

Araştırma Makalesi / Research Article

Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu ile Zenginleştirildikten Sonra Ponceau 4R'nin Şurup ve Meyve Şekerinde Spektrofotometrik Tayini

Tufan GÜRAY*, Şirin ALPER

*Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Kimya Bölümü, Eskişehir
(ORCID: 0000-0002-7509-7260) (ORCID: 0000-0002-3304-569X)*

Öz

Ponceau 4R (E-124) özellikle gıda ve ilaç sanayisinde sıklıkla kullanılan bir gıda boyasıdır. Bu çalışmada, Ponceau 4R'nin bulut noktası ekstraksiyonu için non iyonik bir yüzey aktif madde olan Brij 58 kullanılarak ön deriştirme ve ayırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu ön deriştirme işlemi sonrasında Ponceau 4R spektrofotometrik tayini yapılmıştır. Bulutlanma noktası ekstraksiyonu sonrasında ayrılan yüzey aktif maddece zengin fazdaki Ponceau 4R, su ile 0.5 mL'ye seyreltilmiş ve köre karşı 510 nm'de UV-görünür spektrofotometri ile absorbansı ölçülmüştür. Ekstraksiyon için optimum şartlar pH 6-9 aralığında, Brij 58 miktarı % 0.5 (w/v), tuz miktarı % 20 (w/v), inkubasyon sıcaklığı 70 °C ve 10 dk bekleme süresi olarak belirlenmiştir. Yöntemin tayin aralığı 0.08 - 2.50 µg mL⁻¹ olarak belirlenmiştir. Bu yöntemin saptama sınırı (LOD), 0.00453 µg mL⁻¹ olarak bulunmuştur. Bu geliştirilen seçici ve hassas bulutlanma noktası ekstraksiyonu yöntemi, Ponceau 4R'nin rutin analizi için kullanılabilir.

Anahtar kelimeler: Ponceau 4R, E124, spektrofotometrik, bulutlanma noktası ekstraksiyonu.

Spectrophotometric Determination of Ponceau 4R in Syrup and Fruit Candy after Enrichment with Cloud Point Extraction

Abstract

Ponceau 4R (E-124) is a food dye that is commonly used in the food and pharmaceutical industry. In this study, pre-concentration and separation was performed using Brij 58, a non-ionic surfactant, for cloud point extraction of Ponceau 4R. After this pre-concentration procedure, Ponceau 4R spectrophotometric determination was performed. After the cloud point extraction, the surfactant-rich phase Ponceau 4R was diluted to 0.5 mL with water and the absorbance was measured by UV-visible spectrophotometry at 510 nm against to blank. The optimum conditions for extraction were determined as in the pH range of 6-9, the amount of Brij 58 was 0.5% (w/v), the salt amount was 20% (w/v), the incubation temperature was 70 °C and the 10 min waiting time. The determination range of the method was 0.08 - 2.50 µg mL⁻¹. The detection limit (LOD) of this method was found to be 0.00453 µg mL⁻¹. This developed selective and sensitive cloud point extraction method can be used for routine analysis of Ponceau 4 R.

Keywords: Ponceau 4R, E124, spectrophotometric determination, cloud point extraction.

1. Giriş

Ponceau 4R (Food Red, Acid Red 18, E124), alkollü içecekler ve alkolsüz içecekler, şekerler, şuruplar, unlu mamuller, soslar gibi çeşitli gıda maddelerine kırmızı renk vermek için gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan bir sülfonatlı azo boyasıdır [1]. Son yıllarda yapılan çalışmalara göre, Ponceau 4R ve benzeri gıdalarda kullanılan azo boyar maddeler alımı çocukların davranışlarını etkilediğinden, artan hiperaktiviteye ve hoşgörüsüzlüğe neden olan ciddi sonuçlar ortaya çıkmıştır [2]. 2009 yılında, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), bir gıda katkı maddesi olarak bu boyanın güvenli kullanım miktarını

*Sorumlu yazar: tguray@ogu.edu.tr

Geliş Tarihi: 09.05.2019, Kabul Tarihi:06.08.2019

yeniden değerlendiren ve sonunda Günlük Kabul Edilebilir Alım Miktarını 0-4 mg kg⁻¹ 'dan 0.7 mg kg⁻¹'a düşüren bir bilimsel görüş ortaya koyarak düzenleme yapmıştır [1].

HPLC [3], diferansiyel puls polarografisi [4], spektrofotometri [5] gibi Panceau 4R tayini için literatürde birçok çalışma vardır. Bu çalışmalarda ve benzeri pek çok çalışma için tayin öncesinde sıvı sıvı ekstraksiyon (LLE), katı faz ekstraksiyon (SPE) ve bulutlanma noktası ekstraksiyonu (CPE) gibi bir takım ayırma ön deriştirme işlemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bulutlanma noktası ekstraksiyonu (CPE) yüzey aktif maddelerin analitik kimyadaki pratik uygulamalarındandır. Geleneksel sıvı sıvı ekstraksiyona kıyasla, yüzey aktif maddeler kullanılarak, çok miktarda pahalı, toksik ve yanıcı organik çözücü kullanımından kaçınılır. İyonik olmayan yüzey aktif maddelerinin su çözeltilerinde faz ayrılması, kritik sıcaklığın (bulutlanma noktası sıcaklığının) üzerinde sıcaklıklara ısıtılması veya inorganik tuzların eklenmesi ile elde edilir. Sonuç olarak, iki faz oluşur: Birincisi küçük hacimli yüzey aktif madde bakımından zengin bir faz ve ikincisi büyük hacimli su fazıdır [6]. Böylece, tayin edilecek madde küçük hacme deriştirilmiş olur.

Bu çalışmada, Ponceau 4R'nin spektrofotometrik tayini için ilk defa Brij 58 yüzey aktif maddesi kullanılarak bulutlanma noktası ekstraksiyonu ile zenginleştirme işlemi yapılmıştır. Yöntem pH, yüzey aktif madde derişimi, ekstraksiyon süresi ve sıcaklığı, tuz cinsi ve tuz derişimi gibi çeşitli parametreler incelenmiştir. Geliştirilen yeni yöntem ile şurupta ve meyve şekerinde bulunan Ponceau 4R boyar maddesinin miktarının saptanması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Cihazlar

Numune tartımları için Sartorius terazisi kullanıldı. Ortamın pH'nın ayarlanması için pH metre (ISO LAB Laborgerate GmbH) kullanıldı. Ponceau 4R'nin absorbans değerleri 300-800 nm dalga boyu aralığında kaydedildi. Karıştırma işlemleri için vorteks (ISOLAB, Laborgerate GmbH) kullanıldı. Ultrasonik çözdürme işlemleri için Bandelin Sonarex Super model bir ultrasonik banyo kullanıldı. Ortam sıcaklığının ayarlanması için sıcak su banyosu (Water Bath RE 100 B) kullanıldı. Faz ayırımının gerçekleştirilmesi için santrifüj cihazı (Sigma 1-6 P) kullanıldı. Absorbans değerini ölçmek için 1 mL hacimde kuvars hücreli bir UV-Vis spektrometresi (Agilent Technologies, Cary 60) kullanıldı.

2.2. Reaktifler

Na₂SO₄, Brij 58, Ponceau 4R gıda boyası ve diğer kimyasallar Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir.

2.3. Numuneler

Forza şurup eczaneden temin edildi. (Aris Ali Raif İlaç Sanayi, üretim yeri: Pharmactive İlaç San. Ve Tic. A.Ş., Karaağaç Mah., Fatih Bulvarı, No:32 , ÇOSB, Kapaklı/ Tekirdağ). 10 mL şurup numunesi 100 mL 'ye seyreltilerek işlemler gerçekleştirildi. Bölge marketlerinden alınan uygun miktarda meyve şekeri (5.0000 ± 0.0005 g) ılık su içinde ultrasonik banyoda çözüldü, süzöldü ve 500 ml'lik hacimsel şişelerde hacme tamamlandı. Ponceau 4R'nin spektrofotometrik tayini için önerilen ekstraksiyon prosedürünün uygulanması için örnek çözeltiden uygun hacimler alındı.

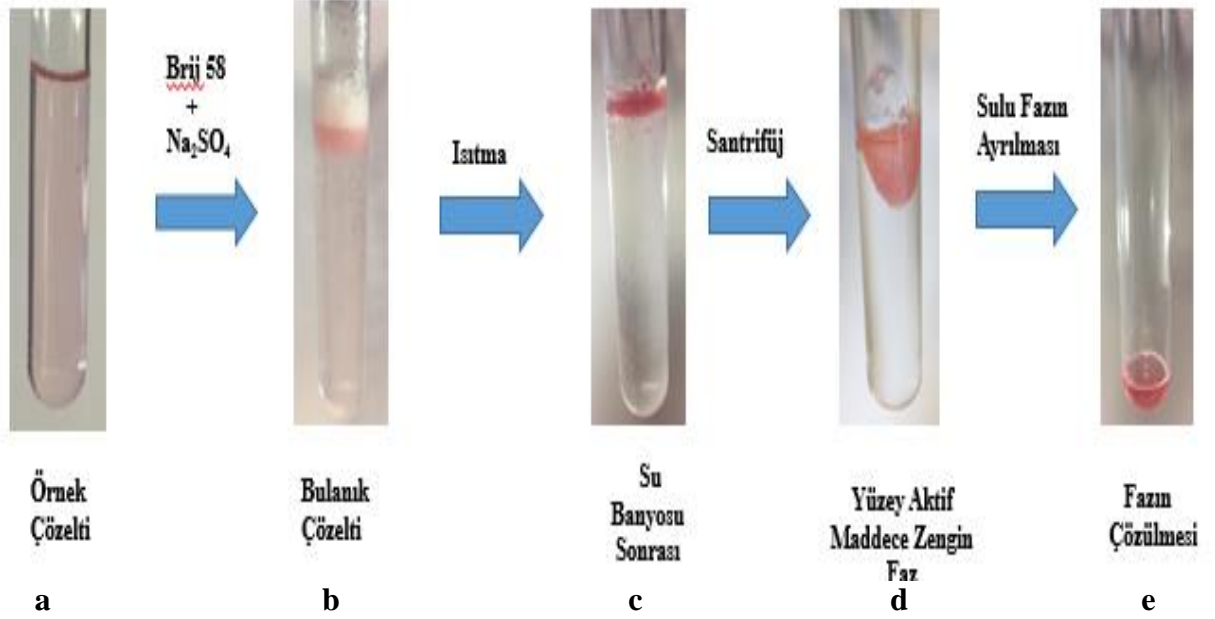
2.4. Standart çözeltilerin hazırlanması

100 mg L⁻¹ stok Ponceau 4R çözeltisi hazırlamak için, 0.1 g boya deiyonize suda çözüldü ve 1000 mL'ye seyreltildi. Çalışma standardı çözeltiler istenen konsantrasyonları stok çözeltiden seyrelterek günlük olarak hazırlandı. Bu çözeltiler karanlıkta 4°C 'de saklandı. % 10'luk (w/v) Brij 58 çözeltisi hazırlamak için, Brij 58 'in on gramı tartıldı ve ultrasonik banyoda 100 ml deiyonize su ile çözüldü.

2.4. Ponceau 4R'nin şurupta ve meyve şekerinde tayini için önerilen yöntem

Önerilen yöntem, 1mL örnek çözeltisinden 15 mL'lik vidalı kapaklı santrifüj tüpüne alınır. Örnek üzerine 0,5 mL %10'luk Brij 58 ve 2,0000±0,0005 g Na₂SO₄ tartılıp eklenir. 10 mL'ye tampon (pH 6-

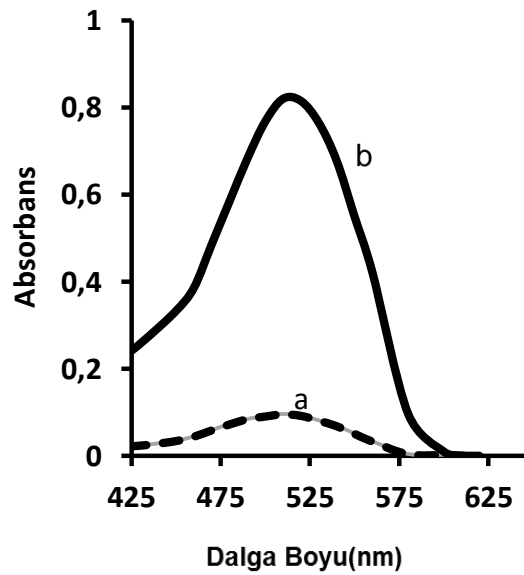
9) ile tamamlanır. Karışım 70°C’ de 10 dakika bekletilir. Daha sonra oda sıcaklığına gelmesi beklenir. Faz ayrımı için 5 dakika 4000 rpm’de santrifüj yapılır. Yüzey aktif maddece zengin faz ayrılarak 0,5 mL tampon ile vortekste çözülerek 510 nm’ de köre karşı UV-GB spektroskopisinde köre karşı ölçüm alınır.



Şekil 1. a- Örnek çözeltisi, b- Brij 58 + Na₂SO₄ ‘ten eklendikten sonra, c- İnkübasyondan sonra, d- Santrifüj işleminden sonra, e- Yüzey aktif madde bakımından zengin fazın ayrılmasından sonra 0,5 mL suda çözünür.

3. Bulgular ve Tartışma

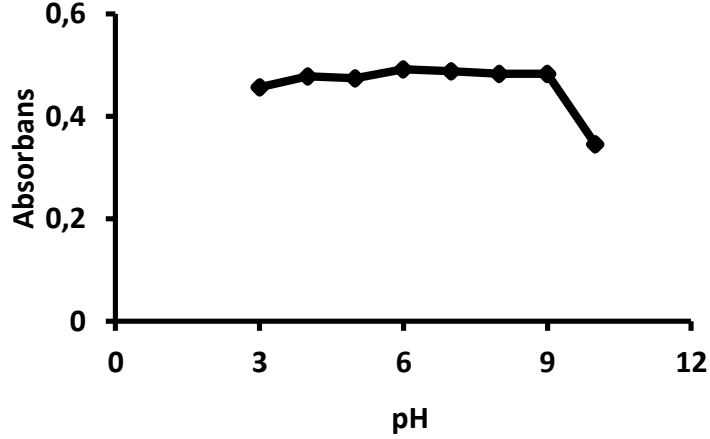
Bulutlanma noktası ekstraksiyonu yöntemi ile ponceau 4R'nin kantitatif geri kazanımlarını elde etmek için, zenginleştirme ve ayırma işlemi, noniyonik yüzey aktif madde Brij-58 konsantrasyonu, tuz konsantrasyonu etkisi, denge sıcaklığının etkisi ve inkübasyon süresi gibi çeşitli analitik faktörlerde araştırıldı. Bu ekstraksiyon işleminden sonra ponceau 4R'nin maksimum absorpsansı 510 nm'de olarak gözlemlendi.



Şekil 2. a) Bulutlanma noktası ekstraksiyonu öncesi ve b) bulutlanma noktası ekstraksiyonu sonrası Ponceau 4R için absorpsiyon spektrumları.

3.1. pH'in etkisi

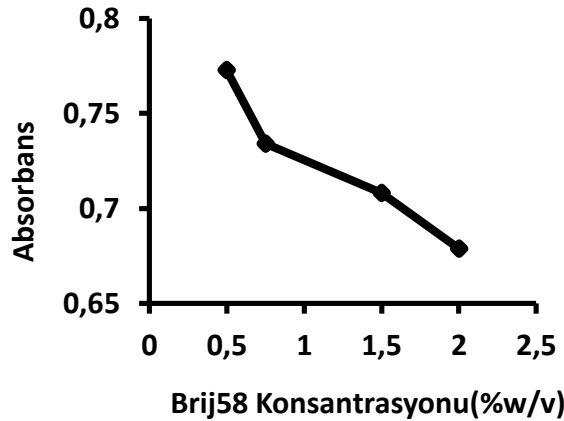
Bu yöntemde, pH, sulu faz ile yüzey aktif madde bakımından zengin faz arasındaki analitin dağılım katsayısını arttıran önemli bir parametredir. Bu nedenle, Ponceau 4R ekstraksiyon verimliliğini etkileyen pH 3 ve 10 arasında incelenmiştir. Çözeltinin pH'ı, bazik bölgede $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, HCl ve NaOH; asidik bölge için NH_3 ve CH_3COOH ilavesi ile pH metre kullanılarak istenilen değere ayarlanmıştır. Ponceau 4R 'nin absorbanı 510 nm'de ölçülmüştür. pH 6-9 aralığında en yüksek absorban değerleri gözlenmiştir. Bu pH aralığı optimum aralık olarak seçilmiştir.



Şekil 3. pH'nin ekstraksiyon verimliliği üzerine etkisi. 2,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ponceau 4R, %10 Brij 58, 2,000 g Na_2SO_4 , 70°C' de 10 dakika süreyle inkübasyon.

3.2. Yüzey aktif madde derişiminin etkisi

Yüzey aktif madde derişimini optimize etmek, ekstraksiyon verimini arttırmak için önemli parametrelerden biridir. Böylece, Brij 58'in konsantrasyonunun Ponceau 4R' nin absorbanı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 4'te verilmiştir. Görülebileceği gibi, absorban Brij 58'in % 0,5 (w/v) 'den daha yüksek derişimlerde düştüğü görülmektedir.

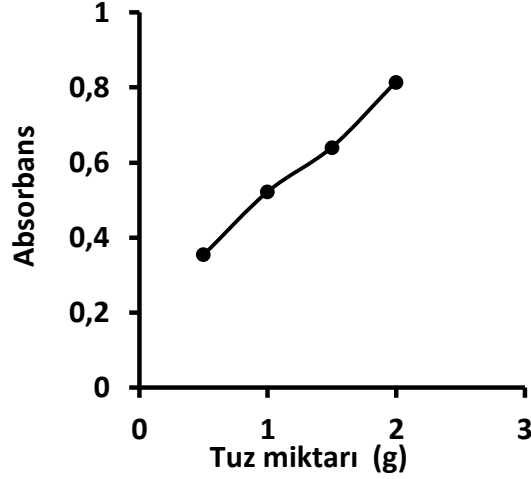


Şekil 4. 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ponceau 4R, pH 6-9, 2,000 Na_2SO_4 , %10 Brij 58, 70°C' de 10 dakika süreyle inkübasyon

3.3. Tuzun etkisi

Ekstraksiyon yönteminde, tuz konsantrasyonu önemlidir, bunun nedeni faz ayrılmasına, analitin sulu fazdan yüzey aktif madde bakımından zengin faza kütle transferini arttırmaya ve bulutlanma noktası sıcaklığını azaltmaya yardımcı olmasıdır. Bu nedenlerden dolayı, NaCl, Na_2SO_4 ve Na_2CO_3 gibi yaygın olarak kullanılan tuzlar denenmiş ve ekstraksiyon işlemi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Na_2SO_4

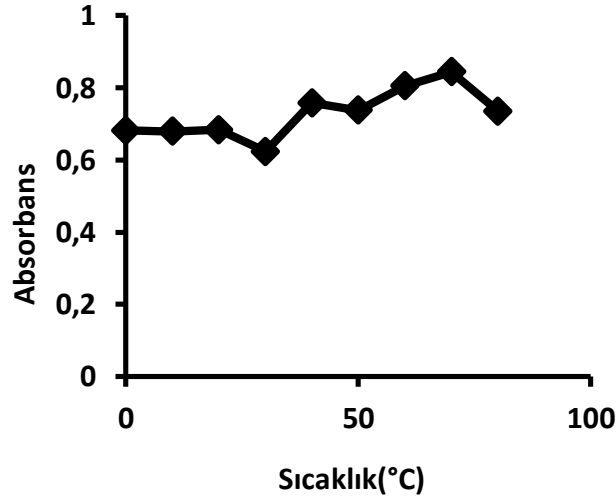
dışındaki diğer tuzlar kullanıldığında faz ayrımı olmadığı görüldü. Bu nedenle, Na_2SO_4 tercih edildi. Na_2SO_4 miktarı 2 g ve üstündeki miktarlarda absorbands artışına neden olmuştur. Ancak bu miktarın üstündeki değerler ilave edildiğinde faz ayırımından sonraki yüzey aktif maddece zengin fazın çözünmesi işleminde güçlükler çıkarması ve çökmenin olması absorbands ölçümünü imkansız kılmaktadır. Sonuçlar, Şekil 5'te verilmiştir.



Şekil 5. $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ponceau 4R, pH 6-9, $2,000 \text{ Na}_2\text{SO}_4$, %10 Brij 58, 70°C ' de 10 dakika süreyle inkübasyon

3.4. Denge sıcaklığının ve inkübasyon süresinin etkisi

Bulutlanma noktası ekstraksiyonu yönteminde incelenen diğer iki önemli parametre, denge sıcaklığı ve inkübasyon süresidir. Çalışılan sıcaklık aralıkları $0-80^\circ\text{C}$ idi ve en yüksek ekstraksiyon verimliliği 70°C 'de gözlemlendi. 5-15 dakika arasında inkübasyon süresi çalışılmıştır. Maksimum absorbands, 10 dakika bekleme sürecinde elde edilmiştir. Diğer çalışmalarda, bu optimum koşullarda gerçekleştirilmiştir.

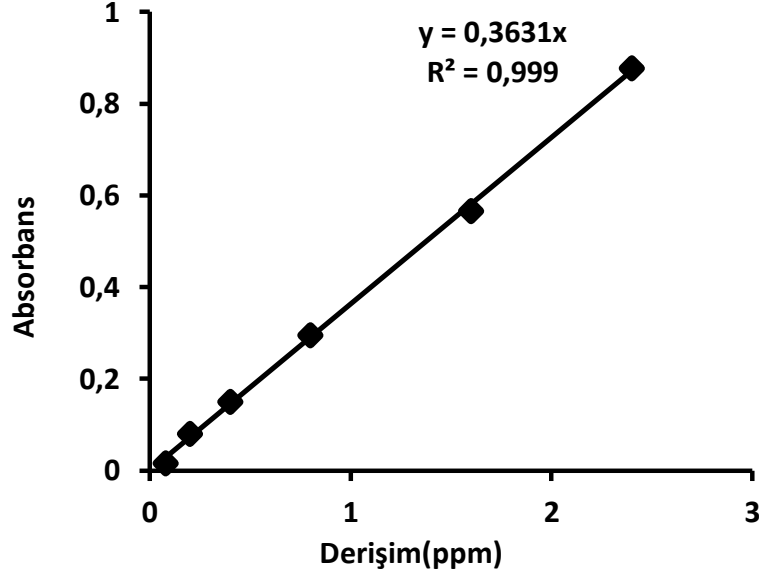


Şekil 6. $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ponceau 4R, pH 6-9, $2,000 \text{ Na}_2\text{SO}_4$, %10 Brij 58, 70°C ' de 10 dakika süreyle inkübasyon

3.5. Analitik performans

Önerilen yöntemle korelasyon grafikleri, ölçülen absorbandsa karşı artan Ponceau 4R konsantrasyonları arasındaki optimum şartlarda elde edilmiştir. Ponceau 4R'nin absorbandsı, optimum koşullarda, $0,08 \mu\text{g mL}^{-1}$ ile $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ arasındaki Lambert-Beer yasasına uyar. Ponceau 4R için korelasyon katsayısı 0,999'dur. Eğim değeri 0,3631'dir. Yöntemin gözlenebilirlik sınırı (LOD) kör ölçümünün standart sapmasının, kalibrasyon grafiğinin eğimine oranı olarak hesaplanmış ve $0,00453 \mu\text{g mL}^{-1}$, tayin sınırı

(LOQ), bu oranın 3 ile çarpılması ile hesaplanmış $0,01509 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Ayrıca, yöntemin tekrarlanabilirliği için kalibrasyon doğrusundaki en küçük derişimin ($0,08 \mu\text{g mL}^{-1}$) beş tekrar ölçümü alınarak hesaplanmış ve % 1,27 (bağıl standart sapma, %RSD) olarak hesaplanmıştır. Bu değerler literatürdeki benzer çalışmalar ile karşılaştırıldığında çok daha hassas olduğu görülmektedir (Tablo 1).



Şekil 7. $0,08-2,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ arasında değişen Ponceau 4R derişimi, pH 6-9, $2,000 \text{ Na}_2\text{SO}_4$, % 10 Brij 58, 70°C ' de 10 dakika süreyle inkübasyon

Tablo 1. Literatürde bildirilen bulutlanma noktası ekstraksiyonu sonrasında Ponceau 4R'nin spektrofotometrik tayini yöntemlerinin mevcut yöntem ile karşılaştırılması

Yüze Madde	aktif	Tuz	pH	İnkübasyon Sıcaklığı, ($^\circ\text{C}$)	İnkübasyon süresi, (dk)	Seyreltme çözücüsü	Kalibrasyon aralığı, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOD, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%RSD	% Geri kazanım	Kaynak
Triton X-114, 0,5 mL, %2		Na_2SO_4 , 0,5 mL, %5	6	-	-	Aseton, 40 μL	2,0-12,0	0,111	9,93	117,24- 105,98	[7]
Triton X-114 veya Brij 56, 2 mL, 0,5 M		NaCl , 0,75 mL, 2M	3	Triton X- 114 için 50, Brij 56 için 70	Triton X- 114 için 20, Brij 56 için 30	Su, 5 mL	0,05	Triton X- 114 için 0,025, Brij 56 için 0,062	Triton X- 114 için 2,45, Brij 56 için 3,43	Triton X- 114 için 94-98, Brij 56 için 52-87	[8]
Brij 58		Na_2SO_4 , 2 g	6-9	70	10	Su, 0,5 mL	0,08-2,5	0,00453	1,27	97,2-99,4	Mevcut çalışma

3.6. Yöntemin gerçek örneklerle uygulaması

Ponceau 4R'nin spektrofotometrik tayini için geliştirilen bu yöntem, bir şurup örneğine ve meyve şekerine uygulanmıştır. Örneklerde Ponceau 4R analizi, deneysel çalışma bölümünde açıklanan "Ponceau 4R'nin Şurupta ve Meyve Şekerinde Tayini için Önerilen Yöntem" bölümünde belirtildiği gibi yapıldı. Gerçek numunelerden Ponceau 4R'nin geri kazanımı % 97,20-99,40 arasında değişmiştir. Bu, önerilen yöntemin Ponceau 4R'nin bulutlanma noktası ekstraksiyonu için şurup ve meyve şekeri örneklerinde uygulanabilirliğini göstermektedir (Tablo 2). Sonuçlar, önerilen ekstraksiyon yönteminin, şurup ve meyve şekeri örneklerinde Ponceau 4R'nin spektrofotometrik tayini için kullanılabileceğini göstermektedir.

Tablo 2. Amaçlanan bulutlanma noktası ekstraksiyonu sonrasında şurup ve meyve şekerinde Ponceau 4R'nin spektrofotometrik tayini

Örnek	Eklene Ponceau 4R ± GS ^a (µg mL ⁻¹)	Bulunan Ponceau 4R ± GS ^a (µg mL ⁻¹)	Geri kazanım ^b
Şurup	-	0,135	-
	0,5	0,632±0,01	99,4
	0,75	0,864±0,03	97,2
Meyve Şekeri	-	1,15	-
	0,5	1,645±0,02	99,0
	0,75	1,894±0,02	99,2

^aGS, güven sınırlarıdır, $(\frac{ts}{\sqrt{n}})$; n=5

^bGeri kazanım = $\frac{(C_2 - C_1)}{C_3} \times 100$

C₁= Örnek konsantrasyonu

C₂= Örnek + Eklene std konsantrasyonu

C₃=Eklene std konsantrasyonu

4. Sonuç ve Öneriler

Geliştirilen bulutlanma noktası ekstraksiyonu yöntemi, düşük maliyetli, hassas, seçici, yüksek ekstraksiyon verimli ve çevre dostu gibi avantajlara sahiptir. Brij 58, bulutlanma ekstraksiyonundan sonra Ponceau 4R tayini için, bir yüzey aktif madde olarak ilk kez tarafımızdan kullanılmıştır. Bu yeni geliştirilen yöntem, rutin analizlerde kısa sürede Ponceau 4R'nin hassas, seçici ve tekrarlanabilir tayini için literatürdeki çalışmalara alternatif bir yöntem olarak kullanımı düşünülebilir.

Kaynaklar

- [1] European Food Safety Authority (EFSA). 2009. Scientific Opinion on The Re-Evaluation of Ponceau 4R (E 124) as a Food Additive. EFSA Journal, 7 (11): 1-49.
- [2] de Moraes P.B., Hudari F.F., Silva J.P., Zanon M.V.B. 2018. Enhanced Detection of Ponceau 4R Food Dye by Glassy Carbon Electrode Modified with Reduced Graphene Oxide. Journal of Brazilian Chemical Society, 29 (6): 1237-1244.
- [3] Petronijević R.B., Matekalo-Sverak V.F., Spirić A.T., Vuković I.K., Babić J.A., Milijašević M.P., Trbović D.K. 2014. Chemometric Approach in The Development of The Colorimetric Method for The Estimation of Food Colorants in Meat Products. Hemijska industrija, 68 (6): 781-791.
- [4] Combeau S., Chatelut M., Vittori O. 2002. Identification and Simultaneous Determination of Azorubin, Allura Red and Ponceau 4R by Differential Pulse Polarography Application to Soft Drinks. Talanta, 56 (1): 115-122.
- [5] Berzas-Nevado J.J., Guiberteau-Cabanillas C., Contento-Salcedo A.M., Martín-Villamuelas R. 1999. Spectrophotometric Simultaneous Determination of Amaranth, Ponceau 4R, Allura Red and Red 2G by Partial Least Squares and Principal Component Regression Multivariate Calibration. Analytical Letters, 32 (9): 1879-1898.
- [6] Doroschuk V.O., Lelyushok S.O., Rakhilchuk O.O., Kulichenko S.A. 2006. Lyophilic Properties of Surfactant-Rich Phases of Polyethoxylatedalkylphenols Formed at Cloud Point Temperature. Journal of Colloid Interface, 299 (1): 403-409.
- [7] Ghasemi E., Kaykhahi M. 2016. Application of a Novel Micro-Cloud Point Extraction for Preconcentration and Spectrophotometric Determination of Azo Dyes. Journal of Brazilian Chemical Society, 27 (9): 1521-1526.
- [8] Thani M.Z., Al-Ameri S.A.H., Sultan M.S. 2018. Spectrophotometric Determination of Ponceau 4R in the Several Beverages Using Mixed Micelles After Cloud Point Extraction. Journal of Al-Nahrain University, 21 (1): 8-13.