



LC-MS/MS ile Enerji İçeceklerinde Taurin, İnositol ve Glukoronolaktonun Belirlenmesinde Metot Validasyon Çalışmaları

Method Validation for Determination of Taurine, Inositol and Glucuronolactone in Energy Drinks by LC-MS/MS

Pınar MANARGA BİRLİK¹, Ayşe Binnur KARATAŞ², İbrahim Emre TOKAT³

¹ Gıda Yük. Müh., Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, BURSA-TÜRKİYE-ORCID ID:0000-0001-8902-1796

² Gıda Yük. Müh., Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, BURSA-TÜRKİYE-ORCID ID:0000-0001-7750-5427

³ Veteriner Hekim, Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, BURSA-TÜRKİYE-ORCID ID:0000-0003-1975-9706

Geliş Tarihi : 17.10.2019

Kabul Tarihi : 07.01.2020

Öz

Amaç: Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de özellikle gençler arasında enerji içeceği tüketimi son yıllarda giderek artmaktadır. Zihinsel uyanıklık sağladığı, dayanıklılığı ve enerjiyi arttırdığı, yorgunluk hissini azalttığı bildirilen enerji içeceklerinin temel bileşimini kafein ile birlikte taurin, inositol ve glukuronolakton oluşturmaktadır. Bu çalışma ile enerji içeceklerinde yasal mevzuat ile sınırlandırma getirilen taurin, inositol ve glukuronolakton analizlerinin LC-MS/MS kullanılarak optimize edilmesi ve metot validasyonunun yapılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem: Çalışmada materyal olarak enerji içeceği kullanılmıştır. Taurin, inositol ve glukuronolakton analizlerinin ekstraksiyon aşamaları aynı olup cihaz şartları farklılık göstermektedir. Uygun dilüsyon ile C18 kartuştan geçirilen örnekler cihaza enjekte edilmiştir. Optimize edilen metodun doğrusalılık, tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik, tespit limiti (LoD), ölçüm limiti (LoQ) ve geri kazanım parametreleri kullanılarak validasyonu yapılmış ve ölçüm belirsizliği hesaplanmıştır.

Bulgular: Tüm analitler için doğrusalılık $r^2 \geq 0,99$ olarak saptanmıştır. Taurin, inositol ve glukuronolakton için LoQ değerleri sırasıyla 23,91; 6,27; 2,47 mg/L iken, LoD değerleri 100; 21 ve 8,22 mg/L olarak belirlenmiştir. Geri kazanım oranları ise taurin için %99,1, inositol için %98,4 ve glukuronolakton için ise %100 olarak hesaplanmıştır.

Sonuç: Enerji içeceğinde taurin, inositol ve glukuronolakton analizlerinin LC-MS/MS kullanılarak yapılabilir olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Enerji İçeceği, Taurin, İnositol, Glukuronolakton, LC-MS/MS

Abstract

Objective: As in all over the world, consumption of energy drinks has increased in recent years especially among young people in our country. Caffeine, taurine, inositol and glucuronolactone are the main components of energy drinks that are reported to provide mental alertness, increase endurance and energy, reduce fatigue but usage of these components is limited by legal regulations. In this study, it is aimed to optimize taurine, inositol and glucuronolactone analyzes and validate the method by LC-MS/MS.

Material and Method: In this study energy drinks were used as material. Extraction steps of taurine, inositol and glucuronolactone were the same but instrument conditions were different. Samples passed through the C18 cartridge with the appropriate dilution were injected into instrument. The optimized method was validated using linearity, repeatability, reproducibility, limit of detection (LoD), limit of quantification (LoQ) and recovery, measurement uncertainty was calculated.

Results: The linearity of calibration curves (r^2) were determined $\geq 0,99$ for all analytes. LoQ values for taurine, inositol and glucuronolactone were 23,91, 6,27 and 2,47 mg/L; LoD values were 100, 21, 8,22 mg/L, respectively. Recovery rates were calculated as 99,1% for taurine, 98,4% for inositol and 100% for glucuronolactone.

Conclusion: It was found that taurine, inositol and glucuronolactone analyzes in energy drinks were feasible using LC-MS/MS system.

Keywords: Energy Drinks, Taurine, Inositol, Glucuronolactone, LC-MS/MS.

1.Giriş

Enerji içecekleri gençler tarafından tercih edilen, tüm dünyada yaygın olarak kullanılan, ülkemizde de son yıllarda kullanımı giderek artan performans artırıcı ürünlerdir (Varım ve ark. 2015). Dünya genelinde 1980’li yıllarda kullanımı yaygınlaşmaya başlayan enerji içecekleri, Türkiye’de piyasaya 1990’lı yıllarda girmiştir (Nakilcioğlu-Taş ve ark. 2019). Genel olarak tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de enerji içeceği pazarının büyüme hızı, diğer içecek grupları ile kıyaslandığında 2-3 kat daha fazladır (Sipahi ve ark. 2014).

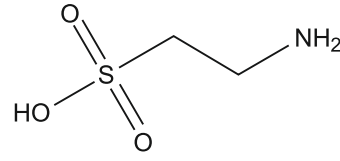
Türk Gıda Kodeksi (TGK)-Enerji İçecekleri Tebliği’ne göre enerji içeceği; kafein içeren, taurin, glukoronolakton, inositol, karbonhidrat, aminoasitler, vitaminler, mineraller ve diğer gıda ve bileşenlerini içerebilen, aromalandırılmış alkolsüz içecek olarak tanımlanmaktadır. Aynı tebliğ ile enerji içeceklerinde bulunan kafein miktarı 150 mg/L, inositol miktarı 100 mg/L, glukoronolakton miktarı 20 mg/L ve taurin miktarı ise 800 mg/L olarak sınırlanmıştır (Anonim 2017).

Enerji içeceklerinin asıl etken maddesi kafein olmakla birlikte söz konusu içecekler taurin, inositol ve glukoronolaktonun yanı sıra riboflavin, niasin, pantotenik asit, pridoksin ve siyanokobalamin gibi B grubu vitaminleri, C vitamini, şeker ve tatlandırıcılar, magnezyum ve potasyum gibi mineral maddeler, ginseng, guarana, yerbamate ve ginkgobiloba gibi doğal kafein içeren bitki ekstraktları, doğal ve/veya yapay aroma vericiler de içerebilmektedir (Görgülü ve ark. 2014, Malinauskas ve ark. 2007, İşçiöğlü ve ark. 2010, Hıdırhoğlu ve ark. 2013).

Bazı çalışmalarda enerji içecekleri ile ilgili olarak kafein, taurin ve glukoronolakton kombinasyonunun performansa direkt etki eden kombinasyon olduğu düşünülmektedir. Bu kombinasyonun vücut üzerine etkileri ile ilgili uzun süreli bir çalışma yoktur. Söz konusu içecekler ile ilgili en önemli etki ve yan etkinin kaynağı olarak ise kafein kabul edilmektedir (Pennay ve Lubman 2012). Ancak bu durumun aksine farklı araştırmalarda enerji içeceği bileşenleri arasında sinerjik bir etkileşim olduğu; enerji içeceğinin sağlamış olduğu performansın kafein içeriğinin tek başına sağlayabileceğinden daha fazla olduğu öne sürülmüştür (Marczinski ve ark. 2011, Scholey ve Kennedy 2004).

1.1.Taurin Kimyasal Yapısı ve Metabolizması

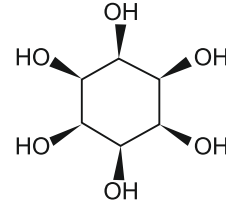
Taurin (2-aminoetansülfonik asit) (Şekil 1), karaciğerde magnezyum katalizörlüğünde metiyoninin homosisteine dönüşümünden sonra bir dizi biyokimyasal reaksiyon sonucu meydana gelen sisteinden sentezlenen, merkezi sinir sistemi için gerekli, sülfonlu bir β-amino asittir.



Şekil 1.Taurin kimyasal formülü

Çalışmalar, taurinin dopamin üretimini artırarak lokomotor aktiviteyi artırdığını, alkolün neden olduğu hafıza kaybı ve karaciğer üzerindeki toksik etkisini azalttığını göstermiştir. Ayrıca; antioksidan ve antiinflamatuvar etkisi olan, kan basıncının düzenlenmesinde rol alan taurinin koroner kalp hastalığına karşı koruyucu etkisi olabileceği de düşünülmektedir. Taurinin, beyinde en önemli inhibitör nörotransmitter olan gamma-amino bütirik asidi etkileyerek anti-anksiyete ajanı olma gibi bir özelliği de bilinmektedir. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından genel olarak güvenli kabul edilen taurin 1980 yılından bu yana bebek mamalarına da eklenmektedir (Eppler ve ark. 1999, Heneman ve Zidenberg 2007, Wójcik ve ark. 2010, Arpacı ve Ersoy 2011).

1.2.İnositol Kimyasal Yapısı ve Metabolizması



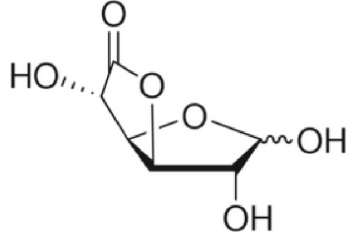
Şekil 2. İnositol kimyasal formülü

İnositol (sikloheksan-1,2,3,4,5,6-heksol) (Şekil 2), bitkisel ve hayvansal dokularda yaygın olarak bulunan bir glikoz izomeridir. Gıdalarda yüksek kepek içeren tahıllarda (karabuğday), fındık, fasulye ve meyvede bulunmaktadır (Schlemmer ve ark. 2009). İnositolün biyolojik olarak en önemli izomeri olan myo-inositol; inositol fosfatlar (fitik asit), fosfatidilinositol ve fosfatidilinositol fosfat lipidler dahil olmak üzere ökaryotik hücrelerde çok sayıda ikincil habercinin yapısal temeli olarak önemli rol oynar (Irvine ve Schell 2001).

İnositol insan vücudu tarafından sentezlendiği için vitamin olarak kabul edilmezken diğer taraftan myo-inositol, B vitamini kompleksi (genellikle B8 vitamini olarak adlandırılır) üyesi olarak sınıflandırılır. İnositol tıp bilimi açısından da önem taşır. Klinik depresyon şikayeti olan hastalar genellikle beyin omurilik sıvısında inositol seviyelerinde azalma gösterir. Yüksek dozlu myo-inositol takviyeleri üzerine yapılan çalışmaların bazı ön sonuçları; vücutta serotonin etkisini artırarak, epilepsi, panik bozukluk, obsesif/kompulsif bozukluk ve unipolar/bipolar depresyondan muzdarip insanlar için ümit verici sonuçlar sergilemektedir (Solomon ve ark. 2010, Ontiveros ve ark. 2009).

İnositol, glikoz metabolizmasının ürünü olarak üretilmesine rağmen vücutta çok az miktarda bulunmakta ve yüksek miktarlarda kafein alımı vücuttaki miktarını azaltmaktadır (Iovieno ve ark. 2011, Varım ve ark. 2015).

1.3. Glukoronolakton Kimyasal Yapısı ve Metabolizması



Şekil 3. Glukoronolakton kimyasal formülü

Glukoronolakton (D-(+)-Glucurono-6,3-lactone) (Şekil 3), karaciğerde glikozun metabolize olması

sonrasında oluşan doğal bir maddedir. Ancak enerji içeceklerinde bulunan glukuronolakton, sentetik olup insan vücudunda bulunan miktardan çok daha fazlasını içermektedir (Wolk ve ark. 2012).

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Materyal

Validasyon çalışması kapsamında orijinal ambalajında piyasaya sunulan sıvı formda enerji içeceği kör örnek olarak kullanılmıştır. Enerji içeceği satın alma yoluyla temin edilmiş ve 6 tekrarlı ön çalışma yapılmıştır. Numuneler analize alınana kadar orijinal ambalajında muhafaza edilmiştir.

2.2. Kimyasallar

Kullanılan kimyasallar Çizelge 1'de belirtilmiştir. Tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

Çizelge 1. Kullanılan kimyasallar ve özellikleri

Kimyasal Adı	CAS No	Kimyasal Maddelerin Saflıkları (%)
Glukoronolakton standart maddesi	32449-92-6	≥99
Myo-İnositol standart maddesi	87-89-8	≥99
Taurin standart maddesi	107-35-7	≥99
Metanol	67-56-1	
Sodyum hidroksit	1310-73-2	
Amonyak	7664-41-7	
Sodyum hidrojen fosfat monohidrat	10049-21-5	
Tetra-n-butilamonyum hidrojen sulfat (TBA)	32503-27-8	
Asetonitril	75-05-8	
Amonyum format	540-69-2	≥99
Formik asit	64-18-6	98-100

2.3. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada; ultrasonik banyo (Elma S300 H, Almanya), çoklu çalkalayıcı (Heidoph Unimax 1010, Almanya), vorteks (LVM-202, LabTech), azot jeneratörü (Peak Scientific Genius 1050, UK), ikili pompa (Shimadzu AD-30, Japonya), oto örnekleyici (Shimadzu Nexera X2 SIL-30AC, Japonya), kolon fırını (Shimadzu CTO-20AC, Japonya), kütle dedektörü (Shimadzu 8040 MSMS triple quadrapole, Japonya), inositol ve glukuronolakton için HILIC kolon (2.1x100 mm, 3.5 µm, 100A, Merck), taurin için ise ultra saf silika kolon (150 x 3 mm, 3µm, GL Sciences Inertsil SIL100A) kullanılmıştır.

2.4. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Taurin, inositol ve glukuronolakton stok çözeltileri söz konusu standartların herbirinden 100 mg tartılıp 100 ml su ile ayrı ayrı çözülerek elde edilmiş; ağız kapalı amber renkli balon joje içerisinde +4°C'de 7 gün süresince saklanmıştır. Çalışma çözeltileri için günlük olarak stok çözelti, kör enerji içeceği ile seyreltilmiş ve Çizelge 2'de belirtilen konsantrasyonlarda her bir analit için ayrı ayrı hazırlanmıştır. Hazırlanan çalışma çözeltileri ile her çalışma öncesinde matriks uyumlu kalibrasyon çizilmiştir.

Çizelge 2. Taurin, inositol ve glukoronolakton için kalibrasyon noktaları

Kalibrasyon Noktaları (mg/L)	
İnositol	4, 10, 20 ve 40
Glukoronolakton	0.5, 1, 2, 4 ve 8
Taurin	10, 20, 40, 80 ve 160

2.5. Ekstraksiyon

Taurin, inositol ve glukoronolakton analizlerinin ekstraksiyon aşamaları aynı olup cihaz şartları farklılık göstermektedir. Ultrasonik banyoda degas edilerek su ile dilue edilen (1:10, v/v) numuneden 5 ml alınarak, önce 2 ml metanol daha sonra 5 ml TBA(II) geçirilerek aktif hale dönüştürülen C₁₈

kartuştan damla damla geçirilir. Süzütünün ilk 2 ml'lik kısmı atılırken geri kalan süzöntü 0,2 µm gözenek büyüklüğü olan politetrafluoroetilen (PTFE) filtreden geçirilerek viallenir ve cihaza enjekte edilir (Ricciutelli ve ark. 2014, Leung ve ark. 2011, Anonim 1989). Metodun ekstraksiyon aşamasında kullanılan çözeltilerin hazırlanma şekilleri Çizelge 3'te verilmiştir.

Çizelge 3. Ekstraksiyon aşamasında kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

TBA (I)	3,40 g TBA ve 1,38 g sodyum hidrojen fosfat monohidrat 450 ml ultra saf suda çözünür. 2M NaOH çözeltisi ile pH 6,5'e ayarlanır ve 500 ml'e ultra saf su ile tamamlanır.
TBA (II)	TBA (I) ile ultra saf suyun 1:3, v/v oranında karıştırılmasıyla elde edilir.

2.6. Cihaz Parametreleri

2.6.1. Taurin Tespiti için Kullanılan Cihaz Şartları

Sıvı Kromatografi (LC) Parametreleri: Mobil Faz A 40 mM amonyum format ve %2 formik asitli su,

Mobil Faz B ise %2 formik asit içeren asetonitrilden oluşmaktadır. Akış hızı 0,4 ml/dk ve gradient olarak Çizelge 4'de belirtildiği şekilde kullanılmıştır. Kolon fırını sıcaklığı 30°C'ye ayarlanmıştır. Enjeksiyon hacmi 1 µl'dir.

Çizelge 4. Taurin analizi için gradiyent olarak uygulanan mobil faz şartları

Süre (dak.)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)
0,5	10	90
4	65	35
6	65	35
8	10	90
10	10	90

Kütle Spektrometresi (MS) Parametreleri: Taurin tespiti için elektrosprey iyonizasyon pozitif mod (ESI+) ve tanımlama için çoklu iyon izleme (MRM)

modu kullanılmıştır. MRM modda kullanılan LC-MS/MS parametreleri Çizelge 5'te verilmiştir.

Çizelge 5. Taurin analizi için MRM modda kullanılan LC-MS/MS parametreleri

Analiz Süresi (dak)	Ana İyon (m/z)	Ürün İyon (m/z)	Çarpışma Enerjisi	Alkonma Süresi (dak)	Polarite
10	125,9	44,15 ^a	20	4,7	Pozitif
		30,15 ^b	16		

^a: kantitatif ölçüm için kullanılan iyon

^b: doğrulama amaçlı kullanılan iyon

Metot optimizasyonu ile taurinin [M+H]⁺ iyonlaştığı görülmüş bu durum literatür ile doğrulanmıştır (Ricciutelli ve ark. 2014, Anonim 2016b).

2.6.2. Glukoronolakton Tespiti için Kullanılan Cihaz Şartları

LC Parametreleri: Mobil Faz A 10 mM Amonyum format ve %0,1 Amonyak içeren su, Mobil Faz B ise

asetonitrilden oluşmaktadır. Akış hızı 0,3 ml/dk ve gradient olarak Çizelge 6'da belirtildiği şekilde kullanılmıştır. Kolon fırını sıcaklığı 30°C'a ayarlanmıştır. Enjeksiyon hacmi 1 µl'dir.

Çizelge 6. Glukoronolakton analizi için gradient olarak uygulanan mobil faz şartları

Süre (dak.)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)
1	10	90
6	63	37
8	63	37
10	10	90
12	10	90

MS Parametreleri: Glukoronolakton tespiti için elektrosprey iyonizasyon negatif mod (ESI-) ve tanımlama için MRM mod kullanılmıştır. MRM

modda kullanılan LC-MS/MS parametreleri Çizelge 7'de verilmiştir.

Çizelge 7. Glukoronolakton analizi için MRM modda kullanılan LC-MS/MS parametreleri

Analiz Süresi (dak)	Ana İyon (m/z)	Ürün İyon (m/z)	Çarpışma Enerjisi	Alınma Süresi (dak)	Polarite
12	175,3	113,2 ^a	4	2,99	Negatif
		85,2 ^b	12		

^a: kantitatif ölçüm için kullanılan iyon

^b: doğrulama amaçlı kullanılan iyon

Metot optimizasyonu ile glukoronolaktonun [M+H]⁺ iyonlaştığı görülmüş bu durum literatür ile doğrulanmıştır (Ricciutelli ve ark. 2014).

2.6.3. İnositol Tespiti için Kullanılan Cihaz Şartları

LC Parametreleri: Mobil Faz A % 0,1 amonyak içeren

su, Mobil Faz B ise asetonitrilden oluşmaktadır. Akış hızı 0,3 ml/dk ve gradient olarak Çizelge 8'de belirtildiği şekilde kullanılmıştır. Kolon fırını sıcaklığı 30°C'ye ayarlanmıştır. Enjeksiyon hacmi 1 µl'dir

Çizelge 8. İnositol analizi için gradient olarak uygulanan mobil faz şartları

Süre (dak.)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)
2,0	50	50
2,5	10	90
3,5	10	90
4,0	70	30
6,0	70	30

MS Parametreleri: İnositol tespiti için elektrosprey iyonizasyon negatif mod (ESI-) ve tanımlama için çoklu iyon izleme (MRM) modu kullanılmıştır. MRM

modda kullanılan LC-MS/MS parametreleri Çizelge 9'da verilmiştir

Çizelge 9. İnositol analizi için MRM modda kullanılan LC-MS/MS parametreleri

Analiz Süresi (dak)	Ana İyon (m/z)	Ürün İyon (m/z)	Çarpışma Enerjisi	Alıkonma Süresi (dak)	Polarite
6	179,3	87,10 ^a	18	1,24	Negatif
		99,20 ^b	18		

^a: kantitatif ölçüm için kullanılan iyon

^b: doğrulama amaçlı kullanılan iyon

Metot optimizasyonu ile inositolun [M-H] iyonlaştığı görülmüş bu durum literatür ile doğrulanmıştır (Leung ve ark. 2011).

3. Bulgular

3.1. Metot Validasyonu

3.1.1. Kalibrasyon ve Doğrusallık

Doğrusallık çalışması için Çizelge 2’de belirtilen konsantrasyonlarda standartlar hazırlanmış ve matriks uyumlu kalibrasyon çizilmiştir. Çalışma aralığı için en az 3 farklı konsantrasyon seviyesi belirlenmiş ve en az 2 tekrarlı çalışma yapılmıştır (Anonim 2002).

Konsantrasyon ve cihaz sinyali arasındaki ilişki incelenerek doğrusallık, korelasyon katsayısı (r^2) ile gösterilmiştir. Her bir analit için yüksek korelasyon katsayısı ($r^2 > 0,99$) sağlanmıştır.

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

s: Standart sapma

x: Ölçüm sonuçlarının ortalaması

x_i: Her bir ölçüm sonucu

N: Yapılan çalışma sayısı

3.1.2. Tespit (Dedeksiyon) Limiti (LoD), Ölçüm (Kantitasyon) Limiti (LoQ)

Ölçüm limiti çalışmasında; Çizelge 10’da belirtilen konsantrasyon seviyelerinde, içerisinde tespit edilebilir düzeyde analit bulunmayan kör örneklere ayrı ayrı kirletme işlemi uygulanmış ve her bir analit için 10 adet bağımsız çalışma yapılmıştır. Konsantrasyon seviyelerinin belirlenmesinde, LoD ve LoQ hesaplamalarında seyreltme faktörü kullanılmıştır.

Çalışma sonucunda bulunan değerlerin standart sapma (s) değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Hesaplanan standart sapmaların 3 katı LoD (LoD=3xS), 10 katı ise LoQ (LoQ=10xS) olarak belirlenmiştir (Anonim 2018a).

Çizelge 10. LoD ve LoQ çalışma sonuçları

Analit	Konsantrasyon Seviyesi* (mg/L)	Sonuç	
		LoD (mg/L)	LoQ (mg/L)
Taurin	200	23,91	100
İnositol	50	6,27	21
Glukoronolakton	10	2,47	8,22

*: Konsantrasyon seviyelerinin belirlenmesinde seyreltme faktörü (1/10) göz önünde bulundurulmuştur.

3.1.3 Kesinlik (Tekrarlanabilirlik ve Tekrar Üretilirlik)

Tekrarlanabilirlik, bir metodun aynı laboratuvarında, aynı cihaz/metotla, aynı uygulama koşulları altında, aynı kişi tarafından kısa zaman aralığında, aynı veya benzer matrikslerde elde edilen ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür ve % rölatif standart sapma (%RSDr) ile ifade edilir (Anonim 2018a). Analistlerin farklı konsantrasyon seviyelerindeki kesinlik değerleri arasında fark olup olmadığı Anova Testi ile kontrol edilmiştir. Tekrarlanabilirlik çalışması kapsamında örnekler her bir analist için 3 farklı konsantrasyonda 6 paralel olacak şekilde numune hazırlama prosedürüne göre ekstrakte edilmiş ve cihaza verilmiştir.

Laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik ise, bir metodun aynı laboratuvarında aynı/farklı cihazlarla, farklı kişiler tarafından, geniş zaman aralığında, aynı veya eş değer matrikslerde yaptığı ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür. Her bir analit için seçilen konsantrasyon seviyelerinde, elde edilen verilerin standart sapması hesaplanarak tekrar üretilebilirlik için sR ve %RSDR hesaplanır (Anonim 2018a). Tekrar üretilebilirlik çalışması için örnekler 3 farklı konsantrasyonda, 3 farklı günde 10 paralel çalışma olacak şekilde numune hazırlama prosedürüne göre ekstrakte edilmiş ve cihaza verilmiştir.

Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmaları kapsamında; glukoronolakton için 10, 25, 50 mg/L; inositol için 50, 100, 200 mg/L; taurin için ise 200,

800, 1200 mg/L konsantrasyon seviyelerinde çalışmalar yapılmıştır. Tekrarlanabilirlik (%RSD_r) ve tekrar üretilebilirlik (%RSD_R) değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen %RSD'ler ve değerlendirme kriterleri Çizelge 11'de verilmiştir. %RSD değerlerinin uygunluk değerlendirmesi

“Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi”nde yer alan kriterlere göre yapılmıştır. Tüm tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik sonuçları ilgili kriterlere göre uygun bulunmuştur (Anonim 2018a).

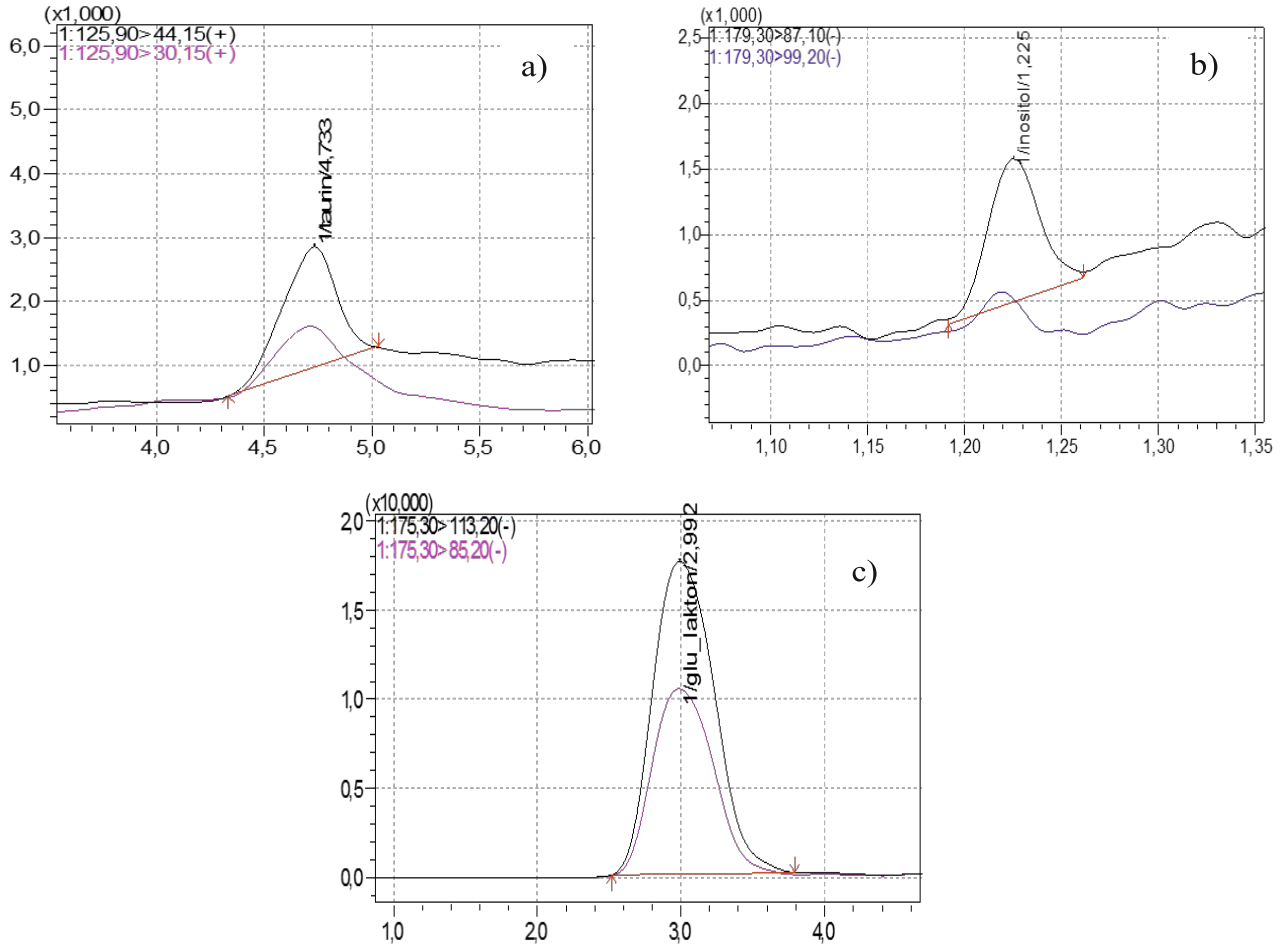
Çizelge 11. Tekrarlanabilirlik (%RSD_r) ve tekrar üretilebilirlik (%RSD_R) değerleri

Analit	Tekrarlanabilirlik (%RSD _r)	Değerlendirme Kriteri (%RSD _r)	Tekrar Üretilebilirlik (%RSD _R)	Değerlendirme Kriteri (%RSD _R)
Taurin	1,69	2,7	2,10	4
İnositol	2,33	3,7	3,27	6
Glukoronolakton	2,88	5,3	6,13	8

3.1.4. Geri Kazanım

Geri kazanım çalışması dahilinde kirletilmiş materyal kullanılmıştır. Orijinal matriks aranan analit ile zenginleştirilmiş, kör ve zenginleştirilmiş örnekler birlikte çalışılmıştır. Geri kazanım oranı için örnekler; 2 analist tarafından 3 farklı konsantrasyonda ve 3 farklı günde, her bir konsantrasyon seviyesinde toplam 10 bağımsız çalışma olacak şekilde numune hazırlama prosedürüne göre ekstrakte edilmiş ve analize alınmıştır. Taurin, inositol ve glukoronolakton

için geri kazanım değerleri sırasıyla %99,1, %98,4 ve %100 olarak hesaplanmıştır. Çalışmaya ait örnek kromatogramlar Şekil 4'te verilmiştir. Geri kazanım oranlarının uygunluk değerlendirmesi “Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi”nde yer alan kriterlere (taurin için %97-103, inositol için %95-105, glukoronolakton için ise %90-107) göre yapılmıştır (Anonim 2018a).



Şekil 4. LC-MS/MS kromatogramları a) Blank içerisine 200 mg/L düzeyinde taurin spike yapılarak elde edilen kromatogram, b) Blank içerisine 50 mg/L düzeyinde inositol spike yapılarak elde edilen kromatogram c) Blank içerisine 10 mg/L düzeyinde glukoronolakton spike yapılarak elde edilen kromatogram

$$\% \text{ GK} = \frac{\bar{X}' - \bar{X}}{X_{\text{kirletilmiş}}} \times 100$$

% GK: Geri kazanım oranı

x : Kirletilmemiş örneklerle yapılan analiz sonuçları ortalaması

x' : Kirletilmiş örneklerle yapılan analiz sonuçları ortalaması

$x_{\text{kirletilmiş}}$: Kirletmek için kullanılan analit miktarı (eklenen konsantrasyon)

3.1.5. Ölçüm Belirsizliği

Ölçüm belirsizliği, ölçüm sonucunda elde edilen değerleri mantıklı kılabilen dağılımları karakterize eden ve ölçümün sonucuyla bağlantılı olan parametrelerdir. Ölçüm sonucunun kalitesinin bir göstergesidir ve ölçüm sonuçlarından istatistiksel olarak hesaplama ile elde edilir (Anonim 2018b). Doğrusallık, tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik,

geri kazanım gibi validasyon parametrelerinden hesaplanan belirsizlikler bu grup altında toplanır (Anonim 2013a). Yapılan çalışmalar sonucunda hesaplanan ölçüm belirsizlikleri için kullanılan formüller Çizelge 12'de, taurin, inositol ve glukoronolaktan için belirlenen ölçüm belirsizlikleri ise Çizelge 13'de verilmiştir.

Çizelge 12: Ölçüm belirsizliği hesaplamaları için kullanılan formüller

Formül	Açıklama	
Kalibrasyon eğrisi ölçüm belirsizliği $U(c_0)$	$U(c_0) = \frac{S}{B_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_0 - \bar{c})^2}{S_{xx}}}$	S: Residual Standart Sapma B ₁ : Eğim p: Örnek ölçümü için okuma sayısı n: Kalibrasyon için yapılan ölçüm sayısı c ₀ : Tayin edilen çözelti derişimi S _{xx} : Aşağıdaki formüle göre hesaplanır \bar{c} : Farklı kalibrasyon standartlarının ortalaması
Tekrar üretilebilirlik ölçüm belirsizliği $U(\text{RSDr})$	$RSD_{\text{pool}} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times RSD_1^2 + (n_2 - 1) \times RSD_2^2 + \dots}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots}}$	RSD _{pool} : Genişletilmiş Bağlı Standart sapma n: Yapılan ölçüm sayısı RSD: Bağlı Standart sapma
Tekrarlanabilirlik ölçüm belirsizliği $U(\text{RSDr})$	$RSD_{\text{pool}} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times RSD_1^2 + (n_2 - 1) \times RSD_2^2 + \dots}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots}}$	RSD _{pool} : Genişletilmiş Bağlı Standart sapma n: Yapılan ölçüm sayısı RSD: Bağlı Standart sapma
Geri kazanım ölçüm belirsizliği $U(\text{GK})$	$U(gk) = \frac{s}{\sqrt{n}}$	s: Standart Sapma n: Yapılan ölçüm sayısı
Rölatif Bileşik Belirsizlik $U(x)$	$U(x) = \sqrt{\frac{U(c_0)}{c_0} + \frac{U(\text{RSDr})^2}{\text{RSDr}} + \frac{U(\text{RSDr})^2}{\text{RSDr}} + \frac{U(gk)^2}{gk}}$	U(x): Birleştirilmiş belirsizlik U(c ₀): Kalibrasyon eğrisinin belirsizliği U(RSDr): Kesinlik – Tekrar üretilebilirlik belirsizliği U(RSDr): Kesinlik – Tekrar üretilebilirlik belirsizliği U(gk): Geri Kazanım belirsizliği

Genişletilmiş Ölçüm Belirsizliği = Rölatif Birleşik Belirsizlik x 2 (%95 güven aralığında, k=2)

Çizelge 13. Taurin, inositol ve glukoronolakton için hesaplanan ölçüm belirsizlikleri

Analit	Genişletilmiş Ölçüm Belirsizliği (%) (%95 güven aralığında, k=2)
Taurin	7,46
İnositol	8,51
Glukoronolakton	14

4. Tartışma ve Sonuç

Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi kapsamında yapılan çalışma sonucunda elde edilen verilerin (tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik ve geri kazanım) uygunluk kontrolü AOAC Official Methods of Analysis (Anonim 2016a), Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F) doğrultusunda yapılmış ve uygun olduğu tespit edilmiştir.

Tüm analitler için doğrusalılık $r^2 \geq 0,99$ olarak saptanmıştır. Taurin, inositol ve glukoronolakton için LoQ değerleri sırasıyla 23,91; 6,27; 2,47 mg/L iken, LoD değerleri 100; 21 ve 8,22 mg/L olarak

belirlenmiştir. Geri kazanım oranları ise taurin için %99,1, inositol için %98,4 ve glukoronolakton için ise %100 olarak hesaplanmıştır.

Enerji içeceğinde taurin, inositol ve glukoronolakton analizlerinin LC-MS/MS kullanılarak uygulanabilir olduğu görülmüş olmasına rağmen konu ile ilgili ulusal ve uluslararası literatür incelendiğinde araştırmaların genel olarak enerji içeceklerinin insan sağlığı üzerindeki etkileri veya enerji içeceği tüketimindeki sosyo-ekonomik faktörler ile ilgili olduğu; analiz yöntemleri ile ilgili yapılan çalışmaların çok kısıtlı olduğu görülmüştür. Bu nedenle analiz yöntemleri ile ilgili daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğu belirlenmiştir.

5. Kaynaklar

Anonim, 1989. NMKL, Nordic Committee on Food Analysis: Colours, synthetic water soluble, liquid chromatographic determination in foods. UDC 667.28:543.544 130.

Anonim, 2002. TS ISO 11095, Referans Malzemeler Kullanarak Doğrusal Kalibrasyon, Ankara.

Anonim, 2013a. EA-4/02 Kalibrasyonda Ölçüm Belirsizliğinin Değerlendirilmesi. <http://www.turkak.org.tr/TURKAKSITE/docs/EA402.pdf> (Erişim: 07.10.2019)

Anonim, 2016a. AOAC Official Methods of Analysis. Guidelines for Standart Method Performance Requirements, Appendix F, p.9.

Anonim, 2016b. Ant Teknik Uygulama Notu. LC/MSMS ile enerji içeceklerinde taurin analizi, M024.

Anonim, 2018a. Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi. https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/G%C4%B1da%20ve%20Yem%20Hizmetleri/gıda_kontrol/ımyasal_Fiziksel_Val_Ver_Rehber.pdf (Erişim: 07.10.2019)

Anonim, 2018b. Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Ölçüm Belirsizliği Rehberi https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/G%C4%B1da%20ve%20Yem%20Hizmetleri/gıda_kontrol/Kimyasal_Fiziksel_OB_Rehberi.pdf (Erişim: 07.10.2019)

Arpacı, N. ve Ersoy, G., 2011. Enerji içeceklerinin gücü nedir? Uluslararası İnsan Bilimleri

Eppler, B., Patterson, T.A., Zhou, W., Millard, WJ. and Dawson, R., 1999. Kainic Acid (KA)-Induced Seizures in Sprague-Dawley Rats and the Effect of Dietary Taurine (TAU) Supplementation or Deficiency. *Amino Acids*, 16(2):133-47.

Görgülü, Y., Taşdelen Ö., Sönmez M.B. ve Çınar R.K., 2014. Enerji İçeceği Tüketimi Sonrası Gelişen bir Akut Psikoz Olgusu. *Nöropsikiyatri Arşivi*, 51: 79-81.

Heneman, K. and S. Zidenberg-Cherr, 2007. "Nutrition and Health Info Sheet: Energy Drinks", Davis, CA: University of California, <http://nutrition.ucdavis.edu/InfoSheets/ANR/EnergyDrinkFact.pdf> (Erişim: 27.10.2015).

Hıdırlıoğlu, S., Tanrıöver, Ö., Ünalı, S., Sülün, S. and Karavus, M., 2013. A Survey of Energy-Drink Consumption Among Medical Students. *Journal Pakistan Medical Association*, 63: 842-845.

- Iovieno, N., Dalton, E.D., Fava, M. and Mischoulon, D., 2011. Second-Tiernatural Antidepressants: Review and Critique. *Journal of Affective Disorders*, 130(3):343-57.
- Irvine, R.F. and Schell, M.J., 2001. Back in the Water: there Turn of the Inositol Phosphates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2(5), 327–338.
- İşçioğlu, F., Ova, G., Duyar, Y. ve Köksal, M., 2010. Üniversite Öğrencileri Arasındaki Enerji İçeceği Tüketimi ve Bilinci Araştırması. *Akademik Gıda*, 8: 6-11.
- Leung, K., Mills, K., Burren, K.A., Copp, A.J. and Green, N.D.E., 2011, Quantitative Analysis of Myo-inositol in Urine, Blood and Nutritional Supplements by High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 879:2759-2763.
- Malinauskas, B.M., Aeby, V.G., Overton, R.F., Carpenter-Aeby, T. and Barber-Heidal, K., 2007. A Survey of Energy Drink Consumption Patterns Among College Students. *Nutrition Journal*, 6: 1-7.
- Marczinski, C. A., Fillmore, M. T., Bardgett, M. E. and Howard, M. A., 2011. Effect of Energy Drinks Mixed with Alcohol on Behavioral Control. Risks for College Students Consuming Trendy Cocktails. *Alcohol Clinical and Experimental Research*, 35(7), 1282–1292.
- Nakilcioğlu-Taş, E.; Hacıhasanoğlu, F.E. ve Ötleş, S., 2019. 18 Yaş Altı ile 18 Yaş ve Üstü Bireylerin Enerji İçeceği Tüketimi Eğilimlerinin Belirlenmesi: İzmir İli Örneği. *ÖHÜ Müh. Bilim. Dergisi*, Cilt:8, Sayı:1, 111-120.
- Ontiveros, J. A.; Trevino, E. and Gil, A., 2012. *Biol. Psychiatry*, 71, 197S–198S.
- Pennay, A. E. and Lubman, D.I., 2012. Energy Drinks: Health Risks and Toxicity. *Medical Journal of Australia*, 196(7):442-7.
- Ricciutelli, M., Caprioli, G., Cortese, M., Lombardozi, A., Strano, M., Vittori, S. and Sagratini, G., 2014. Simultaneous Determination of Taurine, Glucuronolactone and Glucuronic Acid in Energy Drinks by Ultra High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (Triple Quadrupole). *Journal of Chromatography A*, 1364:303-307.
- Schlemmer, U., Frolich, W., Prieto, R. M. and Grases, F., 2009. Phytate in Foods and Significance for Humans: Food Sources, Intake, Processing, Bioavailability, Protective Role and Analysis. *Mol. Nutr. Food Res.*, 53, S330–S375.
- Scholey, A.B. and Kennedy, D.O., 2004, Cognitive and Physiological Effects of an “Energy Drink”. An Evaluation of the Whole Drink and of Glucose, Caffeine and herbal Flavouring Fractions. *Psychopharmacology (Berl)*, 176, 320–330.
- Sipahi, H., Sönmez, İ. ve Aydın, A., 2014. Enerji İçecekleri ve İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri. *Türkiye Klinikleri J Pharm Sci.*, 3(1): 39-46.
- Solomonias, R.; Mikautadze, E.; Nozadze, M.; Kuchashvili, N.; Lepsveridze, E. and Kiguradze, T., 2010. Myo-Inositol Treatment Prevents Biochemical Change Striggered by Kainate-Induced Status Epilepticus. *Neurosci. Lett.*, 468, 277–281.
- Varım, C., Varım, P., Atılğan Acar, B., Vatan, M.B., Kaya T., Acar, T. ve Tamer, A., 2015. Enerji İçecekleri Ruhu Kanatlandırıyor ya Bedeni. *J Hum Rhytim*, 1(3);79-82.
- Wójcik, O.P., Koenig, K.L., Zeleniuch-Jacquotte, A., Costa, M. and Chen, Y., 2010. The Potential Protective Effects of Taurine on Coronary Heart Disease. *Atherosclerosis*, 208: 19–25.
- Wolk, B.J., Ganetsky, M. and Babu, K.M., 2012. Toxicity of Energy Drinks. *Current Opinion in Pediatrics*, 24(2): 243-51.