



Araştırma Makalesi (Extended Abstract available in English)

## Baharatlarda Sudan I boyasının tayini için basit bir spektrofotometrik yöntem

Osman Can Çağlıcı, Abidin Gümrükçüoğlu, Hakan Alp, Elvan Vanlı, Ümmühan Ocak\*, Miraç Ocak

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 61080 Trabzon, Türkiye

### Ö Z E T

**Anahtar Kelimeler:**Sudan I boyası,  
florekans metot,  
florimetri,  
pul biber,  
sumak,  
kimyon

Yasal olmamasına rağmen gıdalarda renklendirme amacıyla kullanıldığı bilinen azo boyar maddesi olan Sudan I'in, kendine has floresans özelliği kullanılarak çeşitli baharatlarda tayini için basit bir spektrofotometrik yöntem geliştirildi. Önerilen yöntem gerçek numune olarak yerel üreticilerden temin edilen pul biber, sumak ve kimyon numunelerine Sudan I ilavesinden sonra uygulandı. Ekleme-geri kazanım sonuçları ile yöntemin doğruluğu gösterildi. Pul biber, sumak ve kimyon için geri kazanım değerleri %96,6 ile %97,6 arasında bulundu. Ölçümler modifiye edilmiş bir standart ekleme yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Tespit sınırları pul biber, sumak ve kimyon için sırasıyla; 1,0 mg/L, 0,2 mg/L ve 0,3 mg/L olarak bulundu. Önerilen yöntem, pul biber, sumak ve kimyon gibi baharatlardaki Sudan I miktarını belirlemek için literatürdeki yöntemlere göre basit, çevreci ve düşük maliyetli bir yöntemdir.

**EN**

### A Simple spectrofluorimetric method to determine Sudan I dye in spices

**ABSTRACT****Keywords:**Sudan I dye,  
fluorescence method,  
fluorimetry,  
red pepper,  
sumac, cumin

A simple spectrofluorimetric method was developed to determine Sudan I, a banned food dye, in various spices by using its intrinsic fluorescence property. The proposed method was used in the determination of red pepper, sumac and cumin samples to which were added Sudan I dye after being supplied from the local sources. The accuracy of method has been shown by the spike and recovery experiments. The recovery values for red pepper, sumac and cumin found to be acceptable from 96.6% to 97.6%. Measurements were carried out by using the modified standard addition method. Detection limits were 1.0, 0.2 and 0.3 mg/L for red pepper, sumac and cumin, respectively. The presented method is simple, green and cost-effective for determination of Sudan I content of spices.

### 1. Giriş

Sudan boyaları I-IV tekstil ve kozmetik ürünlerinde kullanılan sentetik azo boyalardır. Olası kanserojen etkileri nedeniyle gıdalarda kullanılmaya uygun olmasına rağmen, çeşitli gıda maddelerinin renk yoğunluğunu arttırmak için halen kullanılmaktadırlar [1-3]. Avrupa Birliği'nde ve diğer birçok ülkede yiyeceklerde kullanımı kanunen yasaklanmıştır [4]. Buna rağmen birçok ülkede yapılan kontrollerde bu boyaların halen çeşitli gıda maddelerinde katkı maddesi olarak kullanıldığı tespit edilmektedir.

Sudan boyaları arasında Sudan I (1-fenilazo-2-naftol), başta köri ve toz biber olmak üzere çeşitli baharatları renklendirmek için en sık kullanılan boyadır [5-8]. Baharatlarda Sudan I'i tayin etmek için pek çok yöntem literatürde verilmiştir. Bunlar genel olarak elektrokimyasal [7,9,10], plazmon rezonans ışık saçılımı (PRLS) [11], yüzey-artırılmış raman saçılım (SERS) spektroskopisi [12], yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) tekniği [13], fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) [14] ve enzim-bağlı iminosorbent tayini (ELISA) [15,16] tekniklerine dayalı yöntemlerdir. Sıvı kromatografik yöntemlere dayalı olanlar literatürde en çok rastlanan yöntemlerdir [13, 17-19]. Bunlar arasında son zamanlarda yüksek performanslı sıvı kromatografisi-morötesi-görünür bölge spektrometrisinden (HPLC-UV-Vis) başka ultra performanslı sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi/kütle spek-

trokopisi (UPLC-MS/MS), ultra performanslı sıvı kromatografisi-elektron sprey iyonlaştırma-kütle spektroskopisi/kütle spektroskopisi (UPLC-ESI-MS/MS), sıvı kromatografisi-elektron sprey iyonlaştırma-uçuş süresi-kütle spektroskopisi (LC-ESI-TOF-MS) gibi daha karmaşık ve pahalı sistemlerin kullanıldığı dikkat çekmektedir [20-23]. Bahsedilen yöntemler çok hassas olmakla birlikte, yapılan analizler ekonomik değildir ve zaman alıcıdır. Sudan I'i HPLC ile tayin etme basamağından önce farklı şekillerde uygulanan katı-sıvı ekstraksiyonuna ihtiyaç duyulduğu da görülmektedir. Bu amaçla genellikle moleküler baskılanmış katı faz ekstraksiyon malzemeleri ve iyonik sıvılar gibi sıvı faz ekstraksiyon çözücülerini kullanılarak veya jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ve iminoafinite kromatografisi gibi başka cihazların kullanıldığı tekniklerle numune ön temizleme işlemine tabi tutulmaktadır [24-31]. Bu nedenle tayin işlemi uzamakta ve ekonomik olmamaktadır. Daha basit katı faz ekstraksiyonuna dayanan ve numuneden Sudan I'in ekstraksiyonu için sadece yaygın organik çözücülerin kullanıldığı ayırma işlemlerinde ise genellikle aseton, asetonitril, n-heksan ve metanol gibi toksik ekstraksiyon çözücülerinin kullanıldığı görülmektedir [13,14, 32-41]. Sonuç olarak Sudan boyalarının basit, hızlı, çevreci ve ekonomik olarak tayinine imkan veren yeni analitik tayin yöntemlerinin geliştirilmesi hala önem arz eden bir konudur. Baharatlarda etkin renk elde etmek için Sudan I'in yaklaşık 100 ile 1000 mg/kg konsantrasyon aralığında kullanılması gerektiğinden [13, 14] bu konsantrasyonlardaki Sudan I'i tayin edebilen basit ve ucuz metotların geliştirilmesi bahsedilen boyanın baharatlardaki kullanımlarının tespiti açısından yeterli olacaktır.

Moleküler floresans spektroskopisi kullanılan molekülün floresans özelliğine bağlı olarak yüksek hassasiyete sahip metotların geliştirilmesine imkan sunar. Sudan I'in baharatlarda tespiti için floresans ölçümüne dayanan sınırlı sayıda çalışma vardır [42-46].

\*Corresponding author: [uocak@ktu.edu.tr](mailto:uocak@ktu.edu.tr)Citation: Çağlıcı, O. C., Gümrükçüoğlu, A., Alp, H., Vanlı, E., Ocak, Ü., Ocak, M., Baharatlarda Sudan I Boyası'nın tayini için basit bir spektrofotometrik yöntemi (A Simple spectrofluorimetric method to determine Sudan I dye in spices), *Karadeniz Chem. Sci. Tech.* 2017, 1, 16-21.DOI:  
ISSN:

Ancak, bu yöntemlerde literatürdeki diğer çoğu yöntemde olduğu gibi analitle etkileşecek bir reaktif kullanımı söz konusudur. Huang ve arkadaşları Sudan I'yi belirlemek için Cu(II)-kalsein kompleksinin kullanıldığı ligand değişim mekanizmasına dayanan çok düşük tespit sınırına sahip bir floresans metodunu bildirmişlerdir [42]. Chen ve arkadaşları çili tozu'nda Sudan I'yi belirlemek için polietilenimin kaplı gümüş nanokümlerinin floresans prob olarak kullanımını önerirken [43], Ling ve arkadaşları yine polietilenimin kaplı bakır nanokümlerinin kullanımına dayanan bir yöntem önermişlerdir [45]. Fang ve arkadaşları ise zahmetli ve zaman alıcı sentez ve hazırlanma işlemi gerektiren bir nanomateryalin iç süzme etkisiyle floresans sönümüne dayanan metodu Sudan boyalarının tayini için bildirmişlerdir [44]. Tayin öncesinde ise uzun ve zaman alıcı ön işlemlerle boyanın etanol ortamına ekstraksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Son zamanlarda Di Anibal ve diğerleri tarafından, baharatlarda Sudan I'in belirlenmesi için çok değişkenli sınıflandırma analizi yöntemi ile sonuçların değerlendirildiği bir senkronize floresans ölçüm yöntemi önerilmiştir [46]. Ekstraksiyon çözücüsü olarak izopropil alkolün kullanıldığı bu yöntem Sudan I'in kendine has floresans özelliğine dayanmaktadır. Ancak yazarlar izopropil alkollü ekstraktlara Sudan I standardından ilave ederek taşıyıcı edilmiş numunelerin hazırlandığını bildirmişlerdir. Bu durum elde edilen geri kazanım sonuçlarının doğruluğuna şüphe düşürmektedir. Halbuki orijinal katı numunelere Sudan I'in eklenmesi daha geçerli bir yaklaşımdır. Bu yaklaşımla elde edilen geri kazanım sonuçları da daha anlamlıdır. Ayrıca yazarlar bu makalede önerdikleri yöntemin tespit sınırından ve doğrusal aralığında bahsetmemişlerdir [46].

Sunulan bu çalışmada, çeşitli baharatlarda Sudan I boyasını kantitatif tayin edebilmek için basit ve zaman almayan, boyanın kendine has floresans özelliğinin ölçülmesine dayalı yeni bir analitik metod geliştirilmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda önerilen yöntemin başka bir reaktif kullanılmayarak çevreci olması hedeflenmiştir. Muhtemel matriks etkisinin giderilmesi için, daha önce bazı metal katyonlarının spektrofotometrik yöntemle tayininde kullanıldığını modifiye edilmiş bir standart ekleme yönteminin kullanılması öngörülmüştür [47-50]. Geliştirilen yöntemin çeşitli baharatlarda Sudan I'in tayininde kullanılabileceği gösterilmek istenmiştir.

## 2. Malzeme ve yöntem

### 2.1. Cihazlar

Floresans şiddetlerini ölçmek için bir PTI-QM4 spektrofotometresi kullanıldı. Sudan I'in floresans emisyon spektrumları 1,0 nm slit genişliğinde 310-510 nm dalgaboyu aralığında kaydedildi. Sudan I ilave edilmiş numunelerin homojenize edilmesi için laboratuvar tipi bir parçalayıcı (Waring Commercial Laboraty Blender) ve numunelerin etanolik ekstraktlarını elde etmek için otomatik çalkalayıcı (Edmund Bühler GmbH KS-15) kullanıldı. Ultrasonik işlem için Bandelin Sonarex Dipitec model bir ultrasonik banyo, ekstraktları süzmek için selüloz asetat membranlar (Sartorius Minisart NML Germany) kullanıldı.

### 2.2. Reaktifler

Sudan I ilave edilmiş numunelerden boyanın ekstraksiyonunda spektroskopik saflıkta etanol (Merck) kullanıldı. Sudan I boyası Sigma Aldrich'ten satın alındı. Uygun miktarda katı boyanın etanolde çözünmesi ile 1000 mg/L'lik stok çözeltisi hazırlandı. Çalışma standart çözeltileri, bu stok çözeltinin etanolla uygun şekilde seyreltilmesi ile elde edildi.

### 2.3. Numuneler

Taşıyıcı edilmiş pul biber, sumak ve kimyon numuneleri yerel kaynaklardan temin edilmiş, taşıyıcı numuneleri hazırlamak için ise bu numunelere Sudan I'in uygun miktarı ilave edilerek bir parçalayıcı ile homojenize edilmiştir. Boyanın etanolla ekstraksiyonu işlemi hem taşıyıcı edilmiş hem de taşıyıcı edilmemiş numunelere uygulanmıştır.

5,0 g numune 100 mL etanol içinde 20 dakika 250 dev/dk.'da bir otomatik çalkalayıcıda çalkalandı. Bu işlemin ardından karışım 5 dk. ultrasonik banyoda tutuldu, 0,45 µm'lik membrandan süzülme ve elde edilen süzüntüler numune çözeltileri olarak kullanıldı.

### 2.4. Sudan I'in tayini için önerilen yöntem

Önerilen yöntem, artan Sudan I konsantrasyonu ile boyanın floresans şiddetinde sönüm gözlenmesine dayanmaktadır. Numunelerin Sudan I içeriğini belirlemek için modifiye bir standart ekleme yöntemi kullanılmıştır. Floresans sönümüne dayalı bazı spektrofotometrik tayin yöntemleri için benzer bir yaklaşım daha önceden kullanılmıştır [47-50]. Ancak Sudan I'in tayini için bu çalışmada matriks benzeştirilmesi ve standart ilave etme yöntemi birarada uygulanmış olup mevcut bilgilerimize göre Sudan boyalarının tayini için böyle bir kalibrasyon yöntemi literatürde daha önceden kullanılmamıştır.

Bunun için bir seri tüpe önce numune matriksine bağlı olarak sabit hacimde standart Sudan I çözeltisi ve 500 µL taşıyıcı edilmiş numune ekstraktı kondu. Ardından, birinci tüp hariç diğer tüplere taşıyıcı edilmiş numune ekstraktından aynı hacimlerde ilave edildi. Sonra üçüncü tüpten başlayarak diğer tüplere artan konsantrasyonda olacak şekilde standart Sudan I çözeltisinden uygun hacimlerde ilaveler yapıldı. Tüm tüplerin son hacimleri etanolla 1 mL'ye tamamlandı. Tüm çözeltilerin floresans şiddetleri uygun dalga boyu ile uyarılarak maksimum emisyonun olduğu dalga boyunda ölçüldü. Eşitlik 1'den Sudan I konsantrasyonu hesaplandı.

$$C_x = \frac{F_0 - F_1}{m} \quad (1)$$

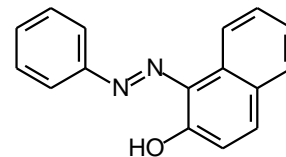
Eşitlik 1'de  $C_x$ ; tüplerdeki numunenin Sudan I konsantrasyonudur.  $F_0$  ve  $F_1$ , sırasıyla birinci ve ikinci tüplerin floresans şiddetleridir.  $m$ , modifiye standart ekleme grafiğinin eğimidir. Bu işlemde,  $F_0$  ve  $F_1$  arasındaki fark, tüplerdeki numunenin Sudan I konsantrasyonu ile orantılıdır.

## 3. Bulgular ve tartışma

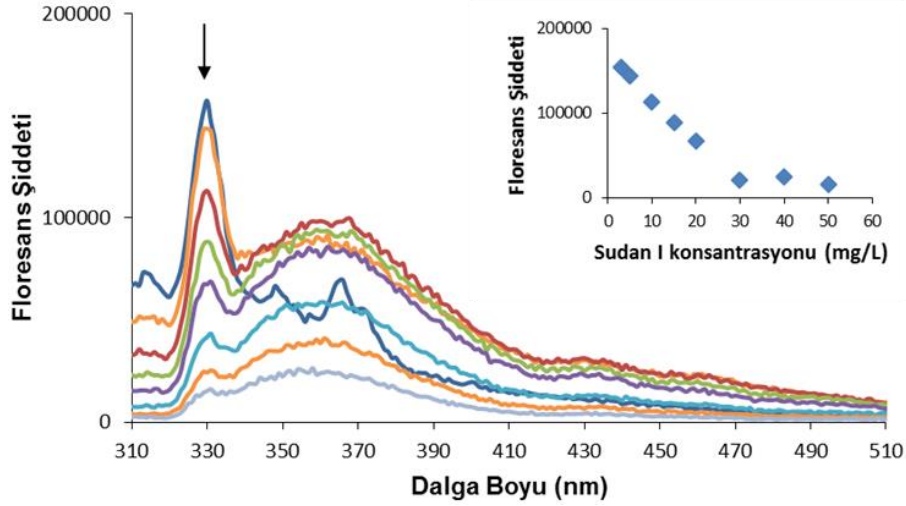
### 3.1. Sudan I'in floresans özelliklerinin belirlenmesi

Şekil 1'de açık yapısı verilen Sudan I bileşiğinin floresans özelliği gösterdiği bilinmektedir. Boyanın tayini için floresans ölçümüne dayanan birkaç spektrofotometrik yöntem literatürde vardır [42-46]. Bu çalışmada öncelikle daha ucuz olmaları sebebiyle boyanın metanol ve etanoldeki çözeltilerinin floresans şiddetleri ölçülerek kalibrasyon grafikleri elde edilmeye çalışıldı. Yapılan ön denemelerde her iki çözücüyle de uygun doğrusal konsantrasyon aralıkları belirlendi. Bununla birlikte etanolün daha ucuz ve düşük toksisiteye sahip olması sebebiyle ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılmasına karar verildi. En yüksek floresans şiddetini elde etmek için 300 ile 360 nm arasındaki çeşitli dalga boyları ile uyararak Sudan I'in etanoldeki çözeltisinin floresans spektrumları alındı. 300 nm dalga boylu ışıkla uyarıldığında en yüksek floresans şiddetinin elde edildiği belirlendi. Bu nedenle ilk ölçümlerde uyarıcı dalga boyu olarak 300 nm kullanıldı.

0,3-50,0 mg/L konsantrasyon aralığında bir seri Sudan I çözeltisi hazırlandı ve 300 nm'de uyarılarak floresans spektrumları alındı. Şekil 2'de görüldüğü gibi, Sudan I konsantrasyonunun artmasıyla düzenli bir floresans sönümü gözlenmektedir. 330 nm'de floresans



Şekil 1. Sudan I boyası'nın yapısı.



Şekil 2. Sudan I'nin artan konsantrasyonu ile emisyon spektrumundaki değişim. Konsantrasyon aralığı: 0,3-50,0 mg/L. Uyarıcı dalga boyu 300 nm. İç grafik: Artan konsantrasyonla 330 nm'deki floresans şiddetindeki değişim.

şiddetlerinin değişiminden 0,3 ile 30,0 mg/L aralığında doğrusal bir kalibrasyon grafiği elde edildi. 30,0 mg/L'den sonra Beer kanunundan sapma gözlenmiştir (Şekil 2, iç grafik).

### 3.2. Numune hazırlama ve ekstraksiyon işlemi

Numune hazırlama aşamasında boyanın çözücü ortamına etkili ekstrakte edilmesi gerektiğinden bu basamak tayinin en önemli basamaklarından. Eğer bu aşamada boyanın bir kısmı katı numuneden çözücü ortamına alınmazsa çözeltinin floresans şiddetinin ölçümüne dayanan tayin aşamasında bulunacak geri kazanım değerleri düşük olacaktır. Böylece bulunan düşük geri kazanım değerleri aslında düşük ekstraksiyon veriminden kaynaklanacaktır. Bu nedenle orijinal katı numunelere analitin standart çözeltisinden ilave edildikten sonra ekstraksiyon işleminin uygulanması önerilecek metodun doğruluğu için daha güvenilir bir yaklaşımdır. Bu yaklaşımla Sudan boyalarının tayini için gerçekleştirilen birçok eklem-geri kazanım çalışması literatürde mevcuttur. Ancak bu metodların çoğu pahalı sistemler olan kromatografik ölçüm cihazlarının kullanıldığı metotlardır [13]. Sudan I'nin tayini için önerilen, floresans ölçümlerine dayanan yöntem sayısı literatürde çok azdır. Bu çalışmaların bazılarında Sudan I boyasının ilavesinin orijinal numunelere değil, ekstraksiyondan sonra elde edilen ekstraktlara uygulandığı görülmektedir [45,46]. Bazı çalışmalarda ise standart ilave etme işleminin nasıl yapıldığı açık olarak verilmemiştir [43]. Bu nedenle literatürde önerilen yöntemlerdeki geri kazanım değerleri tartışmaya açıktır.

Literatürde uygulanan bu yaklaşımların kontrol edilmesi amacıyla önerilen çalışmada önce ekstraktlara Sudan I boyası ilave edilerek geri kazanım çalışması yapıldı. Bunun için normal standart eklem yöntemi uygulandığında kabul edilebilir geri kazanımlar elde edildi. Ancak orijinal katı numunelere Sudan I ilave edilerek yapılan ölçümlerde standart eklem yöntemi ile elde edilen geri kazanım değerlerinin yeterince yüksek olmadığı belirlendi. Böylece literatürde uygulanan, ekstraktlara Sudan I ilave etme işleminin uygun olmadığı belirlenmiş oldu. Bu nedenle orijinal katı numunelere Sudan I ilave edilerek ve deneysel kısımda ayrıntılı olarak anlatılan modifiye standart eklem yöntemi kullanılarak geri kazanım çalışmaları yapıldı. Bu yöntemle Sudan I ilave edilmiş orijinal numunelerden kabul edilebilir % geri kazanım değerleri elde edildi.

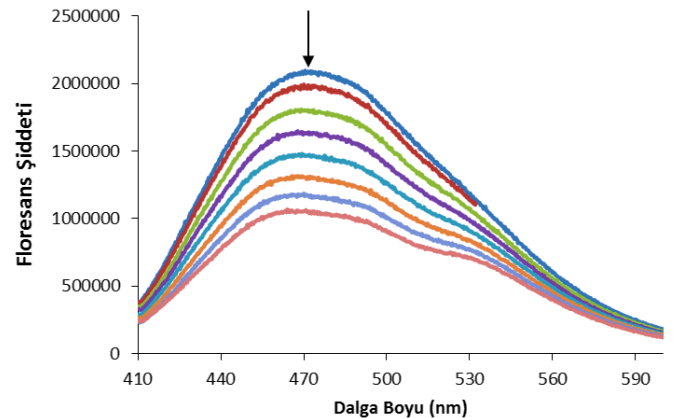
Önerilen çalışmada ekstraksiyon çözücüsü olarak etanol kullanılmıştır. Sudan I'i baharatlardan ekstrakte etmek için organik çözücüler ile katı-sıvı ekstraksiyon teknikleri literatürde yaygın olarak kullanılmıştır [13, 16, 18, 43, 45, 46]. Geri kazanım değerlerinin çözücüye ve matrikse bağlı olduğu bildirilmiştir. Bu amaçla literatürde en yaygın kullanılan çözücülerin asetonitril, aseton, n-hekzan, metanol, etanol ve izopropil alkol olduğu bilinmektedir. Önerilen çalışmada ise, ucuzluğu, zararsızlığı ve Sudan I'i çözme kabiliyeti yüksek olması nedeniyle çözücü olarak etanol tercih

edilmiştir. Böylece önerilen metodun sağlıklı, çevreci ve ekonomik olması hedeflenmiştir.

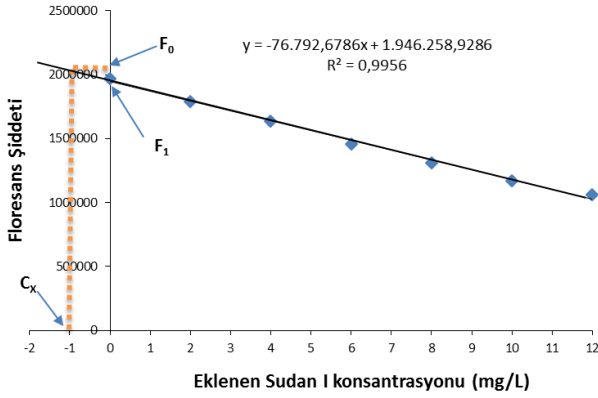
### 3.3. Analitik performans

Yukarıda bahsedilen sebeplerle bu çalışmada orijinal numunelere Sudan I boyası ilave edilerek geri kazanım ölçümleri yapıldı. Yapılan ölçümlerde önce Şekil 2, iç grafikteki doğrusal bölge kullanılarak dış kalibrasyonla numunelerdeki Sudan I'nin tayini gerçekleştirilmeye çalışıldı. Ancak geri kazanımlar %95'ten düşük olduğu için normal standart eklem yöntemi uygulandı. Bu kalibrasyon grafikleri ile de istenen sonuçlar elde edilemediğinden modifiye edilmiş bir standart eklem yöntemi kullanıldı.

Örnek olarak kimyonda numunesindeki Sudan I'nin tayini için hazırlanan çözeltilerin floresans spektrumları Şekil 3'te ve ilgili standart eklem grafiği Şekil 4'te verilmiştir. Şekil 4'ten görüldüğü gibi numunedeki Sudan I konsantrasyonu ekstrapolasyonla da bulunabilir. Yardımcı Materyal'de her bir numune matriksi için hazırlanan çözeltiler şematik olarak, ayrıca pul biber ve sumak numunelerinde yapılan tayinler için spektrumlar ve kalibrasyon grafikleri verilmiştir (Figure S1-S7, S1). Optimize edilmiş koşullar altında önerilen yöntem için analitik performans verileri Tablo 1'de sunulmuştur.



Şekil 3. Kimyonda Sudan I tayini için kullanılan çözeltilerin floresans spektrumları (1,0 mg/L).



Şekil 4. Kimyonda Sudan I tayini için çizilen modifiye standart ekleme grafiği (1,0 mg/L).

Tablo 1'den görüldüğü gibi uyarıcı dalga boyu, emisyon dalga boyu ve doğrusal aralık, örnek matrisine göre değişmektedir. Pul biber için, 330 nm'deki floresans şiddeti ile Sudan I konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişki 3,0-10,0 mg/L aralığında bulundu. Doğrusal aralık, sumak için 417 nm'de floresans şiddeti ölçümlerinde 0,5 ile 10,0 mg/L arasında idi. Kimyon için ölçümlerin yapıldığı dalga boyu 465 nm, doğrusal aralık 1,0-12,0 mg/L arasındaydı. Kalibrasyon grafikleri için elde edilen korelasyon katsayılarının ( $R^2$ ), özellikle sumak ve kimyon için ideal olduğu Tablo 1'den görülmektedir. Tablo 1'den ayrıca her bir numune matrisi için kullanılan sabit Sudan I konsantrasyonunun da matrikse bağlı olarak değiştiği görülmektedir. Bu durum daha önce bazı metal katyonlarının spektrofotometrik yöntemle tayininde uygulanan modifiye standart ekleme yöntemlerindeki sonuçlarla uyumludur [47-50].

Son zamanlarda araştırma grubumuzun floresans ölçümlerine dayalı tayinlerde uyguladığı modifiye standart ekleme yöntemindeki kritik parametre, tüplerdeki çözeltilerin sabit Sudan I konsantrasyonunu optimize etmektir. Bu çalışmada da en uygun sabit Sudan I konsantrasyonunu belirlemek için, 0,5 ile 8,0 mg/L arasında değişen konsantrasyonlar denendi. Optimum sabit Sudan I konsantrasyonları pul biber, sumak ve kimyon için sırasıyla 3,0 mg/L, 6,0 mg/L ve 5,0 mg/L olarak belirlendi. Geri kazanım çalışmalarında bağlı hataların % 5'in altında olduğu konsantrasyon optimum Sudan I konsantrasyonu olarak alındı. Tüm numune matrisleri için modifiye edilmiş standart ekleme yönteminde matris benzeşmesini sağlamak için tağış edilmeyen numunenin etanolik ekstraktından her bir tüpe 0,5'er mL ilave edildi.

Tablo 3. Önerilen metodun literatürdeki bazı metotlarla karşılaştırılması

Metot	Numune	Reaktif	Numune hazırlama ve ölçüm öncesi işlemler	Doğrusal aralık (mg/L)	LOD (mg/L)	Ref.
SF	Pul biber, sumak, kimyon	-	Etanolle 20 dak, ekstraksiyon, 5 dak, ultrasonik işlem	0,5-12	0,3-1,0	Önerilen metot
SF	Pul ve tütsülenmiş biber	-	İzoprolil alkolle 5 dak, çalkalama	-	-	46
SF	Çili tozu	Cu(II)-kalsein kompleksi	National Standard of the People's Republic of China (2005) metoduna göre ön işlem	0,0028-0,51	0,000052	42
SF	Çili tozu	Polietilenimin kaplı gümüş nanoküpleri	Etanolle ekstraksiyon, 5 dak, vortex, 30 dak, ultrasonik işlem, 10 dak, bekleme, 3 dak, santrifüj, PEI-AgNCs kullanımı	0,0992-6,2	0,0027	43
SF	Acı çili tozu	Polietilenimin kaplı bakır nanoküpleri	National Standard of the People's Republic of China (2005) metoduna göre ön işlem	0,0248-7,44	0,0161	45
HPLC-UV	Çili tozu	-	Triton X-100 ile bulutlanma noktası ekstraksiyonu, aseton-su karışımı ile seyreltme	-	-	28
ELİSA	Baharat karışımı, köri, çili tozu	HRP'ye konjuge edilmiş karboksi-Sudan I türevi	15 dak, asetonitrille çalkalama, metanolle seyreltme, jel permeasyon ile temizleme işlemi	-	-	16

Tablo 1. Sudan I'in tayini için önerilen yöntemin analitik performans verileri

	Pul biber	Sumak	Kimyon
Uyarıcı dalga boyu (nm)	300	350	400
Emisyon dalga boyu (nm)	330	417	465
Tespit sınırı (mg/L)	1,0	0,2	0,3
Tayin sınırı (mg/L)	3,0	0,5	1,0
Doğrusal aralık (mg/L)	3,0-10,0	0,5-10,0	1,0-12,0
Sabit Sudan I konsantrasyonu (mg/L)	3,0	6,0	5,0
Tağış edilmemiş numune çözeltisi hacmi (mL)	0,5	0,5	0,5
Toplam hacim (mL)	1,0	1,0	1,0
Çözücü	etanol	etanol	etanol
Ölçüm öncesi bekleme zamanı	yok	yok	yok
Korelasyon katsayısı ( $R^2$ )	0,9975	0,9964	0,9956
Gün içi kesinlik (% BSS, N=3)	3,1	4,3	2,2
Günler arası kesinlik (% BSS, N=3)	3,7	4,7	2,4

Tablo 2. Sudan I'in çeşitli baharatlarda tayini (N = 3)

Numune	Eklene (mg/L)	Bulunan $\pm$ %BSS (mg/L)	Geri kazanım (%)
Pul biber	3,0	2,9 $\pm$ 3,1	97,6
	4,0	-	96,5
Sumak	0,5	0,5 $\pm$ 4,	96,6
	0,6	-	97,4
	2,0	-	96,3
Kimyon	1,0	1,0 $\pm$ 2,2	96,8
	2,0	-	97,5
	4,0	-	96,5

- : Ölçüm yapılmadı.

Tespit sınırı (LOD), analit içermeyen 11 adet tanık çözeltinin sinyalinin standart sapmasının üç katını kalibrasyon grafiğinin eğimine bölerek hesaplandı. Tayin sınırı (LOQ) ise tespit sınırının üç katı olarak belirlendi. Metodun kesinliğini belirlemek amacıyla gün içinde ve günler arasında yapılan tayinlerin % Bağlı Standart Sapma (% BSS) değerleri her üç numune matrisi için 2,2-4,7 aralığında bulunmuştur (Tablo 1).

Yöntemin doğruluğu, pul biber için iki, sumak ve kimyon için üç konsantrasyon seviyesindeki örneklerinin analizi ile gösterildi. Tüm numuneler için yüksek % geri kazanım değerleri bulunmuştur (Tablo 2). Tablo 2'den görüldüğü gibi metodun gün içi kesinliği pul biber için 3,0 mg/L, sumak için 0,5 mg/L ve kimyon için 1,0 mg/L Sudan I içeren üç paralel numunenin analiz sonuçlarına dayanarak %BSS olarak hesaplandı. Sonuçlar, önerilen yöntemin yasaklı Sudan I boyasının baharatlarda tayini için uygulanabileceğini göstermektedir.

Tablo 3 Sudan I'in çeşitli baharatlarda tayini için literatürde önerilen yöntemlerden bazılarını özetlemektedir. Tablo 3'te özetlenen yöntemler daha çok spektrofotometrik yöntemler olup bu çalışmada önerilen yöntemle karşılaştırma imkanını vermektedir. Tablo 3'ten görüldüğü gibi literatürde bilinen yöntemlerin tayin sınırları önerilen yönteminkinden daha düşük olmakla birlikte çoğu tayin basamağından önce zahmetli ve zaman alıcı ön temizleme veya ekstraksiyon işlemlerine ihtiyaç duyar. Ayrıca yine çoğu bir kimyasal reaktifin kullanımına veya nanomateryalin hazırlanıp kullanılmasına dayalıdır. Bu nedenle zaman alıcı ve pahalı yöntemlerdir.

#### 4. Sonuç

Sudan I'in tayini için önerilen yöntem herhangi bir reaktifin kullanımına ihtiyaç duymaz. Boyanın kendi floresans özelliğinin ölçümüne dayanır. Etanoldeki Sudan I çözeltisinin artan boya konsantrasyonu ile gözlenen düzenli floresans sönümünden yararlanılır. Bu nedenle literatürde bildirilen birçok reaktif ve malzemenin kullanıldığı yöntemlere göre avantajlıdır. Önerilen yöntem pul biber, sumak ve kimyon gibi baharatlarda uygulanabilir. Ölçümler basit ve hızlıdır. Ölçüm aşamasından önce hazırlanan çözeltilerin beklemesine gerek yoktur. Çözücü olarak ucuz, ulaşılabilir ve toksik olmayan etanol kullanılmıştır. Ölçüm öncesinde bir önderiştirme veya zenginleştirme işlemi uygulanmadan baharatlardaki Sudan I'in pratikte tespit edilmesine imkan verecek tayin sınırına sahiptir. Matriks benzeşmesi yapılarak uygulanan modifiye edilmiş bir standart ekleme yöntemi ile ortaya çıkan matriks etkileri giderilmiştir. Bu avantajlar önerilen metodu literatürde bildirilen birçok yöntemle karşılaştırıldığında zaman kazandırıcı, basit ve ekonomik yapmaktadır.

#### SUPPORTING INFORMATION

The supplementary material associated with this article is available [on-line](#).

#### Kaynaklar

1. Fonovich, T. M., Sudan dyes: Are they dangerous for human health? *Drug Chem. Toxicol.* 2013, 36, 343-352.
2. Semanska, M., Dracinsky, M., Martinek, V., Hudecek, J., Hodek, P., Frei, E., Stiborova, M., A one-electron oxidation of carcinogenic nonaminoazo dye Sudan I by horseradish peroxidase, *Neuroendocrinol. Lett.* 2008, 29, 712-716.
3. Nisa, A., Zahra, N., Butt, Y. N., Sudan dyes and their potential health effects, *Pak. J. Biochem. Mol. Biol.* 2016, 49, 29-35.
4. Official Journal of the European Union (2004/92/EC) L27/52.
5. Tateo, F., Bononi, M., Fast determination of Sudan I by HPLC/APCI-MS in hot chili, spices, and oven-baked foods, *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 655-668.
6. Du, M., Han, X., Zhou, Z., Wu, S., Determination of Sudan I in hot chili powder by using an activated glassy carbon electrode, *Food Chem.* 2007, 105, 883-888.
7. Prabakaran, E., Pandian, K., Amperometric detection of Sudan I in red chili powder samples using ag nanoparticles decorated graphene oxide modified glassy carbon electrode, *Food Chem.* 2015, 166, 198-205.
8. Puoci, F., Garreffa, C., Iemma, F., Muzzalupo, R., Spizzirri, U. G., Picci, N., Molecularly imprinted solid phase extraction for detection of Sudan I in food matrices, *Food Chem.* 2005, 93, 349-353.
9. Ming, L., Xi, X., Chen, T., Liu, J., Electrochemical determination of trace Sudan I contamination in chili powder at carbon nanotube modified electrodes, *Sensors* 2008, 8, 1890-1900.

10. Lin, H., Li, G., Wu, K., Electrochemical determination of Sudan I using montmorillonite calcium modified carbon paste electrode, *Food Chem.* 2008, 107, 531-536.
11. Wu, L. P., Li, Y. F., Huang, C. Z., Zhang, Q., Visual detection of Sudan dyes based on the plasmon resonance light scattering signals of silver nanoparticles, *Anal. Chem.* 2006, 78, 5570-5577.
12. Lopez, M. I., Ruisanchez, I., Callao, M. P., Figures of merit of a SERS method for Sudan I determination at traces levels, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2013, 111, 237-241.
13. Rebane, R., Leito, I., Yurchenko, S., Herodes, K., A review of analytical techniques for determination of Sudan I-IV dyes in food matrixes, *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 2747-2757.
14. Lohumi, S., Joshi, R., Kandpal, L. M., Lee, H., Kim, M. S., Cho, H., Mo, C., Seo, Y-W., Rahman, A., Cho, B-K., Quantitative analysis of Sudan dye adulteration in paprika powder using FTIR spectroscopy, *Food Addit. Contam. Part A* 2017, 34, 678-686.
15. Wang, Y., Yang, H., Wang, B., Deng, A., A sensitive and selective direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for fast detection of Sudan I in food samples, *J. Sci. Food Agric.* 2011, 91, 1836-1842.
16. Oplatowska, M., Stevenson, P. J., Schulz, C., Hartig, L., Elliott, C.T., Development of a simple gel permeation clean-up procedure coupled to a rapid disequilibrium enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of Sudan I dye in spices and sauces, *Anal. Bioanal. Chem.* 2011, 401, 1411-1422.
17. Long, C., Mai, Z., Yang, X., Zhu, B., Xu, X., Huang, X., Zou, X., A new liquid-liquid extraction method for determination of 6 azo-dyes in chili products by high-performance liquid chromatography, *Food Chem.* 2011, 126, 1324-1329.
18. Nelofar, A., Khan, S. T., Yasmin, A., A method for simultaneous detection and determination of Sudan-I, II, III & IV in food stuff by HPLC, *J. Chem. Soc. Pak.* 2006, 28, 230-231.
19. Zhang, Y., Wu, H. L., Xia, A. L., Han, Q. J., Cui, H., Yu, R. Q., interference-free determination of Sudan dyes in chili foods using second-order calibration algorithms coupled with HPLC-DAD, *Talanta* 2007, 72, 926-931.
20. Zhu, H., Huang, C., Chen, Y., Lu, Z., Zhou, H., Chen, C., Wu, J., Chen, X., Jin, M., Quantitative determination of four azo dyes in rat plasma with solid-phase extraction and UFLC-MS-MS analysis: application to a pharmacokinetic study, *J. Chromatogr. Sci.* 2016, 54, 1522-1531.
21. Liu, Z-C., Yang, F., Yin, T-K., Qian, J., Simultaneous determination of four Sudan red dyes residues in poultry eggs by solid-phase extraction combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Fenxi Ceshi Xuebao* 2015, 34, 171-176.
22. Khalikova, M. A., Satinsky, D., Solich, P., Novakova, L., Development and validation of ultra-high performance supercritical fluid chromatography method for determination of illegal dyes and comparison to ultra-high performance liquid chromatography method, *Anal. Chim. Acta* 2015, 874, 84-96.
23. Tsai, C-F, Kuo, C-H., Shih, D. Y-C., Determination of 20 synthetic dyes in chili powders and syrup-preserved fruits by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Food Drug Anal.* 2015, 23, 453-462.
24. Mazzetti, M., Fascioli, R., Mazzoncini, I., Spinelli, G., Morelli, I., Bertoli, A., Determination of 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I) in chili powder and in chili-containing food products by GPC clean-up and HPLC with LC/MS confirmation, *Food Addit. Contam.* 2004, 21, 935-41.
25. Rajabi, M., Sabzalian, S., Barfi, B., Arghavani-Beydokhti, S., Asghari, A., In-line micro-matrix solid-phase dispersion extraction for simultaneous separation and extraction of Sudan dyes in different spices, *J. Chromatogr. A* 2015, 1425, 42-50.
26. Zhao, C., Zhao, T., Liu, X., Zhang, H., A novel molecularly imprinted polymer for simultaneous extraction and determination of Sudan dyes by on-line solid phase extraction and high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 6995-7002.
27. Fan, Y., Chen, M., Shentu, C., El-Sepai, F., Wang, K., Zhu, Y., Ye, M., Ionic liquids extraction of para red and Sudan dyes from chili powder, chili oil and food additive combined with high performance liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta* 2009, 650, 65-69.
28. Liu, W., Zhao W-J., Chen, J-B., Yang, M-M., A cloud point extraction approach using Triton X-100 for the separation and preconcentration of Sudan dyes in chili powder, *Anal. Chim. Acta* 2007, 605, 41-45.
29. Li, Y., Wang, Y., Yang, H., Gao, Y., Zhao, H., Deng, A., Establishment of an immunoaffinity chromatography for simultaneously selective extraction of Sudan I, II, III and IV from food samples, *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 7840-7847.
30. Baggiani, C., Anfossi, L., Baravalle, P., Giovannoli, C., Giraudi, G., Barolo, C., Viscardi, G., Determination of banned Sudan

- samples by molecularly imprinted solid phase extraction-high performance liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 2009 32, 3292-3300.
31. Ji, W., Zhang, M., Wang, T., Wang, X., Zheng, Z., Gong, J., Molecularly imprinted solid-phase extraction method based on SH-Au modified silica gel for the detection of six Sudan dyes in chili powder samples, *Talanta* 2017, 165, 18-26.
  32. Liang, G-J., Li, H-Z., Wang, W-P., Sun, D., Xiao, Y., Zhang, J., Determination method of 8 industrial dyes in chili products by high performance liquid chromatography, *Shipin Keji* 2013, 38, 329-333.
  33. Li, J., Ding, X-M., Liu, D-D., Guo, F., Chen, Y., Zhang, Y-B., Liu, H-M., Simultaneous determination of eight illegal dyes in chili products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 2013, 942-943, 46-52.
  34. Li, C., Wu, Y.-L., Shen, J.-Z., UPLC-ESI-MS/MS analysis of Sudan dyes and para red in food, *Food Addit. Contam. Part A* 2010, 27 (9), 1215-1220.
  35. Long, C., Mai, Z., Yang, X., Zhu, B., Xu, X., Huang, X., Zou, X., A new liquid-liquid extraction method for determination of 6 azo-dyes in chili products by high-performance liquid chromatography, *Food Chem.* 2011, 126, 1324-1329.
  36. Dixit, S., Dwivedi, P. D., Das, M., Simultaneous determination of Sudan dyes along with dimethyl yellow in Indian curry samples by reverse phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. Sep. Tech.* 3:150. doi:10.4172/2157-7064.1000150.
  37. Piatkowska, M., Jedziniak, P., Olejnik, M., Pietruk, K., Zmudzki, Z., Posyński, A., Simultaneous determination of ten illegal azo dyes in feed by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Vet. Res.* 2017, 61, 299-305.
  38. Wang, L., Zheng, J., Zhang, Z., Wang, T., Che, B., Determination of eight Sudan dyes in chili powder by UPLC-MS/MS, *Engineering* 2013, 5, 154-157.
  39. Schummer, C., Sassel, J., Bonenberger, P., Moris G., Low-level detections of Sudan I, II, III and IV in spices and chili-containing foodstuffs using UPLC-ESI-MS/MS, *J. Agric. Food Chem.* 2013, 61, 2284-2289.
  40. Botek, P., Poustka, J., Hajslova, J., Determination of banned dyes in spices by liquid chromatography-mass spectrometry, *Czech J. Food Sci.* 2007, 25, 17-24.
  41. Tateo, F., Bononi, M., Gallone, F., Rapid detection of dimethyl yellow dye in curry by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry, *Czech J. Food Sci.* 2010, 28, 427-432.
  42. Huang, S. T., Yang, L.F., Li, N.B., Luo, H.Q., An ultrasensitive and selective fluorescence assay for Sudan I and III against the influence of Sudan II and IV, *Biosens. Bioelectron.* 2013, 42, 136-140.
  43. Chen, N. Y., Li, H. F., Gao, Z. F., Qu, F., Li, N. B., Luo, H. Q., Utilizing polyethyleneimine-capped silver nanoclusters as a new fluorescence probe for Sudan I-IV sensing in ethanol based on fluorescence resonance energy transfer, *Sens. Actuators B: Chem.* 2014, 193, 730-736.
  44. Fang, A., Long, Q., Wu, Q., Li, H., Zhang, Y., Yao, S., Upconversion nanosensor for sensitive fluorescence detection of Sudan I-IV based on inner filter effect, *Talanta* 2016, 148, 129-134.
  45. Ling, Y., Li, J. X., Qu, F., Li, N. B., Luo, H. Q., Rapid fluorescence assay for Sudan dyes using polyethyleneimine-coated copper nanoclusters, *Microchim. Acta* 2014, 181, 1069-1075.
  46. Di Anibal, C. V., Rodriguez, M. S., Albertengo, L., Synchronous fluorescence and multivariate classification analysis as a screening tool for determining Sudan I dye in culinary spices, *Food Control* 2015, 56, 18-23.
  47. Başoğlu, A., Tosun, G., Ocak, M., Alp, H., Yaylı, N., Ocak, Ü., Simple time-saving method for iron determination based on fluorescence quenching of an azaflavanon-3-ol compound, *J. Agric. Food. Chem.* 2015, 63, 2654-2659.
  48. Çağlar, Y., Saka, E. T., Alp, H., Kantekin, H., Ocak, Ü., Ocak, M., A simple spectrofluorimetric method based on quenching of a nickel(II)-phthalocyanine complex to determine iron (III), *J. Fluoresc.* 2016, 26, 1381-1389.
  49. Özbek, N., Alp, H., Çelik, G., Ak, T., Çağlıcı, O. C., Yaylı, N., Ocak, Ü., Ocak, M., A Simple spectrofluorimetric method for iron determination with a chalcone-based Schiff base, *J. Fluores.* 2017, 27, 635-641.
  50. Ocak, M., Ak, T., Aktaş, A., Özbek, N., Çağlıcı, O. C., Gümrükçüoğlu, A., Kantekin, H., Ocak, Ü., Alp, H., Metal complexation properties of Schiff bases containing 1,3,5-triazine derived from 2-hydroxy-1-naphthaldehyde in solution. a simple spectrofluorimetric method to determine mercury (II), *J. Fluores.* 2017, 27, 59-68

Note: This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution regulations with the licence type "Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND 4.0)", which, for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.