

## YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC) İLE KOYUN GÖZ SIVISINDA (CORPUS VITREUM) VİTAMİN A TAYİNİ

Haluk Testereci<sup>1</sup>

İbrahim H. Yörük<sup>2</sup>

### Determination of Vitamin A in Sheep Eye Liquor (corpus vitreous) by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

**Summary:** In this study, a rapid method for the determination of Vitamin A (retinol acetate) in sheep eye liquor (Corpus vitreous) by high performance liquid chromatography (HPLC) has been developed. In this method, eye liquor has been extracted directly with alkaline-methanol without further cleanup. Vitamin A has been separated on ODS column (150x4.6 mm) by methanol as a mobile phase. Detection was made by fluorescence detector set for excitation 348 nm and emission 470 nm. Vitamin A palmitate has been used as an external standard. Retention time for retinol acetate and Vitamin A palmitate are 4.4 and 4.9 minutes, respectively. Vitamin A in eye liquor has been measured rapidly without further cleanup at nanogram quantities. Retinol acetate concentration of health sheep eye liquor was found as 98.2 ng/ml  $\pm$  17.55 SE. Calculated recovery was found to be 45%. This might be due to application of one step extraction. This low recovery can be enhanced by increasing number of methanol extraction steps as reported in many procedure.

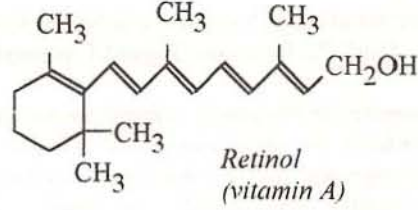
**Özet:** Bu çalışmada, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ( HPLC ) ile koyun göz sıvılarındaki (Corpus Vitreum) vitamin A (retinol asetat) miktarları tayini için, hızlı bir metot geliştirildi. Bu metotta, göz sıvısı direkt olarak alkali-metanol ile daha fazla temizlemeye gerek görmeden ekstrakte edildi. Vitamin A ODS (150x4.6 mm) kolonunda, metanol hareketli (mobil) faz kullanılarak ayrıldı. Vitamin A tayini, flouresans dedektörün eksitasyonu 348 nm ve emisyonu 470 nm'ye ayarlanarak yapıldı. Vitamin A palmitat eksternal standart olarak kullanıldı. Retinol asetat ve vitamin A palmitat'ın tutulma zamanları (retention time) sırası ile 4.4 ve 4.9 dakikadır. Göz sıvısında vitamin A, daha ileri ön temizlemeye gerek duyulmadan, nanogram miktarlarda ölçülebildi. Klinik olarak sağlıklı koyunlarda göz sıvısı retinol asetat konsantrasyonu 98.2 ng/ml  $\pm$ 17.55 SE bulundu. Hesaplanan geri alma (recovery) %45 bulunmuştur. Bu hesap geri alma oranı birçok metotta kaydedildiği gibi, metanol ile ekstraksiyon sayısının artırılmasıyla yükseltilebilir.

1: Yrd.Doç.Dr., Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya-Fizyoloji Anabilim Dalı, Van -TÜRKİYE

2: Uzman Kimyager, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya -Fizyoloji Anabilim Dalı, Van -TÜRKİYE

## Giriş

Vitamin A veya retinol, siklohekzenil halkası taşıyan bir poliizopren bileşiğidir. Doğada poli-izopren içeren karotenoidler den  $\alpha$ -,  $\beta$ -, ve  $\gamma$ - karotinler, vitamin A'nın memelilerde sentezi için ön maddelerdir. Hayvanların başlıca vitamin A kaynaklarını bu üç karotin oluşturur. Ancak yeşil bitkilerde en çok  $\beta$ -karotin bulunur ve en yüksek vitamin A aktivitesi gösterir (8, 12).



Vitamin A, bu vitaminlerin biyolojik aktivitesini gösteren, hayvansal kaynaklı tüm bileşikleri kapsayan genel bir terimdir. Bunlar retinol, retinal ve Retinoik asittir. Sadece retinol, vitamin A'nın tüm aktivitesini gösterir (12). Vitamin A ve karotin emildikten sonra ve vitamin A'ya çevrildikten sonra, uzun zincirli yağ asitleriyle, özellikle palmitik asitle esterleşerek lenf yoluyla karaciğere taşınır (4,6,9).

Retinada, diğer bazı dokulara göre daha fazla miktarda A vitamini vardır. Vitamin A eksikliğinde rodopsin oluşumu azalmakta veya durmaktadır. Retinal görme pigmenti olan rodopsinin bir pigmentidir. Rodopsin az ışıkta görmeden sorumlu retinanın çubuk hücrelerinde mevcuttur. 11-cis retinal all-trans retinal'ın bir izomeridir. 11-cis retinal rodopsin oluşturmak için görme proteini opsine bağlanır. Rodopsin ışığa maruz kalınca rengi dissosiasyona uğrar ve all-trans- retial ile opsini teşkil eder (2,12). Vitamin A yetersizliği memelilerde gece körlüğü ve kserofalmiye sebep olur.

Vitamin A'nın dokulardan ekstraksiyonunda çeşitli metotlar kullanılmıştır. Ekstraksiyonda organik solvent olarak hekzan (13,15) etanol-hekzan (3, 5, 7, 11), etanol-alkali-etil eter (14) ve aceton-hekzan (5) yaygın olarak kullanılmıştır. Vitamin A miktar tayin metotları oldukça çeşitlidir. A vitamini tayininde önceleri kolorimetrik (1) ve U.V spektrofotometrik (5, 15) metotlar kullanılmıştır. Sonraları yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile geliştirilmiş çeşitli metotlarda bildirilmektedir. C<sub>18</sub> ters-fazlı kolonu kullanarak retinol ve onun asetatı fluoresans detektör (3), UV detektör (10, 11) kullanılarak tesbit edilmiştir.

Bu çalışmada, laboratuvarımız şartlarında vitamin A'nın koyun göz sıvısında HPLC ile ölçülebilmesi için hızlı bir metot geliştirildi.

## Materyal ve Metot

Materyal olarak, Van Belediye Mezbahanesin de yeni kesilmiş koyunların 10 adet göz sıvısı kullanıldı.

**Çözeltiler ve diğer malzemeler:** %96 Metanol (Merck), KOH (Merck), Retinol Asetat (Sigma), Vitamin A palmitat (Roche).

**Standard çözeltisi :** Saf retinol asetattan tam olarak 20 mg. hassas terazide (Bosch S-2000) tartılarak bir miktar metanolde çözündürüldü ve 3 ml ye metanolle tamamlandı. 20 mg/3ml stok retinol asetat solüsyonu ve daha sonra bu solüsyon metanolle dilue edilerek 666 ng/ml çalışma standardı hazırlandı. 10 mg vitamin a palmitat 7 ml metanolde eritilerek stok çözeltisi ve bu stoktan 1430 ng/ml palmitat çalışma standardı hazırlandı .

**Kromatografik şartlar:** Numunelerdeki vitamin A' lar Shimadzu LC10 AD pompası yardımıyla ODS-(150x4,6 mm) kolonda ayrılmış , Shimadzu (Japon ) RF-10 A flouresan dedektörde eksitasyon 348 nm ve emisyon 470 nm'lerde standartlara karşı okunmuş, konsantrasyonlar C-R 6 A Chromatopac'ta (Shimadzu ) kaydedildi. Mobil faz olarak metanol , vakum pompası ile (Millipore) degaze edildikten sonra pompanın çıkış hızı 1 ml/dk'ya ayarlandı.

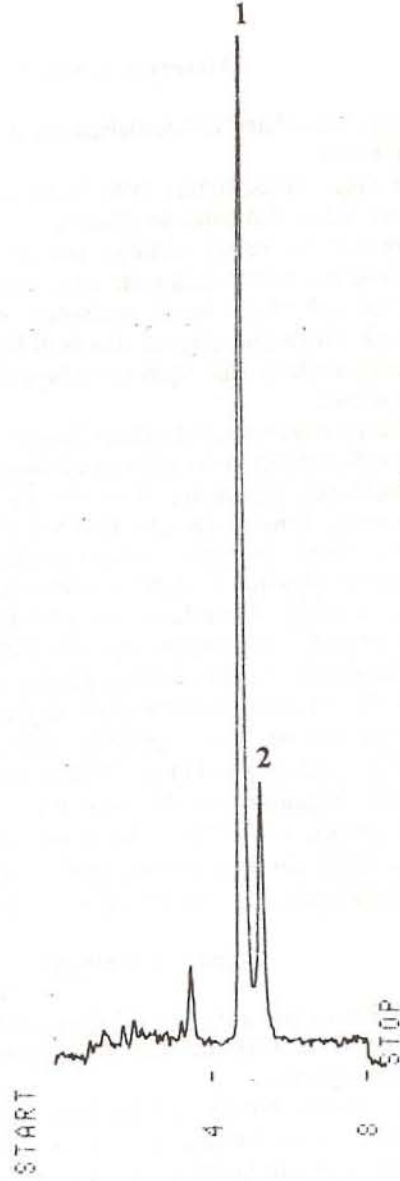
Yeni kesilmiş, sağlıklı koyunların tek gözlerine ait sıvıları (corpus vitreum) karanlık bir ortamda , alüminyum yaprakla kaplı 10 adet serum saklama tüpüne alındı . Buz içerisinde süratle analizin yapılacağı yere getirildi . Burada derin dondurucuda ( -20 °C) analizin yapılacağı güne kadar bekletildi. Numuneler derin dondurucudan alınarak oda ısısına getirildi. Herbir numuneden 250'şer µl alınarak üzerlerine 500µl alkali metanol (1 gr KOH/100ml ) ilave edildi .

Numuneler süratle 60 saniye süre ile karıştırıcıda (Nüve 100 marka Vortex) karıştırıldı ve 3000 devirde ( +4°C'de) 10 dakika süre ile santrüfuj edildi. (Minifuge RF, Heraeus Sepatech ). Her numune 0,45 µm filtrede süzüldü ve berrak süzüntüler HPLC 'ye enjekte edilerek, retinol asetat konsantrasyonları ölçüldü.

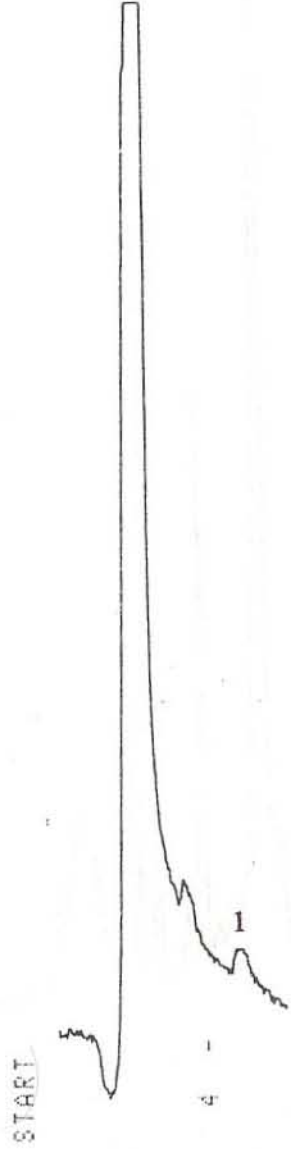
## Sonuç ve Tartışma

Normal sağlıklı koyun göz sıvısında (Corpus vitreum) Vitamin A (retinol asetat) konsantrasyonları standart retinol asetat standardına göre okundu. Sonuçlar aşağıdaki tablo 1 de gösterilmiştir.

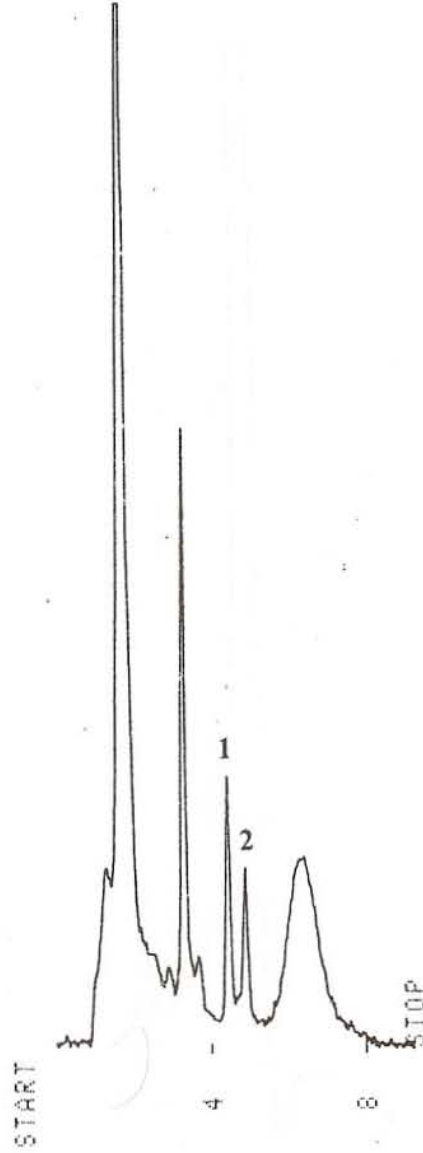
Retinol asetatin tutulma zamanı 4.4 dakikadır. Retinol palmitat eksternal standart olarak kullanıldı. Bunun tutulma zamanı 4.9 dakikadır (Şekil 1). Şekil 2'de 6 nolu göz numunesinin tam kromatogramın da retinol asetatin belirlemesi görülmektedir. Şekil 3 de göz numunesinin retinol asetat ve vitamin A palmitat ile ilavesiyle zenginleştirilmiş tam kromatogramı görülmektedir.



Şekil 1. Retinol asetat (1) ve Vitamin A palmitat (2) standardlarının tutulma zamanları sırası ile 4.4 ve 4.9 dakikadır. ODS-kolonunda (150x4.6 mm) da ayrılan standartlar floresans detektörde 348 nm eksitasyona maruz bırakılıp 470 nm de emisyonları okunmuştur. Mobil faz olarak %96 lık metanol kullanılmıştır. Akış hızı 1 ml/dakikadır.



Şekil 2. 6 nolu göz numunesinde Retinol asetat (1) ın konsantrasyonunun okunması. ODS-kolununda (150x4.6 mm) da ayrılan standartlar fluoressans detektörde 348 nm eksitasyona maruz bırakılıp 470 nm de emisyonları okunmuştur. Mobil faz olarak %96 lık metanol kullanılmıştır. Akış hızı 1 ml/dakikadır.



Şekil 3. 6 nolu göz numunesinin Retinol asetat (1) ve Vitamin A palmitat (2) eklendikten sonra, konsantrasyonların okunması ODS-kolununda (150x4.6 mm) da ayrılan standartlar floresans detektörde 348 nm eksitasyona maruz bırakılıp 470 nm de emisyonları okunmuştur. Mobil faz olarak %96 lık metanol kullanılmıştır. Akış hızı 1 ml/dakikadır.

Tablo 1. Sağlıklı koyun göz sıvısında (Corpus vitreum) Vitamin A (retinol asetat) konsantrasyonlarının HPLC ile tayin sonuçları.

Numune	Retinol asetat (ng/ml)
1	187
2	161
3	54
4	178
5	79
6	82
7	62
8	81
9	65
10	33
Ortalama	98.2 ±17.5 SE

Bu çalışmada en çok vitamin kaybının olduğu aşama olan ilk ekstraksiyon safhası (2,7, 13) oldukça kısaltılmıştır. Vitaminlerin en çok kayba uğramasına sebep olan ısı muamelesine (1, 5,10,11)bu ekstraksiyon metotunda kaçınılmıştır. Keza 6 nolu numunenin ertesi günkü okunmasında konsantrasyonu %86 oranında bir kayıp saptanmıştır. Bu metot sonucu yaklaşık %45 lik bir geri alma olayı söz konusudur. Bu düşük oranda vitamin A'nın elde edilmesindeki kayıpta ekstraksiyonun bir defa yapılmasından kaynaklanabilir.

Akış hızı 1.5 ml/dak kullanılarak retinol asetatın tutulma zamanı 3.4 dakika bulunmuştur (3). Akış hızının 1 ml/dak. kullanılmasıyla bu asetat ve palmitat değerleri benzerlik göstermiştir. Asetat ile palmitat arasındaki 0.5 dakikalık tutulma zamanı farkına dayanılarak, ikisi birbirinden rahatlıkla ayrılmıştır. Retinol asetatın, retinol palmitat'tan ayrılmasında ve göz sıvısında vitamin A değerlerinin 4 .4 dakika gibi kısa bir zamanda okunmasıyla metot pratik ölçümler için geçerli olabilecektir.

Şekil 1, 2 ve 3 detaylı bir şekilde incelendiğinde göz sıvısında vitamin A ile interfere edecek herhangi bir madde bulunmadığından, numunelerin ön temizliğine gerek duyulmaması bu metot için bir hayli zaman kazandırmıştır. Özellikle UV detektörde plazmada ve karaciğerde okunan kromatogramlarda ortaya çıkan bir çok tanımlanamayan pikler (11, 13), göz sıvısındaki fluoresansı etkileyecek kirlilik,

detektörde ilk dakikalarda emisyon vererek retinolün rahat tanımlanmasına yardımcı olmuşlardır. Van yöresinden mezbahaya getirilen sağlıklı koyunların göz sıvısındaki retinol asetat konsantrasyonu ortalama  $98.2 \text{ ng/ml} \pm 17.55 \text{ SE}$  olarak bulunmuştur. Bu metotla göz sıvısında (corpus vitreum) yapılacak bir ölçümle vücuttaki vitamin A eksikliğinden kaynaklanmış bir hastalığın teşhisi mümkün olacaktır. Daha ideal geri alma oranı (recovery) birden fazla alkali-metanol ekstraksiyonla artırılabilir.

#### Kaynaklar

1. Bayfield, R. F. and Cole, E. R. (1980): *Colorimetric Estimation of Vitamin A with Trichloroacetic Acid. Methods in Enzymology.* 67, 189-195.
2. Brewster, M. A. (1984): *Vitamins. In Clinical Chemistry, Theory, Analysis and Correlation.* Edited by L. A. Kaplan and A. J. Pesce. Th. C. V. Mosby Company, St. Louis. USA. 656-685.
3. Collins, C. A. and Chow, C. K. (1984): *Determination of Vitamin A and Vitamin A acetate by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence detection. Journal of Chromatography.*, 317, 349-354.
4. Goodman, D. S., Bromstrand, R., Werner, B., Huang, H. S. and Shiratori, T. (1966): *The Intestinal Absorption and Metabolism of Vitamin A and  $\beta$ -Carotene in man. J. Clin. Invest.*, 45, 1615-1623.
5. Gryns, S. (1980): *Indirect Spectrophotometry on Vitamin A Products: Peak Signal Readout. Methods in Enzymology.*, 67, 195-199.
6. Haung, H. S. and Goodman, D. S. (1965): *Vitamin A and carotenoids. I. Intestinal absorption and metabolism of  $^{14}\text{C}$  - Labeled vitamin A alcohol and  $\beta$ -Carotene in the rat. J. Biol. Chem.*, 240, 2839-2844.
7. Hess, D., Keller, H. E., Oberlin, B., Bonfanti, R. and Schüep, W. (1991): *Simultaneous Determination of Retinol, Tocopherols, Carotenes and Lycopene in Plasma by Means of High Performance Liquid Chromatography on Reversed Phase. J. Vit. Nutr. Int.* 61, 232-238.
8. Kolb, E. (1971): " *Vitamine und vitaminangelkrankheiten*" In: (Herausgeber ; Kolb, E. und Gärtler, H.- *Ernaehrungsphysiologie der landwirtschaftlichen Nutztiere*, VEB, Gustav Fischer, Verlag, Jena). 815-921.
9. Mahadevan, S., Seshadri, S. P. and Ganguly, J. (1963) : *Studies on metabolism of vitamin A<sub>3</sub> The mode of absorption of vitamin A esters in the living rat. Biochem. J.*, 88, 531-534.
11. Miller, K.W., Loo, N. A. and Yang, C.S. (1984): *Situltaneous Determination of Plasma Retinol,  $\alpha$ -Tocopherol, Lycopene,  $\alpha$ -Carotene, and  $\beta$ -Carotene by High Performance Liquid Chromatography. Analytical Biochemistry.*, 138, 340-345.
13. Pikkarainen, S. A. and Parviainen, M. T. (1992): *Determination of retinyl palmitate and total Vitamin A content in liver- based ready to eat foods. Journal of Chromatography.* 577, 163-166.



14 - Stancher, B. and Zonta, F. (1984): *Quantitative High Performance Liquid Chromatographic Method for determining the isomer distribution of Retinol (Vitamin A<sub>1</sub>) and 3-Dehydroretinol (Vitamin A<sub>2</sub>) in Fish oils.* **Journal of Chromatography.**, 312, 423-434.

15- Suzuki, L. and Katoh, N. (1990): *A simple and Cheap Methods for Measuring Serum A in Cattle Using Only a Spectrophotometer.* **Jpn. J.Vet.Sci.** 52(6), 1281-1283.