T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KONYA ÇEVRESİNDE KULLANILAN YEM VE BİLEŞENLERİNDEKİ SUDA VE YAĞDA ERİYEN VİTAMİNLERİN EŞ ZAMANLI TAYİN METODUNUN GELİŞTİRİLMESİ

Necla İREŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
Konya, 2009

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KONYA ÇEVRESİNDE KULLANILAN YEM VE BİLEŞENLERİNDEKİ SUDA VE YAĞDA ERİYEN VİTAMİNLERİN EŞ ZAMANLI TAYİN METODUNUN GELİŞTİRİLMESİ

Necla İREŞ

Selçuk Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Yrd. Doç.Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI

2009, Sayfa: 64

Jüri: Yrd. Doç.Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI

Prof.Dr.Hüseyin KARA

Yrd.Doç.Dr.Gülşin ARSLAN

Bu çalışma yem ve yem katkı maddelerinde suda ve yağda eriyen vitaminlerin eş zamanlı tayini için yeni bir yöntem geliştirmek amacıyla yapıldı. Bu çalışmada suda eriyen vitaminlerden; vitamin C, B_6, B_2, B_{12}, nikotinik asit ve folik asit, yağda eriyen vitaminlerden de vitamin A, D_3, K_3 ve vitamin E üzerinde çalışmalar yapıldı. Suda ve yağda çözünen vitaminlerin tayini için Phenomenex gemini C18 110A (150x4.60mm, 3 µm) kolonu kullanılırken, hareketli faz olarak % 0.01 trifluoroasetik asit pH 3.9 (hareketli faz A) ve metanol (hareketli faz B) tercih edildi. Çalışmalarda gradient elüsyon kullanılırken akış hızı=0.7 mL/dk olarak kullanıldı. Her bir vitamin için uygun dalga boyu tespit edilip analizler bu dalga boylarında ve Diode array dedektör kullanılarak yapıldı. Yem ve yem katkı numunelerine uygulanan yöntemde eş zamanlı vitamin tayini için belirlenen optimum koşullarda tayin edilebilecek minimum vitamin konsantrasyonları belirlendi. Bu vitaminler için yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçların geri kazanımlarının %88.5 ile %100.3 arasında bulunması geliştirilen kromatografik yöntemin duyarlı, güvenilir olduğunu gösterirken, ayrıca rutin analizde kullanılabilirliğinin fazla olması açısından da tercih edilebilecek bir yöntem olduğuna karar verildi.

Anahtar Kelimeler: Yem, yem katkı, vitamin, vitamin C, A vitamini, vitamin D_3, vitamin E, vitamin K_3, riboflavin (B_2), pyridoksin (B_6), cyanokobalamin (B_{12}), nikotinik asit, folik asit, HPLC-DAD

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

DEVELOPMENT OF METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF WATER AND FAT SOLUBLE VITAMINS IN FEEDS AND THEIR COMPONENTS USED IN KONYA AREA

Necla İREŞ

Selcuk University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Chemistry

Supervisor : Assist. Prof. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI
2009, Pages: 64

Jury : Assist. Prof. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI
Prof .Dr. Hüseyin KARA
Assist. Prof. Dr.Gülşin ARSLAN

This study was designed in order to develop a new metod for simultaneous determination of water and fat soluble vitamins in feeds and feed additives. In this study we tried to determine vitamin C, B_2, B_6, B_{12}, nikotinik asit, folik asit from water soluble vitamins and vitamin A, D_3, K_3, E from fat soluble vitamins. Water and fat soluble vitamins were seperated on a Phenomenex Gemini C18 110A (150x4.60mm, 3 µm) column in a single run using combined isocratik and gradient elution with a mobile phase consisting of % 0.01 trifluoroacetik acid of pH 3.9 (mobile phase A) and methanol (mobile phase B) at the flow rate 0.7 mL/min. The most suitable detection wavelength is found for water and fat soluble vitamins. Diode array dedektör is used in this study. For simultaneous determination of water and fat soluble vitamins optimum circumstances were defined. Under optimum circumstances, the minimum detectable vitamin concentrations were choosed. Although results are very close to each other, this new developed chromatographic method is preferable because it is quick, requires less reactive and solvent, more sensitive, reliable and more usable in routine analysis.

Key Words: Feed, feed additive, vitamin, vitamin C, vitamin A, vitamin D_3, vitamin E, vitamin K_3, riboflavin (B_2), pyridoksin (B_6), cyanocobalamin (B_{12}), nicotinic acid, folic acid, HPLC-DAD

TEŞEKKÜR

Araştırmamın düzenlenmesi, gerçekleştirilmesi ve değerlendirilmesi sırasında bana yol gösteren ve destekleyen, çalışmamın her devresinde bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI'na ve çalışmalarım süresince ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Sayın hocam Prof. Dr. Hüseyin KARA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmamın tez yazma aşamalarında bana yardımcı olan hocalarım Arş. Gör. Orhan GEZİCİ ve Arş. Gör. Filiz AYYILDIZ'a ve mesai arkadaşımlarım Mücahit KALKAN, Tuba AYBEK ve Halil YILMAZ'a

Araştırmamın laboratuar çalışmalarında anlayışları ve yardımlarını esirgemeyen kurum Müdürümüz Dr. M. Kürşat IŞIK, Müdür Yardımcılarımız Mevlüt ÇAKMAK ve Süleyman ERASLAN'a, Katkı Laboratuvarı Şefi Ersel YEŞİL ve personelleri Süleyman TEKELİOĞLU ve Mustafa AĞAÇDELEN'e

Desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen sevgili eşim Nazım İREŞ ve canım kızım Zeynep Naz İREŞ'e

Araştırma projeme destek ve katkılarından dolayı; Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkürü bir borç bilirim.

Necla İREŞ

Kimyager

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
İÇİNDEKİLER iv
ÇİZELGE LİSTESİ vii
ŞEKİL LİSTESİ viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Tarım Bakanlığına Göre Yem ve Yem Katkı Maddelerinin Tanımı 3
2.1.1. Yemlerde kalite ve güvenlik 3
2.2. Vitaminler 7
2.2.1. Riboflavin (vitamin B_2) 7
2.2.2. Piridoksin (vitamin B_6) 8
2.2.3. Kobalamin (vitamin B_{12}) 9
2.2.4. Nikotinamid (niyasin) 10
2.2.5. Folik asit (folasin) 11
2.2.6. Vitamin C (askorbik asit) 12
2.2.7. A vitamini (retinol asetat) 12
2.2.8. D_3 vitamini (cholecalciferol) 13
2.2.9. E vitamini (α-tokoferol asetat) 14
2.2.10. K_3 vitamini (menadione) 15
2.3. Vitaminlerin Sınıflandırılması 15
2.3.1. Yağda eriyen vitaminler 15
2.3.2. Suda eriyen vitaminler 15
2.4. Vitamin Analizi Tayin Yöntemleri 16
2.4.1. Kromatografik yöntemler 16
2.4.1.1. Yüksek basıçlı sıvı kromatografisi (HPLC) 17
2.4.2. Spektrofotometrik yöntemler 21
2.4.2.1. Ultraviyole/görünür bölge moleküler absorbsiyon Spektrometri 22
2.4.2.2. Florimetri 22
3. KAYNAK ARAŞTIRMASI 25

4. MATERYAL VE METOT 29
4.1. Kullanılan Cihazlar 29
4.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler 30
4.2.1. Kullanılan vitamin standartları 30
4.2.2. Kullanılan çözücüler 30
4.2.3. Kullanılan yem katkı numuneleri 31
4.2.4. Çözeltilerin hazırlanması 31
4.2.4.1. Standart çözeltiler 31
4.2.4.2. Diğer çözeltiler 32
4.3. Deneysel İşlem 32
4.3.1. Vitaminlerin kromatografik özelliklerinin incelenmesi 32
4.3.2. Vitamin analizi için uygun şartların belirlenmesi 33
4.3.2.1. Ekstraksiyon çözeltisinin oranının belirlenmesi 33
4.3.2.2. Karıştırma süresi belirlenmesi 33
4.3.3. Uygun kromatografik şartların belirlenmesi 33
4.3.3.1. Uygun dalga boyunun seçimi 33
4.3.3.2. Uygun kolonun seçimi 34
4.3.3.3. Gradient elüsyonun belirlenmesi 34
4.3.4. Kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi 34
4.3.5. Yem ve yem katkı maddelerinde eşzamanlı vitamin tayini 35
5.DENEY SONUÇLARI 36
5.1. Vitaminlerin kromatografik özelliklerinin değerlendirilmesi 36
5.2. Vitamin analizi için uygun şartların değerlendirilmesi 38
5.2.1. Ekstraksiyon çözeltisinin oranının değerlendirilmesi 38
5.2.2. Karıştırma süresinin değerlendirilmesi 41
5.2.3. Uygun kromatografik şartların değerlendirilmesi 42
5.2.3.1. Uygun dalga boyunun değerlendirilmesi 42
5.2.3.2. Uygun kolonun değerlendirilmesi 45
5.2.3.3. Gradient elüsyon çalışmalarının değerlendirilmesi 46
5.2.4. Tespit limiti çalışmalarının değerlendirilmesi 48
5.2.5. Kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi 52
5.2.6. Yem ve yem katkı maddelerinde eş zamanlı vitamin tayini 58
5.2.7. Geri dönüşüm çalışmalarının değerlendirilmesi 58
6. TARTIŞMA 60

7. SONUÇ VE ÖNERİLER 61
8. KAYNAKLAR 62
9. ÖZGEÇMİŞ 64

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1. Tescile tabi karma yem normları 6
Çizelge 2.2. Vitaminlerin sınıflandırılması 16
Çizelge 2.3. HPLC'nin uygulama alanları 17
Çizelge 2.4. Dedektörlerin kullanım yüzdeleri 21
Çizelge 2.5. Florimetrinin bazı uygulama alanları 23
Çizelge 4.1. Vitaminler ve temin edildikleri firmalar 30
Çizelge 4.2. Kullanılan kimyasal çözücüler, saflık dereceleri ve firmalar 31
Çizelge 4.3. Analizi yapılan yem katkı numuneleri ve içerikleri 31
Çizelge 4.4. Vitaminler ve kalibrasyon aralıkları 35
Çizelge 5.1. Vitamin standartlarının çıkış zamanları ve dalga boyları 37
Çizelge 5.2. Ekstraksiyon çözeltisi oranının karşılaştırılması 39
Çizelge 5.3. Değişen vortex sürelerinde okunan vitaminler ve pik alanları 41
Çizelge 5.4. Çeşitli dalga boylarında vitaminlerin alan değerleri (vitamin konsantrasyonları: 10 mg/L) 42
Çizelge 5.5. Vitamin analizlerinde kullanılan dalga boyları 45
Çizelge 5.6. Gradient elüsyon çalışması 46
Çizelge 5.7. Gradient elüsyon 47
Çizelge 5.8. Yem katkılarında eklenen ve bulunan vitamin konsantrasyonları 59
Çizelge 5.9. Yağda ve suda çözünen vitaminlerin validasyon verileri 59

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. HPLC sistemi 19
Şekil 5.1. Vitaminlerin spektrumları 36
Şekil 5.2. Vitaminlerin karışım kromatogramı 38
Şekil 5.3. Ekstraksiyon çözücüsü olarak %80 MeOH-%20 TFA kullanımı ile elde edilen numune kromatogramı 40
Şekil 5.4. Numune %70 TFA-%30 MeOH ile ekstrakte edildikten sonra kalıntının %10 TFA -% 90 MeOH ile ekstrakte edildiği numune kromatogramı 40
Şekil 5.5. B_{12} vitamininin çeşitli vortex sürelerindeki kromatogramı 41
Şekil 5.6. D_3 vitamininin çeşitli dalga boylarında pik alan değerleri 42
Şekil 5.7. A vitamininin çeşitli dalga boylarında pik alan değerleri 43
Şekil 5.8. E vitamininin çeşitli dalga boylarında pik alan değerleri 43
Şekil 5.9. B_{12} vitamininin çeşitli dalga boylarında pik alan değerleri 43
Şekil 5.10. K_3 vitamininin çeşitli dalga boylarındaki kromatogramı 44
Şekil 5.11. D_3 vitamininin çeşitli dalga boylarındaki kromatogramı 44
Şekil 5.12. A vitamininin iki farklı kolondaki pikleri 45
Şekil 5.13. Çizelge 5.6.'da ki gradient elüsyonun kromatogramı 46
Şekil 5.14. Dakikaya karşı hareketli faz B'nin akış grafiği 47
Şekil 5.15. Vitamin K_3 kalibrasyon eğrisi 53
Şekil 5.16. Vitamin A kalibrasyon eğrisi 53
Şekil 5.17. Vitamin E kalibrasyon eğrisi 54
Şekil 5.18. Vitamin D_3 kalibrasyon eğrisi 54
Şekil 5.19. Vitamin C kalibrasyon eğrisi 55
Şekil 5.20. Nikotinik asit kalibrasyon eğrisi 55
Şekil 5.21. Vitamin B_6 kalibrasyon eğrisi 56
Şekil 5.22. Vitamin B_{12} kalibrasyon eğrisi 56
Şekil 5.23. Vitamin B_2 kalibrasyon eğrisi 57
Şekil 5.24. Folik asit kalibrasyon eğrisi 57

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Vitaminler, canlı organizmalarda yaşamsal etkinliklerin (büyüme, üreme, performans, bağışıklık gibi) normal ölçülerde şekillenebilmesi ve sağlıklı durumun sürdürülebilmesi için gerekli olan organik maddelerdir. İnsan dahil, bütün hayvan türleri biyolojik yönden etkin olan bu maddelerin hepsinin yeterli ölçülerde organizmalarında sentezleyemezler. Bu nedenle de, vitaminlerin çok düşük miktarlar halinde besinler içerisinde alınması veya doğal değerlerine yakın ölçülerde günlük yem karışımlarına katılması gerekir. Günümüzde yüksek verimliliğin sağlanabilmesi amacıyla; kalıtsal yönden daha üstün tür ve ırkların yetiştirilmesi, daha iyi bakım ve hijyen koşullarının sağlanması, parazitler ve salgın hastalıklara karşı koruyucu hekimlik hizmetlerinin yaygınlaştırılması ve evcil hayvanlarda bireysel verimliliğin arttırılmasına yönelik, büyümeyi hızlandırıcı, süt ve yumurta verimini çoğaltıcı her çeşit yaşamsal etkinlikleri en uygun koşullarda düzenleyici çeşitli kimyasal maddelerin geliştirilmesi, bolca üretilmesi ve hayvancılık sektörlerinde yaygın bir biçimde kullanılması seçeneklerine başvurulmaktadır.

Yüksek verimliliğin sağlanmasında hiç kuşkusuz özel ve seçkin vitaminlerin kullanılması, bunların yüksek kaliteli ve ekonomik yem karışımlarıyla uygun kombinasyonlar halinde bir araya getirilmelerinin payı büyüktür. Günlük hayvan ihtiyacını karşılayan birkaç miligram ve hatta mikrogram miktarındaki vitaminlerin varlığı günlük besinlerin optimum düzeyde değerlendirilmesine ve düzenlenmesine olanak sağlar. Yeterli ölçülerde vitamin desteğinin sağlanması halinde, büyüme düzensizliklerini, gelişme hatalarını, verim azlığını ve hastalık olasılıklarını en az düzeye indirirler. Diğer bir anlatımla, modern yetiştiriciliğin başlıca garanti seçeneğini oluştururlar. Üstelik belirtilen amaçlar için öngörülen vitamin masrafı aynı gelir çeşidi ve tedavi seçeneklerinin gerektirdiği diğer girdilerden çok daha ucuza gelir. Kaldı ki, bu tür vitaminler katkı maddesi olarak kullanıldıkları sürece, her çeşit hayvansal verim optimum düzeyde artacağından belirtilen masraf giderleri hemen hiç ölçüsünde kalır.

Bu nedenlerden dolayı yem ve yem katkı maddelerinde vitaminlerin rutin kantitatif analizi çok önemlidir. Günümüzde çeşitli kontrol laboratuarlarında vitamin analizleri yapılmakta fakat suda ve yağda eriyen vitaminlerin analizi için ayrı yöntemler uygulanmaktadır. Gerek ön ekstraksiyon aşaması gerekse kromatografik tayini için farklı yöntemler uygulandığından fazla zaman almakta ve fazla çözücü tüketimi olmaktadır. Bu

proje hem yağda hem suda eriyen vitaminler için eşzamanlı tayin metodu geliştirilmeye çalışılması ve yemler ve bileşenlerinde uygulanabilirliğinin araştırılmasını amaçlamaktadır.

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), geniş bir uygulama alanına sahip olduğu için sıvı kromatografi ayırma teknikleri içerisinde en çok kullanılanıdır. Kalitatif ve kantitatif analizlere yüksek verimlilikle cevap verir ve hızlı analiz olanağı sunar. Özellikle katkı maddeleri analizlerinde, koruyucu maddeler, renklendiriciler, tatlandırıcılar ve vitaminler gibi maddelerde çok düşük tayin sınırlarında çok iyi sonuçlar alınabilmektedir. Bitki ekstraktlarında okratoksin analizleri yapılabilmekte ve her gıda maddesinde aflatoksin analizi çok düşük konsantrasyonlarda tayin edilebilmektedir. Ayrıca HPLC, çok fazla bir ön ayırma işlemi gerektirmemesi, birçok madde için hem ayırma hem de tayin yapabilmesi, amaca göre değişik dedektör kullanılabilmesi avantajları ile tercih edilen bir yöntemdir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Tarım Bakanlığına Göre Yem ve Yem Katkı Maddeleri

07.07.1973/14557 tarihinde resmi gazetede yayımlanan 1734 sayılı yem kanununa göre yem, madde ve enerji bakımından hayvanın yaşama ve verim ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla ve belli sınır ve şartlarda tüketildiği zaman hayvan sağlığına zararlı olmayan organik ve inorganik maddeler veya bunların karışımlarıdır.

Bu kanunun amacı; hayvanların rasyonel bir şekilde beslenmelerini sağlamak ve hayvansal üretimi geliştirmek üzere ticarete arz edilecek yemlerin hazırlanması, imali, ithali, ihracı ve sürüm ve satışını belli esaslara bağlamaktır. Ticarete arz edilecek yemlerin hazırlanması, imali, ithali, sürümü ve satışları ile yemlerin özelliklerine göre sahip olacakları nitelikler ve ihtiva etmeleri gereken temel besin maddeleri cins ve miktarlarının tespiti, bu yemlerin beyana ve tescile tabi tutulmaları ve benzeri hususlar bu kanun hükümlerine tabidir.

1734 sayılı kanunun uygulama şeklini göstermek ve kanunun çeşitli maddeleriyle yönetmeliğe bırakılan hususlarını açıklamak üzere yem yönetmeliği düzenlenmiştir.

2.1.1. Yemlerde kalite ve güvenlik

Hayvanlardan yeterli verimin alınabilmesi için kaliteli yemlerle besin maddesi ihtiyaçlarının karşılanması gerekir. Hayvansal üretimde en çok kullanılan girdi yemdir. Bir hayvancılık işletmesinde işletme maliyetinin %70-80'ini yem giderleri oluşturur. Ekonomik bir hayvancılığın yapılabilmesi için kaliteli ve güvenli yemlerin kullanılması zorunludur.

Hayvan beslemede kullanılan yemlerin hem hayvan sağlığına zarar vermemesi hem de hayvansal ürünleri tüketen insanların sağlığına zarar veren maddeler olan mikotoksinler, ağır metaller, antibiyotikler ve pestisitleri taşımaması gereklidir.

Herhangi bir yem maddesinin ya da karma yemin yem olarak değeri belirlenirken çeşitli metotlar uygulanır. Bu metotlar şu şekilde sıralanabilir (Bülbül, H., T.K.B. Yayını, 2007).

•**Duyusal ya da fiziksel muayeneler:** Bu tür muayeneler yemlerin nemlilik durumu, görünüşleri, kokuları, renkleri, yabancı maddelerin varlığı, karma yemlerin yapısı ve bir örnekliliği, yemlerde kızışma ve ya küflenme gibi bozulmaların olup olmadığı hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlar.

•**Kimyasal analizler:** Bir hayvancılık işletmesinde kullanılacak karma yemlerin ya da yem hammaddelerinin seçimi, işletmede üretilen kaba ve diğer tane yemlerin besin madde içeriklerinin belirlenmesi, satın alınması için karar verilen ve işletmeye gelen bir hammadde veya karma yemin kabul edilmesi, yem üretim ya da işleme tekniklerinin uygunluğu, yemlerin içerdikleri besin madde miktarlarının ve dayanıklılıklarının tespiti, resmi kurumlar ya da işletmeler tarafından yapılan rutin kontroller, alıcıların şikayetlerinin incelenmesi gibi birçok nedenlerle yemlerde bazı analizlerin yapılması için başvurulabilmektedir.

•**Mikrobiyolojik analizler:** Yemlerin mikrobiyolojik yönden incelenmesinde üç amaç güdülmektedir.

- ✓ Yem hijyeni açısından bakteriyel ve ya küflerle bulaşık olup olmadığının incelenmesidir.
- ✓ Yemlerin özellikle protein yönünden değerliliğinin tespit edilmesidir. Bu amaçla yemden elde edilen ekstraktlar sıvı ya da katı besi yerine ekim yapılarak mikroorganizmaların çoğalmaları karşılaştırılır.
- ✓ Yemlerde antibakteriyel yem katkı maddelerinin belirlenmesi amacıyla da mikrobiyolojik ölçümler yapılabilmektedir. Bu durumda üremenin azalması antibakteriyel katkı maddelerinin varlığını göstermektedir.

•**Mikroskobik muayeneler:** Öğütülmüş karma yemlerde karma yemin kimyasal kompozisyonu yanı sıra hangi hammaddelerden oluştuğu da önem taşımaktadır. Bu durumda mikroskobik inceleme yapmak gerekmektedir. Aynı zamanda son yıllarda karma yemlere katılması yasaklanan hayvansal ürünlerin bir karma yem içerisindeki varlığını araştırırken de en pratik yöntem mikroskobik incelemedir.

•**Near infrared analizleri:** Kaliteli yem üretiminde karma yeme girecek hammaddelerin ve üretilen karma yemin mümkün olduğunca sık analizlerinin yapılması

kaliteli yem üretimi için mutlaka gereklidir. Yemlerde rutin olarak nem, ham kül, ham protein, ham yağ, ham selüloz, kalsiyum ve fosfor gibi analizler yapılmaktadır. Bu analizler NIR (near infrared) ile verimli bir şekilde yapılabilmektedir. Ayrıca vitamin analizlerinde de HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) cihazından yararlanılmaktadır.

•**Sindirim denemeleri:** Yemlerin hayvan tarafından ne kadar değerlendirilebildiğinin ölçülmesinde ilk başvurulan metotlardan biri sindirilebilirlik ölçümüdür. Uygun bir alıştırma döneminden sonra sindirim kafeslerinde tutulan hayvanlara tartılarak yem verilir ve dışkıları toplanır. Yemle verilen besin madde miktarından dışkı ile atılan besin madde miktarı çıkarılarak yemin ne kadarının sindirildiği tespit edilir. Basit şekilde anlatılan bu işlem hayvan türüne göre değişik süreler almakla birlikte ruminantlarda en az 20 gün sürmektedir. Süre uzunluğunun yanı sıra oldukça zahmetli ve masraflı bir işlemdir. Bu nedenle klasik sindirilme derecesi tayin işlemi rutin analizlerde tercih edilmez.

•**Metabolizma çalışmaları ve biyolojik denemeler:** Yem hammaddelerinde bulunan besin maddeleri sindirim sisteminde en küçük yapı taşlarına ayrıldıktan sonra emilerek kana karışıp, metabolizmaya katılarak hayvanın ihtiyaçlarının karşılanmasında kullanılırlar. Klasik metotlarda hayvanlar metabolizma kafeslerine tutularak, dışkının yanı sıra idrar ve Rumen fermantasyonu sonucu üretilen metan gazı miktarı da ölçülür. Ayrıca çevreye saldıkları enerjiyi bile dolaylı ya da doğrudan ölçebilmek mümkündür. Böylece yemlerde ki proteinlerin ve yem enerjisinin metabolizmada kullanım etkinliği ölçülebilir, ancak bu tür detaylı metabolizma çalışmaları sindirim denemesinden daha güçtür bu ölçümlerin rutin analizlerde kullanılması mümkün olmadığı gibi dünyada da çok az sayıda merkezde yapılabilmektedir.

Karma Yemlerde Bulunacak Besin Maddeleri; Kuru Madde, Ham Protein, Ham Sellüloz, Ham Kül, HCI'de çözünmeyen Kül, Kalsiyum, Fosfor, Sodyum, NaCl, Metabolik Enerji, Vitamin A, Vitamin D_3, Vitamin E (Çizelge 2.1)

Çizelge 2.1. Tescile tabi karma yemlerin normu

	Temel Besin Maddeleri									Karmada Bulunacak Vitaminler			
YEM ADI	Ham Protein (en az) (%)	Ham Sellüloz (ençok) (%)	Ham Kül (en çok) (%)	HCl de Çözünmeyenler Kül (en çok) (%)	Kalsiyum (en az-en çok) (%)	Fosfor (en az) (%)	Sodyum (enaz-en çok) (%)	NaCl (en çok) (%)	Metabolik Enerji Kcal/kg) (en az)	A Vit. (En Az) (İÜ/Kg)	D_3 Vit. (EnAz) (İÜ/Kg)	E Vit. (En Az) (Mg/Kg)	Hayvanın Yaşı
KUZU BAŞLANGIÇ	18	11	8	1,0	0,8-2,0	0,5	0,1-0,4	0,6	2800	5000	600	25	Kuzuların 1-8. hafta sonuna kadar beslenmesinde kullanılır.
KUZU BÜYÜTME	16	10	10	1,0	0,8-2,0	0,5	0,1-0,4	0,6	2500	6000	750	15	Kuzuların 9.haftadan itibaren beslenmesinde kullanılır.
KUZU BESİ	15	12	9	1,0	0,6-1,6	0,4	0,1-0,4	1,0	2800	7000	700	25	Besi amaçlı kuzuların 7. aya kadar beslenmesinde kullanılır.
TOKLU BESİ	12	12	9	1,0	0,6-1,6	0,4	0,1-0,4	1,0	2750	7000	700	25	Besiye alınan toklularda 7. aydan itibaren 12.aya kadarki döneminde kullanılır.
BUZAĞI BAŞLANGIÇ	18	12	8	1,0	1,0-2,0	0,5	0,1-0,4	0,6	2800	5000	600	25	Buzağıların 12. hafta sonuna kadar beslenmesinde kullanılır.
BUZAĞI BÜYÜTME	17	12	10	1,0	1,0-2,0	0,5	0,1-0,4	0,6	2600	5000	600	25	Buzağıların 3. aydan itibaren 6. ayın sonuna kadar beslenmesinde kullanılır.
SIĞIR BESİ	12	14	9	1,0	1,0-2,0	0,5	0,3-0,6	1,0	2500	5000	700	30	Besiye alınan dana ve tosunların beslenmesinde kullanılır
SIĞIR SÜT	16	14	9	1,0	0,8-1,5	0,5	0,2-0,4	1,0	2400	5000	1000	30	Sağmal ineklerin beslenmesinde kullanılır.

2.2. Vitaminler

Vitaminler, canlılardaki hücre ve organların düzgün çalışabilmesi, metabolik olayların gerçekleşebilmesi için gerekli, yiyecekler ya da içeceklerle belirli miktarda alınması gereken, ileri biyolojik etkinliğe sahip organik bileşiklerdir.

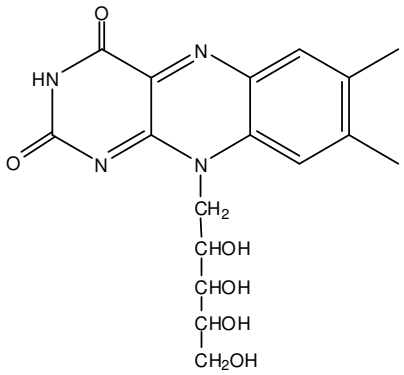
Suda eriyen vitaminler; C, H, O gibi elementlerden başka azot (N), kükürt (S), ve kobalt (Co)'da içerirler. Provitaminleri yoktur. Ayrıca koenzim olarak rol oynarlar ve enerji transferinde etkilidirler. Su devamlı bağırsaktan emildiği için suda eriyen vitaminlerin emilimi oldukça kolaydır. Bu bileşiklerin depolanmaları mümkün değildir. Ancak vitamin C vücutta çok az depolanabilir. Bu vitaminlerin başlıca atılım yolu idrardır.

Bu gruba giren B kompleks vitaminlerin yetersizliğinde dermatitis, kılların kaba bir hal alması, büyümenin gerilemesi, yemden yararlanma oranının azalması gibi spesifik olmayan belirtiler ortaya çıkar.

Ayrıca B grubuna ait vitaminlerin spesifik enzim aktiviteleri ile ilgili oldukları bilinmektedir. Bunlar koenzimlerdir. Belki hepsi bazı enzim sisteminde kofaktördürler.

Sindirim sistemi geniş olan atlarda genellikle sekum ve kolonlarda B kompleksi vitaminler yeterli düzeyde sentezlenmektedir. Geviş getirenlerin Rumenlerinde de aynı durum söz konusudur fakat köpek ve kediler gereksinimlerini diyetleri ile almak zorundadırlar.

2.2.1.Riboflavin (Vitamin B_2)

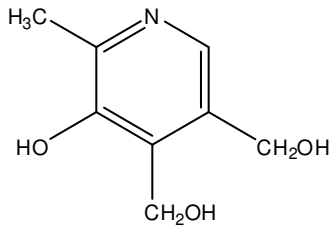


Riboflavin flavoproteinlerin önemli bir yapı maddesidir. Bu proteinlerin prostetik grubu fosfat formunda (Flavin Mononukleotid = FMN) riboflavin veya daha kompleks form olan Flavin Dinukleotid (FAD) içerir. Hayvan vücudunda önemli görevler üstlenen pek çok flavoprotein vardır. Bunlar hidrojen transferinde rol oynayan çeşitli kimyasal reaksiyonlarla ilgilidir.

Riboflavin bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunur ve özellikle yapraklı sebzelerde, mayada, sıcakkanlıların bütün organlarında, balıkta ve sütte (lactoflavin adı buradan gelir) vardır. Riboflavin bitki ve hayvan aleminde çok yaygındır, bütün besin maddelerinde ve yemlerde pek az bir istisna ile bulunur. Bitkilerin genç kısımları yaşlı kısımlarından çok riboflavin içerir. Yapraklarda saptakinden çok riboflavin bulunur. Tahıllar riboflavince fakirdir.

Riboflavin noksanlığında piliçlerde büyüme durur, felç ve ölüm meydana gelir. Civcivlerde büyüme yavaşlar ve periferal büyüme noksanlığına bağlı olarak ayak felçleri ortaya çıkar. Yetişkin tavuklarda ise kuluçka kabiliyeti düşer, embriyonun ölüm oranı artar. Sıçan ve köpeklerde ayrıca kansızlık görülür. Pratik beslenme şartlarında hayvanlarda riboflavin yetersizliği meydana geldiği bilinmemektedir. Riboflavin noksanlığının teşhisi güçtür.

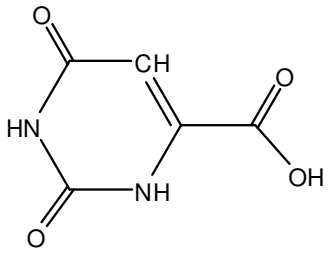
2.2.2.Piridoksin (Vitamin B_6)



Vücut dokularında birbirine dönüşebilen üç ayrı formda bulunur. Bunlar pridoksin, pridoksal (aldehit formu – en aktif olanı) ile pridoksamin (amin formu)'dir. Vitamin B_6 bu üç formu tanımlamada kullanılır. Pridoksine göre daha az stabil olan diğer iki formu ısı etkisiyle parçalanır. Pridoksin ise ısı, asit ve alkalilere dayanıklıdır. Ayrıca vitamin karbonhidrat, yağ, protein metabolizmasında rol oynar. Böbrek, karaciğer, et, süt, karaciğer, beyin, maya, yumurta sarısı, çeşitli hububatlar iyi bir vitamin B_6 kaynaklarıdır.

Sıçanlarda noksanlığı, büyümenin kaybolması, kuyrukta, kulaklarda, ağızda, pençelerde ödem ve pullanma ile birlikte seyreden dermatitis ile karakterize olur. Genç domuz, köpek ve sıçanlarda noksanlığı microtic, hypochromic anemiaya, plazmada demir miktarında artmaya ve hemosiderosis'e neden olur. Sinir sistemide ciddi şekilde etkilenir. Sıçanlar B_6 noksanlığında gürültüye karşı fevkalade duyarlıdır, epileptiform nöbetler meydana gelir. Perifer sinirler ve medulla spinalis demiyelin'e olur. Büyümede gerileme, deride yangılar, periferal ve sentral sinir sisteminde değişiklikler, protein kazanımında azalma, tavuklarda yumurta ve kuluçka veriminde düşme, yetersizliğin en önemli belirtilerindendir.

2.2.3.Kobolamin (Vitamin B_{12})

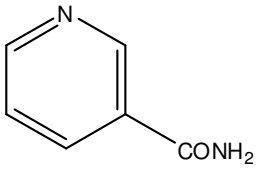


Yapısında H, O, N, P ve Co bulunan kompleks bir vitamindir. Bir siyan grubu (CN) molekülün ortasında bulunan kobalta bağlanmıştır. İz elemente bağlı siyanid iyonu yerine 5-deoksiadenozin molekülü girerse kobamid adı verilen koenzim oluşur. Kuvvetli asit, alkali ve ısıya karşı dayanıksızdır.

Sadece hayvansal kökenli yem maddelerinde bulunur. Balık unu, et unu, süt tozu vb yemler bol miktarda vitamin içerirler. Bu yemlerde bulunan vitamin hayvanlar tarafından tam olarak değerlendirilebilir. Hayvanlar ve bitkiler bu vitamini sentezleyemezler. Toprak, su ve bağırsakta yaşayan mikroorganizmalar vitamin B_{12}'nin kaynaklarıdır. Birçok mikroorganizma çoğalmaları için vitamin B_{12} ye gereksinim duyarlar.

Eksikliğinde domuzlarda, büyümenin durması, ishal, kusma, hareket bozuklukları, ağız mukozasında yangı; kanatlılarda büyümenin yavaşlaması, kötü tüylenme, böbreğin zarar görmesi, kuluçka yeteneğinin düşmesi; ruminantlarda Co yetersizliğinde mikrobiyel sentez sağlanamaz ve bu durumda iştahın azalması, zayıflama, anemi görülür.

2.2.4.Nikotinamid (Niyasin)



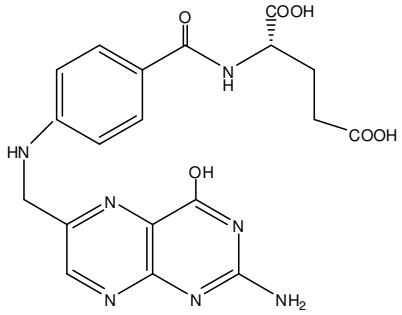
Triptofan aminoasidi nikotinik asit ve nikotinamidin ön maddesi olup bağırsak duvarında vitamine dönüşür.

Memeli soylarında triptofan barsak duvarında ve vücut dokularında bu vitamine dönüştürülebildiği için niasin gereksinimi diyetteki triptofan düzeyi ile yakından alakalıdır. Kediler diğer memelilerden farklı olarak bu dönüşümü gerçekleştiremezler ve bu durum enzim yetersizliğinden kaynaklanmamaktadır. Triptofanın parçalanması sırasında, reaksiyon sonucu iki yoldan birine gider. Bunlardan ilkinde alternatif non-niyasin'den sorumlu enzim yüksek aktiviteye sahiptir ve triptofan bu alternatif metabolik basamakta karbonhidratların değerlendirilmesine benzer biçimde metabolitlere ayrılıp enerji sağlar. Böyle olduğu içinde ikinci yolda kullanılacak triptofan azalır, diğer bir deyişle niasin sentezinde triptofan kalmaz.

Niyasin yetersizliği değişik hayvan türlerinde deri, gastrointestinal sistem, tüylerde bir takım bozukluklara neden olur. Civcivlerde büyümenin gecikmesi, ağızda köpeklerde görülen kara dil benzeri semptomlar, kötü tüylenme, dermatitis görülür. Tavuklarda yumurta ve kuluçka veriminin düşmesi niyasin eksikliğinde görülebilen genel belirtilerdir. İnsanlarda dilin kırmızı renk alması, ağız ülseri, iştahsızlık, dermatitis ve bulantı ile karakterize olan pellegra hastalığı ortaya çıkmaktadır. Tek başına niasin eksikliği köpeklerde insanlarda olduğu gibi şiddetli sentral sinir sistemi bozukluklarına yok açmaz. Şiddetli stomatitis ve enteritis vardır. Dildeki stomatitis ve nekrozis nedeniyle bu hastalığa "karadil hastalığı" denir. Daha ileri vakalarda ölümle sonuçlanan daire, anemi, ağız ve dil mukozasında eritem ve ülserasyonlar vardır. İnsanlarda da köpeklerdeki bu aynı tablo mevcuttur. Kedilerde de daire, kaşeksi ve ölüm görülebilir.

Karaciğer, maya, yer fıstığı ve ayçiçeği küspeleri vitamin bakımından zengin kaynaklardır. Tahıl tanelerinde bol miktarda vitamin bulunursa da, bağlı formda olan bu vitaminden kanatlı ve domuzların yararlanması çok güçtür.

2.2.5.Folik asit (Folasin)



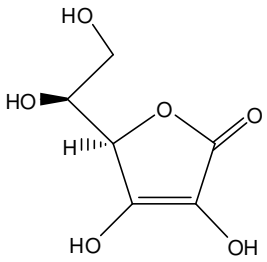
İlk defa ıspanak yapraklarından elde edildiği için bu adı almıştır. (Folium = yaprak) Folasin, folik asit derivatlarını tanımlamak amacıyla kullanılan bir terimdir. Folik asit (B9 vitamini) doğada aminoasitler ve glutamik asitle konjuge formda bulunur.

Doğada yaygın olarak bulunur. Yeşil yapraklı bitkiler, tahıllar, yağlı tohum küspeleri, hayvansal kökenli protein kaynakları, peynir, süt, kas, böbrek, yumurta sarısı, karaciğer zengin kaynaklardandır. Kanatlılar, doğal kaynaklarda bu vitaminin bağlı bulunmasından dolayı sınırlı oranda (% 20 – 30) faydalanırlar.

Folik asit formil, metilen ve metil grupları gibi tek karbonlu bileşiklerinde içine alan birçok metabolik dönüşümler için önem taşır. Ayrıca alyuvar ve hemoglobin üretiminde rol oynar.

Bu vitaminin eksikliğinde büyümenin gerilemesi, anemi, lökopeni gözlenir. Civcivlerde ise gereksinim yeterince karşılanmazsa perozis şekillenir. Gingivitis, diare, kaşeksi, iştahın kaybolması da gözlenir.

2.2.6.Vitamin C (Askorbik asit):

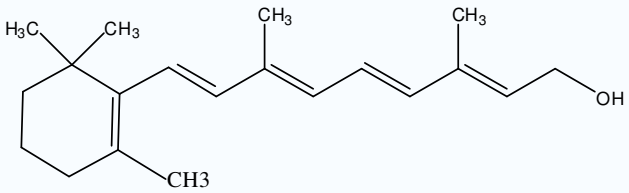


Sağlıklı bir gelişim, diş, kemik ve deri için vazgeçilmez bir bileşen olan C vitamini olarak da adlandırılan L-askorbik asit (3-keto-L-gulofuranolaktan); demirin absorblanması, kolajen sentezi, kan damarlarının yapısal gücünün sürdürülmesi, bazı aminoasitlerin metabolizmasında ve adrenal bezlerin hormon sentezi ve salgılaması gibi metabolik fonksiyonlarda görev alan karbonhidrat benzeri bir kimyasal maddedir. Beyaz veya hafif sarı renkte, kokusuz kristalimsi yapıda bir madde olup suda tamamen çözünürken etanolde biraz çözünmekte dietil eter çözeltisi içinde ise hiç çözünmemektedir. (Anon, 2008)

Oksijen varlığı, sıcaklık yükselmesi, güneş ışığı ve ultraviyole ışıklara maruz kalma, bakır ve demir gibi ağır metallerin varlığı, güçlü asit ve alkali koşullar gibi durumlarda bu oksidasyonun derecesi artmaktadır. Bu nedenle askorbik asit; karanlık, soğukta ve metal olmayan kaplarda depolanmalıdır.

Vitamin C yetersizliğinde hayvan türlerinin çoğunda vitamin C glikozdan sentezlenir. Bu sebepten vitamin C eksikliği nadir görülür. Broiler tavuklarında ısı ve yol stresi halinde eksiklik olguları ortaya çıkabilir. Ayrıca stres altındaki sürülerde asitez ve ani ölümler gözlenebilir.

2.2.7. A Vitamini (Retinol asetat)



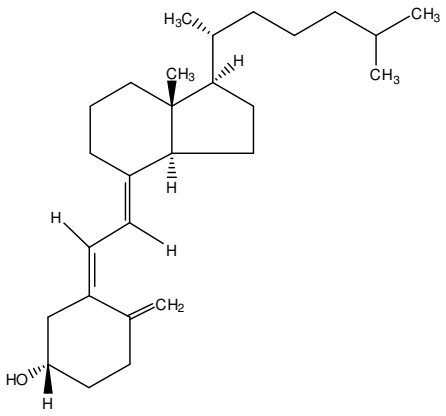
Retinol olarak da bilinen vitamin A monohidrik bir alkoldür. Alkol grubunun aldehitle yer değiştirmesi ile retinal, asit grubu ile yer değiştirmesi sonucuda retinoik asit adını alır.

Ultraviole ışınlarına, ısıya ve oksijene karşı duyarlıdır. Vitamin karaciğerde palmitat biçiminde depo edilir. Vitamin A'nın provitaminleri bitkilerde bulunan a, b, d karotinlerle kriptoksantinlerdir. Karotenlerin vitamin A'ya dönüşümünün önemli bir kısmı ince bağırsaklarda gerçekleşir. Karotenin geri kalan bölümü ise karaciğerde viamin A'ya dönüşür. Yağlar özellikle doymamış yağ asitleri karotenlerin emilimini hızlandırır. Karotenler sadece hayvan vücudunda vitamin A'ya dönüştükleri için bu vitamin hayvansal ürün olarak nitelendirilir. Yemlerde protein ve fosfor yetersizliği ya da nitratların yüksek miktarlarda alınması vücutta karotenin değerlendirilmesini olumsuz etkiler.

Vitamin A'nın biri gözde diğeri genel sistemde olmak üzere iki önemli rolü bulunmaktadır. Görme olgusu, görme pigmentlerinin beyazlaşması yoluyla bir nöyrondan diğerine aktarılarak beyine kadar ulaşması sonucu meydana gelir. Görme pigmentlerinin sentezlenmesi için Retinol'un oksitlenerek Retinale dönüşmesi gerekir. Ayrıca A vitamini Epitel membranları koruma ve Kemik gelişimi ile ilgili görevler üstlenir.

Eksikliğinde hayvanlarda büyüme durur. İştah kaybı oluşur ve kanser riski artar. Gece körlüğü meydana gelebilir, sinirsel bozukluklar oluşur. Ayrıca dölverimi yeteneği kaybolur ve plasentanın gelişmesi durur.

2.2.8. D_3 Vitamini (Cholecalciferol)

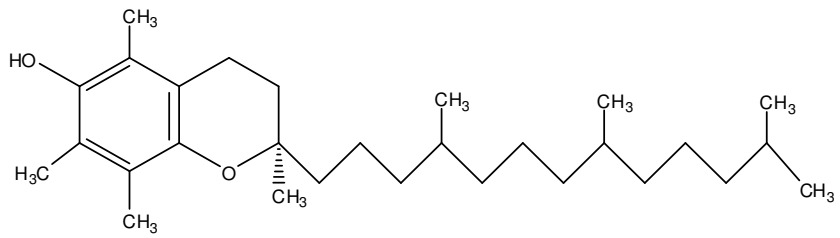


Antiraşitik vitamin olarak da bilinir. Vitaminin ergokalsiferol (vit. D_2) ve kolekalsiferol (vit. D_3) olmak üzere iki formu vardır. İnsan, sığır ve köpekte etkinlik bakımından aynı değere sahip iken kanatlılarda D_3 vitamini D_2'den 30 kat daha iyi değerlendirilir. Her iki provitaminin Ultraviyole ışınlarının etkisiyle 9. ve 10. pozisyonu arasındaki b halkası açılmadıkça beslenme açısından önemi yoktur.

D_3 vitamini, yemden yararlanmayı arttırır, dişlerin oluşumunda görev alır. Kalsiyum ve fosforun bağırsaklardan emilimini ve vücuttan atılımını düzenler. Kemik gelişimini ve güçlenmesini arttırır. Ayrıca yumurtlamada süreklilik sağlar ve kabuk kalitesini arttırır. Böylelikle kırık yumurtaların sayısını oldukça azaltır.

Vitamin D_3 yetersizliğinin en önemli belirtileri kemiklerde gözlenir. Kemikler zayıflar, eğrilir, kolay kırılır bir hal alır. Genç hayvanlarda raşitizm oluşur. Kanatlı hayvanlarda kemiğin yanı sıra gagaların yumuşadığı da gözlemlenebilir. Bacak çarpıklıkları ve yumurta kabuğu kalitesinde zayıflık görülür. Aynı zamanda yumurta verimi ve kuluçkadan çıkma oranında azalma olur.

2.2.9. E Vitamini (α-Tocopherol)

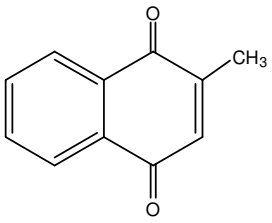


Vitamin E nin üstlendiği metabolik rollerden birincisi biyolojik antioksidan olmasıdır. Vitamin E hücrenin solunum mekanizmasında rol alan koenzimler ve C vitamini sentezinde rol oynar (Eitenmiller, 2008).

Doğada 8 formu bulunmaktadır. Bunlar 4 adet tokoferol ile 4 adet tokotrienoldür. α-tokoferol en yaygın olarak bulunanı ve en aktif olanıdır. Vitamin E, organizmada hücre düzeyinde doğal antioksidan etkiye sahip olan bir maddedir. Vitamin E'nin ester formları çevre koşullarına dayanıklı olmasına rağmen doğal halinde hemen bozulabilir.

E vitamininin hastalıklara karşı vücudun direncini arttırması, antikanserojenik etkisi olması, et kalitesini ve etin raf ömrünü arttırması gibi özelliklerinin yanında beyaz kas hastalığına karşı koruyucu olması ve bacak tutulmalarını önlemesi gibi faydaları bulunmaktadır. Yetersizliğinde ise beyaz kas hastalığı oluşması, döl verimi düşmesi gibi etkileri görülmektedir.

2.2.10. K_3 Vitamini (Menadione)



K grubu vitaminleri menadionun türevleridir. Birbirlerinden yan zincirlerinin yapısına göre farklılaşırlar. Menadinon (vitamin K_3) sentetik vitamin K'dır. K vitaminleri organik çözücülerin çoğunda ve yağda çözünürken, suda çözünmez. Isıya dayanıklıdır ve pişirme sırasında kısmen parçalanır. Işığa çok hassastır. Karaciğerde protrombin sentezi için gerekli bir bileşiktir. Kanın pıhtılaşması için gereklidir. K_3 vitamininin yetersizliğinin en önemli belirtisi kanın pıhtılaşma süresinin uzamasıdır. K_3 vitamininin yetersizliğide anemi ve genel olarak vücut yüzeyinde hemoraji olmaktadır. Memeli hayvan ve insanlardan farklı olarak kuslarda K vitamini yetersizliği bazı patolojik durumlara yol açar bunun nedeni kusların bağırsaklarında K vitamini sentez eden bakterilerin yasamamasıdır. (Basu, 1996)

2.3. Vitaminlerin Sınıflandırılması

Vitaminler yağda ve suda eriyen vitaminler olarak ikiye ayrılır (Çizelge 2.2.).

2.3.1. Yağda eriyen vitaminler: Sadece karbon, hidrojen ve oksijen kapsarlar. Provitamin halinde bulunurlar ve bunlar hayvan vücudunda aktif vitamine dönüşürler. Yapı ünitelerinin metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan yağda eriyen vitaminler ancak bağırsaklarda yağ olduğu sürece emilirler. Bu bileşikler yağ ile birlikte vücutta depo edilir ve dışkı yolu ile atılırlar.

2.3.2. Suda eriyen vitaminler: Karbon, hidrojen ve oksijen gibi elementlerden başka azot(N), kükürt(S) ve kobalt(Co)'da içerirler. Bütün calılarda bulunan suda eriyen vitaminlerin provitaminleri yoktur. Su devamlı bağırsaktan emildiği için suda eriyen vitaminlerin emilimi oldukça kolaydır. Bu bileşiklerin depolanması mümkün değildir. Ancak vitamin C vücutta çok az depolanabilir. Suda eriyen vitaminlerin başlıca atılım yolu idrardır.

Çizelge 2.2. Vitaminlerin sınıflandırılması

Yağda Eriyen Vitaminler	**Suda Eriyen Vitaminler**
A vitamini (retinol asetat)	Pridoksin (vitamin B_6)
D_3 vitamini (cholecalciferol)	Riboflavin (vitamin B_2)
E vitamini (α-Tocopherol)	Nikotinik asit (vitamin B_3)
K_3 vitamini (menadione)	Folik asit
	Askorbik asit (Vitamin C)
	Cyanocobalamin (vitamin B_{12})

2.4. Vitamin Analizi Tayin Yöntemleri

Vitamin analizlerinde UV-Vis spektrometre, Florimetri, HPLC gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

2.4.1. Kromatografik yöntemler

Kromatografi, karmaşık karışımlardaki kimyasal bileşimlerin ayrılması, tanınması ve tayini için yaygın olarak kullanılan bir analitik metottur (Skoog ve Holler 1999). Gaz veya sıvı haldeki bir hareketli fazda bulunan karışımdaki bileşenlerin, durgun fazdan geçme hızlarına bağlı olarak ayrıldıkları bir teknik şeklinde de tanımlanabilmektedir.

Kromatografide bir durgun faz birde hareketli faz vardır.

Durgun faz: Bir kolon içinde veya düz bir yüzeyde tutturulmuş faza denir.

Hareketli faz: Kromatografide durgun fazın üzerinden veya arasından geçen ve analiti de içeren faza denir. (Gündüz, 1999)

Kromatografik metotlar; Uygulanan metoda göre; kolon-düzlemsel kromatografi ve kullanılan sabit faza göre; adsorpsiyon-dağılma-iyon değiştirme-sterik seçici olarak, kullanılan hareketli faza göre; gaz-sıvı-süperkritik akışkan olarak gruplandırılabilmektedir (Levin 2006). Bölüm 2.4.1.1.'de bu çalışmada kullanılan yüksek-performans sıvı kromatografi hakkında bilgi verilmektedir.

2.4.1.1. Yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC)

Bu bölüm hareketli fazın sıvı olduğu dört ayrı temel kromatografi ile ilgilidir. Bunlar dağılma kromatografisi; adsorbsiyon kromatografisi veya sıvı-katı kromatografisi; iyon değiştirme kromatografisi ve boyut eleme veya jel kromatografisidir. Yüksek performanslı sıvı kromotografi bütün analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Uygulama alanları Çizelge 2.3.' da verilmiştir.

Çizelge 2.3. HPLC' nin uygulama alanları

Alan	Tipik Karışımlar
Farmasötikler	Antibiyotikler, Sedatifler, Steroidler, Analjezikler,
Biyokimya	Amino asitler, Proteinler, Karbonhidratlar, Lipidler
Gıda ürünleri	Suni tatlandırıcılar, Antioksidatlar, Aflatoksinler, Vitaminler, Katkı maddeleri
Endüstriyel kimyasallar	Kondanse aromatikler, Yüzey aktif maddeler, Boyalar
Kirleticiler	Pestisitler, Herbisitler, Fenoller, PCB' ler
Adli tıp	İlaçlar, Zehirler, Kan alkolü, Narkotikler
Klinik tıp	Safra asitleri, İlaç metabolitleri, İdrar ekstraktları, Östrojenler

Hareketli faz olarak sıvı maddelerin kullanıldığı kromatografiye sıvı kromatografi denilmektedir.

Hareketli faz sıvı ve durgun faz ise çok küçük katı parçalardan oluşur.

Beş tür yüksek performanslı sıvı kromatografi metodu vardır:

1-Dağılma veya sıvı-sıvı kromatografisi,

2-Adrorpsiyon veya sıvı-katı kromatografisi,

3-İyon değiştirici kromatografisi,

4-Jel geçirgenlik kromatografisi,

5-Jel süzme kromatografisidir.

Bu sıvı kromatografi tipleri aslında uygulamalarda birbirlerini tamamlayan tekniklerdir. Örneğin mol kütlesi 10000 den büyük maddelerin analizinde iki boyut ayırıcı metodundan jel geçirgenlik metodu apolar maddeler için, jel süzme metodu ise polar veya iyonik maddeler için kullanılmaktadır. Mol kütlesi daha düşük olan iyonik türlerin analizinde ise iyon değiştirici kromatografi genellikle tercih edilen metottur. İyonik olmayan küçük polar türler ise en iyi şekilde dağılma metotları ile analiz edilirler.

Geniş bir uygulama alanına sahip olduğu için sıvı kromatografi ayırma teknikleri içerisinde en çok kullanılanıdır.

Sıvı kromatografi tekniklerinin çeşitli tipleri bir kolonda veya düz bir yüzeyde gerçekleştirilebilir. Bunlardan düz bir yüzeyde gerçekleştirileni düzlemsel kromatografi adını alır ve hem tekniğin basit olması hem de cihazlarının ucuz olması gibi bir üstünlüğe sahiptir. Sıvı kromatografide ayırma durgun faz ile hareketli faz arasındaki göçe bağlıdır. Durgun faz; bir kolon içinde veya düz bir yüzeyde tutturulmuş fazdır. Hareketli faz; durgun fazın üzerinden veya arasından geçen ve analitide içeren fazdır.

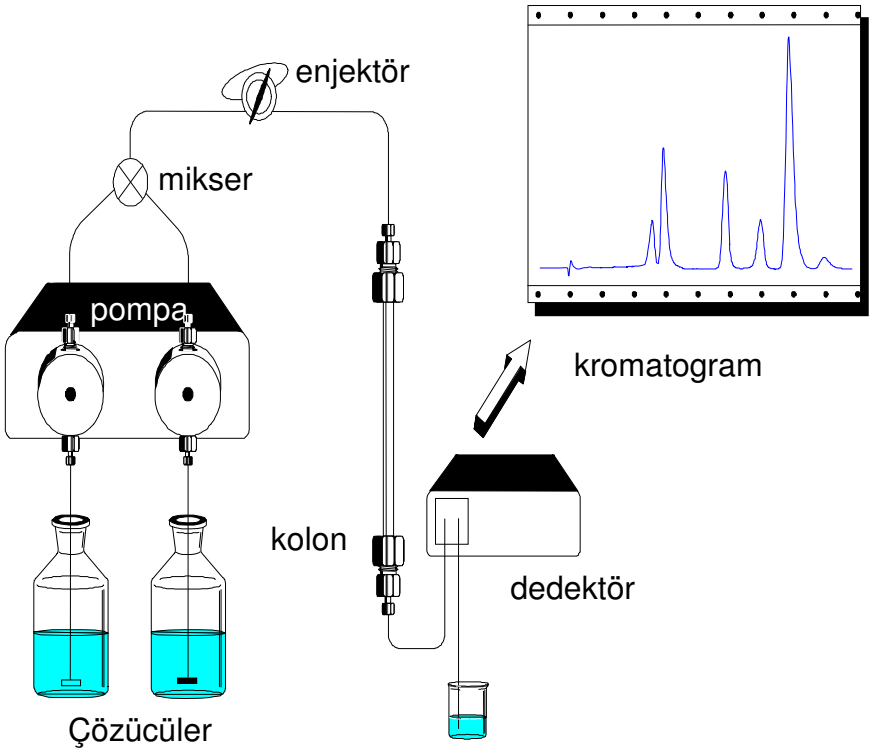
HPLC de en çok kullanılan ters faz kromatografisidir. Kullanım oranlarına göre gösterilirse:

Ters faz	%50.4
Normal faz	%24.1
İyon değiştirme	%14.0
Boyut eleme	%6.7
Diğerleri	%5

şeklinde gösterilebilir (Anon, 2006a).

Modern sıvı kromatografi sistemlerinde genel olarak kullanılan ve tanecik boyutu 2-10 µm arasında olan dolgu maddeleri ile uygun sıvı akış hızları elde edebilmek için, yüzlerce atmosferlik pompa basınçlarına gerek vardır. Bu yüksek basınçların bir sonucu olarak HPLC için gerekli donanım, diğer tip kromatografi sistemleri dikkate alındığında daha ince işçilik gerektirir ve sonuçta daha pahalıdır. Tipik bir HPLC' nin önemli parçaları Şekil 2.1.'de verilmiştir.

HPLC sisteminin ana parçaları; solvent haznesi, de-gas, pompa, enjeksiyon, kolon/fırını, dedektör ve veri analizden oluşmaktadır (Özcan, 2006).



Şekil 2.1. HPLC sistemi

- **Hareketli faz hazneleri ve çözücü muamele sistemleri:**

Modern bir HPLC cihazı bir veya daha fazla, her biri 200-1000 mL çözücü içeren camdan veya çelikten yapılmış hazne içermektedir. Bu hazneler çoğu zaman, kolonda ve detektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sebep olan çözünmüş gazları (genellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir cihazla donatılmıştır. Bu gaz kabarcıkları bant genişlemesine; ayrıca, çoğu zaman dedektörün performansında bozucu etkilere sebep olurlar.

- **Pompalama sistemleri:**

Üç tip pompa vardır. Bunlar pistonlu pompalar, şırınga veya sürgülü pompalar ve pnömatik veya basınç pompalarıdır.

- **Numune enjeksiyon sistemleri:**

Sıvı kromotografik ölçmelerin kesinliğini belirleyici faktör, numunenin kolon dolgu maddesine sevkinin tekrarlanabilirliğidir. Aşırı numune yüklenmiş kolonlarda görülen bant genişlemesi de kesinliği etkiler. Bu yüzden, kullanılan hacim, mikrolitrenin birkaç ondalığından belki 500 µL' ye kadar oldukça küçük olmalıdır. Dahası sistemin basıncını düşürmeksizin numunenin sisteme girişinin sağlanması gereklidir. Sıvı kromotografide numune vermek için en yaygın kullanılan yöntem, numune giriş sarımlarının kullanılması esasına dayanır.

- **Sıvı kromatografi kolonları:**

Sıvı kromatorafi kolonları normal olarak düzgün iç çaplı paslanmaz çelik borulardan yapılır. Ancak arasıra kalın cidarlı cam borular da kullanılır.

Analitik kolonlar:

Sıvı kromatografi kolonlarının büyük çoğunluğu 10-30 cm arasındadır. İç çapı çoğu zaman 4-10 mm; yaygın olarak kullanılan birçok kolon dolgu maddesinin tanecik büyüklüğü 5-10 µm arasındadır. Son yıllarda üreticiler yukarıda tarif edilen kolonun boyutlarından daha küçük boyutlarda yüksek hızlı ve yüksek performanslı kolonlar üretmektedir.

Emniyet kolonları:

Analitik kolonun ömrünü arttırmak amacıyla, analitik kolondan önce yerleştirilen bu kolonun görevi sadece partikül haldeki maddeleri ve çözücü içindeki yabancı maddeleri tutmak değil aynı zamanda numune içinde bulunan ve durgun faza tersinmez olarak bağlanan bileşenleri de tutmaktadır. İlave olarak hareketli fazı durgun faz ile doyurarak analitik kolondaki çözücü kaybının en aza indirilmesi sağlanır.

Kolon termostatları:

Birçok modern ticari cihaz, kolon sıcaklığını oda sıcaklığından, 100- 150°C' a kadar sıcaklıkta onda birkaç derece hata ile sabit tutabilen kolon ısıtıcıları ile donatılmıştır.

- **Kolon dolgu maddeleri:**

Sıvı kromatografide temel olarak iki tip dolgu maddesi kullanılmaktadır. Bunlar, film dolgular ve gözenekli dolgulardır. Film dolgular küresel, gözeneksiz, çapları 30-40 µm olan cam veya polimer tanelerinden oluşur. Gözenekli partiküller, çapları 3-10 µm arasındadır ve silis, alumina, benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçineden meydana gelmiştir.

- **Dedektörler**

HPLC' de genel olarak filitreli ultraviyole absorbans, monokromatörlü ultraviyole absorbans, infrared absorbans, floresans, kırma indisi, buharlaştırmalı ışık saçma, elektrokimyasal, kütle spektrometrik dedektörler kullanılmaktadır (Çizelge 2.4.).

Yüksek performanslı sıvı kromatografide dedektörler

Çizelge 2.4. Dedektörlerin kullanım yüzdeleri

UV-Vis	% 43
DAD	%22
Fluorescence	%10
Refraktif indeks	%8
Elektrokimyasal	%7
İletkenlik	%5
Kütle	%1
Diğer	%4

Sıvı kromatografide en çok kullanılan dedektör UV-Vis dedektördür. Son yıllarda MS kullanımı da hızla artmaktadır. MS dedektör hem pahalı hem de kullanımı iyi bilgi gerektirdiği için yeterince yaygın değildir (Anon, 2006b).

2.4.2. Spektrofotometrik yöntemler

Ultraviyole, görünür ve infrared ışınların absoprbsiyonuna dayanan moleküler spektroskopi, onbinlerce inorganik, organik ve biyokimyasal türün tayininde kullanılır. Moleküler Ultraviyole/görünür bölge absorbsiyon spektroskopisi, başlıca kantitatif analizlerde kullanılır. Bu başlık altında sadece Ultraviyole ve görünür alan spektrofotometre cihazları ve uygulamaları hakkında bilgi verilmiştir (Skoog, 2000).

2.4.2.1. Ultraviyole/Görünür bölge moleküler absorbsiyon spektrometri

Atomik ya da moleküler bir M türünün ultraviyole veya görünür ışını absorplaması iki basamaklı bir süreç olup, bunlardan birincisi o türün aşağıdaki gösterildiği şekilde elektronik uyarılmasına ilişkindir. (Erdik, 2005)

$$M + h\nu \rightarrow M^*$$

M ile $h\nu$ arasındaki reaksiyon ürünü, elektronik olarak uyarılmış M^* ile gösterilen türdür. Uyarılmış türlerin ömürleri kısa olup (10^{-8}-10^{-9} s); bunların varlığı, çeşitli durulma süreçleriyle sonlandırılır. Durulmanın en yaygın tipi uyarılma enerjisinin ısıya dönüştüğü haldir; yani:

$$M^* \rightarrow M + \text{ısı}$$

dır. Moleküler absorbsiyon spektrometri b cm ışın yoluna sahip ışık absorbansının (A) ölçümüne dayanır. Normal olarak absorbans, absorbsiyon yapan analitin derişimi ile aşağıdaki eşitlikte belirtildiği gibi, doğrusal olarak değişir:

$$A = -\log T = \log \frac{P_o}{P} = \in bc$$

Bu eşitlikte P, P_o ışın gücü; A absorbans; b ışın yolu; T geçirgenlik; $\in$ absorptivitedir.

2.4.2.2. Florimetri

Florimetri, çok düşük derişimlerdeki numunelerin tayinine olanak sağladığı için besin endüstrisinde, farmakolojide, klinik numunelerde, biyokimyasal bileşiklerin analizinde, hava ve çevre kirliliği tayinlerinde, tarım kimyasında ve pekçok organik ve inorganik bileşiğin analizinde tercih edilen bir enstrümental yöntemdir. Bütün bu uygulama alanları ve florimetrik olarak tayin edilen bazı maddeler Çizelge 2.5'de verilmiştir.

Çizelge 2.5. Florimetrinin bazı uygulama alanları.

KULLANIM ALANI	ANALİT TÜRÜ	ÖRNEKLER
İnorganik bileşiklerin Analizi	Anyonlar	Siyanür, florür, sülfat, iyodür, bromür, klorür, nitrat, fosfat
	Katyonlar	Alüminyum, arsenik, berilyum, bor, kadmiyum, seryum, kalsiyum, galyum, demir, lityum, mağnezyum, nadir toprak elementleri, selenyum, kalay, tungten, silisyum, çinko, zirkonyum
Organik bileşiklerin Analizi	Aromatik Hidrokarbonlar	Benzen, toulen, *o–, m–, p–*ksilenler, mesitilen, fenol, krezol, *o–, m–, p–* hidrobenzoik asitler, anilin, *o–, m–, p–* anisidinler, bifenil, bibenzil, difenilamin, bibenziletilen, difenilmetan, floren, naftalen, antrasen, fenantren ve benzeri halkalı bileşikler
	Heterosiklik Bileşikler	Piridin, pirol, diazin, piron, kinolin, akridin, karbazol, alloksazin, lumazin, kumarin ve benzerleri
	Organik boyalar	Fluoran, floresein, eosin, eritrosin, rodamin–B, akridin, reomin–A, magdala kırmızısı, safranin, tionin, metilen mavisi
	Asit, alkol, aldehit ve ketonlar	Etandikarbosilik asit, antranilik asit, umbelliferon-4-karbosilik asit, 1,3-dihidroksibenzen (rezorsinol), 1,2-diformilbenzen (ftalaldehit), 3,5-diasetil-1, 4-dihidroksi-2, 6-lutidin, 2-difenilasetil-1, 3-indandion-1-monohidrazon
Tarım kimyası	İnorganik tarımsal Bileşikler	Selenyum, mağnezyum, bor florürler, alüminyum ve kalay bileşikleri
	Organik tarımsal bileşikler	İnsektisit ve pestisitler
	Tabii ürünler	Klorofiller, pigmentler
	Vitaminler	A_1, B_1, B_2, B_6, C, D ve E
	Proteinler	Süt proteinleri (kazein, laktik asit)
Sağlık hizmet sektörü ve çevre kimyası	Çevre kirliliği yapan bileşikler	İnsektisit kirlilik ürünleri, su ve hava kirlilik ürünleri (azot bileşikleri, sülfür bileşikleri, ozon ve bazı kanserojen aromatik hidrokarbonlar
	Zehirli metal Bileşikleri	Berilyum, bor, kurşun, uranyum, kadmiyum ve bileşikleri

Çizelge 2.5. (devamı)

KULLANIM ALANI	ANALİT TÜRÜ	ÖRNEKLER
Besin kimyası	Karbonhidratlar	Glukoz, fruktoz, maltoz, laktoz, sellobiyozun rezorsinol ve ksantenon ile türevleri
Farmakoloji	İlaçlar	Barbitüratlar, salisilatlar, aspirinden salisilik asit, indol, prokain penisilin, alkaloidler, LSD (lizerjik asit dietilamid), tetrasiklinler, N-asetil sistein
Bakteriyoloji	Bakteri	Çeşitli bakteri teşhis ve sayımları
İmmünoloji	Kan numuneleri	Floresant antikor ve antijenler
Klinik patoloji	Elektrolit	Ca^{2+}, Mg^{2+}, inorganik sülfat ve fosfatlar
	Steroidler	Kortikosteroidler, östrojen, projesteron, androjen, testosteron, adrenalin
	Lipidler	Lipoproteinler, fosfolipitler, kolesterol, trigliseritler
	Plazma proteinleri, aminoasitler ve metabolitler	Serum albümini, adenin, sistein, guanidin, triptofan, serotonin, fenilalanin, tirozin, katekolaminler, tiramin, 3-OH tiramin, histidin, histamin, kreatinin, arjinin, homovanilik asit, kinurenik asit, folik asit (nikotinamid), kan glikozu, porfirinler, karbosilik asitler ve ketonlar, kandaki üre azotu, NH_3, hippurik asit, hemoglobin demiri, kolesterol, kortizon
	Enzimler	Dehidrojenazlar, transaminaz, fosfataz, lipaz, kreatinkinaz, LDH-izoenzimler, peroksidazlar
	Alkaloidler	Kodein, morfin, papaverin, nikotin

3.KAYNAK ARAŞTIRMASI

Li ve **Chen** (2001) yaptıkları çalışmada vitamin analizleri için birçok metot olduğunu belirtmiş ve bu metotları mikrobiyolojik tayin, spektrofotometre, florimetre, atomik absorpsiyon spektrometresi, kapiler elektroforez ve HPLC şeklinde belirtmiştir. Bunların arasında vitamin tayininde kullanılan en genel metot HPLC' dir. Çünkü vitaminler yağda çözünen ve suda çözünen diye gruplandırılmışlardır ve vitaminlerin tayini iki ayırma ile yapılır. 6-7 tane suda çözünen vitaminler HPLC ile tek deneyle eşzamanlı ayrılabilir ve 3-4 tanede yağda çözünen vitaminler başka bir HPLC ile eşzamanlı tayin edilebilir. Suda ve yağda çözünen vitaminlerin bugüne kadar eşzamanlı tayinleri yapılamamıştır, bu metot ile hazır ilaç ürünlerinde 12 adet suda ve yağda çözünen vitaminin eşzamanlı tayinleri HPLC-DAD ile yapılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Yaptıkları çalışmada hareketli faz olarak metanol, KH_2PO_4 tampon çözeltisi ve su kullanarak gradient elüsyon gerçekleştirmişlerdir.

Klejdus ve arkadaşlarının 2004 de yaptığı çalışmada, HPLC-DAD ile suda ve yağda çözünen vitaminlerin eşzamanlı tayinini yapmak için geliştirdikleri yöntemde meta chem polaris C18-A kolon (150 mm x 4.6 mm, 3μm) gradient ve izokratik elüsyon teknikleri denenmiştir. Hareketli faz olarak % 0.01 TFA (solvent A) ve metanol (solvent B) kullanımı sonucunda, gradient elüsyon (A:B) 95:5 oranında başlatılıp 4 dk boyunca devam etmiş ve sonraki 6 dk içinde oran lineer olarak 2:98'e düşürülmüş ve 20 dk bu oranda akış gerçekleşmiştir. Ayırmanın son 5 dakikasında ise su fazı lineer olarak 95:5 şeklinde yükseltilmiştir. Dalgaboyu 280 nm ve akış hızı 0.7 mL/dk olarak belirlenmiştir. Bu metot hazır ilaçlar, güçlendirilmiş toz içecekler ve gıda numunelerindeki vitamin tayininde başarıyla uygulanmıştır.

Vitaminler normal büyüme, kendi kendine bakım, insan ve hayvan vücudunu düzenlemesi açısından çok gereklidirler ve metabolizmada farklı spesifik ve hayati fonksiyonları vardır. Eksiklikleri veya fazlalıklarında belirli hastalıklar üretebilir. **Ball** (1998)'ın çalışmasında insan beslenmesi için gerekli olan 12 vitamini tanımladı ve bunları çözünürlüklerine göre iki ana gruba ayırmışlardır. Yağda çözünen vitaminler (A,D,E,K) ve suda çözünen vitaminler (vit C ve vit B grubu elemanları) B vitamin grubu elemanları; thiamin(B_1), riboflavin (B_2), niacin, B_6, pantothenic asit, vit B_{12}. D vitamini ve K vitamini

insan vücudu tarafından yeterli oranda üretilememesinden dolayı dışarıdan tedarik edilmelidir.

Gimeno (2000) ve arkadaşları α-tokoferol ve β-karotenin zeytinyağında ters faz HPLC ile tayini üzerinde çalışma yapmıştır. Metot hızlı bir sabunlaştırma işlemi ve ardından hekzan-etil asetat ile ekstraksiyon yapılmasını içermektedir. Hareketli Faz olarak; metanol-su-butanol kullanılmıştır. Kolon olarak ise ODS-2 kullanılmıştır. Diode array dedektör kullanımıyla beraber, linearite, kesinlik, geri alım ve hassaslık için memnun edici sonuçlar alınmıştır. Bu metodun başlıca avantajı hız ve eş zamanlı tayin imkanıdır.

Vitaminler hem kimyasal hem de analitik olarak çeşitli bileşenlerden oluşur, çünkü çok geniş oranda biyomoleküller içerirler. Çeşitli kimyasal şekillerde mevcut olabilirler, fakat biyolojik olarak içdönüşüm yapabilen formdadır. Dayandıkları temel özellik, hayvanlar ve insanlar için esas günlük diette olması gereken bileşenlerdir. Hayatı devam ettirmek ve iyi bir sağlık için oldukça küçük miktarda ihtiyaç vardır. Ayrıca erkeklerdeki IQ (initial non-verbal) ve L-askorbik asit arasında özel bir ilişki de bulunmaktadır.

Vitaminler depolama, saklama gibi işlemler boyunca kimyasal reaksiyonlar dolayısıyla bir miktar kaybolabiliyorlar, bu nedenle vitamin eksikliğinde bunu günlük alımlarla telafi etmek gerekir, multivitamin hazır ilaçların yaygınlaşması da bu ihtiyaçtan kaynaklanmaktadır. Bu kompleks hazır ilaçların kalite kontrolü içinde teşvik edici araştırmalar ve etkili analitik metotlar kullanılmaktadır. Bunlardan birini de **Blinkhorn** (1991) de yapmıştır.

Delgado (2002) ve arkadaşları yağda ve suda çözünen vitaminlerin elektrokinetik kapiler kromatografi ile ayırımı ve eşzamanlı tayini üzerine yapılan çalışmada, sodyum dodesil sülfat ve bis (2-ethylhexyl) sodyum sulfosuksinate gibi maddeler kullanılmıştır. Su, asetonitril, sodyum borat gibi maddeler kullanılarak ayırma başarıyla gerçekleştirilmiştir. En iyi resolüsyonu sağlamak için farklı değişkenlerle birçok çalışma denenmiştir. pH, kullanılan tampon konsantrasyonu, asetonitril yüzdesi, uygun voltaj çalışılan değişkenlerdir. Her analit için kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve sonuçta bu metot hazır ilaçlarda başarıyla uygulanmıştır.

Moreno ve Salvado (2000) multi vitamin ilaç ürünlerinde HPLC ile sekiz adet suda ve yağda çözünen vitaminlerin tayini üzerine yaptığı çalışmada, ters faz HPLC metodu geliştirilmiştir. Numunede katı faz ekstraksiyon tekniği uygulanmıştır. Kolon olarak Nova-pack C18 kolonu ve hareketli faz olarak da, suda çözünen vitaminler için metanol- amonyum asetat ile, yağda çözünen vitaminler için metanol- asetonitril kullanılmıştır. UV-Vis ile suda ve yağda çözünen vitaminlerin 285 nm de tayini yapılmıştır. Metodun doğruluğu testi sonucu % 78-116 oranında geri kazanım sağlanmıştır.

Geleneksel yöntemlerle beslenen hayvanlar kış boyunca ve özellikle de ilkbahara doğru vitamin eksikliği riskiyle yüz yüze kalırlar. Uzun süre vitamin içeriği yönünden yetersiz yemlerle beslenmeleri sonucu hayvanlar giderek çok yönlü verim kaybına uğrarlar. Hastalıklara dirençleri azalarak hastalanma ve ölüm oranı artar. Belirtilen açıklamalardan da anlaşılacağı gibi, yüksek verime yönelik hayvan beslemesi sadece temel besin maddeleri yönünden zengin rasyonların verilmesiyle gerçekleştirilemeyip, rasyonun dengeli miktarda mineral tuzları, oligo elementler ve vitaminleri de içermesi zorunludur. Hayvanların vitamin ihtiyaçları karşılanırken öngörülen miktarlar, en olumsuz koşullar altında bile yetersizlik ortaya çıkmayacak şekilde güven payı eklentileriyle arttırılması gerekir. Vitaminler, diğer etkin öğeler kadar, yüksek zehirlenme riski yaratmazlar. Ancak, A ve D vitaminleri gibi bazı çeşitlerin günlük alım miktarları sürekli olarak günlük alım miktarının çok üstünde tutulursa, hipervitaminozis olarak adlandırılan zehirlenmelere sebep olabilirler.

Elton ve Stacey (1980) balık yağı ve yemlerde yağda çözünen vitaminlerin HPLC ile ayırımında yaptıkları çalışmada kolon olarak Micro pak-CN kullanmışlardır. Hareketli faz olarak balık yağında ve yemlerde, metilen klorür- kloroform- hekzan (3:2:15) kullanılmıştır. Güçlendirilmiş yem numuneleri hekzan- kloroform- etanol (6:3.5:0.5) kullanılarak çözülmekte, ardından santrifüj yapılmaktadır. Bu yöntemle A, D, E, K3 vitaminlerinde başarılı sonuçlar alınmaktadır

Zonta ve Stancher'in (1982) yaptığı, gıda numunelerinde vit A, E ve karoten varlığında D2 ve D3 vitaminlerinin ve bunların izomerlerinin HPLC ile ayırımı ve tanınması konulu çalışmada, D2 ve D3 vitaminleri ve bunların izomerleri HPLC kullanılarak tayin edilmektedir. Asetonitril- metanol- su kullanımıyla gradient elüsyon yapılmaktadır. Dedektör

olarak UV-Vis dedektörle çalışılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda tek enjeksiyonla maksimum hassaslık alınmıştır

Mulholland ve Dolphin'e (1985) göre besinlerdeki yağda çözünen vitaminler ısı, hava ve ışıktan etkilenmezler. Oysa, arı halde bulunan beta-karoten (provitamin A), E ve K vitaminleri çevresel koşullarla kolaylıkla parçalanırlar. Tiamin, folik asit, pantotenik asit ve özellikle askorbik asit gibi suda çözünen vitaminler, besin maddelerinin kaynatma, fırınlama gibi ısısal işlemler sırasında kısmen veya tamamen parçalanırlar. Riboflavin ve folik asit ultraviyole ışığına duyarlıdır. Askorbik asit beklemekle çabucak oksitlenir ve etkinliğini kaybeder. Hava ve ışık etkisiyle bozulabilen vitaminleri içeren yem hammaddelerinin hiç değilse kolayca parçalanabilen ve sık beslenme değişikliklerine yol açabilen vitaminlerce zenginleştirilmesi öngörülür. Yağda çözünen vitaminlerin HPLC- multi channel UV-Vis ile analizi çalışmasında hareketli faz olarak hekzan- izopropanol (95.5:0.5 v/v) kullanılmıştır. Bütün referans maddeler hekzanda çözülerek hazırlanmıştır. A vitamini için 330 nm ve α-tokoferol için 290 nm de çalışılmıştır. Geri dönüşün % 86-96.8 arasında bulunmuştur

Qian ve Sheg'in (1998) yaptığı çalışmanın amacı hayvan yemlerinde A, E, D vitaminlerinin ve D_2 pro-vitamininin tek adımda ekstraksiyonu ve eş zamanlı tayinini yapmak için metot geliştirmektir. Numune partikül boyutu, ekstraksiyon solventleri, numunedeki solvent oranları, ekstraksiyon yaklaşımı, ekstraksiyon zamanı, N_2 koruması ve uygun dalgaboyu gibi çeşitli analitik şartlar test edilmiş ve geliştirilen metodun doğruluğu AOAC (Association of Official Analytical Chemists) metodu ile karşılaştırılarak kanıtlanmıştır. Tekrar üretilebilirliği ise tekrarlanan geri kazanım çalışmalarıyla gösterilmiştir. Yem numunelerinde dört vitamin için tespit limiti 10 ng/g olarak bulunmuştur.

Yukarıda özetlenen konu ile ilgili literatürlerde yapılanlardan farklı olarak bu çalışmada yem ve yem katkı numunelerinde eşzamanlı vitamin analizleri yapılmıştır. Ayrıca farklı yeni bir kolon kullanılırken, dalga boyu ve ekstraksiyon çözücüsü v.b. gibi parametrelerde farklılıklar yapılarak çalışılmıştır.

4.MATERYAL VE METOT

4.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada, kromatografi ölçümleri için Konya İl Kontrol Laboratuarında bulunan Agilent marka 1100-1200 serili sıvı kromatografi cihazı ve DAD (diode array dedektör) dedektörden oluşan yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanıldı. Pompa akış hızı 0.7 mL/dak olup DAD dedektör dalga boyu için 265, 280, 292 ve 325 nm de çalışmalar yapıldı.

HPLC ana parçaları;

a.1200 series G1379 B Degasser

b.1100 series G1310A Iso Pump

c.1200 series G1329A ALS (otosampler)

d.1100 series G1316A TCC (kolon fırını)

e. 1100 series G1315B DAD

Deney çözeltilerinin pH'larını ayarlamak amacıyla, WTW 330İ marka pH-metre kullanıldı. pH-metrenin kalibrasyonu, WTW marka pH 4 ve pH 10 tampon çözeltileri kullanılarak yapıldı.

Analizlerde kullanılan ultra saf su, Millipore Elix-3 ultrasaf Su Cihazından elde edildi.

Santrüfüj tüpüne alınan numuneler Velp Scientifica marka vortexde karıştırılıp Hettich marka santrifüjde santrifüj edildi.

Kullanılan diğer cihazlar:

- Hassas terazi (Sartorius)
- Vakum pompası (Neuberger)
- Ultrasonic Banyo (Bandelin Sonarex)
- Manyetik Karıştırıcı (Stuart Scientific)

4.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

4.2.1 Kullanılan vitamin standartları

Bu çalışmada analizlerde kullanılan standart vitaminler ve temin edildikleri firmalar Çizelge 4.1' de verilmiştir

Çizelge 4.1. Vitaminler ve temin edildikleri firmalar

Vitaminler	**Firma**
Vitamin A (Retinol asetat)	Sigma-Aldrich
Vitamin E (α-Tocopherol)	Sigma
Vitamin D_3 (Cholecalciferol)	Sigma
Vitamin K_3 (Menadione)	Supelco
Vitamin B_2 (Riboflavin)	Supelco
Vitamin B_{12} (Cyanocobalamin)	Supelco
Folic Acid	Supelco
Vitamin C (Ascorbic Acid)	Supelco
Vitamin B_6 (Pyridoxine)	Supelco
Nikotinik asit	Supelco

4.2.2. Kullanılan çözücüler

Bu çalışmada kullanılan çözücüler, kimyasal maddeler, saflık dereceleri ve temin edildikleri firmalar Çizelge 4.2' de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kullanılan Kimyasal Çözücüler, Saflık Dereceleri ve Firmalar

Madde	**Saflık Derecesi**	**Firma**
Metanol	Kromatografik saflıkta	Merck
TFA(trifluoro asetik asit)	Kromatografik saflıkta	Merck
KOH	Analitik saflıkta	Merck
Asetik Asit	Kromatografik saflıkta	Merck

4.2.3.Kullanılan yem katkı numuneleri

Çalışmamızda vitamin analizi yapmak üzere numune olarak yem ve yem katkı maddeleri Konya İl Kontrol Laboratuarına gelen numunelerden sağlanmıştır. Bu numuneler Çizelge 4.3 de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Analizi yapılan yem katkı numuneleri ve içerikleri

Vitaminler	Nutrimix-süt	Nutrimix-besi	Anamix
Vitamin A	450 mg/kg	450 mg/kg	300 mg/kg
Vitamin D_3	7.5 mg/kg	7.5 mg/kg	7.5 mg/kg
Vitamin E	3000 mg/kg	3000 mg/kg	1200 mg/kg
Vitamin K_3	-	-	100 mg/kg
Vitamin B_2	300 mg/kg	-	200 mg/kg
Vitamin B_6	50 mg/kg	-	10 mg/kg
Vitamin B_{12}	20 mg/kg	-	-
Vitamin C	-	-	5 mg/kg

4.2.4. Çözeltilerin hazırlanması

4.2.4.1. Standart çözeltiler

Bölüm 4.2.1. de adı geçen standart vitaminlerden suda çözünen vitaminlerin (riboflavin, pyridoxine, nikotinik asit, cyanokobalamin, folik asit ve C vitamini) stok

çözeltileri su ile yağda çözünen vitaminlerin (A, D_3, K_3, E) stok çözeltileri ise metanolle konsantrasyonları 1000 mg/L olacak şekilde hazırlandı, 4 ^{0}C'de karanlıkta saklandı. Bu çözeltilerden 0,1; 1; 5; 10 mg/L olacak şekilde A, D_3, B_{12}, B_2 vitaminleri; 0,5, 1, 5, 10 mg/L olacak şekilde E, Nikotinik Asit, K_3 vitaminleri; 0.2, 1, 5, 20 mg/L olacak şekilde vitamin C; 0.5, 1, 5, 10, 20 mg/L olacak şekilde B_6 vitamini ve 1, 5, 10, 20 mg/L olacak şekilde Folik asit çözeltileri hazırlandı.

Suda çözünen vitaminlerin çalışma standart çözeltileri su ile yağda çözünen vitaminlerin çalışma standart çözeltileri metanolle seyreltilerek hazırlandı. Çalışma standart çözeltileri günlük olarak hazırlandı.

4.2.4.2. Diğer çözeltiler

% 0,01 TFA çözeltisi: TFA dan 0,1 mL alınarak ultra saf su ile balon jojede 1000 mL' ye tamamlandı. Vakum pompasında millipore marka durapore membrane filtre kağıdında (0.45µm) süzülerek hazırlandı.

1M KOH çözeltisi: KOH dan 5,6 gram alınıp suyla 100 mL' ye tamamlandı.

TFA- MeOH çözeltisi: %0.01 TFA – MeOH (%20 - %80). %0,01 TFA' dan 10 mL alınıp MeOH ile 50 mL' ye tamamlandı.

4.3. Deneysel İşlem

4.3.1. Vitaminlerin kromatografik özelliklerinin incelenmesi

Bölüm 4.2.4.1 de hazırlanan standart vitamin çözeltilerinden 20 µL alınarak, 0,7 mL/dak akış hızında Çizelge 4.4 de verilen gradient elüsyon kullanılarak ve uygun dalga boylarında tek tek kromatogramları alındı ve her bir vitamin için çıkış zamanları tesbit edildi.

4.3.2. Vitamin analizi için uygun şartların belirlenmesi

4.3.2.1. Ekstraksiyon çözeltisinin oranının belirlenmesi

Çalışmada kullanacağımız ve yem numunelerimizi ekstrakte edebileceğimiz en uygun çözelti bileşimini tespit etmek amacıyla Trifloroasetikasit (TFA) ve Metanol (MeOH) içeren çözeltiler ile denemeler yapıldı. TFA ve MeOH'ün yüzde bileşimleri değiştirilerek ekstraksiyon çözücüsü denendi. Sırasıyla % TFA- % MeOH: 100-0, 80-20, 50-50, 20-80, 0-100 olacak şekilde hazırlanıp numuneler bu çözücü bileşiminde ekstrakte edildi.

Daha sonra numunelerdeki vitaminleri daha iyi çözelti ortamına alabilmek amacıyla kalıntı, ikinci bir ekstraksiyon çözücüsü ile işleme tabi tutuldu. Bu işlemler için;

1. Numune %70 TFA-%30 MeOH içeren çözelti ile ekstraksiyon edildikten sonra kalıntı %10 TFA - %90 MeOH içeren çözelti ile ekstrakte edildi ve ekstraktlar birleştirildi.
2. Numune %80 TFA - %20 MeOH içeren çözelti ile ekstraksiyon edildikten sonra kalıntı %10 TFA - %90 MeOH içeren çözelti ile ekstrakte edildi ve ekstraktlar birleştirildi.

   Çalışmalarda alınan sonuçlar deney sonuçlarında Çizelge 5.2'de gösterilmiştir.

4.3.2.2. Karıştırma süresi belirlenmesi

Numunelerden vitaminlerin ekstrakte edilmesi sırasında uygun çözücü ilave edildikten sonra Vortexte karıştırma süresi olarak sırasıyla 5, 15 ve 25 dakika denendi. Yapılan çalışmalar sonucunda en uygun karıştırma süresi belirlendi.

4.3.3. Uygun kromatografik şartlarının belirlenmesi

4.3.3.1. Uygun dalga boyunun seçimi

Çıkış zamanı tespit edilen her bir vitaminin analiz yapılabilecek ve en yüksek alanı verdiği dalga boyunu belirlemek için standart vitamin çözeltileri ile dört dalga boyunda kromatogramları alındı. 265 nm, 280 nm 292 nm ve 325 nm dalga boyları kullanılarak denemeler yapıldı ve her bir vitamin için en orantılı alanı veren dalga boyları belirlendi.

4.3.3.2. Uygun kolonun seçimi

Standart vitaminler ve yem katkı numunelerinde eş zamanlı vitaminleri en iyi ayırabilen kolon seçimi için iki farklı kolon ile ayırma ve tayinler denendi. Bu kolonlar;

- Hıchrom 5 C18-250A 25cm x 4.6mm 5 micron ve,
- Phenomenex gemini 3u C18 110A 150x4.60mm 3 micron'dur. Tayini yapılacak olan vitaminlerin en iyi ayrılmasını sağlayan kolon seçildi.

4.3.3.3. Gradient elüsyonun belirlenmesi

Suda ve yağda eriyen vitaminlerin eş zamanlı ayırımını yapabilmek için vitaminlerin pik verdikleri dakikalarda, akış hızında ve hareketli faz (A: TFA, %0,01 ve B: MeOH) yüzdelerinde değişiklikler yapılarak vitamin pikleri değerlendirildi. Yapılan çalışmalar sonucunda en uygun elüsyon oranı Çizelge 5.8.'da gösterildiği şekilde belirlendi.

4.3.4. Kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi

Bölüm 4.2.4.1. de hazırlanan standart vitamin çözeltileri kullanılarak belirlenen kromatografik şartlarda Çizelge 4.4' de verilen aralıklarda çözeltiler hazırlanıp konsantrasyon alan eğrileri çizildi. Her bir eğrinin istatistik değerlendirmesi yapıldı.

Çizelge 4.4. Vitaminler ve Kalibrasyon Aralıkları

Vitamin	**Kalibrasyon Aralığı (mg/L)**
Vitamin A	0.1-10
Vitamin D_3	0.1-10
Vitamin E	0.5-10
Vitamin K_3	0.5-10
Vitamin C	0.2-20
Nikotinik asit	0.5-10
Vitamin B_6	0.5-20
Vitamin B_{12}	0.1-10
Vitamin B_2	0.1-10
Folik Asit	1.0-20

4.3.5. Yem ve yem katkı maddelerinde eşzamanlı vitamin tayini

Numuneden 2,00 gram tartılarak santrüfüj tüpüne alındı. Üzerine %TFA- %MeOH oranı 20-80 olan ekstraksiyon çözücüsünden 8 mL ilave edilerek vortexte 15 dk karıştırıldı. Daha sonra 15 dk santrifüj edildi (5000 x g, 15 dk, 24 ^{o}C). Elde edilen santrifugattan uygun miktarda alınarak TFA- MeOH çözeltisiyle seyreltildi. 0,45 µm filtreden süzülerek viale alındı ve cihaza enjekte edildi. Kalibrasyon grafikleri ve doğru denklemlerinden faydalanarak her bir vitamin miktarı okundu. Seyreltme faktörleri ile son değerleri hesaplandı.

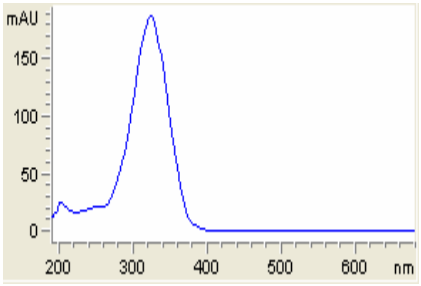
Geri kazanım çalışması kapsamında öncelikle içerisinde miktarı bilinen yem katkı numunelerinin analizi yapıldı. Bu analizler 6 kez yapılarak istatistiki değerlendirmesi verildi. Daha sonra bu numunelere bilinen miktarda standartlar spike edildi ve geri almaları incelendi. Tayin limiti ve tespit limit çalışmaları metoda uygulandı.

5. DENEY SONUÇLARI

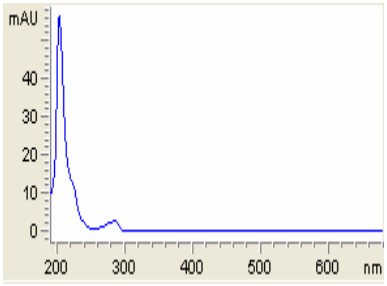
5.1. Vitaminlerin Kromatografik Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Her bir vitaminin kromatografik özelliklerini belirlemek içi bölüm 4.2.4.1 de anlatıldığı şekilde standart vitamin çözeltilerinin kromotogramları alındı. Çizelge 5.1'de standart vitamin çözeltileri için çıkış zamanları ve dalga boyları verilirken, Şekil 5.1.'de de vitaminlerin spektrumları verildi.

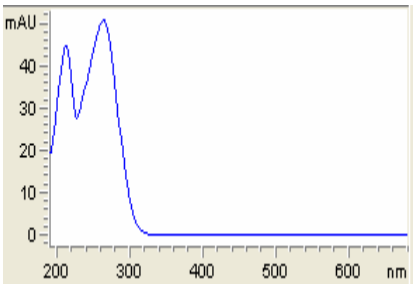
VİT A



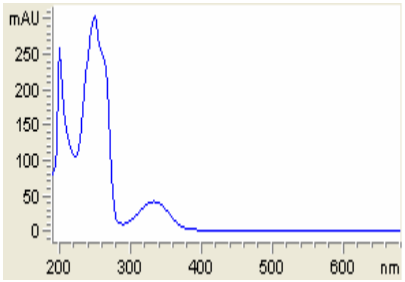
VİT E



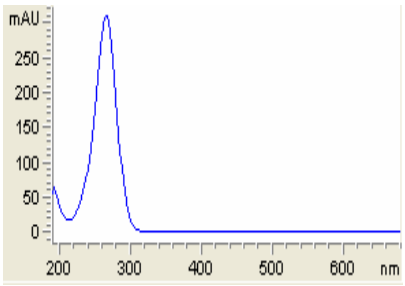
VİT D_3



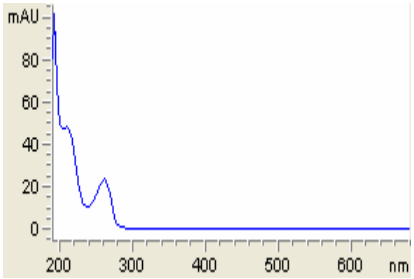
VİT K_3



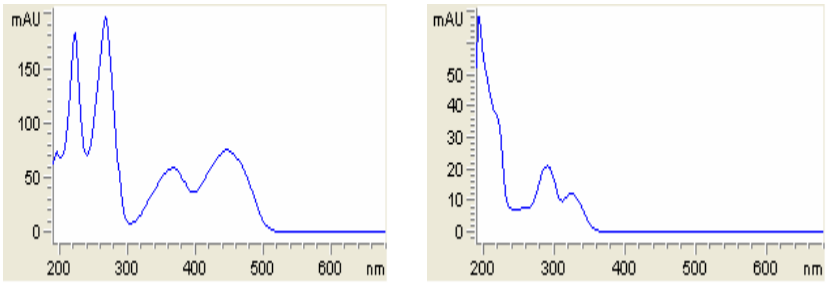
VİT C



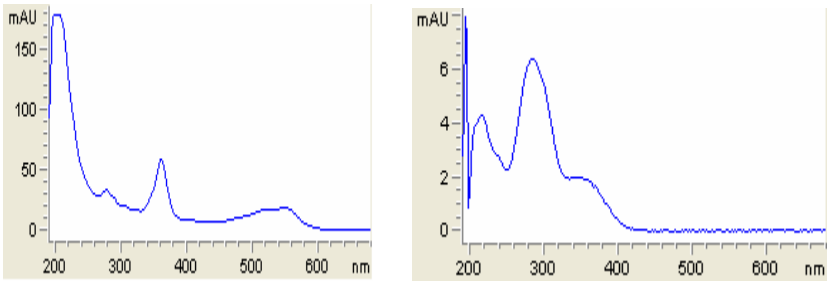
NİKOTİNİK ASİT



VİT B_2 **VİT B_6**



VİT B_{12} **FOLİK ASİT**

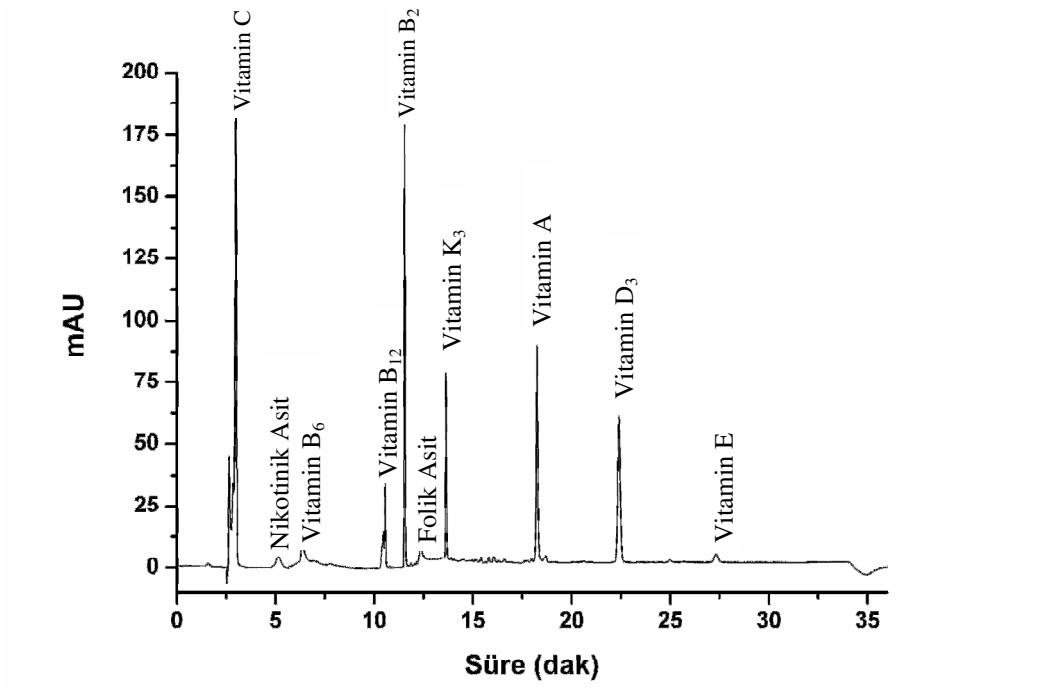


Şekil 5.1. Vitaminlerin Spektrumları

Çizelge 5.1. Vitamin Standartlarının Çıkış Zamanları ve Dalga Boyları

Vitaminler	**Çıkış zamanı(dk)**	**Dalga boyu (nm)**
Vitamin C	3,02	280
Nikotinik asit	5,15	280
Vitamin B_6	6,28	280
Vitamin B_{12}	10,60	280
Vitamin B_2	11,33	280
Folik asit	12,21	280
Vitamin K_3	13,56	265
Vitamin A	18,32	325
Vitamin D_3	22,58	265
Vitamin E	27,63	280

Standart vitaminler karışım halinde kromatogramları alınmış, her birinin pikleri ve çıkış zamanları Şekil 5.2. de verilmiştir.



Şekil 5.2. Vitaminlerin karışım kromatogramı

5.2. Vitamin Analizi İçin Uygun Şartların Değerlendirilmesi

5.2.1. Ekstraksiyon çözeltisinin oranının değerlendirilmesi

Çalışmada kullanacağımız ve yem numunelerimizi ekstrakte edebileceğimiz en uygun çözelti bileşimini tespit etmek amacıyla Trifloroasetikasit (TFA) ve Metanol (MeOH) içeren çözeltiler ile denemeler yapıldı. İlk önce tek başlarına TFA ve MeOH ekstraksiyon çözücüsü olarak denendiler ve yalnız TFA kullanımında yağda çözünen vitamin piklerinin tamamen kaybolduğu, yalnız MeOH ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanıldığında ise suda çözünen vitamin piklerinin kaybolduğu gözlendi.

Daha sonra TFA ve MeOH'ün yüzde bileşimleri değiştirilerek ekstraksiyon çözücüsü olarak denendiler. Sırasıyla %TFA- % MeOH: 80-20, 50-50, 20-80 olacak şekilde hazırlanıp numuneler bu çözücü bileşiminde ekstrakte edildi. Yapılan çalışmalar içinde en iyi sonuç ekstraksiyon çözücüsü oranı olarak %80 MeOH –%20 TFA kullanımıyla elde edildi.

Daha sonra numunelerdeki vitaminleri daha iyi çözelti ortamına alabilmek amacıyla kalıntı, ikinci bir ekstraksiyon çözücüsü ile işleme tabi tutularak çift ekstraksiyon yapıldı. Bu işlemler için;

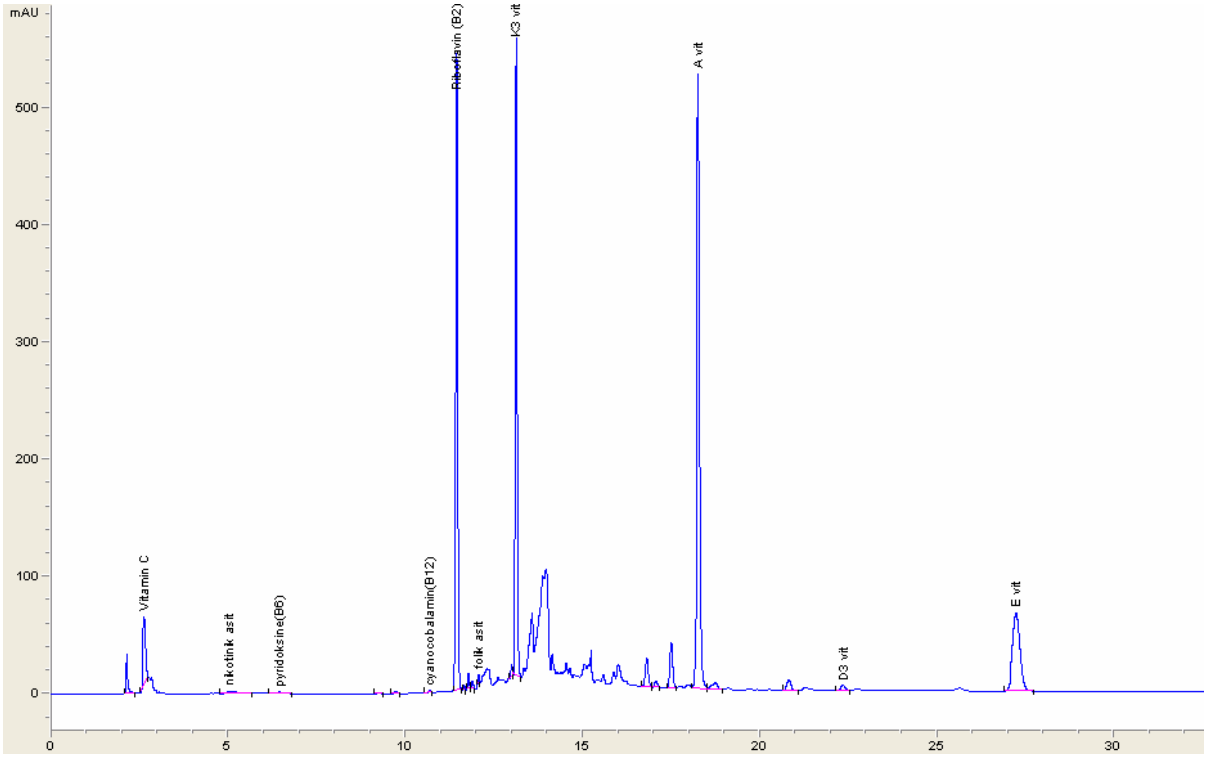
- Numune %70 TFA-%30 MeOH içeren çözelti ile ekstraksiyon edildikten sonra kalıntı %10 TFA - %90 MeOH içeren çözelti ile ekstrakte edildi ve ekstraktlar birleştirildi.
- Numune %80 TFA - %20 MeOH içeren çözelti ile ekstraksiyon edildikten sonra kalıntı %10 TFA - %90 MeOH içeren çözelti ile ekstrakte edildi ve ekstraktlar birleştirildi. Yapılan ikili çalışmalarda özellikle yağda çözünen vitaminlerin geri kazanımında düşüş gözlendi.

Ekstraksiyon çözeltisi oranının belirlenmesinde yapılan denemelerden elde edilen toplu sonuçlar Çizelge 5.2'de vitaminler, % çözücüler ve okunan alan değerleri olarak gösterilmiştir.

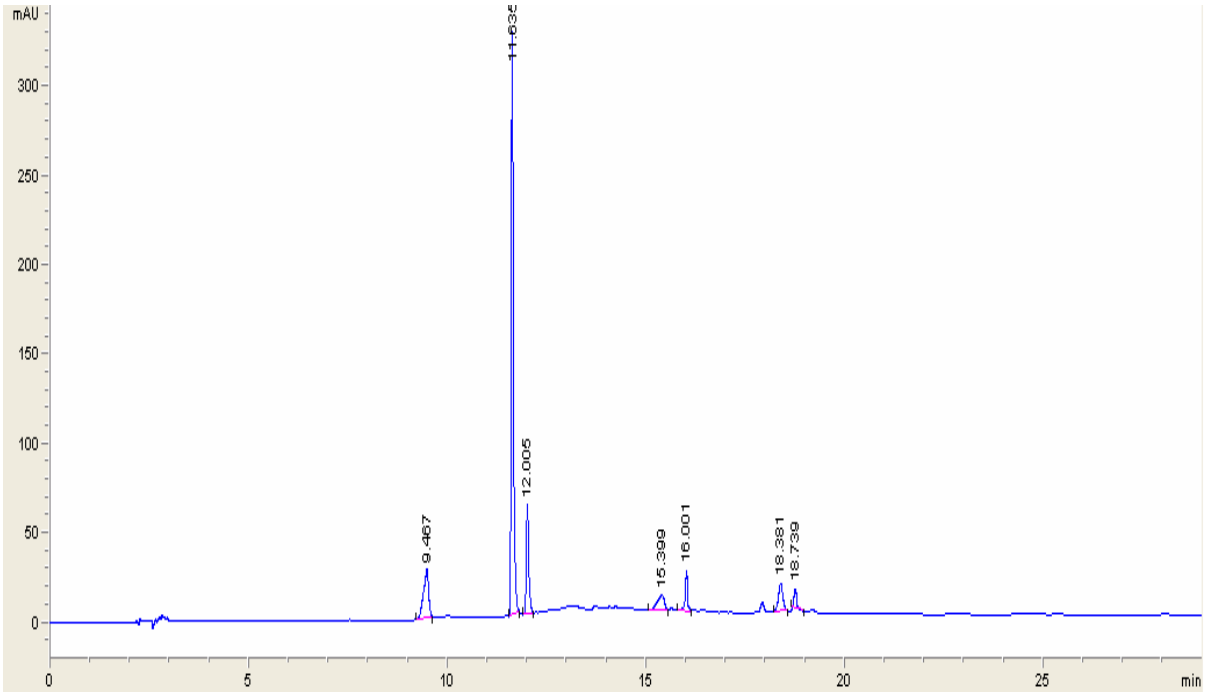
Çizelge 5.2. Ekstraksiyon çözeltisi oranının karşılaştırılması.

% Çözücü / Vitamin	%80 TFA-% 20 MeOH	%50 TFA - %50 MeOH	%20 TFA - %80 MeOH	%70 TFA-%30 MeOH sonra kalıntı %10 TFA-%90 MeOH	%80 TFA-%20 MeOH sonra kalıntı %10 TFA-%90 MeOH
A	-	37.3	5840.6	521.9	1039.4
E	-	-	506.1	-	-
D	-	-	46.6	-	-
B_2	2000.0	456.5	1990.4	1204.7	1356.5

Çizelge 5.2. deki sonuçlardan görüldüğü gibi tüm vitaminlerin eş zamanlı analizi için en uygun ekstraksiyon çözücü oranı % 80 MeOH- % 20 TFA olarak belirlenmiştir ve numunelerde vitamin analizi için bu oran kullanılmıştır.



Şekil 5.3. Ekstraksiyon çözücüsü olarak % 80 MeOH- % 20 TFA kullanımı ile elde edilen numune kromatogramı.



Şekil 5.4. Numune %70TFA- %30MeOH ile ekstrakte edildikten sonra kalıntının %10TFA-%90 MeOH ile ekstrakte edildiği numune kromatogramı.

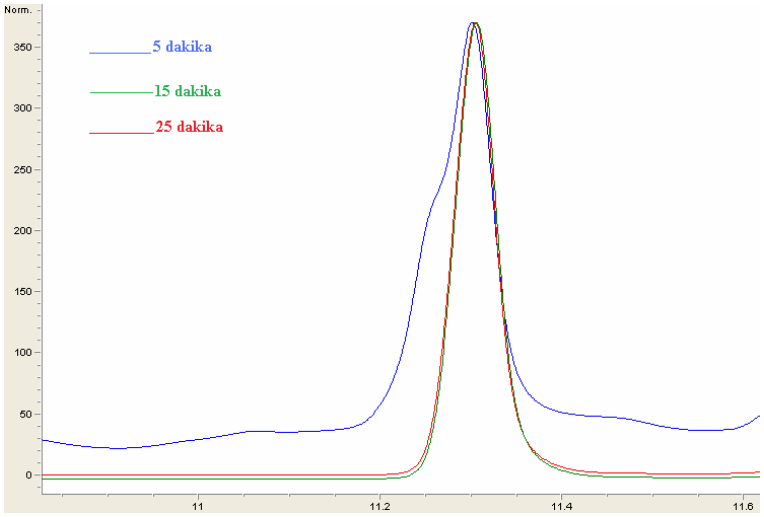
İki kromatogram incelendiği zaman Şekil 5.3.'de K_3, D_3 ve E vitaminlerinin pikleri gözlenirken Şekil 5.4.'de çift ekstraksiyon kullanarak elde edilen numune kromatogramında aynı pikler tespit edilemedi. Aynı şekilde A vitamininin pikinde de düşüş gözlenmiştir.

5.2.2. Karıştırma süresinin değerlendirilmesi

Numunelerden vitaminlerin ekstrakte edilmesi sırasında uygun çözücü ilave edildikten sonra Vortexte karıştırma süresi olarak sırasıyla 5, 15 ve 25 dakika denendi ve Çizelge 5.3'de A, E, D_3 vitaminlerinde karıştırma süreleri sonucunda alınan alan değerleri gösterildi. Karıştırma süresi kısa tutulduğu zaman geri kazanımlar azalırken, 15 dk ile 25 dk arasında önemli bir fark görülmemiştir. Karıştırma süresinin uzaması analiz süresini de etkileyeceğinden, bu vitaminler için en yüksek pik alan değerinin okunduğu 15 dakika vortex süresi en uygun zaman olarak bulunmuştur.

Çizelge 5.3. Değişen Vortex sürelerinde okunan vitaminler ve pik alanları.

Süre(dakika) / **Vitamin**	**5**	**15**	**25**
A	4781.9	6487.5	5781.6
E	744.9	745.2	729.3
D_3	35.7	43.6	44
B_{12}	12,8	31,4	31,4



Şekil 5.5 B_{12} vitamininin çeşitli vortex sürelerindeki kromatogramı

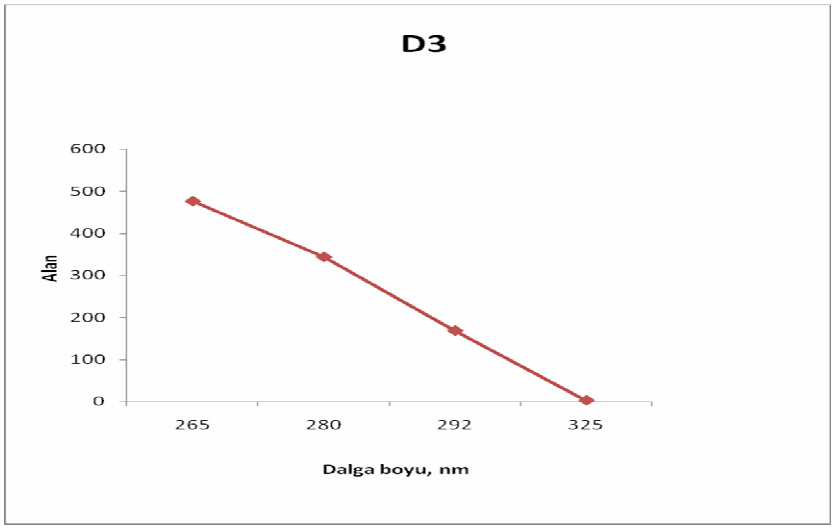
5.2.3. Uygun kromatografik şartlarının değerlendirilmesi

5.2.3.1. Uygun dalga boyunun değerlendirilmesi

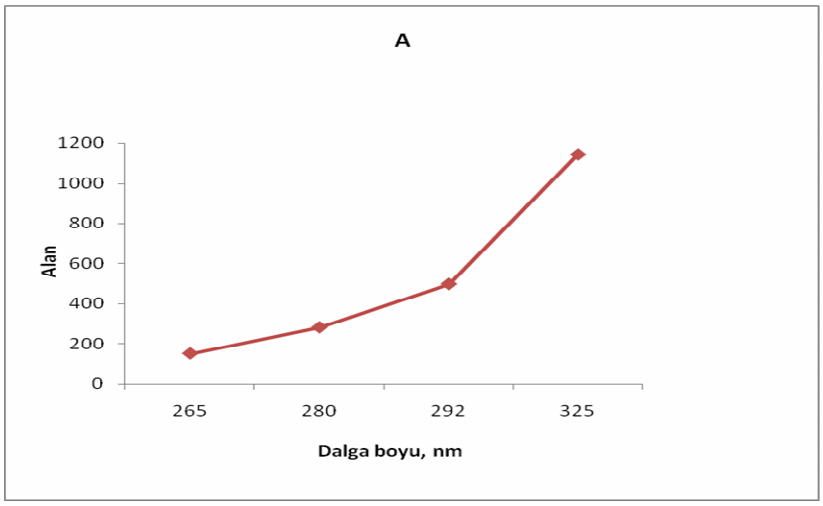
Dalga boyu olarak 280nm, 265nm, 325nm, 292nm dalga boylarında vitaminlerin kromatogramları alındı ve her bir vitamin için piklerin en iyi gözlendiği ve en yüksek alan değerlerinin okunduğu dalga boyları belirlendi (Çizelge 5.4.) (Şekil 5.4.-5.7.). Ayrıca K3 ve D3 vitamininin denenen tüm dalga boylarında kromatogramları şekil 5.8 ve 5.9 da gösterilmiştir. 265 nm de K_3, D_3 vitaminlerinin pikleri iyi gözlenirken, 325 nm de ise A vitamininin piki iyi gözlenmiş, 292 nm de vitaminlerin pikleri diğer dalga boylarına göre düşmüştür. 280 nm de E, B_2, B_{12}, C, Nikotinik asit, B_6, Folik asit vitaminlerinin piklerinin oldukça iyi olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre Çizelge 5.5 de her bir vitamin için kullanılan dalga boyları gösterilmiştir.

Çizelge 5.4. Çeşitli dalga boylarında vitaminlerin alan değerleri (vitamin konsantrasyonları: 10mg/L)

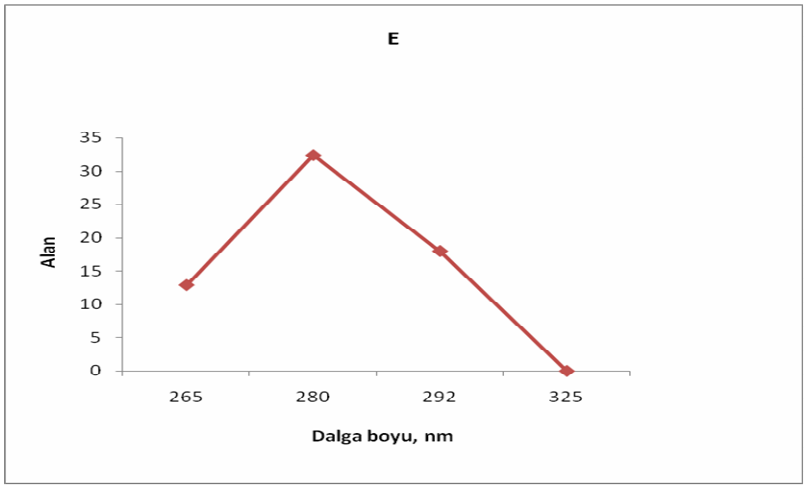
Dalga Boyu (nm)	**Alan**			
	A	**E**	**D_3**	**B_{12}**
265	150,5	12,9	476,2	89,7
280	280,8	32,4	343,7	99,4
292	496,8	18,0	168,4	76,7
325	1142,1	-	2,9	52,3



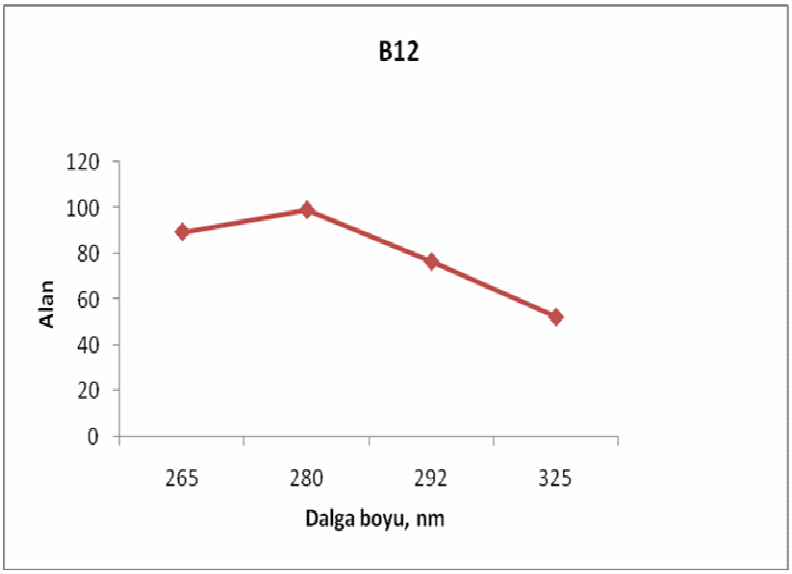
Şekil 5.6. D_3 vitamininin çeşitli dalga boylarında pik alan değerleri



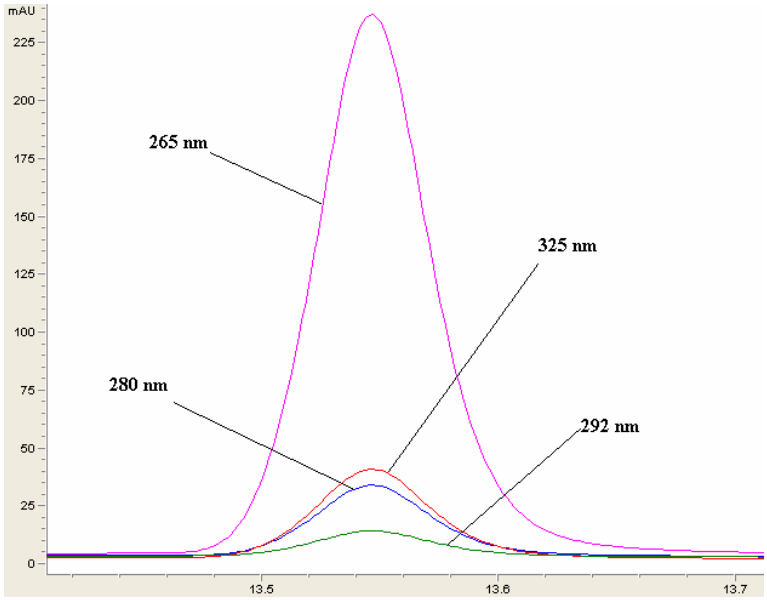
Şekil 5.7. A vitamininin çeşitli dalga boylarında pik alan değerleri



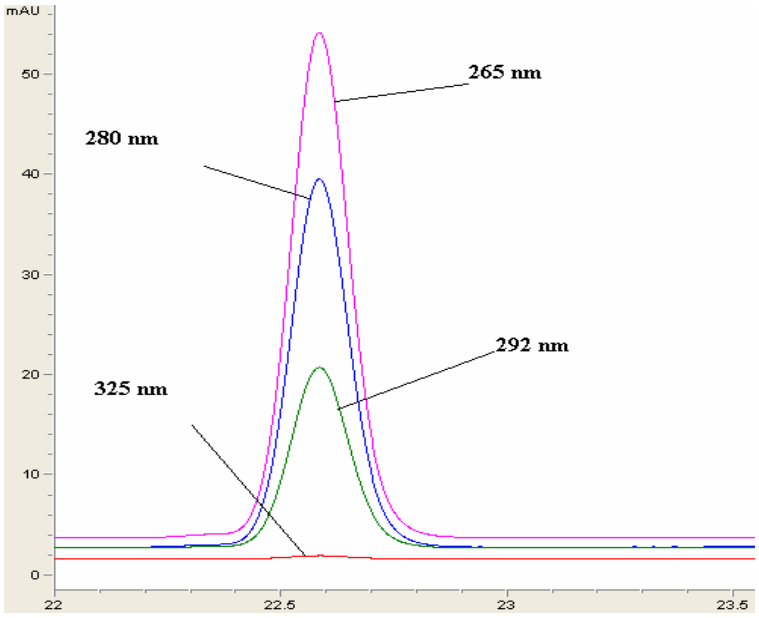
Şekil 5.8. E vitamininin çeşitli dalga boylarında pik alan değerleri



Şekil 5.9. B_{12} vitamininin çeşitli dalga boylarında pik alan değerleri



Şekil 5.10. K_3 vitamininin çeşitli dalga boylarındaki kromatogramı



Şekil 5.11. D_3 vitaminin çeşitli dalga boylarındaki kromatogramı

Çizelge 5.5. Vitamin analizlerinde kullanılan dalga boyları

Dalga boyu (nm)	Vitaminler
265	K_3, D_3
280	E, B_2, B_{12}, C, Nikotinik asit, B_6, Folik asit
325	A

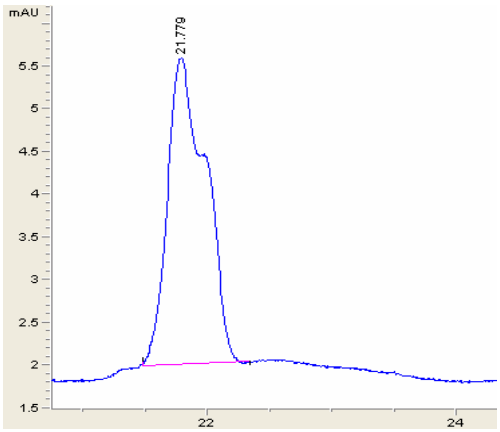
5.2.3.2. Uygun kolonun değerlendirilmesi

Standart vitaminler ve yem katkı numunelerinde iki farklı kolon ile ayırma ve tayinler denenerek çalışmalar yapıldı.

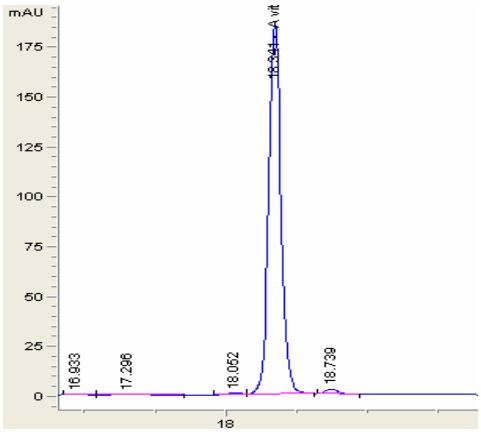
- Hıchrom 5 C18-250A 25cm x 4.6mm 5 micron
- Phenomenex gemini C18 110A 150x4.60mm 3um

Hichrom kolonunda E vitamini 39. dakikada gelip 16.3 alan verirken, phenomenex kolonunda E vitamininin 28. dakikada gelip 32.4 alan değeri verdiği görüldü. Aynı şekilde D_3 vitamini hichrom kolonunda 32,6. dakikada gelip 214 alan verirken, phenomenex kolonunda D_3 vitamini 22,5. dakikada gelip 476 alan verdi. Diğer vitaminlerin de çoğunun phenomenex kolonunda çok daha iyi ayrıldığı ve iyi sonuç verdiği görüldüğü için çalışmaların Phenomenex gemini C18 110A 150x4.60mm 3um kolonu ile yapılmasına karar verildi.

Hichrom kolonu



Phenomenex kolonu



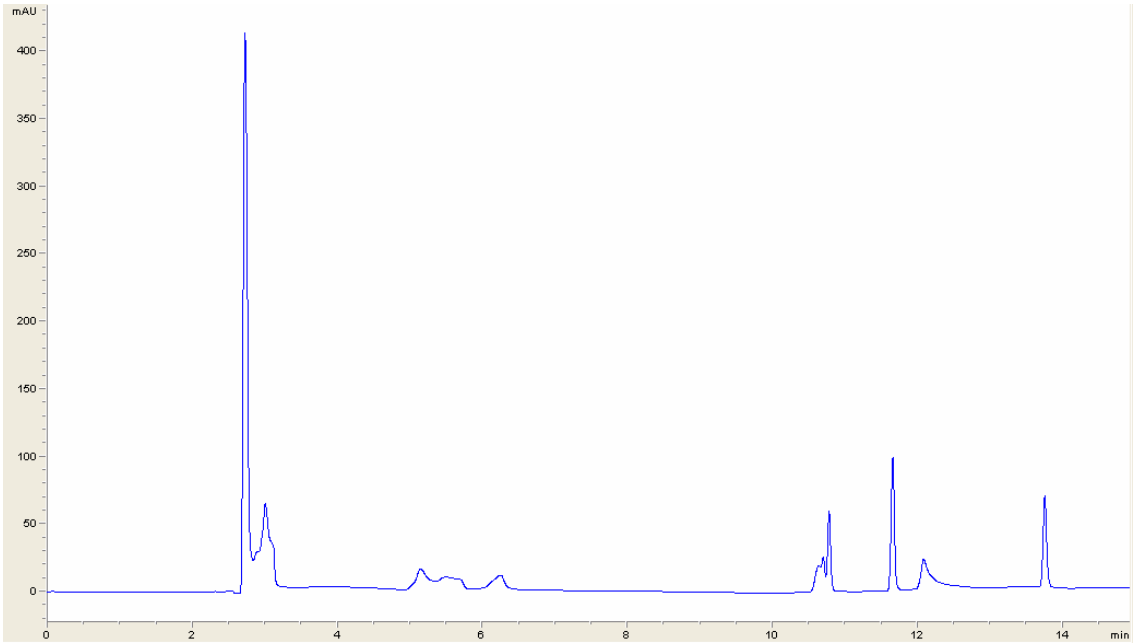
Şekil 5.12. A vitamininin iki farklı kolondaki pikleri

5.2.3.3. Gradient elüsyon çalışmalarının değerlendirilmesi

Gradient elüsyon için akış hızında, dakikalarda ve hareketli faz yüzdelerinde değişiklikler yapılarak en iyi ayırmayı gerçekleştirmek için çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda en iyi gradient elüsyon Çizelge 5.7.'de gösterildiği şekilde gerçekleşmiştir. Çizelge 5.6.'da ise çalışılmış bir gradient elüsyon ve Şekil 5.13.'de bu elüsyon sonucu alınan kromatogram görülmektedir.

Çizelge 5.6. Gradient elüsyon çalışması

Dakika	Hareketli faz A(TFA)%	Harekatli Faz B(MeOH)%	Akış(mL/dk)
0	95	5	0.7
4	95	5	0.7
4.01	95	5	0.6
7	70	30	0.6
7.01	70	30	0.7
10	2	98	0.7
30	2	98	0,7
35	95	5	0,7



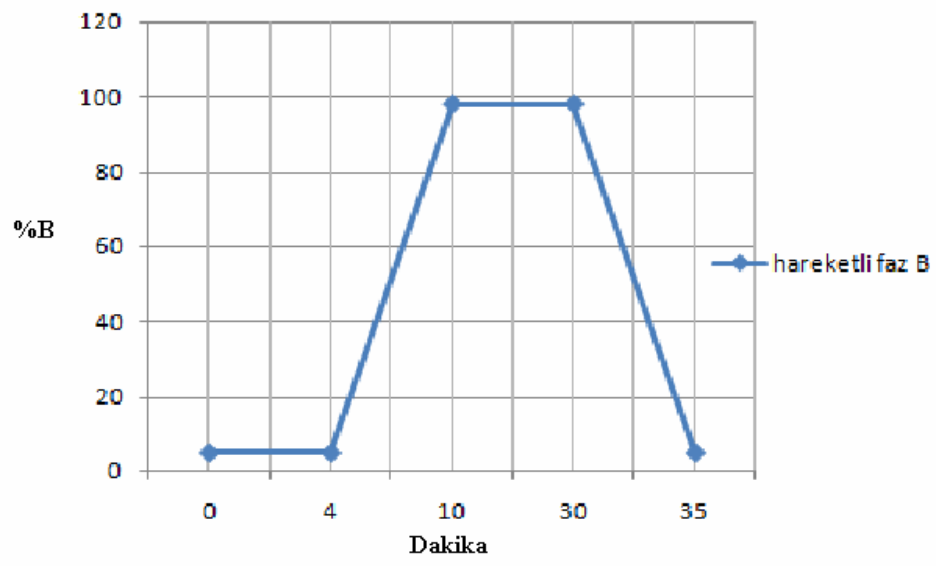
Şekil 5.13. Çizelge 5.6.'da ki gradient elüsyon kullanımıyla alınan kromatogram

Bu elüsyon, 4 dk ile 7 dk arasında gelen piklerin daha iyi ayrılmasını sağlamak için yapıldı, fakat iyi sonuç alınamadı. Yapılan diğer çalışmalar sonucunda da en iyi ayrılma çizelge 5.7.'de gösterildiği gibi gerçekleştiğinden dolayı çalışmalarımızda bu akış programı kullanılmıştır.

Çizelge 5.7. Gradient elüsyon

Dakika	Hareketli faz A(TFA)%	Harekatli Faz B(MeOH)%	Akış(mL/dk)
0	95	5	0.7
4	95	5	0.7
10	2	98	0.7
30	2	98	0.7
35	95	5	0.7

Bu gradient elüsyon sonucu alınan kromatogram şekil 5.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 5.14. Dakikaya karşı hareketli faz B nin akış grafiği

5.2.4.Tespit limiti çalışmalarının değerlendirilmesi:

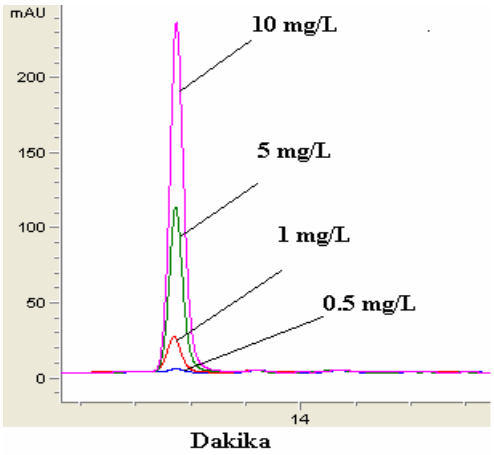
Tespit limiti çalışmalarında, her bir vitamin için cihazda pik olarak görülebilen en düşük miktarlara inilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda aşağıda verilen şekillerde de görüldüğü gibi pik olarak vitamin K_3, vitamin E, Nikotinik asit, vitamin B_6 için cihazda 0,5 mg/L konsantrasyonu görülürken; vitamin A, vitamin D_3,vitamin B_{12} ve vitamin B_2 için 0,1 mg/L; vitamin C için ise 0,2 mg/L konsantrasyonu görülebilmiştir.

Tespit limiti çalışmalarında;

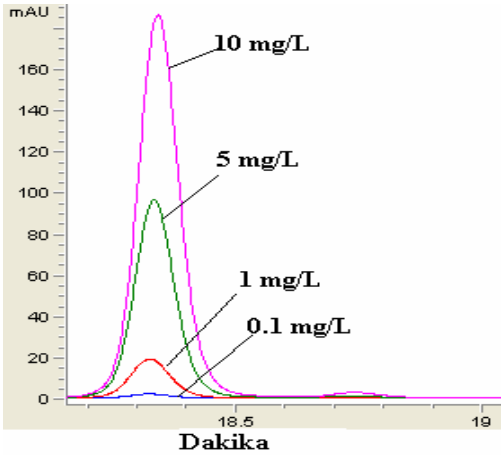
LOD= 3 x S/N

LOQ= 10 x S/N formülleri kullanılmıştır.

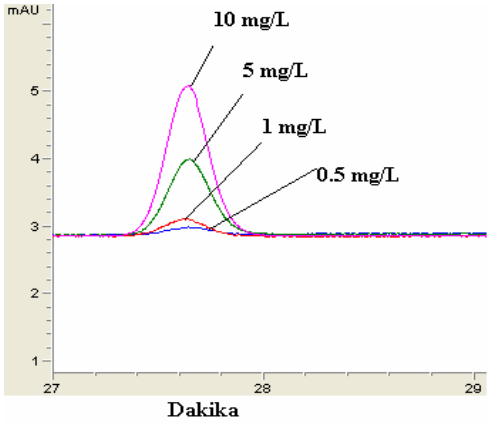
Vitamin K_3 Konsantrasyon (mg/L)	**Alan**
0.5	29.368
1	85.899
5	389.56
10	838.38



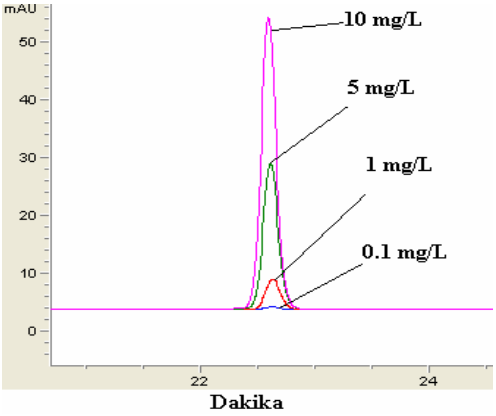
Vitamin A Konsantrasyon (mg/L)	**Alan**
0.1	11.692
1	112.11
5	578.8
10	1138.9



Vitamin E Konsantrasyon (mg/L)	Alan
0.5	1.501
1	3.848
5	16.616
10	32.85

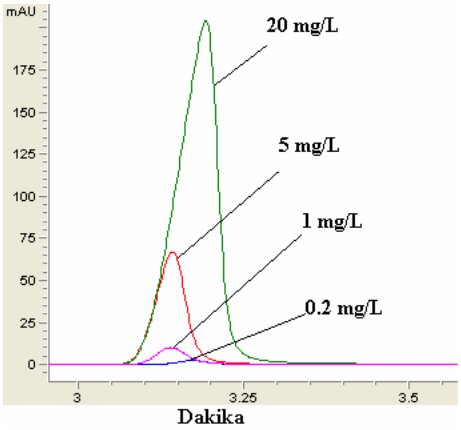


Vitamin D_3 Konsantrasyon (mg/L)	Alan
0.1	3.494
1	48.72
5	235.3
10	475.79



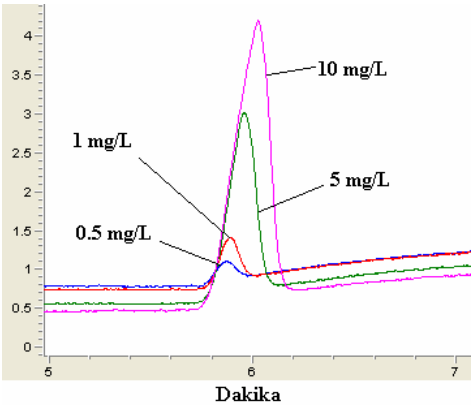
Vitamin C

Konsantrasyon (mg/L)	Alan
0.2	8.028
1	34.919
5	225.09
20	889.74

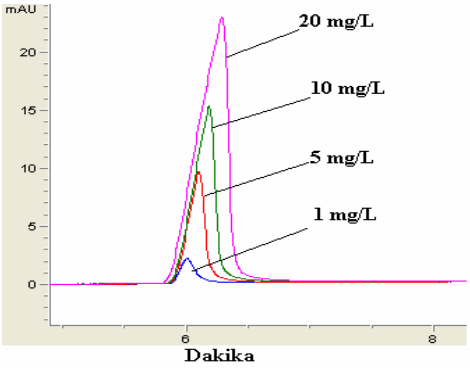


Nikotinik Asit

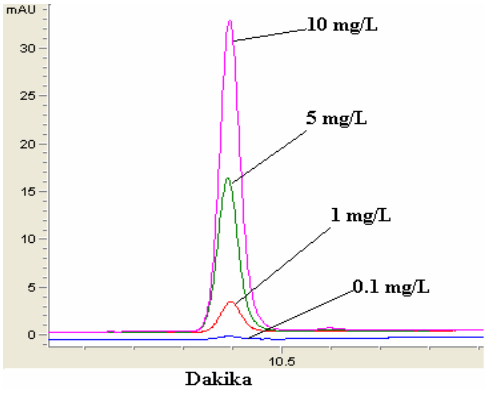
Konsantrasyon (mg/L)	Alan
0.5	1.634
1	3.425
5	18.889
10	38.359



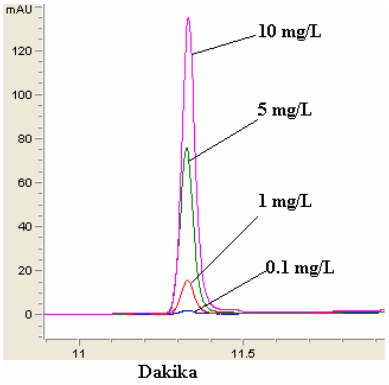
Vitamin B_6 Konsantrasyon (mg/L)	Alan
0.5	8,2
1	18,70
5	93
10	187
20	390.48



Vitamin B_{12} Konsantrasyon (mg/L)	Alan
0.1	0.98682
1	9.769
5	49.57
10	99.45



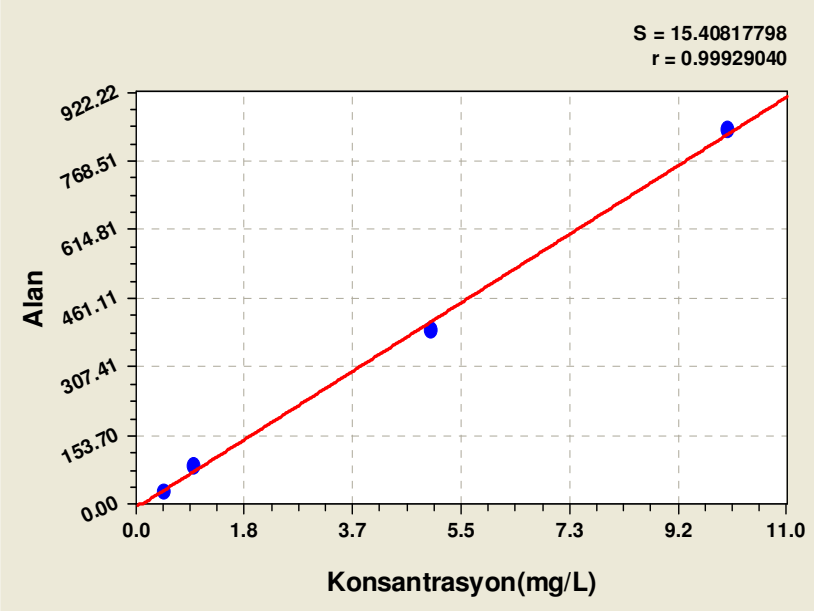
Vitamin B_2 Konsantrasyon (mg/L)	Alan
0.1	4,8
1	44.6
5	222.6
10	397.2



5.2.5. Kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi

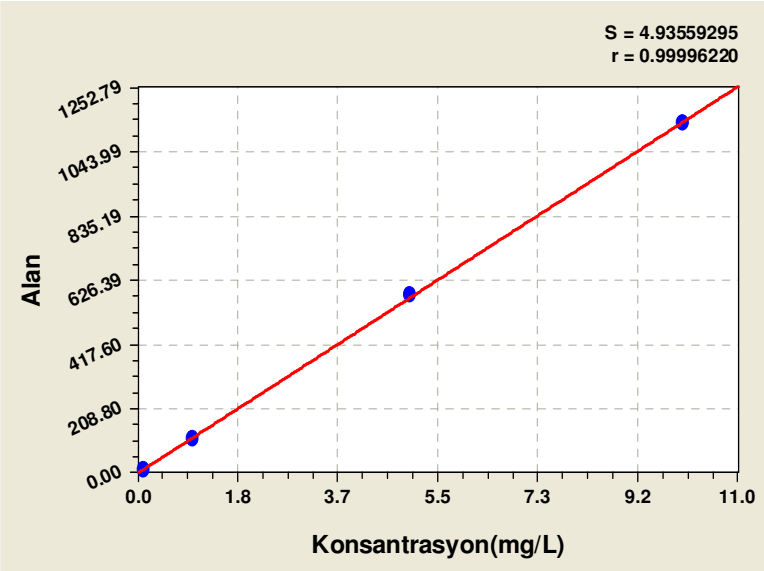
Yapılan çalışmalar sonucunda her bir vitamin için elde edilen kalibrasyon eğrileri bölüm 4.3.4.'de anlatıldığı gibi çizildi ve bu eğriler Şekil 5.15 - 5.24'de verildi.

Vitamin K_3 y=83.6x-7.1



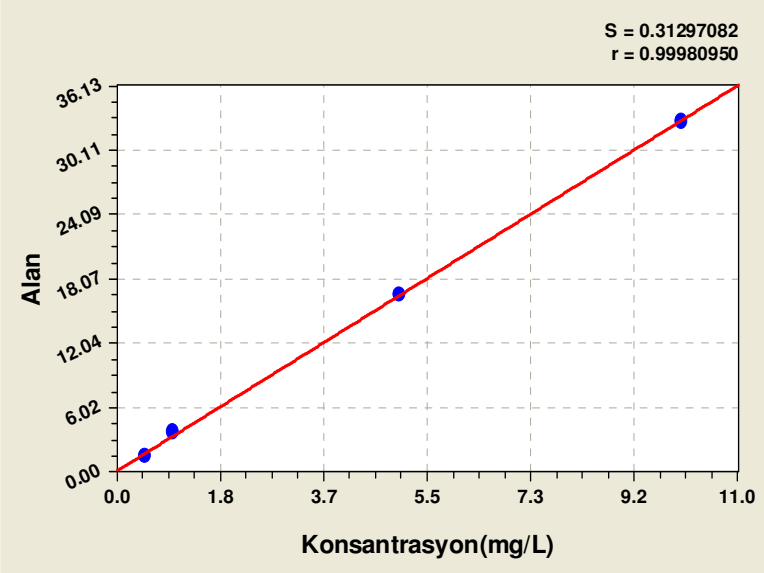
Şekil 5.8. Vitamin K_3 kalibrasyon eğrisi

Vitamin A y=0.72+114X



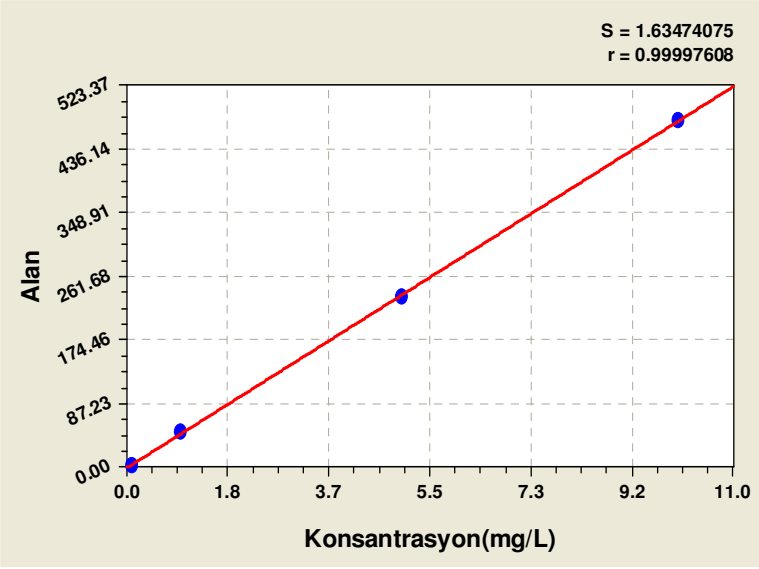
Şekil 5.9. Vitamin A kalibrasyon eğrisi

Vitamin E y=0.15+3.3X



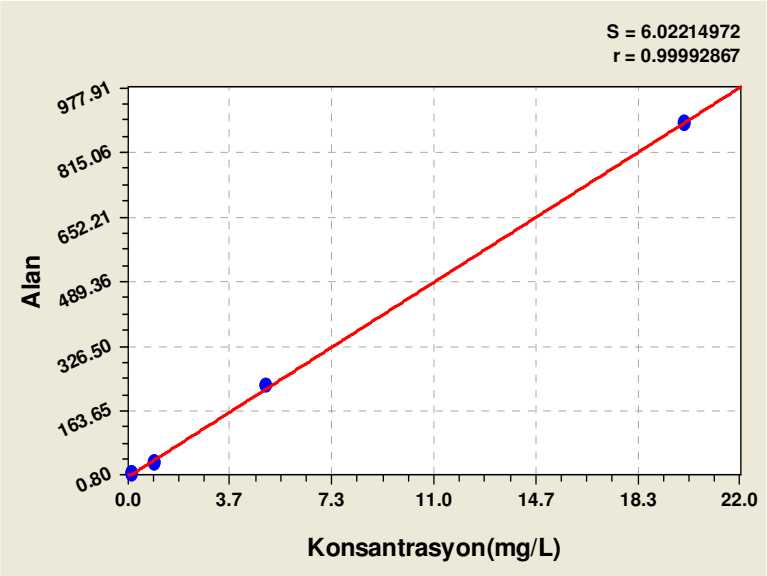
Şekil 5.10. Vitamin E kalibrasyon eğrisi

Vitamin D_3 y=47.5x-0.4



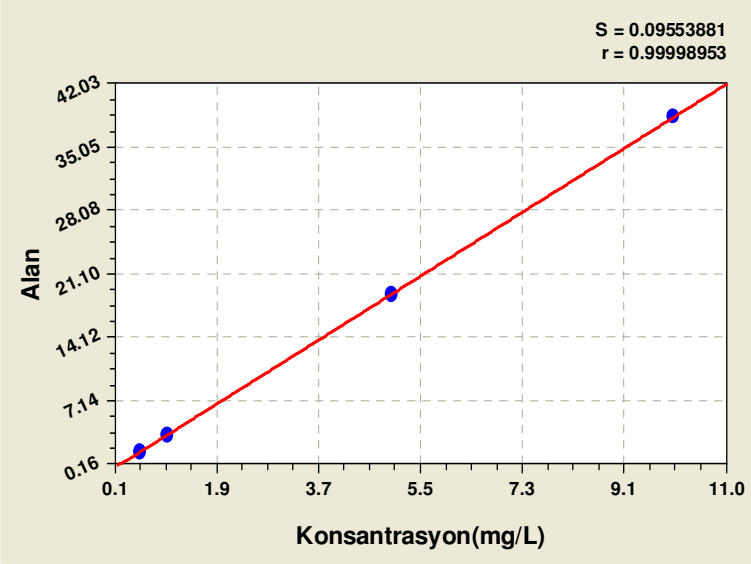
Şekil 5.11. Vitamin D_3 kalibrasyon eğrisi

Vitamin C y=44.7x-3.3



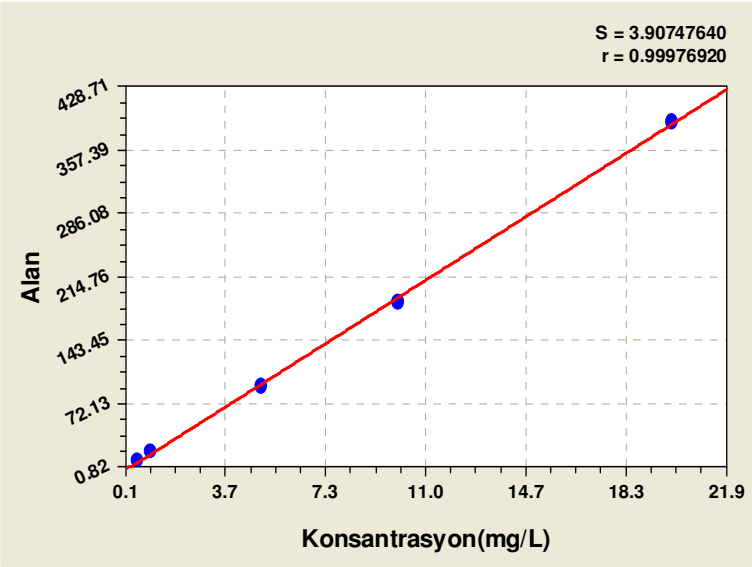
Şekil 5.12. Vitamin C kalibrasyon eğrisi

Nikotinik Asit y=3.9x-0.4



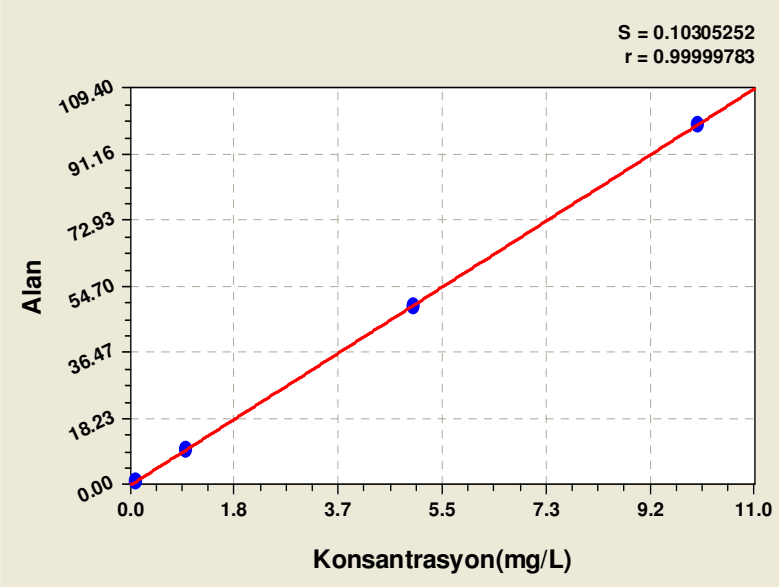
Şekil 5.13. Nikotinik asit kalibrasyon eğrisi

Vitamin B_6 y=19.5x-3.2



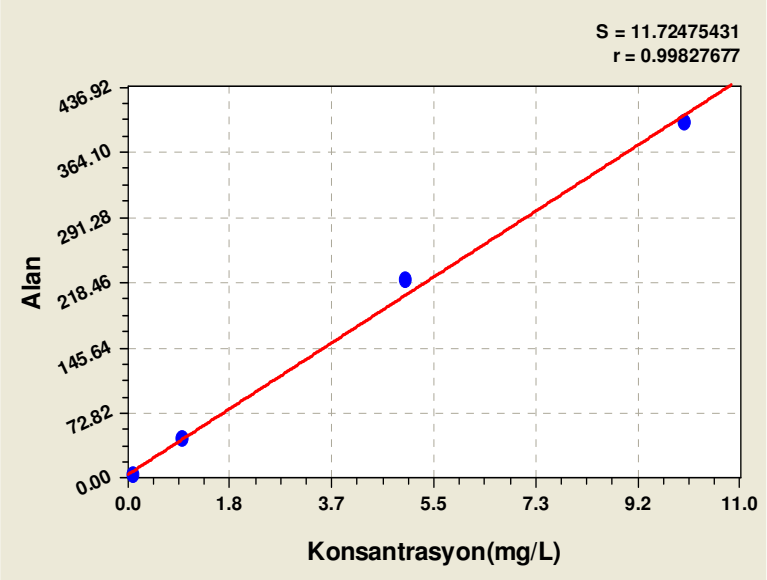
Şekil 5.14. Vitamin B_6 kalibrasyon eğrisi

Vitamin B_{12} y=9.9x-0.07



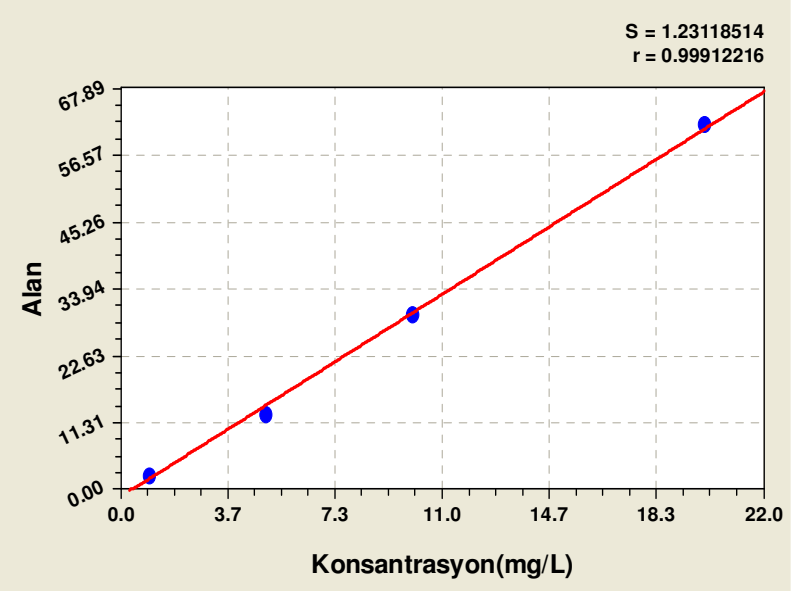
Şekil 5.15. Vitamin B_{12} kalibrasyon eğrisi

Vitamin B_2 y=4.7+40x



Şekil 5.16. Vitamin B_2 kalibrasyon eğrisi

Folik Asit y=3.1x-1.15



Şekil 5.17. Folik asit kalibrasyon eğrisi

Bu eğriler incelendiğinde vitamin C, B_6, B_2, B_{12}, nikotinik asit, folik asit, vitamin A, D_3, E, K_3 vitaminlerinde kalibrasyon grafiklerinin doğrusallıklarının iyi olduğu ve kalibrasyon

eğrilerinin regrasyon katsayılarının bire oldukça yakın olduğu görüldü. Numunelerde tayin çalışmalarımızda bu kalibrasyon grafikleri ve eğri denklemleri kullanıldı.

5.2.6. Yem ve yem katkı maddelerinde eşzamanlı vitamin tayini

Yem veya yem katkı numunesinden 2,000 g tartılarak santrüfüj tüpüne alınır. Üzerine TFA- MeOH (TFA-MeOH çözeltisi: %0,01 TFA – MeOH (%20 - %80) Ektraksiyon çözeltisinden 8 mL ilave edilerek Vortexte 15 dk karıştırılır. Daha sonra 15 dk santrifüj edilir (5000 devir, 24 ^{0}C). Santrifugat kısımdan uygun miktarda alınarak TFA- MeOH çözeltisiyle seyreltilir. 0,45 µm filtreden süzülerek cihaza enjekte edilir. Kromatografik tayin için kullanılan parametreler aşağıda verilmiştir.

- **Hareketli faz:** Hareketli Faz A: %0,01 TFA, pH:3,9 ve

  Hareketli Faz B: Metanol

Hareketli fazın pH değeri, KOH veya CH_3COOH ile ayarlanır.

- **Kolon:** Phenomenex Gemini 3u C18 110A 150x4,60 mm
- **Akış Hızı:** 0,7 mL/dk
- **Kolon sıcaklığı:**20 ^{0}C
- **Gardient elüsyon:**İzokratik ve gradient elüsyon tekniği uygulanmıştır. Gradient elüsyon Çizelge 5.8.'de gösterilmiştir.
- **Dedektör:** Diode Array Dedektör ve Çizelge 5.5'de verilen dalga boyları kullanıldı.

Elde edilen kromatogramların her birinde alan değerleri okunarak kalibrasyon grafikleri kullanılarak derişim miktarları belirlenmiştir. Her numune 6 kez ölçülerek istatistik değerlendirmesi yapılmıştır. Bulunan miktarlar ve değerlendirmesi Çizelge 5.8. de verilmiştir.

5.2.7.Geri kazanım çalışmalarının değerlendirilmesi

Yem ve yem katkı maddelerindeki suda ve yağda çözünen vitaminlerin geri kazanım çalışmaları yapılarak hesaplanmıştır ve Çizelge 5.8.'de verilmiştir. Görüldüğü gibi yağda çözünen vitaminlerden vitamin A, E, D_3 ve K_3 için ve suda çözünen vitaminlerden vitamin B_2

ve B_{12} için % geri kazanım oldukça iyidir. Tüm vitaminlerin istatistik verileri Çizelge 5.9.'da toplu halde gösterilmiştir.

Çizelge 5.8. Yem katkılarında vitamin analizi ve geri kazanım sonuçları (n=6)

Vitamin	**Miktar (mg/kg)**	**Eklenen (mg/kg)**	**Bulunan (mg/kg)**	**Geri Kazanım(%)**
Vitamin A	217.8 ± 3.3	105.8	322.0 ± 4.9	99.5 ± 1.5
Vitamin E	1106.0 ± 8.0	266.4	1214.0 ± 8.7	88.5 ± 0.6
Vitamin D_3	2.4 ± 0.04	22.6	22.6 ± 0.4	90.2 ± 1.6
Vitamin K_3	3.9 ± 0.09	9.7	12.2 ± 0.3	89.6 ± 2.2
Vitamin B_2	213.0 ± 2.9	100.0	313.9 ± 4.2	100.3 ± 1.3
Vitamin B_{12}	-	50.0	44.8 ± 0.7	89.7 ± 1.4

Folik asit, vitamin C, vitamin B_6 ve nikotinik asit geri kazanımları çok düşük olduğu için tabloda gösterilmemiştir.

Çizelge 5.9. Yağda ve suda çözünen vitaminlerin validasyon verileri (n=6)

Vitamin	**Alıkonma Zamanı(dk)**	**Lineer Aralık(mg/L)**	**LOD (mg/L)**	**LOQ (mg/L)**	**%RSD (mg/L)**	**Regrasyon eşitliği**	**Korelayon katsayısı(r^2)**
L-askorbik Asit	3.03	0.2-20.0	0.06	0.2	6.3	y=44.7x-3.3	0.99986
Cyanocobalamin	10.6	0.1-10.0	0.03	0.1	2.2	y=9.9x-0.07	0.99999
Folik asit	12.2	1.0-20.0	0.30	1.0	4.8	y=3.1x-1.15	0.99825
Riboflavin	11.3	0.1-10.0	0.03	0.1	4.8	y=4.7+40.0x	0.99656
Nikotinik asit	5.1	0.5-10.0	0.15	0.5	6.0	y=3.9x-0.4	0.99989
Pyridoxine	6.3	0.5-20.0	0.15	0.5	0.3	y=19.5x-3.2	0.99954
Vitamin K_3	13.6	0.5-10.0	0.15	0.5	4.0	y=83.6x-7.1	0.99858
Vitamin A	18.3	0.1-10.0	0.03	0.1	2.3	y=0.72+114x	0.99992
Vitamin E	27.6	0.5-10.0	0.15	0.5	2.8	y=0.15+3.3x	0.99962
Vitamin D_3	22.6	0.1-10.0	0.03	0.1	2.7	y=47.5x-0.4	0.99995

6.TARTIŞMA

Günümüzde çeşitli kontrol laboratuarlarında vitamin analizleri yapılmakta fakat suda ve yağda eriyen vitaminlerin analizi için ayrı metotlar uygulanmaktadır. Ayrıca Yağda Çözünen vitaminlerin ekstraksiyon aşaması hem çok uzun sürmekte hem de çok fazla kimyasal çözücü tüketimi olmaktadır (özellikle eter). Bu çalışma ile yağda çözünen vitaminlerden A-D_3-E-K_3 için başarılı sonuçlar alınırken suda çözünen vitaminlerden de B_2 ve B_{12} için geri kazanımları yüksek değerler alınmış, fakat folik asit, nikotinik asit, B_6 ve C vitaminlerinin geri kazanımları düşük olduğu için karışımda tayin edilebilme oranları çok düşüktür. Ayrıca önerilen yöntemde ekstraksiyon süresi çok azalmıştır. Laboratuvarlarda özellikle yağda çözünen vitaminlerin ekstraksiyon aşaması nerdeyse bir gün sürerken ve de geri kazanımları düşükken bu çalışmayla ekstraksiyon süresi yarım saate düşürülmüş ve geri kazanımlarda önemli oranda artmıştır. Dolayısıyla bu çalışma sonucunda hem zamandan hem de paradan tasarruf sağlanmıştır.

7.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında geliştirilen kromatografik yöntemin az zaman alması; daha az reaktif ve çözücü gerektirmesi; sonuçların duyarlı, güvenilir, tekrarlanabilir olması ve ayrıca rutin analizlerde kullanılabilirliğinin fazla olması açısından kullanılabilecek bir yöntemdir.

8.KAYNAKLAR

Anon, 2006a, http://www.agilent.com/chem/SQ

Anon, 2006b, http://www.waters.com/ WatersDivision/ ContentD.asp? watersit = EGOO-66YNU9

Anon, 2008, www.yilmazkimya.com.tr/index.php?Urunler&id=12

Ball, G.F.M. Bioavailability and Analysis of Vitamins in Foods; 1998 Chapman& Hall, London

Basu, T.K. and Dickerson, J.W. Vitamins in Human Health and Disease. United Kingdom. CAB INTERNATIONAL. 1996. pps.249

Blinkhorn, S. ,Nature, 1991, 6313, 13

Bülbül, H., Editör, Yemlerde Kalite Kontrolü ve Olumsuzlukları, 2007, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Konya İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü yayını.

Delgado, M.M., Gonza, I., Sanchez, A., Carabias, R., 2002, Separation and simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble vitamins by electrokinetic capillary chromatography, journal of chromatography, 953,257-262

Eitenmiller,R.,Ye,L., Landen, W.,2008, Vitamin Analysis

Elton, R.R., Stacey, C.I., 1980, High performance Liquid chromatographic seperation of the fat soluble vitamins in cod liver oil and feeds, Analytica Chimica Acta, 127.213-218.

Erdik, E., 2005, Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler, Ankara

Gimeno, E., Calero, E., Castellote,A.I., Lamuela, R.M., Torre, M.C., Lopez, M.C., 2000,Simultaneous determination of a-tocopherol and b-carotene in olive oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography, journal of chromatography, 881,255-259

Gündüz, T., 1999, İnstrümental Analiz, Ankara

Klejdus, B., Petrlova, J., Potesil, D., Adam, V., Mikelova, R., Vacek, J., Kizek, R., Kuban, V., 2004, Simultaneous determination of water- and fat-soluble vitamins in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection, Analytica Chimica Acta, 520, 57-67.

Levin,S.,2006,high performance liquid chromatography – HPLC introduction

Li, H.B., Chen, E.,2001, Simultaneous Determination of Twelve Water- and Fat-Soluble Vitamins by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection, Chromatographia, 54,270-273

Moreno, P., Salvado, V., 2000, Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography, journal of chromatography, 870,207-215

Mulholland, M., Dolphin, R.J.,1985, Analysis of The Fat-Soluble Vitamins Using Narrow-Bore High Performance Liquid Chromatography With Multichannel UV-Vis Detection, Journal Of Chromatography, 350, 285-291.

Özcan, S., 2006, Hacettepe üniversitesi, gıda mühendisliği bölümü, sunumu

Qian, H., Sheng, M., 1998, Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D and E and pro-vitamin D_2 in animal feeds by one-step extraction and high-performance liquid chromatography analysis, journal of chromatography, 825,127-133

Skoog, D. A., D. M., Holler, F.J., Neaman, T. A., Çeviri: Kılıç, E., Köseoğlu, F., 2000, Enstrümental Analiz İlkeleri, Bilim Yayıncılık, Ankara

Skoog, D.A., D.M., Holler, F.J., Çeviri: Kılıç, E., Köseoğlu,F., 1999, Analitik Kimya, Bilim Yayıncılık, Ankara

Zonta, F., Stancher, B., 1982, Hıgh-Performance Lıquıd Chromatography Of Fat-Soluble Vıtamıns Separatıon And Identıfıcatıon Of Vıtamıns D, And D, And Theır Isomers In Food Samples In The Presence Of Vıtamın A, Vıtamın E And Carotene, Journal of Chromatography, 246, 105-112.

9.ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Konya'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Konya'da tamamladı. 1998 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazandı ve 2002 yılında bu bölümden mezun oldu. 2006 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde Yüksek Lisansa başladı. 2004 yılında Konya İl Kontrol Laboratuvarı'nda Kimyager olarak göreve başladı. Halen aynı görevde olup evli ve bir çocuk annesidir.