T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI GIDALARDA SUDA VE YAĞDA ÇÖZÜNEN VİTAMİNLERİN EŞZAMANLI TAYİN METODUNUN OPTİMİZASYONU

Onur BİLBER

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
Konya, 2010

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI GIDALARDA SUDA VE YAĞDA ÇÖZÜNEN VİTAMİNLERİN EŞZAMANLI TAYİN METODUNUN OPTİMİZASYONU

Onur BİLBER

Selçuk Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI

2010, 95 Sayfa

Jüri : Yrd. Doç. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI

Prof.Dr. Hüseyin KARA

Prof.Dr. Erol PEHLİVAN

Bu çalışma vitamin preparatlarda suda ve yağda çözünen vitaminlerin eşzamanlı tayini için geliştirilen metodun optimizasyonu amacıyla yapıldı. Çalışmalarda yağda çözünen A, D3, E ve K1 vitaminleri ile suda çözünen B1, B2, B3, B12, C, Folik asit ve p-Aminobenzoik asit vitaminleri üzerinde çalışma yapıldı. Çalışmalarda Yüksek Performans Sıvı Kromatografi (HPLC) cihazı kullanıldı. Hareketli faz olarak triflouroasetik asit (0,01%, pH 4) ve metanol ile yapılan gradient program kullanıldı. Çalışmalarda vitaminlerin ayrımı 3µ C18 Gemini kolon ile yapıldı. Folik asit, B2 ve E vitaminlerinin tayini floresans dedektör (FLD) ile yapılırken diğer vitaminler diode array dedektör (DAD) ile tayin edildi. Kantitatif tayinde her bir vitamin için, DAD dedektörde maksimum absorbans verdikleri dalga boyları ile FLD dedektördeki maksimum uyarma ve emisyon dalga boyu değerleri kullanıldı. Piyasada bulunan vitamin preparatlarına uygulanan yöntemde eş zamanlı vitamin tayini için belirlenen optimum koşullarda tayin edilebilecek minimum vitamin konsantrasyonları belirlendi. Çalışmalar sonucunda vitaminlerin geri kazanım değerlerinin %87,5 ile %97,5 aralığında olduğu gözlendi. Bağıl standart sapma (%) değerlerinin de 1.3 ile 7.0 aralığında olması metodun hassas ve güvenilir olduğunu gösterdi. Sonuç olarak ekstraksiyon metodunun kısa olması ve yüksek hassasiyeti sebebi ile geliştirilen metodun tablet analizlerinde rutin olarak kullanılabilecek bir yöntem olduğuna karar verildi.

Anahtar Kelimeler: Vitamin, tablet, eşzamanlı tayin, HPLC, DAD, FLD, Optimizasyon

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

OPTIMIZATION OF SIMULTANEOUS DETERMINATION METHOD OF WATER AND FAT SOLUBLE VITAMINS IN SOME FOODS

Onur BİLBER

Selcuk University

Graduate School of Natural and Applied Science

Department of Chemistry

Supervisor: Asist. Prof.Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI
2010, Pages 95

Jury : Asist. Prof.Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI

Prof.Dr. Hüseyin KARA

Prof.Dr. Erol PEHLİVAN

This study was undertaken for the purpose of optimization of the method which developed for simultaneous determination of the water and fat-soluble vitamins in the vitamin preparations. In these studies, it has been worked on the fat soluble vitamins A, D3, E, K1 and water soluble vitamins B1, B2, B3, B12, C, Folic acid and p-Aminobenzoic acid. It was used High Performance Liquid Chromatography in these studies. It was used the gradient program which was made from triflouroacetic acid (0.01 %, pH4) and methanol as a mobile phase. Separation of vitamins was performed with 3µ C18 Gemini colon in these studies. While determination of Folic acid, B2 and E vitamins was performed with fluorescent detector, the other vitamins was determined with diod array detector. In quantitative detection, it was used their wavelengths which gave maximum absorbance in diod array detector and their maximum emission and their values of extraction wavelength in fluorescent detector for every vitamin. Under optimum circumstances, the minimum detectable vitamin concentrations were choosed and the method was applicated commercial tablets. As a result of the studies, it was observed that recovery values of the vitamins ranging from 87,5% and 97,5%. The relative standard deviation (%) values in the range of 7.0 to 1.3 have also demonstrated that the method was sensitive and reliably. In conlusion, it was decided that the developed method can be routinely used in tablet analysis, because of shortness of its extraction method and high sensitivity.

Keywords: Vitamin, tablet, simultaneous determination, HPLC, DAD, FLD Optimization.

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI danışmanlığında hazırlanarak, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuştur.

Tez süresince yapılan deneysel çalışmaların tamamı; Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri (BAP) kapsamında sağlanan destekler ile gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmalar; Ulusal Gıda Referans laboratuarında yürütülmüştür.

Yüksek Lisans çalışması olarak sunduğum bu çalışmanın seçiminde, hazırlanmasında ve ve araştırmaların yürütülmesinde her türlü bilgi ve önerileriyle yol gösteren danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI ve değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hüseyin KARA ya sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım süresince her zaman desteğini benden esirgemeyen değerli çalışma arkadaşlarım Rind Kürşat AKTAŞ, Dr Gülin KÖKSAL, Dr. Aslı TÜRKOĞLU, Dr. Aslı KORKMAZ ve Dr. Aslı ÖZKÖK' e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmalarım süresince manevi anlamda her zaman yanımda olan, sevgili eşim Defne BİLBER'e sonsuz şükranlarımı sunarım.

Onur BİLBER
KONYA-2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **İ**

ABSTRACT ..... **II**

ÖNSÖZ ..... **III**

İÇİNDEKİLER ..... **IV**

ÇİZELGELER LİSTESİ ..... **VII**

ŞEKİLLER LİSTESİ ..... **IX**

1.GİRİŞ VE AMAÇ **1**

2.GENEL BİLGİLER **3**

2.1. Vitaminler **3**

2.2. Vitaminlerin Sınıflandırılması **3**

2.2.1.Yağda çözünen vitaminler 3

2.2.1.1.Vitamin A 3

2.2.1.2.Vitamin D 6

2.2.1.3.Vitamin E 8

2.2.1.4.Vitamin K 10

2.2.2.Suda çözünen vitaminler 12

2.2.2.1.Vitamin B1 12

2.2.2.2.Vitamin B2 14

2.2.2.3.Vitamin B3 16

2.2.2.4.Vitamin B5 18

2.2.2.5.Vitamin B6 19

2.2.2.6.Vitamin B12 21
2.2.2.7.Vitamin C 24
2.2.2.8.Folik asit 25
2.2.2.9.p-Aminobenzoik asit 27

2.3. Kromatografi **28**
2.3.1. Kolon kromatografisi 29
2.3.1.1 Hareketli faz seçimi 30
2.3.1.2 Kolon seçimi 33
2.3.2. Yüksek basınçlı sıvı kromatografi sistemi (HPLC) 34
2.3.2.1. Çözücü haznesi ve degasser 36
2.3.2.3 Enjeksiyon ünitesi 37
2.3.2.4 Kolon fırını 38
2.3.2.5 Dedektörler 38

3.KAYNAK ARAŞTIRMASI 42

4.MATERYAL VE METOT 46

4.1. Kullanılan Cihazlar **46**

4.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler **46**
4.2.1 Kullanılan vitamin standartları 46
4.2.2. Kullanılan çözücüler 47
4.2.3. Kullanılan vitamin tablet numuneleri 48
4.2.4. Çözeltilerin hazırlanması 48
4.2.4.1. Standart çözeltiler 48
4.2.4.2. Diğer çözeltiler 49

4.3. Kullanılan Kolonlar **50**

4.4. Deneysel İşlem **50**
4.4.1. Uygun dedektör ve dalga boylarının seçimi 50
4.4.2. Kolon seçimi ve kromatografik şartların optimizasyonu 51

4.4.3. pH ve sıcaklığın etkisinin incelenmesi 51
4.4.4. Ekstraksiyon çözeltisinin oranının belirlenmesi 51
4.4.5. Farmasotik preparatlarda suda ve yağda çözünen vitaminlerin eşzamanlı tayini... 51
4.4.6. Metod validasyon çalışmaları 52

5. DENEY SONUÇLARI 53

5.1 Uygun Dedektör Ve Dalga Boylarının Değerlendirilmesi 53

5.2. Uygun Kromatografik Şartlarının Değerlendirilmesi 57
5.2.1. Uygun kolonun değerlendirilmesi 57
5.2.2. Gradient elüsyon çalışmalarının değerlendirilmesi 58

5.3. pH ve Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi 63

5.4. Farmasotik Preparatlarda Suda Ve Yağda Çözünen Vitaminlerin Eşzamanlı Tayini ... 66

5.5. Metod Validasyon Çalışmaları 68
5.5.1.Tespit limiti (Limit of Dedection, LOD) ve tayin limiti (Limit of Quantitation, LOQ) çalışmalarının değerlendirilmesi: 68
5.5.2. Kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi 80
5.5.3. Geri kazanım çalışmaları 87
5.5.4. Kesinlik çalışması 88

6.TARTIŞMA 90

7.SONUÇ VE ÖNERİLER 92

8.KAYNAKLAR 93

9.ÖZGEÇMİŞ 95

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 2.1. Bazı Ayrım Metotlarının Özellikleri 29

Çizelge 2.2. Kromatografik Terimler 30

Çizelge 2.3. Çözücü Polarite Tablosu 31

Çizelge 2.4. Çözücü Karışabilirlik Tablosu 32

Çizelge 4.1. Vitaminler Ve Temin Edildikleri Firmalar 47

Çizelge 4.2. Kullanılan Kimyasal Çözücüler, Saflık Dereceleri Ve Temin Edildikleri Firmalar 47

Çizelge 4.3. Polivitamin Draje Numunesinin Vitamin İçeriği 48

Çizelge 4.4. Optimizasyon Çalışmalarında Kullanılmak Üzere Hazırlanan Vitamin Mix Çalışma Çözeltisinin İçeriği 49

Çizelge 4.5. Çalışmalarda Kullanılan Kromatografik Kolonlar 50

Çizelge 5.1. Vitamin Standartlarının İki Farklı Dedektöre Ait Verileri 53

Çizelge 5.2. Vitamin Standartlarının İki Farklı Kolona Ait Verileri 58

Çizelge 5.3. I No'lu Gradient Elüsyon Çalışması 59

Çizelge 5.4. II No'lu Gradient Elüsyon Çalışması 60

Çizelge 5.5. III No'lu Gradient Elüsyon Çalışması 61

Çizelge 5.6. Vitamin Standartlarının Diod Array Dedektör İle Çıkış Zamanları 62

Çizelge 5.7. Vitamin Standartlarının Floresans Dedektör İle Çıkış Zamanları 62

Çizelge 5.8. Vitamin Standartlarının Farklı pH Değerlerine Ait Verileri 63

Çizelge 5.9. Vitamin Standartlarının Farklı Sıcaklık Değerlerine Ait Verileri 64

Çizelge 5.10. Tespit Limiti Ve Tayin Limiti Çalışmalarına Ait Veriler.....80

Çizelge .5.11. Vitaminler ve Kalibirasyon Aralıkları……...81

Çizelge 5.12 Vitamin Tablet Numunesinde Düşük Konsantrasyonda Geri Kazanım Çalışması Sonuçları (N=10) 87

Çizelge 5.13. Vitamin Tablet Numunesinde Yüksek Konsantrasyonda Geri Kazanım Çalışması Sonuçları (N=10) 88

Çizelge 5.14. Tekrarlanabilirlik Çalışmasına Ait Veriler.....89

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Tipik Kolon Dolgu Maddesi.....33

Şekil 2.2. HPLC-GC Kullanımı Alanları.....34

Şekil 2.3 HPLC Sistemi.....36

Şekil 2.4 .Degassing.....37

Şekil 2.5.. HPLC Sistemlerinde Detektörlerin Kullanımı.....38

Şekil 5.1. Vitaminlerin Spektrumları.....55

Şekil 5.2. E Vitaminine Ait DAD Ve FLD Kromatogramları.....56

Şekil 5.3. p-Aminobenzoik Asit Vitaminine Ait DAD Ve FLD Kromatogramları.....56

Şekil 5.4. B2 Vitaminine Ait DAD Ve FLD Kromatogramları.....57

Şekil 5.5. B3 Vitamininin İki Farklı Kolondaki Pikleri.....58

Şekil 5.6. I No'lu Gradient Elüsyon Çalışmasına Ait Kromatogram.....59

Şekil 5.7. II No'lu Gradient Elüsyon Çalışmasına Ait Kromatogram.....60

Şekil 5.8. III No'lu Gradient Elüsyon Çalışmasına Ait Kromatogram.....61

Şekil 5.9.III No'lu Gradient İçin Dakikaya Karşı Hareketli Faz B'nin Akış Grafiği.....62

Şekil 5.10. Vitaminlerin Farklı pH Değerlerine Karşılık Pik Alan Değişimi.....63

Şekil 5.11. B1 Vitaminin Çeşitli pH Değerlerindeki Kromatogramları.....64

Şekil 5.12. Vitaminlerin Farklı Sıcaklık Değerlerine Karşılık Pik Alanı Değişimi.....65

Şekil 5.13. A Vitamininin Farklı Sıcaklıklardaki Kromatogramları.....65

Şekil 5.14. Ekstraksiyon Çözücüsü Olarak % 80 MeOH- % 20 TFA Kullanımı İle Elde Edilen Numuneye Ait DAD Kromatogramı 67

Şekil 5.15. Ekstraksiyon Çözücüsü Olarak % 80 MeOH- % 20 TFA Kullanımı İle Elde Edilen Numuneye Ait FLD Kromatogramı 67

Şekil 5.16. Vitamin A Kalibrasyon Eğrisi 81

Şekil 5.17. Vitamin D3 Kalibrasyon Eğrisi 82

Şekil 5.18. Vitamin E Kalibrasyon Eğrisi 82

Şekil 5.19. Vitamin K1 Kalibrasyon Eğrisi 83

Şekil 5.20. Vitamin B1 Kalibrasyon Eğrisi 83

Şekil 5.21. Vitamin B2 Kalibrasyon Eğrisi 84

Şekil 5.22. Vitamin B3 Kalibrasyon Eğrisi 84

Şekil 5.23. Vitamin B12 Kalibrasyon Eğrisi 85

Şekil 5.24 Vitamin C Kalibrasyon Eğrisi 85

Şekil 5.25 Folik Asit Kalibrasyon Eğrisi 86

Şekil 5.26 p- Aminobenzoik Asit Kalibrasyon Eğrisi 86

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ülkemizde yapılan ulusal ve yöresel beslenme-sağlık araştırmaları, toplumumuzda yetersiz beslenmeye bağlı sağlık sorunlarının halen devam etmekte olduğunu göstermektedir. Özellikle risk gruplar olarak nitelendirilen gebe-emzikli anneler, bebekler, büyüme-gelişme çağındaki çocuklar ve gençlerin, vücutta kilit işlevler gören, fiziksel, ruhsal ve mental gelişimi etkileyen bazı besin öğelerinden ileri düzeylerde yetersiz beslendikleri saptanmıştır. Bu besin öğelerinden bir tanesi de vitaminlerdir.

Birçok gıda ürününde vitaminler farklı derişimlerde bulunmaktadır. Bu gıdaların bazıları günlük alımlar için yeterli vitamin derişimine sahiptir. Ancak günlük beslenme alışkanlığı ile vitaminlerin yeterli miktarda alınamadığı ya da vitamin desteği gerektiren özel diyetlerin kullanıldığı hastalıklarda bu eksikliğin giderilmesi için farmasotik preparatlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Vitamin preparatların içerisindeki vitaminlerin dayanıklılığını depolama, nem, ısı, ışık, pH, oksidasyon, mineral etkileşimleri gibi birçok faktör etkilemektedir. Birçok firma vitamin preparatları hazırlarken bu türden faktörleri elimine edebilmektedir. Ancak yine de belirli miktarlarda kayıp söz konusu olabilmektedir. Dolayısıyla hazırlanan vitamin preparatlar içerisindeki vitaminler, beyan edilen miktarları yansıtmamakta ve önerilen dozda kullanım insanların vitamin ihtiyacını karşılayamamaktadır.

Bu gerekçelerle preparatlarda vitamin derişimlerinin rutin kantitatif analizi çok önemlidir. Günümüzde birçok laboratuarda vitamin analizleri yapılmakta fakat suda ve yağda çözünen 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 çalışma, hem yağda hem suda çözünen vitaminler için eşzamanlı bir tayin metodu optimizasyonu için çalışılması ve piyasada bulunan preparatlara uygulanabilirliğinin araştırılmasını amaçlamaktadır. Çalışmalarda her bir vitaminin kantitatif tayininin düşük derişimlerde yapılabilmesi için uygun dalga boyu, hareketli faz ve bileşimi, akış hızı gibi parametrelerin belirlenmesi ve uygun dedektörün seçimi yapılacaktır. Vitaminlerin yapısal özelliklerine göre floresans dedektör (FLD) ve diode array dedektör (DAD) sonuçları

değerlendirilecektir. Aynı zamanda çalışmalar sonucunda elde edilen veriler, istatistiksel olarak değerlendirilip optimize edilen metodun performans kriterleri belirlenerek rutin kullanılabilirliği araştırılacaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Vitaminler

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.

2.2. Vitaminlerin Sınıflandırılması

Vitaminler genel olarak iki grupta sınıflandırılmaktadır; Yağda çözünen vitaminler ve suda çözünen vitaminler.

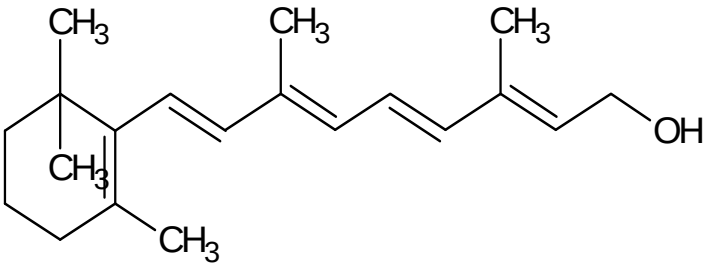
2.2.1.Yağda çözünen vitaminler

2.2.1.1.Vitamin A

Tüm omurgalı canlılar için gerekli olan A vitamini; retinol ve retinal esterler olarak veya provitamin A karotenoidleri olarak iki değişik formda vücuda alınır.

Retinoidler ailesinin temel üyesi all trans retinoldür. Temel olarak dört isoprenoid birimden oluşan yapılardır. Retinol palmitat, retinoidlerin en önemli trans ester yapılarındandır. Retinoidlerin diğer üyeleri ise all trans retinal ve all trans retinoik asittir. Bunlar da retinoldeki alkol grubunun oksidasyonu ile oluşmaktadır. 600 den fazla karotenoid karakterize edilmiştir. Provitamin A karotenoidleri arasında β Karoten önemli bir yere sahiptir. Karotenoidlerde isoprenoid birimleri sekiz adet bulunmaktadır.

Vitamin A eksikliğinde gece körlüğü, büyüme geriliği gibi rahatsızlıkların oluştuğu yapılan araştırmalar sonucu ortaya konuşmuştur.



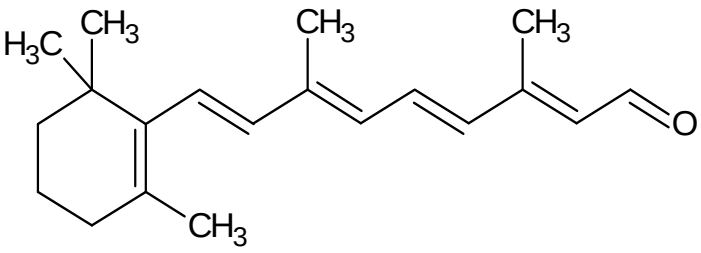
Retinol Asetat

CAS No. : 68-26-8

Formül : $C_{20}H_{30}O$

E.N (°*C*) : 62-64

Molar Kütle (g/mol): 286,46



All trans retinal

CAS No. : 116-31-4

Formül : $C_{20}H_{28}O$

E.N (°*C*) : 61-64

Molar Kütle (g/mol): 284,44

Metabolizma

Günlük A vitamini ihtiyacı 1 mg dan daha azdır. A vitamininin bugün için yeterli bir şekilde bilinen başlıca etkisi omurgalılarda "Görme siklusu" denen biyokimyasal olayda oynadığı roldür. Kofaktör olarak demire ihtiyaç gösteren bir dioksigenaz enziminin aracılığı ile 3-karotenin oksijenizasyonu sonucu meydana gelen A vitamininin görme olayında önemli bir rolü vardır.

Spektral özellikleri

Yapılarındaki konjugasyon sebebiyle hem retinoidler hem de karotenoidler UV-Visible ışığı absorbe ederler. Maksimum absorbans verdikleri dalga boyu çözücüye ve molekülün izomerlerine bağlı olarak değişmektedir. Ancak vitamin A için yapılan ölçümler 318nm ve 360nm dalga boylarında maksimum absorbans verdiğini göstermiştir. All trans retinol ve retinal aset, polar olmayan organik çözücüler içerisinde fluoresan spektrum oluşturmaktadır.

Kararlılık

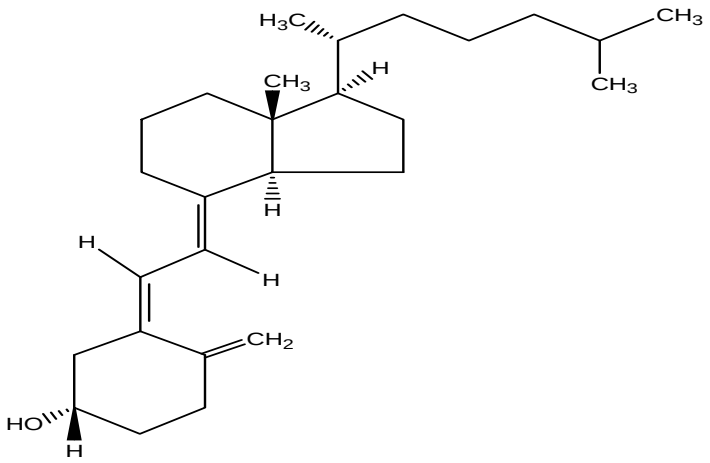
Genel olarak vitamin A analizlerinde yüksek sıcaklıkların, yüksek asitlik değerlerinin, oksijenin ve ışığın yapıda bozulmalara neden olduğu belirlenmiştir. Bazı çalışmalarda gıda prosesinde 90 ^{o}C a kadar A vitaminini % 90 oranında kararlı kaldığı 140 ^{o}C da ise kararlılığın % 62 olduğu gözlenmiştir.

Analiz yöntemleri

Numune	Ekstraksiyon	HPLC Şartları
Peynir/ Retinol	Su:EtOH:Hekzan (8:20:20) ile homojenizasyon yapılır, santrifuj edildikten sonra hekzan fazı alınır	Kolon: LiChrosorb Si60 Hareketli Faz: Hex:IPA (99,8:0,02) İsokratik Dedeksiyon: 325 nm
Özel Formullü Gıdalar/Retinol	Oda şartlarında 18 saat sabunlaştırmadan sonra Hex:EtOH (85:15) ile ekstraksiyon ve santrifuj yapılır, Süpernatant uzaklaştırılıp kalıntı heptanda çözülür.	Kolon: Apex Silica Hareketli Faz: Heptan:IPA (99:1) İsokratik Dedeksiyon: 325 nm

2.2.1.2.Vitamin D

D vitamini stereoidler içerisinde antiraşitikler olarak anılmaktadır. Bu gurubun en önemli iki üyesi Vitamin D2 (ergokalsiferol) ve Vitamin D3 (kolekalsiferol) dir. Vitamin D2 bitkisel kaynaklı olup bir bitkisel stereoit olan ergesterolden türemiştir. D3 vitamini ise 7-dehidrokollesterolden türemiştir. Ergesterol ve 7-dehidrokolesterolün D vitamini aktivitesi kazanmaları için, stereoit yapıdaki halkanın 9-10 karbonları arasındaki bağın kopması gerekmektedir.



Vitamin D3 (Cholecalciferol)

CAS No. : 67-97-0

Formül : $C_{27}H_{44}O$

E.N (°*C*) : 84-85

Molar Kütle (g/mol): 284,65

Metabolizma

D vitamini başlıca etkisini Ca metabolizması üzerinde gösterir. Öteden beri bilinen bir husus D vitamininin bağırsaklardan Ca ve P absorbsiyonunu kolaylaştırdığıdır. Ancak bu kolaylaştırmanın ne şekilde olduğu son zamanlara kadar aydınlatılamamıştı. Genellikle Ca absorbsiyonunun D vitamininin bağırsak mukoza hücresi cidarını Ca un geçişini kolaylaştıracak şekilde değişikliğe uğratması sonucu hızlandığı kabul olunuyordu. Ancak son zamanlarda yapılan araştırmalar, D vitamininin organizmada metabolik değişikliklere

uğradığını, kolekalsiferol'ün (D3 vitamini) önce karaciğerde mikrozomlarda 25-hidroksikolekalsiferol'e dönüştüğünü bu hidroksikolekalsiferol'ün daha sonra böbreklerde mitokondriler içerisinde 1,25-dihidroksikolekalsiferole oksidlendiğini ve bu sonuncu maddenin de kan yolu ile asıl etki gösterdiği bağırsak mükozasına taşındığını ve orada Ca'un absorbsiyonunda bir tür taşıyıcı olarak görev yapan özel bir proteinin yapımını regüle ettiğini ortaya koymuştur. Intestinal mükozada sentez edilen bu protein izole edilmiştir. 24.000 mol ağırlığında olup her molekülü bir atom kalsiyumu bağlamaktadır.

Spektral özellikleri

Vitamin D nin bütün formları UV bölgede karakteristik absorpsiyon spektrumu oluşturlar. Floresans özelliği olmayan D vitamini UV bölgede 264 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir.

Kararlılık

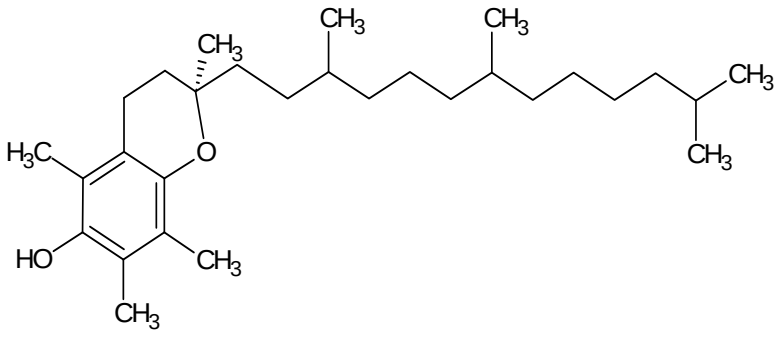
D vitamini asidin, ışığın ve suyun olmadığı ortamlarda ve düşük sıcaklıklarda kararlı kalabilmektedir. Işık etkisi ile asidik ortamlarda izomerizasyon tepkimesi verir.

Analiz yöntemleri

Numune	Ekstraksiyon	HPLC Şartları
Zenginleştirilmiş süt ve Özel Formüllü Gıdalar/D2ve D3	Oda şartlarında 18 saat sabunlaştırmadan sonra 1-Klorbütan ile ekstraksiyon yapılır, buharlaştırma ve kalıntının 2,2, 4- Trimetilpentan ile çözülmesi ile enjeksiyon yapılır.	Kolon: PolyGosil NH_2CN Hareketli Faz: Hekzan içinde %1 Pentanol İsokratik Dedeksiyon: 254 nm
Süt /D2 ve D3	Oda şartlarında 18 saat sabunlaştırmadan sonra Dietileter ile ekstraksiyon yapılır.	Kolon: LiChrosorb Si60 Hareketli Faz: Hekzan içinde %0.6 IPA İsokratik Dedeksiyon: 265 nm

2.2.1.3.Vitamin E

Yağda çözünen 6 hidroksi kroman bileşiklerinin genel ismi olan Vitamin E, metabolizmada antioksidant olarak görev yapmaktadır. Bu antioksidan gurubu 4 tokol ve 4 tokoretionol yapıyı kapsamaktadır. Tokol gurubu E vitamini ailesinde ana bileşen olup alfa beta gama ve sigma tocopherol olarak sınıflandırılırlar. Tokoretinoller 3, 7 ve 11 pozisyonunda çift bağlara sahiptirler.



Vitamin E (α Tochopherol)
CAS No. : 59-02-9
Formül : $C_{29}H_{50}O_2$
E.N (°*C*) : 76-78
Molar Kütle (g/mol): 430,71

Metabolizma

E vitamininin etki şekli henüz açıklıkla bilinmemektedir. Tokoferol ve benzeri maddelerin kuvvetli antioksidan bir etkiye sahip oldukları görülmektedir. Yağlar içerisinde bulunan tokoferoller yüksek yapılı doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu önlerler. E vitamini yetersizliği bulunan deney hayvanlarından hazırlanan mitokondrilerde aktivitenin ileri derecede bozulduğu görülmektedir. Bu bozukluk mevcut doymamış yüksek yağ asitlerinin hematinle katalize edilen peroksidasyonundan ileri gelmektedir. E vitamini ilâvesi antioksidan etkisi ile bu peroksidasyona mani olmaktadır.

Yapılan gözlemler E vitamini noksanlığı gösteren deney hayvanlarının kaslarında daha çok oksijen kullanıldığını ortaya koymuştur. Bu durum özellikle kalp ve iskelet kaslarında daha belirgin bir haldedir. Vitamin E etkisi ile Koenzim-Q etkisi arasında bir benzerlik veya ilişki olduğu zannedilmektedir.

Spektral özellikleri

E vitaminin gurubu hem UV hem de flouresans spektral özelliklere sahiptir. Etanol içerisinde tokoferoller ve esterleri 280nm ve 300nm de maksimum absorbsiyon verirler. Tokotrienoller de benzer özellikler gösterirler. Fluoresans değerleri daha güçlü olup kromatografik analizlerde ekstasyon-emisyon değerlerinden faydalanılarak analiz yapılması tercih edilir.

Kararlılık

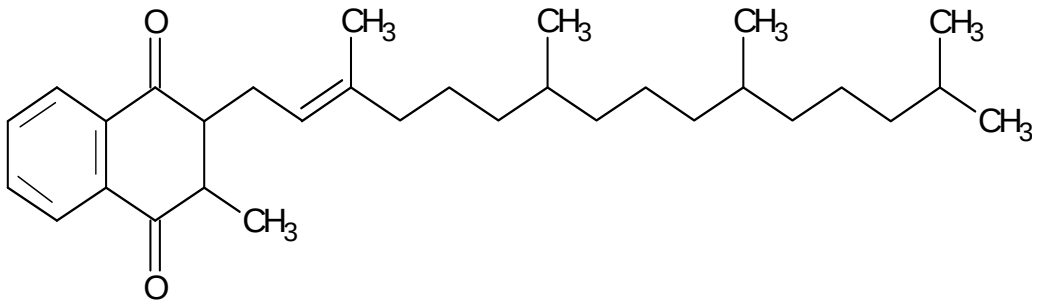
E vitaminin oksidadif kaybı ışık, sıcaklık, alkali ortam, radikaller ve metal iyonları ile hızlanmaktadır. Ancak oksijenin bulunmadığı ortamlarda E vitamini ışığa ve sıcaklığa daha fazla dayanmaktadır.

Analiz yöntemleri

Numune	Ekstraksiyon	HPLC Şartları
Bitkisel Yağlar	İnternal standart ekleyip CH_2Cl_2 ile çözdükten sonra GPC de yıkama yapılır, buharlaştırmadan sonra kalıntı mobil fazda çözülür.	Kolon: Silica Hareketli Faz: Hex:IPA (99,8:0,02) İsokratik Dedeksiyon: λ_{ex}: 290, λ_{em}: 330nm
Zenginleştirilmiş süt ve Özel Formüllü Gıdalar	Sabunlaştırmadan sonra extrakt petrol eteri ile alınıp buharlaştırılır ve kalıntı Hekzan ile çözülür.	Kolon: RedPack Silika Hareketli Faz: Hex:IPA (99:1) İsokratik Dedeksiyon: : λ_{ex} : 290, λ_{em}: 330nm

2.2.1.4.Vitamin K

Kimyasal olarak K1 vitamini phylloquinone olarak anılır ve 2-metil-1,4 naftokinon'un türevleri olarak bilinir. K3 vitamini ise menadione olarak anılır ve 2-metilnaftalen-1,4-dione yapıdadır. 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 yetersizliğinde 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.



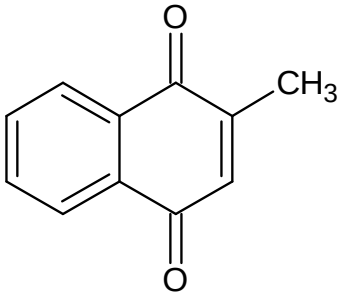
Vitamin K1 (Phyllquinone)

CAS No. : 84-80-0

Formül : $C_{31}H_{46}O_2$

E.N (°C) : 135-136

Molar Kütle (g/mol): 450,71



Vitamin K3 (Menadione)

CAS No. : 58-27-5

Formül : $C_{11}H_8O_2$

E.N (°C) : 105-107

Molar Kütle (g/mol): 172.18

Metabolizma

Vitamin K'nın bilinen en önemli etkisi koagulasyonla olan ilişkisidir. K vitamininin yetersiz olduğu hallerde kan pıhtılaşmasının geciktiği gözlenmiştir. K vitamini yetersizliği protrombin'in sentezi için gerekli bir enzim olan "prokonvertinin" karaciğerde sentezinin yapılmamasına sebep olur. K vitamininin bitkilerde, mikroorganizma ve hayvanlarda yaygın şekilde bulunuşu kan pıhtılaşması dışında başka bir fonksiyonun daha bulunabileceği kanısını uyandırmaktadır. Özellikle K vitamininin oksidatif fosforilasyonda görevi bulunduğu anlaşılmaktadır. Bazı bulgular Vitamin K nın hayvansal dokuda elektron taşınmasında özel bir yoldan koenzim görevi yaptığı olasılığını düşündürmektedir. Bir kinon olan K vitamini tersinir bir şekilde kinole indirgenebilmektedir. Bu nedenle elektron taşıma görevi yapabilecek bir niteliktedir.

Spektral özellikleri

Naftokinon yapılarına bağlı olarak phllykinon ve menakinon yapılarının UV spektrumları karakteristiktir. Phyllkinon yapısı 242, 248, 260 ve 325 nm dalga boylarında absorbsiyon yapmaktadır. K vitaminin bileşikleri fluoresans yapmazken yapıdaki kinon bölümler hidrokinona çevrilerek fluoresans yapabilir hale getirilebilirler.

Kararlılık

K vitaminin bileşikleri başta oksijen olmak üzere gıda prosesindeki birçok ekti karşısında dayanıklı olmaktadırlar. Ancak ışık ve bazik ortamlarda kararlı değildirler.

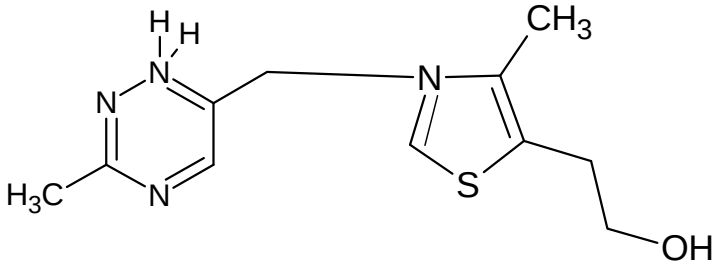
Analiz yöntemleri

Numune	Ekstraksiyon	HPLC Şartları
Sebzeler	İnternal standart ekleyip Hekzan ile çözdükten sonra santrifuj, C18 ile clean up yapılır	Kolon: ODS Hareketli Faz: MeOH:Su (92.5:7,5) İsokratik Dedeksiyon: : 260 nm
Süt ve Özel Formüllü Gıdalar/K1	$CHCl_3$:MeOH(2:1) ile ekstraksiyon yapılır.	Kolon: ODS Hareketli Faz: MeOH:CH_2Cl_2 (8:2) İsokratik Dedeksiyon: 270 nm

2.2.2.Suda çözünen vitaminler

2.2.2.1.Vitamin B1

Hidroklorid formunun basit formülü $C_{12}H_{17}ClN_4OS.HCl$ olan B1 vitamininin kimyasal ismi 2-[3-[(4-amino- 2-methyl- pyrimidin- 5-yl) methyl]- 4-methyl- thiazol- 5-yl] ethanol olarak geçmektedir. Thiamine hidrokolorid renksiz, kokusuz ve suda yüksek oranda çözünebilen bir yapıdadır. Hayvansal ürünlerde bulunan thiaminin % 95 i fosforilat formundadır.



Vitamin B1(Thiamin)

CAS No. : 67-03-5

Formül : $C_{12}H_{17}ClN_4OS.HCl$

E.N (°*C*) : 246-250

Molar Kütle (g/mol): 337,26

Metabolizma

Thiamin fosfat türevleri vücutta emilmeden önce enzimler vasıtası ile serbest thiamine çevrilir. Vücutta vitamin B1 doğrudan kullanılmamakla beraber birçok mekanizmada (dehidrojenaz sistem) görev almaktadır.

Spektral özellikleri

Thiamin Hidroklorid 200 -300 nm dalga boylarında absorbans vermektedir. Maksimum absorbsiyon verdiği dalga boyu değişmekle birlikte pH 3 değerinde 246 nm dir.

Kararlılık

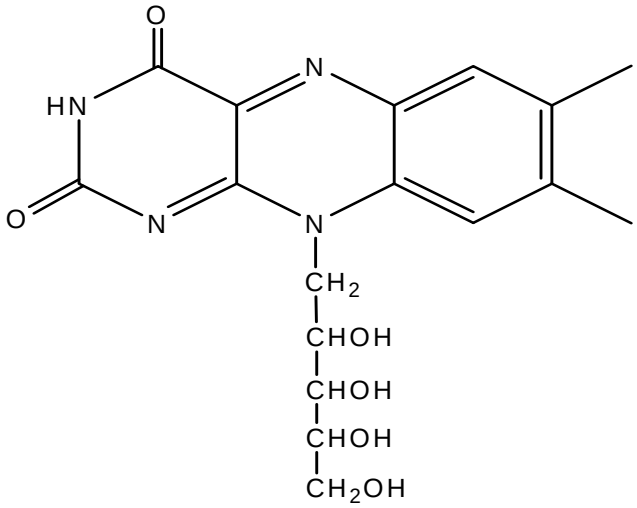
Suda çözünen vitaminler içerisinde düşük asitlik (nötral ortam) de kararlılığı en düşük vitaminlerden birisi B1 vitaminidir. pH 2-4 aralığında dayanıklılığı maksimumdur. Dolayısı ile düşük asitli ya da alkali oranı yüksek gıdalarda çabuk bozunur. Gıda prosesinde homojenizasyon, çürüme gibi olaylardan çabuk etkilenen bir vitamindir.

Analiz yöntemleri

Numune	Ekstraksiyon	HPLC Şartları
Çeşitli Gıdalar	10 mL 0.1 N HCl 1 g numuneye eklenip otoklav edilir. Takadiastaz enzimi ile parçalama yapılır. TCA eklenerek santrifuj edilir. C18 ile clean up yapılır.	Kolon: ODS Hareketli Faz: MeOH:Fosfat (30:70) İsokratik Dedeksiyon: : 254 nm
Özel Formüllü Gıdalar	HCl ile pH 4 olacak şekilde ekstraksiyon yapılarak süzülür.	Kolon: ODS Hareketli Faz: MeOH:Fosfat (30:70) İsokratik Dedeksiyon: 254 nm

2.2.2.2.Vitamin B2

7,8-dimetil 10-izoaloksazin yapısındaki B2 vitamini Riboflavin olarak bilinir. İzoaloksazin halkası flavin grubu olarak da bilinir. Sarı –yeşil renkte olup metanolde kısmen çözünürken eter gibi çözücülerde çözünmez. Işıktan korunduğu sürece gıda prosesinde sıcaklığa ve oksidasyona karşı oldukça dirençli bir vitamindir.



Vitamin B2 (Riboflavin)

CAS No. : 83-88-5

Formül : $C_{17}H_{20}N_4O_6$

E.N (°C) : 220-224

Molar Kütle (g/mol): 376,37

Metabolizma

B2 vitamini doku solunumunda elektron nakleden enzim sisteminde koenzim olarak görev yapar. Genel olarak "Delıidrogenaz'lar" olarak adlandırılan bu enzimler, substrattan veya başka bir ara taşıyıcıdan "H" alarak sitokrom sistemine naklederler.

Spektral Özellikleri

Sulu çözeltilerinde riboflavin 223,266, 373 ve 445nm dalga boylarında absorpsiyon yapar. Birçok HPLC uygulamalarında fluoresan özelliğinden (Ex 440nm Em 520nm) faydalanılarak da analiz edilir.

Kararlılık

Işıktan korunduğu sürece riboflavin, sıcaklık ve oksidasyona karşı oldukça kararlı bir vitamindir. Dolayısı ile birçok gıda üretim prosesinden minimum seviyede etkilenir. Ancak yine de küçük miktarda kimyasal bozulma gözlenebilir. 420nm ile 500nm dalga boyları arasında riboflavin kolayca bozulur. Dolayısı ile B2 vitaminini içeren gıdalarda en önemli husus paketleme olmaktadır.

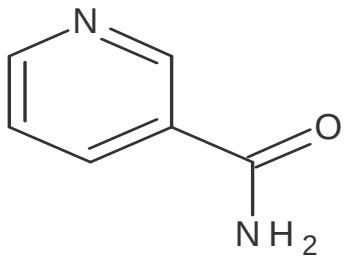
Analiz yöntemleri

Numune	Ekstraksiyon	HPLC Şartları
Peynir	Su:MeOH (2:1) ile homojenize edilip TCA ile asitlendirilerek santrifuj edilir.	Kolon: ODS Hareketli Faz: MeCN:Su (20:80) isokratik Dedeksiyon: 446 nm
Çeşitli Gıdalar	0.2 M H_2SO_4 ile homojenize edilip otoklavlama yapılır, 2.5 M Asetat tamponu ile pH 4.5'e ayarlanıp clarediastaz ile parçalama ve santrifuj yapılır. C18 kartuş ile clean up sonrası enjeksiyon yapılır.	Kolon: ODS Hareketli Faz: MeOH:Su (35:65) İsokratik Dedeksiyon: λext : 445, λems: 565 nm

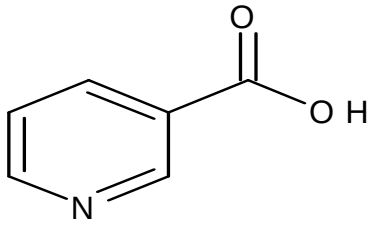
2.2.2.3.Vitamin B3

Kimyasal adı Piridin-3-Karboksilik Asit, kimyasal yapısı nikotinik asitten ibaret olan bu vitaminin kabul olunan resmi adı Niyasin'dir. Aminli bir bileşiği olan Nikotinamid de aynı vitamin etkisine sahiptir. PP Faktörü denilmesinin sebebi Pellagra Preventif faktörü kelimelerinin baş harflerinin kullanılmasından ileri gelmektedir. Pellagra, Pelle Ağara (Sert Deri) anlamına gelmektedir.

Niyasin noksanlığı sonucu meydana gelen bu Avitaminoz hastalığında deri kurumakta ve sertleşmektedir. Vitamin beyaz iğne biçiminde kristaller halindedir.



Nikotinamid
CAS No. : 68-92-0
Formül : $C_6H_6N_2O$
E.N (°*C*) : 128-131
Molar Kütle (g/mol): 122,13



Nikotinikasit
CAS No. : 58-67-6
Formül : $C_6H_5NO_2$
E.N (°*C*) : 236.6
Molar Kütle (g/mol): 123,11

Metabolizma

Biyokimyasal reaksiyonlar sırasında iki önemli dehidrogenaz sınıfı enzimin yapısına koenzim olarak girmek suretiyle görev yapar. Bunlara nikotinamidli dehidrogenazlar denilmektedir. Yeni terminolojiye göre bu iki enzimden birincisi "Nikotinamid-Adenin-Dinükleotid" (NAD), ikincisi ise "Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat" (NADP) diye sınıflandırılmaktadır. Her iki enzimin öteden beri kullanılan adları ise "Difosfo-Piridin-Nükleotid" (DPN) ve "Trifosfo-Piridin-Nükleotid" (TPN) dir. Ancak eski adları koenzimin yapısını doğru bir şekilde açıklamadığı için yukarda verilen adların kullanılması kabul olunmuştur.

Spektral özellikleri

Nikotinik asit özel bir spektruma sahip olup 260nm civarında maksimum absorpsiyon verir. Serbest formları floresan özellik göstermez iken türevlendirilmiş yapılar (co enzim) floresan spektrumu verir.

Kararlılık

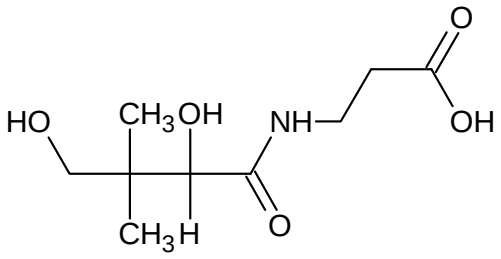
Niyasin en dayanıklı suda çözünen vitamindir. Prosesdeki sıcaklık, ışık, oksidasyon, asitlik ya da alkalilik bu vitaminin biyolojik aktivitesini etkilemez.

Analiz yöntemleri

Numune	Extraksiyon	HPLC Şartları
Çeşitli Gıdalar	80 mL su ve 10 mL $Ca(OH)_2$ eklenip hidroliz edilir ve filtrasyon sonrası enjeksiyon yapılır.	Kolon: PRP-X100 Hareketli Faz: Su:MeOH (5:95) isokratik Dedeksiyon: 254 nm
Özel Formüllü Gıdalar	10g numuneye 50 mL su ve 6 mL 5N H_2SO_4 eklenir. Karıştırılıp otoklavlandıktan sonra NaOH ile pH 6 ya ayarlanıp filtrasyon yapılır.	Kolon: ODS Hareketli Faz: 20mL HAC 1L suda İsokratik Dedeksiyon: 254 nm

2.2.2.4.Vitamin B5

B5 vitamini pantotenik asit olarak adlandırılır. Pantotenik asit, hayvansal besinlerden özellikle süt, et, karaciğer, böbrek, yumurtada, bitkisel besinlerden ise buğday, pirinç ve diğer kuru sebzelerde yaygın halde bulunur. Pantoil ve Ş-Alaninden oluşan Pantotenik asidin kimyasal adı "3-[(2,4-dihydroxy-3,3-dimethylbutanoyl) amino] propanoic acid" dir.



ccc Pantenoik Asit

CAS No. : 79-93-4

Formül : $C_9H_{17}NO_5$

E.N (°*C*) : 122-124

Molar Kütle (g/mol): 219,24

Metabolizma

Pantotenik asit'in büyük değeri biyokimyasal reaksiyonlarda son derece önemli bir rol oynayan "Koenzim-A" nın yapısında yer almasından ileri gelmektedir. Sitrik asit siklusunda oksal asetik asidin, sitrik aside dönüşümünde, suksinil Ko-A nın suksinata dönüşümünde, piruvik asidin dekarboksilasyonunda, yağ asitlerinin oksidasyonunda, bazı amino asitlerin aktivasyonunda ve diğer birçok önemli metabolik reaksiyonlarda Ko-A nın rolü vardır.

Spektral özellikleri

Kromofor guruplar içermeyen pantetonik asit, düşük dalga boylarında zayıf UV spektrumları oluştururlar.

Kararlılık

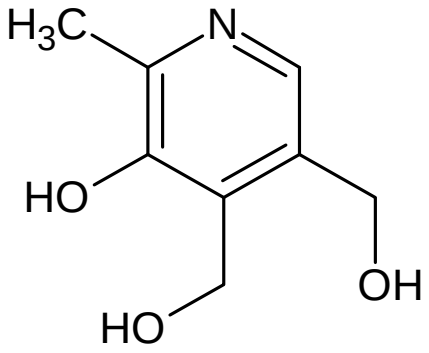
Pantetonik asit, nötral ortamlarda kararlı olurken hem alkali hem de asidik ortamda bozunur. Aynı şekilde sıcaklık da B5 vitaminin için bozucu etki yapmaktadır. Dolaysı ile gıda prosesinde 100 ^{o}C 'ün üzerindeki sıcaklıklar bu vitamini içeren gıdalar için yüksek sıcaklıklardır.

Analiz yöntemleri

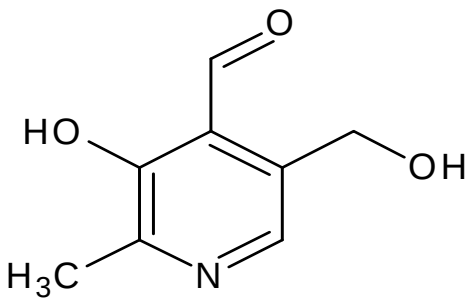
Numune	Ekstraksiyon	HPLC Şartları
Çeşitli Gıdalar	10 mL 0,1 N HCl 1 g numuneye eklenip otoklav edilir. pH 4.6 olarak ayarlanıp enjeksiyon yapılır.	Kolon: ODS Hareketli Faz: MeOH:Fosfat (30:70) İsokratik Dedeksiyon: 254 nm

2.2.2.5.Vitamin B6

Piridoksin veya piridoksal, "4,5-Bis(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-3-ol" yapısındadır Gerçekte B6 vitamini etkisi gösteren sadece piridoksin değildir. Aldehit şekli olan "Piridoksal" ve aminli bileşiği olan "Piridoksamin" de aynı etkiyi gösterirler. Bunlar idrarla piridoksik asit şeklinde dışarı atılırlar. Piridoksin bitkilerde ve hayvansal besinlerde özellikle yumurta sarısında yaygın şekilde bulunur.



Piroksidin (PN)
CAS No. : 65-23-6
Formül : $C_8H_{11}NO_3$
E.N (°*C*) : 160
Molar Kütle (g/mol): 169,18



Piroksidal (PL)

CAS No. : 65-22-5

Formül : $C_8H_9NO_3$

E.N (°C) : 165

Molar Kütle (g/mol): 203,63

Metabolizma

Piridoksinin biyokimyasal olarak en etkili olan şekli piridoksal fosfattır. Piridoksal fosfat tirozin, arginin, gulutamik asit ve diğer bazı amino asitlerin dekarboksilasyonunda görevli enzimlerin prostetik gurubunu teşkil eder. Piridoksal fosfat ayrıca serin ve treoninin deaminasyonunda koenzim olarak görev yapar. Piridoksal fosfatın diğer bir önemli rolü de transaminasyon sırasında görülür.

Spektral özellikleri

B6 vitaminin bütün formlarının kendine has UV spektrumları vardır. Özellikle 292nm dalga boyu civarında maksimum absorpsiyon verir.

Kararlılık

B6 vitaminin bütün formları ışıktan korunduğu sürece asidik çözeltiler içerisinde kararlıdır. Ancak pridoksin, diğer bütün formlara göre daha kararlı durumdadır. Genellikle ısıya karşı kararlı olmalarına karşın gıda prosesindeki yüksek sıcaklıklar B6 vitaminin tüm formlarına kısmen zara verebilmektedir.

Analiz yöntemleri

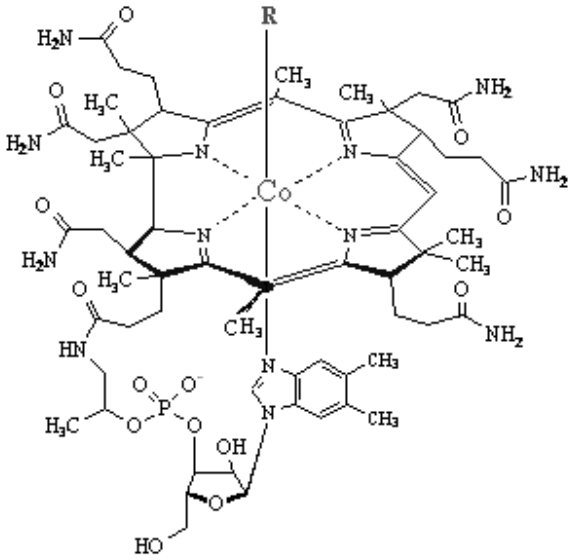
Numune	Ekstraksiyon	HPLC Şartları
Süt	0.1N KH_2PO_4 ile homojenizasyon yapılır. 3mL 4N perklorik asit eklenip santrifuj ederek filtrasyon yapılır.	Kolon: ODS Hareketli Faz: MeCN: KH_2PO_4 (2,5:97,5) İsokratik Dedeksiyon: : 290 nm
Çeşitli gıdalar	25 mL %5 TCA ve internal standart eklenip homojenize edildikten sonra 50 mL TCA ile dilüsyon yapılır.	Kolon: ODS Hipersil Hareketli Faz: MeOH:Fosfat (3:97) İsokratik Dedeksiyon: : 298 nm

2.2.2.6.Vitamin B12

Genellikle hayvanlar ve yüksek yapıda bitkisel organizmalar tarafından sentez edilemeyen, ancak mikroorganizmalarca sentez edilebilen çok önemli bir besin faktörüdür. İzole etmek ve elde etmek ancak 1948 yılında mümkün olmuştur. Daha önceleri ekstrensek faktör veya antipernisyöz faktör olarak yaptığı etkisi ile biliniyordu. Kırmızı kristal halde bir maddedir. Mikrogram ile ölçülecek çok ufak miktarları ile etki yapar. Streptomices griseus ile bir fermentasyon ürünü olarak elde edilebilir. Halen en verimli B12 vitamini kaynağı olarak "Propionibacterium Shermanii" kültüründen yararlanılmaktadır. Yapısı oldukça karışık olan B12 vitamininde merkezi yapıyı "corrin" halka sistemi denen bir sistem oluşturur. Hemin yapısına benzeyen bu sistemde, Hemin'den farklı olarak pirrol halkalarından ikisi "meten" köprüsü yerine birbirleri ile doğrudan doğruya bağlanmışlardır. Porfirin halkasının ortasında bir kobalt atomu yer almaktadır. Kobalt atomu pirrol halkalarının azot atomlarına koordine haldedir. Kobalt atomu bir koordinat bağıyla değişik türde bir nükleotide bağlıdır. Bu madde 5,6-dimetilbenzimidazol rübonükleotitdir. Nükleotidin farkı, yapısında baz olarak benzimidazol bulunmasından ileri gelmektedir.

Benzimidazol bir azot atomuyla kobalta bağlanmıştır. Diğer azot atomuyla alfa-**N**-glikozil bağı aracığıyla riboza bağlanmıştır.

Riboz ise 3 numaralı hidroksil gurubuyla fosforik asidle esterleşmiştir. Fosforik asit corrin halkasının D halkasında yer alan propiyonik asit ve ona peptit bağıyla bağlı aminoizopropanol ile esterleşmiş haldedir.



Siyanokobalamin (B12)

CAS No. : 68-19-9

Formül : $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$

E.N (°C) : 210-220

Molar Kütle (g/mol): 1355,38

Metabolizma

B12 vitamini koenzimine ihtiyaç gösteren (metilmalonil-Ko-A mutaz) enzimler substratta 1,2 numaralı karbon atomları arasında hidrojen atomunun yer değiştirmesini sağlarlar. Buna karşılık karbon atomundan ayrılan hidrojen atomu yerine karşılıklı olarak hidroksil, karboksil, amino veya alkil gurubu nakledilir. B12 vitamini koenzimi ribonükleozit-5-fosfattan oksijen ayrılması suretiyle ikinci karbon atomunun indirgenmesini sağlar. Koenzim B12 bakterilerde karbon oksijen bağlarının parçalanmasını da gerçekleştirir. Veya D-Alfa-lizin mutaz da olduğu gibi karbon azot bağının parçalanmasını sağlayabilir. B12 vitamininin diğer önemli bir fonksiyonu kobalt atomuna

bağlanan 5-Deoksiadenozil gurubu yerine bir metil gurubu girmesiyle meydana gelen metilkobalaminin metil gurubunu başka bir substrata nakletmesidir. örneğin kobalamin N5-metiltetrahidrofolatdan aldığı CH_3 gurubunu belirli alıcılara nakleder. Metil alıcısı olarak homosistein metilkobalaminden yararlanmak suretiyle metionine dönüşür. Metilkobalaminden yararlanarak bakteriler, metan ve asetik asit oluşumunu sağlayabilirler.

Spektral özellikleri

Sulu çözeltilerinde siyanokobalamin, 278, 361 ve 571nm dalga boylarında maksimum absorpsiyonlar gösterir. Özellikle kromatografik çalışmalarda B12 vitamininin tayini için 360nm dalga boyunda spektrumlar alınmaktadır.

Kararlılık

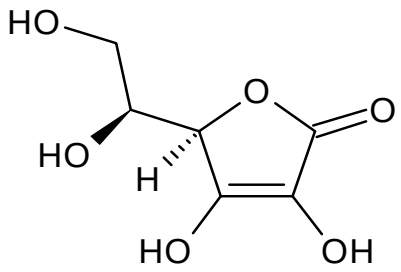
B12 vitaminin kristal formu ışıktan korunduğu sürece kararlıdır. Prosesteki birçok etkene karşı (asitlik, oksidasyon, ısı) dirençli olmasına karşın pişirme sıcaklıklarında bütün suda çözünen vitaminler gibi kolayca bozunurlar.

Analiz yöntemleri

Numune	Extraksiyon	HPLC Şartları
Süt	%10 TCA ile karıştırılıp homojenize edildikten sonra otoklavlanır.	Kolon: ODS Hareketli Faz: Fosfat:MeCN(20:80) isokratik Dedeksiyon: 280
Özel Formüllü Gıdalar	60mL 0.1 N H_2SO_4 ile 45 ^oC da hidroliz edilir. Soğutulduktan sonra filtrelenir.	Kolon: RP C18 Hareketli Faz: Metanol:Su(1:9) İsokratik Dedeksiyon: 254 nm

2.2.2.7.Vitamin C

Yapı itibariyle monosakkaridlere benzeyen ve oldukça basit yapıda bir vitamindir. Genellikle yeşil sebzelerde özellikle limongillerde bol miktarda bulunur. En zengin kaynaklarını limon, portakal, yeşilbiber, domates ve diğer meyveler teşkil eder. Beyaz, kristal halde bir tozdur. C-vitamini de Lipoik asit gibi oksitlenmiş ve indirgenmiş olarak iki şekilde bulunur; Askorbik asit ve Dehidroaskorbik asit.



L-Askorbik Asit

CAS No. : 50-81-7

Formül : $C_6H_8O_6$

E.N (°C) : 190-192

Molar Kütle (g/mol): 176,13

Metabolizma

Sadece bazı vertebralı hayvanlar için önemli bir diyet faktörü olan C Vitamini, bazı yüksek yapıda hayvanlar ve bitkiler tarafından sentez edilebilir. Mikroorganizmalarda askorbik asit sentezi yapılmaz, zaten bunların askorbik asit gereksinmeleri de yoktur. Prolin ve hidroksiprolinin hidroksilasyonunda ve diğer hidroksilasyon reaksiyonlarında rol oynadığı saptanmıştır. Fakat bu ikisi spesifik değildir. Diğer indirgeyici maddeler de aynı etkiyi meydana getirebilmektedirler.

Spektral özellikleri

pH değerine bağlı olarak küçük değişiklikler göstermekle beraber L- askorbik asidin 265 nm civarında maksimum absorbans gösterdiği bilinmektedir. Yüksek asidik ortamlarda ise bu değer 244-245 nm dalga boyuna kadar düşmektedir.

Kararlılık

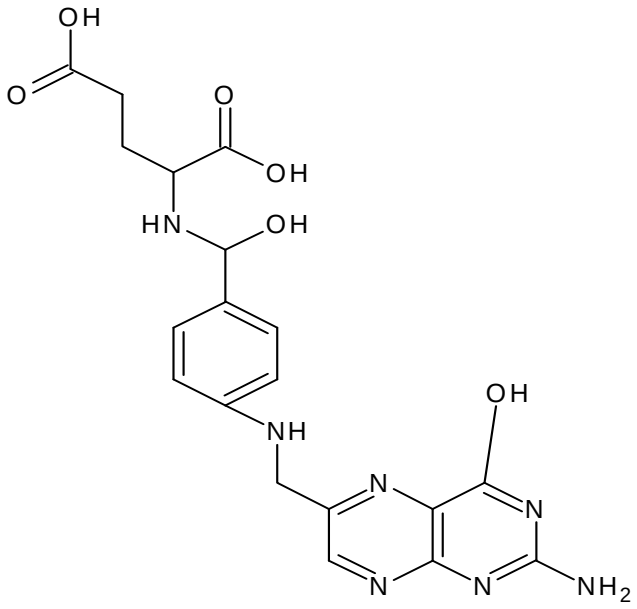
Kristal yapıdaki askorbik asit, oksijen varlığında oldukça kararlı bir vitamindir. Çözeltilerinde ise askorbik asit hidrolize uğramaktadır. Düşük pH değerlerinde askorbik asitin kararlılığı artmaktadır. Isıya karşı dayanıklı olmasına karşın pişirme sıcaklıklarında C vitamini bozulmaktadır.

Analiz yöntemleri

Numune	Extraksiyon	HPLC Şartları
Gıdalar, Meyve ve Sebzeler	60 mL 0.3 N TCA ile homojenize edilip NaOAC ve askorbik asit eklenerek inkübasyona bırakıldıktan sonra.1% OPD eklenir.	Kolon: ODS Hareketli Faz: 0.08 M KH_2PO_4:MeOH (80:20) isokratik Dedeksiyon: 246nm
Özel Formüllü Gıdalar	5 g alınarak %1 lik MPA ile çözülür. Santrifuj edilip süzülür.	Kolon: RP-C18 Hareketli Faz: 0.1M KH_2PO_4 İsokratik Dedeksiyon: 270nm

2.2.2.8.Folik asit

B9 vitamini olarak da anılır. Özellikle yeşil sebzelerde ve ıspanak yapraklarında çok bulunan bu vitaminin adı Folium'da yani yaprakta bulunan asit anlamına gelmektedir. Diğer B kompleksi vitaminlerinde olduğu gibi folik asit mayada da bol miktarda bulunur. Sarı renkte kristal halde bir maddedir, suda çok az erir, alkali ortamlarda kolay çözünür. Folik asitin yapısı başlıca üç organik maddenin birleşmesinden meydana gelir. Bunlar Piridin, p-Aminobenzoik-asit ve glutamik asitlerdir.



Folik Asit

CAS No. : 59-20-3

Formül : $C_{19}H_{19}N_7O_6$

E.N (°*C*) : 135-136

Molar Kütle (g/mol):441,40

Metabolizma

Folik asidin koenzimini teşkil ettiği enzim, tek karbon (C1**)** parçasının naklinde ve kullanılmasında rol oynar. Folik asidin bu şekilde görev yapabilmesi için önce tetrahidrofolik aside dönüşmesi gerekmektedir. Bu indirgenmede NADPH hidrojen donörü olarak görev yapar. Bu enzimin adı "Folik asit redüktaz"dır. Yani folik asit redüktaz NADP ye bağımlı bir enzimdir. Folik asit tek karbon ünitelerini formil ve hidroksimetil şeklinde nakleder. Folik asit pürin halkasında yer alan C2 ve C8 atomlarının naklinde görev yapar.

Spektral özellikleri

Folik asitin hem iyi bir UV absorpsiyon spektrumu hem de floresan özelliği bulunmaktadır. Folat gurupları genel olarak üç maksimum absorpsiyon dalga boyu verecek şekilde UV spektrumları oluştururlar. Bu dalga boyları 254nm, 283 nm ve 364 nm dir. Bazik çözeltilerinde ise floresan değerleri şöyledir; λex:360 nm, λem:450nm.

Kararlılık

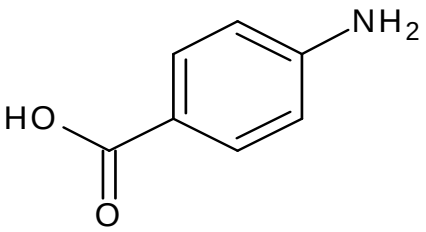
Termal proseslerde folatların %90-95 'e kadar kararlı kaldıkları gözlenmiştir. Bununla birlikte oksijene ve ışığa karşı da oldukça kararlı olan folik asit, gıda prosesindeki metal varlığından olumsuz olarak etkilenmektedir.

Analiz yöntemleri

Numune	Ekstraksiyon	HPLC Şartları
Çeşitli Gıdalar	0.05 M NaOAC ile çözülüp 0.5g/100mL askorbik asit eklenir. 50µL oktanol eklenerek otoklavlanır HK konjugaz ile parçalanıp santrifuj edilir.	Kolon: ODS Hareketli Faz: 0.033M fosfat içerisinde MeCN ile gradient Dedeksiyon: : λ_{ex} : 366, λ_{em}: 415
Özel Formüllü Gıdalar, medikal Gıdalar	15mL su ile çözülüp 100^{o}C da 5 dakika bekletilir. Papain ile parçalama yapılıp filtre edilir.	Kolon: ODS Hareketli Faz: NaOAC/NaSO4:MeCN İsokratik Dedeksiyon: 345 nm

2.2.2.9. p-Aminobenzoik asit

p-Aminobenzoik Asit (PABA), molekül formülü $H_2NC_6H_4CO_2H$ şeklinde olan ve folik asit ile birlikte değerlendirilmesi gereken bir vitamindir. Suda çözünen bu vitamin kristal yapıdadır.



P-Aminobenzoik Asit
CAS No. : 150-13-0
Formül : $C_7H_7NO_2$
E.N (^{0}C) : 187-189
Molar Kütle (g/mol): 137,14

Metabolizma

p-Aminobenzoik asit bazı riketsial hastalıkların tedavisinde başarı ile kullanılmıştır. Bu çeşit hastalık meydana getiriciler önemli bir metabolit olarak p-Oksibenzoik asitten yararlanmaktadırlar. Ortama p-Aminobenzoik asidin verilmesi antagonist olarak rol oynamakta ve riketslerin çoğalmasını önlemektedir.

Spektral özellikleri

p-Aminobenzoik asit 288 nm dalga boyunda en yüksek absorbansı yapmaktadır. Bununla birlikte floresan özellik de gösteren bu vitamin Ext: 264 ve Ems: 350 nm lerde oldukça iyi bir floresan spektrumuna sahiptir.

Kararlılık

Tıpkı folik asit gibi, **p**-Aminobenzoik asit vitaminin de ışık ve oksijen karşısında oldukça kararlıdır. Yine prosesteki sıcaklık artışlarına karşı dirençli olan bu vitamin metal varlığındaki gıda üretimlerinden olumsuz etkilenmektedir.

Analiz yöntemleri

Numune	Ekstraksiyon	HPLC Şartları
Çeşitli Gıdalar	10 mL 0.1 N HCl 1 g numuneye eklenip otoklav edilir. Takadiastaz enzimi ile parçalama yapılır. TCA eklenerek santrifuj edilir.	Kolon: ODS Hareketli Faz: MeOH:Fosfat (30:70) İsokratik Dedeksiyon: : λext : 366, λems: 436
Özel Formüllü Gıdalar	HCl ile pH 4 olacak şekilde ekstraksiyon yapılarak süzülür.	Kolon: ODS Hareketli Faz: MeOH:Fosfat (30:70) İsokratik Dedeksiyon: 254 nm

2.3. Kromatografi

Kromatografi, karışımlardaki kimyasal bileşimlerin ayrılması, tanınması ve tayini için yaygın olarak kullanılan bir analitik metottur. 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. Bu metodun temelinde, ayrılacak bileşenlerin bu iki farklı fazda gösterdikleri davranış farklılığı yer almaktadır. Durgun faz, bir kolon içinde veya düz bir yüzeyde tutturulmuş faza, Hareketli faz ise kromatografide durgun fazın üzerinden veya arasından geçen ve analiti de içeren faza denir.

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.

Çizelge 2.1. Bazı Ayırma Metotlarının Özellikleri

Metot İsmi	**Faz Sayısı**	**Ayrım Prosesi**
Gaz-Sıvı Kromatografi	2	Partisyon
Gaz-Katı Kromatografi	2	Adsorpsiyon
Sıvı-Sıvı Kromatografi	2	Partisyon
Sıvı-Katı Kromatografi	2	Adsorpsiyon
Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon	2	Partisyon
Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon	2	Partisyon
Katı Faz Ekstraksiyon	2	Adsorpsiyon-Partisyon
Katı Faz Mikroekstraksiyon	2	Partisyon-Adsorpsiyon
Elektrofarez	1	Elektromigrasyon
Kapiler Elektrokromarografi	2	Partisyon-Elektromigrasyon
Distilasyon	2	Yapı Değişimi
Çöktürme	2	Yapı Değişimi
Filtrasyon	2	Eleme
Boyut Eleme Kromatografisi	2	Eleme

2.3.1. Kolon kromatografisi

Sabit faz ile doldurulmuş bir kolondan karışım halindeki analitlerin, sürekli akış halinde olan bir hareketli faz ile yıkanması (elüsyon) çok sık kullanılan bir kromatografi tekniğidir. İki faz arasında dağılım gösteren analitin Ortalama Göç Hızı ($\tilde{V}$), bu analitin iki faz arasında gösterdiği Partisyon Oranına (k, Dağılım oranı) bağlıdır. Kromatografide kullanılan bazı terimler Çizelge 2.2. ‘de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Kromatografik Terimler

Terim	Tanımlama	Formülasyon
K	Analitin sabit ve hareketli faz arasındaki derişimi	K= Cs/Cm
k’	Kapasite Faktörü	$k' = (t_R - to)/t_0$
N	Plaka Sayısı	$N = 16\left[\frac{t_{R(A)}}{W}\right]^2$
H	Plaka Yüksekliği	$H = \frac{\sigma^2}{L}$
Rs	Rezolüsyon Gücü	$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4}\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\left(\frac{k'_B}{1 + k'_B}\right)$
α	Seçicilik Katsayısı	$\alpha = k_2/k_1$

Genel olarak kolon kromatografisinde analitlerin ayrımı için iki parametrenin seçimi ön plana çıkmaktadır; hareketli faz ve kolon.

2.3.1.1 Hareketli faz seçimi

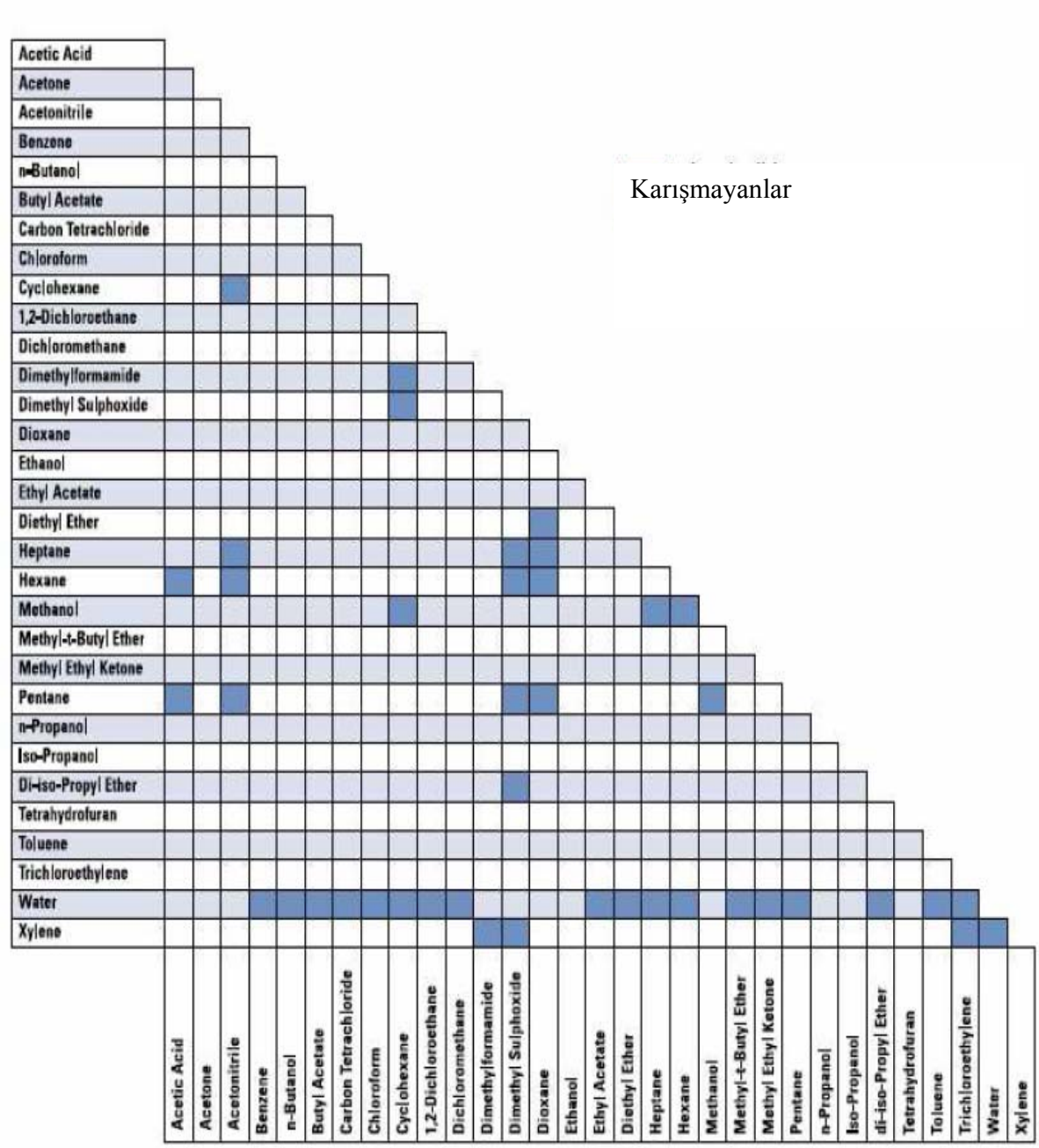
Tüm kromatografik teknikleri için hareketli faz seçimi oldukça önemlidir. Özellikle sıvı kromatografide kapasite faktörü ile hareketli faz bileşimi arasından önemli bir ilişki vardır. Deneysel olarak kapasite faktörü değerinin 1-5 arasında olması istenmektedir. Ancak kompleks karışımlarda bu aralık ideal olmayıp artabilmektedir. Kolondaki ayrımı iyileştirmek için kapasite faktöründe yapılacak değişiklikler hareketli faz seçimi ve kompozisyonunun değişimiyle olmaktadır.

Hareketli faz seçiminde analitlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri ön plana çıkmaktadır. Ayrımı yapılacak analitlerin seçilen çözücü ile reaksiyona girmemesi öncelikle dikkat edilmesi gereken husustur. Daha sonra analitlerin polarite farklarına göre mobil faz kompozisyonları seçilmelidir. Bunun için çözücülerin polaritelerini gösteren Çizelge 2.3 ve birbirleri içerisindeki karışabilirliklerini gösteren Çizelge 2.4’ten faydalanılabilinir.

Çizelge 2.3. Çözücü Polarite Tablosu

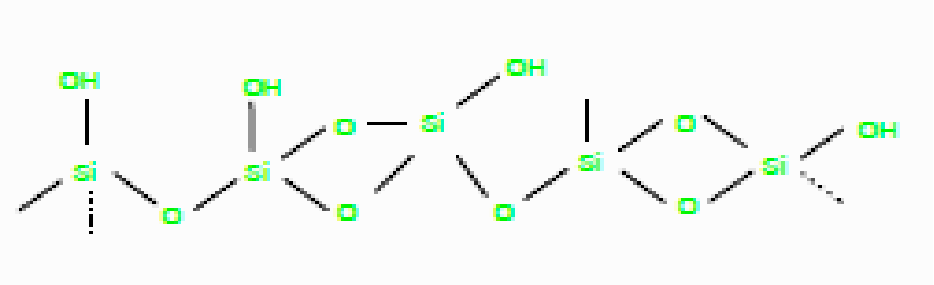
Solvent	Formül	Molekül Ağırlığı	Kaynama Noktası (^{0}C)	Erime Noktası (^{0}C)	Yoğunluk (g/mL)	Suda Çözünürlük (g/100g)	Dielektrik Sabiti	Alevlenme Noktası
Asetik Asit	$C_2H_4O_2$	60.05	118	16.6	1.049	Karışabilen	6.15	39
Aseton	C_3H_6O	58.08	56.2	-94.3	0.786	Karışabilen	20.7(25)	-18
Asetonitril	C_2H_3N	41.05	81.6	-46	0.786	Karışabilen	37.5	6
Benzen	C_6H_6	78.11	80.1	5.5	0.879	0.18	2.28	-11
1-butanol	$C_4H_{10}O$	74.12	117.6	-89.5	0.81	6.3	17.8	35
2-butanol	$C_4H_{10}O$	74.12	98	-115	0.808	15	15.8(25)	26
t-butil alkol	$C_4H_{10}O$	74.12	82.2	25.5	0.786	Karışabilen	12.5	11
Karbon tetraklorür	CCl_4	153.82	76.7	-22.4	1.594	0.08	2.24	--
Kloroform	$CHCl_3$	119.38	61.7	-63.7	1.498	0.795	4.81	--
Siklohekzan	C_6H_{12}	84.16	80.7	6.6	0.779	<0.1	2.02	-20
Dietil eter	$C_4H_{10}O$	74.12	34.6	-116.3	0.713	7.5	4.34	-45
Dietilenglikol	$C_4H_{10}O_3$	106.12	245	-10	1.118	10	31.7	143
Dimetileter	C_2H_6O	46.07	-22	-138.5	NA	NA	NA	-41
DMSO	C_2H_6OS	78.13	189	18.4	1.092	25.3	47	95
Etanol	C_2H_6O	46.07	78.5	-114.1	0.789	Karışabilen	24.6	13
Etil asetat	$C_4H_8O_2$	88.11	77	-83.6	0.895	8.7	6(25)	-4
Etilen glikol	$C_2H_6O_2$	62.07	195	-13	1.115	Karışabilen	37.7	111
Gliserin	$C_3H_8O_3$	92.09	290	17.8	1.261	Karışabilen	42.5	160
Heptan	C_7H_{16}	100.20	98	-90.6	0.684	0.01	1.92	-4
Hekzametil formamid	$C_6H_{18}N_3OP$	179.20	232.5	7.2	1.03	Karışabilen	31.3	105
Hekzan	C_6H_{14}	86.18	69	-95	0.659	0.014	1.89	-22
Metanol	CH_4O	32.04	64.6	-98	0.791	Karışabilen	32.6(25)	12
Metil t-bütileter	$C_5H_{12}O$	88.15	55.2	-109	0.741	5.1	??	-28
Metilen klorid	CH_2Cl_2	84.93	39.8	-96.7	1.326	1.32	9.08	1.6
NMP	CH_5H_9NO	99.13	202	-24	1.033	10	32	91
Pentan	C_5H_{12}	72.15	36.1	-129.7	0.626	0.04	1.84	-49
Petrolum eter	--	--	30-60	-40	0.656	--	--	-30
2-propanol	C_3H_8O	88.15	82.4	-88.5	0.785	Karışabilen	18.3(25)	12
Piridin	C_5H_5N	79.10	115.2	-41.6	0.982	Karışabilen	12.3(25)	17
Tetrahidrofuran	C_4H_8O	72.11	66	-108.4	0.886	30	7.6	-21
Toluen	C_7H_8	92.14	110.6	-93	0.867	0.05	2.38(25)	4
Trietil amin	$C_6H_{15}N$	101.19	88.9	-114.7	0.728	0.02	2.4	-11
Su	H_2O	18.02	100.00	0.00	0.998	--	78.54	--
Ağır su	D_2O	20.03	101.3	4	1.107	Karışabilen	??	--
o-ksilen	C_8H_{10}	106.17	144	-25.2	0.897	Çözünmez	2.57	32

Çizelge 2.4. Çözücü Karışabilirlik Tablosu



2.3.1.2 Kolon seçimi

Kolon kromatografisinde iyi bir ayrım için, kullanılacak olan kolon seçimi analitin doğasıyla doğrudan ilişkilidir. Genel olarak sıvı kromatografi kolonları 10-30 cm boyunda düzgün iç çaplı paslanmaz çelik yapılardır. Ayrımın temelini oluşturan dolgu maddeleri, film ya da gözenekli yapıdadır. Gözenekli dolgularda partikül çapları 3- 10µ arasında değişmektedir. Bu partiküller silis, alumina ya da sentetik reçine gibi maddelerdir. Son dönemlerde dolgu maddelerinin partikül çapları düşürülerek (1,8 µ) daha yüksek basınçlarda çalışmaların yapıldığı UPLC veya nano HPLC gibi sistemler konvansiyonel yapıların yerini almaktadır.



Şekil 2.1. Tipik Kolon Dolgu Maddesi

Dolgulu kolonlarda kolon dolgu maddesi üzerine kaplanan durgun sıvı fazın iki farklı şekilde kaplanma tekniği vardır. Bunlar:

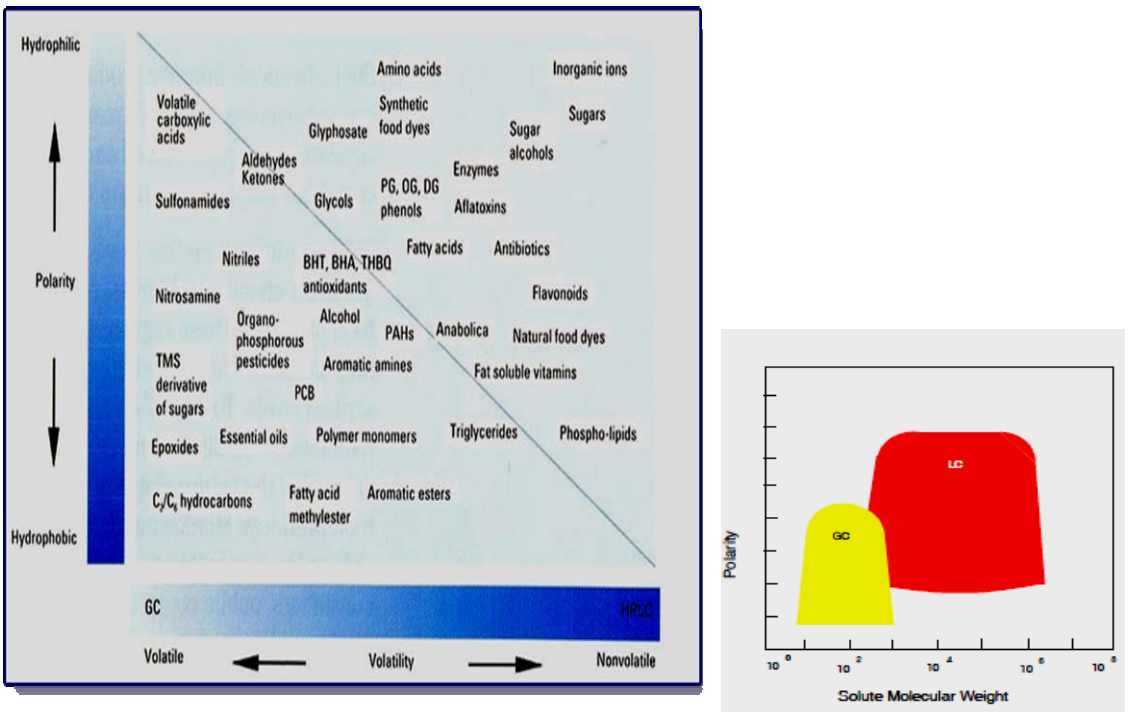
a) Durgun faz katı dolgu maddesi partikülleri üzerine fiziksel adsorpsiyon tekniği ile kaplanır. Ancak bu şekilde tutturulmuş sıvı faz zamanla hareketli fazda çözünebilir ve dolayısıyla sürüklenebilir.

b) Durgun faz dolgu maddesi partikülleri üzerine kovalent bağ karakteri ile kaplanır. Ortaklaşa kullanılan elektron çiftinden oluşan kovalent bağ karakterinden dolayı bu tip kaplamalardan oluşan durgun faz tabakası kararlı özellik gösterir. Bağlı faz dolgu maddelerinin çoğu, organoklorosilan moleküllerinin, yüzeyinde -OH grubu içeren silisyum dioksit ile reaksiyona sokulması ile elde edilirler. Bu reaksiyon sonucunda oluşan ürün bir Organosiloksan molekülüdür.

Oluşan organosiloksan molekülünde görülen R (alkil) grubu genellikle düz zincirli oktil (C-8) veya oktildesil (C-18) grubudur. Bu yapı genellikle Şekil 2.1.'de görüldüğü gibidir. Silis yüzeyine bağlanan diğer organik fonksiyonel gruplar (alifatik aminler, eterler, nitriller ve aromatik hidrokarbonlar v.b.) vasıtasıyla çok farklı polarite özelliği gösteren durgun faz elde etmek mümkün olmaktadır.

2.3.2. Yüksek basınçlı sıvı kromatografi sistemi (HPLC)

Yüksek basınçlı sıvı kromatografi, bütün analitik ayırma teknikleri arasında gaz kromatografisi ile birlikte en yaygın kullanılanıdır (Şekil 2.2) . Bunun sebebi ise kantitatif analizlerde yüksek doğruluğu ve çok geniş bir analit yelpazesinde uygulanabilirliğidir. Temel olarak hareketli fazın bir sıvı olduğu bu teknikte ayrım prosesine, analitin yapısına ve sabit faza bağlı olarak farklı tipte uygulamalar mevcuttur. Bunlar; dağılma kromatografisi, adsorpsiyon kromatografisi, iyon değişim kromatografisi ve boyut eleme kromatografisi olarak sınıflandırılabilir .



Şekil 2.2. HPLC-GC Kullanımı alanları

Dağılma Kromatografisi sıvı kromatografi sistemi içerisinde en yaygın olanıdır. Temel olarak sabit fazın bir destek katısının yüzeyine tutturulduğu sistemler daha fazla rağbet görür. Bu sistemler de hareketli ve sabit fazın bağıl polarlığına bağlı olarak ters faz ve normal faz kromatografi olarak iki şekilde sınıflandırılır. Ters faz kromatografide durgun faz genellikle bir hidrokarbon iken hareketli faz su gibi polar bir çözücüdür. Normal faz kromatografide ise sabit faz bir silika ya da amino yüzeye tutturulmuş hekzan gibi düşük polaritede bir çözücü iken hareketli faz olarak organik çözücüler kullanılmaktadır. Normal faz kromatografisi daha çok yapısal izomer ayrımında kullanılmaktadır.

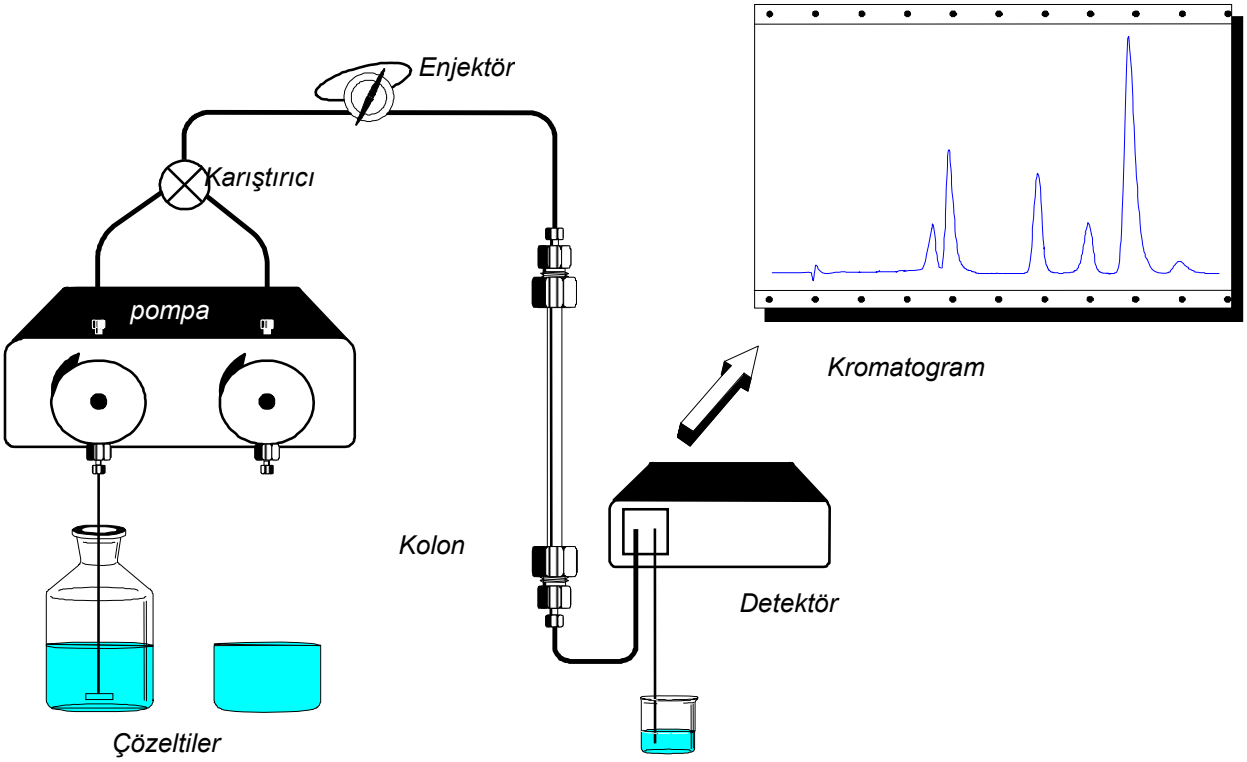
Adsorpsiyon kromatografisi bir sıvı-katı kromatografisi tekniği olup sabit faz silika veya aluminadır. Ayrım prosesinin temelinde bu sabit fazlar üzerine adsorplanan analitin farklı hareketli fazlar ile elüsyon farklılığı yatmaktadır.

İyon değişim kromatografisinde mekanizma iyonik etkileşim üzerinden yürümekte olup sabit faz olarak bu sistemlerde karboksimetil ya da sülfanat gibi yapılar kullanılır. Hareketli fazlar ise tampon çözeltiler ya da diğer iyonik çözeltilerdir. Anyon ya da katyon değiştirici kolonlar sayesinde birçok iyon bu kromatografi tekniği ile ayrılıp analiz edilebilmektedir.

Boyut eleme kromatografisi, ayrımın molekül büyüklüğüne göre gerçekleştiği kromatografi sistemidir. Özellikle molekül ağırlığı 1000'den büyük analitler için bu teknik oldukça etkilidir. Boyut eleme kromatografisinde sabit faz, belirli gözenek çapına sahip çapraz bağlı jeller iken, hareketli faz olarak organik çözücüler yaygın olarak kullanılır.

Şekil 2.3.'de görülen modern sıvı kromatografi sistemleri genel olarak aşağıdaki bölümlerden oluşmaktadır;

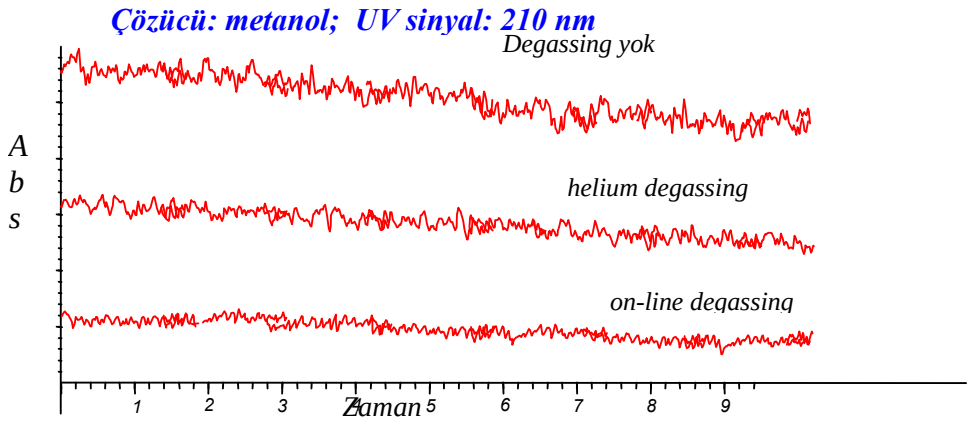
- Çözücü haznesi
- Degasser
- Pompa
- Enjeksiyon ünitesi
- Kolon fırını
- Dedektör
- Veri analiz



Şekil 2.3 HPLC sistemi

2.3.2.1. Çözücü haznesi ve degasser

Kromatografik ayrımın temelinde bulunun hareketli faz bileşeni için kullanılacak olan çözücü ya da çözücüler ile sistemin diğer gereksinimlerinde kullanılacak olan çözücüler sistemde bir hazne içerisinde muhafaza edilir. Buradan seçilen çözücüler sistemin öncelikle degasser ünitesine girmelidir. Çünkü çözücüler içerisinde bulunabilecek muhtemel hava kabarcıkları ile istenmeyen partiküller bu bölümde elemine edilir. Bu sayede hem ayrım prosesinde istenmeyen etkileşimlerden kaçınılmış olup hem de dedektör sinyalindeki analiz kaynaklı gürültü minimuma indirilmiş olmaktadır. Bu şekilde elde edilen verilere dayalı grafik Şekil 2.4.'te görülmektedir.



Şekil 2.4 .Degassing

2.3.2.2 Pompa

Sıvı kromatografi işlemini daha modern hale getirerek HPLC dizaynlarının oluşmasını sağlayan temel üniteler pompalardır. Pompalar sisteme doğru ve sabit akışı sağlamakla görevlidirler. Bu görevi hem doğru hareketli faz kompozisyonu oluşturarak hem de bu kompozisyonun çok sıkı doldurulmuş kolonun içerisinden ilerlemesini sağlayarak gerçekleştirirler.

Temel olarak sistemlerde iki tür pompa kullanılmaktadır; İsokratik pompa ve Gradient pompa.

Tek bir çözücü veya kompozisyonu değişmeyen mobil faz karışımları için isokratik pompalar kullanılmaktadır. Ancak birden fazla çözücünün zaman içerisinde oranlarının değiştiği hareketli faz kompozisyonları için gradient pompalar kullanılmalıdır. Gradient pompalar iki türlü çalışır; çözücüleri düşük basınç altında karıştıran pompalar ve çözücüleri yüksek basınç altında karıştıran pompalar.

2.3.2.3 Enjeksiyon ünitesi

HPLC sistemlerinde örnekleme iki türde yapılabilmektedir; manuel enjeksiyon ve otomatik enjeksiyon. Manuel enjeksiyon için genellikle 6 portlu bit valf ve loop adı verilen bir bölüm bulunmaktadır. Örnek bir enjektör ile sisteme verildiğinde kapasitesine bağlı

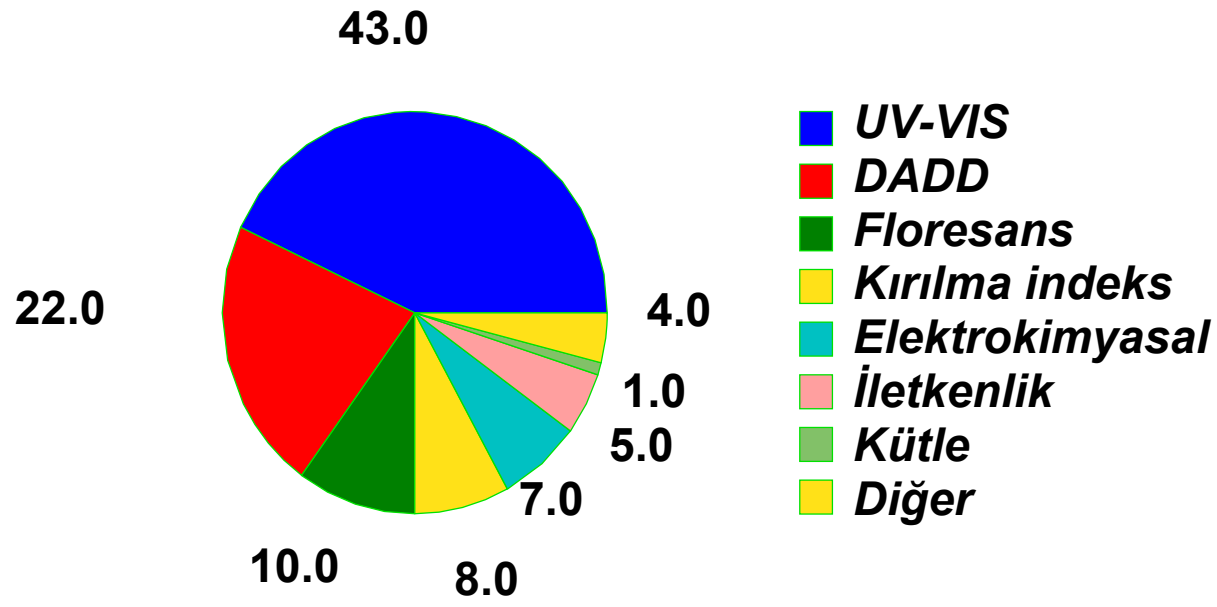
olarak loop doldurulur. Daha sonra manule olarak valfin pozisyonu değiştirilir ve örnek, mobil faz ile kolona gönderilir. Oto enjektörlerde sistem hava ya da elektronik hareket ile çalışmaktadır. Numune enjeksiyonu ve valf pozisyonunun değişimi cihaz tarafından yapıldığı için bu sistemlerde tekrarlanabilirlik manuel enjeksiyona göre daha iyidir.

2.3.2.4 Kolon fırını

Kolon ya da kolonların bulunduğu bu bölüm, analiz sırasında farklı sıcaklık uygulamaları gerektiğinde kullanılmaktadır. Günümüzde iki çeşit kolon fırını bulunmaktadır; blok ısıtmalı kolon fırınları ve hava sirkülasyonlu kolon fırınları. Gelişmiş kolon fırınları -10 ile 150 0C arasında çalışabilmektedir.

2.3.2.5 Dedektörler

HPLC sistemlerinde farklı birçok dedektör kullanılmaktadır. Kullanılan detektörler örnek varlığını doğrudan ölçer ya da örnek ile taşıyıcı faz arasındaki farklılığa göre ölçüm yaparlar. HPLC' de en fazla kullanılan dedektörler UV-DAD, FLD, Refraktif İndeks Dedektör (RID), Elektrokimyasal Dedektör (ECD) ve Kütle Spektrometri Dedektörleri (MSD)'dir. Bu dedektörlerin kullanım yoğunluğu şekil 2.5.'de verilmiştir.



Şekil 2.5.HPLC Sistemlerinde Detektörlerin Kullanımı

UV-VIS ve DAD

Temel olarak ultraviyole ve görünür bölge ışığın absorplanması prensibi ile çalışan dedektörler tek bir dalga boyunda ya da çoklu dalga boylarında ölçüm yapabilmektedir. Tek dalga boyu ile çalışan UV-VIS detektörlerde bir slit-ayna-diod serisi ile belirlenen tek dalga boyundaki ışın, numune bölmesine gönderilir ve örneğin bu dalga boyundaki absorpsiyonu ölçülür. Yüksek hassasiyetli bu ölçümlerde kantitatif tayin için Beer yasası temel alınmaktadır.

$$\text{Log } Io/I = A = \varepsilon \times c \times d$$

Bu eşitliğin sol tarafında numune absorpsiyonu (veya geçirgenliği) bulunmaktadır. Sağ taraftaki parametreler ise sırasıyla; molar absortivite faktörü (ε), numune derişimi (c) ve ışın yolu (d) olarak verilir.

Ticari olarak DAD ya da PDA olarak isimlendirilen detektörlerde döteryum lambadan çıkan polikromatik ışın doğrudan numune bölmesine gönderilir. Buradan çıkan ışın ise slit ve ve bir diod serisi ile dalga boylarına ayrılırlar. Bu sayede bir spektrum elde edilerek daha fazla sayıda analitik bilgi toplanmış olur.

Floresans detektör(FLD)

Gelişmiş floresans detektörlerde ışın kaynağı olarak ksenon lambası ve optik ağ monokromatörü kullanılmaktadır. Bir ışın ile uyarılan elektronların ışığı absorplaması ve tekrar temel hallerine dönerken foton yayınlamaları, moleküler lüminesans yöntemlerinin temelini oluşturmaktadır. Burada yayılan floresan ışığın şiddeti birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir. Çözünmüş oksijen, floresan şiddetini azaltırken sistem tarafından absorplanan uyarıcı demetin ışın gücü (ekstasyon kaynağının gücü) floresan şiddetini artırmaktadır. Yine numune floresanı için kuantum etkisi (lüminesans yapan moleküllerin sayısının toplam uyarılmış molekül sayısına oranı) ne kadar yüksek olursa floresan şiddeti o kadar fazla olur.

Refraktif indeks dedektör

İlk geliştirilen detektör olmasına ve birçok madde için genel olarak kullanılabilmesine rağmen refraktif indeks detektör kötü dedeksiyon limitleri yüzünden çok fazla tercih edilmez. Temel olarak bu detektöre çözücü, bir hücrenin yarı bölmesinden sürekli olarak geçmektedir. Kolondan gelen eluat ise hücrenin diğer bölmesinden geçer. Bu arada sürekli hücreden geçen ışın kırılmaya uğrar ve kırılma oranına bağlı olarak kantitatif analiz yapılır. Özellikle polimerik yapıların tayininde, karbonhidrat tayininde ve trigliseridlerin tayininde sıklıkla kullanılmaktadır.

Elektrokimyasal dedektör (ECD)

Elektrokimyasal detektörler, indirgenebilen veya okside olabilen bileşiklere karşı hassas aletlerdir. Detektör hücresinde üç adet elektrot bulunmaktadır; referans elektrot, çalışma elektrotu ve yardımcı elektrot. Belirlenen optimum bir voltaj altında çalışma elektrotu ile yardımcı elektrot arasındaki potansiyel farkı numune varlığında tespit edilerek kantitatif tayin yapılır. Tayin amperometrik, kulometrik ya da polarografik olarak yapılabilmektedir. Elektrokimyasal detektörler optik detektörler kadar yaygın kullanılmasa da hassasiyeti oldukça yüksek cihazlardır.

Kütle spektrometri dedektörleri (MSD)

Kütle spektrometri detektörleri, HPLC uygulamalarında oldukça geniş bir alana sahip cihazlardır. Bu detektörler inorganik, organik ve biyolojik yapıların aydınlatılmasında, karmaşık bileşenlerin kalitatif ve kantitatif tayininde, bir yapıdaki atomların izotop oranlarının belirlenmesinde sıkça kullanılırlar.

Temel olarak HPLC'den ayrılmış olarak gelen analitler detektörün iyonlaştırma bölümünde yüklü parçacıklar haline getirilirler. İyonlaştırma için analitin yapısına bağlı olarak aşağıdaki tekniklerden biri kullanılabilmektedir.

- Elektron İmpakt
- Kimyasal İyonizasyon
- Elektrosprey
- Atmosferik basınç Kimyasal İyonizasyon

İyonlaşan moleküller kütle analizörlerine gönderilerek kütle/yük oranına göre ayrılırlar. Bu amaçla kullanılan bazı kütle analizörleri şunlardır;

- Manyetik sektör analizörleri
- Çift odaklı analizörler
- Kuadropol Sistemleri
- Uçuş zamanlı analizörler
- İyon Tuzaklı analizörler

Günümüzde birçok cihaz bu analizörlerin iki ya da daha fazlasının bir arada kullanıldığı sistemlere sahiptir. Bu kütle analizörlerinde kütle/yük oranlarına göre ayrılan moleküller foton çoğaltıcı veya elektron çoğaltıcı plakalar üzerine düşürülerek tayin edilirler.

2.3.2.6 Veri analiz

Her ne kadar gelişmiş sistemler sayesinde hedef analit ayrılıp detektörler ile tayin edilse bile özellikle kantitatif verilerin güvenilir olması için iyi bir veri analiz sistemine sahip olunmalıdır. Geçmişte veri analizleri için yazıcıdan çıkan kromatogramların kesilip tartılması ya da ince tabaka kromatografisi üzerinde oluşan bölgelerin alanlarının hesaplanması gibi yöntemler kullanılmış olsa da, günümüzde gelişmiş sinyal dönüştürücüler ve bilgisayarlar yardımı ile analiz sonucu elde edilen veriler yüksek doğrulukta işlenebilmektedir.

3.KAYNAK ARAŞTIRMASI

Gomez ve Ayuso (2009) yaptıkları çalışmada, gıda numunelerinde suda çözünen vitaminlerden tiamin, riboflavin, pridoksin, siyanokobalamin ve folik asitin eşzamanlı tayini için metot geliştirmişlerdir. Geliştirilen bu metotta vitaminlerin ayrımı için C18 kolon kullanılmış, ve her bir vitamin için farklı dalga boylarında floresan ve UV dedektörde çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda vitminlerin geri kazanım değerlerinin % 90-100 aralığında olduğu gözlenmiştir.

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

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.

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.

Ubaldi ve Serventi (2005) vitamin analizlerinde farklı metotların kullanıldığını ve bunların içerisinde en yaygın olanının yüksek performanslı sıvı kromatografi ile yapılan analizlerin olduğunu belirtmişlerdir. Bu kapsamda inek sütünde E vitamininin tayini üzerine yaptıkları çalışmada ters faz HPLC yöntemini kullanmışlardır. Kromatografik çalışmalarda C18 kolon kullanılırken tokoferollerin tayininde kullanılan elektrokimyasal detektör, floresan detektör ve UV detektör verileri karşılaştırılmış, en düşük hassasiyetin UV detektöre ait olduğu belirtilmiştir.

Escriva ve Frigola (2001) süt ve süt ürünlerinde yağda çözünen vitaminlerin yüksek performanslı sıvı kromatografi ile tayini üzerine yaptıkları çalışmada potasyum hidroksit ile 80°C sıcaklıkta sabunlaştırma yapmış ve daha sonra anti oksidanrt olarak askorbik asit ilavesi yapmışlardır. Daha sonra dietil eter ile vitaminleri ekstrakte edip C18 kolon ve metanol-su (94:6, v/v) hareketli faz kompozisyonu kullanarak ayrımını yapmışlardır. Çalışmalar sonucunda A vitamin için geri kazanım değeri % 95,6 E vitamini için geri kazanım % 96,5 olarak tespit edilmiştir.

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.

İreş, N (2009) yaptığı tez çalışmasında yem ve yem katkı maddelerinde suda ve yağda eriyen vitaminlerin eş zamanlı tayini için yeni bir yöntem geliştirmiştir. 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 yapmıştır. 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 etmiştir. Çalışmalarda gradient elüsyon kullanılırken akış hızı=0.7 mL/dk olarak kullanılmıştır. Her bir vitamin için uygun dalga boyu tespit edilip analizler bu dalga boylarında ve Diode array dedektör kullanılarak yapılmıştır.. Yem ve yem katkı numunelerine uygulanan yöntemde eş zamanlı vitamin tayini için belirlenen optimum koşullarda tayin edilebilecek minimum vitamin derişimları belirlenmiştir. 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 verilmiştir

Hurtado ve arkadaşları (1997) bebek mamalarında retinol ve α- tokoferolün birlikte tayini için yaptıkları çalışmada yüksek basınçlı sıvı kromatografi ile metot geliştirmişlerdir. Metot oda sıcaklığında sabunlaştırma işlemini ve ardından n-hekzan ile yapılan ekstraksiyonu kapsamıştır. Vitaminler bir C18 ters faz kolonu ile ayrıldıktan sonra UV dedektör ile tespit edilmiştir. Çalışmalar sonucu doğrusallık, geri kazanım, kesinlik ve hassasiyet tatmin edici çıkmıştır. Metodun en önemli avantajı, vitaminlerin eşzamanlı olarak tek ekstraksiyon ile ayrılıp farklı dalga boylarında tayin edilebilmesi olarak görülmüştür.

Delgado Zammareno ve arkadaşları (2001) yağda ve suda çözünen vitaminlerin elektrokinetik kapiler kromatografi tekniği ile tayini için yaptıkları çalışmalarda sabit faz olarak iki farklı yüzey aktif maddeyi; sodium dodecyl sulfate ve bis(2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate (AOT) kullanmış ve en iyi ayrım şartlarını tespit etmek için karşılaştırma yapmışlardır. Borik asit-sodyum borat tamponu kullanılarak asetonitril-su içerisinde AOT kullanılarak ayrım yapılmıştır. Vitaminlerin ayrımı ve miktarsal tayini için en iyi koşulları belirlemek üzere tampon çözeltinin pH sı, asetonitri-su oranı ve uygulanan voltajın farklı

değerleri için çalışmalar yapılmıştır. Her bir analit için kalibrasyon eğrisi ve kesinlik çalışması yapılmıştır.

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.

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.

4.MATERYAL VE METOT

4.1. Kullanılan Cihazlar

Vitaminlerin eşzamanlı tayini için kullanılan Ulusal Gıda Referans Laboratuarı, Gıda ve Yem Katkı Maddeleri Taklit Tağşiş ve Orijin Belirleme Birimine ait cihazlara ait bilgiler şunlarıdır;

- HPLC
  - Agilent 1200 series G1379 B Degasser
  - Agilent 1100 series G1310A Iso Pump
  - Agilent 1200 series G1329A ALS (otosampler)
  - Agilent 1200 series G1316A TCC (kolon fırını)
  - Agilent 1200 series G1315D DAD
  - Agilent 1200 series G1312A FLD

- Ultra Saf Su Cihazı (Elga Option R 7/15)
- Santrifuj (Sigma 3-16P)
- Hassas Terazi (Kern ABS/ABJ Version 1.3)
- pH Metre (WTW İnolab pH 720)
- Vakum Pompası (Neuberger)
- Ultrasonik Banyo (Starsonic 30)
- Vorteks (Velp)
- Manyetik Karıştırıcı (Velp ARE)

4.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

4.2.1 Kullanılan vitamin standartları

Çalışmada kullanılan vitamin standartlarına ait bilgiler Çizelge 4.1 de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Vitaminler ve temin edildikleri firmalar

Vitamin Adı	**CAS No**	**Firma Adı**
Vitamin A	68-26-8	Sigma Aldrich
Vitamin D3	67-97-0	Sigma Aldrich
Vitamin E	59-02-9	Fluka
Vitamin K1	58-27-5	Sigma Aldrich
Thiamin (B1)	67-03-5	Sigma Aldrich
Riboflavin (B2)	83-88-5	Sigma Aldrich
Niacin(B3)	58-67-6	Sigma Aldrich
Siyanokobalamin (B12)	68-19-9	Sigma Aldrich
Askorbik Asit (C)	50-81-7	Sigma Aldrich
Folik Asit	59-20-3	Sigma Aldrich
p-Aminobenzoik Asit	150-13-0	Sigma Aldrich

4.2.2. Kullanılan çözücüler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddelere ait bilgiler Çizelge 4.2 de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kullanılan Kimyasal Çözücüler, Saflık Dereceleri ve Temin Edildikleri Firmalar

Kimyasal Maddenin Adı	**Saflık Derecesi**	**CAS No**	**Firma**
Metanol	Gradient Elüsyon	7-56-1	Sigma Aldrich
Trifluoro Asetikasit	Kromatografik Saflıkta	76-05-1	Sigma Aldrich
Sodyum Hidroksit	Analiz için	1310-73-2	Merck
Asetik Asit	Analiz için	64-19-7	Merck

4.2.3. Kullanılan vitamin tablet numuneleri

Bu çalışmada vitamin içeriğini belirlemek üzere Şanlı İlaç Sanayi A.Ş' ye ait multivitamin formülü Polivitamin draje ticari preparat kullanılmıştır. Numunenin vitamin içeriği Çizelge 4.3 de belirtilmiştir.

Çizelge 4.3. Polivitamin draje numunesinin vitamin içeriği

Vitaminler	**Bileşimi, mg/Tablet**
Vitamin A	1,05
Vitamin D3	0,55
Vitamin E	1,5
Thiamin (B1)	10
Riboflavin (B2)	5
Niacin (B3)	16
Siyanokobalamin (B12)	0,5
Askorbik Asit (C)	30
Folik Asit	1,8

4.2.4. Çözeltilerin hazırlanması

4.2.4.1. Standart çözeltiler

Suda ve yağda çözünen vitaminler için derişimleri 1000 ppm olacak şekilde stok çözeltiler hazırlandı. Stok çözeltiler hazırlanırken suda çözünen vitaminler su ile, yağda çözünen vitaminler ise metanol ile çözüldü. Daha sonra her bir vitamin için derişimi 100 ppm olacak şekilde ara stok çözeltileri hazırlandı. Çalışma çözeltileri günlük olarak ara stok çözeltilerinden hazırlandı. Çalışma çözeltileri için çözücü olarak metanol/su (50/50) karışımı kullanıldı. Tüm çözeltiler +4 ^{o}C'da karanlıkta muhafaza edildi. Optimizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere hazırlanan vitamin mix çalışma çözeltisinin içeriği Çizelge 4.4 de belirtilmiştir.

Çizelge 4.4. Optimizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere hazırlanan vitamin mix çalışma çözeltisinin içeriği

Vitamin Adı	**Konsantrasyon, mg/L**
Vitamin A	10
Vitamin D3	5
Vitamin E	10
Vitamin K1	5
Thiamin (B1)	10
Riboflavin (B2)	10
Niacin(B3)	15
Siyanokobalamin (B12)	20
Askorbik Asit (C)	10
Folik Asit	20
p-Aminobenzoik Asit	10

4.2.4.2. Diğer çözeltiler

% 0.01 TFA: 0,1 mL TFA alınarak içerisinde bir miktar ultra saf su bulunana 1000 mL hacimli balon jojeye aktarıldı. Daha sonra ultra saf su ile hacme tamamlandı. pH Metre kullanılarak sodyum hidroksit çözeltisi ve asetik asit ile çözelti pH'sı 4 olarak ayarlandı. Vakum pompasında millipore marka durapore membrane filtre kağıdında (0.45µm) süzüldü.

0.1 N NaOH: 4g NaOH tartılarak bir miktar saf suda çözüldü. Daha sonra 100 mL lik balona aktarıldı ve saf su ile hacme tamamlandı.

Ekstraksiyon Çözeltisi: 20mL % 0.01 TFA çözeltisi alınıp 80 mL Metanol ile karıştırılarak hazırlandı.

4.3. Kullanılan Kolonlar

Çalışmalarda vitaminlerin kromatografik ayrımı için iki farklı kolon kullanıldı. Bu kolonlara ait bilgiler Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. Çalışmalarda Kullanılan Kromatografik Kolonlar

Kolon	Agilent Aclipse Plus	Phenomenex Gemini
Boyutlar	150x4.6 mm	150x4.6 mm
Yüzey Alanı	160m^2/g	375m^2/g
pH Aralığı	2-9	1-12
Açık Uçları Kapatma	Çift	Tek
C Yükleme	9%	12%
Gözenek Büyüklüğü	95A^0	110A^0

4.4. Deneysel İşlem

4.4.1. Uygun dedektör ve dalga boylarının seçimi

Vitaminlerin hangi detektörde ve hangi dalga boylarında daha iyi sinyal verdiklerini belirlemek amacıyla çalışmalar yapıldı. Bu çalışma için, kullanılan detektörlere ait özelliklerden ve yazılımdan faydalanıldı. Çalışmalar her bir vitaminin 10 ppm'lik standartları ile yapıldı.

Diod Array detektörün yazılımında bulunan maksimum sinyal özelliği kullanılarak her bir vitamin için en yüksek absorbans verdiği dalga boylarındaki kromatogramlar alındı. Ayrıca vitaminler floresans dedektöre doğrudan enjekte edilerek her birinin floresans spektrumlarına bakıldı. Daha sonra bu spektrumlardan elde edilen maksimum uyarma ve emisyon değerleri kullanılarak her bir vitamin için FLD sinyallerine ait kromatogramlar alındı.

Sonuç olarak vitaminlerin DAD ve FLD'ye ait kromatogramları karşılaştırılarak her bir vitamin için sinyalin alınacağı dedektör ve dalga boyları tespit edildi.

4.4.2. Kolon seçimi ve kromatografik şartların optimizasyonu

Vitaminler için en iyi ayrımın sağlanması amacı ile iki tip kolon ile çalışmalar yapıldı. Çizelge 4.5'te verilen bu iki kolon ile her bir vitamin ayrı ayrı analiz edildi. Vitaminlerin ayrımı için kullanılacak olan en uygun kolon, elde edilen verilere göre seçildi.

Uygun kolon seçimi yapıldıktan sonra suda ve yağda eriyen vitaminlerin eş zamanlı ayırımını yapabilmek için hareketli faz (A: TFA, %0,01 ve B: MeOH) yüzdelerinde ve akış hızlarında değişiklikler yapılarak vitamin pikleri değerlendirildi. Yapılan çalışmalar sonucunda en uygun elüsyon oranı Çizelge 5.8.'da gösterildiği şekilde belirlendi.

4.4.3. pH ve sıcaklığın etkisinin incelenmesi

Çalışmalarda farklı sıcaklık (20^oC, 30^oC ve 40^oC) ve pH (3,4 ve 5) değerleri uygulanarak vitaminlerin ayrımına etkisi incelendi. Öncelikle sıcaklık çalışması yapıldı. Bunun için hazırlanan vitamin karışımının kromatografik şartlar sabit tutularak 20^oC, 30^oC ve 40^oC kolon sıcaklılarındaki çalışmalar ile ayrım incelendi. Daha sonra trifloroasetik asitin (0.01%) pH değeri 3,4 ve 5 olarak ayarlandı ve diğer kromatografik şartlar sabit tutularak çalışmalar tekrarlandı. Elde edilen verilere göre ayrım için en uygun sıcaklık ve pH değerleri tespit edildi.

4.4.4. Ekstraksiyon çözeltisinin oranının belirlenmesi

Çalışmalarda, belirlenen gıda numunelerinden vitaminlerin ekstraksiyonu için 0.01% TFA-MeOH (20/80) ekstraksiyon çözeltisi kullanıldı (İreş N., 2009).

4.4.5. Farmasotik preparatlarda suda ve yağda çözünen vitaminlerin eşzamanlı tayini

Yağda ve suda çözünen vitaminleri içeren Polivitamin draje tabletlerinden 20 adet alınarak homojen olacak şekilde havanda toz haline getirilerek karıştırıldı. Daha sonra bu

karışımından 100 mg numune tartılarak üzerine 10mL TFA- MeOH (TFA-MeOH çözeltisi: %0,01 TFA – MeOH (%20 - %80) ektraksiyon çözücüsü eklendi. 15 dakika vorteksle karıştırılan numune 15 dakika santrifüj edildi (5000 x g, 15 dk). Santrifugat kısımdan uygun miktarda alınarak TFA- MeOH çözeltisiyle seyreltildi. 0,45 μm filtreden süzülerek cihaza enjekte edildi.

4.4.6. Metod validasyon çalışmaları

Ekstraksiyon ve kromatografik şartların optimizasyonunun ardından, belirlenen metot performans kriterleri üzerinde validasyon çalışmaları yapıldı.

Geri kazanım

Geri Kazanım çalışmaları kapsamında vitamin tabletlerinden bölüm 4.4.5'e göre hazırlanan numunelere düşük (yaklaşık LOQ değerinin 2 katı düzeyinde) ve yüksek (yaklaşık numune konsantrasyonlarının 1,5-2 katı düzeyinde) konsantrasyonlarda standartlar eklenerek 10 tekrarlı analizler yapıldı. Analiz koşulları olarak optimizasyon çalışmaları sonucu elde edilen parametreler kullanıldı.

Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik çalışmaları kapsamında vitamin tabletlerinden bölüm 4.4.5'e göre hazırlanan numunelerin 10 tekrarlı analizleri yapıldı. Analiz koşulları olarak optimizasyon çalışmaları sonucu elde edilen parametreler kullanıldı.

Tespit ve Tayin Limiti

Tespit limiti ve tayin limiti çalışmalarında, her bir vitamin için belirlenen detektör ve maksimum absorbans verdikleri dalga boyları göz önünde bulundurularak azalan derişimlerde enjeksiyonlar yapıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda her bir vitamin için cihazda pik olarak görülen derişimler tespit edilip bu derişimlerde vitamin standartları ile tespit limiti ve tayin limiti çalışmaları yapıldı.

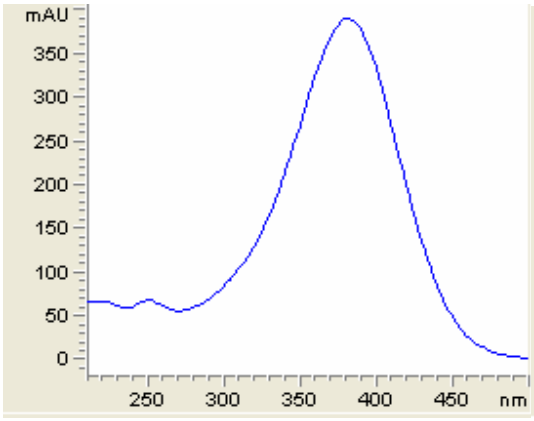
5. DENEY SONUÇLARI

5.1. Uygun Dedektör ve Dalga Boylarının Değerlendirilmesi

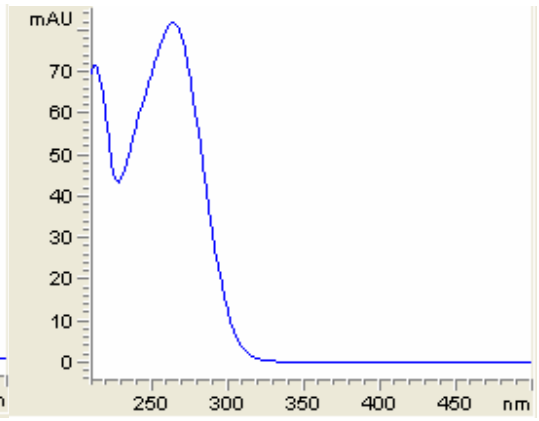
Vitaminlerin kromatografik ayrımı için en uygun şartlar belirlendikten sonra kantitatif tayin için en uygun dedektör ve dalga boyu çalışmaları yapıldı. Bu kapsamda her bir vitamin için 10 ppm derişimde diod array dedektörde maksimum absorbans verdiği dalga boyuna ait pik alanları tespit edildi. Daha sonra bu 10 ppm lik vitamin standartları floresans dedektöre doğrudan verilerek floresans spektrumları incelendi. Bu çalışmalara ait veriler Çizelge 5.1.'de verilmiştir. Şekil 5.1 vitaminlerin diod array dedektöre ait spektrumlarını göstermektedir.

Çizelge 5.1. Vitamin standartlarının iki farklı dedektöre ait verileri

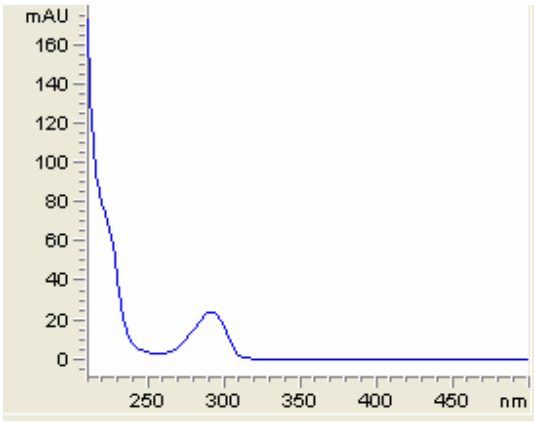
Vitamin, 10ppm	DAD		FLD	
	λ_{max},nm	Alan	$\lambda_{Ex}t/\lambda_{Em}$, nm	Alan
Vitamin A	318	689,32		-
Vitamin D3	262	715,32		-
Vitamin E	292	165,25	210/335	815,65
Vitamin K3	246	436,21		-
Thiamin (B1)	246	687,5		-
Riboflavin (B2)	268	315,42	360/530	335,23
Niacin(B3)	262	550,98		-
Siyanokobalamin(B12	364	315,25		
Askorbik Asit (C)	246	521,01		-
Folik Asit	290	63,08	276/440	55,25
p-Aminobenzoik Asit	288	1619,92	264/350	1596,3



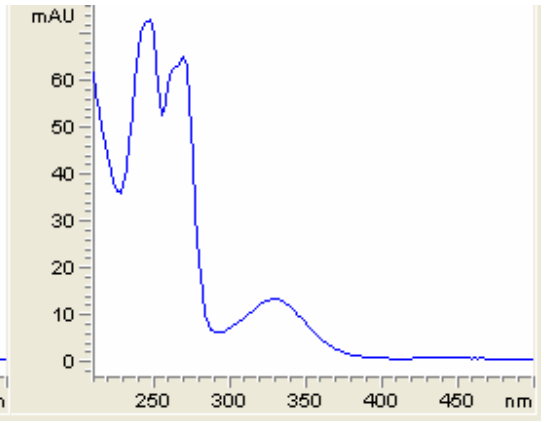
VİTAMİN A



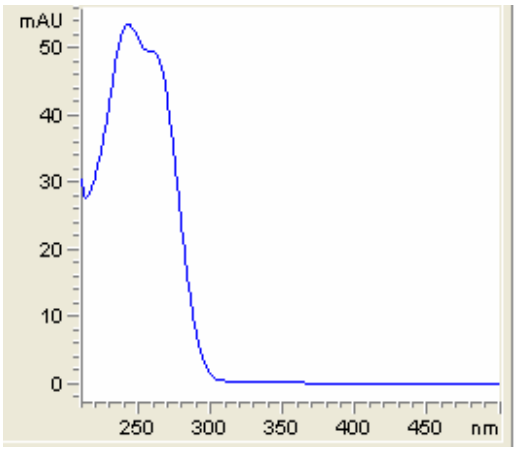
VİTAMİN D3



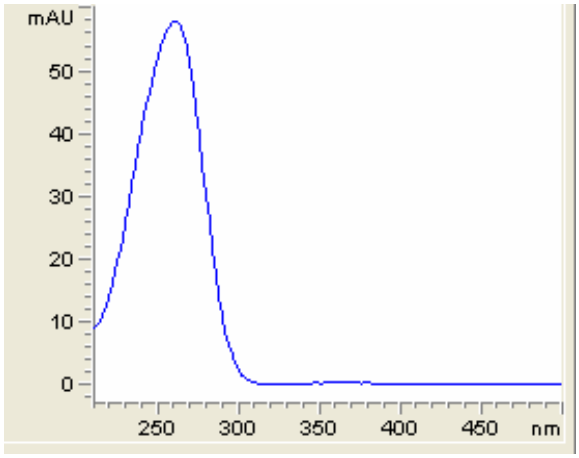
VİTAMİN E



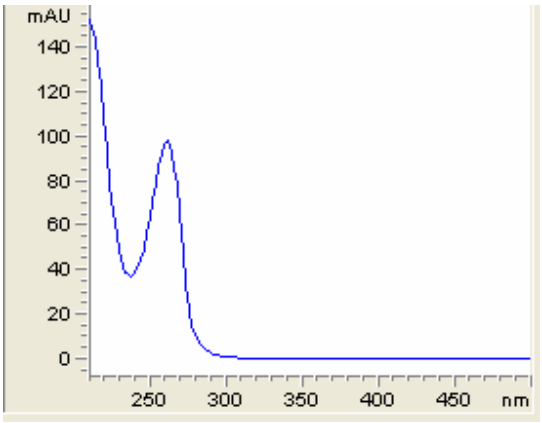
VİTAMİN K1



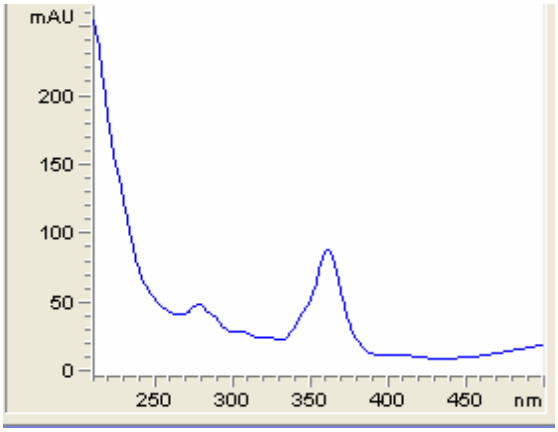
VİTAMİN B1



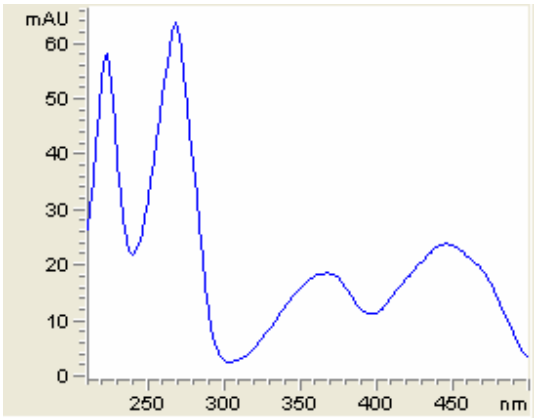
VİTAMİN C



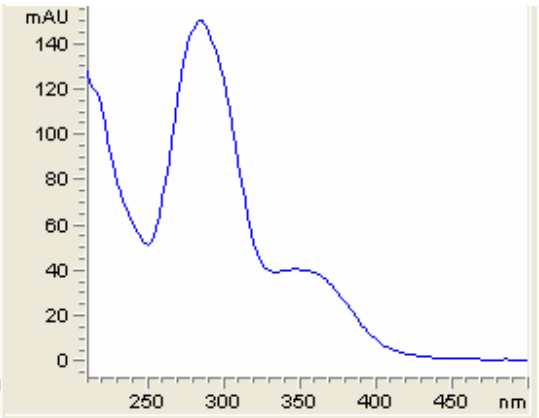
VİTAMİN B3



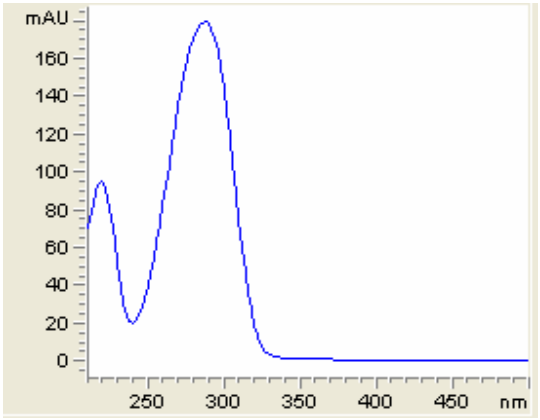
VİTAMİN B12



VİTAMİN B2

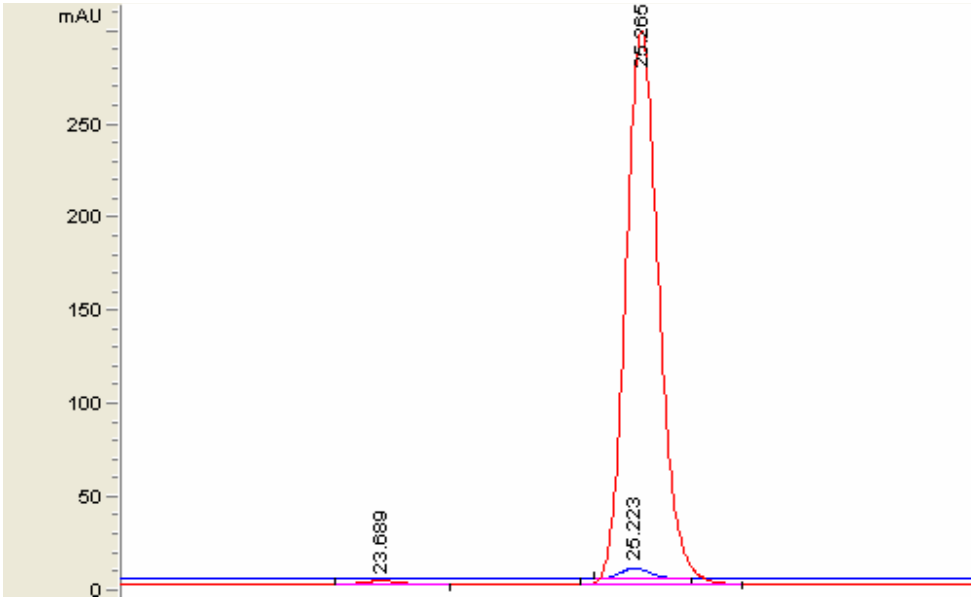


FOLİK ASİT

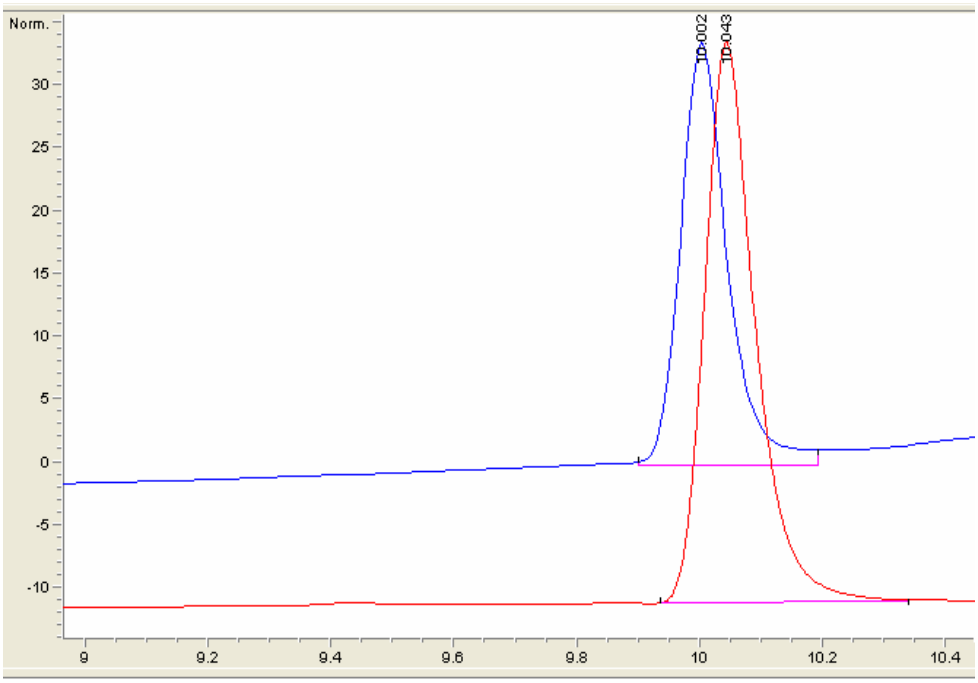


P-AMİNOBENZOİK ASİT

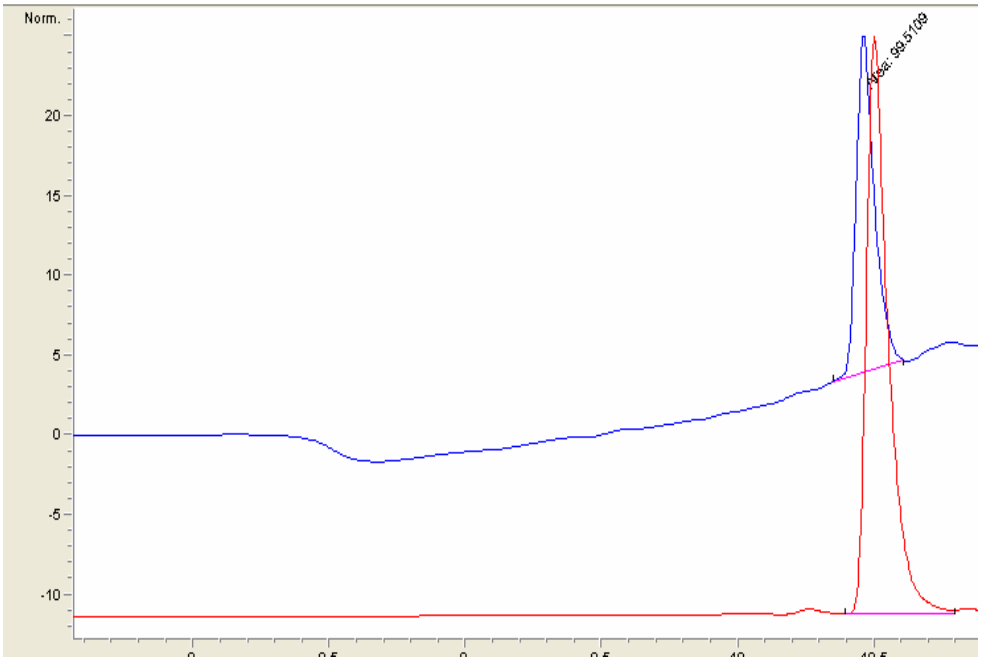
Şekil 5.1. Vitaminlerin Spektrumları



Şekil 5.2 . E vitaminine ait DAD ve FLD kromatogramları



Şekil 5.3. p-Aminobenzoik Aasit vitaminine ait DAD ve FLD kromatogramları



Şekil 5.4. B2 vitaminine ait DAD ve FLD kromatogramları

5.2. Uygun Kromatografik Şartlarının Değerlendirilmesi

5.2.1. Uygun kolonun değerlendirilmesi

Standart vitaminler iki farklı kolon ile aynı şartlarda analiz edildi.

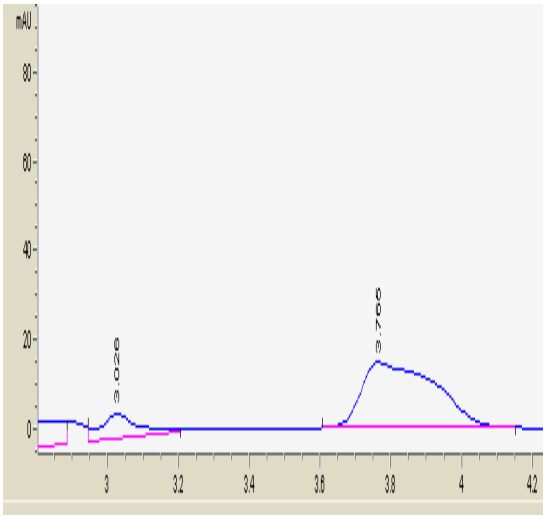
- Agilent Aclipse Plus C18-250A150cm x4.6mm 5 micron
- Phenomenex gemini C18 110A 150cmx4.6mm 3 micron

Çalışmalar sonucunda vitaminlerin kromatogramları incelendiğinde Phenomenex gemini C18 110A 150x4.60mm 3 micron kolona ait verilerin daha iyi olduğu gözlenmiş ve çalışmalara bu kolon ile devam edilmiştir. Bu iki kolona ait veriler Çizelge 5.2 de verilmiştir.

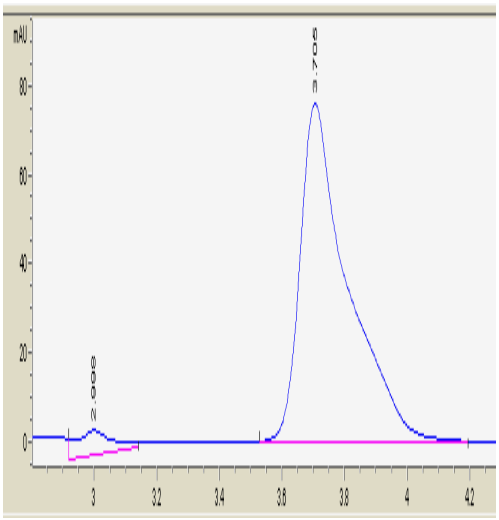
Çizelge 5.2. Vitamin standartlarının iki farklı kolona ait verileri

Vitamin, 10 ppm	Phenomenex Gemini			Agilent Aclipse Plus		
	Alan	Simetri	S/N	Alan	Simetri	S/N
Thiamin(B1)	686,25	1,195	454,1	515,21	2,159	255,2
Niacin(B3)	526,32	1,675	617,2	315,32	2,466	355,2
Folik Asit	182,15	2,096	255,4	115,54	6,492	187,0
Vitamin A	655,34	1,415	872,7	663,98	1,495	845,9
VitaminD3	745,90	1,817	1352,6	662,87	1,854	1025,0

Agilent Aclipse Plus



Phenomenex Gemini



Şekil 5.5. B3 vitamininin iki farklı kolondaki pikleri

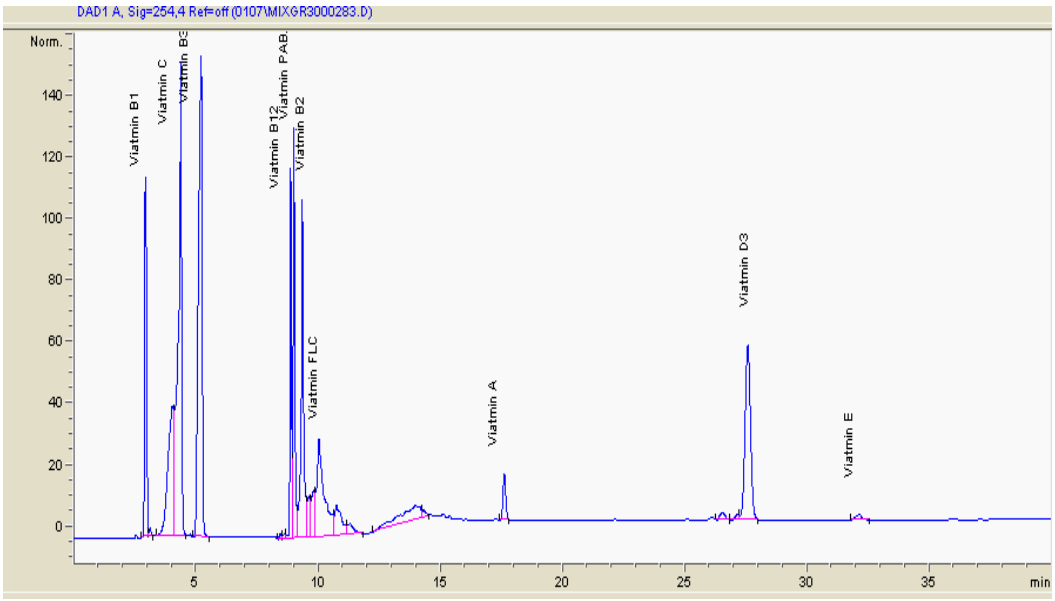
5.2.2. Gradient elüsyon çalışmalarının değerlendirilmesi

Vitaminlerin kromatografik ayrımında kullanılacak kolonun seçimi yapıldıktan sonra gradient elüsyon için akış hızında, dakikalarda ve hareketli faz yüzdelerinde değişiklikler

yapılarak en iyi ayırmayı gerçekleştirmek için çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalarda uygulanan gradient elüsyonlar ve bu elüsyon sonucu alınan kromatogramlar aşağıda gösterilmektedir. I ve II No'lu gradient ile B2, folik asit, p-Aminobenzoik Asit ve B12 vitaminlerinin ayrımı tam olarak sağlanamamıştır. Bu çalışmalar sonucu en iyi gradient programının 3 numaralı çalışma olduğu görülmüştür.

Çizelge 5.3. I No'lu Gradient elüsyon çalışması

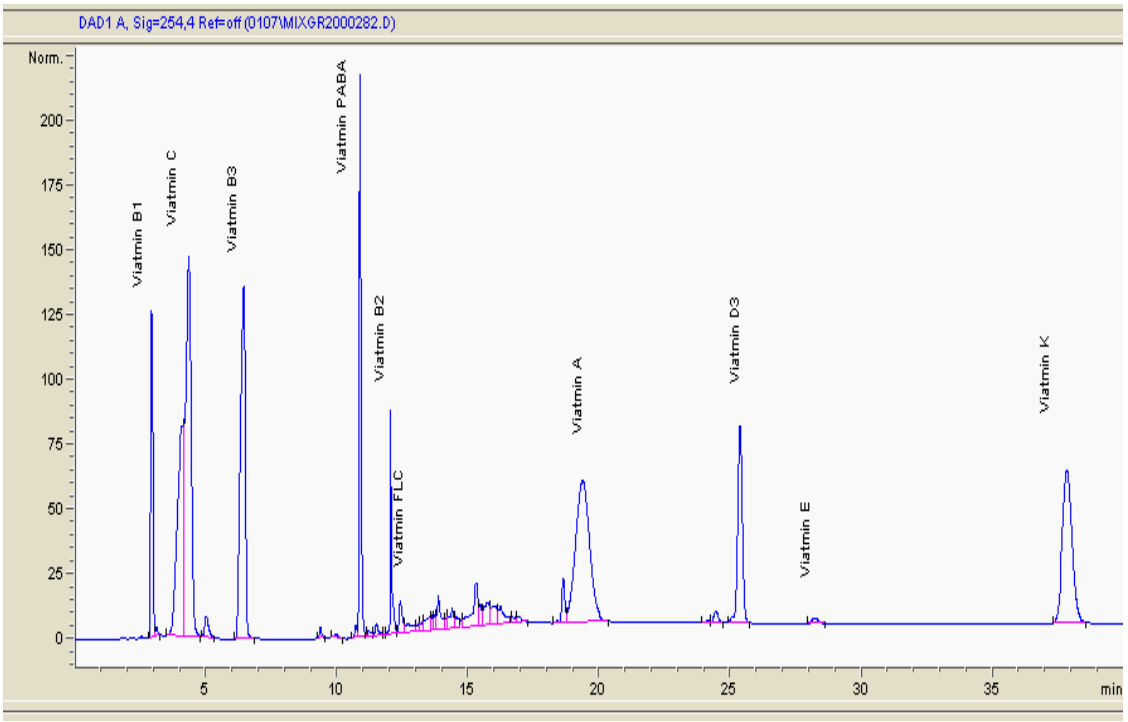
	Dakika	Hareketli faz A (TFA)%	Hareketli faz B (MeOH)%	Akış,(mL/dk)
Gradient I	0	98	2	1,0
	5	98	2	1,0
	15	5	95	1,0
	30	5	95	1,0
	35	98	2	1,0



Şekil 5.6. I No'lu Gradient elüsyon çalışmasına ait kromatogram

Çizelge 5.4. II No'lu Gradient elüsyon çalışması

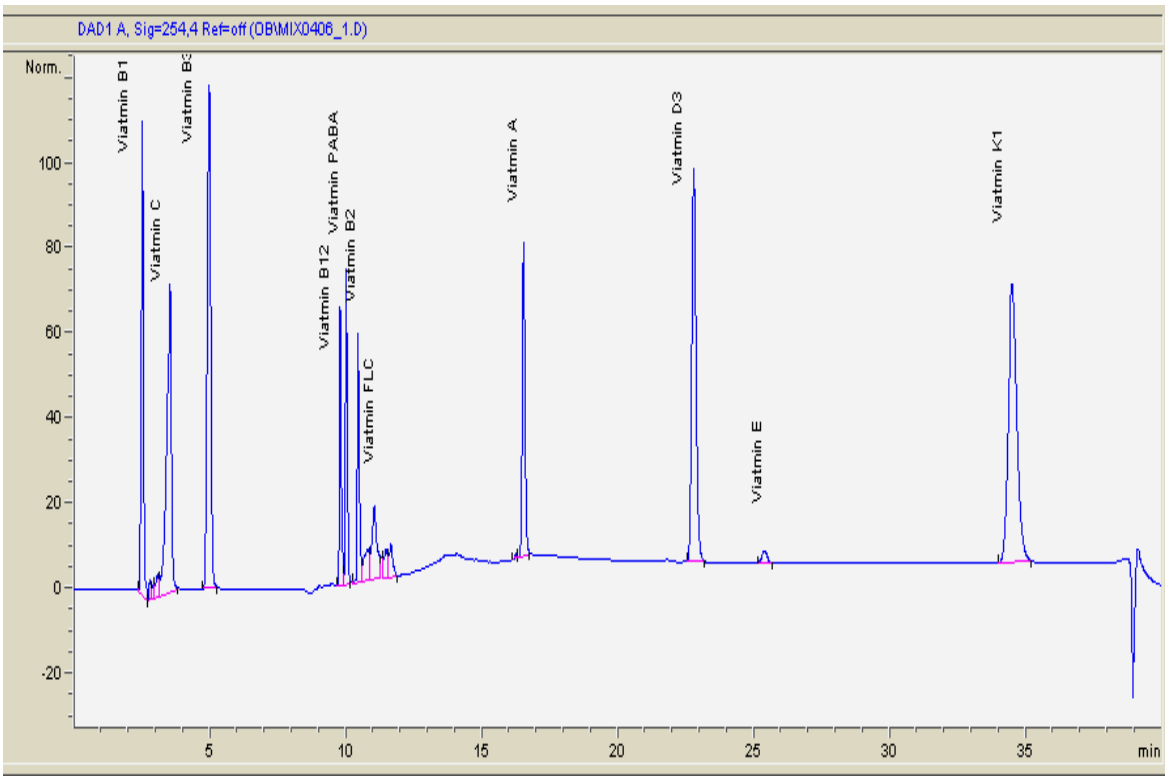
	Dakika	Hareketli faz A (TFA)%	Hareketli Faz B (MeOH)%	Akış,(mL/dk)
Gradient II	0	100	0	0,8
	5	95	5	0,8
	10	5	95	0,8
	30	5	95	0,8
	35	98	2	0,8



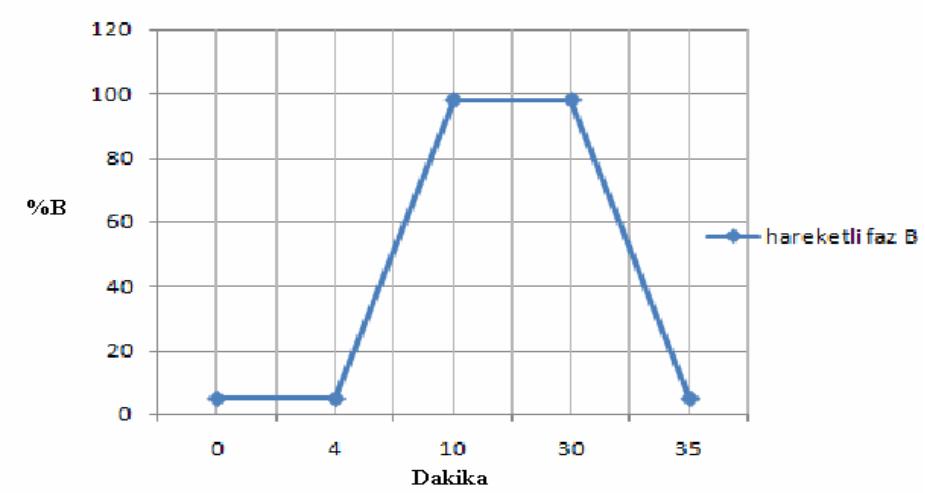
Şekil 5.7. II No'lu Gradient elüsyon çalışmasına ait kromatogram

Çizelge 5.5. III No'lu Gradient elüsyon çalışması

	Dakika	Hareketli faz A (TFA)%	Hareketli Faz B (MeOH)%	Akış (mL/dk)
Gradient III	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



Şekil 5.8. III No'lu Gradient elüsyon çalışmasına ait kromatogram



Şekil 5.9. III No'lu gradient için dakikaya karşı hareketli faz B'nin akış grafiği

Çizelge 5.6. Vitamin Standartlarının Diod Array Dedektör ile Çıkış Zamanları

Vitaminler	**Çıkış zamanı,dak.**
Vitamin A	16,48
Vitamin D3	22,55
Vitamin E	24,99
Vitamin K1	33,82
Vitamin B1	2,47
Vitamin C	3,51
Vitamin B_3	4,99
Vitamin B12	9,77
Vitamin B2	10,46
Folik Asit	11,11
p-Aminobenzoik Asit	9,99

Çizelge 5.7. Vitamin Standartlarının Floresans Dedektör ile Çıkış Zamanları

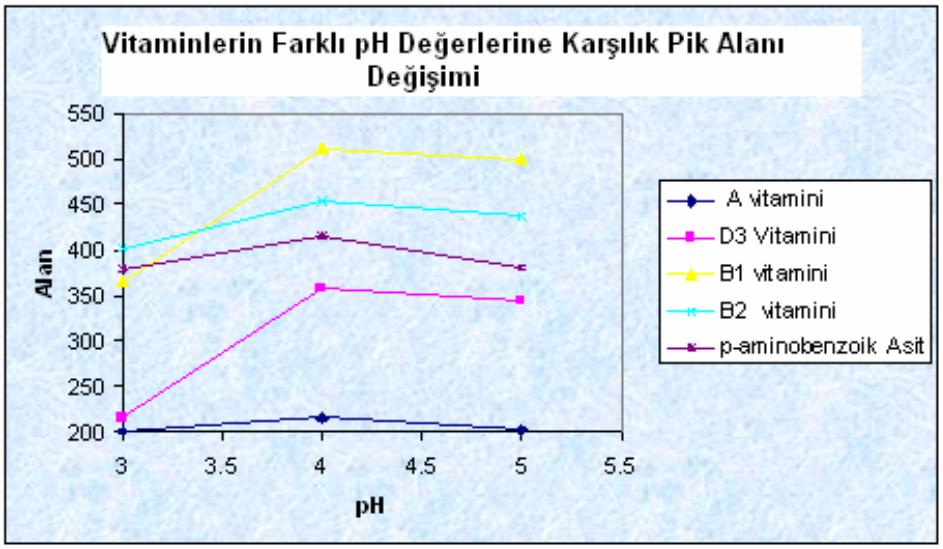
Vitaminler	**Çıkış zamanı,dak.**
Vitamin E	25,01
Vitamin B2	10,47

5.3. pH ve Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

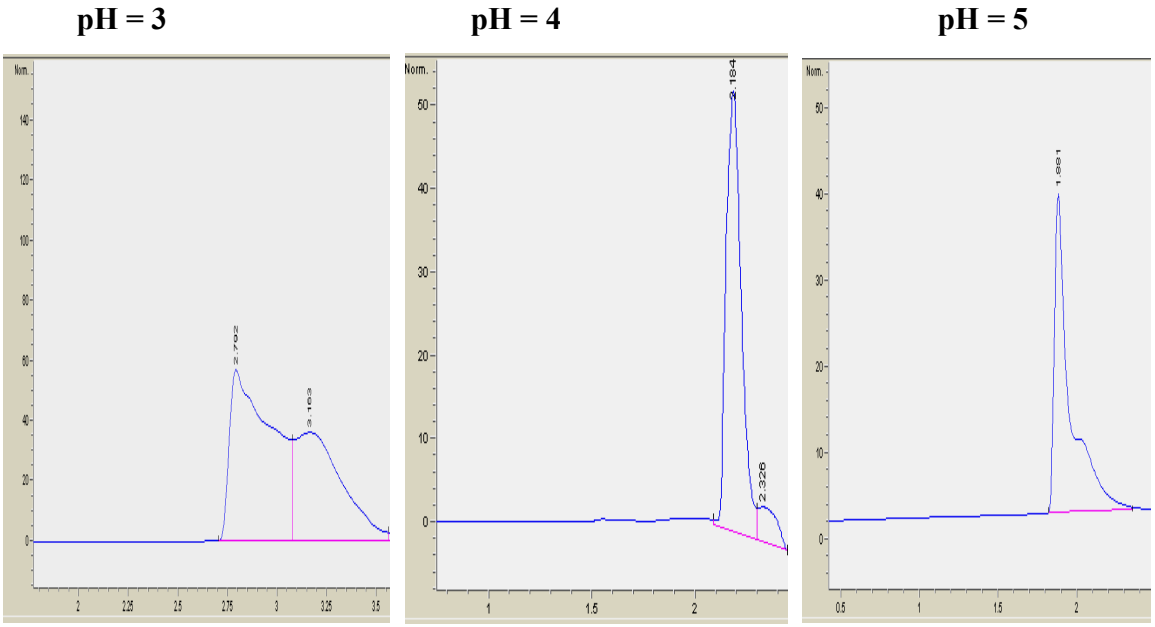
Çalışmalar sırasında kullanılacak kolon, dedektör dalga boyları ve gradient programı belirlendikten sonra, vitaminlerin ayrımı için en uygun pH ve sıcaklık değerlerini tespit etmek üzere hazırlanan vitamin karışımı üzerinden çalışmalar yapıldı. Çalışmalarda pH; 3,4 ve 5 değerlerinde ve 20^0C, 30^0C ve 40 ^{0}C sıcaklıklarda vitaminlere ait alanlar S/N oranları ve pik simetrileri (pik yüksekliğinin % 10'unda) belirlendi. Çalışmalar sonucunda vitaminlerin ayrımı için en uygun pH değerinin 4 olduğu ve en uygun sıcaklığın 30°C olduğu gözlendi. Elde edilen değerler Çizelge 5.8. de verilmiştir.

Çizelge 5.8. Vitaminlerin farklı pH değerlerine ait verileri

Vitamin	pH 3		pH 4		pH 5	
	Alan	Pik Simetri	Alan	Pik Simetri	Alan	Pik Simetri
A	199,3	1,56	216,3	1,04	201,8	1,66
D3	215,0	1,44	356,8	1,23	345,1	2,13
B1	366,2	2,13	512,1	1,36	499,2	2,22
B2	402,3	3,45	454,0	1,98	436,7	2,14
p-aminobenzoik Asit	379,0	1,88	365,2	1,91	351,7	1,96



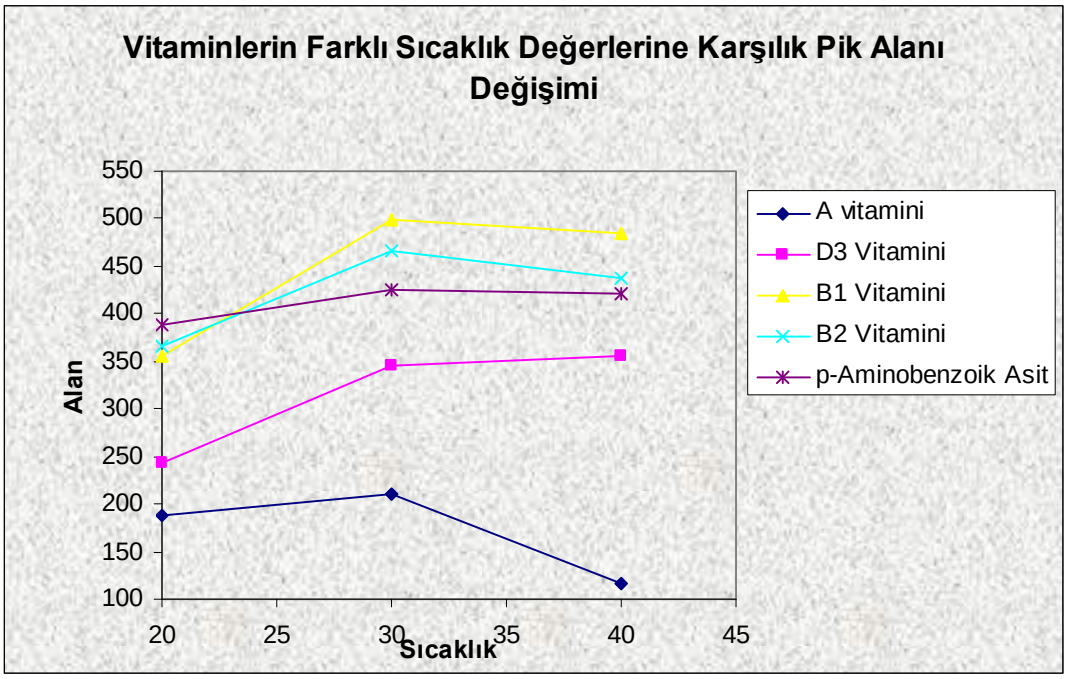
Şekil 5.10. Vitaminlerin Farklı pH Değerlerine Karşılık Pik Alan Değişimi



Şekil 5.11. B1 vitaminin çeşitli pH değerlerindeki kromatogramları

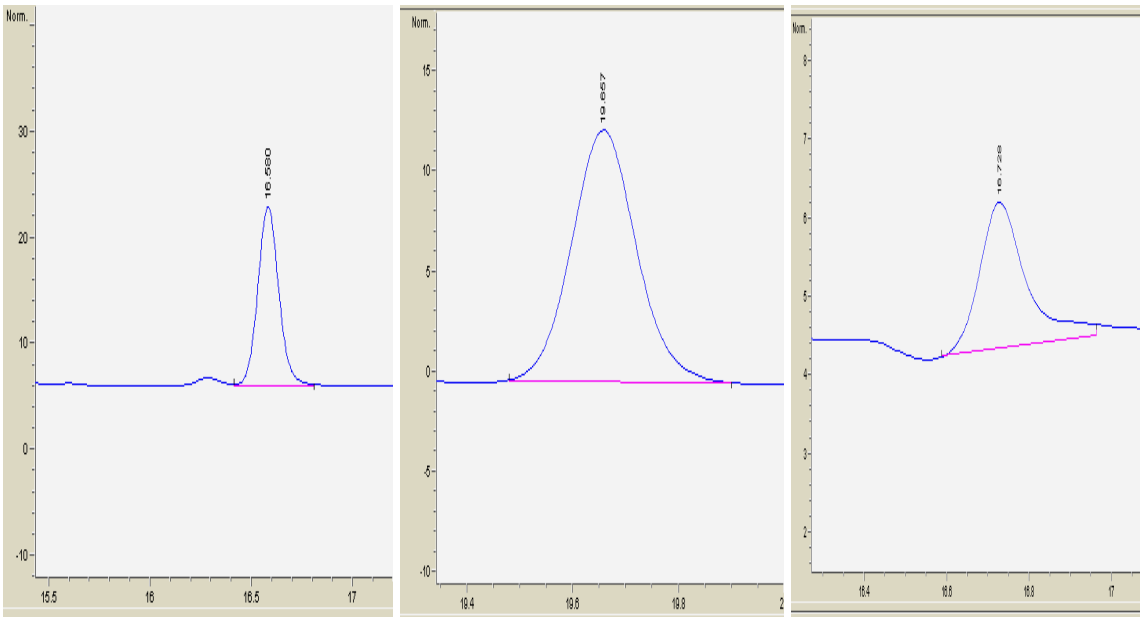
Çizelge 5.9. Vitamin standartlarının farklı sıcaklık değerlerine ait verileri

Vitamin	20^0C		30^0C		40^0C	
	Alan	Pik Simetri	Alan	Pik simetri	Alan	Pik Simetri
A	187,3	1,99	211,4	1,13	116,7	2,01
D3	242,6	2,03	344,5	1,18	332,3	2,06
B1	355,3	2,20	499,6	1,19	483,7	1,36
B2	366,8	3,10	466,8	1,36	436,5	1,40
p-Aminobenzoik asit	389,3	1,98	425,1	1,65	416,3	1,69



Şekil 5.12. Vitaminlerin Farklı Sıcaklık Değerlerine Karşılık Pik Alanı Değişimi

T = 20 ^{0}C T = 30 ^{0}C T=40^{0}C



Şekil 5.13. A vitamininin farklı sıcaklıklardaki kromatogramları

5.4. Farmasotik Preparatlarda Suda Ve Yağda Çözünen Vitaminlerin Eşzamanlı Tayini

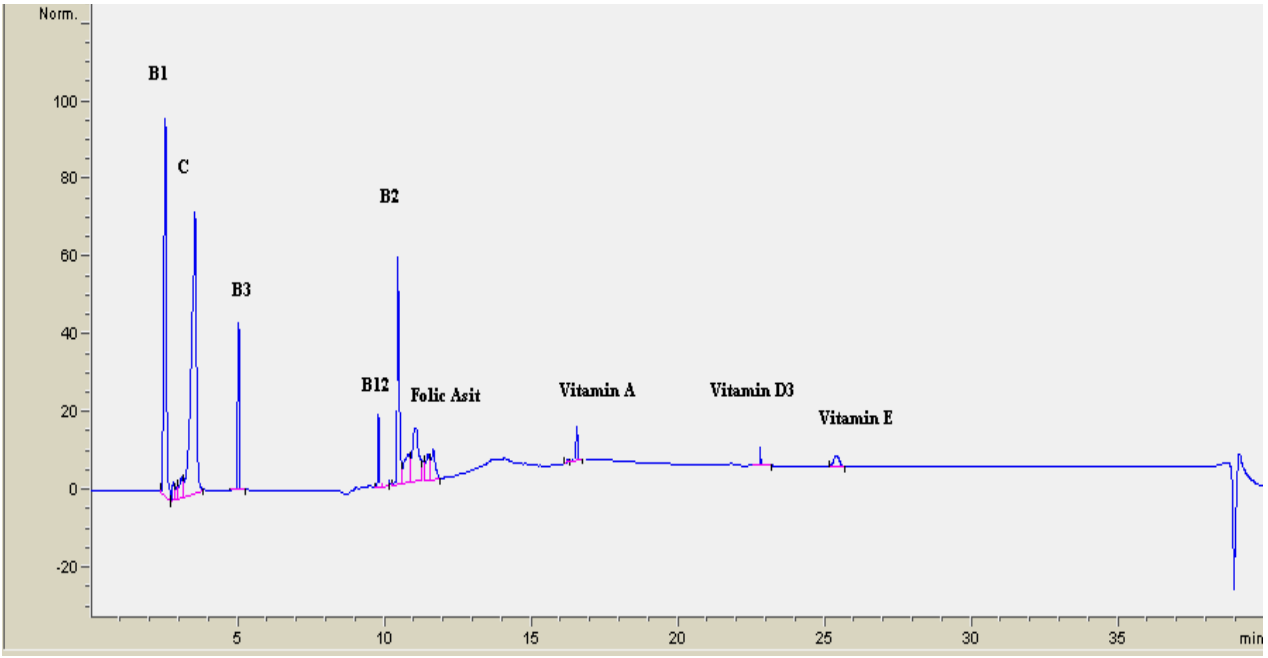
Yağda ve suda çözünen vitaminleri içeren Polivitamin draje tabletlerinden 20 adet alınıp homojen olacak şekilde havanda toz haline getirilerek karıştırıldı. Daha sonra bu karışımından 100 mg numune tartılarak üzerine 10mL %0,01 TFA- MeOH (%20 - %80) ektraksiyon çözücüsü eklendi. 15 dakika vorteksle karıştırılan numune 15 dakika santrifüj edildi (5000 x g, 15 dk). Santrifugat kısımdan uygun miktarda alınarak TFA- MeOH çözeltisiyle seyreltildi. 0,45 μm filtreden süzülerek cihaza enjekte edildi. Analiz sonucu elde edilen numuneye ait kromatogramlar Şekil 5.14. ve Şekil 5.15. de verilmiştir Kromatografik tayin için kullanılan parametreler aşağıda verilmiştir.

- **Hareketli faz:** Hareketli Faz A: %0,01 TFA, pH:4
  Hareketli Faz B: Metanol

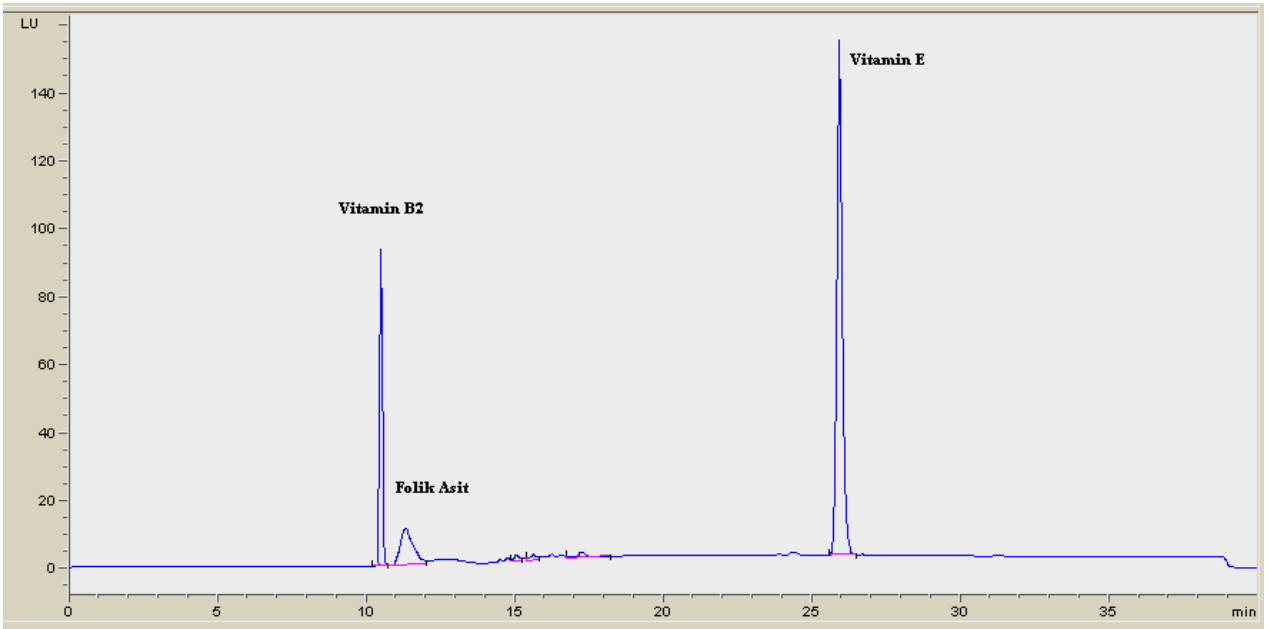
Hareketli fazın pH değeri, NaOH veya CH_3COOH ile ayarlanır.

- **Kolon:** Phenomenex Gemini 3μ C18 110A 150x4,60 mm
- **Akış Hızı:** 0,7 mL/dk
- **Kolon sıcaklığı:**30 ^{0}C
- **Gradient elüsyon:**İzokratik ve gradient elüsyon tekniği uygulanmıştır. Gradient elüsyon Çizelge 5.8.'de gösterilmiştir.
- **Dedektör:** Diode Array Dedektör ve Floresan Dedektör (Çizelge 5.9. da verilen maksimum dalga boyları kullanıldı).

Elde edilen kromatogramların her birinde alan değerleri okunup kalibrasyon grafikleri kullanılarak derişim miktarları belirlenmiştir.



Şekil 5.14. Ekstraksiyon çözücüsü olarak % 80 MeOH- % 20 TFA kullanımı ile elde edilen numuneye ait DAD kromatogramı



Şekil 5.15. Ekstraksiyon çözücüsü olarak % 80 MeOH- % 20 TFA kullanımı ile elde edilen numuneye ait FLD kromatogramı

5.5. Metod Validasyon Çalışmaları

5.5.1.Tespit limiti (Limit of Dedection, LOD) ve tayin limiti (Limit of Quantitation, LOQ) çalışmalarının değerlendirilmesi

Metod validasyon çalışmaları için bölüm 4.4.6 da anlatıldığı gibi, tespit limiti ve tayin limiti çalışmalarında azalan derişimlerde enjeksiyonlar yapıldı. Bu denemeler için derişim aralığı her vitamin için hem tablet içindeki miktarları hem de verdikleri DAD cevabı değerleri göz önünde bulundurularak karar verildi. Derişim aralıkları 5000ng/mL- 10 ng/mL arasında değiştirildi. Yapılan çalışmalar sonucunda her bir vitamin için cihazda pik olarak görülen derişimler tespit edilip bu derişimlerde vitamin standartları ile tespit limiti ve tayin limiti çalışmaları yapıldı. Çalışmalar sonucu elde edilen değerler çizelge 5.10 da verilmiştir.

Çalışmalarda;

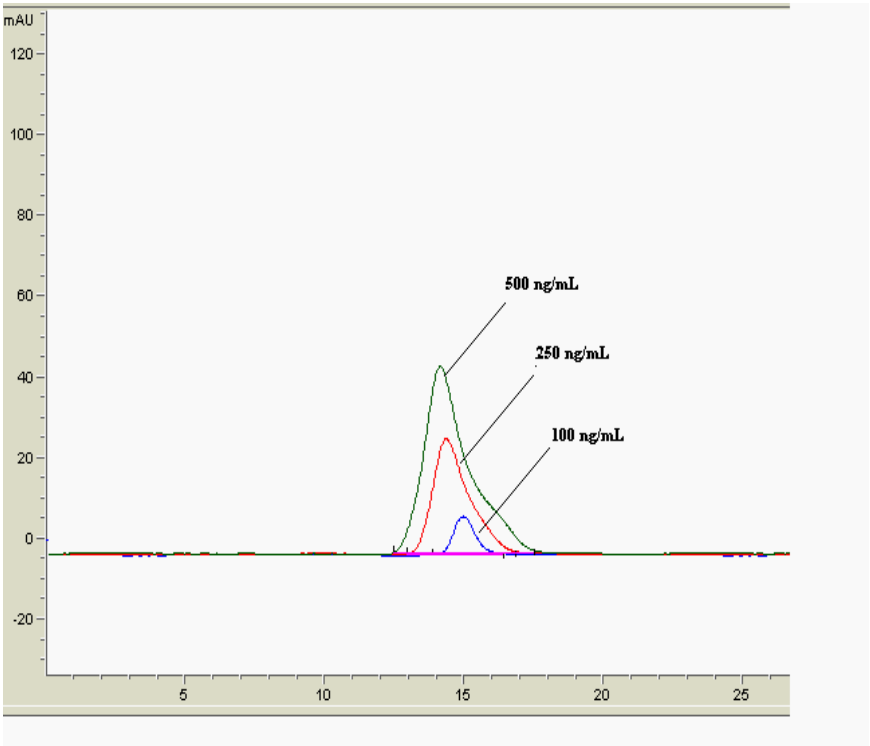
LOD= C + 3 x SD

LOQ= C + 10 x SD formülleri kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır.

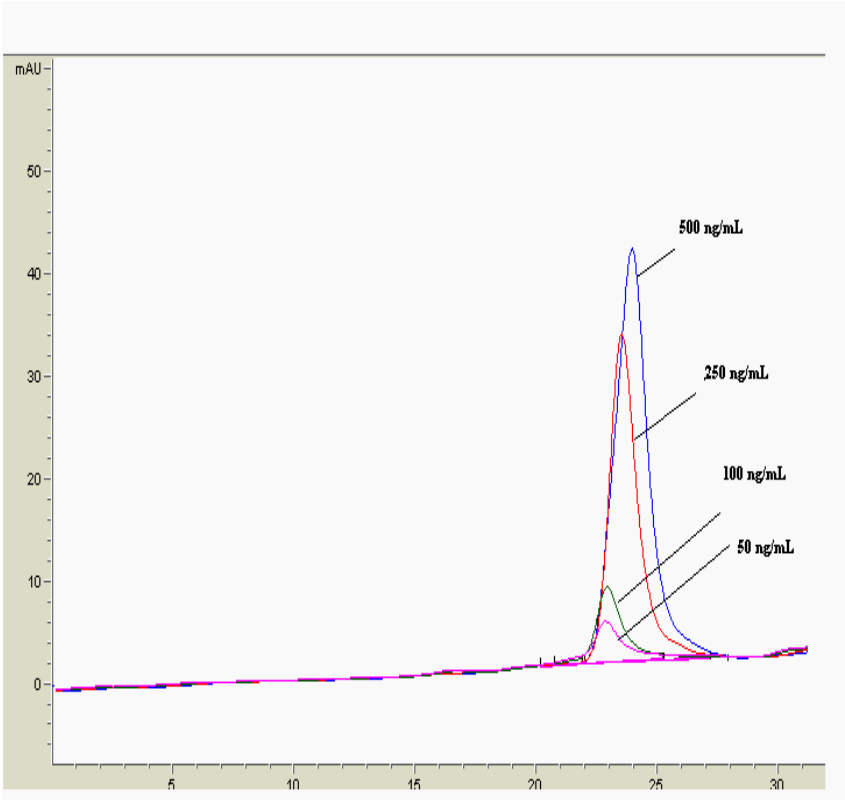
Bu eşitlikte C, cihazda pik olarak görülen en düşük derişimi ve SD bu derişimde yapılan 10 çalışma sonucu elde edilen standart sapma değerlerini göstermektedir (Skoog, 2000).

Her bir vitamin için kullanılan derişimler ve du derişimlere ait kromatogramlar aşağıda verilmiştir.

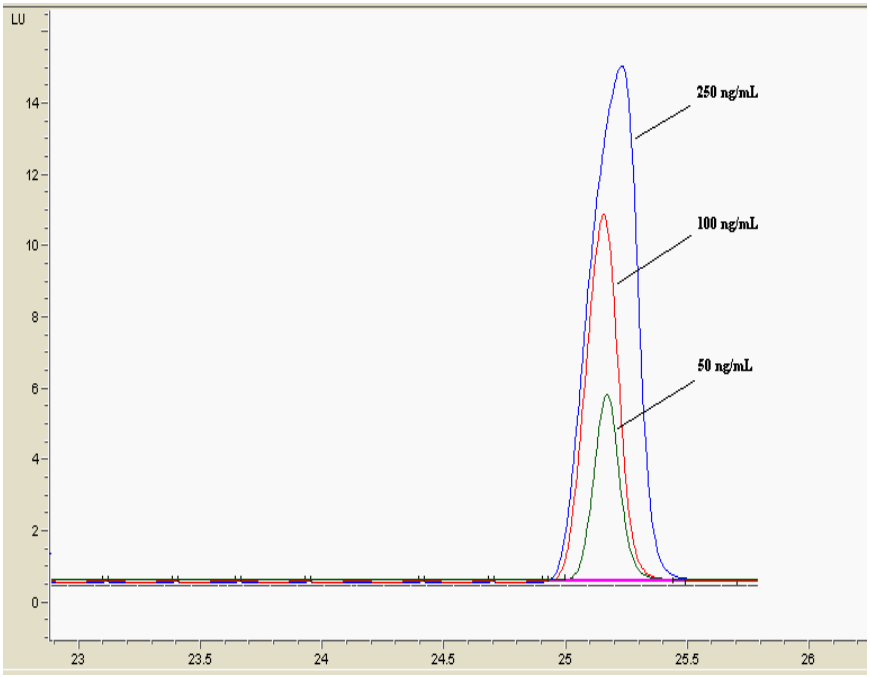
Vitamin A **Dedektör: DAD** **Dalga Boyu: 382 nm**	
Derişim, ng/mL	***Alan***
500	***75,9***
250	***38,2***
100	***14,8***
50	***-***



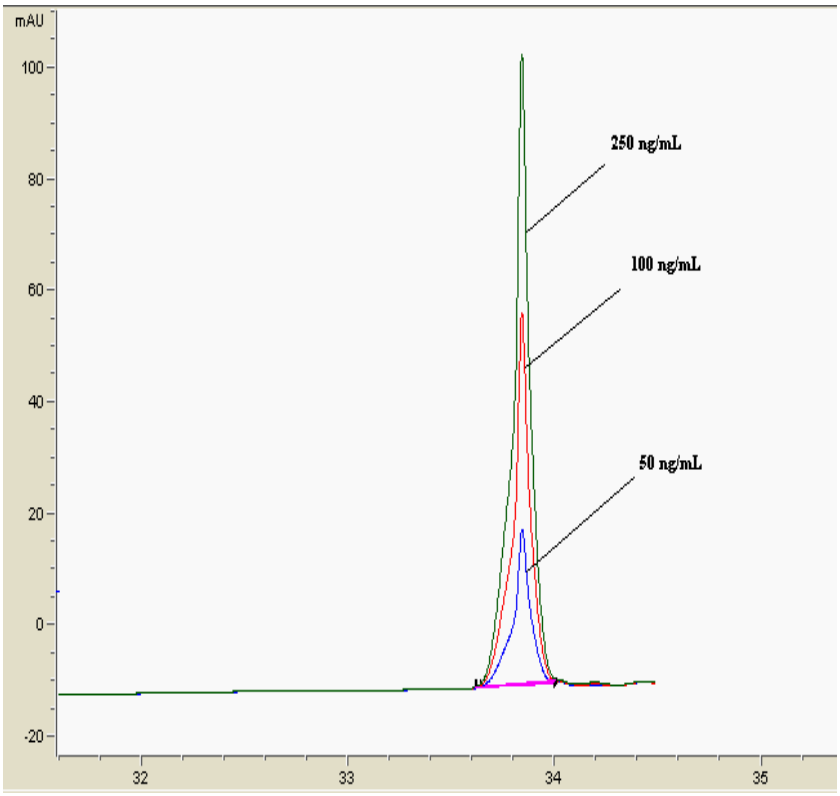
Vitamin D3 **Dedektör: DAD** **Dalga Boyu: 262 nm**	
Derişim,ng/mL	***Alan***
500	***89,4***
250	***45,2***
100	***18,1***
50	***9,6***
25	***-***



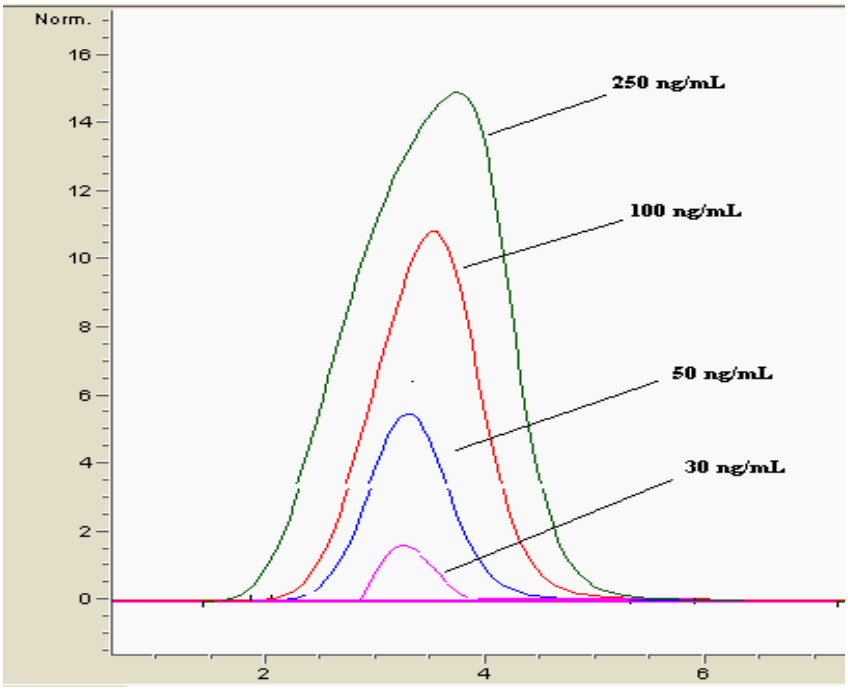
Vitamin E **Detektör: FLD** **Dalga Boyu: λ_{Ext}= 210 nm** **λ_{Ems}=*335 nm***	
Derişim,ng/mL	***Alan***
500	***143,5***
250	***72,1***
100	***28,6***
50	***15,1***
25	***-***



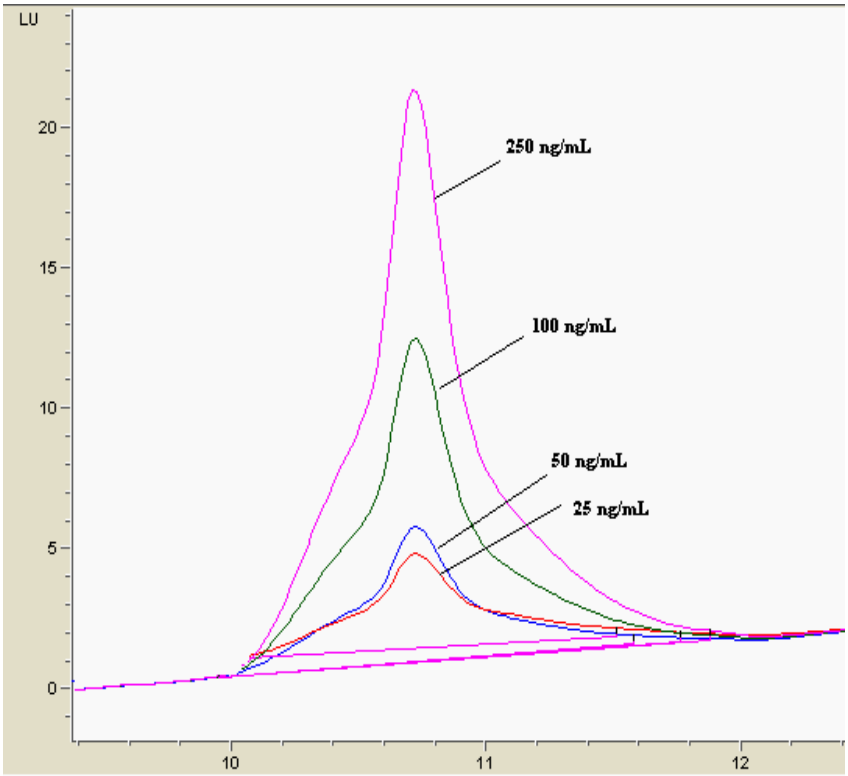
Vitamin K1 **Dedektör: DAD** **Dalga Boyu: 248 nm**	
Derişim,ng/mL	***Alan***
500	***154,2***
250	***78,1***
100	***31,2***
50	***16,3***
25	***-***



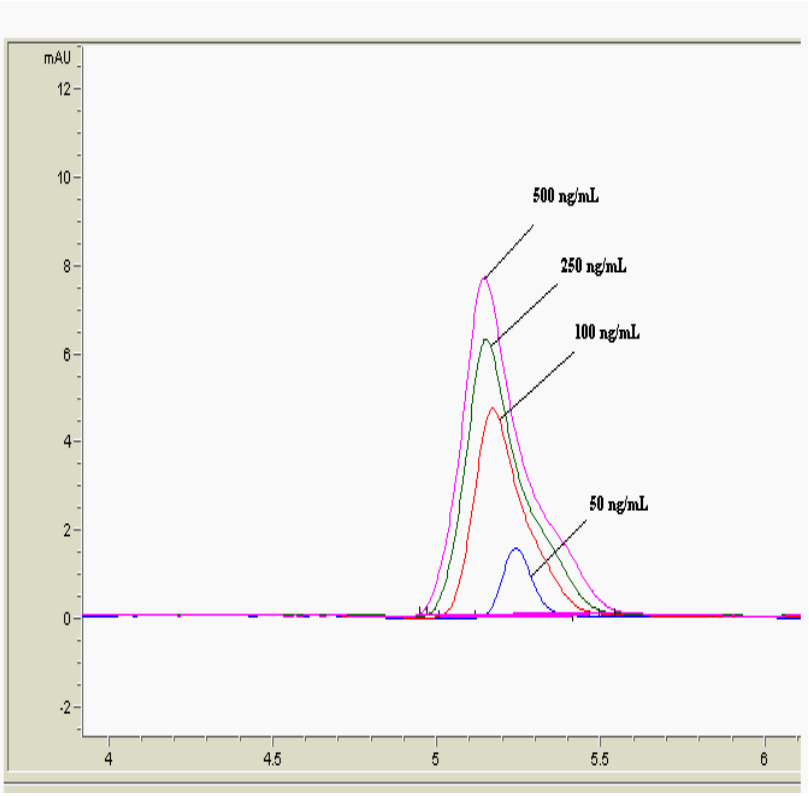
VitaminB1 **Dedektör: DAD** **Dalga Boyu: 246 nm**	
Derişim,ng/mL	***Alan***
500	***123,5***
250	***62***
100	***20,1***
50	***9,4***
30	***5,3***
25	***-***



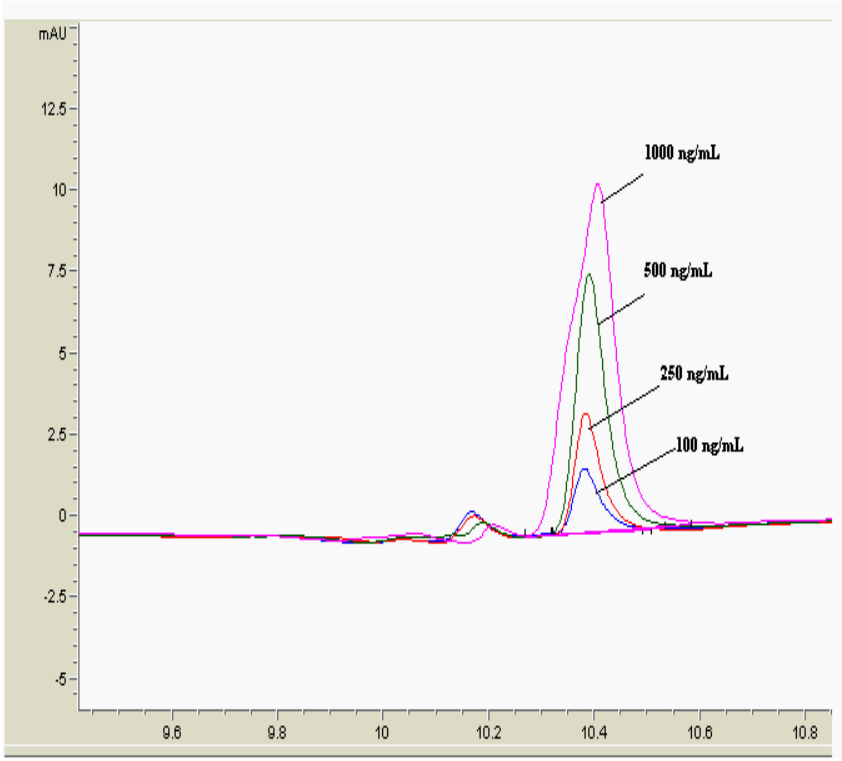
Vitamin B2 **Dedektör: DAD** **Dalga Boyu: λ_{Ext}= 360 nm** ***λ_{Ems}=530 nm***	
Derişim,ng/mL	***Alan***
500	***156,2***
250	***75,6***
100	***30,3***
50	***13,5***
25	***7,3***
10	***-***



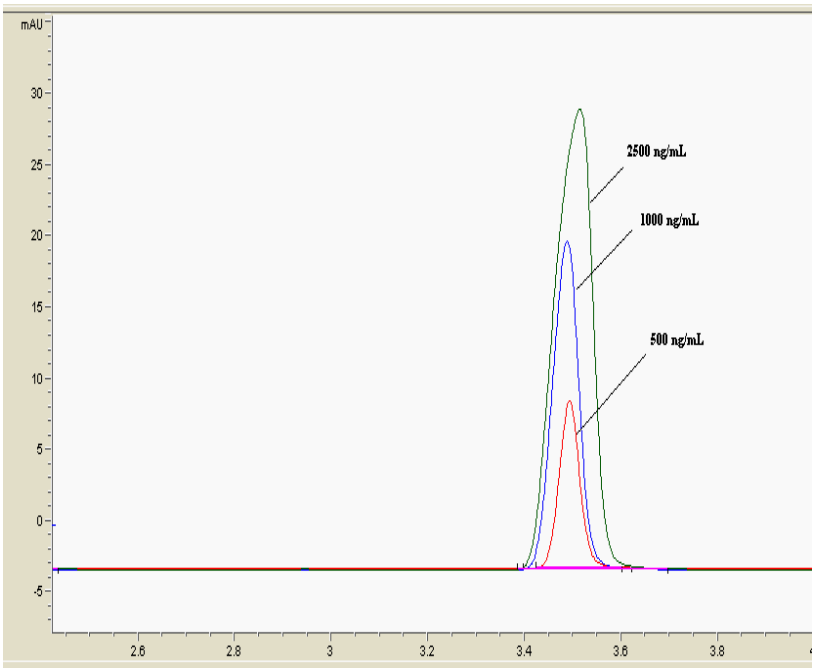
Vitamin B3 **Dedektör: DAD** **Dalga Boyu: 262 nm**	
Derişim,ng/mL	***Alan***
500	***96,7***
250	***48,2***
100	***19,2***
50	***10,6***
25	***-***



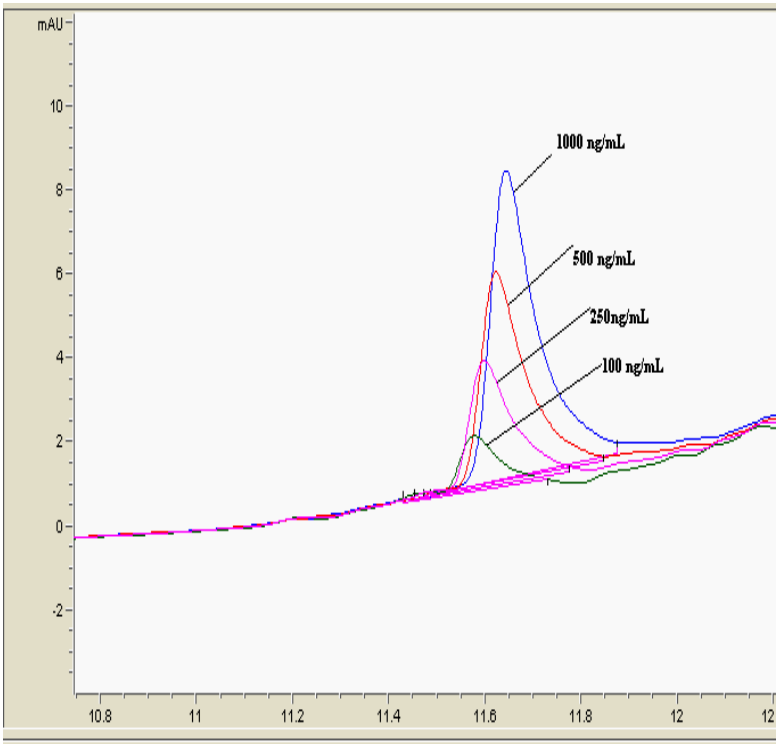
Vitamin B12 **Dedektör: DAD** **Dalga Boyu: 364 nm**	
Derişim,ng/mL	***Alan***
1000	***65,3***
500	***33,1***
250	***17,5***
100	***9,6***
50	***-***



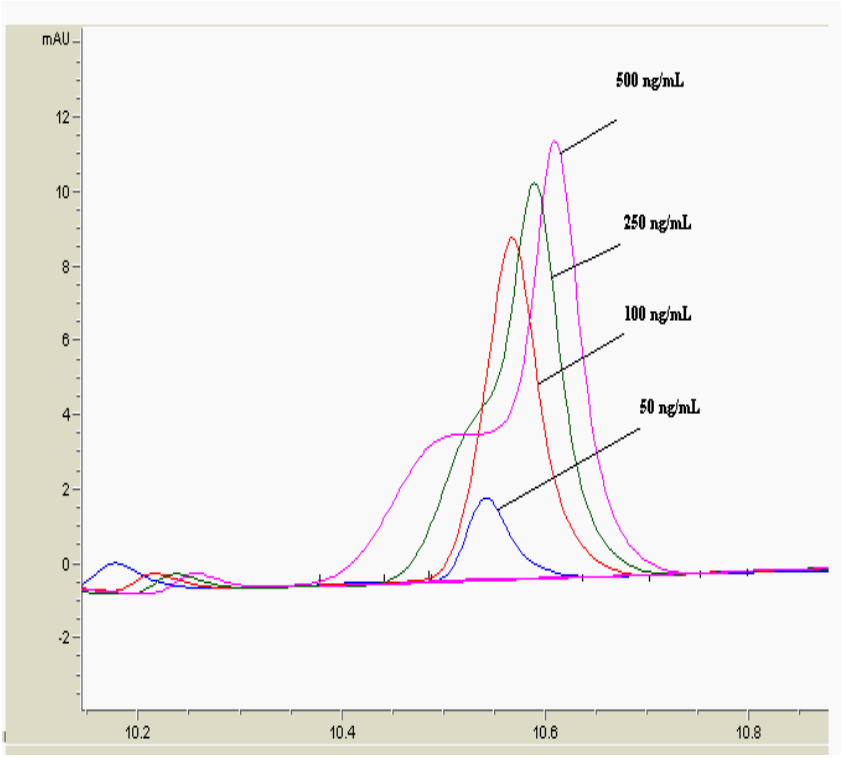
Vitamin C **Dedektör: DAD** **Dalga Boyu: 246 nm**	
Derişim,ng/mL	***Alan***
5000	***213,6***
2500	***107,5***
1000	***17,3***
500	***8.6***
250	***-***



Folik Asit **Dedektör: DAD** **Dalga Boyu: 290 nm**	
Derişim,ng/mL	***Alan***
1000	***99,5***
500	***51,8***
250	***24,8***
100	***12,3***
50	***-***



p-Aminobenzoik Asit Dedektör: DAD Dalga Boyu: 288 nm	
Derişim,ng/mL	***Alan***
500	***82,2***
250	***41,6***
100	***20,4***
50	***9,6***
25	***-***



Çizelge 5.10. Tespit limiti ve tayin limiti çalışmalarına ait veriler.

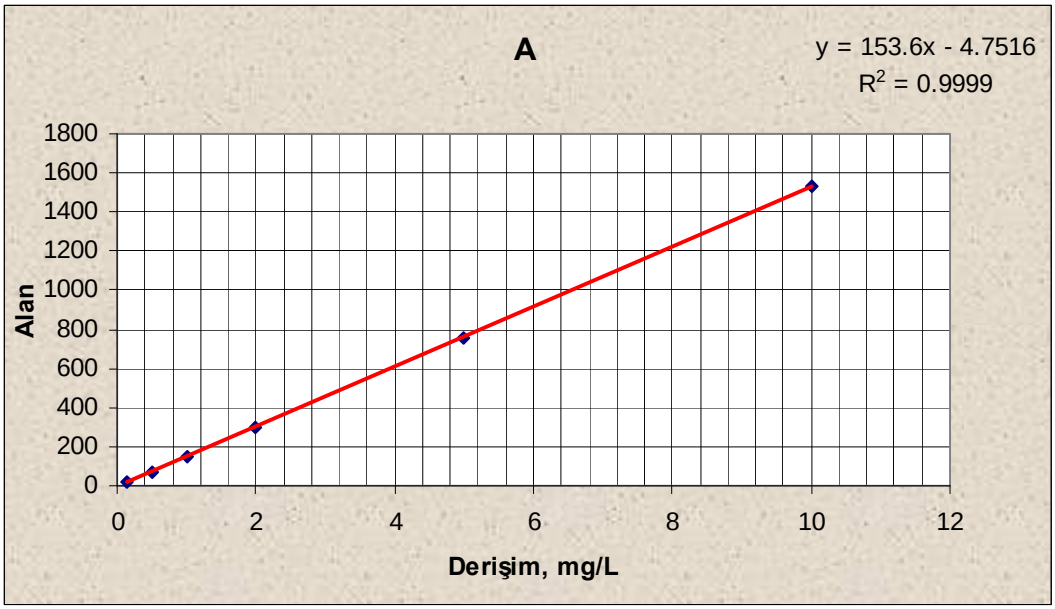
	Konsantrasyon, ng/mL										
Tekrar Sayısı	**Vitamin A**	**Vitamin D3**	**Vitamin E**	**Vitamin K1**	**Vitamin B1**	**Vitamin B2**	**Vitamin B3**	**Vitamin B12**	**Vitamin C**	**PABA**	**Folik Asit**
1	95,3	46,5	48,7	49,4	28,3	24,9	50,2	99,8	496,3	46,5	96,7
2	96,5	54,9	55,5	47,5	29,6	24,6	48,5	101,3	501,8	54,7	100,2
3	103,4	48,9	53	48,6	28,4	23,2	51,6	100,6	499,7	48,6	99,8
4	99,8	47,6	46,4	48,3	30,4	25,7	47,3	99,5	489,7	52,6	99,3
5	109,0	56,5	49,0	50,3	28,7	23,7	49,4	98,6	500,4	49,2	101,3
6	101,2	50,3	52,1	51,0	29,8	25,1	47,2	103,4	498,3	50,1	95,3
7	100,6	51,6	48,1	50,9	29,5	24,9	46,8	97,6	483,7	51,0	98,7
8	97,6	50,8	49,6	49,8	32,3	24,4	50,4	105,0	488	47,3	102,5
9	102,8	49,2	50,8	47,7	30,6	23,7	49,8	108,6	504	52,4	100,9
10	101,3	48,6	49,8	46,5	28,5	25,4	51,6	96,5	496,7	49,8	98,2
Ortalama	100,8	50,5	50,3	49,0	29,6	24,6	49,3	101,1	495,9	50,2	99,3
SD	3,7	3,1	2,6	1,5	1,3	0,8	1,8	3,7	6,6	2,5	2,2
LOD	112,1	59,9	58,2	53,6	33,4	27,0	54,6	112,1	515,6	57,8	105,8
LOQ	137,7	81,9	76,7	64,3	42,1	32,6	67,0	137,7	561,8	75,5	120,9

5.5.2. Kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi

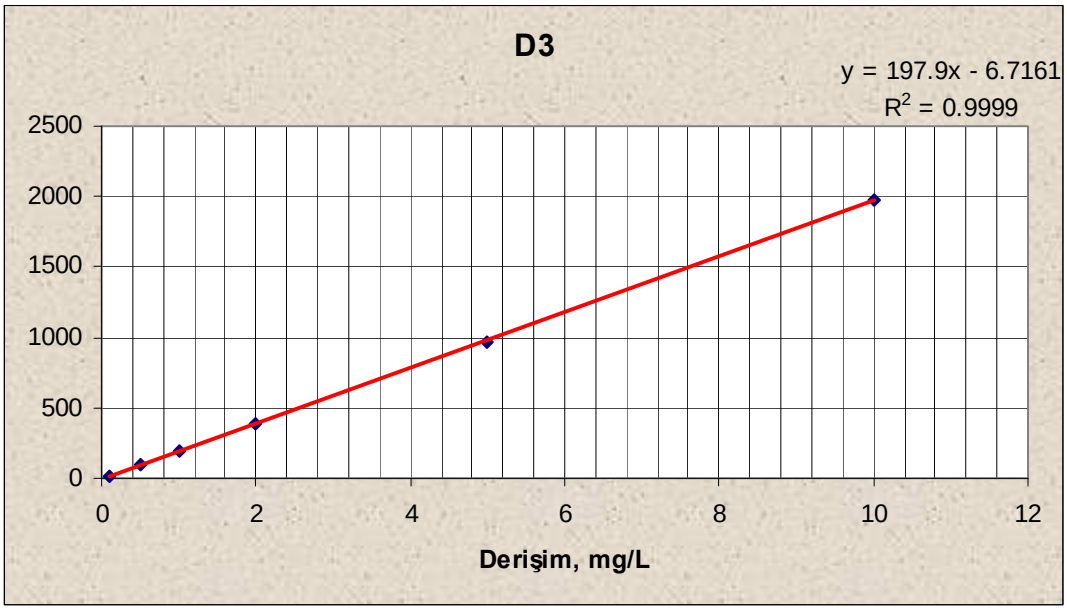
Bölüm 4.2.4.1. de hazırlanan standart vitamin çözeltileri kullanılarak, belirlenen kromatografik şartlarda Çizelge 5.11 de verilen aralıklarda çözeltiler hazırlanıp 5 noktadan üçer tekrarlı çalışmalar yapılarak konsantrasyon - alan eğrileri çizildi. Çalışmalarda bölüm 5.2.1 den elde edilen tayin limiti (LOQ) değerleri, kalibrasyon grafiklerinin başlangıç noktaları olarak belirlendi.

Çizelge 5.11. Vitaminler ve Kalibrasyon Aralıkları

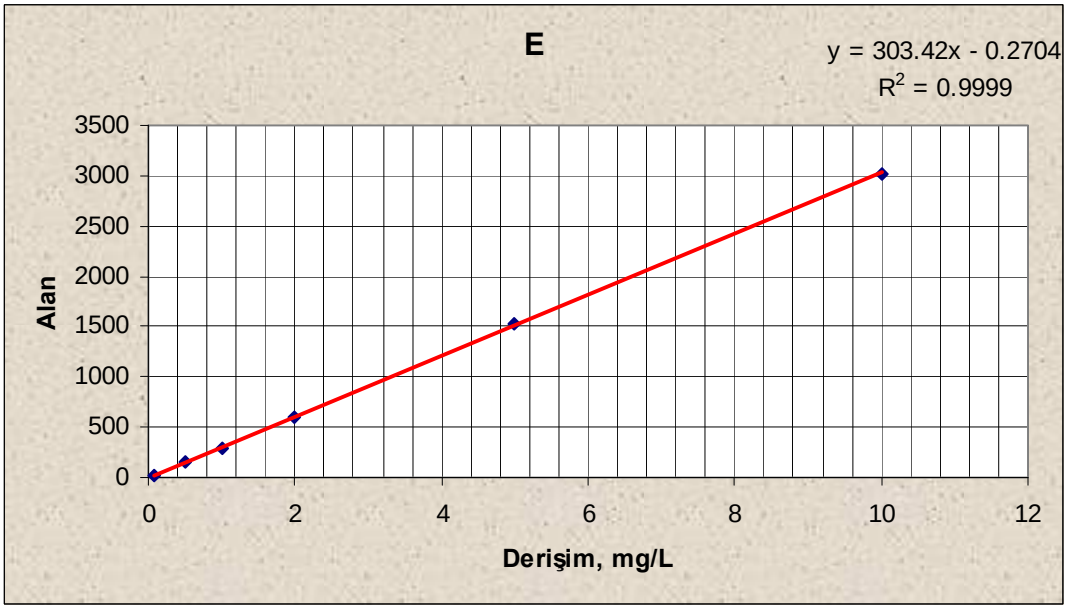
Vitamin	Kalibrasyon Aralığı	Korelasyon Katsayısı	Eğri Denklemi
Vitamin A	0,15-10	0,9999	y = 153,6x - 4,7516
Vitamin D3	0,1-10	0,9999	y = 197,9x - 6,7161
Vitamin E	0,08-10	0,9999	y = 303,42x - 0,2704
Vitamin K1	0,1-10	0,9999	y = 471,04x + 4,4078
Vitamin B1	0,05-10	0,9992	y = 214,31x - 14,13
Vitamin B2	0,05-10	0,9999	y = 282,51x + 2,9618
Vitamin B3	0,07-10	0,9999	y = 215,63x - 4,4514
Vitamin B12	0,15-10	0,9999	y = 58,378x - 0,3068
Vitamin C	0,6-20	0,9999	y = 18,163x -0,5823
Folik Asit	0,15-10	0,9999	y = 128,95x - 5,29
p-Aminobenzoik Asit	0,075-10	0,9999	y = 474,32x - 10,285



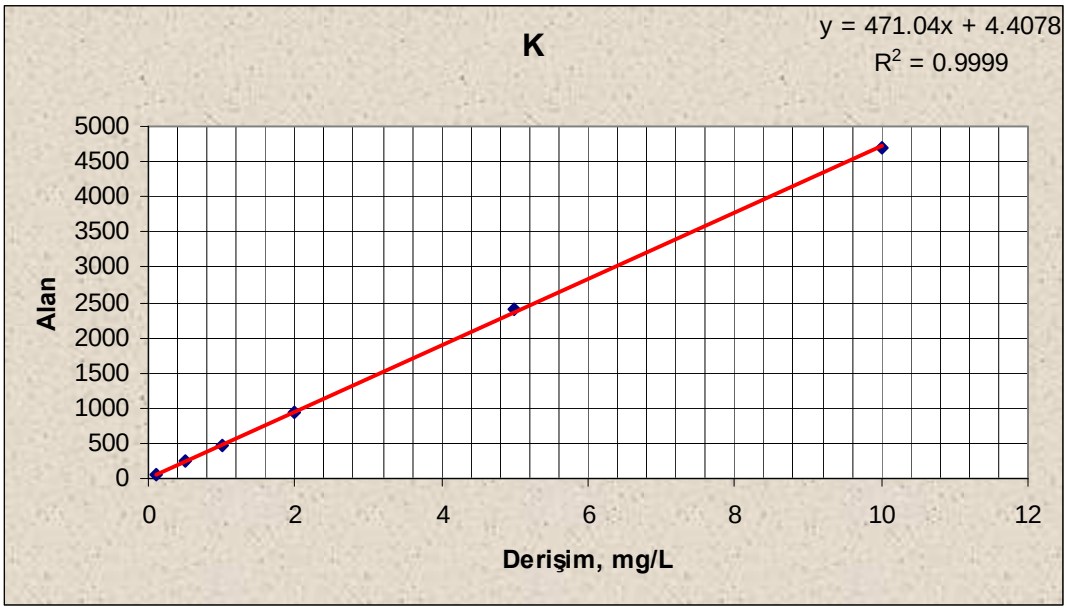
Şekil 5.16. Vitamin A kalibrasyon eğrisi



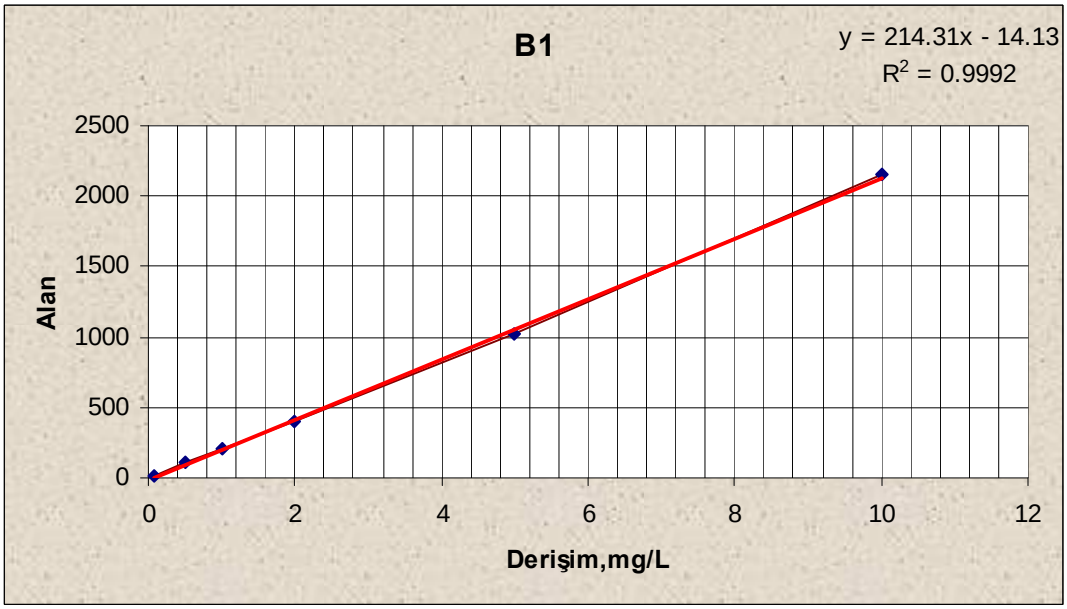
Şekil 5.17. Vitamin D3 kalibrasyon eğrisi



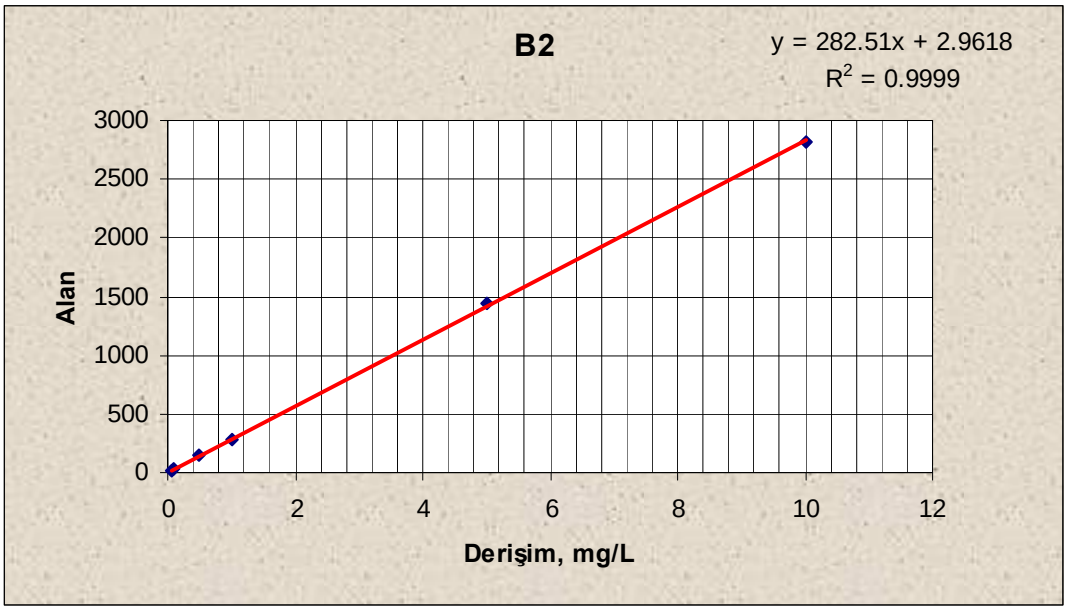
Şekil 5.18. Vitamin E kalibrasyon eğrisi



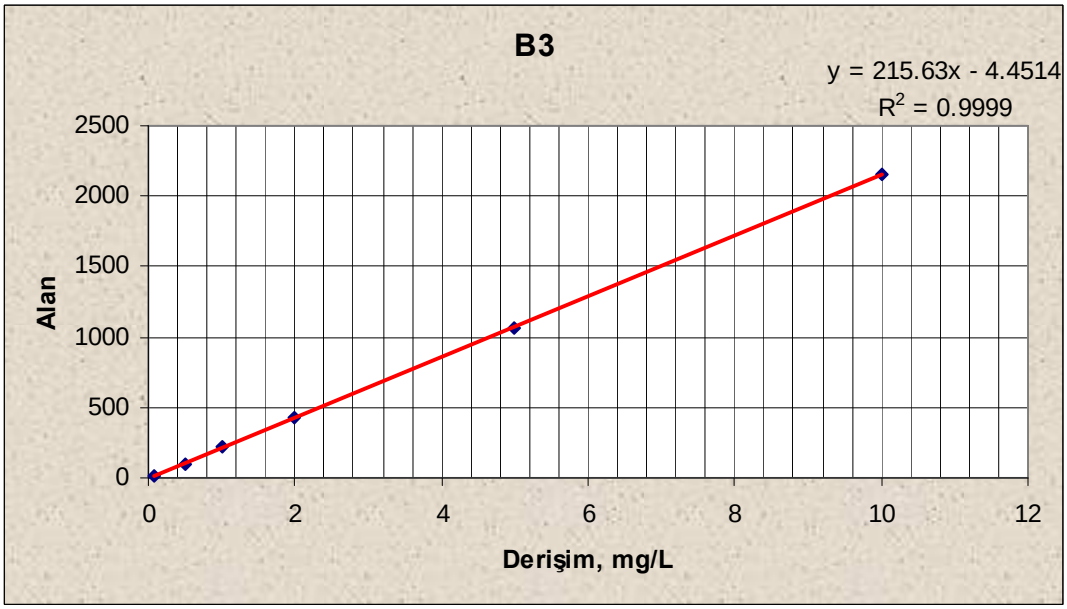
Şekil 5.19. Vitamin K1 kalibrasyon eğrisi



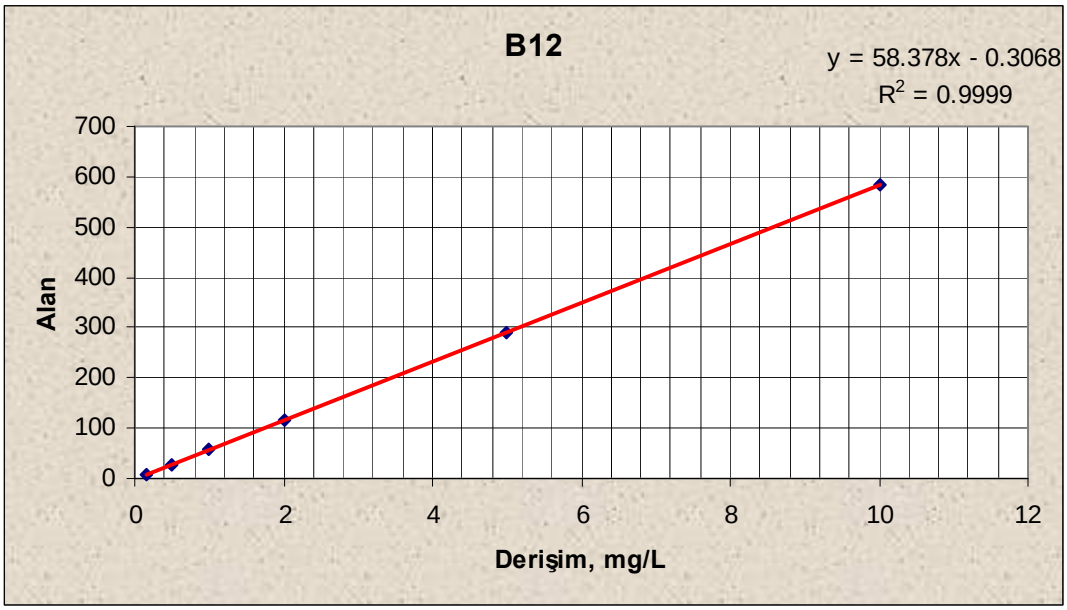
Şekil 5.20. Vitamin B1 kalibrasyon eğrisi



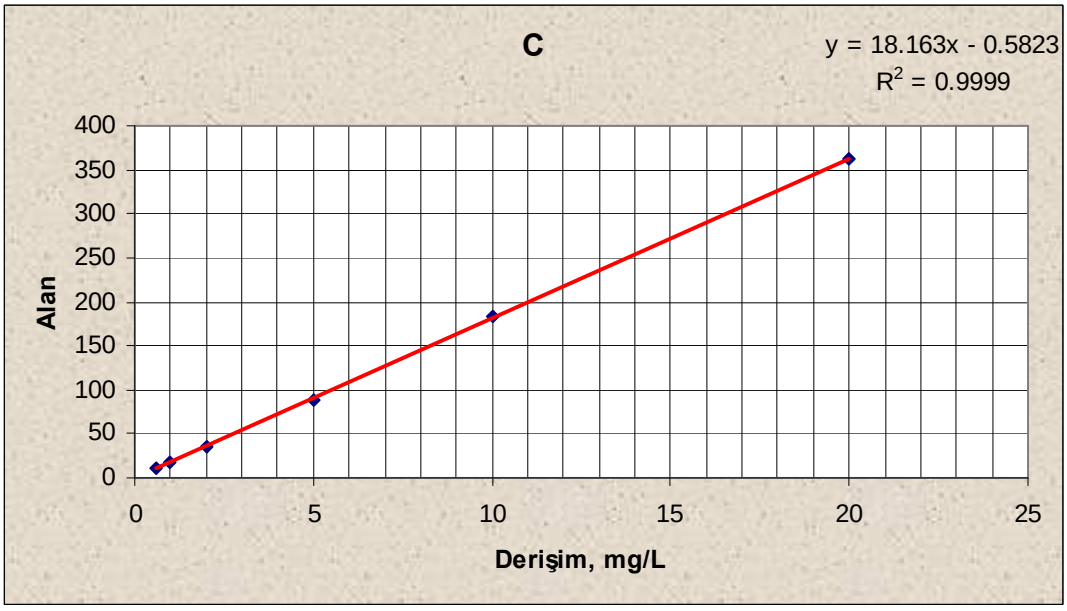
Şekil 5.21. Vitamin B2 kalibrasyon eğrisi



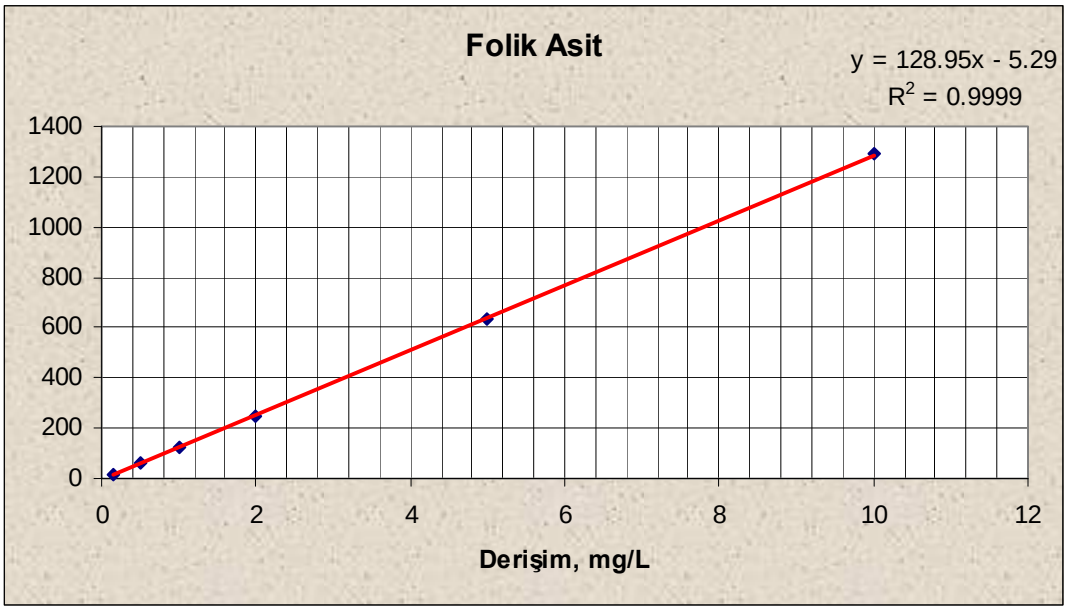
Şekil 5.22. Vitamin B3 kalibrasyon eğrisi



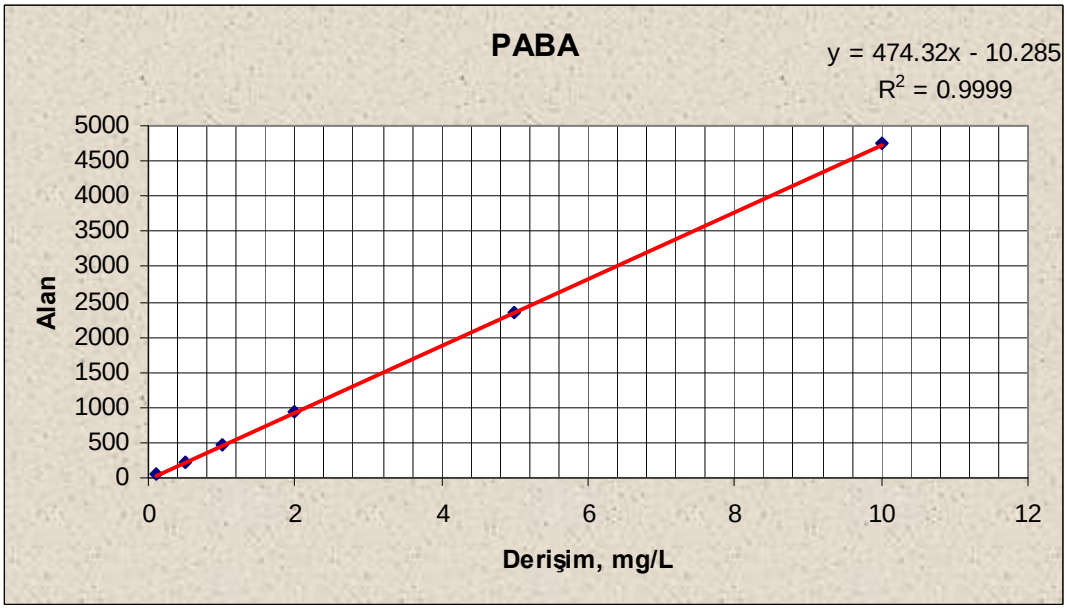
Şekil 5.23. Vitamin B12 kalibrasyon eğrisi



Şekil 5.24 Vitamin C kalibrasyon eğrisi



Şekil 5.25 Folik asit kalibrasyon eğrisi



Şekil 5.26 p- Aminobenzoik asit kalibrasyon eğrisi

Vitaminler için çizilen eğriler incelendiğinde (Şekil 5.16-5.26), kalibrasyon grafiklerinin doğrusallığının iyi olduğu, kalibrasyon eğrisinin regrasyon katsayısının bire yakın olduğu görüldü.

5.5.3. Geri kazanım çalışmaları

Geri Kazanım çalışmaları kapsamında vitamin tabletlerinden bölüm 4.4.5'e göre hazırlanan numunelere düşük (yaklaşıl LOQ değerinin 2 katı düzeyinde) ve yüksek (yaklaşık numune konsantrasyonlarının 1,5-2 katı düzeyinde) konsantrasyonlarda standartlar eklenerek 10 tekrarlı analizler yapıldı. Analiz koşulları olarak optimizasyon çalışmaları sonucu elde edilen parametreler kullanıldı. Bu çalışmalara ait veriler çizelge 5.12 ve Çizelge 5.13 de verilmiştir.

Çizelge 5.12 Vitamin tablet numunesinde düşük konsantrasyonda geri kazanım çalışması sonuçları (n=10)

Vitamin	Teorik Örnek Derişimi, mg/L	Bulunan Örnek derişimi,mg/mL	Eklenen Miktar, mg/L	Sonuç, mg/L	Teorik Değer,mg/L	Ortalama Geri Kazanım(%) ± RSD
Vitamin A	0,53	0,49	0,30	0,76	0,83	91,57±3,75
Vitamin D3	0,28	0,27	0,20	0,45	0,48	93,75±2,66
Vitamin E	0,75	0,76	0,20	0,88	0,95	92,63±3,98
Vitamin B_1	5,00	5,08	0,20	5,12	5,20	98,46±2,32
Vitamin B_2	2,50	2,47	0,20	2,52	2,70	93,33±3,84
Vitamin B_3	8,00	7,96	0,20	7,87	8,20	95,98±4,33
Vitamin B_{12}	0,75	0,71	0,30	0,91	1,05	86,67±5,65
Vitamin C	15,00	14,56	1,50	14,67	16,50	88,91±5,73
Folik asit	0,90	0,85	0,30	1,06	1,20	88,33±4,37

Çizelge 5.13. Vitamin tablet numunesinde yüksek konsantrasyonda geri kazanım çalışması sonuçları (n=10)

Vitamin	Teorik Örnek Derişimi, mg/L	Bulunan Örnek derişimi,mg/mL	Eklenen Miktar, mg/L	Sonuç, mg/L	Teorik Değer,mg/L	Ortalama Geri Kazanım(%) ± RSD
Vitamin A	0,53	0,49	0,50	0,97	1,03	94,17±2,73
Vitamin D3	0,28	0,27	0,50	0,75	0,78	96,15±2,96
Vitamin E	0,75	0,76	0,75	1,41	1,50	94,00±3,83
Vitamin B_1	5,00	5,08	5,00	9,77	10,00	97,70±2,45
Vitamin B_2	2,50	2,47	2,50	4,73	5,00	94,60±3,54
Vitamin B_3	8,00	7,96	5,00	12,65	13,00	97,31±3,72
Vitamin B_{12}	0,75	0,71	0,75	1,38	1,50	92,00±5,88
Vitamin C	15,00	14,56	5,00	17,72	20,00	88,60±4,97
Folik asit	0,90	0,85	1,00	1,66	1,90	87,37±5,12

5.5.4. Kesinlik çalışması

Kesinlik çalışması kapsamında tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmıştır. Tekrarlanabilirlik çalışmaları kapsamında vitamin tabletlerinden bölüm 4.4.5'e göre hazırlanan numunelerin 10 tekrarlı analizleri yapıldı. Analiz koşulları olarak optimizasyon çalışmaları sonucu elde edilen parametreler kullanıldı. Bu çalışmaya ait veriler ve istatistiksel değerlendirmeler çizelge 5.14 de verilmiştir.

Çizelge 5.14. Multivitamin tabletinde vitaminlerin eşzamanlı tayini için elde edilen tekrarlanabilirlik ölçüm sonuçları (n=10 ve mg/L).

Tekrar Sayısı	**Vitamin A**	**Vitamin D3**	**Vitamin E**	**Vitamin B1**	**Vitamin B2**	**Vitamin B3**	**Vitamin B12**	**Vitamin C**	**Folik Asit**
1	0,99	0,49	0,18	9,56	4,98	16,12	1,21	30,2	1,56
2	1,02	0,46	0,17	9,68	4,92	15,66	1,19	29,92	1,54
3	1,00	0,51	0,19	10,08	4,83	15,87	1,19	29,87	1,78
4	0,97	0,50	0,19	9,36	4,89	15,81	1,23	29,56	1,82
5	0,93	0,51	0,17	10,02	4,91	15,92	1,20	28,00	1,79
6	1,03	0,47	0,19	9,77	4,76	15,99	1,20	28,98	1,62
7	0,96	0,51	0,18	9,47	4,77	15,46	1,14	29,01	1,59
8	0,90	0,54	0,18	9,66	4,81	15,50	1,16	29,03	1,60
9	0,91	0,47	0,16	9,76	4,90	15,69	1,17	29,58	1,80
10	1,02	0,46	0,18	9,73	4,88	15,81	1,20	28,66	1,82
Ortalama	0,97	0,49	0,18	9,71	4,87	15,78	1,19	29,28	1,69
SD	0,05	0,03	0,01	0,22	0,07	0,21	0,03	0,67	0,12
% RSD	4,84	5,4	5,55	2,29	1,44	1,32	2,18	2,28	7,00

6.TARTIŞMA

Yapılan araştırmalar sonucunda günlük beslenme alışkanlığı ile vitaminlerin yeterli miktarda alınamadığı ya da vitamin desteği gerektiren özel diyetlerin kullanıldığı hastalıklarda gıda destek maddelerine ihtiyaç duyulduğu görülmektedir. Fakat gıda desteği olarak bilinen vitamin preparatları içerisindeki vitaminler beyan edilen miktarları yansıtmamakta ve önerilen dozda kullanım insanların vitamin ihtiyacını karşılayamamaktadır. Dolayısıyla bu vitamin preparatları içerisindeki vitamin miktarlarının doğru olarak tespit edilmesi önem kazanmaktadır. Vitaminlerin tayini için gerek standart metotlar gerekse literatürlerde belirtilen metotlarda incelendiğinde suda ve yağda çözünen vitaminlerin analizi için ayrı metotların kullanıldığı görülmüştür. Bu metotlarda suda ve yağda çözünen vitaminlerin ekstraksiyon aşaması çok üzün sürmekte ve de özellikle yağda çözünen vitaminler için çok fazla kimyasal çözücü tüketimi gerektirmektedir (Escriva ve Frigola 2001,). Yine bu metotlar incelendiğinde suda ve yağda çözünen vitaminlerin kromatografik tayini için farklı yöntemler uygulandığından analiz süresi ve maliyet artmaktadır (Moreno ve Salvado 2000). Bu çalışmada yağda ve suda çözünen vitaminler için eş zamanlı bir ekstraksiyon ve kromatografik ayrım metodu optimize edilerek gıda destek maddelerine uygulanmıştır. Bu amaçla çalışmamızda vitaminlerin kromatogafik ayrımı için çeşitli parametreler optimize edilmiştir.

Optimizasyon çalışmasında ilk olarak her bir vitamin için uygun dedektör ve bu detektörlerdeki maksimum dalga boylarının tespiti için çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu E ve B2 vitaminlerinin floresans detektör ile diğer vitaminlerin ise diod array detektörle tayinlerinde daha hassas ve güvenilir sonuçlar alınacağı gözlenmiş, bununla birlikte p-aminobenzoik asit ve folik asit vitaminlerinin de floresan detektör ile tayinlerinin yapılmasının daha uygun olacağına karar verilmiştir. Literatür incelendiğinde her bir vitaminin tayini için sabit detektör ve dalga boyları kullanıldığı görüldü (Li, H.B., Chen, E.,2001). B çalışma her bir vitamin için uygun olan detektör ve maksimum olan dalga boyularında tek enjeksiyonla analize imkan vererek yüksek hassasiyette tayin yapılabilme im olanağı sağlamaktadır.

Ayrıca iki farklı kolon denenerek her bir kolona ait veriler incelenmiş, ayırmanın hassasiyetin iyi olduğu kolon seçilmiştir. Yağda ve suda çözünen vitaminleri tayinine

yönelik kromatografik şartların optimizasyonunda büyük öneme sahip olan hareketli faz bileşimi, akış hızı ve zamana karşı hareketli faz değişimini belirlemek için yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen kromatogramlar yardımıyla en uygun gradient elüsyon programı tespit edildi. Bu programla, yağda ve suda çözünen 11 vitaminin tek enjeksiyonu sonucu ortaya çıkabilecek olan muhtemel kolon etkileşimleri ve pik girişimleri önlenerek 35 dakika gibi kısa bir sürede ayrımları sağlanmıştır.

Optimizasyon çalışmaları kapsamında pH'nın vitaminlerin ayırımına etkisini incelemek üzere 3 farklı değer (pH=3, pH=4 ve pH=5) seçilmiştir. Bu seçim yapılırken vitaminlerin düşük pH değerlerinde daha kararlı olması ve seçilen kolonun katalog bilgileri göz önünde bulundurulmuştur. Hareketli faz (0,01 % TFA) bu pH değerlerinde hazırlanarak analizler yapılmış ve elde edilen veriler incelendiğinde vitaminlerin büyük çoğunluğu için en uygun pH değerinin 4 olduğu gözlenmiştir. Yine çalışmalar kapsamında sıcaklığın vitaminlerin ayırımına etkisini incelendiğinde, sıcaklık değişimi ile elde dilen kromatografik veriler fazla değişmemekte fakat tüm vitaminler için optimum bir sıcaklık değeri belirlenmesi açısından 30 °C tercih edilmiştir.

Önerilen metot gıda destek maddesi olarak piyasada bulunan vitamin tabletlerine uygulanmış ve seçilen bu matrikste validasyon çalışmaları yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda en düşük tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ) değerlerinin sırasıyla vitamin B2 ' ye ait olduğu (27 ng/mL ve 33 ng/mL) görülmüştür. Bu şekilde diğer vitaminlerin de tayin limiti değerleri hesaplanmış (Bölüm 5.2.1.) ve bu değeler kalibrasyon grafiklerinin başlangıç noktaları olarak belirlenerek eğriler çizilmiştir. Bu eğriler incelendiğinde doğrusallıklarının oldukça iyi olduğu ve regrasyon katsayılarının 1'e yakın olduğu görülmüştür. Beyan edilen miktarlar göz önünde bulundurularak hazırlanan vitamin tabletlerinde standart ekleme metodu ile geri kazanımlar hesap edilmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak verilmiştir. Geri kazanım sonuçları 87,5-96,7% aralığında değişmektedir. Kesinlik çalışması için numunelerden 10 tekrarlı analizler yapılarak her bir vitamin için tekrarlanabilirlik verileri elde edilmiş ve %RSD değerlerinin 1,32 il3 7,00 aralığında değiştiği belirlenmiştir. Bu veriler incelendiğinde önerilen metodun yüksek hassasiyete ve güvenilirliğe sahip olduğu ve vitaminlerin düşük konsantrasyonlarda tayininin yapılabileceği görülmüştür.

7.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında optimizasyon şartları belirlenen kromatografik yöntemin; az zaman alması, daha az reaktif ve çözücü gerektirmesi, sonuçların duyarlı, güvenilir, tekrarlanabilir olması ve ayrıca rutin analizlerde kullanılabilirliğinin fazla olması sebebiyle daha sonra yapılacak olan çalışmalar için yol gösterici olması umulmaktadır. Gıda destek maddeleri üzerine yapılan bu çalışmanın, daha sonraki çalışmalarda farklı matrikslerde de uygulanabileceği öngörülmektedir.

8.KAYNAKLAR

Akdağ İ, Metot Validasyonu ve Önemi, TÜBİTAK UME, (2002)

Association of Analytical Communities (AOAC) Guidlines for Singe Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals,(2002)

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

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

Escrive A., Frigola A., (2001)Determination of liposoluble vitamins in cooked meals, milk enad milk products by liquit chromatography, Journal of Agriculture Chemistry, 3465, 34

Eurachem/Citac Guide CG 4. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, (2000)

Eurachem Guide/ The Fitness for Purpose of Analytical Methods, 1998

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

Gomez A., Ayuso L.,(2009), Simultaneous determination of eight water-solunble vitamins in supplemented foods by liquit chromatography, Journal of Agriculture Chemistry 4531,54

Gündüz, T., 1999, İnstrümental Analiz, Ankara

Hurtado S., Rodriugez N., Determinaton of vitamins A and E in infant milk formulae by high performance liquit chromatography

İreş, N., Konya çevresinde kullanılan yem ve bileşenlerindeki suda ve yağda eriyen vitaminlerin eş zamanlı tayin metodunun geliştirilmesi

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.

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

The United States Pharmacopeia, 2000, Rokville, MD, 24.

Ubaldi A., Delbono G., Serventi P., 2005, Quick HPLC method to determine vitamin E concentration in cows milk

Zonta, F., Stancher, B., 1982, Hıgh-Performance Lıquıd Chromatography Of Fat-Soluble Vıtamıns Separatıon And Identıficatıon 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 Yozgat Sarıkaya'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Ankara'da tamamladı. 1999 yılında Kırıkkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazandı ve 2003 yılında bu bölümden mezun oldu. 2006 yılında Konya İl Kontrol Laboratuvarında Kimyager olarak göreve başladı. 2007 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde Yüksek Lisansa başladı. Daha sonra Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı'na atandı. Halen aynı görevde çalışmaya devam etmektedir. Evlidir.