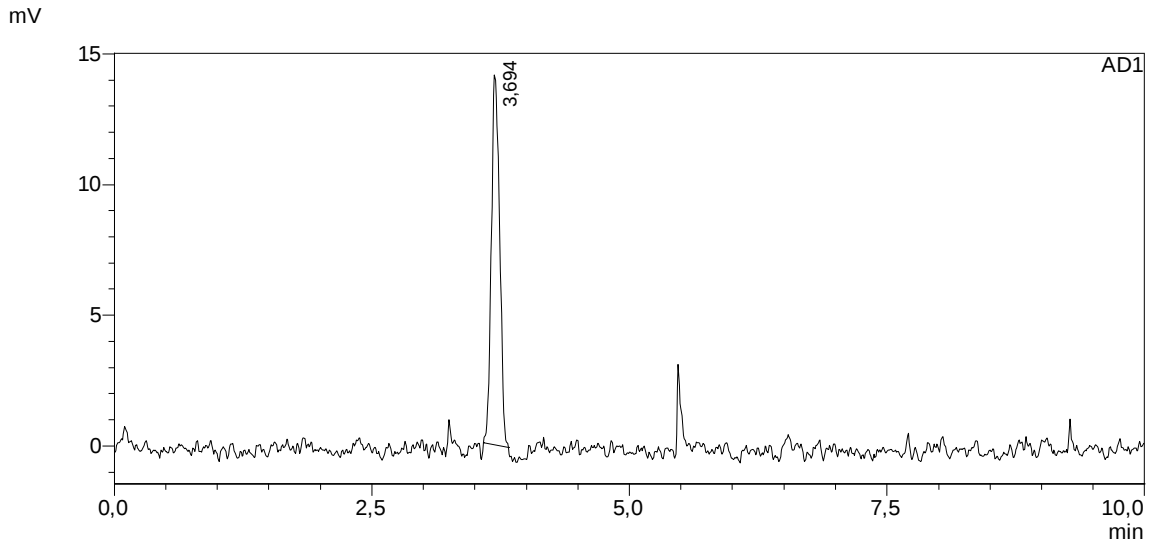
ELSD ile ilgili çalışmalarda Na^+ , SO_4^{2-} , Cl^- vb. gibi iyon analizlerinin yapıldığı ve L-Glutamik asidin Na^+ tuzu olan MSG'nin standardının YPSK-ELSD sistemine enjeksiyonu gerçekleştirildiğinde gözlenen ilk pikin Na^+ 'dan kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Bundan hareketle bu pikin Na^+ olduğuna karar vermek amacıyla YPSK-ELSD sistemine sırasıyla her birinin derişimi 10 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde NaCl , Na_2CO_3 , Na_2SO_4 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ çözeltileri hazırlanmış ve aynı koşullar altında analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu 5 çözeltilerden elde edilen alıkonma zamanları ile L- GLU ve MSG'den edilen alıkonma zamanları kaydedilerek kıyaslanmıştır. Belirtilen Na^+ bileşikleri için elde edilen kromatogramlar Şekil 5.29. ile Şekil 5.33.'de gösterilmiştir.



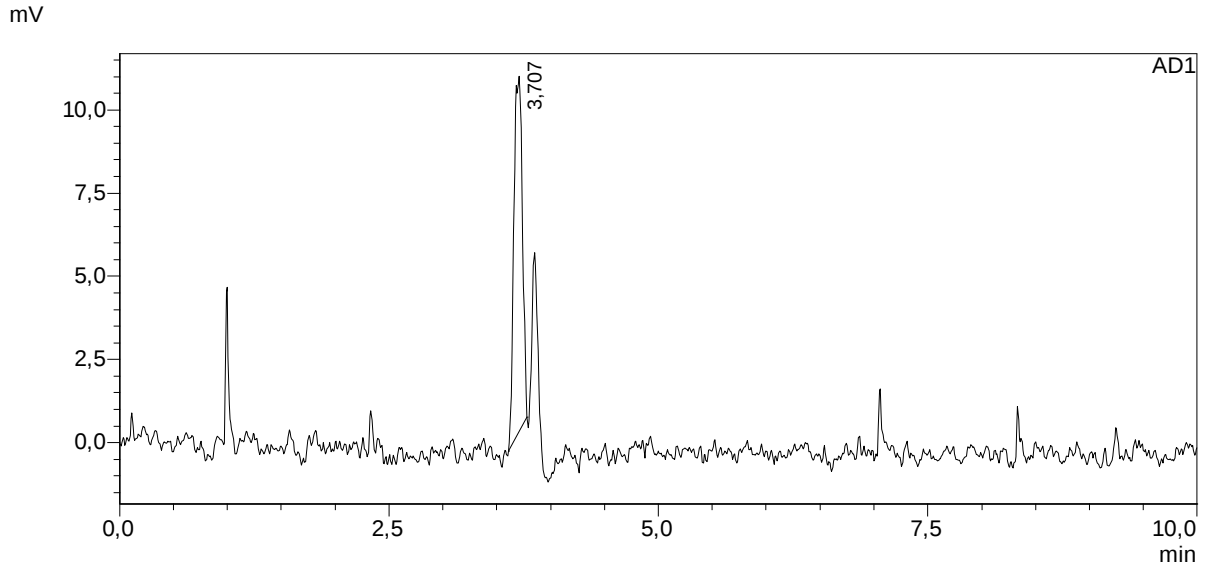
Şekil 5.29. 10 $\mu\text{g/mL}$ NaCl kromatogramı Mobil faz: ACN:Su:FA (5:94:1, h/h/h) Nebulazier sıcaklığı: 40 °C Gain: 5 Filter: 1 Azot gazı Basıncı: 350 kPa. Na^+ Alıkonma zamanı: 3,781



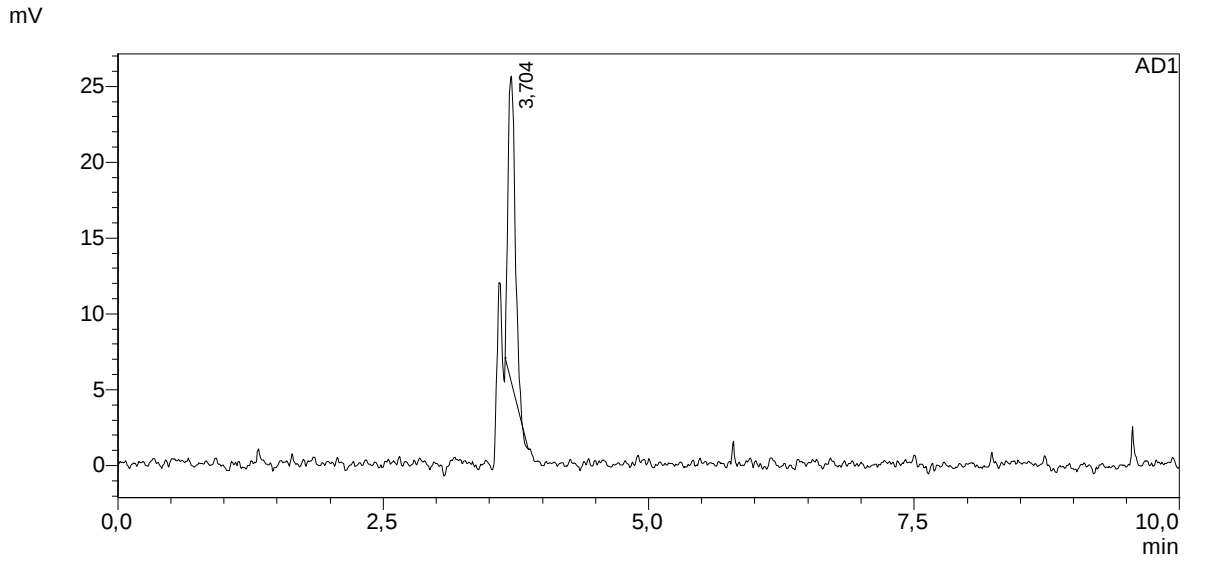
Şekil 5.30. 10 µg/mL Na_2CO_3 kromatogramı Mobil faz: ACN:Su:FA (5:94:1, h/h/h) Nebulazier sıcaklığı: 40 °C Gain: 5 Filter: 1 Azot gazı Basıncı: 350 kPa. Na^+ Alıkonma zamanı: 3,706



Şekil 5.31. 10 µg/mL $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ kromatogramı Mobil faz: ACN:Su:FA (5:94:1, h/h/h) Nebulazier sıcaklığı: 40 °C Gain: 5 Filter: 1 Azot gazı Basıncı: 350 kPa. Na^+ Alıkonma zamanı: 3,694



Şekil 5.32. 10 µg/mL $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kromatogramı Mobil faz: ACN:Su:FA (5:94:1, h/h/h) Nebulazier sıcaklığı: 40 °C Gain: 5 Filter: 1 Azot gazı Basıncı: 350 kPa. Na^+ Alıkonma zamanı: 3,707



Şekil 5.33. 10 µg/mL Na_2SO_4 kromatogramı Mobil faz: ACN:Su:FA (5:94:1, h/h/h) Nebulazier sıcaklığı: 40 °C Gain: 5 Filter: 1 Azot gazı Basıncı: 350 kPa. Na^+ Alıkonma zamanı: 3,704

Bu kromatogramlara karşılık gelen alıkonma zamanları ise Tablo 5.18’ de gösterilmiştir. Bu sonuçlar ilk gelen pikin Na^+ iyonundan kaynaklı olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 5.18. 10 µg/mL olan NaCl, Na₂CO₃, Na₂SO₄, NaH₂PO₄.2H₂O, Na₃PO₄.12H₂O ile L-GLU ve MSG standartlarının alıkonma zamanları

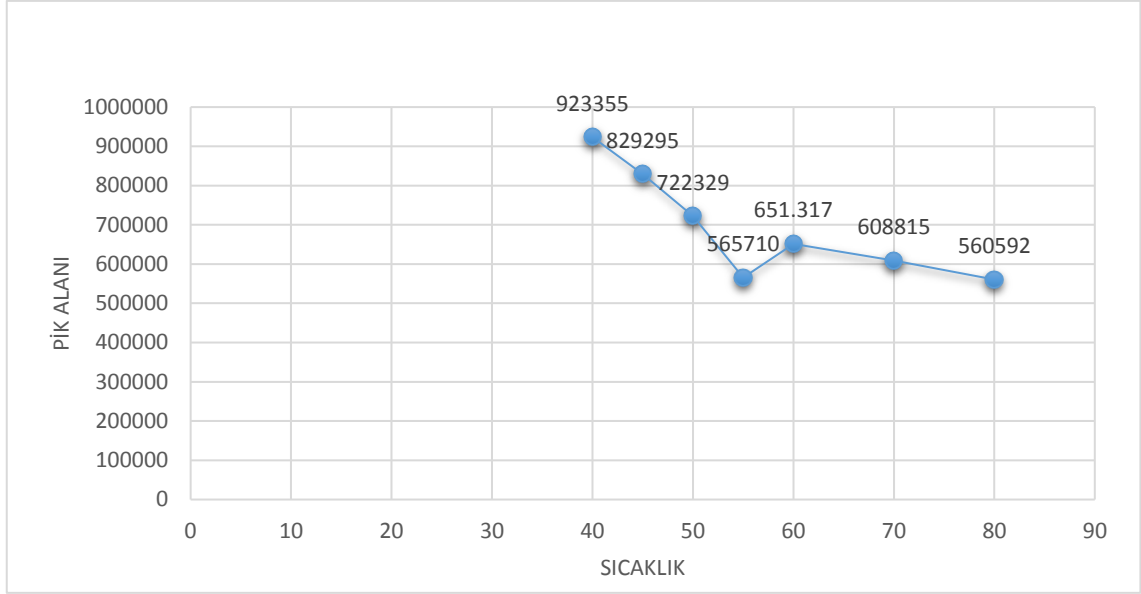
	L-GLU	MSG	NaCl	Na ₂ CO ₃	Na ₂ SO ₄	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Na ₃ PO ₄ .12H ₂ O
T_{R1} (n=3)	--	3,743	3,781	3,706	3,704	3,707	3,694
T_{R2} (n=3)	4,083	4,066	--	--	--	--	--

ELSD için bir diğer önemli parametre Nebulazier sıcaklığıdır ve en önemli parametrelerinden biridir. Sistemdeki sıcaklığının artışı ile analize olan etkisi incelenmiştir. Sıcaklık artışına karşılık gelen dedektör sinyalleri Tablo 5.19.'de gösterilmiştir.

Tablo 5.19. ELSD ile Nebulazier sıcaklık değişimi ile oluşan pik alanı değerleri

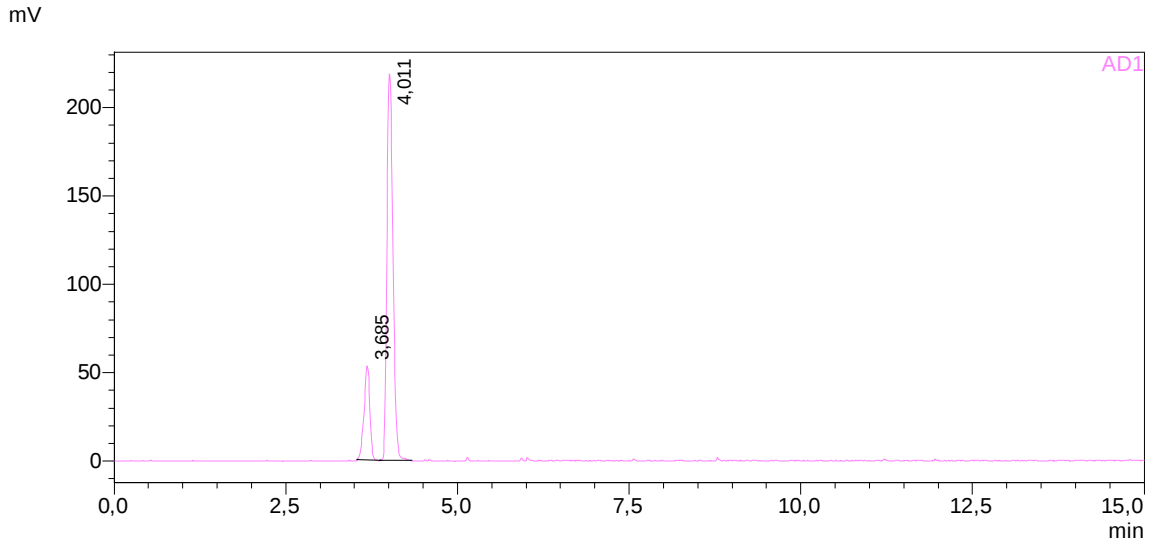
ELSD Sıcaklık (°C)	Elde Edilen Pik Alanı
40	923355
45	829295
50	722329
55	565710
60	651317
70	608815
80	560592

ELSD sıcaklığının arttırılması ile ters orantılı bir cevap alındığı Şekil 5.34. 'de görülmektedir. Bu veriler doğrultusunda Nebulazier sıcaklığının 40 °C olarak ayarlanmasına karar verilmiştir.



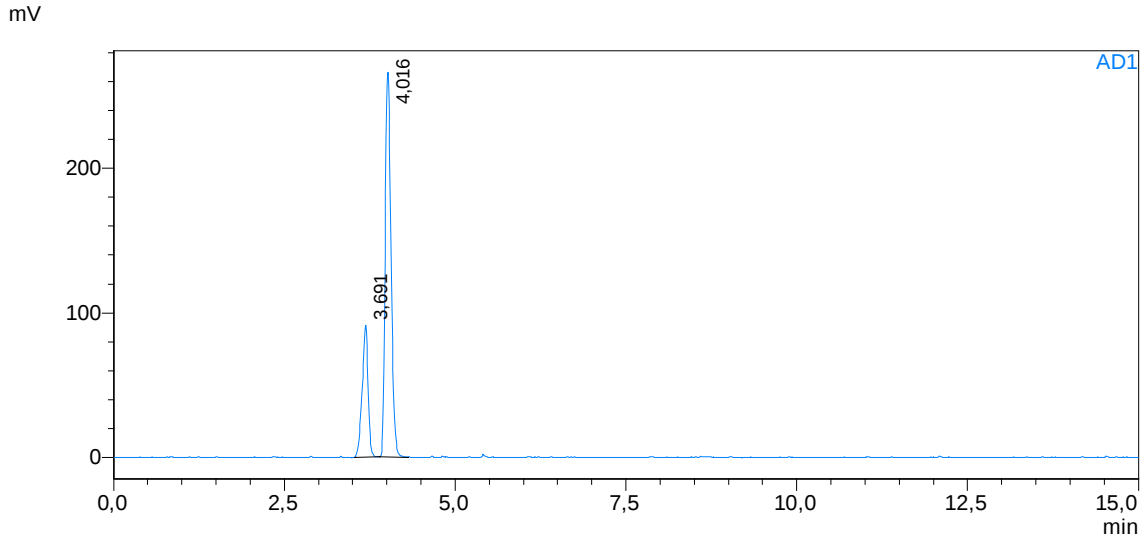
Şekil 5.34. Evaporatif ışık saçılım dedektörü sıcaklık değişimi pik-alanı ilişkisi

Sırasıyla 70 °C ve 40 °C’de elde edilen kromatogramlar Şekil 5.35. ve Şekil 5.36.’da gösterilmiştir. Bu değerler, ELSD ile yapılan çalışmalar ile uygunluk göstermektedir [112, 114, 115].



Şekil 5.35. YPSK-ELSD ile elde edilen 1000 ppm MSG kromatogramı Mobil faz: ACN:Su:FA

(5:94:1, h/h/h) Nebulazier sıcaklığı: 70 °C Gain: 5 Filter: 1 Azot gazı Basıncı: 350 kPa



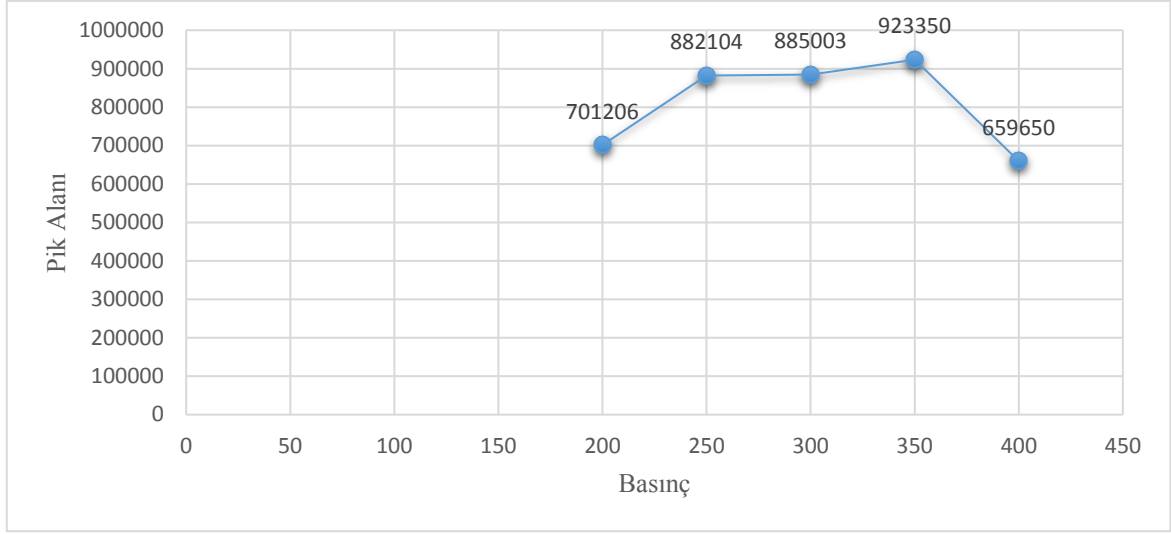
Şekil 5.36. YPSK-ELSD ile elde edilen 1000 ppm MSG kromatogramı Mobil faz: ACN:Su:FA (5:94:1, h/h/h) Nebulazier sıcaklığı: 40 °C Gain: 5 Filter: 1 Azot gazı Basıncı: 350 kPa

MSG tayini için kullanılan azot gazı basıncının, elde edilen pik alanı ve morfolojisine olan etkileri de incelenmiştir. Sırasıyla 200, 250, 300, 350, 400 kPa olarak ayarlanan azot gazı YPSK-ELSD sisteme gönderilmiş olup elde edilen pik alanları Tablo 5.20.'de gösterilmiştir.

Tablo 5.20. ELSD Azot Gazı Basıncı (kPa) değişimi ile oluşan pik alanı değişimi Mobil faz: ACN:Su:FA(5:94:1, h/h/h) Nebulazier sıcaklığı: 40 °C Gain: 5 Filter: 1 Azot gazı Basıncı: 350 kPa)

ELSD Azot Gazı Basıncı (kPa)	Elde Edilen Pik Alanı
200	701206
250	882104
300	885003
350	923350
400	659650

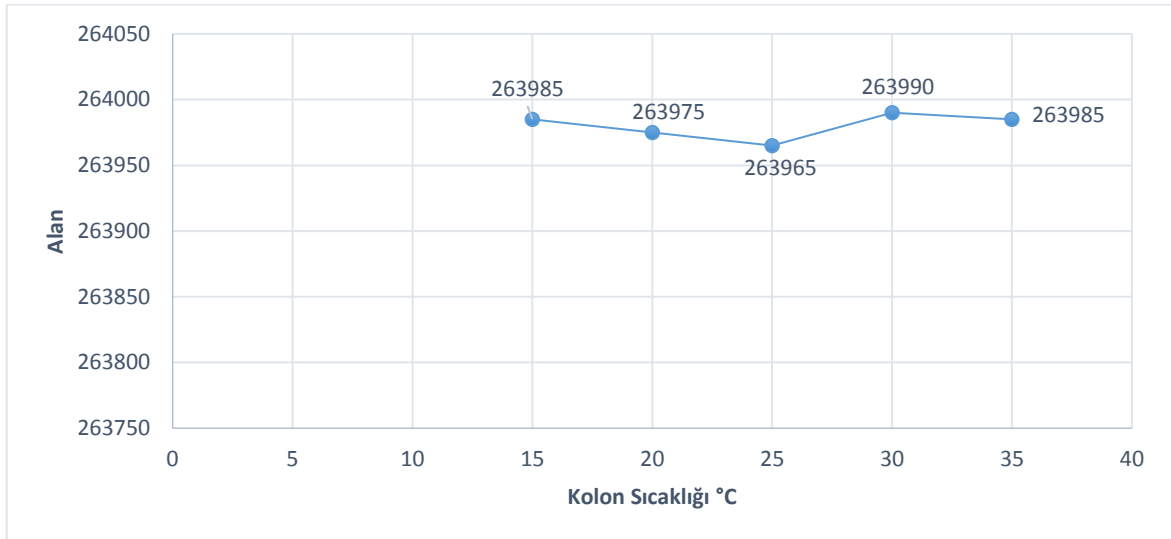
Azot gazı basıncı değişikliğine karşılık gelen alan grafiği Şekil 5.37.'de gösterilmiştir. Bu doğrultuda basıncın 350 kPa olarak ayarlanmasına karar verilmiştir.



Şekil 5.37. ELSD Azot Gazı Basıncı (kPa) değişimi ile oluşan pik alanı değişimi Mobil faz:

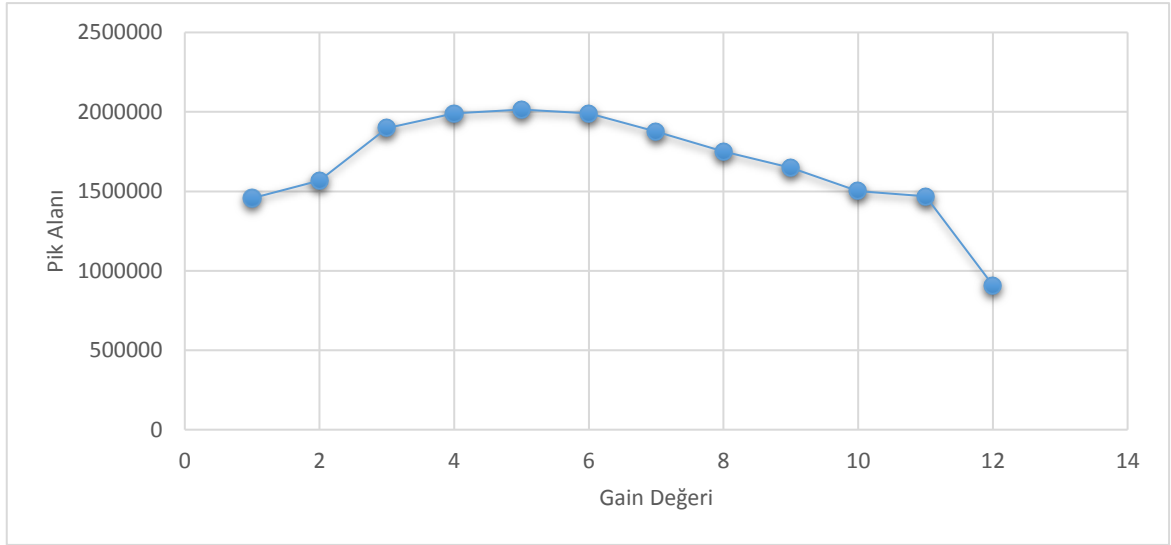
ACN:Su:FA(5:94:1, h/h/h) Nebulazier sıcaklığı: 40 °C Gain: 5 Filter: 1 Azot gazı
Basıncı: 350 kPa)

Analiz süresince ayarlanacak kolon sıcaklığının belirlenmesi için incelemeler yapılmıştır. 15 °C ile 40 °C sıcaklıkları arasında gözlemler yapılarak elde edilen kromatogramların alanları arasındaki ilişki Şekil 5.38.'da gösterilmiştir. Gözlemlenen ELSD cevabı en yüksek 30 °C'de raporlandığından dolayı bu sıcaklığın kolon sıcaklığı olarak ayarlanmasına karar verilmiştir.

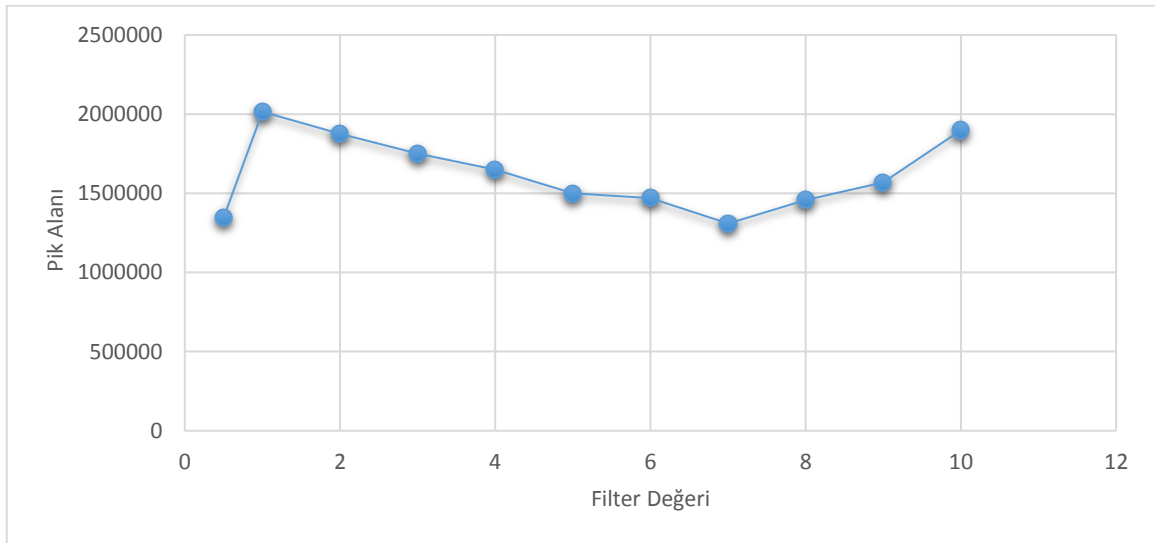


Şekil 5.38. YPSK-ELSD sisteminde kolon sıcaklığı pik alanı ilişkisi

ELSD sisteminde gain (kazanç) ve filter (filtre) parametrelerinin değışiklikleri ile analizde elde edilen farklılıklar incelenmiştir. Bu parametreler doğrudan kromatogramların simetrisini, keskinliğini ve alanını doğrudan etkileyen değlerlerdir. Yapılan analizler sonucunda kazanç değerin 5, filtre değerin 1 olması gerektiğı sonucuna varılmıştır. Bu değlerin değıştırilmesiyle elde edilen kromatogram alanlarına karşı oluşturalan grafikler, sırasıyla Şekil 5.39. ve Şekil 5.40.'de gösterilmiştir.



Şekil 5.39. YPSK-ELSD sisteminde gain değeri ELSD sinyali arasındaki ilişki



Şekil 5.40. YPSK-ELSD sisteminde filter değeri ile ELSD sinyali arasındaki ilişki

Yapılan denemelerden sonra, YPSK-ELSD ile MSG tayini Tablo 5.21.'de gösterilen koşullarda gerçekleştirilmesine karar verilmiştir. Bu bulgular ELSD parametreleri için önerilen koşullara uygunluk göstermektedir.

Tablo 5.21. YPSK-ELSD ile MSG analiz koşulları

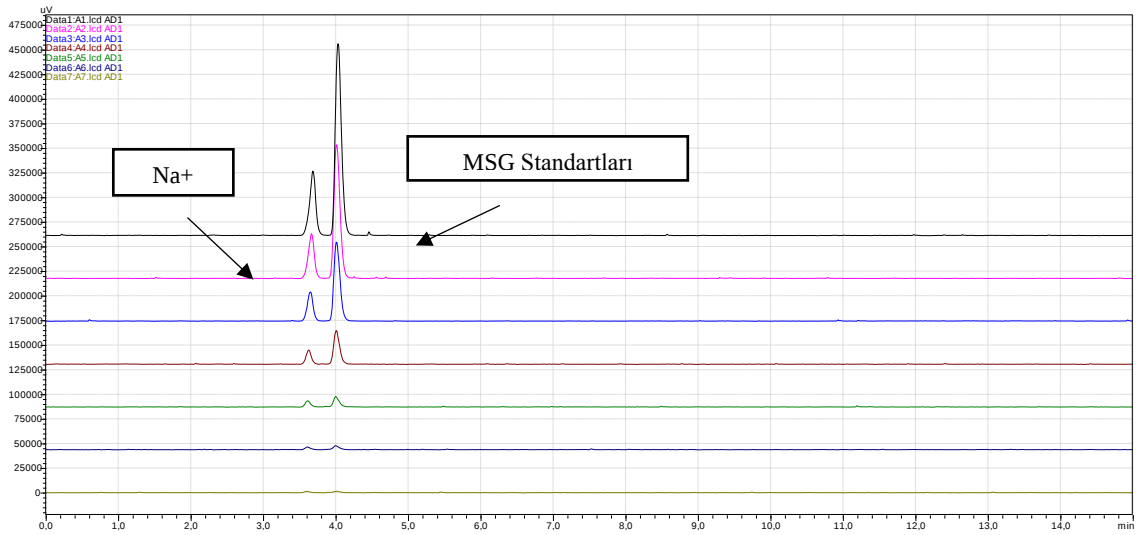
Cihaz	Shimadzu, Nexera – i (LC-2040C 3D)
Dedektör	Evaporatif Işık Saçılım Dedektörü
Mobil Faz	Su:ACN:FA (94:5:1, <i>h:h:h</i>)
Kolon	Restek Ultra AQ C18 (150 mm, 4.6mm, 3 µm) Seri no: 16021404S
Akış hızı	0.4 mL/dk
Evaporator Sıcaklığı	40 °C
ELSD Basıncı	340 kPa
Gain	5 x (16)
Filter	1
Kolon Sıcaklığı:	30 °C
Hücre Sıcaklığı:	30 °C
Enjeksiyon Hacmi:	10 µL

YPSK-ELSD sistemine enjekte edilen MSG ve L-GLU derişimleri mg/L olarak Tablo 5.22.'de verilmiştir.

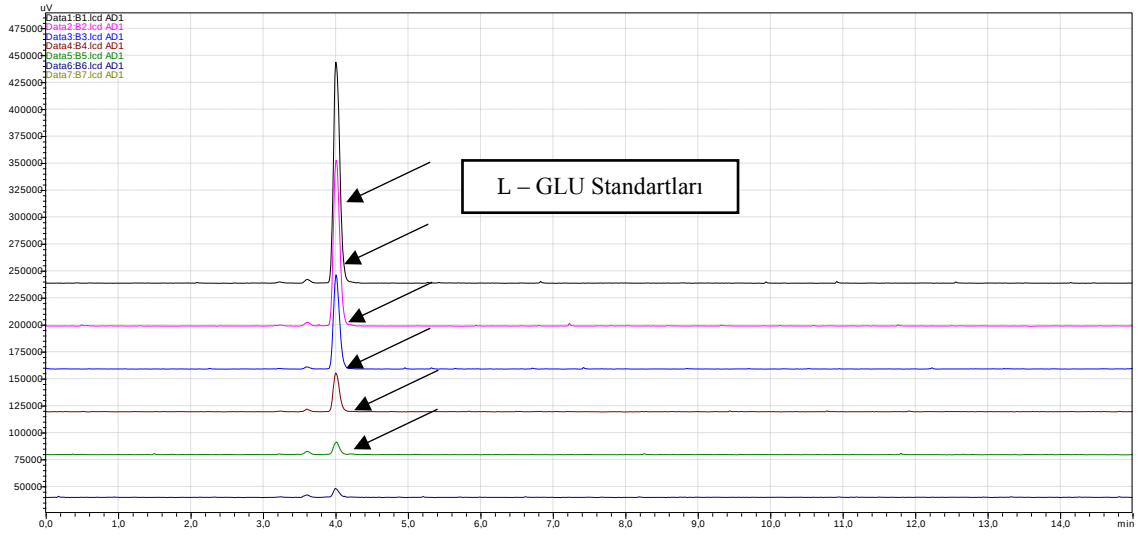
Tablo 5.22. YPSK-ELSD sistemine enjekte edilen MSG ve L-GLU derişimleri

MSG (mg/L)	L-GLU (mg/L)
1000	1000
750	750
500	500
250	250
100	100
50	50
25	25

Tablo 5.22.'de belirtilmiş olan derişimlerde hazırlanan L-GLU ve MSG standartları Tablo 5.21.'de belirtilen koşullar altında YPSK-ELSD sistemine verilmiştir. Elde edilen kromatogramlar Şekil 5.41. ve Şekil 5.42.'de gösterilmiştir.



Şekil 5.41. 1000 ppm – 25 ppm arası elde edilen MSG standart kromatogramları Mobil faz: ACN:Su:FA (5:94:1, h/h/h) Nebulazier sıcaklığı: 40 °C Gain: 5 Filter: 1 Azot gazı Basıncı: 350 kPa



Şekil 5.42. 1000 ppm – 25 ppm arası elde edilen L-GLU standart kromatogramları Mobil
faz: ACN:Su:FA (5:94:1, h/h/h) Nebulazier sıcaklığı: 40 °C Gain: 5 Filter:1 Azot gazı
Basıncı:350 kPa

Tablo 5.21.'de gösterilen koşullar altında Na⁺ ve L-GLU için elde edilen değerler, pik alanları ve ortalama alıkönma zamanları Tablo 5.23.'de gösterilmiştir.

Tablo 5.23. YPSK-ELSD sistemi ile MSG standartları ile elde edilen alanları ile alıkonma zamanları

MSG Derişimi (mg/L)	Na ⁺		L-GLU		Ortalama Alıkonma zamanı	Toplam Alan
	Alıkonma zamanı (t _{R1})	Alan	Alıkonma zamanı (t _{R2})	Alan		
1000	3,686	380020	4,034	1262133	t _{R1} =3,637 t _{R2} =4,011	1542152
750	3,667	264317	4,013	808728		1073046
500	3,652	166251	4,012	473650		639901
250	3,629	73739	4,009	195233		268971
100	3,616	33096	4,001	61518		94613
50	3,609	14609	3,998	26172		40780
25	3,604	7578	4,016	9510		17088
10	3,654	2284	3,997	1766		6852

Oluşan damlacıklar evaporatif ışık saçılım süreci boyunca azalmaktadır ancak sabit damlacık büyüklüğünü elde etmek bu süreç boyunca önem arz etmektedir. Daha büyük damlacıklar daha büyük buharlaştırma sıcaklığını beraberinde getirir ancak daha önemli olan bir şey var ki o da ışık saçılım yoğunluğudur. ELSD spektroskopik bir dedektör olmadığı için Lambert – Beer yasasına uymaz. Madde konstantrasyonu ile pik alanı arasındaki ilişli doğrusal değildir çünkü ELSD derişimden ziyade partikül büyüklüğü ile orantılı bir dedektör cevabı söz konusudur. Bu durum logaritmik bir fonksiyon ile açıklanır. Işık saçılım olayı partükül büyüklüğünden etkilenen 3 matematiksel terim ile açıklanır. Gözlenen pik alanı A , m kütle, a ve b damlacık büyüklüğü, derişim, gaz akış hızı ve sıcaklığa bağlı olarak değişen katsayıları ifade eder [116].

$$A = am^b \quad (5.1.)$$

Cevabın eğimi b iken a ELSD cevap faktördür. A ve m için logartitmik değerler doğrusal bir denklem oluşturur [117,118]. Yani bu eşitliği şöyle ifade edilebilir;

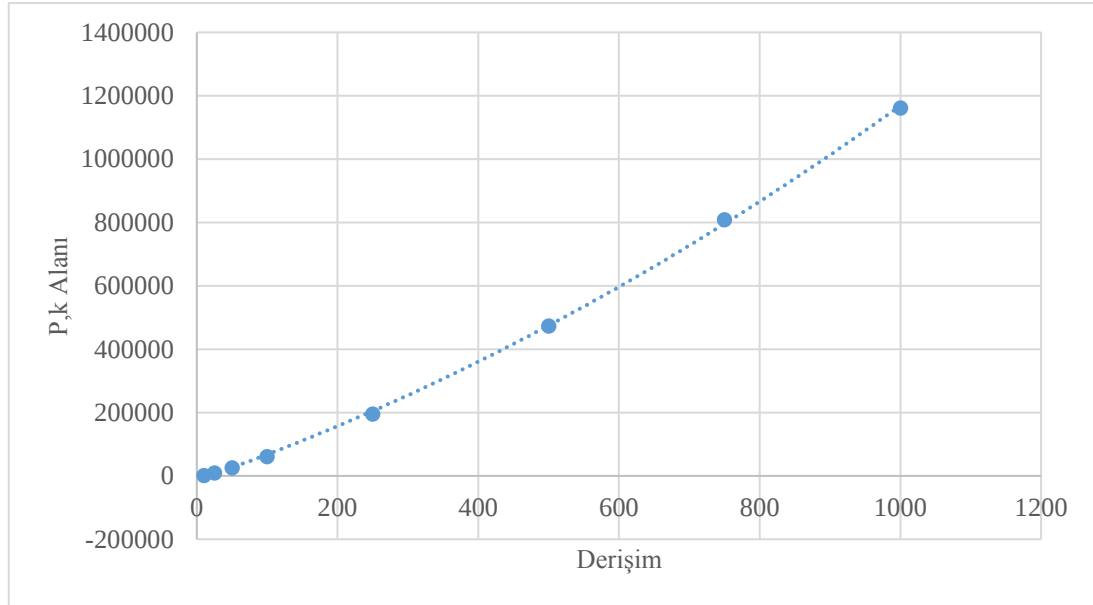
$$\log A = b \log m + \log a \quad (5.2.)$$

Pik alanına karşılık gelen değerin $\log_{10}(A)$ ile MSG miktarına karşılık gelen değerin $\log_{10}(m)$ oranı bize doğrusal bir denklem vermiştir. Elde edilen değerler Tablo 5.24.'de gösterilmiştir.

Tablo 5.24. Sisteme enjekte edilen MSG derişimlerinin logaritmaları ile elde edilen alanların logaritma değerleri

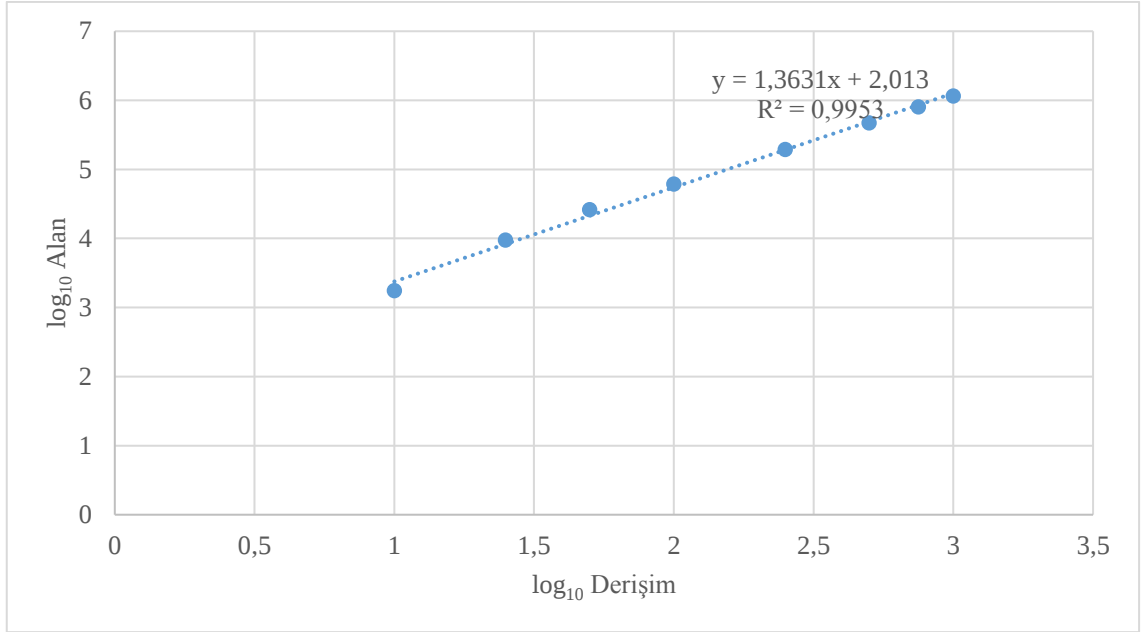
MSG Derişimi (mg/L)	Enjekte edilen derişim $\log_{10}$ (mg/L)	Elde edilen Alan	$\log_{10}$ (Toplam pik Alanı)
1000	3	1162133	6,0652558
750	2,875	808728	5,9078025
500	2,698	473650	5,6754575
250	2,397	195233	5,2905532
100	2	61518	4,7890022
50	1,698	26172	4,4178369
25	1,397	9510	3,9781805
10	1	1766	3,2469907

ELSD sisteminde kolona enjekte edilen madde miktarı Lambert – Beer yasasına uymadığı için doğrusal bir denklem elde edilmemiştir. Elde edilen grafik Şekil 5.43.’de gösterilmiştir.



Şekil 5.43. YPSK-ELSD ile elde edilen derişim – alan grafiğı

Tablo 5.24.’de elde edilen değerler ile kalibrasyon grafiğı oluşturulmuştur. Alanların ve MSG derişimlerine karşılık gelen değerlerin logaritmaları ile elde edilen grafik Şekil 5.44.’de gösterilmiştir.



Şekil 5.44. YPSK-ELSD ile elde edilen $\log_{10}$ derişim – $\log_{10}$ pik alanı grafiği

5.3.1. YPSK-ELSD ile SUT alışmaları

Standart özeltilerin analiz işlemleri gerçekleştirildikten sonra SUT çalışmalarına başlanmıştır. Bu alışmalar sonucunda elde edilen alıkönma zamanı, kuyruklanma faktörü (T), ayırım gücü R_s , kapasite faktörü, seçicilik Faktörü (α), teorik tabaka sayısı (N), asimetri faktörü (A_s), pik yüksekliğinin / alanın tekrar edilebilirliği (%BSS) değerleri Tablo 5.25.'de gösterilmiştir.

Tablo 5.25. SUT çalışmaları sonuçları, Mobil faz: ACN:Su:FA (5:94:1, h/h/h)Kolon: RaptorTM C18 (150x4.6mm.,3 µm)

Parametre	Elde edilen değer	Elde edilen değer	Olması gereken/tavsiye edilen değer
	(L-GLU)	(MSG)	
Alıkonma zamanı	4,009	4,011	-----
Kuyruklanma faktörü (T)	0,97	0,89	T<2
Ayırım gücü R _s	9,97	1,13	R _s > 2,0
Kapasite faktörü	6,42	2,14	k'>2
Seçicilik Faktörü (α)	1,28	1,11	α >1
Teorik Tabaka Sayısı (N)	2306	2579	N>2000
Asimetri Faktörü (A _s)	1,02	1,04	A _s =0,95-1,2
Pik yüksekliğinin veya alanın tekrar edilebilirliği (%BSS)		<1.5	%BSS < 1,5

Yapılan SUT testleri sonuçlarına göre elde edilen değerler iyi bir ayırım gerçekleştirildiğini gösterir niteliktedir. Geliştirilen yöntem, ICH tarafından yayınlanan kılavuzda belirtilen öneriler doğrultusunda bölüm 4.3.2.2.'de belirtilen şekilde valide edilmiştir.

5.3.2. YPSK-ELSD sistemi ile yapılan doğruluk çalışmaları

Geliştirilen yöntemdeki doğruluk çalışmaları, zenginleştirme (spike) işlemi uygulanarak geri kazanım değerlerinin ölçülmesiyle değerlendirilmiştir. Her bir konstantasyon için 3'er analiz yapılarak sonuçların ortalamaları alınarak yapılmıştır. Bu koşullar altında elde edilen geri kazanım, standart sapma ve %RSD değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen bu değerler Tablo 5.26.'da gösterilmiştir.

Tablo 5.26. Standart MSG çözeltilerine zenginleştirme (spiked) işlemi uygulanarak elde edilen geri kazanım değerleri

Numune	Derişim (ng/mL)	Zenginleştirme (Spike) edilen miktarı (ng/mL)	Ortalama Geri Kazanım (ng/mL)	Geri Kazanım Değerlerinin Standart Sapması ^a	Geri Kazanım (%)	Ortalama Geri kazanım (%)
Standart MSG	50	10	9,75	0,52	97,5	98,56
	100	25	25,2	0,58	100,8	
	150	50	48,7	0,79	97,4	

5.3.3. YPSK-ELSD sistemi ile yapılan kesinlik çalışmaları

500 ppm MSG tayininde YPSK-ELSD sistemi ile elde edilen sonuçlar, gün içi ve günler arası olacak şekilde 5'şer set hazırlanmıştır. Her bir gruptan elde edilen değerlerin ortalaması, SS ve %BSS değerleri Tablo 5.27.'de gösterilmiştir.

Tablo 5.27. 500 ppm MSG standart çözeltisinden elde edilen gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları değerlendirmesi

	1.gün (n=5)	2.gün(n=5)	3.gün(n=5)	Günler arası (n=15)
Ortalama derişim (ppm)	497,7	498,6	498,2	498,1
SS	0,755	0,332	0,550	0,545
%BSS	0,151	0,066	0,110	1,109
Güven aralığı $\alpha= 0.05$	49.54 $\pm$ 0,266	49,46 $\pm$ 0,244	49,52 $\pm$ 0,250	49,50 $\pm$ 0,253

5.3.4. YPSK-ELSD ile yapılan seçicilik çalışmaları

Daha önce yapılan yöntemlerde olduğu gibi, seçicilik faktörü olan α değerinin 1'den büyük olması referans olarak alınmıştır. Tablo 5.25.'de gösterildiği üzere SUT değerlendirilmesinde elde edilen sonuçlar referans değere uygunluk gösterir niteliktedir.

5.3.5. YPSK-ELSD ile yapılan doğrusallık çalışmaları

MSG tayini için geliştirilen YPSK-FLD yönteminde çalışma aralıklarının belirlenmesinde numunelerden elde edilebilecek sinyal büyüklükleri ve gürültü etkileri

göz önüne alınmıştır. 25 ppm – 1000 ppm derişimleri aralığında hazırlanan standart çözeltilerden analizler yapılarak gün içi ve günler arası olacak şekilde doğrusallık çalışmaları yapılmıştır. Gün içi ve günler arası olarak incelenen bu değerler eğim, korelasyon katsayısı ve %95 güven seviyesindeki olası sınırları belirlenmiştir. YPSK- ELSD ile yapılan doğruluk çalışmalarının günlere göre sonuçları Tablo 5.28.'de verilmiştir.

Tablo 5.28. YPSK-ELSD ile yapılan doğrusallık çalışma sonuçları

Parametre	1.gün	2.gün	3.gün
Çalışma aralığı (mg/L)	10 ppm – 1000 ppm		
Eğim	1,3631	1,3713	1,3742
r ²	0,9953	0,9926	0,9917
SS	0,045	0,019	0,024
LOQ (mg/L)	0,055	0,043	0,052
LOD (mg/L)	0,183	0,145	0,174

5.3.6. YPSK-ELSD ile yapılan sağlamlık çalışmaları

MSG tayini için geliştirilen YPSK-ELSD yöntemi için sağlamlık çalışmalarının değerlendirilmesi, önceki yöntemlerde olduğu gibi sistemin akış hızı, kolon sıcaklığı, hareketli faz yüzdelerinin değişikliklerinin sonuçlara olan etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.29.'da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre %BSS <2 olması yöntemin sağlamlık açısından uygun olduğunun göstergesidir.

Tablo 5.29. YPSK-ELSD yöntemi ile sağlamlık testinden elde edilen sonuçlar (*önerilen referans değer<2)

Değişiklik yapılan Parametre	1.Deneme	2.Deneme	3.Deneme	%BSS*
Akış hızı (mL/dk)	0,3	0,4	0,5	0,92
Kolon sıcaklığı (°C)	29	30	31	0,85
Hareketli fazda bulunan organik çözelti (%)	4	5	6	0,54

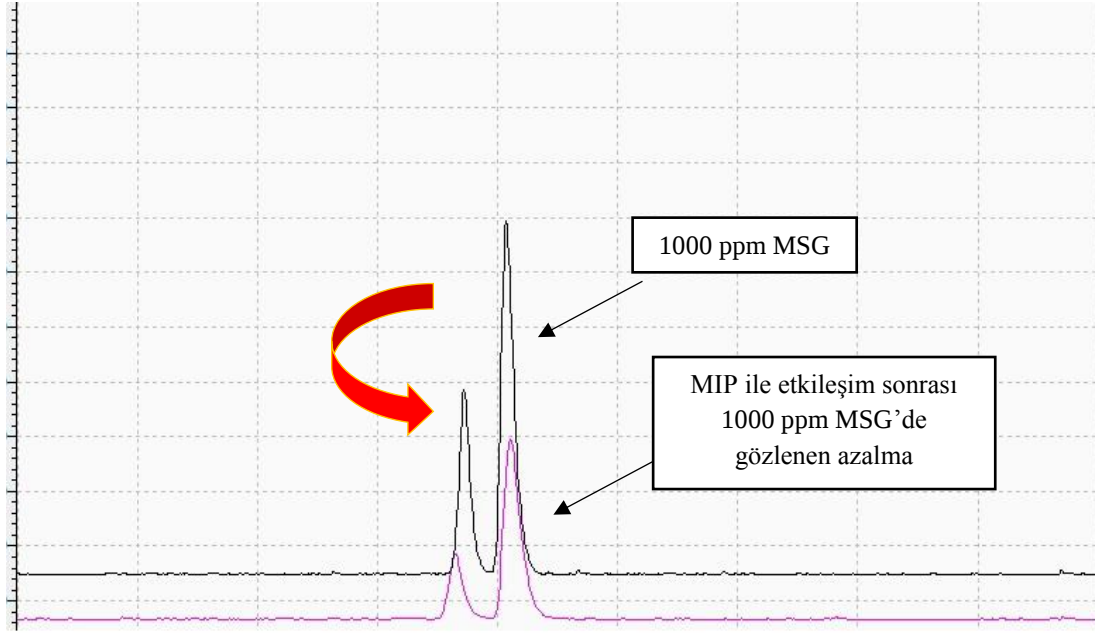
5.4. Moleküler Baskılanmış Polimer (MIPs) ile L-GLU ve MSG'nin Saflaştırma Çalışmaları

MSG' ye özgü MIP'lerin sentezlenme işlemi gerçekleştirilmiştir. Kısım 4.4.'te anlatıldığı gibi sentezlenen MIP'in kurutma işleminden sonra vial'e aktarılmış hali Görsel 5.1.'de gösterilmiştir.



Görsel 5.1. MSG'ye özgü sentezlenen MIP (yıkama işlemi öncesi ve kurutulmuş hali)

YPSK-ELSD sistemine 1000 ppm MSG ve sentezlenen MIP ile etkileşime giren kısım Tablo 5.21.'deki koşullar altında sisteme verildi. Tüm çözeltiler 0,22 μm 'luk gözenek boyutuna sahip PVDF şırınga filtreden geçirilmiştir. MSG'nin MIP ile etkileşimden önce ve sonra elde edilen kromatogramları incelendiğinde, pik şiddetinde azalma olduğu gözlemlenmiştir. İlgili kromatogramların kıyaslanması Şekil 5.45.'de gösterilmiştir. Bu sonuç sentezlenen MIP'in MSG'ye seçici olduğunu gösterir niteliktedir.



Şekil 5.45. 1000 ppm MSG'nin MIP ile etkileşimden önce ve sonra elde edilen YPSK-ELSD kromatogramı Mobil faz: Su:ACN:FA (94:5:1, h/h/h) Nebulazier sıcaklığı: 40 °C Gain: 5 Filter: 1 Azot gazı Basıncı: 350 kPa

Kromatogramlardaki alanlar incelendiğinde MIP'ın MSG moleküllerini adsorbe ettiğini ve g polimer başına 180 mg bağlandığı Tablo 5.30.'da olduğu gibi elde edilmiştir. Bu alan olark %17,57'lik bir alan azalmaya karşılık gelmektedir. Toluen:ACN (80:20, h/h) karşımından elde edilen MIP ile yapılan gözlemlerde ise istenilen tutunma elde edilmemiştir.

Tablo 5.30. 1000 ppm MSG'nin MIP ile muamele edilmesinden sonra elde edilen Q ve (%) azalma değerleri

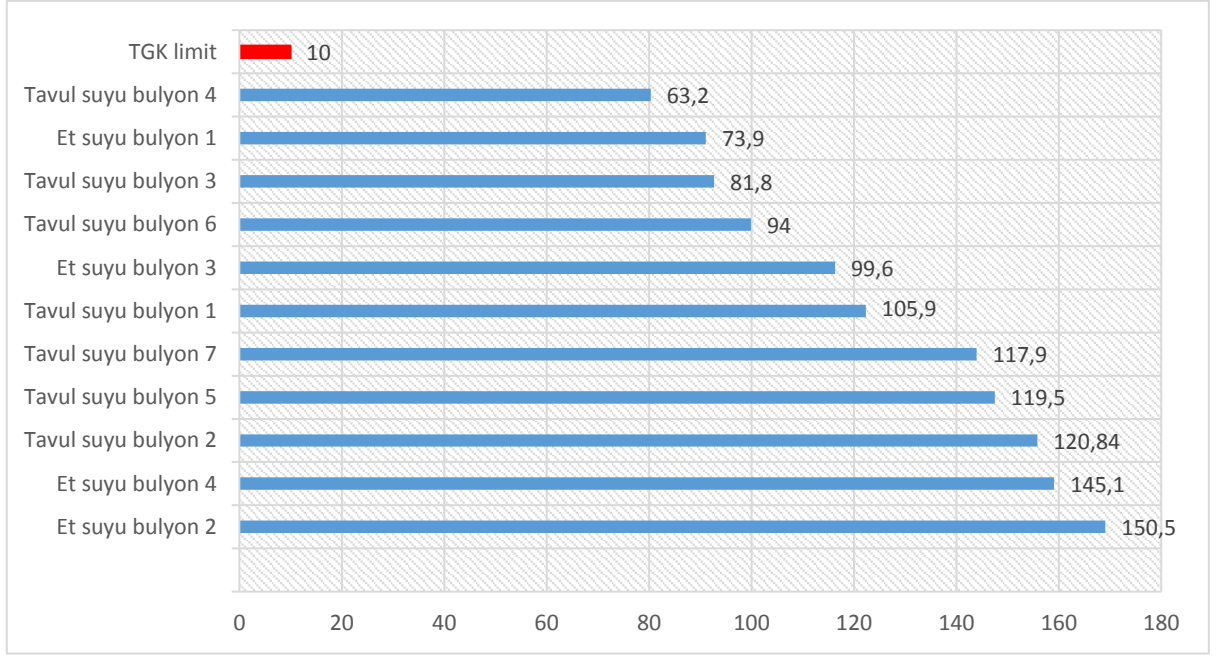
MSG'nin MIP ile etkileştirme sonrası gözlenen azalma (%)	17,57
Q (mg/g)	180

Bu uygulama MSG'nin uzaklaştırılması için alternatif bir uygulama örneği oluşturmaya yardımcı olmak için uygulanabilecek bir yöntem olarak nitelendirilebilir.

6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

İncelenen patates cipsi, mısır cipsi, hazır çorba, et ve tavuk bulyonlar, pizza sosları, çiğ köfteler içerisinde bulunan MSG miktarlarının tayini, doğru, hassas, hızlı, kesin ve tekrarlanabilir niteliğe sahip yöntemler ile gerçekleştirilmiştir. YPSK-UV/DAD sistemi ile gerçekleştirilen MSG tayini ile elde edilen sonuçlar ile YPSK-FLD sistemi ile elde edilen sonuçlar ile uyumluluk göstermektedir. YPSK-ELSD sistemi ile gerçekleştirilen L-GLU ve MSG analizlerinin, uygulanan diğer yöntemlere kıyasla daha hızlı, pratik ve daha az sarfiyat gerektiren bir uygulama olduğu belirlenmiştir. Ayrıca YPSK-UV/DAD sistemi ile MSG'nin türevlendirme süresi her ne kadar YPSK-FLD yöntemine göre kısa olsa da LOD ve LOQ değerleri incelendiğinde FLD ile yapılan çalışmalar hassasiyet bakımından öne çıkmaktadır. Aynı şekilde MSG'nin ELSD ile türevlendirmeye gerek kalmadan tayininin gerçekleştirilmesi, aralarında en hızlı ve pratik yöntem olarak göze çarpmaktadır.

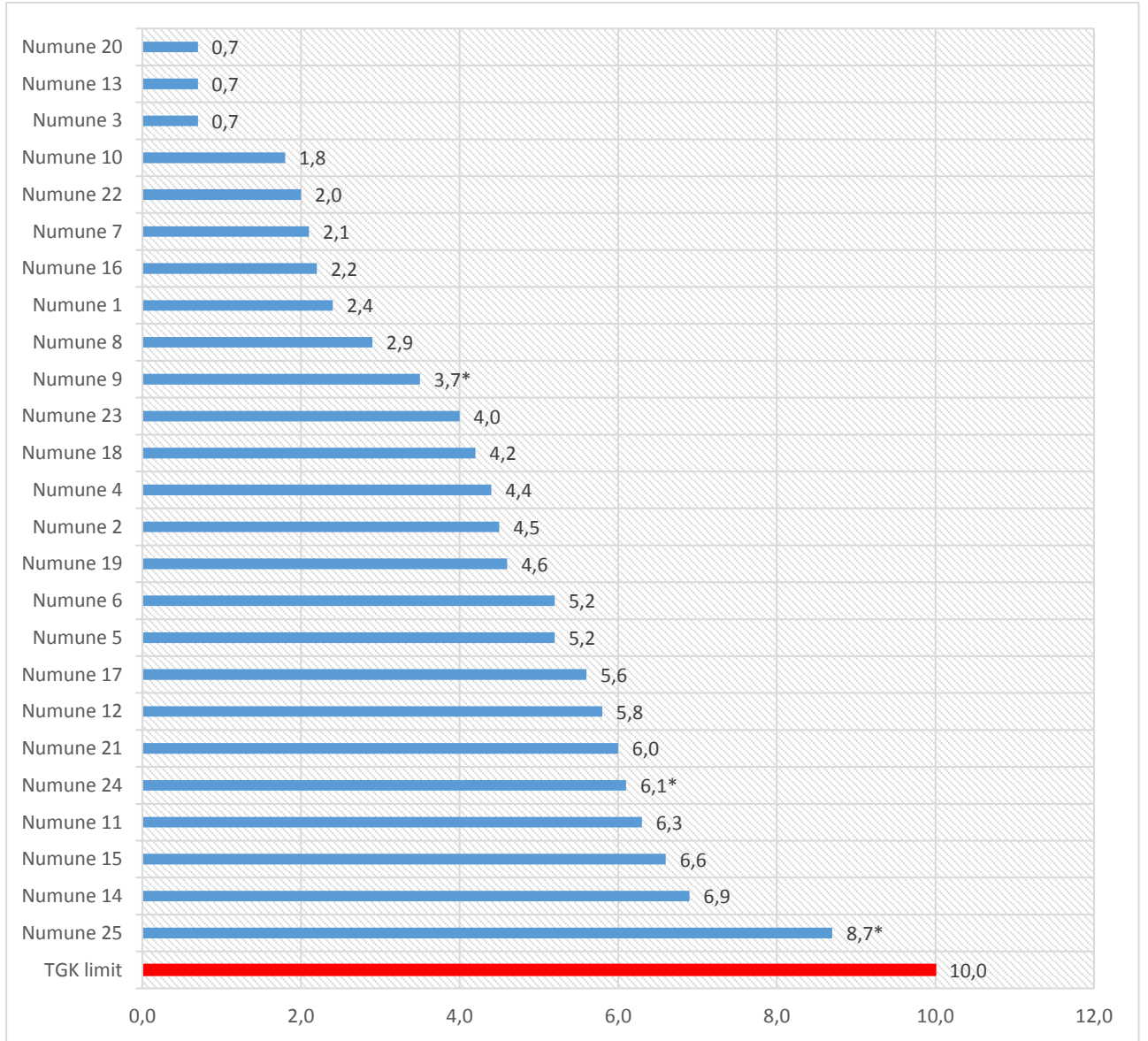
Tavuk suyu bulyon ve et suyu bulyonlarda bulunan ortalama MSG miktarları 63,2 g/kg ile 150,5 g/kg aralığında olduğu görülmektedir. Türk standardı TS 13424'ye bulyon tipi lezzet artırıcıları ile akıcı veya yarı akıcı haldeki sosları kapsamaz hükmüne göre değerlendirildiğinde, et ve tavuk bulyonların içerisinde koyulan miktarların fazla olduğu göze çarpmaktadır. Bulyonlar için bir sınırlama olmaması bu durumun nedeni olarak düşünülmektedir. Elde edilen bu sonuçlar Wafaa M. ve diğerleri ile Andarwulan N. ve diğerleri tarafından yapılan çalışmalara ile uyumluluk göstermektedir [35,68]. Et bulyonlarda tavuk bulyonlara göre daha yüksek miktarda MSG miktarı gözlemlenmiştir. Bulunan bu yüksek değerler göz önüne alındığında kullanılabilecek maksimum MSG miktarı 10 g/kg olarak sınırlandırılması daha uygun olacağı düşünülmektedir. İncelenen et ve tavuk bulyonların tamamında kullanılan MSG değeri TGK yönetmeliğine göre olması gereken değer üzerinde olduğu belirlenmiştir. Elde edilen MSG miktarları Şekil 6.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 6.1. Et ve tavuk bulyonlarda tespit edilen MSG miktarları (g/kg)

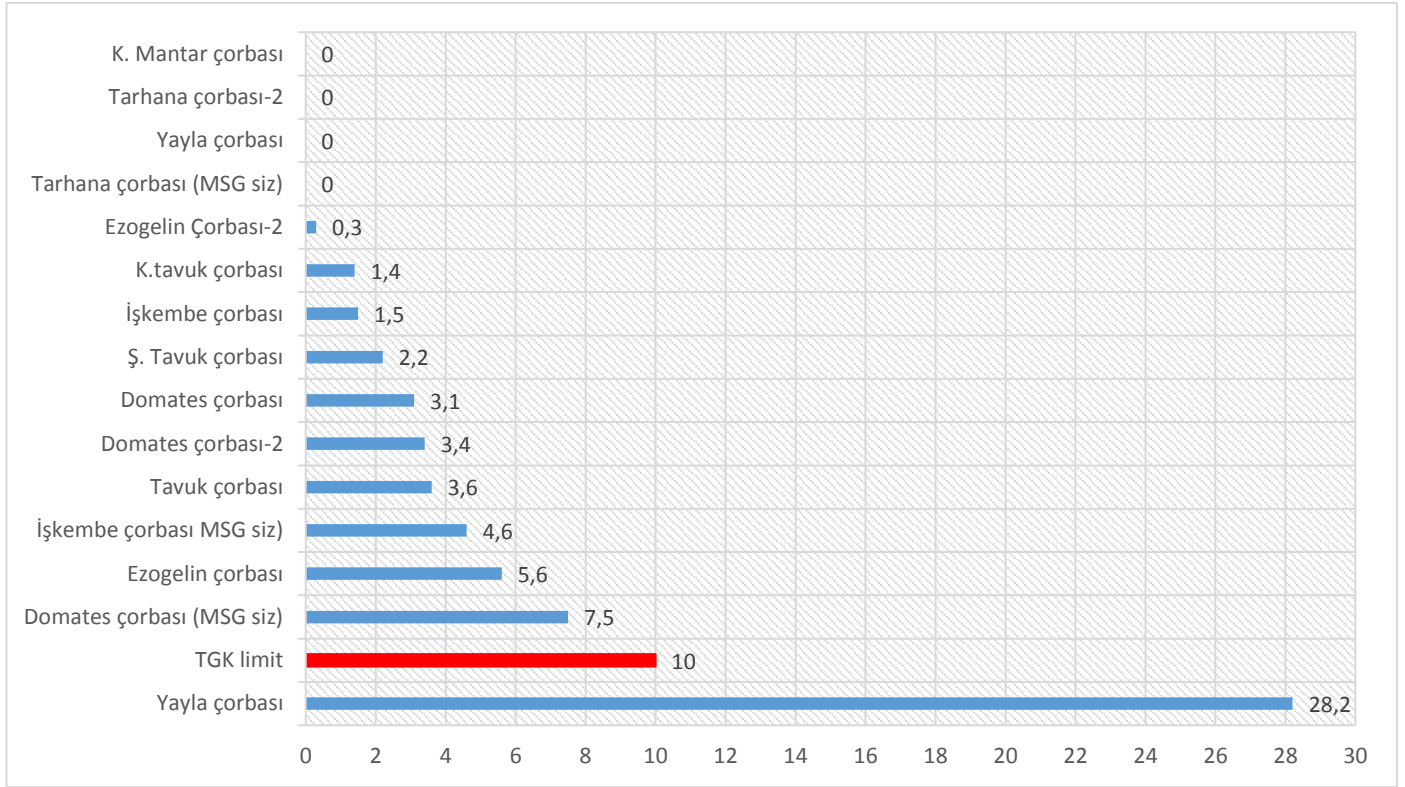
Ülkemizde üretilmiş olan patates ve mısır cipslerinde bulunan MSG miktarları 0,7 g/kg ile 6,9 g/kg aralığında, Asya ve Güney Amerika bölgelerinden temin edilen cipslerde ise 3,7 g/kg ile 8,7 g/kg aralığında sonuçlar elde edilmiştir. Aynı firmaların farklı aromalara sahip cipslerinde kullanılan MSG miktarlarının birbirlerinden farklı olduğu görülmektedir. Aynı durum farklı firmaların aynı aromalara sahip olan cipslerinde de gözlemlenmiştir. İçeriklerinde MSG kullanılmıştır ibaresi hepsinde bulunmaktadır. Miktarları arasında büyük farklılıklar dikkat çekmektedir.

Yapılan bütün denemeler TSK'ya göre belirlenmiş olan 10 g/kg MSG kullanım limitine göre değerlendirilmiştir. Ayrıca ülkemizde üretilen cipslerde bulunan MSG miktarlarının özellikle Asya bölgesinden temin edilen cipslere oranla daha düşük miktarda MSG içerdiği belirlenmiştir. İncelenen tüm mısır ve patates cipslerinde TSK yönetmeliğine göre kullanılabilecek maksimum sınır olan 10 g/kg değerinin altında olduğu görülmektedir. Şekil 6.2.'de farklı cips numunelerinde elde edilen MSG miktarları g/kg cinsinden gösterilmiştir.



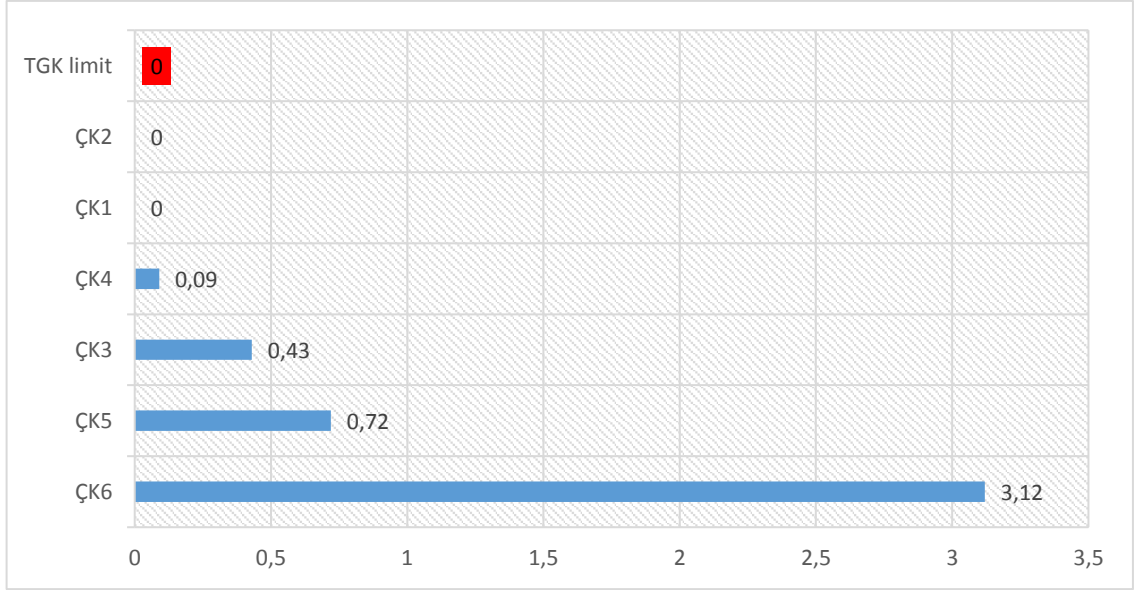
Şekil 6.2. 25 adet cips örneğinin içerisinde bulunan MSG miktarları (gr/kg) *Asya ve Güney Amerika bölgelerinden temin edilen numune

Şekil 6.2. incelendiğinde analizi yapılan farklı cipsler arasında en fazla MSG miktarı 25 numaralı numunede tespit edilmiştir.



Şekil 6.3. Hazır çorbalar içerisinde bulunan MSG miktarları

Hazır çorba örneklerinde tayin edilen MSG miktar aralığı 0,26 g/kg ile 28,2 g/kg olarak elde edilmiştir. En yüksek MSG miktarı yayla çorbası içeriğinde belirlenmiş olup farklı markaların aynı aromaları için de değişiklik göstermektedir. Buna benzer olarak aynı firmaların farklı aromalara sahip çorbalarında da bu durum söz konusudur. Bazı markaların paketlerinde MSG eklenmemiştir ibaresi olmasına karşılık işkembe ve domates çorbalarında MSG tespit edilmiştir. Hazır çorbalar içerisinde bulunan MSG miktarları Tablo 6.3.'de gösterilmiştir. İncelenen çorbaların tamamında MSG tesipt edilmiştir. TGK'ya göre incelendiğinde ise yayla çorbası haricinde incelenen tüm hazır çorbaların TGK'ya uygun şekilde olduğu belirlenmiştir.



Şekil 6.4. Çiğ köfte numunelerinde tespit edilen MSG miktarları

6 farklı firmadan (ÇK1, ÇK2, ÇK3, ÇK4, ÇK5, ÇK6) temin edilen etsiz çiğ köftelerde tespit edilen MSG miktarları Şekil 6.4.'de gösterilmiştir. TKG ve TS 13804 standardına göre kullanılması yasak olan MSG, 4 adet firmadan temin edilen etsiz çiğ köfte numunelerinde tespit edilmiştir. Etsiz çiğköfte numunelerinde 0.09 g/kg ile 3.12 g/kg MSG tespit edilmiştir. 2 firmada ise MSG tespit edilmemiştir. [57,58]. Bu sonuç İnci ve diğerleri tarafından yapılan çalışma ile uygunluk göstermektedir [119]. Bulunan MSG miktarları Şekil 6.4.'de gösterilmiştir. Bu ürünlerde kullanılma ihtiyacı, etli çiğ köfteye yakın bir lezzet elde edilme isteğinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Hazır gıda tüketiminin giderek arttığı günümüzde, sıkça tüketilen bu ürünlerin içerisine konan maddelerin neler olduğu ve miktarlarının belirlenmesi oldukça önem arz etmektedir. Dünya çapında MSG kullanımının zararlı olup olmadığı konusunda fikir bütünlüğüne olmamasına karşın, sağlık üzerine yapılan çalışmalarda birçok etkisinin olduğu açıktır. Bundan dolayı gıdalar içerisine lezzeti artırma amacıyla eklenen MSG'nin kontrol edilmesi gerekmektedir.

KAYNAKÇA

- [1]. Clemens R, Schmidt D., (2014). Conflicts of interest in approvals of food additives. *JAMA Intern Med.* 174(2)299-300
- [2]. Saltmarsh, and M., Lynn, I., 2013, Food additives and why they are used, essential guide to food additives, *Royal Society of Chemistry*, sayfa. 1-7.
- [3]. Cebioğlu İ. ve Önal E., (2018). İstanbul’da bir ilçede gıda katkı maddesi içeren bazı besinlerin tüketiminin ve sağlığa etkilerinin araştırılması: gıdaların risk analizi. *Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi*, Cilt 3, Sayı 1, 21-35.
- [4]. Arslan, G. (2011). *Gıda Katkı Maddeleri ve Yeni Yapılan Dioksimlerin Gıda Katkı Maddesi Olarak Kullanılabilirliğinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi. Konya: Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [5]. Altuğ, T. (2006). *Gıda Katkı Maddeleri*. (İkinci baskı). İzmir: Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri
- [6]. Özkaya İ. (2004). Gıda katkı maddeleri ve toksinler. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sağlıkta ve Hastalıkta Beslenme Sempozyum Dizisi* No: 41, 39-44
- [7]. Vaclavik V. A. and Christian E. (2008). *Essential of food science*. Springer
- [8]. Altuğ, T., (1999). Gıda katkı maddeleri. *Hekim ve Yaşam*, 99, 29-31.
- [9]. Çalışır, Z. E. ve Çalışkan, D. (2003). Gıda katkı maddeleri ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 2, 42-48.
- [10]. <https://www.tarim.gov.tr/Mevzuat/Turk-Gida-Kodeksi> (Erişim tarihi Mart 2018)
- [11]. Yurttagül, M. ve Ayaz, A. (2008). *Beslenme bilgi serisi katkı maddeleri*. Ankara: Sağlık Bakanlığı.
- [12]. Sardesai V.M. (2003). Toxicants occurring naturally in foods and additives. *Introduction to clinical nutrition*, (2).
- [13]. N Ataseven, (2015). *Gıda Katkı Maddeleri Olarak Kullanılan Monosodyum Glutamat, Sodyum Proponat ve Potasyum Proponatın İnsan Lenfosit Kültürüne Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi*, Doktora Tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [14]. Martyn, M.D., McNulty, A.B., Nugent, A.P. and Gibney M.J. (2013). Translating nutrition: integrating research, practice and policy. *Conference on Postgraduate*

- Symposium Food additives and preschool children UCD Institute of food and health, Belfield, Dublin, Republic of Ireland; Proceedings of the Nutrition Society, 72, 109–116*
- [15]. Gunther FA., (1963) Pesticides and food additives residue reviews, Berlin, Gottingen, Heidelberg: Springer-Verlag., 3, 170.
- [16]. Saldamlı, İ., Uygun, Ü. (2014). *Gıda Katkı Maddeleri*. 625-668. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları.
- [17]. Fidan, H. ve Özbek, F.Ş. (2009). Türkiye ve Avrupa birliğinde gıda standartları. *Selçuk Üniversitesi Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 24 (1), 92-100,
- [18]. Erden C., (2012). *Türkiye’de Gıda Güvenliğinde Karşılaşılan Sorunlar ve Gıda Güvenliğinin Benimsenmesinde Eğitim Yöntemlerinin Uygulanabilirliği*. Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ: Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [19]. Keskin. H, (1981). *Besin Kimyası*. (I-II), İstanbul: Fatih Yayınevi Matbaası.
- [20] Çalışır, Z.E ve Çalışkan, D. (2003). Gıda katkı maddeleri ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 193-206.
- [21]. Acebal, C.C., Lista, A.G. and Fernández, B. S. (2008). Simultaneous determination of flavor enhancers in stock cube samples by using spectrophotometric data and multivariate calibration. *Food Chemistry*, 106(2), 811–815.
- [22]. Concon, J.M, (1988). Food toxicology. Part B: Contaminants and additives. *Marcel Dekker Inc*.
- [23]. Furia, T.A. (1980). *Handbook of food additives 2nd edition*. Washington D.C: CRC Press.
- [24]. http://www.fao.org/gsfaonline/docs/CXS_192e.pdf (Erişim tarihi: 08.03.2018)
- [25]. Kaitano, T. E. (2014). Food Additives, Flavors and Flavor Enhancers. *Encyclopedia of Food Safety*, Volume 2, 466.
- [26]. Lezzet Artırıcı Maddeler, Benan Dinç, Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 2012.
- [27]. Elmacı, Y. (2009). *Lezzet artırıcılar*. İzmir: Kanyılmaz Matbaacılık.
- [28]. Saltmarsh, M. and Insall, L. (2013). Food additives and why they are used chapter 1. Saltmarsh M. (editör), *Essential guide to food edition* içinde (s. 50-55).
- [29]. Ninomiya, K. (2001). An overview of recent research on MSG. Sensory applications and safety. *Food Australia*, 53, 546–549.

- [30]. Bellisle, F. (1999). Glutamate and the umami taste. Sensory, metabolic, nutritional and behavioural considerations. A review of the literature published in the last 10 years. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23, 423–438.
- [31]. Torii, K. Brain activation by the umami taste substance monosodium L-glutamate via gustatory and visceral signaling pathways, and its physiological significance due to homeostasis after a meal. *Journal of Oral Biosciences*, 54 (2012), 144–150.
- [32]. Husarova, V. and Ostatnikova, D. (2013), Monosodium glutamate toxic effects and their implications for human intake: a review, *JMED Research*.
- [32]. Yamaguchi, S. and Ninomiya, K. (2000). Umami and food palatability, *The Journal of Nutrition* 13(1), 921-926.
- [33]. Zhang, Yin., Venkitasamy, C., Pan Z, Liu, W., Zhao, L., (2017). Novel umami ingredients: umami peptides and their taste. *Journal of food science*, 82.
- [34]. Anonim (1986). A Handbook for the world of umami. *Umami International Center*. 14.
- [35]. Andarwulan, N., Nuraida, L., Madanijah S, Lioe1 HN, Zulaikhah. (2011). Free glutamate content of condiment and seasonings and their intake in Bogor and Jakarta, Indonesia. *Food and Nutrition Sciences*, 764–769.
- [36]. Freeman, M. (2006). Reconsidering the effects of monosodium glutamate: A literature review. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*, 18(10), 482–486.
- [37]. Ault, A. (2004). The monosodium glutamate story: the commercial production of MSG and other amino acids. *Journal of Chemical Education*, 81(3), 347.
- [38]. Andarwulan, N., Nuraida, L., Hariyadi, P., Madanijah, S. Gitapratwi, Z.D., Pangan, J.M. (2012). Determination of free glutamate source in the Indonesian dish menus. *Jurnal Mutu Pangan* Vol 2. No.1.
- [39]. Basu, A. K., Chattopadhyay, P., Roychudhuri, U., and Chakraborty, R. (2006). Development of biosensor based on immobilized L-glutamate oxidase for determination of monosodium glutamate in food. *Indian Journal of Experimental Biology*, 44(5), 392- 398.
- [40]. Rolls, E. T., (2009), Umami tadının işlevsel nörolojik görüntülemesi. *Amerika Klinik Beslenme Dergisi*, 90(3), 804–813.
- [41]. Loliger, J., (2000), Lezzetli gıdalar için glutamatın işlevi ve önemi. *Beslenme Dergisi*, 130, 915–920.

- [42]. Prescott, J. (2004). Effects of added glutamate on liking for novel food flavors, *Neuro Science*, 143–150.
- [43]. Bellisle, F. (1998). Nutritional effects of umami in the human diet. *Food Reviews International*, 14, 309–320.
- [44]. Kalapanda, M. A., (2010), Chapter 13 – Monosodium Glutamate in Foods and its Biological Effects, *Ensuring Global Food Safety Exploring Global Harmonization*, Pages 217–226.
- [45]. <https://zablude.com/mononatrijum-glutaminat-zablude-mitovi/> (Erişim Tarihi: 07.02.2018).
- [46]. Uslu, D. ve Tosun, H. (2013). Glutamik asit üretimi ve genel kullanım alanları, derleme. *Electronic Journal of Food Technologies*, 8(2), 18-28.
- [47]. S, Jinap, P, Hajeb; (2010). Glutamate. Its applications in food and contribution to health; *Appetite*, 55, 1–10.
- [48]. Duran, N. (2017). *Gıdalarda lezzet artırıcı olarak kullanılan Monosodyum glutamat (Msg) ve ribonükleotidlerin (Gmp/Imp) allium cepa L. türü üzerindeki genotoksik etkilerinin belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale: Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [49]. Hegenbart, S. L., (1998). Analysis of Monosodium l-Glutamate in Food Products by high-performance thin layer chromatography. *Journal of Young Pharmacy*, 2(3): 297-300.
- [50]. Yamaguchi, S., Ninomiya, K., (1998), "Umami nedir?", *Uluslararası gıda değerlendirmeleri*, 14 (2,3), 123–138.
- [51]. Ault, A. (2004). The monosodium glutamate story: the commercial production of MSG and other amino acids. *Journal of Chemical Education*, 81(3), 347.
- [52]. Filer, L. J., and Stegink, L.D. (1994). Report of the proceedings of the glutamate workshop. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 34(2), 159–174.
- [53]. Yoshida, Y. (1998). Umami taste and traditional seasoning. *Food Review International*, 14(2), 213–246.
- [54]. Ninomiya, K. (1998). Natural occurrence. *Food Review International*, 14, 177–212.
- [55]. Sharma, V., Deshmukh R. (2015). Ajinomoto (msg): a fifth taste or a bio bomb. *European Journal Of Pharmaceutical And Medical Research*. 2(2), 381-400.

- [56]. Mehreen, L., Kauser, S., Muhammad, S. and Lubna, I. (2012). Estimation of monosodium glutamate by modified HPLC method in various Pakistani spices formula. *Pakistan Journal*, 34 (1), 39-42.
- [57]. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı (2013) *Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği*, Ankara.
- [58]. TSE, (2018), *Tüketime Hazır Etsiz Çiğ Köfte Standardı*. TS 13804. TSE, Ankara.
- [59]. Giacometti, T. (1979). Free and bound glutamate in natural products. L. J. Filer, S. Garattini, M. R. Kare, W. A. Reynolds, and R. J. Wurtman (Editörler), *Glutamic acid: advances in biochemistry and physiology* içinde (s. 25–34). New York: Raven Press.
- [60]. Konosu, S., Hayashi, T., & Yamaguchi, K. (1987). Role of extractive components of boiled crab in producing the characteristic flavor. L. J. Filer, S. Garattini, M. R. Kare, W. A. Reynolds, and R. J. Wurtman (Editörler), *Glutamic acid: advances in biochemistry and physiology* içinde (s. 235–253). New York: Raven Press.
- [61]. Fuke, S., and Shimizu, T. (1993). Sensory and preference aspects of umami. *Food Science and Technology*, 4, 246–251.
- [62]. <https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:354:0016:0033:en:PDF> (Erişim tarihi: 15.04.2018).
- [63]. Croitorua, M.D. and Alimentaria, A. (2010). Glutamate determination in food stuffs with a very simple HPLC-UV method, *An International Journal of Food Science*, Akademia Kiado, 39 (2), 239–247.
- [64]. Populin, T. (2007). A survey on the presence of free glutamic acid in food stuffs, with and without added monosodium glutamate. *Food Chemistry*, 1712–1717.
- [65]. Mehreen, L. (2012). Estimation of Monosodium Glutamate by Modified HPLC Method in Various Pakistani Spices. *Journal Chemical Society of Pakistan*, 34(1).
- [66]. Lau, O.W. and Mok, C.S., (1995). Indirect conductometric detection of amino acids after liquid chromatographic separation. Part II. determination of monosodium glutamate in foods. *Analytica Chimica Acta*, 302, 45-52.
- [67]. Rodriguez, M.S., Gonzalez, M.E. and Centurion ME. (2003). Determination of monosodium glutamate in meat products. *J Argent Chemistry Society*. 91(1), 41–45.
- [68]. Mustafa, S., Saleem, Y. and Hameed, S. (2015). Determination of monosodium glutamate content in selected traditional meat dishes. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 6, 569–572.

- [69]. Moneim, W. M., A., Yassa, H. A., Makhoul, R. A., Mohamed, N. A. (2018). Monosodium glutamate affects cognitive functions in male albino rats; *Egyptian Journal of Forensic Sciences*. 8:9.
- [70]. Aunga, H. and Pyell, U. (2016). In-capillary derivatization with o-phthalaldehyde in the presence of 3-mercaptopropionic acid for the simultaneous determination of monosodium glutamate, benzoic acid, and sorbic acid in food samples via capillary electrophoresis with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, 156–165.
- [71]. Williams, A. T. R., Winfield, S. A. (1982). Determination of monosodium glutamate in food using high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Analyst*, Vol. 107, 1092-1094.
- [72]. Phat, C., Moon, B., Lee, C. (2016). Evaluation of umami taste in mushroom extracts by chemical analysis, sensory evaluation, and an electronic tongue system. *Food Chemistry*, 192, 1068–1077.
- [73]. Cebi N., Doğan, C.E., Olgun, E.Ö., ve Sağdıç, O. (2018). A survey of free glutamic acid in foods using a robust LC–MS/MS method, *Food Chemistry* 248, 8–13.
- [74]. Khairunnisak, M., Azizah, A.H., Jinap S. and Izzah, A.N. (2009). Monitoring of free glutamic acid in Malaysian processed foods, dishes and condiments, *Food Additives and Contaminants*, 26(4), 419–426.
- [75]. Colucci, P.E. and Grovum, W.L. (1993), Factors affecting the voluntary intake of food by sheep. The effect of monosodium glutamate on the palatability of straw diets by sham-fed and normal animals. *British Journal of Nutrition*, 69(1), 37-47.
- [76]. Eweka, A. O., Eweka, A. And Iniabohs, F. A. E. (2010). Histological studies of the effects of monosodium glutamate on the Wistar rats. *North America Journal of Medical Sciences*, (2), 146-149.
- [77]. Walker, R. Lupien, J.R. (2000). The safety evaluation of monosodium glutamate. *Journal of Nutrition*, 2.
- [78]. N.J. Maragakis, J.D. and Rothstein, J. (2001). Glutamate transporters in neurologic disease. *Basic Science Seminars in Neurology*, 58, 365–3370.
- [79]. <http://www.who.int/ipcs/publications/jecfa/reports/trs940.pdf> (Erişim tarihi: 04.09.2018).

- [80]. (1974). Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *Toxicological evaluation of some food additives including anti-caking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents*. FAO Nutrition Meetings Report Series, 1974, No 53 1-520 Geneva: WHO Technical report.
- [81]. Shannon, M., Green, B., Willars, G., Wilson, J., Matthews, N., Lamb, J., (2017). The endocrine disrupting potential of monosodium glutamate (MSG) on secretion of the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) gut hormone and GLP-1 receptor interaction. *Toxicology Letters*, 265, 97–105.
- [82]. Lateef, M., Siddiqui, K., Salem, M., Iqbal, L. (2012). Estimation of monosodium glutamate by modified HPLC method in various Pakistani spices formula. *Journal Chemistry Society of Pakistan*. Vol. 34 (1), 39-42.
- [83]. Ault, A. (2004). The commercial production of MSG and other amino acids. *Journal of chemical education*, 3(81), 346-347.
- [84]. Bawaskar, H. S., Bawaskar P.H., Bawaskar, P. H. (2017). Chinese restaurant syndrome. *Indian Journal of Critical Care Medicine*. 21(1), 49–50.
- [85]. Hashem, H.E., Safwat, M.D. and Algaidi S. (2012). The effect of monosodium glutamate on the cerebellar cortex of male albino rats and the protective role of vitamin C (histological and immunohistochemical study. *Molecular Histology*, 43(2), 179–186.
- [86]. Umukoro S., Oluwole G., Olamijowon H., Omogbiya A., Eduviere A. (2015). Effect of monosodium glutamate on Behavioral phenotypes, biomarkers of oxidative stress in brain tissues and liver enzymes in mice, *World Journal of Neuroscience*, 5(5), 339–349.
- [87]. Prastiwi, D., Djunaidi A. and Partadiredja G. (2015). High dosage of monosodium glutamate causes deficits of the motor coordination and the number of cerebellar Purkinje cells of rats, *Human and Experimental Toxicology*.
- [88]. Schaumburg, H. H., Byck, R., Gerstl, R., and Mashman, J. H. (1969). Monosodium l-glutamate: Its pharmacology and role in the Chinese restaurant syndrome. *Science* 163(869), 826–828.
- [89]. Yang, W.H., Drouin, M.A., Herbert, M. and Karsh, J., (1997). The monosodium glutamate symptom complex: assessment in a double-blind placebocontrolled, randomised study. *Journal of Allergy Clin. Immunol.* 973 – 980.
- [90]. World Health Organization, (1987). *Technical Report Food Additives*. 22: 97-161.

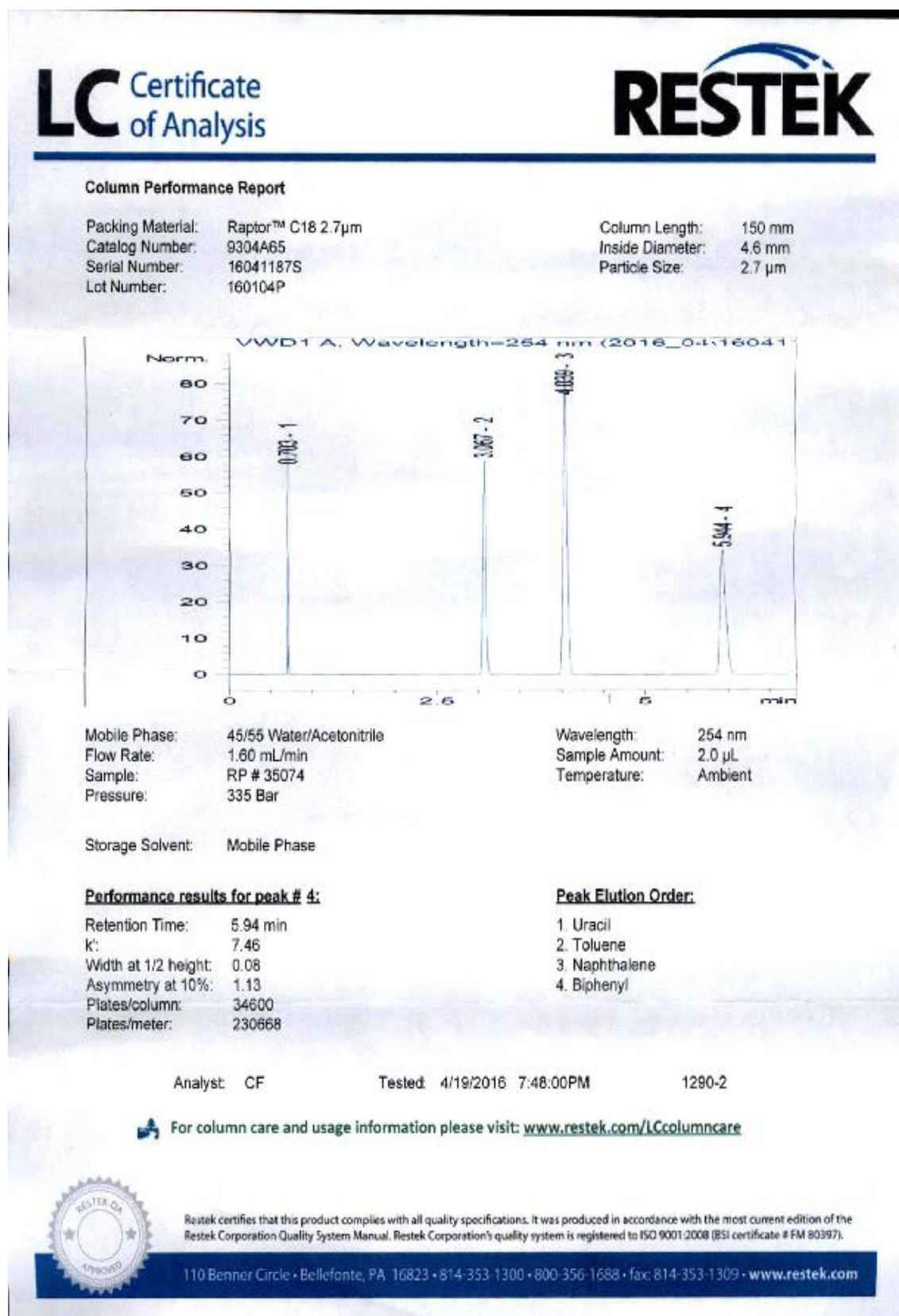
- [91]. Yang WH, Drouin M.A., Herbert M, Mao Y, Karsh J. (2017). The monosodium glutamate symptom complex: assessment in a double-blind, placebo controlled, randomized study. *Journal of Allergy Clinical Immunology*. 757.
- [92]. Oyiengo, E.W. (2014). *Assessment of levels of monosodium glutamate, aspartame and sodium benzoate in some chili and tomato sauces in Nairobi county, Kenya*, School of Pure and Applied Sciences of Kenyatta University.
- [93]. Özçimder, M., Demirci, A. (2004). *Gaz ve sıvı kromatografileri*. Kırıkkale: Bilim Yayınları 19-20.
- [94]. Şenol O. (2014). *Tiyamin ve Piridoksin Etkin Maddelerinin Farmasötik Preparatlarda YPSK Yöntemi ile Analizi*. Yüksek Lisans Tezi. Bolu: Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [95]. Gooding, K. M., Wehr, T., Cunico, R. L. (1998). *Basic HPLC and CE of biomolecules*. Richmond, CA: Bay Bioanalytical Laboratory.
- [96]. Skoog, D.A., West, D. M., Holler, F. J., Crouch, S. R. (2004). *Analitik kimya temel ilkeler*. (Çev: E., Kılıç, H. Yılmaz). Ankara: Bilim Yayınları.
- [97]. Akkaya, D.E. (2016). *Piyasada satılan bazı elma sularında YPSK yöntemiyle HMF (hidroksimetilfurfural) tayini*, Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: Aydın Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [98]. Munk, M, (1993). In a practical guide to HPLC detection, Pariott D. (editör), *Practical HPLC Method Development* içinde, (s. 350) San Diego: Academic Press.
- [99]. Alnökkari, A., Ataie M., Alasaf Z. (2013). Colorimetric determination of monosodium glutamate in food samples using l-glutamate oxidase. *Chinise Journal Applied Environmental Biology* 19 (6), 1069-1072.
- [100]. Demirhan, B.E., Demirhan, B., Sönmez, C., Torul, H., ve Yentür, U.T. (2015). Monosodium glutamate in chicken and beef stock cubes using high-performance liquid chromatography. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 8(1), 63–66.
- [101]. ESA application note, *glutamate and gaba analysis*, www.esainc.com
- [102]. Padovan, G. J., Leme, I. A., Fassini, P. G., Junior, N. I., Marchini, J. S. (2014). A new o-phthaldialdehyde (opa) solution for fluorescence HPLC amine group detection without boric acid preparation. *Journal of Chromatograph and Separation Techniques*, 5:223.
- [103]. Sadek, P.C., (1996). *The HPLC solvent guide*. New York: John Wiley & Sons.

- [104]. Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Glajch, J. L. (1996) *Practical HPLC method development*. Second Edition. New York. John Wiley & Sons.
- [105]. The United States Pharmacopeia. (2006). National Formulary 25, System suitability, *The United States Pharmacopeial Convention, Rockville*. MD, 2287- 2288
- [106]. ICH Steering Committee. (2005). *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*. Harmonised Tripartite Guideline.
- [107]. Barut, İ. (2015). *Ankara'da Tüketime Sunulan Hazır Çorbalarda YPSK Yöntemi İle Monosodyum Glutamat Miktarlarının Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [108]. Kang, X., Xiao, J., Huang, X., and Gu, Z. (2006). Optimization of dansyl derivatization and chromatographic conditions in the determination of neuroactive amino acids of biological samples. *Clinica Chimica Acta*, 366, 352 – 356.
- [109]. Williams, A.T., Winfield, S.A. (1982). Determination of monosodium glutamate in food using high performance liquid chromatography and fluorescence detection, *Short Papers Analyst*, 1092-1094.
- [110]. Mopper, K. (1984). Trace determination of biological thiols by liquid chromatography and precolumn fluorometric labeling with o-Phthalaldehyde, *Analytical Chemistry*, 56(1), 2557-2560.
- [111]. Concha-Herrera, V., Torres-Lapasio J.R., and Garcí'a-Alvarez-Coque, M.C. (2004). Chromatographic Determination of Thiols After Pre-column Derivatization with o-Phthalaldehyde and Isoleucine. *Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 27, 1593–1609.
- [112]. <http://www.shimadzu.com>. (Erişim tarihi: 2018). Principles and practical applications of Shimadzu's ELSD- LT– II evaporative light scattering detector, *Technical Report*. Vol 6.
- [113]. Bullock, S. (2008). Effective determination of glutamic acid by HPLC with ELSD. *Agilent Technologies*.
- [114]. Pu, J., Zhao, X., Xiao, L. ve Zhao, H., (2017). Development and validation of a HPLC-ELSD method for simultaneous analysis of non-substituted and acetylated xylo-oligosaccharides, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 139, 232-237
- [115]. Young, C.S. (2002). The determination of glycerol in wine by HPLC with low temperature evaporative light scattering detection, *LC*GC Application Notebook*, 22.

- [116]. Guiochon, G., Moysan A., Holley, C. (1988). *Journal of Liquid Chromatography*. 11(12), 2547–2570.
- [117]. Lafosse, M., Dreux M., Morin-Allory, L. (1987). Application fields of a new evaporative light scattering detector for high performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 404, 95.
- [118]. Mengerink, Y., De Man H.C.J., Van Der Wal, S. (1991). *Journal of Chromatography*. 552(1–2), 593–596.
- [119]. Cerit, İ., Deniz, G., Yüleci, T., Ergün, B. E., Aygün, M. G., Karaduman, İ., Can, C. Demirkol, O. (2014). Sakarya ilinde satışa sunulan etsiz çiğ köftelerin fiziko-kimyasal özelliklerinin ve monosodyum glutamat içeriğinin belirlenmesi. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 9(3),10-17.
- [120]. Thayyath S. A., Sheeba A. (2015). Selective determination of monosodium glutamate (Ajinomoto) in food samples using potentiometric method with modified multiwalled carbon nanotube based molecularly imprinted polymer. *The Royal Society of Chemistry*, 5, 96840-96850.

EK-1

YPSK Analizlerinde Kullanılan Kolon Sertifikası C18 (2.7µm.150 mm 4.6 mm)



EK-2

YPSK Analizlerinde Kullanılan Kolon Sertifikası C18 (3µm, 150 mm, 4.6 mm)

