

ÇEŞİTLİ BİTKİ TÜRLERİNDE VİTAMİN B₁₂, FOLİK ASİT VE BİOTİN İÇERİĞİNİN İMMUNO-ENZİMATİK YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI *
The Investigation of Vitamin B₁₂, Folic Acid and Biotin Content of Different Plant Species by Enzyme Immuno Assay

Nilgün GÜLER¹, Bilal Cem LİMAN²

Özet : Bu çalışmada, çeşitli bitki türlerinde folik asit, biotin ve vitamin B₁₂, içeriğinin immuno enzimatik yöntemle belirlenmesi amaçlanmıştır. Ispanak, pırasa, marul, maydanoz, kekik, nane, sarımsak, ığde çiçeği, şalgam tohumu ve kuşburnu örnekleri, Kayseri merkezindeki yerel pazarlardan taze ve temiz olarak temin edildikten sonra 5 gr bitki örneği distile su ve 1ml alfa amilaz ilavesinden sonra inkubasyona tabi tutulmuş ve kaynatılmıştır. Carrez I ve Carrez II çözeltilerinin ilavesinden sonra santrifüj edilmiştir. Süzüntü sulandırılmış, bu çözeltilerden ve standart çözeltilerinden kuyucuklara konulmuştur. Sırasıyla enzim kongujat, substrat ve kromojen ilave edilerek bekletilmiş, reaksiyonu sonlandırma çözeltisi ilave edildikten sonra ELISA cihazında 450 nm de ölçüm yapılmış ve sonuçlar ppb olarak elde edilmiştir. Folik asit düzeyleri ppb olarak sırasıyla ispanakta 0.698, marulda 0.711, maydanozda 3.450, kuşburnunda 2.139, şalgam tohumunda 0.959, ığde çiçeğinde 10.303 bulunmuştur. Vitamin B₁₂ düzeyleri ppb olarak sırasıyla ispanakta 11.070, nanede 90.088, kekikte 168.330, sarımsakta 10.744, kuşburnunda 21.240, ığde çiçeğinde 44.127 bulunmuştur. Biotin düzeyleri ppb olarak sırasıyla ispanakta 249.436, pırasada 330.228, marulda 630.676, maydanozda 273.521, nanede 278.973, sarımsakta 942.248, kuşburnunda 589.469 bulunmuştur. Biotinin en fazla sarımsak ve marulda, B₁₂ vitamininin en fazla kekikte, folik asidin en fazla ığde çiçeğinde olduğu tespit edilmiştir.

Summary : The aim of this study is to determine vitamin B₁₂, folic acid, and biotin content of different plant species by enzyme- immuno assay. Spinach, leek, lettuce, parsley, thyme, mint, garlic, oleaster, turnip seed, rosehip samples were obtained from the regional markets of Kayseri and used fresh and clean in the study. 5-10 g of plant sample was added to distilled water and 1 ml of alpha amylase solution and then incubated and boiled. After the addition of Carrez I and Carrez II solutions sample solution was centrifuged. The supernatant was diluted, each standard solution or prepared sample was added to separate wells and then enzyme conjugate, substrate and chromogen solutions were respectively added to each well, incubated at room temperature. After the addition of stop solution. Absorbance was measured at 450 nm by ELISA instrument. Results obtained as ppb. The levels of folic acid as ppb were 0.698 in spinach, 0.771 in lettuce, 3.450 in parsley, 2.139 in rosehip, 0.959 in turnip seed, 10.303 in oleaster found. The levels of vitamin B₁₂ as ppb were 11.070 in spinach, 90.088 in mint, kekikte 168.330, 10.744 in garlic, 21.240 in rosehip, 44.127 in oleaster. The levels of biotin as ppb were 249.436 in spinach, 330.228 in leek, 630.676 in lettuce, 273.521 in parsley, 168.330 in thyme, 278.973 in mint, 942.248 in garlic, 589.469 in rosehip. The highest biotin content was found in garlic and lettuce. The highest vitamin B₁₂ content was found in thyme. Oleaster has the highest folic acid content.

Anahtar kelimeler: Biotin, bitki, ELISA, folik asit, vitamin B₁₂

Key words: Biotin, ELISA, folic acid, plant, vitamin B₁₂.

¹ Bilim Uz.Erciyes Ün.Sağlık Bil.Ens.Vet.Far-Tok. AD, Kayseri

² Prof.Dr.Erc. Ün.Vet Fak.Farmakoloji-Tok. AD, Kayseri

* Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından SBY.04.15 nolu proje ile desteklenmiştir.

Vitaminler, normal metabolik olayların sürdürülmesi için gerekli olan ama genelde vücutta sentezlenemeyen (vitamin D ve C hariç) ve bu nedenle dışardan alınması gereken organik bileşiklerdir. Noksanlıkları halinde; hayvanlarda birçok hastalık veya ölüme yol açabilmeleri yanında gelişme geriliği, verim düşüklüğü ve üremenin zayıf olması gibi ekonomik yönden önemli pek çok olaya, insanlarda; kalp, osteoporoz, kanser gibi pek çok hastalığa sebep olmaktadır (1).

Biotin, folik asit, B₁₂ suda çözünen B grubu vitaminlerdendir. Besinlerdeki biotin varlığı hakkındaki bilgiler nisbeten azdır. Biotinin çoğunluğu besinlerde proteine bağlı biositin şeklindedir. Yetişkinlerde günlük alınması gereken biotin miktarı 100-200 mg arasındadır (2,3). Folik Asit özellikle gebelikte çok gerekli bir vitamin grubu olup iki önemli formu vardır. Bunlardan birincisi folat formunda besinlerden diğeri de folik asit olarak vitamin sağlayıcılardan temin edilebilir. İnsanların günde en az 0.4 mg folik asit alması gerekir (2,4). Vitamin B₁₂'nin sentetik formu olan siyanokobalamin, besin takviyesinde ve doğal kaynaklarda yaygın bir şekilde bulunmaktadır. İnsanların günlük alması gereken B₁₂ vitamini 3-5 mikrogram olup besinlerle ve mide florasının eylemleriyle uygun bir biçimde karşılanmaktadır (1,5).

Vitaminlerin tayininde kromatografik, mikrobiyolojik, spektrofotometrik yöntemlerin yanısıra son yıllarda immuno-enzimatik, radyo enzimatik yöntemler sıkça kullanılmaya başlanmıştır. Enzimli analizlerin avantajları, dezavantajlarından fazladır. Enzim yardımıyla analiz yapmanın faydaları; hızlı ve kısa süreli, düşük maliyetli, seçici olması ve basit bir sistem gerektirmesidir (6,7). Dezavantajları ise analizlerin doğru yürümesinin pH ve ortam sıcaklığına bağlı olmasıdır (8).

Bu çalışmada, kuşburnu, iğde çiçeği, sarımsak, şalgam tohumu, ıspanak, nane, pırasa, marul, maydanoz, kekik bitkilerinin vitamin B₁₂, folik asit ve biotin içeriğinin immuno-enzimatik yöntemle belirlenmesi ve yöntemin bitkilerdeki vitamin içeriğinin

kantitatif tayininde uygulanması yönünde değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kayseri merkezindeki yerel pazarlardan temin edilen, marul, maydanoz, ıspanak, pırasa, sarımsak, kekik, nane, şalgam tohumu, iğde çiçeği, kuşburnu bitki örnekleri çalışma materyalini oluşturmuştur. Beş gram bitki içersinde 95 ml distile su bulunan erlene hassas tartımla alınmıştır. Aynı pazardan alınan tek bitki örneği parçalanıp homojen bir süspansiyon olana kadar çalkalayıcıda karıştırılmış, 3 dakika ultrasonik banyoda çözümleri sağlanmıştır. Çözelti 95 derecelik su banyosunda 5 dakika ısıtılıp, oda sıcaklığına soğutulduktan sonra filtre kağıdı ile süzülmüş, 100µl süzüntüye 400 µl örnek sulandırma çözeltisinden eklenerek sulandırılmıştır. Bu işlem 10 bitki türü için (ıspanak, pırasa, marul, maydanoz, kekik, nane, sarımsak, kuşburnu, iğde çiçeği ve şalgam tohumu) ayrı ayrı uygulanmıştır. 6 adet standart ve 10 adet hazırlanan bitki örneği, plaktaki 16 adet kuyucuğa yerleştirilmiş yerleri numaralandırarak kaydedilmiştir. Her bir kuyucuğa 50'şer µl standart ve örnek çözeltilerinden ayrı ayrı pipet uçlarıyla konulduktan sonra 50'şer µl enzim konjugattan eklenerek, oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Tüm sıvı kuyucuktan boşaltılıp, kuru peçeteye ters çevrilerek içindeki sıvı alınmış, çok kanallı kuyucuk yıkayıcı makina da distile su ile 3 kez yıkandıktan sonra her bir kuyucuğa 2'şer damla substrat ve kromojenden ilave edilmiş, oda sıcaklığında, karanlıkta 10 dakika bekletildikten sonra her bir kuyucuğa 2'şer damla stop çözeltisinden eklenmiştir. Plaka ELISA spektrofotometreye yerleştirilmiş ve 450 nm'de absorpsiyon ölçülmüştür. Ölçüm, standart eğrisini doğrusal elde edinceye kadar en az iki kez tekrar edilmiştir. Her bir vitamin grubunun örnek hazırlama ve analiz işlemi için, folik asit kiti (Ridascreen-Fast Folik Asit. Art No:R3202), vitamin B₁₂ kiti (Ridascreen-Fast Vitamin B12. Art No:R2102), biotin kiti (Ridascreen-Biotin. Art No:R2201) kullanılmıştır.

BULGULAR

Çalışmamızda kullanılan Folik asit standardı, Vitamin B₁₂ standardı ve Biotin standardının ayrı ayrı kuşburnu, ığde çiçeği, sarımsak, marul, kekik, ıspanak, şalgam tohumu, maydanoz, nane, pırasa örnekleriyle absorbens değerleri ve bu bitkilerin vitamin içerikleri Tablo I-VI'da verilmiştir.

Tablo II'de görüldüğü üzere, folik asit içeriğinin 10.303 ppb ile en fazla ığde çiçeğinde olduğu bu-

lunmuş, sarımsak, kekik, nane, pırasa bitkilerinde folik asit tespit edilememiştir.

Tablo IV'de görüldüğü üzere, kekiğin diğerlerine göre 168.330 ppb ile en fazla Vitamin B₁₂ içerdiği bulunmuştur. Şalgam tohumu, pırasa, marul, maydanoz bitkilerinde Vitamin B₁₂ tespit edilememiştir.

Tablo VI'da görüldüğü üzere, 942.248 ppb ile en fazla biotin içeriği sarımsakta bulunmuştur. Kekik, şalgam tohumu, ığde çiçeği bitkilerinde biotin tespit edilememiştir.

Tablo I. Folik asit standardı ve örnek çözeltilerinin absorbens değerleri

Kuyucuk	Absorbans/Çözelti	Absorbans/Bitki çöz.
A	2.554 /0 ppb standart	2.260/sarımsak
B	1.817/1 ppb standart	1.968/marul
C	1.262/2 ppb standart	2.161/kekik
D	0.506/5 ppb standart	1.974/ıspanak
E	0.207/10 ppb standart	1.840/şalgam tohumu
F	0.000/25 ppb standart	0.754/maydanoz
G	1.196/kuşburnu	0.190/nane
H	0.276/ığde çiçeği	0.073/pırasa

Tablo II. Bitkilerin Folik Asit içeriği

Bitki No	Bitki Adı	Ortalama Absorbans	Folik Asit Konsantrasyonu (ppb)
1	Kuşburnu	1.196	2.139
2	ığde çiçeği	0.276	10.303
3	Sarımsak	2.260	0.000
4	Marul	1.968	0.711
5	Kekik	2.161	0.000
6	ıspanak	1.974	0.698
7	Şalgam tohumu	1.840	0.959
8	Maydanoz	0.754	3.450
9	Nane	0.190	0.000
10	Pırasa	0.073	0.000

Tablo III. Vitamin B₁₂ standardı ve örnek çözeltilerinin absorbens değerleri

Kuyucuk	Absorbans/Çözelti	Absorbans/Bitki çöz.
A	2.571 /0 ppb standart	2.854/ pırasa
B	2.528/5 ppb standart	2.476/ ıspanak
C	2.146/15 ppb standart	2.674/ marul
D	1.577/45 ppb standart	2.596/ maydanoz
E	1.103/135 ppb standart	2.154/ ığde çiçeği
F	0.000/405 ppb standart	2.479/ sarımsak
G	2.377/ şalgam tohumu	1.459/ kekik
H	0.000/ kuşburnu	1.803/ nane

Tablo IV. Bitkilerin vitamin B₁₂ içeriği.

Bitki No	Bitki Adı	Ortalama Absorbans	Folik Asit Konsantrasyonu (ppb)
1	Şalgam tohumu	2.563	0.000
2	Kuşburnu	2.377	21.240
3	Pırasa	2.854	0.000
4	İspanak	2.476	11.070
5	Marul	2.674	0.000
6	Maydanoz	2.596	0.000
7	İğde çiçeği	2.154	44.127
8	Sarımsak	2.479	10.744
9	Kekik	1.459	168.330
10	Nane	1.803	90.088

Tablo V. Biotin standardı ve örnek çözeltilerinin absorbens değerleri

Kuyucuk	Absorbans/Çözelti	Absorbans/Bitki çöz.
A	0.000 / 0 ppb standart	0.771/ marul
B	2.745/12 ppb standart	1.037/ maydanoz
C	2.340/37 ppb standart	1.081/ ıspanak
D	1.610/111 ppb standart	0.357/ pırasa
E	0.936/333 ppb standart	0.785/ kuşburnu
F	0.709/1000 ppb standart	0.707/ sarımsak
G	0.512/ ığde çiçeği	0.437/ kekik
H	0.557/ şalgam tohumu	1.028/ nane

Tablo VI. Bitkilerin biotin içeriği

Bitki No	Bitki Adı	Ortalama Absorbans	Folik Asit Konsantrasyonu (ppb)
1	ığde çiçeği	0.512	0.000
2	Şalgam tohumu	0.557	0.000
3	Marul	0.771	630.676
4	Maydanoz	1.037	273.521
5	ıspanak	1.081	249.436
6	Pırasa	0.957	330.228
7	Kuşburnu	0.785	589.469
8	Sarımsak	0.707	942.248
9	Kekik	0.437	0.000
10	Nane	1.028	278.973

TARTIŞMA

Antijen-antikor etkileşimine dayanan birçok yöntem bulunmaktadır. RIA, FIA, EIA bunlar arasında yer almaktadır. Bu yöntemler kendi arasında kullanılan katalizörler, spesifiklik, hassasiyet, hız, kullanılan alet, maliyet yönünden farklılıklar göstermektedirler. En iyi hassasiyet, spesifiklik, en ucuz olması ve birkaç saat gibi kısa zamanda, az aletle sonuç vermesi açısından immuno-enzimatik yöntem tercih edilmektedir (9). RIA'da katalizör olarak kullanılan radyoaktif izotopların hızlı bir şekilde bozunması söz konusudur. FIA'da katalizör olarak kullanılan floresansın temini ve standardizasyonu zordur. Halbuki EIA yani immuno-enzimatik yöntemde katalizör olarak kullanılan enzimlerin dezavantajları yoktur. Aksine yüksek afinite ve hassasiyete sahip, dengeli bir şekilde bağlanma ve mekanizma gösteren etkin katalizörlerdir (9).

Bu çalışmada en yüksek folik asit içeriği, kuru iğde çiçeğinde (10.303 ppb) bulunmuş, bunu sırasıyla taze maydanoz (3.450 ppb) ve kuşburnu (2.139 ppb) izlemiştir. Kekik, nane ve sarımsakta ise folik asit tespit edilememiştir. En yüksek biotin içeriği sarımsakta 942.248 ppb saptanırken kekik, şalgam tohumu ve iğde çiçeğinde biotin tespit edilememiştir. Vitamin B₁₂ içeriği kekikte (168.330 ppb) en yüksek, nane (90.088 ppb) ve iğde (44.127 ppb) çiçeğinde orta değerlerde bulunmuştur. Pırasa, marul, maydanoz ve şalgam tohumunda vitamin B₁₂ tespit edilememiştir.

Agte ve arkadaşları (10), altmış yedi farklı yeşil yapraklı sebzenin folik asit içeriklerini incelemiş ve 100 g ıspanakta 42 mikrogram folik asit, 100 g nanede 15 mikrogram folik asit, 100 g marulda 4 mikrogram folik asit olduğunu bildirmişlerdir (10). Bu çalışmada incelenen nane örneklerinde folik asit tespit edilemezken, marulda 14,22 ppb folik asit, ıspanakta 13,96 ppb folik asit tespit edilmiştir.

HPLC yöntemi ile 87 adet besin grubunun incelendiği bir çalışmada (11) 1g dondurulmuş ıspanakta 7.05 ng biotin tespit edildiği belirtilmiştir. Sunulan çalışmada ise ELISA yöntemiyle 10 g taze ıspanakta 249.436 ppb biotin saptanmıştır.

Jagestand ve arkadaşları (12) fermente ettikleri bazı bitki karışımlarındaki vitamin B₁₂ içeriğini radyo protein bağlama yöntemi (RPBA) ile bitkilerdeki folat içeriğinin ise HPLC yöntemiyle analiz etmişlerdir. Ancak sunulan çalışmada kullanılan bitki türlerini incelememişlerdir.

Immuno-enzimatik yöntemle yaptığımız analiz sonuçlarından ıspanak, marul, nane bitkilerine ait sonuçlar diğer yöntemlerle kıyaslanmıştır. Fakat diğer bitkilere ait aynı ya da farklı yöntemlerle analiz bulguları bulunamamıştır. Aynı bitki türü için farklı yöntemlerle yapılan analiz sonuçları arasında kısmi farklılıklar olmuştur. Buda yöntemlerin duyarlılık, hassasiyet sınırları ya da tespit limitlerinin farklı olmasından kaynaklanmıştır. ELISA kitlerinde vitamin B₁₂ için saptama limiti 25 ppb, folik asit için 100 ppb, biotin için 1.2 ppb olarak verilmiştir. Buna göre sunulan çalışmada bu değerlerin altındaki miktarlar tespit edilememiştir.

Sonuç olarak, immuno-enzimatik yöntem olan ELISA ile on bitki türü için yaptığımız analiz sonuçlarına göre, folik asit 10.303 ppb ile en fazla iğde çiçeğinde, biotin 942.248 ppb ile en fazla sarımsakta, vitamin B₁₂ 168.330 ppb ile en fazla kekikte bulunmuştur.

KAYNAKLAR

1. Mengi A. *Biyokimya. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayinevi. İstanbul.1998, ss 186-204.*
2. Fennema OR. *Food Chemistry.Third Edition.Dekker M(inc), New York. Basel. Hong Kong.1996, 590-606.*
3. McCormick DB, Roth JA. *Colorimetric Determination of biotin and analogs. Methods in Enzymol 1970, 18: 383-385.*
4. Gregory JF. *Chemical and Nutritional Aspects of Folate Research; Analytical Procedures, Methods of Folate Synthesis, Stability, and Bioavailability of Dietary Foliates. Adv. Food Nutr. Res.1989, 33: 1-101.*

5. Minot GR, Murphy WP. *Treatment of pernicious anemia by a special diet. JAMA* 1926, 87: 470.
6. Pomeranz Y, Meloan CE. *Food Analysis. Third Edition. ITP An International Thomson Publishing Company. New York, Albany, Bonn, Boston, Cincinnati, Detroit, London, Madrid.1984, pp 496-502.*
7. Ball GFM. *Bioavailability and Analysis of Vitamins in Foods.1st ed. London*
8. Connell PO, Guilbault GG. *Enzymes and Food Analysis. In: Handbook of Food Enzymology. Whitaker JR(ed), NewYork, NY, USA. Dekker M(inc), 2002, pp 367-373.*
9. Pomeranz Y, Meloan CE. *Food Analysis. Third Edition. ITP An International Thomson Publishing Company. New York, Albany, Bonn, Boston, Cincinnati, Detroit, London, Madrid.1984, pp 496-502*
10. Agte VV, Tarwadi KV, Mengale S et al. *Potential of traditionally cooked green leafy vegetables as natural sources for supplementation of eight micronutrients in vegetarian diets.J. Food composition and analysis. 2000, 13: 885-891.*
11. Staggs CG, Sealey WM, McCabe BJ et al. *Determination of the biotin content of select foods using accurate and sensitive HPLC/ avidin binding. J.Food composition and analysis. 2004, 17: 767-776.*
12. Jagerstand M, Jastrebova J, Svensson U et al. *Folates in fermented vegetables- a pilot study. Lebensm.-Wiss. U. Technol. 2004, 37: 603-611.*