

# ASPARTAMIN, BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN VE BAZI GIDA KATKILARININ YÜKSEK PERFORMANS SIVI KROMATOĞRAFI YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

## DETERMINATION OF ASPARTAME, ITS DECOMPOSITION PRODUCTS AND SOME FOOD ADDITIVES USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD

Güleren ÖZKAN

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, ANKARA

**ÖZET:** Aspartam,  $\alpha$ -L -aspartik asit- L-fenilalanin -1-metil esterdir ve gıdalarda tatlandırıcı olarak geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Bu bileşiğin gıdalarda kullanımı, gıdanın kalorisini önemli ölçüde azaltmaktadır. Aspartamın sıvı sistemlerde pH bağımlı kararlılığı, dondurma uygulanmayan uzun raf ömrü süresinde aspartamın kaybı ve oluşan bozunma ürünlerinin izlenmesi için uygun analitik metotların geliştirilmesini gerektirir. Ancak aspartam ve diğer polar gıda katkılarının benzerliği, geliştirilen herhangi bir analitik metodun ayırma gücünü olumsuz etkilemektedir. Bu makalede aspartam, bozunma ürünleri ve bazı gıda katkılarının yüksek performans sıvı kromatografi ile tayinlerine ilişkin bilgiler derlenmiştir.

**ABSTRACT:** Aspartame,  $\alpha$ -L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester, is a sweetening with broadening food applications. Its use in many food systems can provide significant reduction in calories. The known pH-dependent stability of aspartame in liquid systems provides a need to develop versatile analytical methods that can monitor both aspartame loss and decomposition products formation during storage of nonrefrigerated extended shelf-life products. As well, similarities between aspartame and other polar food components place additional constraints on the resolving power of any developed analytical methodology. In this article, high performance liquid chromatographic method for the determination of aspartame, its decomposition products and some food additives are reviewed.

### GİRİŞ

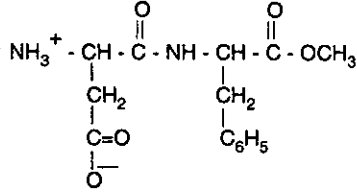
Aspartam, N, L-  $\alpha$ -aspartil -L-fenilalanin -1- metilester, L-aspartik asit ve L-fenilalanin amino asitlerinden oluşan aspartil dipeptidinin metil esteridir ve düşük kalorili bir tatlandırıcıdır. Sukroz tadında ancak sukrozdan 180-200 kat daha fazla tatlandırma özelliği olan kristalin katıdır. Tatlandırma seviyesi hemen hemen %10'luk sakkaroz-su çözeltisinin tadına eşittir ve sakkaroz yerine kullanılması gıdanın kalorisini son derece azaltmaktadır. Nutrasweet ticari adıyla bilinen bu bileşik, gıda ve ilaç yönetmeliğine uygun şekilde tatlandırıcı olarak meşrubatlarda ve gıdalarda kullanılmaktadır. Bu bileşiğin 1981 yılında kuru gıda formülasyonlarında, 1983'de ise karbonatlı içeceklerde kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır. 1981'de FDA tarafından aspartamın kuru bakliyatlarda, balonlu sakızlarda, içeceklerde, taze kahve, çay, jelatinler, pudingler ve günlük ürünlerde kullanımı veya bu gıdaların aspartam tabletleriyle tatlandırılmaları uygun bulunmuştur. Çeşitli analiz metotlarıyla tayini, alternatif bir tatlandırıcı olan aspartamın popülaritesini artırmıştır. Günümüzde düşük kalorili gıdaların önemi giderek arttığından yaygın kullanımı söz konusudur.

Aspartam çeşitli yöntemlerle tayin edilebilmektedir. Bunlar, spektrofotometrik, amperometrik, potansiyometrik, spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlerdir. Aspartam, gıda katkısı olarak kullanımı çok yeni olan bir bileşiktir. Bu nedenle bozunma ürünleri, bu ürünlerin hangi koşullarda oluştuğu ve miktarları üzerinde çalışmalar sınırlıdır. Diet içecekler, diet pudingler belli koşullara uyularak muhafaza edilmediğinde aspartamın bozunması daha etkin olabilecektir. Aspartamın üzerinde önemle durulan bozunma ürünü diketopiperazindir ve bu bileşik için günlük kabul edilebilen miktar 7,5 mg/kg vücut ağırlığıdır. Aspartam yanısıra bu bileşiğin kantitatif tayini de önem arz etmektedir.

Bu derlemede aspartamın, bozunma ürünlerinin ve gıda katkılarının yüksek performans sıvı kromatografi ile tayini incelenmektedir.

## ASPARTAM HAKKINDA GENEL BİLGİ

Aspartam, kokusuz, beyaz, kristalin toz halinde bulunan ve suni tatlandırıcı olarak kullanılan bir bileşiktir. Yapısı Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Aspartamın Kimyasal Yapısı

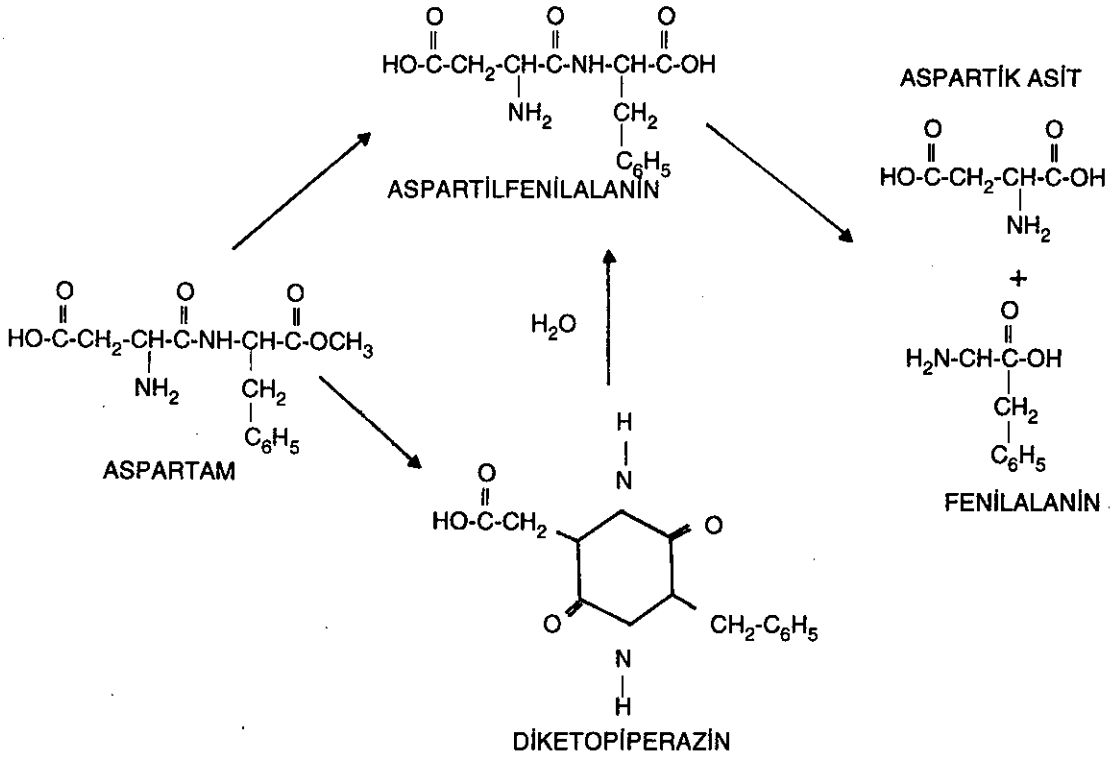
Aspartam, bulunduğu gıdanın muhafaza koşullarından etkilenir ve bozunur. Bileşiğin ester bağı, nem, sıcaklık ve pH'a bağımlı olarak hidrolizlenir (LEWIS ve ark. 1984). Hidroliz tepkimesi sonucu, yapıdan metil alkol ayrılır ve diketopiperazin ya da aspartilfenilalanin oluşur. Diketopiperazin bozunarak aspartilfenilalanin verir. Aspartilfenilalanin takiben kendini oluşturan amino asitlere, aspartik asit ve fenilalanine, dönüşür. Aspartamın bozunma şeması Şekil 2'de verilmiştir. Hidroliz sonucu oluşan dört ürün de tatlı değildir.

Bozunma ürünleri tatlı olmadıkları için gıdanın tat düzeyi beklenme süresinden etkilenir. Bu nedenle gerek gıdanın maliyetini düşürmek gerekse bozunmaların tat düzeyini etkilememesi için aspartam bir diğer tatlandırıcı ile genellikle sakkarin ile birlikte kullanılır. Bu dört bozunma ürünü yanısıra β-aspartam, L-fenilalanil-L-aspartik asit ve süksinimit de çeşitli çalışmalarda aspartamın bozunma aşamalarında dikkat çekmektedir. (GAINES ve BADA, 1987).

Aspartamın bozunması, diğer dipeptidlerine benzer, bozunma diğer aminoasitlerin ve dipeptidlerin varlığından etkilenir. Aspartam, gıdadaki flavor aldehitlerle de etkileşir (CHA ve HO, 1988; HUSSEIN ve ark. 1997). Katıldığı gıdanın nemi ve pH'ı aspartamın kararlılığında etkin olup pH 4-5 civarında kararlı olduğu (PRUDEL ve DAVIDKOVA, 1981; HOMLER, 1984; PRUDEL ve ark. 1986, BELL ve LABUZA, 1991a; TSOUBELI ve LABUZA, 1991); bu aralığın dışında kararlılığın azaldığı bilinmektedir. Gıdanın bekleme süresi ve sıcaklık (HOMLER, 1984; PRUDEL ve ark. 1986; BELL ve LABUZA 1991 a; TSOUBELI ve LABUZA, 1991) bozunmayı etkilemektedir. Ayrıca su aktivitesi aspartamın kararlılığında önemli rol oynamaktadır (BELL ve LABUZA, 1991 a). Sulu çözeltide ışık etkisiyle bozunması, gıda katkılarına ve pH'a bağlıdır (KIM ve ark. 1997)

Aspartamın kuru gıdalarda kararlılığı iyidir ve bu tip gıdalarda kullanıldığında kararlılığı saf aspartamın kararlılığı ile aynı davranışı gösterir. Aspartamın bozunması sıcaklıktan çok etkilenir. 105°C'da kurutma işleminde diketopiperazine dönüşme %4,5'i geçmez, ancak sıcaklığın 120°C olması durumunda birden artar ve %70'lere ulaşır. Sıcaklığın 150°C'a çıkması halinde 1 gün sonunda bileşiğin tamamen diketopiperazine dönüştüğü bilinmektedir. Aspartamın çeşitli pH'larda kararlılığı üzerinde sıcaklık etkisi, çalışmacılar tarafından incelenmiş olup sıcaklığın artması durumunda bozunmanın pH 5-6'lara kaydığı gözlenmiştir. Bu nedenle aspartamın bulunduğu gıdalarda yüksek sıcaklıklarda bir pastörizasyon işlemi yapılması durumunda süre, son derece kısa tutulmalı ve hemen soğutma uygulanmalıdır. Bu şekilde pastörizasyonda gıdanın raf ömrü 6-8 aya kadar çıkabilmektedir.

Aspartam, gıdalarda sıklıkla %0.01-0.6 olacak şekilde kullanılır; miktar ürünün formülasyonuna, pH'a, sıcaklığa ve istenen ürün karakteristiklerine bağlıdır. Tatlandırıcı olarak kullanmanın dışında aspartamın gıdaların ve meşrubatların çeşnisini arttırdığı bilinmektedir. Aspartamın gıdaya katılan miktarı çok az olduğundan gıda için istenen bileşim üzerinde hiç bir olumsuz etkisi olmaz. Aspartamın şeker yerine kullanılması durumunda kütle azalır ve bu da ürünün paketlenme ve taşıma maliyetlerini son derece azaltmaktadır. Düşük kalorili gıdalarda aspartam, sakkaroz, dekstroz, fruktoz ve sakkarin ile birlikte kullanımında sinerjistik etki yapmaktadır. Aspartam tatlandırma tabletlerinde seyreltici olarak maltodekstrin, dekstroz ve laktozdan yararlanır ve genelde 1 tablet 1 çay kaşığı sakkaroz tadındadır. Toz meyve konsantrelerinde maltodekstrin taşıyıcısı ile birlikte, bileşimin %6'sı olacak şekilde kullanılır. Aspartam, jelatinli tatlılar, çikolatalı pudinglerde maltodekstrin, polidekstroz veya kristalin fruktoz ile kullanılır. Jelatinlerde yaklaşık %4, çikolatalı pudinglerde yaklaşık %15, karbonatlı meşrubatlarda %0.03-0.09 olacak şekiide kullanılır. Tahıldan hazırlanan bütün diet gıdalarda, sakızlarda, sütte, dondurmada, yoğurta, şekerlemelerde, reçellerde, kremalarda, jölelerde kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Yoğurt tipi ürünlerde pastörizasyondan sonra gıdaya eklenmektedir.



Şekil 2. Aspartamın tatlı olmayan bileşiklerine dönüşüm şeması

Aspartam için müsaade edilebilir günlük alım değeri 0-40 mg/kg vücut ağırlığı ve diketopiperazin için 0-7,5 mg/kg vücut ağırlığıdır. Aspartam için verilen rakamın 100 kat arttırılabileceği yani 4 g günlük alımın bir olumsuzluk yaratmayacağı hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarla doğrulanmıştır. Bu rakamın diketopiperazin için de 750 mg'a çıkabileceği belirtilmektedir. Hamilelerde, süt çocuklarında ve ketonürlü hastalarda kullanılmaması tavsiye edilmektedir.

### ASPARTAM ve BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN HPLC YÖNTEMİ İLE TAYİNLERİ

Aspartam ve bozunma ürünlerinin tayinleri giderek önem kazanmaktadır. Amino asit analizörü-ninhidrin kullanılarak tayin, amino asitler ve dipeptitler için uygundur, ancak diketopiperazin ninhidrinle renkli bileşik vermez ve bu tayine uygun değildir. İnce tabaka kromatografisi yarı kantitatif bir metottur. Gaz kromatografi ile bu bileşiklerin ayrımları yapılabilir ancak numune hazırlama zaman alıcıdır. Son yapılan çalışmalarda yüksek performans sıvı kromatografi, gerek kullanım kolaylığı, uygulanabilirliği ve sonuçlarının yeterliliği ayrıca rutin uygulamaya geçilebilmesi sebebiyle aspartamın gerek bozunma ürünlerinden ve gerekse diğer gıda katkılarından ayırımında dikkat çekmektedir.

DANIELS ve ark. (1984), toz meyve konsantresi ve tatlandırıcı tabletlerde aspartam tayininde Zorbax ODS C18 kolonda çalışmışlardır. Su-metanol-%0.3 NH<sub>3</sub> (500+400+3) çözeltisinin pH'ını %18-20'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile 4,5'e ayarlayarak elue edici olarak kullanmışlar, bu elue edicinin su-metanol-%1,5NH<sub>3</sub> (375+225+9, pH 3,5) halinde kullanımının bazı toz meyve konsantreleri için daha uygun olduğunu belirtmişlerdir. Geri kazanma verimlerinin belirlenmesinde %2.2-%33.3 olacak şekilde aspartam katkılı numuneler hazırlayan araştırmacılar geri kazanma için %94-%111 değerlerini bulmuşlardır. Aspartamın tablet ve meyve tozlarında varlığı, ince tabaka kromatografi yöntemi ile doğrulanmış; çalışmada n-butanol:asetik asit:su (4:1:1) sistemi yürütücü ve ninhidrin renklendirme reaktifi olarak kullanılmıştır.

PRUDEL VE DAVIDKOVA (1985), Separon SI C-18 kolon kullandıkları HPLC çalışmasında aspartam, aspartam hidroklorür ve bozunma ürünleri olan aspartik asit, fenilalanin, fenilalanin metil ester, aspartilfenilalanin, fenilalanil-aspartik asit, 5-benzil-3,6-dikso-2-piperazinasetik asitin ayrımlarını incelemişlerdir. Mo-

bil faz olarak 0.5 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 2,1) ve metanol (85:15 v/v) kullanılan çalışmada dedeksiyon 200 nm'de gerçekleştirilmiştir. Çalışmada meşrubatlar  $(7\pm 2)^\circ\text{C}$  ve  $(20\pm 2)^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiş ve zaman ve sıcaklığın bozunmadaki etkisi takip edilmiştir. DKP ve aspartamın Britton Robinson pH 4 tamponunda hazırlanan çözeltilerini kullanan çalışmacılar, hız gradienti uygulayarak veya metanol derişimini arttırarak çalışma süresini kısaltmayı amaçlamışlardır. Metanol derişiminin artması durumunda fenilalanin metil esterin DKP ile birlikte elue olduğu, ancak numunede bozunma sonucu fenilalanin metil esterin oluşmaması sebebiyle bir sorun olmadığı vurgulanmaktadır. İyonik şiddetin yüksek olmasının piklerde keskinliği sağladığı, DKP derişimlerinin az olması sebebiyle daha derişik numune gerektiği, bu bileşik için geri kazanmanın %92.8-116.5 ve metodun varyasyon katsayısının %0.8-5.5 olduğu çalışmacılar tarafından belirtilmektedir. Çalışmada, 10 farklı meşrubatta diketopiperazin tayini gerçekleştirilmiş ve gerek zamanın ve gerekse sıcaklığın bu bileşiğin miktarını arttırdığı belirlenmiştir. Yöntemin duyarlılığının gaz kromatografiden biraz daha düşük olduğu, ancak numune hazırlamada zaman kaybı olmadığı ayrıca raf ömründe oluşan diketopiperazin toksik açıdan önemli olmadığı için duyarlılığın yeterli kabul edilebileceği belirtilmektedir.

Aspartamın bozunma ürünlerinin kromatografik ayrımları üzerinde bir diğer çalışma Tsang, CLARKE ve PARRISH (1985) tarafından yapılmış, özellikle sakkarinin olmadığı diet içecekler kullanılarak tayinde sakkarinin geniş pikinin bozucu etkisinin olmamasına dikkat edilmiştir. Karbonatlı içecek gazı giderilerek ve 0.45  $\mu\text{m}$  filtreden süzülerek enjekte edilmiştir.  $\mu$  Bondopak C18 ters faz kolonun kullanıldığı çalışmada akış hızı 0.8 mL/dak, dedeksiyon dalga boyu 214 nm'dir. Elue edici olarak asetonitril ve 0.0125 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 3,5) 10:90 oranında hazırlanarak kullanılmıştır. Diketopiperazin, aspartam  $150^\circ\text{C}$ 'da 1 gece ısıtılarak; aspartil fenilalanin aspartamın baz katalizli hidrolizi ile hazırlanmıştır. Aspartil fenilalaninin hazırlanması için aspartam suda çözülmüş, pH seyreltik NaOH ile 8'e ayarlanmıştır. 1 gün bekleme sırasında diketopiperazin ve aspartil fenilalaninin 37:63 oranında meydana geldiği ve aspartil fenilalanin miktarının aspartam ve diketopiperazin arasındaki farktan yararlanılarak hesaplandığı belirtilmektedir. Sonuçların yorumlanmasında aspartamın %2 diketopiperazin içerdiği ve sulu çözeltilinde yavaşça diketopiperazin verdiği dikkate alınmış ve aspartam çözeltili analiz anında hazırlanarak bu bileşiğin oluşumu en az düzeyde tutulmuştur. Aspartam tayininde geri kazanmanın %99.5, varyasyon katsayısının <%0.3, 214 nm dalga boyunda çalışmanın 254 nm'den daha iyi olduğu; fenilalanin metil esterinin bazik ortamda bekletilme durumunda fenilalanin verecek şekilde %70 hidroliz olduğu çalışmacılarca belirtilmektedir. Çalıştıkları karbonatlı meşrubatlarda 6 ay içinde ~ %60'luk aspartam kaybı olduğu, 36 ay sonunda etikette belirtilen aspartamın %10'undan azının bulunabildiği araştırmacılarca ifade edilmektedir.

VERZELLA ve ark. (1985), RP-8 (Hibar RP8) kolunu kullandıkları çalışmada L-fenilalanin, L-fenilalanin metil ester, L- $\alpha$ [(N-formil)-aspartil]-L-fenilalanin, L- $\alpha$ -aspartil-L-fenilalanin, L- $\alpha$ [(N-formil) aspartil]-L-fenilalanin metil ester, 5-benzil-3,6-dioksa-2-piperazinasetik asit, L- $\beta$ -aspartil-L-fenilalanin metil ester, L- $\beta$ -aspartil-L-fenilalanin, L- $\beta$ [(N-formil)aspartil]-L-fenilalanin metil esterin ayırımını gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada 1-hekzan sülfonik asit sodyum tuzu iyon çifti oluşturucu olarak kullanılmıştır. Standardlar için 0.01-0.03 mg/mL derişimlerinin lineer çalışma aralıkları olduğu belirtilmektedir. Çalışmacılar iyon çifti oluşumunu esas alan RP HPLC yöntemleriyle  $\text{pK}_a$  değerleri çok yakın olan yapıca birbirine çok benzer bileşikler ayırdıklarını ifade etmektedirler.

VERZELLA ve MANGIA (1985) Hypersil MOS kolon ve diot array dedektör kullanarak aspartam ve bozunma ürünlerinin tayini üzerinde çalışmışlardır. Araştırmacılar, 0.01M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 2.5) çözeltilisini 77:33 oranında olacak şekilde asetonitrille modifiye ederek mobil faz olarak kullanmışlardır. Analizlerde aspartamın asetonitrilde hazırlanan çözeltili 1:3 olacak şekilde 0.01M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ile seyreltilerek kullanılmıştır. Aspartamın diketopiperazin, L- $\alpha$ -aspartil-L-fenilalanin, N-formil- $\alpha$ -aspartam, N-formil- $\beta$ -aspartam ve  $\beta$ -aspartamdan ayırımında diğer bileşiklerin aspartamın ellide biri derişiminde hazırlanan çözeltilerinden yararlanılmıştır. Mobil fazda asetonitril derişiminin %23'den küçük veya büyük olması durumunda ayırmanın yapılamadığı, her iki durumda da birlikte elüsyonların olduğu; aspartam için 0.4-0.6 mg/L aralığında korelasyon katsayısının 0.9998, varyasyon katsayısının %1'den küçük olduğu ve diğer bileşikler için varyasyon katsayılarının %4.98-6.70 olduğu belirtilmektedir.

GAINES ve BADA (1987) aspartam ve stereoizomerlerinin ayırımını C18 Alltech Econosphere kolon kullanarak 215 nm'de gerçekleştirmişlerdir. Mobil faz olarak 0.05M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 3,2) asetonitril ile modifiye edilerek kullanılmıştır. Bozunmayı gerçekleştirmek üzere borat tamponunda (pH 8.8) hazırlanan 0.01 M'lik aspartam çözeltisi 100°C'da belli süre ısıtılmıştır. Numune pH'ı 3-4'e ayarlandıktan sonra enjeksiyon yapılmış ve aspartamın, diketopiperazin, fenilalanin, L-aspartil-L-fenilalanin, süksinimit, L-fenilalanin-L-aspartik asit ve  $\beta$ -L-aspartil-L-fenilalaninden ayırımı gerçekleştirilmiştir. Çalışmacılar, belli ısıtma süreleri uygulayarak aspartamın bozunmasına ilişkin görüşlerini açıklamışlardır. Kafein ve gıda boyar maddelerinin tayinde bozucu olabileceği belirtilmektedir.

LAWRENCE ve IYENGAR (1987)  $\beta$ -aspartamın aspartamdan ayırımını, Spherisorb 5 ODS kolon ve asetonitril: 0, 005 M sodyum heptan sülfonatu bulunduran 0.02 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (20:80; pH 4) mobil fazını kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Tayinde 210 nm dalga boyunda ve 0.16  $\mu\text{m}$ 'de çalışılmıştır. Numune, aspartam tayini için 10 kat seyreltilerek,  $\beta$ -aspartam tayini için seyreltilmeden kullanılmıştır. Toz meyve konsantresi, etikette belirtilen kullanma şekline göre hazırlanmıştır. Pudingler, jeller ve çukulatalı içeceklerde aspartam içeriğine göre 1-10 g numuneye, 60 mL etanol eklenmiş, sonik banyoda 30 dakika çalkalanmış, süzülmüş, 4 ml'si 10 ml'ye elue edici ile tamamlanarak analizlenmiştir. Aspartam ve  $\beta$  aspartamın ayırımında mobil faz pH'ının bu iki dipeptidin farklı pKa'ları nedeniyle önemli olduğu, 0.02 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : asetonitril (88:12) ile farklı pH'larda yapılan çalışmalar sonucu pH 3,5'in daha uygun olduğu ifade edilmektedir. pH'da daha fazla azalma band genişlemesine sebep olmakta, pH 2,2 de ayırma tamamen bozulmaktadır. Heptan sülfonatin ilavesinin bileşiklerin alıkonma zamanını arttırdığı, ancak pik şekillerini geliştirdiği, bu nedenle bu bileşiğin kullanılması ve alıkonma zamanlarını düşük tutabilmek için asetonitrilin artırılmasının uygun olacağı belirlenmiştir. pH 4'de bu koşullarda 20 ng  $\beta$ -aspartam tayin edilebileceği;  $\beta$ -aspartam için geri kazanma veriminin %91-100 olduğu; çukulatalı içecekler ve pudinglerde, tayinin dedeksiyon limitinin (0.05 mg/10g toz) üzerinde  $\beta$ -izomer olmadığı ve kafein, sodyum benzoat, sakların ve siklamatin ayırmada bozucu olmadığı belirtilmektedir.

STAMP ve LABUZA (1989), aspartam ve  $\beta$ -L-aspartil-L-fenilalanin, diketopiperazin,  $\alpha$ -L-aspartil-L-fenilalanin,  $\beta$ -L-aspartil-L-fenilalanin-1-metilester, L-fenilalanin-1-metilester ve fenilalaninin ayırımı üzerinde durmuşlardır. Elue edici olarak fosfat tamponu-asetonitril kullanmışlar, bu çalışmada fenilalanin,  $\beta$ -aspartam ve diketopiperazinin birlikte elüsyonu nedeniyle elue ediciye iyon çifti oluşturucunun gerekliliğine karar vermişlerdir. Elue edici bileşimi için 20:80(v/v) asetonitril:5 mM 1-heptan sulfonik asit, 5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH3)'ün uygun olduğu, aspartam ve bozunma ürünlerinin ayırımının net bir şekilde ve piklerde herhangi bir kuyruklanma olmadan gerçekleştiği belirtilmektedir. Çalışmada numune olarak diet kola seçilmiş, belli bir süre 80°C'de ısıtma yapılarak bozunma hızlandırılmıştır. Diet kolada bulunan kafein ve benzoatın da ayırmada bozucu olmadığı belirtilmektedir.

MOTELLIER and WAINER (1990), aspartamın dört stereoizomeri, L,L-aspartam, D,L-aspartam, D,D-aspartam ve L,D-aspartam ve bozunma ürünlerinin direkt sterokimyasal çözümlenmesini HPLC yöntemiyle gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada, mobil faz olarak  $\text{HClO}_4$ 'ün sulu çözeltisi (pH 2,8), 2-propanol derişimi %1.5 olacak şekilde modifiye edilerek kullanılmış, çözücü gradienti yerine sıcaklık gradienti uygulanmıştır. Kromatografik standardlar 100  $\mu\text{M}$  derişimde hazırlanmış, diet kola, ultrasonik banyoda degaze edilmiş, suyla beş kat seyreltilmiştir. Araştırmacılar yöntemin aspartam stereoizomerlerinin ayırımı için uygun olduğunu belirtmektedirler.

HAVAKAWA ve ark. (1990), aspartam, aspartik asit, penilalanin ve aspartilfenilalaninin ayırımında bu bileşiklerin hafifçe bazik ortamda siyanür iyonu varlığında naftalen -2,3- dikarboksaldehit ile oluşturdukları fluoressan özellikteki 1-siyano -2-sübstitüe benz [f] isoindol türevlerinden yararlanmışlardır. Çalışmacılar bu türevlerin RPHPLC ile ayırımında dedeksiyon limitinin subpikomol değerine düşebildiğini, alkali koşullarda aspartamın aspartilfenilalanin ve diketopiperazine dönüşümü nedeniyle aspartamın katı faz ekstraksiyonuyla diğer bileşiklerden ayrılması gerektiğini belirtmektedirler.

BELL ve WETZEL (1995) aspartamın bozunmasında tampon tipinin etkisini inceledikleri araştırmalarında aspartam tayinini HPLC yöntemi ile gerçekleştirmişlerdir. Araştırmalarında Nova Pak C18 kolonu tercih eden araştırmacılar Stamp ve Labuzaya (1989) ait yöntemi modifiye etmişlerdir. Absorbans ölçümleri 214 nm'de

yapılan çalışmada sodyum heptan sulfonat içeren elue edici kullanılmıştır. Araştırmacılar aspartamın bozunmasının fosfat tamponunda, aynı pH ve aynı tampon derişimindeki sitrat tamponundan daha hızlı olduğunu belirtmektedirler.

Aspartamın yüksek performans sıvı kromatografi ile tayininde genellikle UV dedektör kullanılmasına rağmen elektrokimyasal dedektörün kullanıldığı çalışmalar da vardır. Galletti ve Bocchini (1996) araştırmalarında elektrokimyasal olarak inaktif olan aspartamı fotokimyasal bir reaktörde aktif hale getirerek elektrokimyasal dedektörle tayin etmişlerdir. C 6 kolonu tercih eden araştırmacılar %0.1 perklorik asit-metanol (85:15, v/v) karışımını, elue edici olarak kullanmışlardır. 1-20 mg/L aralığında lineer cevabın elde edildiği çalışmada standart sapma %5.3'dür (n=5).

GIBBS ve ark. (1996) fotodiyot array dedektörü tercih ettikleri araştırmalarında aspartik asit, fenilalanin, aspartilfenilalanin, aspartam ve diketopiperazinin ayırımlarını gerçekleştirmişlerdir. Elue edici olarak %0.1 tirtifloroasetik asit içeren su-asetonitril (90:10, v/v), kolon olarak C 8 RP 300(30x4,6mm, 5µ) kolunun kullanıldığı çalışmada analizler ayrıca iyon değişim kromatografisi ile yapılmıştır. Piklerin belirlenmesinde elektrosiprey iyonizasyon kütle spektrometresi metodundan yararlanılmıştır. İyon değişim kromatografisi ile diketopiperazinin tayin edilemediği, kısa kolon kullanmanın analiz süresini azalttığı, kısa kolonun daha ekonomik olduğu, yöntemin dedeksiyon limitinin çok düşük olmadığı ancak rutin analizler için yeterli olduğu belirtilmektedir.

ABOUL-ENEIN ve BAKR (1997) yüksek performans sıvı kromatografi ve kapiler zon elektroforez yöntemlerini kullanarak aspartam ve bozunma ürünlerinin ayırımlarında iki yöntemin etkinliğini karşılaştırmasını yapmışlardır. Araştırmada LL-α-aspartam, LL-β-aspartam, L-α-aspartil-L-fenilalanin, L-β-aspartil-L-fenilalanin, L-β-aspartil-L-fenilalanin ve diketopiperazinin ayırımları üzerinde durulmuştur. Yüksek performans sıvı kromatografide bütün bileşikler için 5-100 µg/mL aralığındaki lineer ilişki kapiler zon elektroforez yönteminde 250-400µg/mL olarak belirlenmiştir. Dedeksiyon limitinin yüksek performans sıvı kromatografi yönteminde diğer yöntemden 20 kat düşük olduğu, enjeksiyon uyarılığının bütün bileşikler için daha iyi olduğu ancak ayırma etkinliğinin kromatografi yönteminde daha düşük olduğu belirtilmektedir.

### **ASPARTAMIN DİĞER GIDA KATKILARINDAN HPLC YÖNTEMİ İLE AYIRIMI**

ARGOUEDELIS (1984) Partisil-10SC katyon değiştirici kolon kullandığı izokratik HPLC çalışmasında UV dedektör kullanarak aspartamı, gıda katkıları olan sakkarin, benzoik asit ve kafeinden ayırmıştır. Mobil faz olarak 0,1M NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>'ün (pH 4,5) kullanıldığı çalışmada dedeksiyon dalga boyu 214 nm'dir. Standardların 1mg/mL'lik çözeltileri mobil fazda hazırlanarak kullanılmış, iç standard olarak adenin sülfat tercih edilmiştir. 214 nm dalga boyunda sakkarin ve benzoik asit tayininde meşrubatta bulunan diğer bileşiklerin bozucu etkilerinin çok az olduğu, dış standard yönteminin kullanılması durumunda aspartam tayininde bağıl standard sapmanın %5-8 ve geri kazanmanın yaklaşık %100 olduğu belirtilmektedir. Kafeinsiz denilen ve çok az düzeyde kafein bulunduran meşrubatlarda geri kazanma veriminin yüksekliği, yöntemin dezavantajı olarak belirtilmektedir.

TYLER (1984), aspartamın sodyum sakkarin, kafein ve sodyum benzoattan kromatografik ayırımı üzerinde çalışmıştır. Bundopak C 18 ters faz kolonun kullanıldığı çalışmada mobil faz trietil amonyum fosfat: asetonitril (85:15, pH 4,3) dir. pH'nın ayırmadaki etkinliği incelenmiş, pH'nın 2,7'den 4,3'e değiştirilmesi durumunda benzoik asitin alikonma zamanının küçülmesini belirleyen, diğerlerinin elüsyonlarında bir problem olmadığını tespit eden çalışmacı elüsyon süresini kısa tutabilmek amacıyla pH 4,3'de çalışmayı tercih etmiştir. Yöntemin standard sapması incelenen tüm bileşikler için %0.3'ten küçük olup geri kazanma verimlerinin sadece sakkarin için %97.8'e düştüğü, bunun sebebinin ise karamelin bozucu etkisinden kaynaklandığı belirtilmektedir. Çalışmacı 10 mg/L derişimlerden daha düşük derişimlerde çalışma durumunda enjeksiyon hacminin artırılmasını ve pik alanı yerine pik yüksekliğini kullanarak kantitatif değerlendirme yapmanın daha uygun olduğunu belirtmektedir. Çalışmada sakkarin için dedeksiyon limiti 0.05 mg/100mL, diğerleri için 0.2mg/100mL olarak belirlenmiştir.

WEBB ve BECKMAN (1984) meşrubatlarda aspartam tayinini RP-HPLC sisteminde gerçekleştirmişlerdir. µBundopak C18 kolonunun (300x4mm) kullanıldığı sistemde araştırmacılar UV dedeksiyonda 254 nm dalga boyunda 0.05 auf's'de çalışmışlardır. Elue edicinin hazırlanmasında %10'luk asetik asit çözeltisinin pH'ı doy-

gun sodyum asetat çözeltisi ile 3'e ayarlanmıştır. Elue edici %3 oranında izopropil alkol içerecek şekilde modifiye edilmiştir. Numunenin sadece süzülerek kullanıldığı çalışmada aspartamın alıkonma zamanının 7 dakika olduğu, asetik asit ve izopropil alkolün ayırmanın etkinliğinde önemli olduğu, sakkarin, kafein, sodyum benzoat, suni boyar madde ve çeşni verici maddelerin tayinde bozucu olmadıkları, yaklaşık 0.05 g/100 mL seviyesinde aspartam katkılı numunelerle yapılan çalışmalarda geri kazanma veriminin %98.2, standard sapmanın %2.9 olduğu belirtilmektedir. Dedektörün 0.005 auFS'de kullanılması durumunda dedeksiyon limitinin 0.10 µg aspartam olduğu, enjeksiyon hacmi olarak 20 µl yerine 80 µl kullanarak doğrusal çalışma bölgesinin genişletilebileceği açıklanmaktadır. Radial Pak C18'i alternatif olarak kullanan çalışmacılar bu kolonda uygun ayırmayı gerçekleştiremediklerini belirtmektedirler.

HANN VE GILKISON (1987) çalışmalarında aspartam, sakkarin, benzoik asit, tartrazin ve sunset sarısının ayırımları üzerinde çalışmışlardır. Gradient çalışma, Spherisorb 5 ODS kolonda 50 mM fosfat tamponu: %10'luk metanol (pH 3,6) ile başlatılmış ve 10 dakika içinde %60 metanole çıkmıştır. 1 mg/L'lik stok çözeltilerin kullanıldığı çalışmada meşrubat örneklerinden 10 µL direkt enjekte edilirken şeker içeriği fazla olan meşrubatlarda seyreltme uygulanmıştır. Çalışmacılar 254 nm'de çalışmak yerine 214 nm'de çalışmayı veya her madde için kendine özgü dalga boyunda ve duyarlılıkta çalışmayı tercih etmişlerdir. Sakkarin, aspartam ve benzoik asit için matrisin bozucu olmadığı, geri kazanma verimlerinin 101,2; 99,4 ve 103,4 olduğu, bu sebeple dış kalibrasyonla sonuç alınabileceği; ancak tartrazin ve sunset sarısı için geri kazanma verimlerinin sırasıyla %77, 3 ve %81,5 olduğu ve birden fazla standard ilaveli çözelti ile çalışma gerekliliği çalışmacılar tarafından belirtilmektedir. Varyasyon katsayısı, aspartam için %6.96; benzoik asit için %3.35 ve sakkarin için %1.95'dir.

VEERABHADRARAO ve ark. (1987) aspartamın, asesulfam K, sakkarin, p-hidroksibenzoik asit, kafein, vanilin, dulsin ve benzoik asitten ayırımında metanol:asetik asit: su (20:5:75) elue edicisini kullanmışlardır, verilen sırada elue olan bileşiklerin ayırımında alıkonma faktörlerinin 0.37-5.56 olduğu belirlenmiştir. Elue edici bileşiminin 35:5:60 olarak kullanılmasının kafein, vanilin, dulsin ve benzoik asitin ayırımlarında daha uygun olduğu, alıkonma faktörlerinin 0,34-2,14 olduğu; aspartamın kafein ve vanilinden ayırımında ise asetat tamponu (pH 3,0): metanol (99:5) karışımın elue edici olarak kullanılmasının daha uygun olduğu, alıkonma faktörlerinin 1.93-2.87 olduğu ve aspartam pikinde son derece az bir kuyruklanma olduğu belirtilmektedir. Aspartamın dedeksiyon limiti 2000 ng iken diğerlerinde bu değerler daha düşük ve 3-100 ng olduğu açıklanmaktadır. Çalışmada direkt enjeksiyon durumunda geri kazanma veriminin aspartam için %98.2; bir organik çözücüye ekstraksiyondan sonra enjeksiyon durumunda %92.8-%94.6 bulunduğu ifade edilmektedir. Diğerleri için direkt enjeksiyonda %98.4-100.6; ekstraksiyon çalışmasında %91.6-101.8 geri kazanma verimleri elde edildiği belirtilmektedir.

MOORS ve ark. (1991), gıdalarda koruyucu olarak kullanılan sorbik asit ve benzoik asit ile sentetik tatlandırıcılar aspartam ve sakkarin üzerinde yaptıkları çalışmada katı faz ekstraksiyon sisteminden yararlanmışlardır. Çalışmada silika esaslı kuaterner amonyum yapısında anyon değiştirici reçine kullanılmıştır. Elusyon %1'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren metanol çözeltisi ile yapılmıştır. Aspartamın anyon değiştiricide tutulmadığı, diğerlerinin bu değiştiricide kaldığı gözlenmiştir. Aspartam içeren çözelti, oktadesil sorbent üzerinden geçirilmiş ve aspartam burada tutulmuştur. Ekstraktlar, C18 kolonunda fosfat tamponu: asetonitril elue edicisi ile alınmış, koruyucular ve sakkarin 230 nm'de, aspartam ise 215 nm'de izlenmiştir. Bileşiklerin geri kazanma verimlerinin en az %95 ve yöntemin bağıl standard sapmasının ise %3,2'den küçük olduğu çalışmacılarca belirtilmektedir.

SANCHEZ ve GALLARDO (1992) aspartamın, sodyum glutamattan ayırımında her iki bileşiğin fluoresansın ile verdiği türevlerin UV ve fluoresans özelliklerinden yararlanmışlardır. Türev hazırlama için her iki bileşiğin 10 µg/mL'lik çözeltilerinden 15-300 µL, fluoressaminin asetondaki 3,4.10<sup>-3</sup> M'lık çözeltisi ve 300 µL pH'ı 9 olan borat tamponu ile karıştırılmıştır. Mobil faz olarak tampon (pH 9)-asetonitril-metanol (50+25+25, v/v) çözeltisi kullanılmıştır. UV dedektörle 395 nm, fluoresans dedektörle 395/482 nm'de çalışılmıştır. 395 nm'de fotometrik yöntemin aspartam için bağıl standard sapması %2.26; glutamat için %3.14'dür. Florimetrik dedeksiyon durumunda bu değerler %0.62 ve %0.34'dür. Fotometrik yöntemde 0.2 ve 0.1 µg/mL olan dedeksiyon limitleri florimetrik dedeksiyonda 0.14 ve 0.08 µg/mL'dir. Çalışma ayrıca 1. türev spektrumu alınarak spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiş; tayine bozucu etki yapabileceği düşünülen dulsin, sodyum siklamat, sakkarin,

askorbik asit, metil paraben, benzoik asit ve nikotinaminin etkileri, belli derişimlerde incelenmiştir. Metil paraben ve benzoik asitin derişimlerinin aspartam tayininde; sodyum siklamat ve dulisinin glutamat tayininde bozucu analit oranı 10:1'in üzerinde olduğunda analiz sonucunu arttıracak şekilde bozucu etkilerinin olduğu belirlenmiştir.

JIMIDAR ve ark. (1993), diet kola ve toz meyve konsantrelerinde aspartam, benzoik asit ve kafeinin ayırımında kapiler zon elektroforez yöntemini geliştirmişler ve sonuçlarını RP HPLC yöntemi ile karşılaştırmışlardır. Her iki metodun tekrarlanabilirliklerinin iyi olduğu, uyarılığın bağıl standart sapmasının kapiler zon elektroforez yönteminde HPLC'den daha yüksek olduğu, bunun kapilerin koşullarından kaynaklandığı belirtilmektedir. Ayırma etkinliğinin kapiler zon elektroforezde HPLC'den daha iyi olduğu, ancak kapiler zon elektroforezde makriks etkinin daha fazla etkin olması nedeniyle dedeksiyon limitinin HPLC'den daha yüksek olduğu vurgulanmaktadır.

CHEN ve ark. (1997) sodyum sakkarin, aspartam, sodyum siklamat, asesulfam K ve sitrik asitin ayırımı üzerinde yüksek performans anyon değişim kromatografisi yöntemi ve seri halinde iki dedektör kullanmanın bu bileşiklerin ayırımında önemini incelemişlerdir. UV dedektör, bileşiklerin maksimum absorbans dalga boyları esas alınarak ve elüsyon sırasında dalga boyu değiştirilerek kullanılmıştır. Sodyum siklamat ve sitrik asit kondüktometrik dedektörle belirlenmişlerdir. Dedeksiyon limitleri sodyum sakkarin için 0.019µg/mL, aspartam için 0.035 µg/mL, asesulfam K için 0.044 µg/mL sodyum siklamat için 0.16 µg/mL, sitrik asit için 0.22 µg/mL'dir.

## KAYNAKLAR

- ABOUL-ENEİN, H.Y., BAKR, S.A. 1997. Comparative study of the separation and determination of aspartame and its decomposition products in bulk material and diet soft drinks by HPLC and CE.J.Liq. Chrom.&Rel. Technol. 20(9), 1437-1444.
- ARGOUEDELIS, C.J., 1984. Isocratic liquid chromatography method for the simultaneous determination of aspartame and other additives in soft drinks. J. Chromatogr. 303, 256-262.
- BELL, L.N. and LABUZA, T.P., 1991(a). Aspartame degradation kinetics as affected by pH in intermediate and low moisture food systems. J. Food Sci., 56(1), 17-20.
- BELL, L.N. and WETZEL, C.R. 1995. Aspartame degradation in solution as impacted by buffer type and concentration. J. Agric. Food Chem. 43, 2608-2612.
- CHA, A.S. and HO, C.T. 1988. Studies of the interaction between aspartame and flavor vanillin by high performance liquid chromatography. J. Food. Sci. 53, 562-564.
- CHEN, Q., MOU, S., LIU, K., Yang, Z., N.;Z. 1997. Separation and determination of four artificial sweeteners and citric acid by high-performance anion exchange chromatography. J. Chromatogr. A. 771. 135-143.
- CODE of FEDERAL REGULATIONS, 1982. Title 21, U.S. Government Printing Office. Washington. 172.804.
- DANIELS, D.H., JOE, JR. F.L., WARNER, C.R., FAZIO, T., 1984. Liquid chromatographic determination of aspartame in dry beverage bases and sweetener tablets with confirmation by thin layer chromatography. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67(3), 513-515.
- FDA, 1981. Aspartame Commissioner's Final Decision. Food and Drug. Admin, Fed. Reg., 46, 38285.
- FDA, 1983. Food additives permitted for direct addition to food for human consumption. Aspartame. Food and Drug Admin. Fed. Reg., 48, 31376.
- FEDERAL REGISTER, 1974. Vol. 39, No.145.
- GAINES, S.M. and BADA, J.L., 1987. Reversed phase high performance liquid chromatographic separation of aspartame diastereomeric decomposition products. J. Chromatogr. 389, 219-225.
- GALLETTI, G.C., BOCCHINI, P. 1996. High performance liquid chromatography with electrochemical detection of aspartame with a post column photochemical reactor. J. Chromatogr. A 729, 393-398.
- GIBSS, B.F., ALLI, I., MULLIGAN, C.N. 1996. Simple and rapid high performance liquid chromatographic method for the determination of aspartam and its metabolites in foods. J. Chromatogr. A. 725, 372-377.
- HANN, J.T. and GILKISON, I.S., 1987. Gradient liquid chromatographic method for the simultaneous determination of sweeteners, preservatives and colours in soft drinks. J. Chromatogr. 395, 317-322.
- HAYAKAWA, K., SCHILPP, T., IMAI, K., HIGUCHI, T and WONG, O.S. 1990. Determination of aspartic acid, phenylalanine and aspartylphenylalanine in aspartame containing samples using a precolumn derivatization HPLC method.
- HOMLER, B.E. 1984. Properties and stability of aspartame. Food Technol. 38, 50-55.
- HUSSEIN, M.M., DAMELIA, R.P., MANZ, A.L., JACIN, H and CHEN, T.C. 1984. Determination of reactivity of aspartame with flavor aldehydes by gas chromatography, HPLC and GPC. J.Food Sci. 49, 520-524.



- JIMIDAR, M., HAMOIR, T.P., FORIERS, A and MASSART, D.L. 1993. Comparison of capillary zone electrophoresis with high-performance liquid chromatography for the determination of additives in food stuffs. *J. Chromatogr.* 636, 179-186.
- KIM, S.K., JUNG, M.Y and KIM, S.Y. 1997. Photodecomposition of aspartame in aqueous solutions. *Food Chem.* 59(2), 273-278.
- LAWRENCE, J.F. and IYENGAR, J.R., 1987. Liquid chromatographic determination of beta aspartame in diet soft drinks, beverage powders and pudding mixes. *J. Chromatogr.* 404, 261-266.
- LEWIS, D., STEGINK, L.J. and FILER, J.R., 1984. Aspartame. *Physiology and Biochemistry*. Marcel Dekker. New York.
- MOORS, M., TEIXEIRA, C.R.R.R., JIMIDAR, M. and MASSART, D.L., 1991. Solid-phase extraction of the preservatives sorbic acid and benzoic acid and the artificial sweeteners aspartame and saccharin. *Anal. Chim. Acta.*, 255, 177-186.
- MOTELLIER, S. and WAINER, I.W., 1990. Direct stereochemical resolution of aspartame stereoisomers and their degradation products by high-performance liquid chromatography on a chiral crown ether based stationary phase. *J. Chromatogr.* 516, 365-373.
- PRUDEL, M. and DAVIDKOVA, E., 1985. Determination of the decomposition products of Usal in model systems and determination of dioxopiperazine in soft drinks by HPLC. *Die Nahrung.* 29, 381-389.
- PRUDEL, M., DAVIDKOVA, E., DAVIDEK, J. and KMINEK, M., 1986. Kinetics of decomposition of aspartame hydrochloride (Usal) in aqueous solutions. *J. Food. Sci.*, 51(6), 1393-1398.
- SANCHEZ, F.G. and GALLARDO, A.A., 1992. Liquid chromatographic and spectrofluorimetric determination of aspartame and glutamate in foodstuffs following fluorescamine fluorogenic labelling. *Anal. Chim. Acta.*, 270, 45-53.
- STAMP, J.A. and LABUZA, T.P., 1989. An ion-pair high performance liquid chromatographic method for the determination of aspartame and its decomposition products. *J. Food. Sci.*, 54(4), 1043-1046.
- TSANG, W.S., CLARKE, M.A., and PARRISH, F.W., 1985. Determination of aspartame and its breakdown products in soft drinks by reverse-phase chromatography with UV detection. *J. Agric. Food Chem.* 33, 734-738.
- TSOUBELI, M.N. and LABUZA, T.P., 1991. Influence of dairy proteins on aspartame stability in the pH 6-7 range. *J. Food Sci.*, 57(2), 361-365.
- TYLER, T.A., 1984. Liquid chromatographic determination of sodium saccharin, caffeine, aspartame and sodium benzoate in cola beverages. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67, 745-747.
- VEERABHADRARAO, M., NARAYAN, M.S, KAPUR, O. and SASTRY, C.S., 1987. Reverse phase liquid chromatographic determination of some food additives. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70(3), 578-582.
- VERZELLA, G. and MANGIA, A., 1985. High performance liquid chromatographic analysis of aspartame and related products. *J. Chromatogr.*, 346, 417-422.
- VERZELLA, G., BAGNASCO, G. and MANGIA, A., 1985. Ion pair high performance liquid chromatographic analysis of aspartame and related products. *J. Chromatogr.* 349, 83-89.
- WEBB, N.G., BECKMAN, D.D., 1984. Reverse phase liquid chromatographic determination of aspartame in beverages and beverage mixes. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67(3), 510-513.