

## HPLC İLE VİTAMİN A VE E'NİN FLORESANS DEDEKTÖR VE TERS FAZ KOLON ARACILIĞINDA MİKTAR TAYİNİ VE KOLON PERFORMANSININ ÖLÇÜMÜ\*

Nezir Yaşar TOKER\*\*

### Quantitative determination of vitamin A and E through florecence dedector and reversed phase column and measurement of column performance by HPLC

**Summary:** The aim of this study is the using and performance controlling of Hypersil ODS Column and Florescence dedektor with HPLC. With the same phase and with different program (vitamin A: Ex: 340nm-Em: 460, Vitamin E: Ex: 298-Em: 350). Vitamin A and E were dedected and to this target Hypersil ODS reversed phase column was found useful in this work. With its filling material (5 µm, RCM 100 RP18, reversed Phase) column is very sensitive and has a speciall highseparator peculiarity. Vitamins, especially fatsoluble vitamins; has more difficulties to extract and to determine. HPLC is used since seventies in the animal, food .medical and chemical industry and has more difficulties with its filling material and capacity of colons. Technical datum of column is very variable with flow liquid, and dedected material. In this work we found timing of vitamins and their area and performans of column with flow rate of HPLC. With this result consantrations can be determined.

**Key words:** Hypersil ODS, vitamin A and E, reversed phase, florecence dedektor.

**Özet:** Bu çalışmada Hypersil ODS kolonun ve floresans dedektörün Vitamin A ve E'nin tayini için kullanılması ve performanslarını ölçümü amaçlanmıştır. Vitamin A ve E'nin floresans dedektörle aynı ortamda farklı programla (vitamin A: Ex:340nm-Em:460, Vitamin E: Ex:298-Em:350) okunabildiği ve bu amaç için Hypersil ODS ters faz kolonunun kullanılabilceği açıklanmıştır. Kolon; içerdiği dolgu (5 µm, RCM 100 RP18, reversed Phase) maddesi açısından hassas ve yüksek ayırıcı özelliğe sahiptir. Vitaminler; özellikle yağda çözünenler, ekstraksiyon ve miktar tayini açısından zorluklar arz etmektedirler. Hayvancılık, gıda, ilaç ve kimya sektöründe 70'li yıllardan günümüze kadar kullanılan HPLC, kolon kapasitesi ve kolon dolgu maddesinden kaynaklanan özelliklerinden dolayı zorluklar gösteren bir sistemdir. Kolonların teknik verileri; uygulama esnasındaki kullanılan taşıyıcı sıvının ve tespit edilen maddenin özelliğine bağlı olarak değişim göstermektedir. Bu çalışmada akış hızı ile yapılan performans tayininde ve program çalışmasında Vitaminlerin kromatogramları vemyedana getirdikleri alanlar tespit edilmiştir. Bu sonuçlarla konsantrasyon tayini yapılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Hypersil ODS, Vitamin A ve E, revers faz, floresans dedektör.

\* İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu sekerterliğince desteklenmiştir Proje, No: 1447/0505200.

\*\* İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, 34320

## Giriş

Günümüz; hayvancılık, gıda, ilaç ve kimya sektöründe üretilen tüketim maddeleri içerisinde, kullanılan katkı maddeleri ve içerikleri bakımından belirtilen miktarlar açısından ayrıcalık ve değer kazandırmaktadır.

Bazı vitaminler, antioksidan olmaları nedeniyle, günümüz gelişen toplumlarında gıdalara ilave edilmek suretiyle en çok tüketilen maddelerdendir (2, 4, 6, 8). Vitaminlerin çok geniş kullanım alanı bulmasına rağmen çok az miktarlarda ( $\mu\text{g/l}$ ) kullanılmaları, ve bazı Vitaminlerin yağda erimeleri, ekstraksiyonda meydana getirdikleri zorluklar nedeniyle tespitlerini de önemli kılmaktadır.

Yağda çözünen vitaminlerden A ve E; gıdalarda, özellikle yağlı yiyeceklerde bulunmaktadır. Yağlı yiyeceklerin bozulmaları içerdikleri vitamin A ve E miktarıyla ters orantılı olarak değişmektedir (2, 7, 9, 10).

Yetmişli yıllardan sonra HPLC bu tür analizlerde kullanılan en önemli metot olmuştur. Kullanılan kolonlar performansları ile metoden önemini arttırmaktadır (4, 5, 8). Kolonların kalitesi içerdikleri dolgu maddesinden kaynaklanmaktadır. Çoğunlukla kolonlar USA'nın AISI normlarına uygun olarak çelikten imal edilmektedir. Bu normda kullanılan madde Krom-Nikel-Molibden-Çelik'dir, ve bileşenlerinin en önemli özelliği basınca ve korozyona dayanıklı olmasıdır.

ODS-Hypersil kolon, 5  $\mu\text{m}$  büyüklüğünde, RCM 100 RP18'le doldurulmuş; yuvarlak çelikten mamul maksimum akış hızı 1.5 ml/dakika olabilen ters faz sınıfına dahil bir kolondur.

Bu çalışmada Hypersil ODS ters faz kolon kullanılarak vitamin A ve E'nin tespitini floresans dedektör aracılığı ile kolaylaştırma hedeflenmiştir. Hiroshi ve ark. (7) floresans dedektör kullanarak vitamin E'nin bitkisel yağlarda tespitini yapmışlardır.

## Materyal ve Metot

Testlerde kullanılan sıvılar (Merck GmbH Germany) HPLC Grade olarak temin edilmiştir.

Vitamin A (retinol) ve E'nin ( $\alpha$ -tokoferol) tayini HPLC floresan dedektör (Jasco 820-FP), Lutegratör (HP-3394 A), latek-400 P model pompa, 100  $\mu\text{l}$  hacmindeki enjeksiyon ünitesi, ile Hypersil ODS (5 $\mu\text{m}$ -150x 4.6 mm, RCM 100 RP18 ile doldurulmuş (Supelco. Inc. Supelco Park. Bellefonte, PA16823-0048) ters faz kolon aracılığı ile yapıldı.

Vitamin A (2 ng/100 $\mu\text{l}$ -150 ng/100 $\mu\text{l}$ ) ve E (1 ng/100 $\mu\text{l}$ -100 ng/100 $\mu\text{l}$ ) (Fluka HPLC grade)'lerden miktar tayini yapmak için etanol içerisinde farklı oranlarda standartlar hazırlandı. Hazırlanan standartlar HPLC'de çalışmak için gerekli miktarlarda porsiyonlanarak derin dondurucuda (-40  $^{\circ}\text{C}$ ) muhafaza edildi (6, 7, 9).

HPLC'de taşıyıcı sıvı olarak metanol kullanılarak Vitamin A ve E'nin miktar tayini yapılmıştır (7, 1, 13).

Vitamin A ve E metanol içerisinde hazırlanarak ortak çalışma programı uygulanıp, ekstinksiyon ve emisyon için farklı dalga boyları uygulanarak okunmuşlardır (1, 5, 6, 8).

**Tablo 1.** Kromatografi koşulları (condition of chromatography).

Dedektör	Vitamin A	Vitamin E
Okuma	Ex: 340 nm–Em: 460	Ex: 298 nm–Em: 350
Attenuation (duyarlılık)	16	16
Gain (kazanım)	X10	X10
Response (cevap)	Slow (yavaş)	Slow (yavaş)
Dedektör programı	0.-7 dakika	7.-20 dakika

### Bulgular

Yapılan çalışmalar sonucunda kolonun kapasitesini ölçmek için farklı hızlarda aynı standart çözeltiden (ng/100 µl) uygulanarak elde edilen alanların hesabı yapılmış ve sonuçta hızın en ideal 0.6 ml/dakika olduğu bulunmuştur.

**Tablo 2.** İdeal akış hızı tespit tablosu (confirm table of ideal flow rate).

Akış Hızı	Elde edilen alan
1.5 ml/min	155 520
1.5 ml/min	154 500
1 ml/min	231 380
1 ml/min	221 487
0.8 ml/min	283 530
0.8 ml/min	260 450
0.6 ml/min	350 940
0.6 ml/min	363 754

Bu metotdaki amaç literatür bilgi veya teknik bilgi olarak verilen kolon akış hızının tespit edilen alana etkisi ve dolayısı ile konsantrasyona bağlı elde edilen alanlara etkisi tespit edilerek kolon akış hızı kondisyonunun önemi vurgulanmıştır. Ticari olarak elde edilen kolonun teknik olarak verilen bilgilerdeki maksimum hız kapasitesi 1.5 ml/dakika olmasına rağmen 1.5 ml/dakikadan başlayarak yapılan çalışmada hız

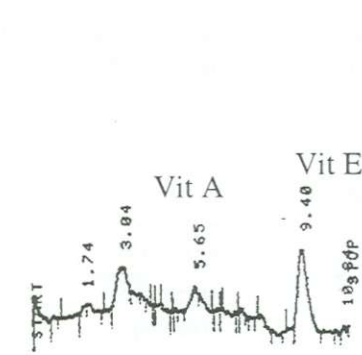
azaldıkça elde edilen alan miktarının arttığı dolayısı ile konsantrasyonun daha iyi tespit edildiği ve 0.6 ml/dakikada en yüksek alan kapasitesine ulaşıldığı, 0.6 ml/dakikanın altındaki hızlarda elde edilen piklerin performansının bozukluğu ve değerlerinin tekrar düştüğü tespit edilmiştir.

Yukarıdaki tablodan anlaşıldığı gibi kolon için en ideal akış hızı 0.6 ml/dakika olarak bulunmuştur.

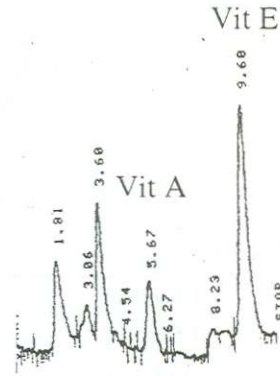
### Standart Linear Grafik

Bulunan vitamin değerlerinin hesaplanması için elde edilen alanın karşılaştırılmasında kullanmak için yapılan standart çözeltilerin şekilleri (1-5) ve elde edilen alanların değerleri aşağıda Tablo 3'dedir.

Şekil 1, 2, 3, 4 ve 5'de standartlara karşı elde edilen kromatografik alanlar ve bunlara karşılık gelen konsantrasyon değerleri verilmiştir.



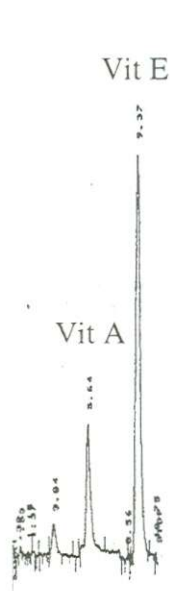
RUN # 22					
AREA%	RT	AREA TYPE	AR/HT	AREA	
	3.84	28031	PV	0.427	31.18
	5.65	8585	PV	0.274	13.24
	9.40	35692	BP	0.382	35.57
TOTAL AREA=		64228			



RUN # 23					
AREA%	RT	AREA TYPE	AR/HT	AREA	
	1.81	43896	PP	0.375	15.188
	3.06	12018	BV	0.298	4.407
	5.68	59368	VV	0.322	26.420
	5.67	35433	BP	0.361	12.189
	8.23	18637	PV	0.337	3.659
	9.68	128568	BV	0.421	44.223
TOTAL AREA=		298698			

Şekil 1. 1 nolu standart (standart number 1).

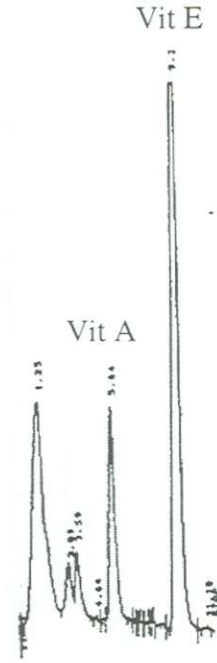
Şekil 2. 2 nolu standart (standart number 2).



RUN # 24

RT	AREA	TYPE	AR/HT	AREA%
0.38	1041	BV	0.187	0.308
0.53	2487	VV	0.189	0.735
1.15	1034	PV	0.101	0.306
3.04	15568	VP	0.328	4.689
5.64	77483	BB	0.399	22.918
9.37	239388	BV	0.398	78.814
10.75	1078	I BP	0.081	0.319

TOTAL AREA= 338218



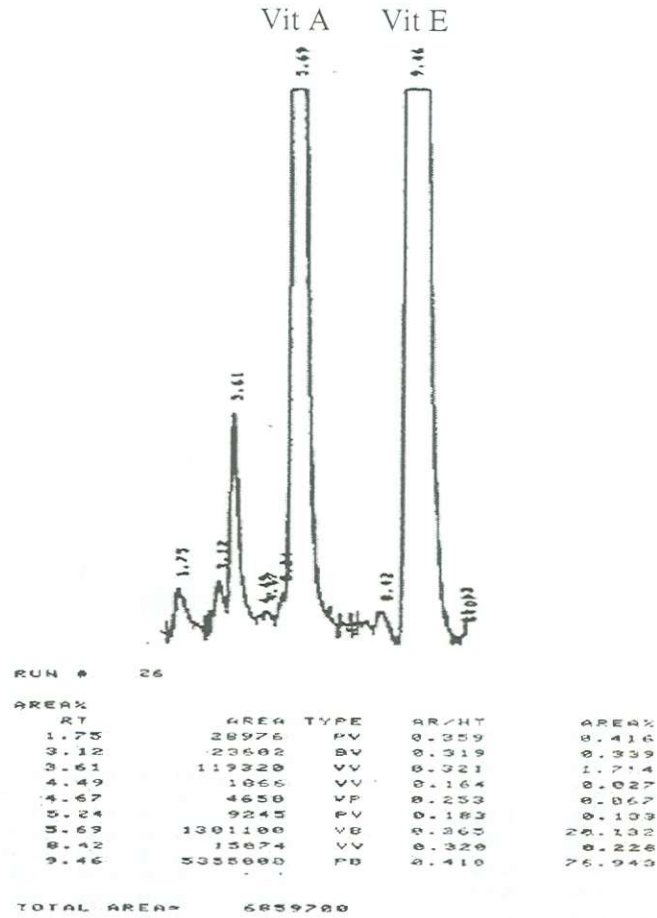
RUN # 25

RT	AREA	TYPE	AR/HT	AREA%
1.25	345868	VV	0.864	38.968
3.09	49847	VV	0.441	4.376
3.59	58515	VV	0.392	4.587
4.64	2222	VB	0.162	0.198
5.64	126138	BV	0.359	12.147
9.39	534328	PB	0.411	47.677
11.18	2615	PV	0.274	0.233

TOTAL AREA= 1828788

Şekil 3. 3 nolu standart (standart number 3).

Şekil 4. 4 nolu standart (standart number 4).



Şekil 5. 5 nolu standart (standart number 5).

**Tablo 3.** Standart linear grafik tablosu (table of standart linear graphic)

Standart	Vitamin	Alan	Vitamin E	Alan
Standart 1	0.2453 ng / 100 µl	8 505	0,928 ng / 100 µl	35 692
Standart 2	0.9812 ng / 100 µl	35 433	3.712 ng / 100 µl	128 560
Standart 3	1.9624 ng / 100 µl	77 453	7.424 ng / 100 µl	239 500
Standart 4	3.9248 ng / 100 µl	126 130	14.848 ng / 100 µl	534 320
Standart 5	39.248 ng / 100 µl	1 301 100	148.480 ng / 100 µl	5 355 000

Vitamin A için: 0.2-50 µg / 100 µL arası linear olup r: 0.9999 elde edilmiştir.

Vitamin E için: 0.9-150 µg / 100 µL arası linear olup r: 0.9966 elde edilmiştir

### T a r t ı Ő m a

Literatür bilgiler doğrultusunda metodik olarak yapılan bu çalışmada floresans dedektör aracılığı ile vitamin A ve E'nin HPLC ile tayini ve değerlerin istatistiki anlamları ortaya konmuştur. Yazarların çoğu vitamin E için UV dedektörü tercih etmişlerdir (3, 4, 8, 11).

Elde edilen minimum değerler yazarların kullandığı standart değerler uygun (5, 8, 10) olup Vitamin A ve E'de minimum değerler olarak Tablo 3'de verilen değerler bulunmuş ve linear grafikteki r değeri vitamin A için; 0.9999, vitamin E için; 0.9966 gibi istatistiki anlamı büyük olan değerler tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada ortak program uygulayıp her iki standart aynı ortamda vitamin A ve E ng/100 µl hacminde enjekte edilerek kromatografi koşulları test edilmiş ve her iki vitaminin aynı ortamda bulunmasının performans açısından herhangi bir zorluk ortaya getirmediği tespit edilmiştir.

Vitamin A için Ex: 340 nm- Em: 460 nm, vitamin E için Ex: 298 nm- Em:350 nm (1, 3, 5, 7, 9, 12). Ortak çalışma programı her iki vitaminin aynı ortamda tespit edilmesine olanak sağladığı için vitaminleri ayrı ayrı tespit ederken kaybedilecek zaman ve sarf malzemelerinden tasarruf imkanı sağlamıştır. Bu çalışma ile her iki vitaminin floresans özellikler gösterdiği ve floresans dedektörler aracılığı ile kolayca tespit edildiği bir kez daha vurgulanmıştır.

Kullanılan kolon özellikleri bakımından kolay temin edilebilen ve HPLC'de vitamin tayininde kapasitesi ve ayırıştırması bakımından mükemmel yakın özelliklere sahiptir. Gimeno ve ark. (6) da gıdalardaki vitamin E nin hızlı tespitinde floresans dedektör kullanarak miktar tayini yapmışlar ve değerlerimizin istatistiki önemi ve en düşük tespit edilen miktar birbiriyle uyumaktadır. Şekil 1, 2, 3, 4 ve 5'de elde edilen değerler ve linearitenin önemi Barbas ve ark. (1) ve Crissey ve ark. (3) elde ettikleri

değerler kıyaslandığında çalışma koşullarımızın mükemmel yakınlığını ortaya çıkarmaktadır. En düşük değer olarak tespit ettiğimiz vitamin A ve E değerleri Melchert ve ark.nın (8) miktar tayini ile de karşılaştırılabilir ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

### Kaynaklar

1. **Barbas, C., Mario, C., Bartolome, B., Marta, V., Emilio, H.:** Simultaneous determination of vitamins A and E in rat tissues by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1997; 778: 415-420.
2. **Brown, K., Reid, A., White, T., Henderson, T., Hukin, S., Johnstone, C., Glen, A.:** Vitamin E, lipids, and lipid peroxidation products in tardive dyskinesia. *Society of Biological Psychiatry*, 1998; 43: 863-867.
3. **Crissey, S. D., Patricia McGill., Ann-Marie, S.:** Influence of dietary vitamins A and E serum  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherols, retinol retinyl palmitate and carotenoid concentrations in Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 1998; 121: 333-339.
4. **Crissey, S. D., Randall, W.:** Serum  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherols and retinol, retinyl palmitate, and carotenoid concentrations in captive and free-ranging bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 1999; 124: 391-396.
5. **Furusawa, N.:** Rapid high-performance liquid chromatographic identification/quantification of total vitamin C in fruit drinks. *Food Control*, 2001; 12: 27-29.
6. **Gimeno, E., Catellote, A. I., Lamuela-Raventos, R. M., de la Torre, M. C., Lopez-Sabater, M. C.:** Rapid determination of vitamin E in vegetable oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2000; 881: 251-254.
7. **Hiroshi, I.:** Determination of tocopherol acetate in emulsified nutritional supplements by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 2000; 881: 243-249.
8. **Melchert, H. U., Pabel, E.:** Quantitative determination of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocopherols in human serum by high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry as trimethylsilyl derivatives with a two-step sample preparation. *Journal of Chromatography A*, 2000; 896: 209-215.
9. **Moreno, P., Salvado, V.:** Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2000; 870: 207-215.
10. **Rizzo, C., Dionisi-Vici, C., D'Ippoliti, M., Fina, F., Sabetta, G., Federic, G.:** A simple and rapid HPLC method for simultaneous determination of plasma 7-dehydrocholesterol and vitamin E: its application in Smith-Lemli-Opitz patients. *Clinica Chimica Acta*, 2000; 291: 97-102.
11. **Sirimanne, S. R., Patterson, D. G., Ma, L., Justice, J. B.:** Application of cloud-point extraction-reversed-phase high performance liquid chromatography: A preliminary study of extraction and quantification of vitamins A and E in human serum and whole blood. *Journal of Chromatography B*, 1998; 716: 129-137.



12. **Tavridou, A., Unwin, N. C., Laker, M. F., White, George, K., Alberti, M. M.:** Serum concentrations of vitamins A and E in impaired glucose tolerance. *Clinica Chimica Acta*, 1997; 266: 129-140.
13. **Vaananen, P. S., Ollilainen, V., Mattila, P., Klehikoinen, R., Salmela-Mölsa, E., Piironen, V.:** Simultaneous HPLC analysis of fat-soluble vitamins in selected animal products after small-scale extraction. *Food Chemistry*, 2000; 7: 535-543.