

Karmosin için Deneysel Tasarımı Uygulanarak Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu Kullanımı ve Spektrofotometrik Tayini

Tufan GÜRAY¹, Ulku Dilek UYSAL²

¹Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 26480, Eskişehir, Türkiye

²Eskişehir Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 26470, Eskişehir, Türkiye

(Alınış/Received: 05.02.2022, Kabul/Accepted: 28.06.2022, Online Yayınlanma / Published Online:20.12.2022)

Anahtar Kelimeler

Karmosin,
Bulutlanma noktası
ekstraksiyonu,
Deneysel tasarım,
Merkezi kompozit tasarım,
Box-Bhenken

Öz: Karmosin (E122) bir gıda katkı maddesi olarak genellikle gıda, kozmetik ve ilaçlarda kullanılan boyadır. Bu çalışmada, bulutlanma noktası ekstraksiyonundan (CPE) sonra şurup numunesinde karmosinin (KAR) spektrofotometrik tayini için ekstraksiyon aşamasında Brij 58 kullanılmıştır. Ekstraksiyon sıcaklığı, pH, Brij 58 (yüzey aktif madde) konsantrasyonu ve Na₂SO₄ konsantrasyonu gibi bazı parametreler merkezi kompozit tasarım, Box-Behnken tasarım ve klasik deneysel yöntemler kullanılarak optimize edilmiştir. Yöntemin doğrusal çalışma aralığı 0,05 - 4,00 µg mL⁻¹ olarak belirlenmiştir. Bu yöntemin gözlenebilir sınırı (LOD); KAR için 0,0018 µg mL⁻¹ dir. Yöntemde KAR'ın geri kazanım değerlerinin %98,00 ve % 102,67 arasında olduğu hesaplanmıştır. Bulgular, bu yeni CPE yönteminin rutin analizde KAR'ın hassas belirlenmesi için hızlı bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir.

Use of Cloud Point Extraction and Spectrophotometric Determination of Carmosine by Applying Experimental Design

Keywords

Carmosine,
Cloud point extraction,
Experiment design,
Central composite design,
Box-Bhenken

Abstract: Carmosine (E122) as a food additive is a dye that is often used in food, cosmetics and pharmaceuticals. In this study, Brij 58 was used in the extraction step for the spectrophotometric determination of carmosine (KAR) in syrup sample after cloud point extraction (CPE). Certain parameters such as extraction temperature, pH, Brij 58 (surfactant) concentration and Na₂SO₄ concentration were optimized using central composite design, Box-Behnken design and classical experimental methods. The determination range of the method was 0.05 – 4.00 µg mL⁻¹. The limit of detection (LOD) of this method is 0.0018 µg mL⁻¹ for KAR. The recovery values of KAR were calculated to be between 98.00% and 102.67%. The findings show that this new CPE method can be quickly used for sensitive determination of KAR for routine analysis.

1. Giriş

Gıda boyaları, doğal olarak bulunan rengi arttırarak ya da kaybolan rengi yerine koyarak gıdanın özelliğini korumak, teknolojik olarak üründe standart renk oluşturmak, başka bir renk veya değişik renk tonları vermek, kalite düşüklüğünü gizlemek koşuluyla cazip ve kabul edilebilir ürünler elde etmek amacıyla kullanılmaktadır [1]. Gıda boyası karmosin [C₂₀H₁₂N₂Na₂O₇S₂ (disodyum 4-hidroksi-2-[(E)-(4-sülfonat-1-naftil) diazenil] naphalen-1-sülfonat)] (E-122) kırmızı renk veren bir maddedir. Karmosin (KAR) ayrıca; vişne kırmızısı ve Azorubin, Food Red 3 olarak da bilinmektedir. KAR suda çözünürlüğü çok yüksek olan bir katkı maddesidir [2]. KAR'ın kanserojen bir madde olduğuna dair kesin kanıtlar bulunmamakla birlikte kansere neden olduğu

konusunda şüpheler bulunmaktadır. Çocuklarda hiperaktiviteye neden olduğu bilinmektedir. Yüksek miktarda ve uzun süre tüketilmesi durumunda; vücutta toksik etki gösterebilir, deri döküntülerine, ödeme, hiperaktiviteye ve alerjik reaksiyonlar gibi sağlık risklerine neden olabilir. Ayrıca astımı tetiklediği de bilinmektedir. Bu etkileri nedeniyle bazı Avrupa Ülkeleri ve A.B.D'de kullanımı yasaklanmıştır [3, 4].

Boyar maddelerin güvenli bir şekilde kullanımı için Dünya Sağlık Örgütü Uzman Komitesi (FAO/WHO Expert Committee) tarafından "günlük kabul edilebilir alım miktarları (GKEAM)" periyodik olarak gözden geçirilerek belirlenmektedir. KAR için bu değer 0,4 mg/kg'dır [2].

Bu nedenle diğer gıda katkı maddelerinde olduğu gibi gıda boyalarının da rutin tayinlerinin yapılması bir ihtiyaçtır. Bu boyalardan biri olan KAR tayini için literatürde HPLC [5-8], kapiler elektroforez [9], elektroanalitik [10, 11] ve spektrofotometrik [3, 12, 13] gibi farklı yöntemler verilmiştir. Bu analitik yöntemlerden spektrofotometrik tayin yöntemleri hızlı, ekonomik, basit ve kolay olmaları sebebiyle yaygın olarak tercih edilen yöntemlerdendir. Bu çalışma kapsamında KAR tayini için spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır.

Kullanılan yöntemlerin genelinde, analitlerin tayini için analiz öncesinde ayırma ve ön deriştirme (ekstraksiyon) işlemlerine gereksinim duyulmaktadır. Sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE), katı faz ekstraksiyon (SPE) ve bulutlanma noktası ekstraksiyonu (CPE) bu işlemlerden bazılarıdır.

Enstrümental analiz öncesi kullanılan numune hazırlama tekniklerinden olan CPE yöntemi hassas, basit, ucuz, çevreye duyarlı ve kirletici olmayan, diğer ayırma ve zenginleştirme yöntemlerine bir alternatiftir [14, 15]. Bulutlanma noktası sıcaklığı olarak bilinen belirli bir sıcaklık seviyesine ulaşıldığında sulu çözeltideki iyonik olmayan yüzey aktif maddeler bulanıklaşır. Analit daha sonra yüzey aktif madde ile küçük bir hacimde ayrı bir faz halinde ayrılır. Orijinal matriks hacminde dağılan analit çok küçük misel fazı hacmine alındığından, CPE büyük bir ön deriştirme faktörü ve yüksek geri kazanım verimliliği sağlayabilir [16]. Literatürde, CPE ile KAR'ın deriştirilmesi için kullanılan yüzey aktifler Triton X-114 [3], Triton X-100 [12, 17], Zephiramine [18], tetrahegzilammonium bromür, (THABr) [19], setiltrimetilamonyum bromür (CTAB) [20], tetrabutilamonyum bromür (TBAB) [21], sodyum dodesil sülfat (SDS) [22], Tween 20 [23], ve yüzey aktif madde gibi iyonik sıvı olan trioktilamonyum salisilat (TOMAS) [24] dir.

Deneysel çalışmaların yüksek verimliliği, deney tasarımına ve kantitatif değerlendirme yöntemlerine dayanmaktadır. Bu deneysel tasarım ve değerlendirmeler, matematiksel modeller veya dizaynlar aracılığıyla gerçekleştirilebilir. Analitik verilerin işlenmesinde istatistik ve uygulamalı matematik, kimyanın temel araçlarıdır.

Deneysel tasarımı istatistiksel olarak yararlı bir yöntem olan yanıt yüzey metodolojisinin (RSM) en yaygın olarak kullanılan optimizasyon modelleri, merkezi kompozit tasarımı ve Box-Behnken tasarımıdır. Biz de bu çalışmada, önce, seçilen deneysel değişkenler ve bu değişkenlere karşı elde edilen cevap değerleri arasındaki ilişkiyi yorumlamak için merkezi kompozit tasarımı, sonrasında da, üç seviyeli ve tüm küresel tasarımları içeren, gerekli deneylerin sayısını azaltabilen ve yetersiz sonuçlar verebilecek deneylerden kaçınabilen ve aynı anda en yüksek veya en düşük seviyelerinde tüm faktörlerin kombinasyonlarını içeren Box-Behnken tasarımı

[25] da kullanarak, deneysel optimizasyonumuzu desteklemeyi hedefledik. Ayrıca, daha önceden literatürde bulutlanma noktası ekstraksiyonu için yüzey aktif madde olarak kullanılan Brij 58'i [26-29] KAR'ın spektrofotometrik tayini öncesinde de kullanarak yeni bir ön deriştirme yöntemi geliştirmeyi amaçladık.

2. Materyal ve Metot

2.1. Cihazlar, kimyasallar ve örnek

Çalışmada, Agilent Transport 60 UV spektrofotometre (Stevens Creek Boulevard, Santa Clara, CA, USA), ThermoOrion 720A model pH/ion metre (Beverly, MA, USA) ve Sigma 1-6P santrifüj cihazı (Osterode am Harz, Germany) kullanılmıştır.

Deneylerin sonuçlarından hangi değişkenin ve/veya değişken etkileşimlerinin seçilen cevap değerlerini etkileyip etkilemediğini veya varsa ne kadar etkilediğini belirlemek için elde edilen bütün cevap verilerinin çoklu regresyon analizi Minitab 20 paket programıyla yapılmıştır.

Bütün kimyasallar analitik saflıkta temin edilmiştir. Polietilen glikol hegzil eter (Brij 58), KAR ve diğer kimyasallar Sigma Aldrich firmasından satın alınmıştır. Bu kimyasallardan belirli miktarlar alınarak standart çözeltileri deiyonize su ile hazırlanmıştır.

Butirol fort® şurup [Etken madde: Her 5 ml şurup 22,5 mg butamirat sitrat içerir. Yardımcı maddeler: Sorbitol (% 70'lik kristalize olmayan), sodyum benzoat, ahududu aroması (FM00192), gliserol, sukraloz, fruktoz, sitrik asit monohidrat, sodyum sitrat dihidrat, tutti frutti aroması (FM04706), azorubin (KAR), saf su] bölge eczanesinden satın alınmıştır.

2.2. Standart çözeltilerinin hazırlanması

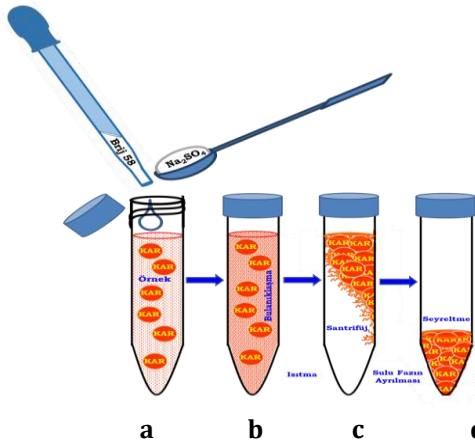
1000 mg KAR tartılıp 100 mL' ye deiyonize su ile seyreltilerek hazırlanan stok çözeltisinden uygun miktarlarda seyreltmeler yapılarak çalışma boyunca kullanılmıştır. % 10'luk (w/v) Brij 58 çözeltisi hazırlamak için 10 g tartılıp 100 mL'ye deiyonize su ile ultrasonik su banyosunda çözülerek tamamlanmıştır. Butirol fort şurup içeriği gereği yüksek miktarda matriks bulunmaktadır. Bu nedenle şurubun 1 mL'si basamaklı olarak seyreltilerek matriks etkisinin azaltılması amaçlanmıştır.

2.3. Geliştirilen CPE yöntemi

KAR standart çözeltisine yeni geliştirilen ekstraksiyon yöntemi aşağıdaki gibi uygulanmıştır:

- KAR standart çözeltisinden 8 mL alınıp ağzı kapaklı 15 mL'lik santrifüj tüplerine konuldu. Na₂HPO₄ ve Na₂HPO₄ çözeltileri ile pH 7 civarına ayarlandı (Şekil 1 a).

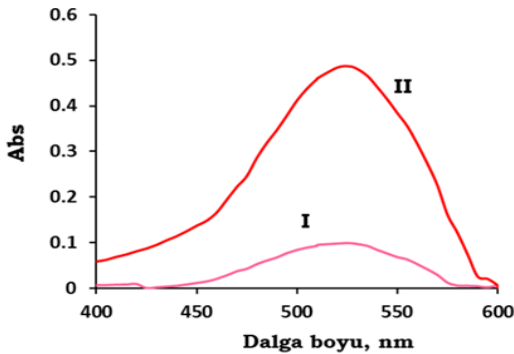
- % 10 (w/v) 'luk Brij 58 çözeltisinden 1,5 mL ve $1,0050 \pm 0,0005$ g Na_2SO_4 eklendi. Deiyonize su ile 10 mL'ye tamamlandı (Şekil 1 b).
- 60 °C 'da 10 dk. çözelti bulanıklaşana kadar bekletildi ve tekrar oda sıcaklığına kadar soğutuldu (Şekil 1 c).
- Faz ayrımını tamamlamak için 4000 rpm'de 5 dk. santrifüjlendi.
- Son olarak yüzey aktif maddece zengin faz sulu fazdan ayrıldı. Bu faz 1 mL deiyonize su ile çözüldü (Şekil 1 d). Bu çözeltinin absorbansı 525 nm dalga boyunda köre karşı ölçüm alındı.



Şekil 1. a- Örnek çözeltisi, b- Brij 58 + Na_2SO_4 'ten eklendikten sonra, c- İnkübasyon ve santrifüj işleminden sonra, d- Yüzey aktif madde bakımından zengin fazın ayrılmasından sonra 1 mL su ile çözme.

3. Bulgular

0,05–5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ KAR standart çözeltilerinin 525 nm dalga boyunda maksimum absorbans yaptıkları gözlenmiştir (Şekil 2-I). CPE sonrasında maksimum absorbans yapılan dalga boyunda değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 2-II). Bu nedenle çalışmadaki ölçümler bu dalga boyunda alınmıştır. Yüksek hassasiyet ve geri kazanım elde etmek için ortamın pH'ı, Brij 58 yüzdesi, Na_2SO_4 miktarı, ortamın sıcaklığı ve bekleme süresi optimize edilmiştir.



Şekil 2. 1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ KAR standart çözeltisinin I- CPE öncesinde ve II- CPE sonrasındaki UV-görünür bölge spektrumu.

3.1. Yanıt yüzeyi metodolojisi ile optimizasyon

Optimum ekstraksiyon verimliliği için belirli ekstraksiyon parametreleri hem deneysel hem de teorik olarak optimize edildi. Klasik deneysel yöntemle bulunan analiz koşulları merkezi kompozit tasarım (Central Composite Designs) (CCD) ve Box-Behnken tasarımı (BBD) kullanılarak da optimize edildi.

3.1.1. Merkezi kompozit tasarım (CCD) ile optimizasyon

Optimum ayırma koşullarını belirlemek istediğimiz KAR için, seçilen bağımsız parametrelerin sınırlarının belirlenmesi gerekir. Öncelikle seçilen parametrelerin deneysel değişkenlerinin taban ve tavan düzeylerinin belirlenmesi gerekir. Çalışmada ölçülen, absorbansı etkilediğini düşündüğümüz [26-29] ortamın pH'ı, ilave edilen yüzey aktif madde miktarı, eklenen tuz miktarı ve ortamın sıcaklığı parametreleri deneysel değişken olarak seçilmiştir. Deneysel değişkenlerin sınırları yapılan deneysel optimizasyon verileri dikkate alınarak belirlenmiştir. Bu parametrelere ait sınır değerleri Tablo 1' de verilmiştir.

Tablo 1. CCD ile KAR için belirlenen parametrelerin sınır değerleri

Faktörler	-2 (+α)	Alt sınır -1	Orta seviye 0	Üst sınır +1	+2 (+α)
pH	3	5	7	9	11
Brij 58	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
Tuz	0,50	0,75	1,00	1,25	1,50
Sıcaklık	40	50	60	70	80

Çalışmada CPE yöntemi için CCD'nin 4 faktörlü tasarımı 31 farklı deneyi kullanılmıştır. Tasarıma yönelik faktörler CCD tekniğine göre yapılan deneyler ve sonuçlar Tablo 2 ve Tablo 3'de verilmiştir. Bağımsız değişkenler [pH, Brij 58, Tuz (Na_2SO_4) ve sıcaklık] ile analitik sinyal (Abs) arasındaki ilişki aşağıda verilmiştir (Denklem 1 ve Şekil 2).

Gerçek değerler ile model denklemi (1);

$$\text{Abs} = -2,769 + 0,3275 \text{ pH} + 0,377 \text{ Brij 58} + 2,301 \text{ Tuz} + 0,0182 \text{ Sıcaklık} - 0,02771 \text{ pH} \cdot \text{pH} - 0,2028 \text{ Brij 58} \cdot \text{Brij 58} - 1,123 \text{ Tuz} \cdot \text{Tuz} - 0,000162 \text{ Sıcaklık} \cdot \text{Sıcaklık} + 0,0219 \text{ pH} \cdot \text{Brij 58} + 0,0070 \text{ pH} \cdot \text{Tuz} + 0,000319 \text{ pH} \cdot \text{Sıcaklık} + 0,098 \text{ Brij 58} \cdot \text{Tuz} + 0,00108 \text{ Brij 58} \cdot \text{Sıcaklık} - 0,00220 \text{ Tuz} \cdot \text{Sıcaklık}$$

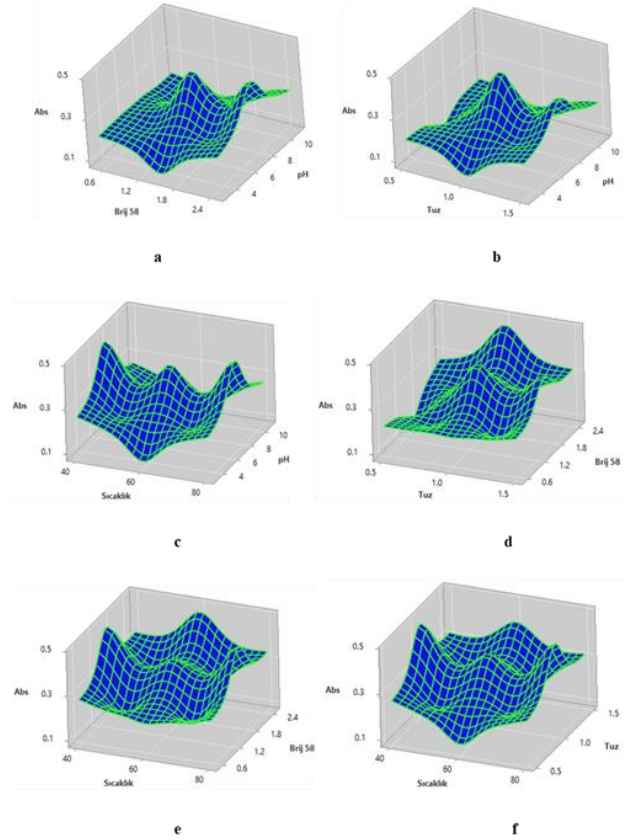
Tahmin edilen veriler ve deneysel veriler arasındaki uyumu gösteren ilişki katsayısı (R^2) değeri 0,8919 ve düzeltilmiş ilişki katsayısı ($R^2_{\text{düzeltilmiş}}$) 0,7974 olarak elde edilmiştir. Bu sonuç elde edilen model denklemin KAR tayini için incelenen bağımsız değişkenlerin ölçüm aralığında yüksek doğrulukta uygulanabilirliğini açıklamaktadır.

Tablo 2. KAR'ın CPE'u için CCD ile belirlenen tasarım noktaları ve cevap değerleri

Deney No	pH	Brij 58	Tuz	Sıcaklık, (°C)	Abs
1	7	1,5	1	60	0,486
2	9	2	1,25	70	0,295
3	11	1,5	1	60	0,095
4	9	1	0,75	50	0,160
5	9	1	0,75	70	0,162
6	9	2	0,75	70	0,270
7	5	1	0,75	70	0,198
8	5	2	1,25	50	0,235
9	7	1,5	1,5	60	0,405
10	9	2	1,25	50	0,293
11	7	2,5	1	60	0,465
12	7	1,5	1	60	0,486
13	7	1,5	1	80	0,482
14	7	1,5	1	60	0,487
15	5	1	1,25	50	0,205
16	5	1	0,75	50	0,203
17	7	1,5	1	60	0,485
18	5	1	1,25	70	0,204
19	7	1,5	1	60	0,486
20	7	0,5	1	60	0,216
21	5	2	1,25	70	0,229
22	5	2	0,75	70	0,215
23	7	1,5	1	40	0,475
24	5	2	0,75	50	0,213
25	3	1,5	1	60	0,105
26	7	1,5	1	60	0,487
27	7	1,5	1	60	0,486
28	9	1	1,25	70	0,145
29	9	2	0,75	50	0,184
30	9	1	1,25	50	0,143
31	7	1,5	0,5	60	0,120

Tablo 3. Absorbans cevap faktörü için CCD ile tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler toplamı	Ort. karesi	F-Değeri	P-Değeri
Model	0,559134	0,039938	9,43	0,000
pH	0,000204	0,000204	0,05	0,829
Brij 58	0,042673	0,042673	10,08	0,006
Tuz	0,021241	0,021241	5,02	0,040
Sıcaklık	0,000384	0,000384	0,09	0,767
pH ²	0,351233	0,351233	82,97	0,000
Brij 58 ²	0,073512	0,073512	17,36	0,001
Tuz ²	0,140931	0,140931	33,29	0,000
Sıcaklık ²	0,007507	0,007507	1,77	0,202
pH.Brij 58	0,007656	0,007656	1,81	0,197
pH.Tuz	0,000196	0,000196	0,05	0,832
pH.Sıcaklık	0,000650	0,000650	0,15	0,700
Brij 58.Tuz	0,002401	0,002401	0,57	0,462
Brij 58.Sıcaklık	0,000462	0,000462	0,11	0,745
Tuz.Sıcaklık	0,000484	0,000484	0,11	0,740

R² = 0,8919, R² düzeltilmiş = 0,7974**Şekil 2.** KAR için CCD kullanılarak çizilen 3D yüzey diyagramları

3.1.2. Box Behnken tasarımı (BBD) ile optimizasyonu

Tasarımda her bir faktörün etkisi CPE analizi için 4 faktör ile incelenmiştir. Bu çalışmada, en önemli faktörlerin tam değerlerini bulmak için Box Behnken tekniğine göre uygulanan 27 deney seti oluşturulmuştur. Faktörlerin incelenen seviyeleri CCD'daki gibi (A: pH, B: Brij 58 konsantrasyonu, C: Na₂SO₄ miktarı ve D: Ekstraksiyon sıcaklığı) belirlenmiş ve Tablo 4'de verilmiştir. Box-Behnken tekniğine göre yapılan deneyler ve elde edilen yanıtlar Tablo 5 ve Tablo 6'da verilmiştir. Bağımsız değişkenler (kodlanmış değerler olarak) ve analitik sinyal (Abs) arasındaki nedensellik ilişkisinin denklemi Denklem 2'de ve yüzey cevap grafikleri Şekil 3'de verilmiştir.

Tablo 4. BBD ile KAR için belirlenen parametrelerin sınır değerleri

Faktörler	Alt sınır -1	Orta seviye 0	Üst sınır +1
pH	5	7	9
Brij 58	1,0	1,5	2,0
Tuz	0,75	1,00	1,25
Sıcaklık	50	60	70

Tablo 5. KAR'ın CPE'u için BBD ile belirlenen tasarım noktaları ve cevap değerleri

Deney No	pH	Brij 58	Tuz	Sıcaklık, (°C)	Abs
1	7	2	0,75	60	0,234
2	7	1	1	70	0,277
3	9	2	1	60	0,284
4	7	1,5	1,25	50	0,411
5	9	1,5	0,75	60	0,254
6	9	1,5	1	50	0,286
7	9	1	1	60	0,17
8	5	1,5	1	50	0,298
9	7	2	1	50	0,379
10	7	2	1	70	0,382
11	7	1,5	1	60	0,487
12	7	1,5	0,75	50	0,357
13	9	1,5	1,25	60	0,324
14	7	1	0,75	60	0,135
15	9	1,5	1	70	0,287
16	7	1	1,25	60	0,218
17	7	2	1,25	60	0,307
18	5	1	1	60	0,211
19	5	2	1	60	0,239
20	5	1,5	0,75	60	0,291
21	5	1,5	1,25	60	0,292
22	7	1,5	0,75	70	0,362
23	7	1	1	50	0,261
24	7	1,5	1	60	0,486
25	5	1,5	1	70	0,239
26	7	1,5	1,25	70	0,413
27	7	1,5	1	60	0,487

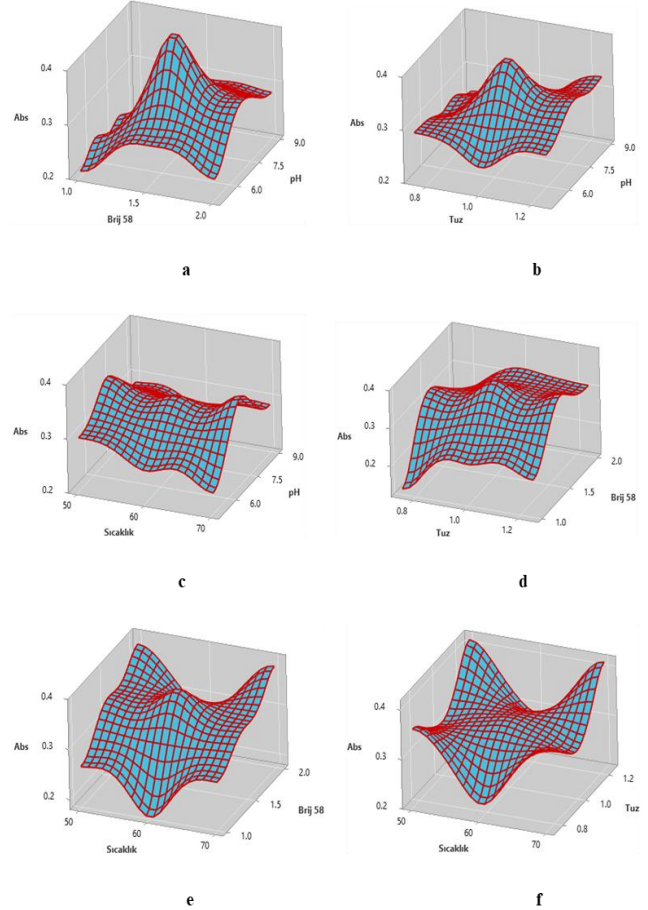
Tablo 6. Absorbans cevap faktörü için BBD ile tanımlanan kuadretik modelin ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler toplamı	Ort. karesi	F-Değeri	P-Değeri
Model	0,203412	0,014529	8,86	0,000
pH	0,034857	0,008714	5,31	0,011
Brij 58	0,000102	0,000102	0,06	0,807
Tuz	0,025484	0,025484	15,54	0,002
Sıcaklık	0,009185	0,009185	5,60	0,036
pH ²	0,096362	0,096362	58,76	0,000
Brij 58 ²	0,110848	0,110848	67,59	0,000
Tuz ²	0,035462	0,035462	21,62	0,001
Sıcaklık ²	0,007417	0,007417	4,52	0,055
pH.Brij 58	0,001849	0,001849	1,13	0,309
pH.Tuz	0,001190	0,001190	0,73	0,411
pH.Sıcaklık	0,000900	0,000900	0,55	0,473
Brij 58.Tuz	0,000025	0,000025	0,02	0,904
Brij 58.Sıcaklık	0,000042	0,000042	0,03	0,875
Tuz.Sıcaklık	0,000002	0,000002	0,00	0,971

$$R^2 = 0,9118, R^2_{\text{düzeltilmiş}} = 0,8089$$

Gerçek değerler ile model denklemi (2);

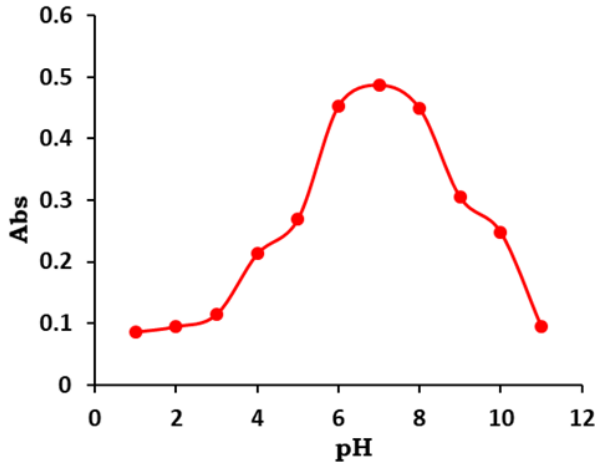
$$\text{Abs} = -4,67 + 0,360 \text{ pH} + 1,731 \text{ Brij 58} + 2,526 \text{ Tuz} + 0,0405 \text{ Sıcaklık} - 0,03360 \text{ pH} \cdot \text{pH} - 0,5767 \text{ Brij 58} \cdot \text{Brij 58} - 1,305 \text{ Tuz} \cdot \text{Tuz} - 0,000373 \text{ Sıcaklık} \cdot \text{Sıcaklık} + 0,0215 \text{ pH} \cdot \text{Brij 58} + 0,0345 \text{ pH} \cdot \text{Tuz} + 0,00075 \text{ pH} \cdot \text{Sıcaklık} - 0,020 \text{ Brij 58} \cdot \text{Tuz} - 0,00065 \text{ Brij 58} \cdot \text{Sıcaklık} - 0,00030 \text{ Tuz} \cdot \text{Sıcaklık}$$

**Şekil 3.** KAR için BBD kullanılarak çizilen 3D yüzey diyagramları

CCD olduğu gibi tahmin edilen veriler ve deneysel veriler arasındaki uyumu gösteren ilişki katsayısı (R^2) değeri 0,9118 ve düzeltilmiş ilişki katsayısı ($R^2_{\text{düzeltilmiş}}$) 0,8089 olarak elde edilmiştir. Bu tasarımda da elde edilen model denklemin KAR tayini için incelenen bağımsız değişkenlerin ölçüm aralığında yüksek doğrulukta uygulanabilirliğini açıkladığı görülmüştür.

3.2. pH'nin etkisi

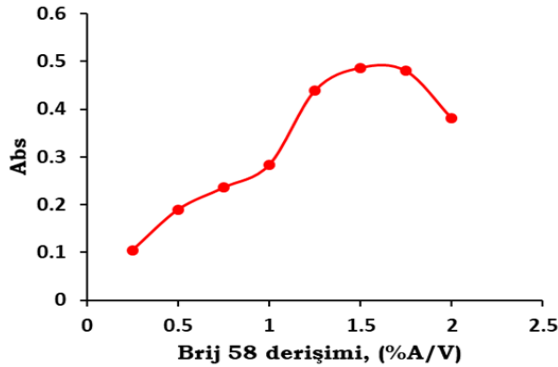
CPE yönteminde, optimizasyon basamaklarından pH önemli bir basamaktır. Çünkü sulu faz ile yüzey aktif madde bakımından zengin faz arasındaki analitin dağılım katsayısını etkileyen parametredir. Bu amaçla, KAR'ın ekstraksiyon verimliliği pH 1 ile pH 11 arasında incelenmiştir. Çözeltinin pH'ı, hidroklorik asit ve sodyum hidroksit ilavesi ve bir pH metre kullanılarak istenilen değere ayarlanmıştır. 525 nm'de KAR absorbansı ölçülmüştür (Şekil 4). pH 1'den 6'ya kadar önce küçük bir artış sonrasında daha yüksek artarak pH 7'de zirve yapıp pH 11'a kadar da absorbansta düşüş olduğu gözlenmiştir. Bu durum, pH'ın 7 civarında 6-8 gibi korunmasının en uygun olduğunu göstermiştir. Bu pH, optimum pH olarak seçilmiştir. Bütün çalışmalar pH 7 yapılmıştır.



Şekil 4. pH'in optimum şartlarda CPE verimliliğine etkisi. 1,5 µg mL⁻¹ KAR.

3.3. Yüzey aktif madde derişiminin etkisi

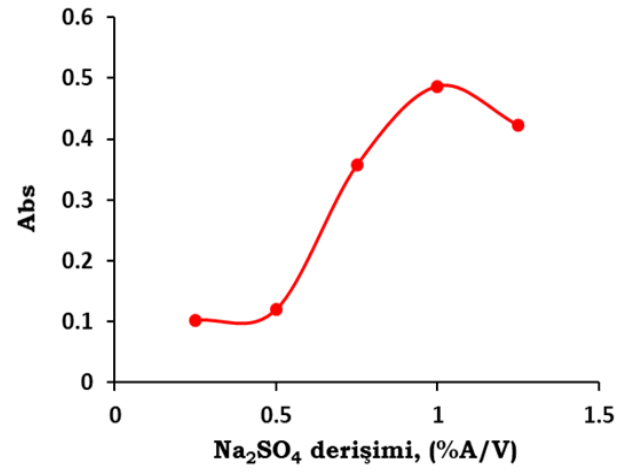
Bu geri kazanım ve zenginleştirme yönteminde yüzey aktif madde derişimini optimize etmek; ekstraksiyon verimini arttırmak için gerekli olan önemli parametrelerden biridir. Bu nedenle, Brij 58'in konsantrasyonunun KAR absorbansı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 5'de verilmiştir. Görülebileceği gibi, absorbans Brij 58'in % 1,5 (w/v)'den daha yüksek derişimlerinde değişmemiş hatta bir miktar düşmüştür.



Şekil 5. Brij 58 derişiminin optimum şartlarda CPE verimliliğine etkisi. 1,5 µg mL⁻¹ KAR.

3.4. Tuz derişiminin etkisi

CPE yönteminde bir diğer önemli optimizasyon basamağı, tuz konsantrasyonudur. Çünkü analitin sulu fazdan yüzey aktif madde bakımından zengin faza kütle transferini arttırmaya yani faz ayrılmasına ve bulutlanma noktası sıcaklığını azaltmaya yardımcı olur. Bundan dolayı, NaCl, Na₂SO₄ ve Na₂CO₃ gibi farklı tuzlar denenmiş ve ekstraksiyon işlemi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Na₂SO₄ dışındaki diğer tuzlar kullanıldığında faz ayrımı olmadı veya yüzey aktif madde bakımından zengin faz, ayrılmayacak kadar zayıftı. Bu nedenle, KAR'ın absorbans değerini en yüksek yapan 1,00 g Na₂SO₄ miktarı, optimum tuz miktarı olarak seçildi. Sonuçlar, Şekil 6'de verilmiştir.



Şekil 6. Na₂SO₄ konsantrasyonunun optimum şartlarda CPE verimliliğine etkisi. 1,5 µg mL⁻¹ KAR.

3.5. Denge sıcaklığının ve inkübasyon süresinin etkisi

CPE yönteminde diğer iki önemli optimizasyon basamağı, denge sıcaklığı ve inkübasyon süresidir. 50-90 ° C sıcaklık aralıkları denemeler yapılmıştır ve ekstraksiyon verimliliğinin nispeten yüksek olduğu sıcaklık 60 ° C'de gözlenmiştir. 10-40 dakika arasında inkübasyon süresi çalışılmış ve ekstraksiyon verimliliğinde herhangi bir değişim net olarak gözlenmemiştir. Bu nedenle sıcaklığın reaksiyon ortamını etkileyebileceği sıcaklık dikkate alınarak 10 dakikalık süre yeterli görülmüştür. Bundan sonraki aşamalar, bu koşullar ile gerçekleştirilmiştir.

3.6. Deneysel ve teorik optimizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması

Çalışmanın amaçlarından biri de, CCD ve BBD teorik optimizasyon yöntemleri ile klasik deneysel optimizasyon işlemlerini karşılaştırarak çalışılan parametrelerin ne kadar etkili doğru seçildiğini belirlemektir. Ayrıca, çalışma da kullanılan bu teorik optimizasyonların bundan sonraki çalışmalarda kullanılabilirliğini ortaya koymaktır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar dikkate alındığında teorik optimizasyon üç boyutlu yüzey yanıt diyagramlarına göre (Şekil 2 ve 3) elde edilen sonuçların deneysel optimizasyon ile son derece uyumlu güvenilir sonuçlar verdiği görülmektedir (Tablo 7). BBD sonuçlarının klasik yöntemler ile elde edilen sonuçlarla çok daha yakın ve uyumlu olduğu da fark edilmektedir.

Tablo 7. Her üç yöntem ile elde edilen optimum koşullar

	CCD	BBD	Klasik Deneysel
pH	7,12	7,06	7
Brij 58, %	1,73	1,58	1,5
Tuz (Na ₂ SO ₄), %	1,07	1,04	1
Sıcaklık, °C	61,82	59,63	60

3.7. Analitik performans

Optimal koşullarda ölçülen absorbansa karşı artan KAR konsantrasyonlarının korelasyon grafikleri elde edilmiştir. Dinamik aralık, KAR için $Abs = 0,1842C (\mu\text{g mL}^{-1}) + 0,1937$ ($R^2 = 0,9982$) denklemiyle 0,05 ve 4,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ arasında elde edildi. Yöntemin hassasiyetini incelemek için tekraredilebilirlik (gün içi) ve kesinlik (günler arası) deneyleri yapılmıştır. Tekraredilebilirlik deneyleri için, numuneler her gün ($n=3$), beş kez ($n=5$) analiz edilerek değerlendirilmiştir. Farklı günlerde (3gün) yapılan deneyler karşılaştırıldığında oldukça hassas olduğu bulunmuştur. Standart KAR çözeltisi ($2,000 \mu\text{g mL}^{-1}$) kullanılmıştır. 3 gün yapılan deneyler karşılaştırılarak kesinliğin yüksek hassasiyete olduğu görülmüştür (Tablo 8). KAR için gözlenebilir sınırı (LOD) $0,0018 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. LOD'dan da anlaşılacağı gibi, geliştirilen yöntemin düşük LOD'ye sahip olması ve bu renklendiricinin çeşitli gıda ve ilaç sektörlerindeki ürünlerinin eser analizlerinde kullanılabilir olduğunu göstermiştir.

Tablo 8. KAR'ın ($2,000 \mu\text{g mL}^{-1}$) gün içi ve günler arası sonuçlarının kesinliği

Parametreler	1 Gün (n=5)	2 Gün (n=5)	3 Gün (n=5)	Günler arası (n=15)
\bar{X}^a	1,994	2,012	2,000	2,002
s^b	0,011	0,013	0,010	0,013
% BSS ^c	0,572	0,648	0,500	0,659

^a \bar{X} , Abs'lerden hesaplanan miktarların ortalaması, ^b s , Standart sapma, ^c % BSS, Yüzde bağıl standart sapma

3.8. Yöntemin şurup örneğine uygulaması

Bu geliştirilen yöntem, KAR'ın spektrofotometrik tayini için bir şurup örneğine uygulanmıştır. Şurup örneğindeki KAR tayini, 'Geliştirilen CPE yöntemi' bölümünde belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Geri kazanım deneyleri, CPE'den önce standart KAR çözeltisi ilavesiyle numunelere standart katma uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Standart KAR çözeltisi eklenmiş gerçek numune çözeltilerinden KAR'ın geri kazanımı %98,00 ve %102,67 arasında değişmiştir. Bu, geliştirilen yöntemin KAR için CPE yönteminin uygulanabilirliğini göstermektedir (Tablo 9).

Tablo 9. CPE sonrasında Butirol fort® şurup numunesindeki KAR'ın spektrofotometrik tayin sonuçları

Eklenen KAR \pm GS ^a ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Bulunan KAR \pm GS ^a , (%95), ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Geri kazanım ^b
-	$0,98 \pm 0,02$	-
0,5	$1,49 \pm 0,05$	102,00
1,0	$1,96 \pm 0,04$	98,00
1,5	$2,52 \pm 0,02$	102,67

^aGS, güven sınırı, ($\frac{tS}{\sqrt{N}}$); N=5, ^bGeri kazanım = $\frac{(C_2 - C_1)}{C_3} \times 100$

C_1 = Örnek konsantrasyonu, C_2 = Örnek + Eklenen std konsantrasyonu, C_3 =Eklenen std konsantrasyonu

4. Tartışma

Bu çalışma, ticari olarak mevcut şurup örneğinden KAR ekstraksiyonu için CPE'nin kullanımını açıklamaktadır. CPE sonrası KAR'ın spektrofotometrik tayininde ilk kez Brij 58 kullanılmıştır. Geliştirilen CPE

Tablo 10. Literatürde bildirilen CPE sonrasında KAR'ın spektrofotometrik tayini yöntemlerinin mevcut yöntem ile karşılaştırılması

Yüzey aktif Madde	Tuz	pH	İnkubasyon Sıcaklığı, (°C)	İnkübasyon süresi, (dk)	Santrifüj süresi (dk) ve hızı (rpm)	Seyreltme çözücüsü	Tayin aralığı, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOD, ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% Geri kazanım	Kaynak
Triton X-114, 1,2 mL, 0,12 M	NaCl, 0,2 mL, 0,01 M	H ₂ SO ₄ , 0,2 M	70	30	10 dk., 3500 rpm	Etanol, 5 mL	0,05-5,00	0,0072	95,00-99,00	[3]
Triton X-100, 1,0 mL, %25	NaCl, 0,75 g	5	60	20	5 dk, 4000 rpm	Su, 1,5 mL	0,05-1,50	0,0150	92,00-102,00	[12]
Triton X-100 5,0 mL, 5 M	NaCl, 2,0 mL, 1 M	5	76	30	-	Su, 5,0 mL	0,02-3,50	0,0170	96,00-103,00	[17]
Zefiramine, 0,12 mL, 0,03 M	NaCl, 1,0 mL, %20	5,5	~25	3	3 dk., 3500 rpm	Su, 0,5 mL	0,0005-0,08	$1,50 \cdot 10^{-4}$	97,50-104,20	[18]
THABr, 62 mg	-	5,5-6,5	~25	-	1 dk., 1500 rpm	-	0,05-0,20	0,006	97,00-102,00	[19]
CTAB, 0,20 mL, 0,2 mM	-	3,5	-	-	10 dk., 3500 rpm	Kloroform, 0,1 mL	0,01-1,20	0,003	95,00-104,00	[20]
Tween 20, 9 mL, %5,6	-	2,53	-	-	-	-	-	1,00	96,30-98,40	[23]
Brij 58, 1,5 mL, %10	Na ₂ SO ₄ , 2 g	6-8	60	10	5 dk, 4000 rpm	Su, 1,0 mL	0,05-4,00	0,0018	98,00-102,67	Mevcut çalışma

tekniklerinin çevre dostu olması, duyarlılığı, seçiciliği, yüksek ekstraksiyon verimi ve düşük maliyeti gibi avantajları vardır. Ayrıca çalışmada, deney tasarım yöntemi olana yanıt yüzey metodolojisinin (RSM) optimizasyon modeli olan CCD ve BBD yöntemleri kullanılarak, KAR'ın spektrofotometrik tayini öncesinde CPE işlemlerinin optimizasyonu incelemiş deneysel verilerle elde edilen sonuçları desteklediği gözlenmiştir. Optimizasyon incelemesinde kullanılan bu iki modelden BBD deneysel veriler ile olan uyumunun CCD modeline göre biraz daha etkili olduğu gözlenmiştir. Bu yeni KAR tayini yönteminin analitik performansı, literatürde bildirilen benzer diğer yöntemlerle karşılaştırılmıştır (Tablo 10). Çalışmamız, zefiraminin kullanıldığı literatür dışında ($LOD=1,5 \cdot 10^{-4} \mu\text{g mL}^{-1}$) diğer çalışmalara göre hassasiyeti daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca, zefiraminin kullanıldığı bu çalışmada, çevre dostu olarak bilen bu ekstraksiyon yönteminde karbon tetraklorür gibi toksik bir çözücünün organik ekstrat olarak kullanılması bir dezavantaj oluşturmuştur. Ayrıca önerilen yöntemin geri kazanım değerleri açısından bu yöntemlere alternatif olabileceğini göstermiştir. Bu yeni geliştirilen yöntem, rutin analizlerde kısa sürede KAR'ın hassas tayini için literatürdeki çalışmalara alternatif bir yöntem olarak kullanımı düşünülebilir.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Kaynakça

- [1] Yentür, G., Yaman, M., Bayhan A. 1998. Bazı gıda maddelerine katılan sentetik boyaların miktarlarının araştırılması. *Gıda*, 23(3), 195-199.
- [2] Kim, M., Park, J., Suh, H., Lee, C. 2016. Establishment of an analytical method for azorubine, an undesignated food colorant in Korea. *Journal of Food Hygiene and Safety*, 31(5), 311-318.
- [3] Karatepe, A., Akalın, C., Soylak, M. 2017. Spectrophotometric determination of carmoisine after cloud point extraction using Triton X-114. *Turkish Journal of Chemistry*, 41, 256-262.
- [4] Peksa, V., Jahn, M., Štolcová, L., Schulz, V., Prošek, J., Procházka, M., Weber, K., Cialla-May, D., Popp, J. 2015. Quantitative SERS analysis of azorubine (E 122) in sweet drinks. *Analytical Chemistry*, 87(5), 2840-2844.
- [5] Iammarino, M., Mentanab, A., Centonze, D., Palermob, C., Mangiacottia, M., Chiaravalle, A. E. 2019. Chromatographic determination of 12 dyes in meat products by HPLC-UV-DIODE array detection, *MethodsX*, 6, 856-861.
- [6] Zor, Ş. D., Dönmez, Ö. A. 2018. A Facile HPLC-PDA method for simultaneous determination of paracetamol, methyl paraben, sunset yellow, and carmosine in oral suspensions. *Journal of the Turkish Chemical Society A*, 5(2) 763-774.
- [7] Aşçı, B., Zor, Ş. D., Dönmez, Ö. A. 2016. Development and validation of HPLC method for the simultaneous determination of five food additives and caffeine in soft drinks. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2879406.
- [8] Mazdeh, F. Z., Khorrami, A. R., Khatoonabadi, Z. M., Aftabdari, F. E., Ardekani, M. R. S., Moghaddam, G., Hajimahmoodi, M. 2016. Determination of 8 synthetic food dyes by solid phase extraction and reversed-phase high performance liquid chromatography. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15 (1), 173-181.
- [9] Giovine, L. D., Bocca, A. P. 2003. Determination of synthetic dyes in ice-cream by capillary electrophoresis. *Food Control*, 14, 131-135.
- [10] 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, 115-122.
- [11] Chanlona, S., Joly-Pottuza, L., Chateluta, M., Vittoria, O., Cretier, J. L. 2005. Determination of carmoisine, allura red and ponceau 4r in sweets and soft drinks by differential pulse polarography. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 503-515.
- [12] Amraeia, A., Niazia, A., Alimoradia, M., Hosseini, M. 2019. Cloud point extraction and simultaneous spectrophotometric determination of allura red and carmoisine using wavelet orthogonal signal correction-partial least squares method. *Journal of Analytical Chemistry*, 74(2), 93-99.
- [13] Turak, F., Dinç, M., Kutlu, Ö. D., Özgür, M. Ü. 2014. Four derivative spectrophotometric methods for the simultaneous determination of carmoisine and ponceau 4r in drinks and comparison with high performance liquid chromatography. *International Journal of Analytical Chemistry*, 650465.
- [14] Kaur, A., Gupta, U. 2012. The review on spectrophotometric determination of synthetic food dyes and lakes. *Gazi University Journal of Science*, 25(3), 579-588.
- [15] Heydari, R., Hosseini, M., Zarabani, S. 2015. A simple method for determination of carmine in

- food samples based on cloud point extraction and spectrophotometric detection. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 150, 786-791.
- [16] Escaleira, L. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., de Carvalho, M. D. B., Bezerra, M. A. 2009. Preconcentration procedure for determining trace amounts of Ni, Cd, Pb and Cu in high-salinity waters after cloud-point extraction. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 89(7), 515-527.
- [17] Pourreza, N., Ghomi, M. 2011. Simultaneous cloud point extraction and spectrophotometric determination of carmoisine and brilliant blue FCF in food samples. *Talanta*, 84(1), 240-243.
- [18] Sarvestani, M. R. J., Doroudi, Z. 2021. Determination of ultra trace amounts of carmoisine in food specimens by ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction method coupled with UV-Visible spectrophotometry. *Journal of Chemical Health Risks*, Articles in Press, Accepted Manuscript, Available Online from 09 May 2021.
- [19] Smirnova, S. V., Lyskovtseva, K. A., Pletnev, I. V. 2021. Extraction and determination of synthetic food dyes using tetraalkylammonium based liquid-liquid extraction. *Microchemical Journal*, 162, 105833.
- [20] Elhami, S., Noorzadi, N. 2016. Rapid spectrophotometric determination of trace amounts of azorubine dye in food samples after dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Indian Chemical Society*, 93, 183-186.
- [21] Faraji, M., Sahneh, B. N., Javanshir, R. 2017. An ion-pair dispersive liquid-liquid microextraction for simultaneous determination of synthetic dyes in ice cream samples by HPLC. *Analytical Bioanalytical Chemistry Research*, 4(2), 213-225.
- [22] Salamat, Q., Yamini, Y., Moradi, M., Karimia, M., Nazraz, M. 2018. Novel generation of nano-structured supramolecular solvents based on an ionic liquid as a green solvent for microextraction of some synthetic food dyes, *New Journal of Chemistry*, 42, 19252.
- [23] Tripathi, M., Khanna, S. K., Das, M. 2004. A novel method for the determination of synthetic colors in ice cream samples. *Journal of AOAC International*, 87(3), 657-663.
- [24] Egorov, V. M., Smirnova, S. V., Pletne, I. V. 2008. Highly efficient extraction of phenols and aromatic amines into novel ionic liquids incorporating quaternary ammonium cation. *Separation and Purification Technology*, 63, 710-715.
- [25] Box, G. E. P., Hunter, W. G., Hunter, J. S. 1978. *Statistics for experimenters*, Wiley, New York, USA.
- [26] Güray, T. 2018. Spectrophotometric determination of sunset yellow (E-110) in powdered beverages and pharmaceutical preparations after cloud point extraction method. *Journal of the Turkish Chemical Society A*, 5(2), 479-492.
- [27] Güray, T., Menevşe, B., Yavuz, A. A. 2020. determination of optimization parameters based on the box-behnkendesign for cloud point extraction of quinoline yellow using Brij 58 and application of this method to real samples. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 243, 118800.
- [28] Güray, T., Alper, Ş. 2019. Spectrophotometric determination of ponceau 4R in syrup and fruit candy after enrichment with cloud point extraction. *Bitlis Eren University Journal of Science*, 8(4), 1243-1249.
- [29] Güray, T. 2019. A novel method for simultaneous analysis of tartrazine and indigo carmine by cloud point extraction using spectrophotometric technique. *International Journal of Chemical Studies*, 7(6), 17-23.