

ENTERAL BESLENME ÜRÜNLERİNDEKİ VİTAMİN B₂ MİKTARININ HPLC İLE BELİRLENMESİ*

Quantitative Determination of Vitamin B₂ by HPLC in Enteral Nutritional Products

Pınar KAYNAR, Meşküre CANBOLAT, Mehmet BİNGÖL, Aynur POLAT

Refik Saydam Hıfzıssıhha
Merkezi Başkanlığı
Gıda Güvenliği ve Beslenme
Araştırma Müdürlüğü,
ANKARA

İletişim:
Pınar KAYNAR
RSHMB,
Gıda Güv. ve Bes. Araş. Müd.,
Vitamin Lab.,
06100 Sıhhiye/ANKARA
Tel: 0312 458 21 51
Faks: 0312 458 23 83
e-posta: rsgida@rshm.gov.tr

ÖZET

Amaç: Enteral beslenme ürünlerindeki vitamin B₂ (riboflavin) miktarının tayinine yönelik floresans dedeksiyonu (FL/250-546 nm) ile kolay, spesifik ve duyarlı, yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) yönteminin uygulanabilirliğini tespit etmektir.

Yöntem: Toplam 48 adet enteral beslenme ürününün vitamin B₂ miktarlarının belirlenmesi için HPLC yöntemi kullanılmıştır. Kromatografik sistem; C-18 kolon (250x4,60-5micron) ve 250-546 nm'ye ayarlı floresans dedektör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak 1 ml/dk akış hızında heksansülfonik asit sodyum tuzu içeren tampon ve metanol (% 75:25) kullanılmıştır. İstatiksel değerlendirme, iki eş arasındaki farkın önemlilik testine göre yapılmıştır.

Bulgular: B₂ vitaminin alıkonma süresi yaklaşık 14 dakika olarak saptanmıştır. Enteral beslenme ürünlerindeki vitamin B₂ miktarları ise 0,11-0,40 mg/100 ml arasında tespit edilmiştir. Bu tespit edilen değerlerin, ürün etiketlerindeki değerlere uygunluk gösterdiği belirlenmiştir.

Sonuç: Enteral beslenme ürünlerindeki vitamin B₂ miktarlarının belirlenmesinde HPLC-FL (HPLC-Floresans Dedektör) kullanılabileceği görülmüştür. Ayrıca bu metodun duyarlı, uygulama süresi ve kolaylığı açısından avantajlı bir yöntem olduğu da düşünülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Enteral beslenme ürünleri, vitamin B₂ (riboflavin), HPLC.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to determine the applicability of fluorescence detection (FL/250-546 nm) method by the simply, specific and sensitive high pressure liquid chromatography (HPLC) for quantitative estimation of vitamin B₂ (riboflavin) levels in enteral nutritional products.

Method: HPLC method was used for quantitative determination of vitamin B₂ in total 48 enteral nutritional products. The chromatographic system was done on a C18 column (250x4,60-5micron) with fluorescence detection at 250-546 nm. Buffer containing hexanesulphonic acid sodium salt and methanol (75:25) was used as the mobile phase at a flow rate of 1 ml/min. The results were evaluated using the paired samples test.

Results: The retention time of vitamin B₂ was determined as ca. 14 min. The concentration of vitamin B₂ of enteral nutritional products ranged from 0.11 to 0.40 mg/100 ml. The determined values showed similarity with the labelling values of the products.

Conclusion: It was showed that HPLC-FL (HPLC-Fluorescence Detector) can be applied for the quantitative determination of vitamin B₂ levels in enteral nutritional products. This had the advantages of improved simplicity, sensitivity and shorter application times.

Key words: Enteral nutritional products, vitamin B₂ (riboflavin), HPLC.

*Bu çalışma IX. Uluslararası Katılımlı Beslenme ve Metabolizma Kongresi'nde (22-25 Ekim 2007, İstanbul) P06' nolu poster bildirisi olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

5179 sayılı Gıdaların Üretimi, Tüketimi ve Denetlenmesine Dair Kanun Hükmünde Kararnamenin Değiştirilerek Kabulü Hakkında Kanun ile Enteral Beslenme Ürünleri; bireyin iştahsızlık, çeşitli hastalıklar ve ameliyatlar gibi çeşitli nedenlerle ağızdan yeterince besin alamadığı durumlarda, yetersiz besin alınımını takviye etmek ve/veya tüm besin öğeleri gereksinimlerini karşılamak amacıyla kullanılan ürünler olarak ifade edilmiştir (1). Enteral Beslenme (EB) ise normal veya normale yakın çalışan gastrointestinal sistem (GİS) aracılığıyla nutrisyonel destek sağlanması şeklinde tanımlanmıştır (2,3). Bu beslenme şeklinde kullanılan ürünlerin içerisinde büyüme ve canlılık için gerekli olan çeşitli vitaminler bulunmaktadır. Bebek mamaları ve tıbbi amaçlı diyet ürünleri dahil çeşitli gıdalarda vitamin tayinine yönelik titrimetrik, mikrobiyolojik-turbidimetrik, spektrofotometrik, florometrik, spektroflorometrik ve kromatografik gibi birçok yöntem kullanılmaktadır (4-7).

Son yıllarda vitamin tayinine yönelik yöntemlerde yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) kullanımının yaygınlaştığı görülmektedir. HPLC yönteminin spesifiklik, duyarlılık ve uygulama kolaylığı açısından bazı avantajlar sağladığı belirtilmektedir (7-9). Büyüme, kas gelişimi ve metabolizma için gerekli olan vitamin B₂'nin HPLC ile tayininde UV ve FL dedeksiyon sistemlerinden yararlanılmaktadır (10, 11).

Bu çalışmada, enteral beslenme ürünlerindeki vitamin B₂ (riboflavin) miktarının tayinine yönelik floresans dedeksiyonu (250-546 nm) ile kolay, spesifik ve duyarlı HPLC yönteminin uygulanabilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Yöntemin uygulanabilirliğini test etmek amacıyla 2005 yılında RSHMB, Gıda Güvenliği ve Beslenme Araştırma Müdürlüğü, Vitamin Laboratuvarı'na gelen 48 adet enteral beslenme ürünü kullanılmıştır.

Ürünlerin analizinde aşağıdaki cihaz-ekipman ve standart ile kimyasal yararlanmıştır:

(a)HPLC: SpectraSystem P1000 model yüksek basınç pompası, SpectraSystem AS3000 model

enjeksiyon bloğu ve SpectraSystem FL 3000 (250-546 nm) kullanılmıştır.

(b)Analitik Kolon: 250x4,60-5micron boyutlarında ters farz C18 kolon kullanılmıştır.

(c)Mobil faz: Akış hızı 1 ml/dk olan ve heksansülfonik asit sodyum tuzu içeren tampon ile metanol (% 75:25) mobil faz olarak kullanılmıştır. Mobil faz günlük hazırlanmış ve kullanılmadan önce gözenek açıklığı 0,45µ olan filtreden geçirilmiştir.

(d)Vitamin B₂ standart çözeltisi: Vitamin B₂ stok çözeltisi günlük olarak 100 µg/ml konsantrasyonda 0,02 N asetik asit içerisinde hazırlanmıştır. Stok çözeltiden asetonitril içeren çözücü ile seyreltmek suretiyle 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ve 1,0 µg/ml konsantrasyonlardaki standart çözeltiler hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi, konsantrasyona karşılık pik yüksekliği baz alınarak belirlenmiştir. Yöntemin doğrusal cevap aralığı 0,2-1,0 µg/ml olarak bulunmuştur.

Laboratuvara gelen 48 adet enteral beslenme ürününden 0,2-1,0 µg/ml olacak şekilde tartımlar yapılmış ve 0,01 N HCl ile 121 °C'de, 30 dakika otoklavda asit hidrolizi işlemi yapılmıştır. Hidroliz işlemi tamamlandıktan sonra 0,01M HCl ve 0,01M NaOH ile pH 4,5'a ayarlanmış ve son hacme deiyonize su ile tamamlanmıştır. Tamamlanmış çözelti üzerine asetonitril içeren çözücü ilave edilmiştir. Daha sonra örnek gözenek açıklığı 0,45µ olan filtreden geçirilmiş ve filtratın 50 µl'si kolona enjekte edilmiştir.

Etiket değeri ile saptanan miktar arasındaki ilişki, iki eş arasındaki farkın önemlilik testine göre belirlenmiştir (12).

BULGULAR

Laboratuvara gelen 48 adet enteral beslenme ürünündeki vitamin B₂ miktarı (HPLC) kullanılarak belirlenmiştir. Enteral beslenme ürünlerinden B₂ vitaminin ekstraksiyonu için asit hidrolizi işlemi uygulanmıştır. Vitamin B₂ yaklaşık 14 dakikalık bir elusyon süresinde analiz edilmiştir. Tablo 1'de 48 adet enteral beslenme ürünüde saptanan vitamin B₂ miktarları verilmiştir. Şekil 1'de vitamin B₂ standart çözeltisi ile enteral beslenme ürününe (E29) ait vitamin B₂ kromatogramları gösterilmiştir.

Tablo 1. Enteral beslenme ürünlerinde saptanan vitamin B₂ miktarları ile etiket değerleri(mg/100 ml)

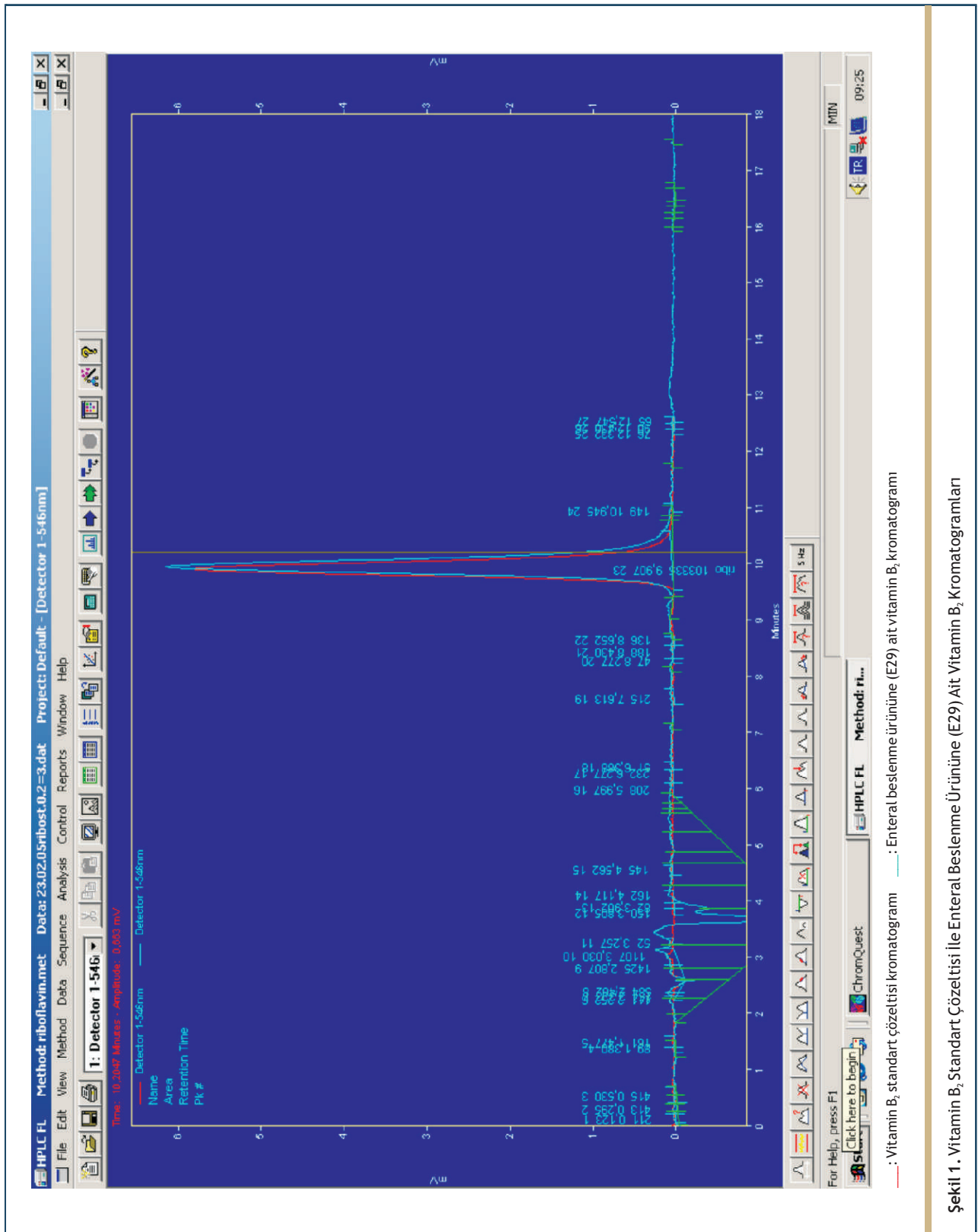
Enteral Beslenme Ürün kodu	Saptanan Miktar	Etiket Değeri
E1	0,22	0,24
E2	0,12	0,17
E3	0,23	0,24
E4	0,28	0,30
E5	0,20	0,20
E6	0,21	0,20
E7	0,18	0,18
E8	0,15	0,17
E9	0,27	0,20
E10	0,20	0,20
E11	0,28	0,29
E12	0,30	0,29
E13	0,22	0,20
E14	0,20	0,18
E15	0,27	0,20
E16	0,20	0,18
E17	0,40	0,36
E18	0,20	0,18
E19	0,20	0,18
E20	0,37	0,31
E21	0,22	0,21
E22	0,20	0,18
E23	0,20	0,18
E24	0,18	0,16
E25	0,30	0,23
E26	0,30	0,27
E27	0,31	0,29
E28	0,30	0,27
E29	0,16	0,16
E30	0,25	0,25
E31	0,24	0,25
E32	0,14	0,14
E33	0,12	0,17
E34	0,13	0,17
E35	0,11	0,13
E36	0,12	0,17
E37	0,14	0,17
E38	0,22	0,3
E39	0,24	0,3
E40	0,25	0,30
E41	0,33	0,4
E42	0,3	0,4
E43	0,3	0,3
E44	0,16	0,16
E45	0,16	0,17
E46	0,13	0,13
E47	0,18	0,17
E48	0,17	0,17

0,2-1,0 µg/ml standart konsantrasyon aralığı için pik yüksekliği ile konsantrasyon arasındaki korelasyon katsayısı 0,999 olarak saptanmıştır (n=5). Enteral beslenme ürünlerindeki vitamin B₂ miktarı 0,11-0,40 mg/100 ml arasında olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen değerlerin, ürün etiketlerindeki değerlere uygunluk gösterdikleri de belirlenmiştir (Tablo 1).

Çalışmamızda, iki eş arasındaki farkın önemlilik testine göre etiket değeri ile saptanan miktar arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmış ve P=0,671 bulunmuştur. Etiket değeri ile saptanan miktar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir (P>0,05).

TARTIŞMA

Çalışmamızda, enteral beslenme ürünlerindeki vitamin B₂ miktarlarını belirlemek için floresans dedeksiyon ile HPLC metodu uygulanmıştır. Heudi ve arkadaşları (13), zenginleştirilmiş bebek gıdaları için kullanılan multivitamin karışımlarda riboflavin dahil birçok vitaminin belirlenmesi için ters-faz HPLC-UV dedeksiyonu kullanmışlardır. Kullanılan metodun multivitamin karışımların kalite kontrolü için uygun olduğunu görmüşlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada da, süt ve soya bazlı bebek mamaları dahil birçok gıdalarda B₂ vitaminin belirlenmesi için ters-faz likit kromatografi floresans dedektörü kullanılmıştır (11). Ndaw ve arkadaşları , ek gıdalarda eş zamanlı olarak suda çözünen vitaminlerin HPLC ile belirlenmesinde asit hidrolizi işlemiyle ekstraksiyonu kullanmışlardır (14). Çalışmamızda da, enteral beslenme ürünlerindeki B₂ vitaminin ekstraksiyonu için asit hidrolizi işlemi uygulanmıştır. Ayrıca, vitamin B₂ uygulanan kromatografik koşullarda çözünürlüğü oldukça yüksek bulunmuştur. Başka bir çalışmada ise ısı ile muamele edilmiş farklı tipteki hazır bebek gıdalarındaki riboflavin, mikrobiyolojik metot ile birlikte ters-faz C18 HPLC UV dedeksiyon metodu kullanılarak da belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, HPLC metodundan daha iyi sonuç alındığı tespit edilmiştir (10). Friel ve arkadaşları ise enteral ve parenteral ürünlerle beslenen prematüre

Şekil 1. Vitamin B₂ Standart Çözeltisi ile Enteral Beslenme Ürününe (E29) Ait Vitamin B₂ Kromatogramları

bebeklerde vitamin C, riboflavin, tiamin ve piridoksin vitaminlerin durumlarını belirlemek için yaptıkları çalışmada kolorimetrik ölçüm yanında yüksek performans likit kromatografisinden yararlanmışlardır (15). Torres-Sequeiros ve arkadaşları da, vitamin katkılı içeceklerde B₂ ve B₆ vitaminlerin belirlenmesi için spektrofotometri ile birlikte HPLC'yi kullanmışlardır (7). Bu içeceklerde B₂ ve B₆ vitaminlerinin belirlenmesi için basit ve çabuk HPLC metodunun kullanılabileceğini tespit etmişlerdir.

Bu çalışma sonucunda enteral beslenme ürünlerindeki vitamin B₂ miktarlarının belirlenmesinde HPLC-FL kullanılabilirliği görülmüştür. Ayrıca bu metodun duyarlılığının yüksekliği, uygulama süresi ve kolaylığı açısından avantajlı bir yöntem olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Anonymous. 05.06.2004 tarih ve 25483 sayılı T.C. Başbakanlık, Resmi Gazete'de yayımlanan Gıdaların Üretimi, Tüketimi ve Denetlenmesine Dair Kanun Hükmünde Kararnamenin Değiştirilerek Kabulü Hakkında 5179 sayılı Kanun.
2. Geçim E, Bunin C. Enteral beslenme. Tıp Bilimleri Dergisi, 1995; 15(2): 111-113.
3. Balcı D, Genç V, Demirel S, Aydınтуğ S. Total nütrisyon tedavisinde farmakolojik etkileşimler. www.kepan.org.tr/farmakolojik-etk.asp., 2007.
4. Deuthsch MJ. Vitamins and other nutrients. In: Cunniff P, ed. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th Edition, Volume II. Virginia-USA. AOAC International Suite Wilson Boulevard Arlington, 1995; 1-79.
5. Polanuer BM, Dedova OA, Gasparov VS. Comparison of various methods of quantitative determination of riboflavin in the culture fluid of producer strains. Russ Biotechnol, 1996; (6): 30-35.
6. Oetles S. Comparative determination of vitamin B₁ and B₂ in foods by means of various enzyme preparations. Z Lebensm Forsch, 1991; 193(4): 347-350.
7. Torres-Sequeiros RA, Garcia-Falcon M, Simal Gandara J. Analysis of fluorescent vitamins riboflavin and pyridoxine in beverages with added vitamins. Chromatographia, 2001; 53 (Suppl.): 236-239.
8. Zafra-Gomez A, Garbalo A, Morales JC, Garcia-Ayuso LE. Simultaneous determination of eight water-soluble vitamins in supplemented foods by liquid chromatography. J Agr Food Chem, 2006; 54(13): 4531-4536.
9. Woollard DC, Indyk HE. Rapid determination of thiamine, riboflavin, pyridoxine and niacinamide in infant formulas by liquid chromatography. J AOAC Int, 2002; 85(4): 945-951.
10. Barna E. Comparison of data obtained by HPLC and microbiological determination of riboflavin in ready-to-eat foods. Acta Aliment Hung, 1992; 21(1): 3-9.
11. Vinas P, Balsalobre N, Lopez-Erroz C, Hernandez-Cordoba M. Liquid chromatographic analysis of riboflavin vitamers in foods using fluorescence detection. J Agr Food Chem, 2004; 52(7): 1789-1794.
12. Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V. Biyoistatistik. 9. Baskı. Ankara: Hatiboğlu Yayınevi, 1990:117.
13. Heudi O, Kilinc T, Fontannaz P. Separation of water-soluble vitamins by reversed-phase high performance liquid chromatography with ultra-violet detection: application to polyvitaminated premixes. J Chromatogr A, 2005; 1070 (1-2): 49-56.
14. Ndaw S, Bergaentzle M, Aoudé-Werner D, Hasselmann C. Extraction procedures for the liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and vitamin B₆ in food stuffs. Food Chem, 2000; 71: 129-138.
15. Friel JK, Bessie JC, Belkhome SL, Edgcombe C, Steele-Rodway M, Downton G, Gin Kwa P, Aziz K. Thiamine, riboflavin, pyridoxine and vitamin C status in premature infants receiving parenteral and enteral nutrition. J Pediatr Gastr Nutr, 2001; 33: 64-69.