

**BAZI VİTAMİNLERİN  
KAPİLER ZON ELEKTROFOREZ İLE İNCELENMESİ**

**(THE DETERMINATION OF CERTAIN VITAMINS  
BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS)**

**Ecz. Volkan ZAIMOĞLU**

Anadolu Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği uyarınca  
Analitik Kimya Anabilim Dalında  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
Olarak Hazırlanmıştır

**ANADOLU ÜNİVERSİTESİ  
MERKEZ KÜTÜPHANESİ**

**Danışman: Prof.Dr.Muzaffer TUNÇEL**

**Eylül 1995**

Volkan ZAIMOĞLU'nun YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırladığı "BAZI VİTAMİNLERİN KAPİLER ZON ELEKTROFOREZ İLE İNCELENMESİ" başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

6/9/1995

Üye: Prof. Dr. Muzaffer TUNÇEL

Üye: Doç. Dr. Zühre ŞENTÜRK

Üye: Doç. Dr. Neşe KIRIMER

---

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
25.08.95.gün ve .....21.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

## ÖZET

Farmasötik preparatlarda ve besinlerde tiamin, riboflavin, piridoksin ve askorbik asitin analizi için kapiler zon elektroforez kullanılarak bir elektroforez tekniği geliştirilmiştir.

60 cm efektif uzunluğu olan ergitilmiş silika kapiler için optimum koşulların 25 kV ve maksimum 200  $\mu$ A olduğu bulunmuştur.

Tampon sistemi olarak 20 mM borat tamponu kullanılmıştır. Bu koşullarda tiamin, riboflavin, piridoksin ve askorbik asit göç hızları sırasıyla 3.9, 6.8, 8.2, 9.7 bulunmuştur.

Bu çalışmayla vitaminlerin beklenenin üzerinde bir kolaylık ve duyarlılıkla analizinin yapılabileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:**Tiamin, riboflavin, piridoksin, askorbik asit, vitamin tayini, kapiler elektroforez.

## SUMMARY

A capillary electrophoresis (CE) technique was developed employing capillary zone electrophoresis (CZE) for analysis of thiamine, riboflavine, pyridoxine and ascorbic acid in pharmaceutical preparations and foods.

Optimum conditions were found to be 25 kV applying voltage and 200  $\mu$ A maximum current for the effective length of 60 cm fused silica capillary. The buffer system was 20 mM borate at pH:8. The migration times of thiamine, riboflavine, pyridoxine and ascorbic acid were 3.9, 6.8, 8.2, 9.7, respectively in these conditions. It can be concluded that the method progressed with this study is a practical and sensitive for the analysis of the vitamins mentioned above.

**Key words:** Thiamine, riboflavine, pyridoxine, ascorbic acid, determination of vitamins, capillary electrophoresis.

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın her aşamasında beni yönlendiren, değerli fikirleri ve hoşgörüsü ile beni destekleyen, çok değerli hocam, Sayın Prof. Dr. Muzaffer TUNÇEL'e;

Tıbbi Bitkiler Araştırma Merkezinin olanaklarından yararlanmamı sağlayan, Eczacılık Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. K. Hüsnü Can BAŞER'e;

Deneysel çalışmalarım sırasındaki ilgi ve destekleri için Sayın Doç. Dr. Neş'e KIRIMER'e;

Bütün çalışmalarım boyunca yakın ilgi ve şahsi gayretleriyle bana yardımcı olan Sayın Yard. Doç. Dr. Berrin BOZAN ve Sayın Arş. Gör. Zeynep TUNALIER başta olmak üzere TBAM çalışanlarına;

Çalışma arkadaşlarım Sayın Yard. Doç. Dr. Zeki ATKOŞAR'a, Sayın Yard. Doç. Dr. Dilek AK'a, Sayın Yard. Doç. Dr. Bülent ERGUN'a, Sayın Öğretim Görevlisi Göksel ALTIOKKA'ya, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sekreteri Sayın Zafer YAZICI'ya ve Sayın Füsun SÖZÜAK'a;

Bu süre içerisinde büyük sabır ve özveriyle destek veren aileme;

En içten teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
SUMMARY.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	2
2.1. B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub> ve C Vitaminlerinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	2
2.1.1. B <sub>1</sub> vitamini.....	2
2.1.2. B <sub>2</sub> vitamini.....	3
2.1.3. B <sub>6</sub> vitamini.....	4
2.1.4. C vitamini.....	5
2.2. Vitaminlerin Farmakolojisi.....	6
2.1.1. B <sub>1</sub> vitamini.....	6
2.1.2. B <sub>2</sub> vitamini.....	7
2.1.3. B <sub>6</sub> vitamini.....	7
2.1.4. C vitamini.....	8
2.3. Vitaminlerin Tayin Yöntemleri.....	9
3 MATERYAL VE METOD.....	10
3.1. Kullanılan Aletler.....	10
3.2. Kullanılan Kimyasallar.....	10
3.3. Kullanılan Çözeltiler.....	11
3.4. Stok vitamin standardı ve standart çözeltilerinin hazırlanması.....	11
3.5. Kapiler Elektroforezin Temeli.....	11
4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	13
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	20
ÖZGEÇMİŞ.....	21

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Tiamin hidroklorürün açık formülü.....	2
2.2. Riboflavin'in Açık Formülü.....	3
2.3. B <sub>6</sub> Vitamininin Analogları.....	4
2.4. Piridoksin Hidroklorürün Kimyasal Formülü.....	4
2.5. C Vitamininin Kimyasal Formülü .....	5
3.1. Elektroosmoz Olayı.....	12
4.1. Tiamin, Riboflavin, Piridoksin, Askorbik Asit ve Salisilik Asitin elektroferogramları...	15
4.2. Tiamin, Riboflavin, Piridoksin ve Askorbik Asitin çakışık Spektrumları.....	16
4.3. Tiamin, Riboflavin, Piridoksin ve Askorbik Asitin pikleri.....	19

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Vitaminler, vücutta metabolik olayların normal bir şekilde meydana gelmesi ve sağlıklı durumun sürdürülebilmesi için besinlerle az miktarda alınan dış kaynaklı organik maddelerdir. Besinlerin dört ana ögesi olan proteinler, yağlar, karbohidratlar ve tuzlar saf olarak alındıklarında, yeterli miktarda vücuda girseler bile, sağlıklı durumun sürdürülmesini sağlayamazlar. Bunlarla birlikte vitaminler ile kobalt, demir, iyod, flor, çinko ve bakır gibi temel minerallerin alınması gereklidir (1).

Vitaminlerin çoğu bitkisel veya hayvansal besinler içinde dışarıdan alınırlar. Bazı vitaminler ise vücutta sentez edilebilirler. Kalın bağırsak florasındaki mikroorganizmalar tarafından sentez edilen tiamin, piridoksin ve K vitaminleri bunlara örnek olarak verilebilir.

Vitaminler genellikle yağda çözünenler ve suda çözünenler olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Suda çözünen vitaminler (B<sub>12</sub> vitamini hariç) genellikle bitkisel kaynaklı besinler içinde, yağda çözünen vitaminler ise hayvansal kaynaklı besinler içinde bulunurlar.

Bazı vitaminlerin, besinler içinde veya prekürsörlerden hareketle yapılan çeşitli şekilleri vardır. Bunlar nitelikleri bakımından birbirlerine benzerler, fakat aralarında nicel bakımdan fark vardır. Aynı vitaminin bu çeşitli şekillerine onun vitameri adı verilir (1).

Vitaminlerin fizyolojik olaylardaki önemi vücutta oluşan metabolitlerin, koenzimlerin ve kofaktörlerin bir kısmını oluşturmalarından; oluşan metabolitlerin belirli genler üzerinde steroid benzeri etkileriyle hedef hücredeki temel olayları kontrol etmelerinden kaynaklanır.

Vitaminlerin önemi nedeniyle üzerlerinde yapılan binlerce çalışmaya rastlamak mümkündür. Tayinleri konusunda ise kendi başlarına olduğu gibi karışımlarının tek bir analiz ile sonuçlandırıldığı ve bu tayinlerin başarıldığı birçok yöntem rastlanmaktadır(2). Bu yöntemler arasında en az kullanılmış olanı kapiler elektroforezdir.

Karışım analizleri için son derece kullanışlı bir yöntem olan kapiler elektroforez ile kapiler zon elektroforez (3, 4) ve miselsi elektrokinetik kromatografik (5, 6) teknikleri kullanılarak yapılmış çalışmalar bulunmaktadır.

Bu çalışmada gıda maddelerinin, farmasötik preparatların ve içeceklerin içerisindeki hedef olarak analizi seçilen tiamin, riboflavin, piridoksin ve askorbik asitin kapiller zon elektroforez ile tayini amaçlanmıştır. Yöntemin geçerliliği çeşitli açılardan yorumlanmıştır.

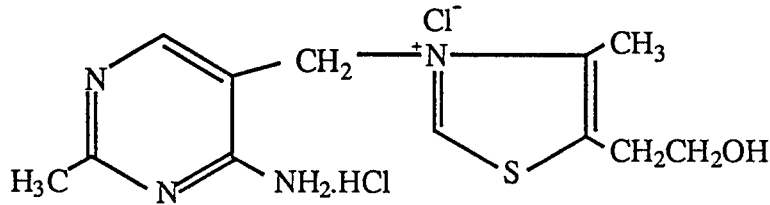


## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI:

### 2.1. B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, C vitaminlerinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri:

#### 2.1.1. B<sub>1</sub> vitamini:

B<sub>1</sub> vitamini (tiamin, anörin) B grubunun en önemli vitaminidir. B<sub>1</sub> vitamini hayvansal ve bitkisel besinlerin her ikisinde de kısmen serbest, kısmen birleşmiş olarak tuz, tiamin-protein kompleksi veya pirofosfat (karboksilaz) halinde bulunur. Molekülünde bir pirimidin ve bir tiazol halkası metilen köprüsü ile birbirine bağlanmış kuarterner tiazolium tuzu vardır (7). 3-[(4-amino-2-metil-5-pirimidinil) metil]-5-(2-hidroksietil)-4-metiltiazolium klorür mono hidroklorür formülüne sahip bir bileşiktir. Açık formülü Şekil 2.1. de verilmiştir.



Şekil 2.1. Tiamin hidroklorürün açık formülü

Kapalı formülü C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>OS olup; molekül ağırlığı 337.27 dir. Tiamin asitli ortamda tuz halinde, alkali ortamda ise serbest halde bulunur. Tuz halindeki tiamin pişirme sırasında bozulmaz, fakat alkali ortamda örneğin karbonat ilave edildiğinde serbest tiamin ayrılır ki bu da pişirme sırasında parçalanır (7).

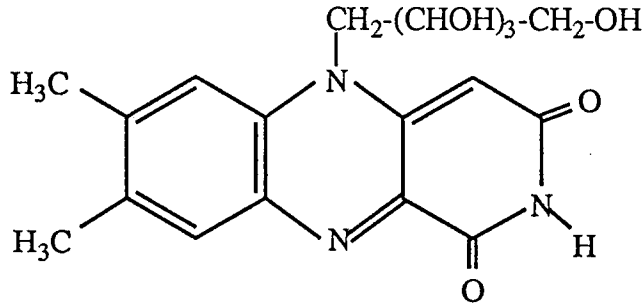
Tiaminin suda çözünürlüğü çok fazladır. 1 gram tiamin 1 ml suda çözünebilir. Alkoldeki çözünürlüğü ise azdır. Eter, benzen, kloroform, aseton, petrol eteri gibi organik çözücülerde çözünmez (8). Pişirme sırasında bir kısım vitamin suya geçer. Sulu çözeltileri ısıya dayanıklıdır, pH 3.5 da 120°C ye kadar ısıtılabilir. Fakat zayıf asidik ortamda

dekompoze olabilir. Biyolojik aktivitesi çok uzun değildir, nötral ve alkali ortamda ısıtmakla hızla bozulur (8).

Saf tiamin 1936 dan bu yana sentezle elde edilebilmekte olup, renksiz, kristalimsi bir maddedir. 221°C de erir. Hafif tuzlu bir tadı ve kendine özgü ceviz kokusu vardır. Tiamin hidroklorür tuzu ise 248-250°C de erir. Özellikle tahıl tanelerinin kabuğunda bulunur. Kabuğu çıkarılmış pirinç B<sub>1</sub> vitamini bakımından fakirdir. Yumurta sarısında, yeşil sebzelerde, domateste bol miktarda vardır. Et, süt, patates ve taze meyveler az miktarda B<sub>1</sub> vitamini içerir.

### 2.2.2. B<sub>2</sub> Vitamini:

B<sub>2</sub> vitamini (riboflavin, laktoflavin), 7-8-dimetil-10-(D-ribo-2,3,4,5-tetrahidroksi pentil) isoalloksazin formülüne sahip bir bileşiktir. Açık formülü Şekil 2.2. de verilmiştir.



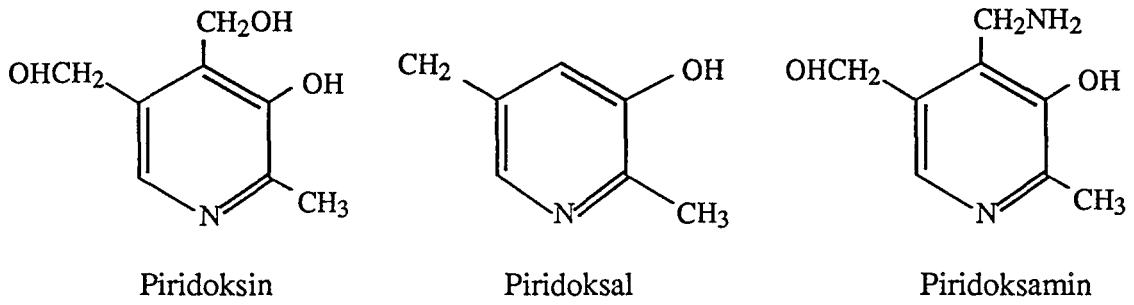
Şekil 2.2. Riboflavin'in kimyasal formülü

Kapalı formülü C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> olup; molekül ağırlığı 376.37 dir. Sarı renkte kristalize bir toz olup 282°C de bozularak erir. Riboflavin doğada çok yayılmıştır. Hayvan ve bitkilerde riboflavin-5-fosforik asit halinde proteine bağlı olarak bulunur. Isıya karşı dayanıklıdır. Su ile pişen yemeklerde riboflavin suya geçer. Hayvansal besinler (süt, yumurta, karaciğer ve etler) bitkisel besinlerden çok daha fazla B<sub>2</sub> vitamini içerirler. B<sub>2</sub> vitamini suda ve alkolde çok az çözünür. Aseton, sikloheksanol ve benzeri diğer organik çözücülerde çözünmez. Bununla birlikte alkali çözeltilerdeki çözünürlüğü oldukça iyidir (8). Hayvansal ve bitkisel besinlerde çözünen şekilde bulunduğu için su ile kolayca özütlenir. Sulu çözeltileri ısıya dayanıklı olup; uzun süre ısıtmakla dahi bozulmaz. Alkali çözeltide riboflavin üzerine ışık etkilendirilirse analitik bakımdan önemli sarımsı

renkte lumiflavin (6,7,9-trimetilizo alloksazin), asitli veya nötral metanollü çözeltilerde lumikrom (6,7-dimetil alloksazin) meydana gelir.

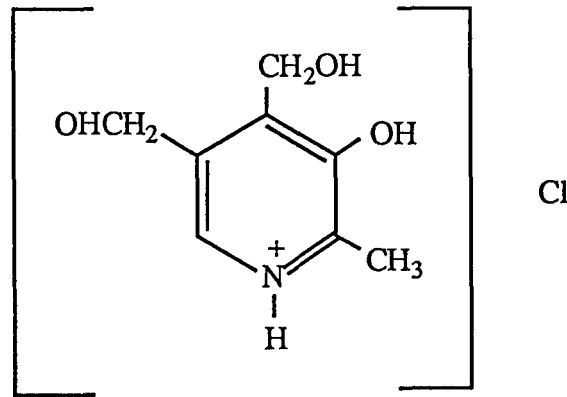
### 2.1.3. B<sub>6</sub> Vitamini

B<sub>6</sub> vitamini, piridoksin, piridoksal, piridoksamin şeklinde üç analog olarak bilinir. Piridoksin hidroklorür ise bu üç formun en stabil şekli ve ortak analogudur.



Şekil 2.3. B<sub>6</sub> vitamininin analogları

Piridoksin hidroklorür; 5-hidroksi-6-metil-3,4-piridindimetanol hidroklorür formülüne sahip bir bileşiktir. Şekil 2.4. de formülü verilmiştir(2).

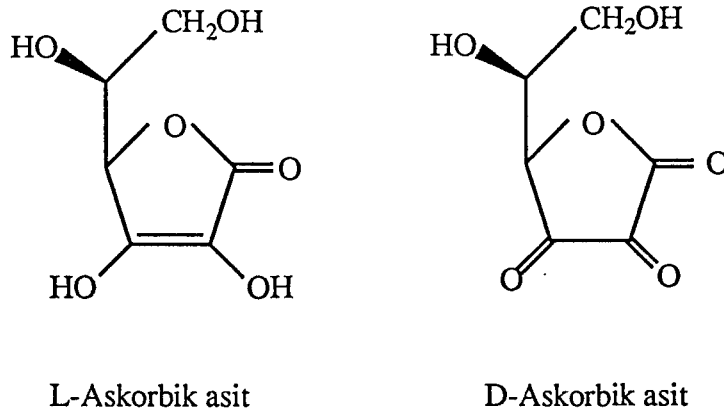


Şekil 2.4. Piridoksin Hidroklorürün kimyasal formülü

Kapalı formülü  $C_8H_{11}NO_3.HCl$  olup; beyaz, kokusuz, kristalsi, tuzlumsu tadı olan bir maddedir. Piridoksinin sentetik preparatları hidroklorür bileşiği halindedir. 204-208°C de bozunarak erir. Suda kolay, alkolde güç çözüner, eterde çözünmez. Isıya ve alkaliye karşı dayanıklıdır. Yeter derecede ışık etkisine bırakılırsa bozunur. Yemeklerin pişirilmesi ile parçalanmaz fakat kızartma sırasında kısmen bozunur. Özellikle balık etinde bulunur. Mayada, sebzelerde, tahılda, sütte vardır. Yumurtada azdır. Organizmada piridoksal fosfat şeklinde, bitkilerde daha çok piridoksin şeklinde bulunur (7).

#### 2.1.4. C Vitamini

Organizmanın en çok gereksinim duyduğu vitamindir. İnsan vücudu askorbik asidi yapamaz, dışarıdan alma zorunluluğu vardır. L-Askorbik asit formunda, beyaz, kokusuz, limon asiti gibi ekşi tadı olan bir maddedir. Kapalı formülü  $C_6H_8O_6$  olup, 3-okso-L gulofuranolakton formülüne sahiptir. kimyasal formülü Şekil 2.5. de verilmiştir.



Şekil 2.5. C Vitamininin kimyasal formülü

Molekül ağırlığı 176.13, yoğunluğu 1.65 tür. Suda çözünürlüğü 0.33 g/mL dir. Alkolde çok çözünmesine karşılık; aseton, kloroform ve eterde çözünmez. 5 mg/mL lik çözeltisinin pH'ı 3 dolaylarında, 50 mg/mL lik çözeltisinin pH'ı ise 2 dolaylarındadır (9). Bileşiminde bulunan endiol grubundan ötürü kuvvetli bir indirgendir. Kolayca yükseltgenebilir.

Askorbik asit kuru halde oldukça dayanıklı ise de ışıktta yavaş yavaş esmerleşir. Çözeltileri kuvvetli asit ortamda dayanıklıdır. Ancak nötral ve alkali ortamda çabuk ayrışır. Oksijen bulunmadığı zaman ısı tek başına vitamini parçalamaz. Fakat hava ile

birlikte kolay yükseltgenir. Besinlerin pişirilmesi ile askorbik asitin çoğu parçalanır. Kaynatılan sebzeler de askorbik asit içeriğinin yaklaşık %80'i kaybolur. Kükürtdioksit askorbik asitin yükseltgenmesini zorlaştırdığından meyve ve sebzelerin kurutulmasında geniş ölçüde kullanılmaktadır.

L-Askorbik asitin erime noktası 174°C dir. D-Askorbik asitin erime noktası ise 192°C dir. Askorbik asit pH 4.5'in üstünde 2.3-diketo gluonik asite dönüşür. Ayrıca indirgen özelliğinden dolayı antioksidan olarak da kullanılır.

## 2.2.VİTAMİNLERİN FARMAKOLOJİSİ:

### 2.2.1. B<sub>1</sub> Vitamini:

Tiamin İnsan ve hayvan dokularında özellikle hidroksietil grubuyla mono-di-tri-fosfat esterleri oluşturmuş halde bulunur. Tiamin di fosfat enzimi karboksilazın ko-enzimidir.  $\alpha$ -keto asitlerin dekarboksilasyonunu sağlar. Yeter derecede tiamin profosfat bulunmadığı takdirde; kanda pirüvik asit ve sonuç olarak laktik asit,  $\alpha$ -keto glutarik asit miktarı çok yükselir. Tiamin profosfat bundan başka, glikozun direkt oksidasyonundaki trans-ketolaz reaksiyonları için de ödevlidir. Trans-ketolazın ko-fermentidir. Bu son reaksiyon vücutta pentoz oluşumu ile steroidlerin hidroksillenmesi ve karbonhidratlardan yağ asitleri oluşumu gibi metabolizma işlerinde pek gerekli olan NADFH'nin oluşumuna neden olur. Böylece B<sub>1</sub> Vitamini eksikliğinden dolayı trans-ketolaz etkisi oluşmaz ve direkt oksidasyon bozulur. Yıkılım pentoz aşamasında kalır. Dokularda ve eritrositte normalin birkaç katı pentoz toplanır. Aynı nedenle NADFH'da oluşamadığından yağ asiti sentezi de durur (10).

Tiamin eksikliğinde karbonhidrat metabolizmasının direkt ve indirekt oksidasyonlarının aksaması yanında; protein, yağ ve su metabolizmasında bozukluklar görülür.

B<sub>1</sub> Vitamini eksikliğinde şiddetli nöritler, mide ve bağırsak bozukluğu ve kaslarda felçler görülür. Tiamin eksikliği beriberi hastalığı olarak bilinen bir hastalığa da yol açar.

Uluslararası tiamin birimi 0.003 mg tiamin hidroklorür'e tekabül eder. 1 mg B<sub>1</sub> Vitamini 333 UB dir. Günlük tiamin gereksinimi ortalama 1.5 mg dir. Tiamin duodenum ve ince bağırsağın yukarı kısmından absorbe edilir. Kalın bağırsakta absorbe edilmediğinden bağırsak florasındaki bakterilerin sentez ettiği tiaminin bir yararı yoktur (1).

### 2.2.2. B<sub>2</sub> Vitamini:

Vücutta çeşitli maddelerin ara metabolizmasında rol oynayan ve flavoproteinler denilen çok sayıda enzimin ko-enzim kısmını oluştururlar. Aktif şekli; riboflavin fosfat (diğer adıyla riboflavin mono nükleotid, FMN) ve flavin adenin dinükleotid (FAD) dır. Birinci türev, Warburg'un sarı enziminin, sitokrom C redüktaz ve L-amino asit dehidrojenaz'ın ko-enzimidir. İkincisi ise yağların oksidasyonunda ilk basamağı katalize eden asil-ko-enzim A dehidrojenaz enziminin ko-enziminin bir bölümünü oluşturur. Ayrıca D-Amino asit dehidrojenaz, ksantin oksidaz ve diğer bazı enzimlerin ko-enzimidir (1). Günlük minimal gereksinim tiaminde olduğu gibi metabolizma hızına ve günlük kalori alımına bağlı olarak değişir. Minimal miktarın günde 1000 kilokalori başına 0.3 mg olduğu tespit edilmiştir. Eksiklik halinde başlıca aşağıdaki lezyonlar oluşabilir. Ağızda (dil, dudak ve yanak mukozasında) iltihaplar ve buna bağlı olarak beyaz lekeler halinde gelişen perleş adı verilen lezyonlar gelişebilir. Gözde, kornea vaskülarizasyonu ve iltihabı oluşur. Ciltte, burun, nazolabiyal kıvrım, göz kapakları, kulak kepçesi, skrotum ve vulva üzerinde ciltte pullanma ve yağlanma gibi seboreik dermatif belirtileri, kızarma ve folikülit meydana gelir. Eritropoietin yapımının azalması nedeniyle anemi gelişebilir. İnce bağırsağın üst kısmından tamamiyle absorbe edilir (1, 10).

### 2.2.3. B<sub>6</sub> vitamini:

Piridoksinin aktif türevleri olan piridoksal fosfat ve piridoksamin fosfat amino asitlerin absorpsiyon, metabolizma ve transportunda rol oynayan çok sayıdaki enzim türlerinin ko-enzim kısmını oluştururlar. Bu enzimler aşağıdaki olaylardan sorumludurlar.

Tirozin, L-dopa, 5- hidroksitriptofan, arginin, glutamik asit ve diğer bazı aminoasitlerin dekarboksilasyonundan sorumludur. Bu olaylarda piridoksin türevleri ko-dekarboksilaz görevi yaparlar. İlk iki aminoasitin dekarboksilasyonu katekolaminlerin sentezinde rol oynar. Üçüncüsünün dekarboksilasyonu sonucu seratonin oluşur. Santral sinir sistemindeki bazı nöronlarda glutamik asitin dekarboksilasyonu sonucu önemli ve yaygın bir inhibitör mediatör olan GABA meydana gelir.  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -keto adipik asitin dekarboksilasyonu ile  $\delta$ -amino levulinik asid oluşturan dekarboksilaz da piridoksinine bağımlıdır.

Amino asitlerin trans aminasyonunda görevlidir. piridoksal fosfat bu olayı yapan enzimlerle ko-transaminaz görevi yapar.

Triptofan metabolizmasında, triptofanın bir minör metaboliti olarak vücutta oluşan kinurenin, antranilik asite dönüştürülür. Bu dönüşümü yapan kinureninaz enziminin koenzimi piridoksal fosfattır.

Kükürtlü amino asitlerin metabolizmasında ise amino asitlerin absorpsiyon ve taşınmasında piridoksin ve türevleri önemli ölçüde rol oynar. Günlük gereksinme 1-2 mg kadardır. Piridoksin eksikliğinde protein metabolizmasının bozulmasına bağlı olarak periferik nörit, santral sinir sisteminde GABA sentezinin azalmasına bağlı olarak hiperirritabilite ve konvülsiyonlar, hipokrom mikrositer anemi, cilt ve mukoza lezyonları gözlenmiştir (1).

#### 2.2.4. C Vitamini

Askorbik asit ve dehidro askorbik asit vücut sıvılarında denge halinde bulunur ve birbirlerine kolayca dönüşürler. Böylece redoks özelliği taşırlar. Bu özellikten dolayı askorbik asitin glutation, piridin nükleotitleri ve flavin nükleotitleri ile birlikte hücrelerde oksitlenme-indirgenme (redoks) sistemlerinde rol oynadığı gösterilmiştir. Askorbik asit hematopoyetik dokuda tetrahidrofolik asitin oksitlenmeden kalmasını sağlar. Bağ dokusu, kemik, kırık ve dentin dokuları gibi mezenşimal kaynaklı dokuların oluşumu ve normal durumda kalabilmeleri için askorbik asit gereklidir. Bu vitaminin sayılan dokuların yapımı ve sağlıklı durumlarını sürdürebilmeleri ile ilgili temel etkisinin kolojen sentezindeki rolünden ileri geldiği düşünülmektedir. Askorbik asit yara iyileşmelerini hızlandırır. Bu nedenle ağır yanıklardan ve travmalardan sonra lezyonların düzelmesini çabuklaştırır. C vitamininin ağır enfeksiyon ve diğer stres hallerinde; strese karşı hormonal reaksiyonun oluşmasında katkısının bulunduğu ileri sürülmüştür. C vitamininin uzun süren eksikliği skorbüt adı verilen hastalığa neden olur. Bu hastalıkta temel bozukluk mezenşimal kaynaklı dokularda kolojen yapımının azalması ve yıkımının artmasıdır. Buna bağlı olarak kapiler frajilitesinde artma, peteşiler, doku içinde kanama, dişlerin gevşemesi ve dökülmesi, diş etlerinde kanama ve iltihap, yara iyileşmelerinin gecikmesi gibi bozukluklar görülür. Erişkinlerde günlük vitamin gereksiniminin 10 mg olduğu tespit edilmiştir (1).

### 2.3. VİTAMİN TAYİN YÖNTEMLERİ:

Vitaminlerin bulunuşundan günümüze dek geliştirilen yöntemlerin çokluğu konusunda hemen herkesin aynı görüşte olduğu söylenebilir.

Bu tayin yöntemlerinin birçoğu bir tekinin miktarının bulunmasına yöneliktir. 60'lı yıllardan sonra HPLC'nin yaygınlaşmasını takiben, grup olarak vitamin tayinlerinin yapıldığı gözlenmektedir.

Son yıllarda, kapiler elektroforezin gelişmesine paralel olarak, kapiler elektroforez HPLC'nin yerini almaya başlamıştır. Doğaldır ki, adı geçen yöntemle vitaminlerin tayinleri de yapılmıştır.

Vitaminler birçok disiplinin kapsamına giren maddeler olduğundan sadece bu maddeleri konu alan araştırmaların yayınlandığı periyodikler vardır. Ayrıca konu ile ilgili birçok kitabın da yayınlandığı belirtilmelidir. Eczacılıkla ilgili tayinleri kapsayan böyle bir kitaptan söz edilebilir (2).

Kapiller elektroforezin değişik teknikleri kullanılarak suda çözünen vitaminler incelenmiştir.

Nishi ve ark (6) miselsi elektrokinetik kromatografi ile suda çözünen vitaminlerin göç hızları üzerine etkili parametreleri incelemiştir. Misel yapıcı ajan olarak sodyum dodesil sülfat ve sodyum laurometil tauratın kullanıldığı belirtilmektedir. pH 9.0 tamponu içerisinde incelenen vitaminlerin teorik plaka sayısının 100000-350000 arasında olduğu ifade edilmektedir.

Fujuwara ve ark.(5) miselsi elektrokinetik kromatografi ile suda çözünen vitaminlerin göç hızları üzerine etkili parametreleri incelemiş, belirlediği optimum koşullarda enjektabl farmasötik preperatlarda vitamin tayinini gerçekleştirmişlerdir. İç standart olarak etil p-aminobenzoat kullandıklarını, ölçüleri 254 nm'de yaptıklarını, enjektabl çözeltilerde 2.1 den az standart sapma ile tayinleri başardıkları bildirilmektedir.

Huopalahti ve Sunell (4) kapiler zon elektroforez tekniği ile fosfat tamponu kullanarak pH 9 da 15 dakikalık bir analiz yöntemi geliştirmişlerdir. Tabletlerden vitaminleri 0.1 M HCl ile aldıklarını, tekraredilebilirliğin ve pik alanlarının her bir vitamin için ortalama, standart sapma ve göreceli standart sapmalarını inceleyerek yöntemlerinin geçerliliğini araştırdıklarını belirtmektedirler.



### **3. MATERYAL VE METOD:**

#### **3.1. Kullanılan aletler:**

Kapiler elektroforez ile yapılan deneyler Modular Injector, High Voltage Power Supply ve Spectra FOCUS model scanning CE dedektörden oluşan Spektrophoresis 100 (Thermo Spectra Physics) ile gerçekleştirilmiştir. Bu sistem, bilgisayar bağlantılı olup (Intra, 486 PC) veriler OS/2 Warp (Version 3.0) altında çalışan PC 1000 Thermo Separation Product programı ile işlemektedir. Elektroferogramlar Deskjet 540 model (Hewlett Packard) ile kaydedilmiştir. pH ölçümleri Elektro mag 822 model pH metre ve Amagrus marka kombine cam elektrotu ile, degas işlemleri B-220 model (Bronson Ultrasonic Cleaner), süzme işlemleri (25 mm, 0.45 $\mu$ m) Phenomenex mikro filtre ile yapılmıştır.

Ayırım, efektif uzunluğu 60 cm olan 75 $\mu$ m lik fused silika (Phenomenex) kapilerde gerçekleştirilmiştir. İyi bir ayırım sağlanabilmesi için ilk koşul kapilerin şartlandırılması olduğu belirtilmektedir. Şartlandırmada ilk yıkamanın 1 N NaOH ile, daha sonraki olağan yıkamaların 0.1 N NaOH ve saf suyla yapılmasının gereği aletin kullanma talimatında yazılmaktadır. NaOH kapillerdeki çökelmeleri önleyen bir maddedir. Ayrıca kapillerin yüzeyinde oluşan negatif yüklerin bulunduğu tabakanın pozitif partiküllerle kaplanmasından kaynaklanan sakıncaları da ortadan kaldırmaktadır.

Belli sayıdaki analizden sonra pik yüksekliklerindeki azalma şartlandırma işleminin mutlaka yapılması gereğini ortaya koymaktadır.

#### **3.2. Kullanılan Kimyasallar:**

Tiamin, riboflavin, piridoksin ve askorbik asit standartları çeşitli ilaç firmalarından sağlanmıştır. Deneylerde kullanılan diğer kimyasal maddeler E. Merck firmasının üretimi olup; analitik ölçülerde saftırlar.

Çalışmalarda kullanılan bidistile su laboratuvarımızda elde edilmiş olup, tüm çözeltilerin hazırlanmasında bu su kullanılmıştır.

### 3.3. Kullanılan Çözeltiler:

Ayırım 20-80 mM derişimlerdeki boraks tamponu içerisinde yapılmıştır. Bu çözeltinin pH'ı 1M HCl veya 1M NaOH ile ayarlanmıştır. Boraks çözeltilerinin derişimleri 100 mM'lük boraks stok çözeltisinden hareketle hazırlanmıştır.

### 3.4. Stok vitamin standardı ve standart çözeltilerinin hazırlanması:

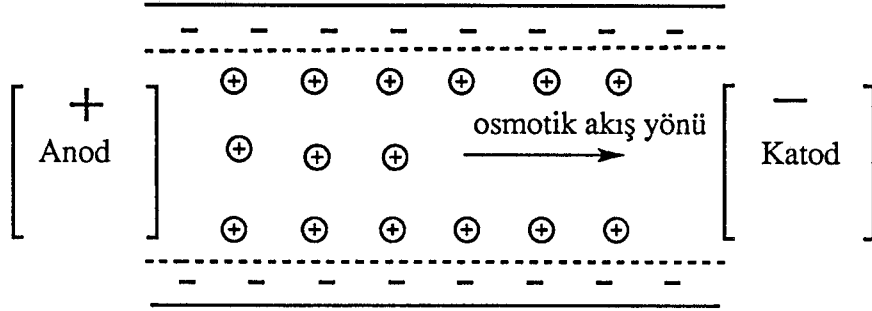
Askorbik asit, tiamin hidroklorür, piridoksin hidroklorür den 10 mg dolaylarında duyarlı tam tartım alınmış, 50 mL'lik balonjojeye aktarılarak, tam çözünmesi sağlandıktan sonra, bidistile su ile tamamlanmıştır. Riboflavin çözeltisi için ise 10 mg dolaylarında duyarlı tam tartım alınmış bidistile su ile 100 mL'lik balonjojeye aktarılmış, üzerine ortamı bazik yaparak çözünmeyi kolaylaştırması için 20 mg dolaylarında Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> katılarak ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilerek tam çözünme sağlandıktan sonra bidistile su ile tamamlanmıştır.

### 3.5. Kapiler Elektroforezin Temeli:

Kapiler elektroforez son yıllarda geliştirilmiş ilgi çekici ve son derece potansiyelli analitik bir tekniktir. Kimya, biyoteknoloji, çevre ve farmasötik analizlerde geniş ölçüde uygulama alanı bulmaktadır. Yöntemin temeli 1886'da Lodge tarafından atılmış, 1987'de ise Cohen ve Kauger tarafından kapiler jel elektroforeze kadar bir gelişim göstermiştir (11). En büyük gelişim ticari elektroforez aletlerinin çıkartılması ile olmuştur. Ayrıca bu gelişmedeki en büyük payın çok küçük çaplı ergitilmiş silika kapilerin hazırlanmasında olduğuda bir gerçektir. Kapiler elektroforezin en basit tekniği kapiler zon elektroforezidir. Kapiler zon elektroforez ile ayırım üzerinde iki önemli etkinin bulunduğu bilinmektedir. Bunlar; elektroosmoz ile taşınma, diğeri elektriksel etki ile yüklü parçacıkların hareketidir. Elektriksel etki ile yüklü parçacıkların hareketi sırasında çözeltinin viskozitesi de bu parçacıkların hareketi üzerine etki göstermektedir.

Elektroosmoz ile taşınmanın temeli aşağıdaki gibi açıklanabilir.

Ergitilmiş silika, dielektrik sabitine bağlı olarak daima yüzeyinde negatif bir yük bulundurur. Bu yük oluştuğu anda buna karşı çözeltide ters bir yükün oluştuğu görülür. Dolayısı ile çözeltideki yüklenme pozitif olmaktadır. Pozitif yük taşıyan çözeltinin katoda doğru akacağı doğaldır. Bu akış sırasında çözelti içerisinde bulunan pozitif, negatif ve nötr maddeler elektroosmoz olayı ile daima katoda doğru olacaktır.



Şekil 3.1. Elektroosmoz olayı

Yukarıda belirtildiği gibi çözelti içerisinde bulunan pozitif ve negatif yük taşıyan iyonlar uygulanan elektriğin etkisi altında anota veya katota doğru yönelmektedirler. Buna göre iyonların net hızları taşıdıkları pozitif veya negatif yüke bağlı olarak değişir.

Her üç tip iyon için

$$\text{Pozitif iyon için: } v = v_{eo} + v_{ep}$$

$$\text{Negatif iyonlar için: } v = v_{eo} - v_{ep}$$

$$\text{Nötr iyon için: } v = v_{eo}$$

eşitlikleri yazılabilir.

Bu yöntemin birçok üstünlükleri bulunmaktadır. Bunları şöyle sıralamak mümkündür. Mikro analizlere olanak sağlar. Çok küçük hacimlerde çalışmanın mümkün olduğu söylenebilir. Ayrım diğer yöntemlere göre daha kısa sürede yapılabilir. Analiz pahalı olmayan kimyasal maddelerle yapılabildiğinden dolayı analiz başına düşen sarfiyatın çok az olduğu söylenebilir.

Yukarıda belirtilen üstünlüklerine karşın bu yöntemin tek dezavantajı incelenecek olan maddelerin çözünür hale getirilme problemleridir.

#### 4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Vitamin analizleri birçok alanı ilgilendiren bir konudur. Biyokimya, gıda ve farmasötik endüstrisi vitaminin analizlerini sürekli kullanmaktadır. Bu nedenle; yöntem geliştiren bilimler, vitamin analizlerini basit, ucuz ve duyarlı yapabilmeye yönelik çaba sarfetmektedirler.

Bu çalışma, bazı suda çözünen vitaminlerin analizlerine temel oluşturacak, besin ve farmasötik analizlerce uygulanabilecek kapiler zon elektroforezi kapsamaktadır.

Önce, kuru olarak seçilen tiamin, riboflavin, piridoksin ve askorbik asitin 10 mg/100 mL'lik çözeltilerinden hareketle hazırlanan çözeltilerin elektroforetik davranışı tampon çözeltiler içerisinde (pH 8-9.5) teker teker incelenmiş ve göç zamanları belirlenmiştir.

Elektroferogramlar 200, 280 ve 360 nm'lerde 25 kV 200 µA (maksimum) uygulayarak elde edilmiştir.

pH'a göre elde edilen elektroferogramlarda bir değerlendirme yapıldığında, pH 8'deki 20 mM boraks tamponu içerisinde analizin yaklaşık 9 dakika, pH 9'daki 20 mM boraks tamponu içerisinde yaklaşık 15 dakika sürdüğü gözlenmiştir. pH 8'de elde edilen elektroferogramda riboflavin ile piridoksinin birbirlerinden tam ayrılmadığı (resolution) görülmektedir. Bu nedenle tiamin, riboflavin, piridoksin ve askorbik asitin birbirlerinden en iyi ayırıcı sistemin pH'ı 9 olan 20 mM boraks tamponu olduğu saptanmıştır.

Göç zamanı (migration time,  $t_m$ ) üzerine çeşitli parametrelerin etkileri bulunmaktadır. Yukarıdaki bulguya göre pH'nın azalması ile göç zamanı da azalmaktadır.

Ayrıca, göç zamanı üzerine kullanılan tamponun derişimi de etkili olmaktadır. Tampon derişiminin göç zamanı ile ilişkisi çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiş ve

$$\mu_{ep} = \frac{e}{3 \times 10^7 |Z| \eta \sqrt{C}}$$

şeklinde bir ilişki bulunmuştur (11).

Burada;

$\mu_{ep}$  elektroforetik göç hızı

Z parçacığının yükünü

$\eta$  çözeltinin viskozitesini

C çözeltinin derişimini göstermektedir.

Bu eşitliğe göre bir maddenin elektroforetik taşınması, çalışma ortamının derişiminin karekökünün tersi ile doğrusal olması gerekir.

Gerçekte, elektroferogramlardaki pikler göç hızlarını göstermektedir. Çünkü, ergitilmiş silika kolonlarda elektroosmoz hızını ortadan kaldırmanın yalnızca kaplanmış kolonlarda gerçekleştiği bilinmektedir.

Göç hızı üzerinde etkili parametrelerden voltaj ve kolon uzunluklarından da söz edilmesi gerekir. Bu iki parametreyi içeren eşitliğin

$$t = \frac{L^2}{\mu_{ep} \times V}$$

şeklinde verilmesi mümkündür (11).

Burada,

t parçacığının göç zamanı

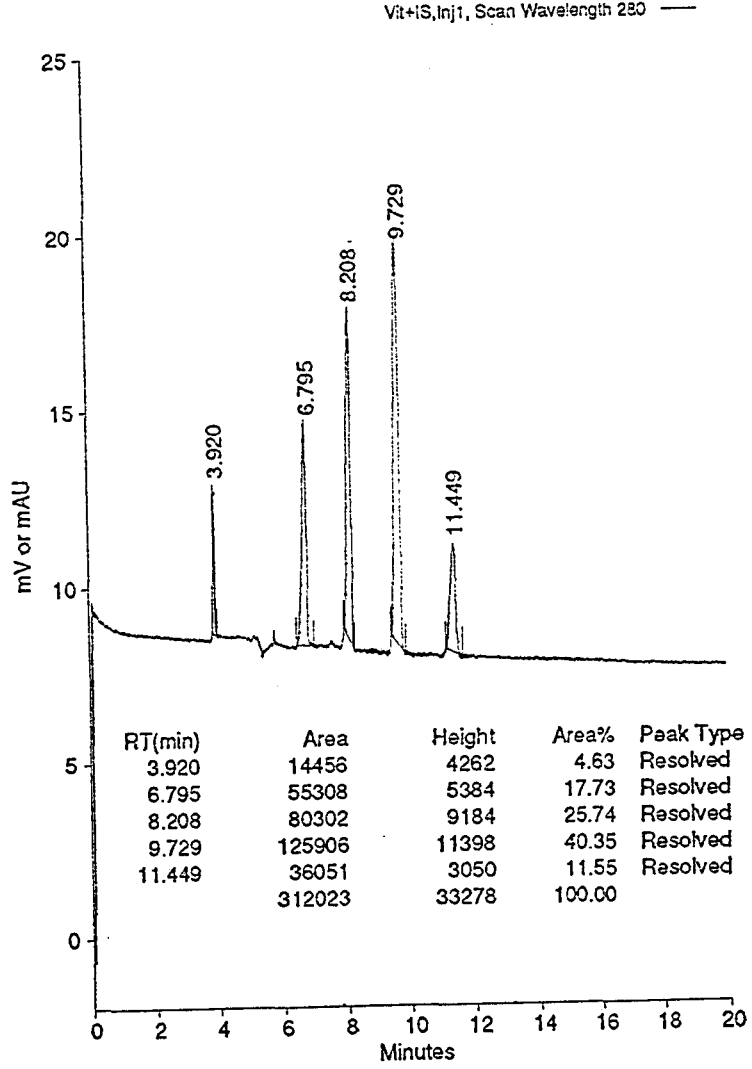
L kolon uzunluğu

$\mu_{ep}$  elektroforetik göç hızı

V uygulanan potansiyeli göstermektedir.

Eşitliğe göre parçacığının göç zamanı kolon uzunluğunu karesi oranında değişmektedir. Şu halde süre olarak uygun zaman alan analizlerde, diğer koşulları değiştirmeden kolon boyunu azaltarak süreyi önemli ölçüde değiştirmenin olası bir alternatif olduğu göz önünde bulundurulmalıdır.

Yukarıda belirtildiği gibi 60 cm lik ergitilmiş silika kolonda pH'ı 9 olan boraks tamponu içerisinde, 25 kV potansiyel, 200  $\mu$ A (maksimum) akım uygulayarak, tiamin, riboflavin, piridoksin, askorbik asit ve internal standart olarak belirlenen salisilik asitin elektroferogramı Şekil 4.1.'de verilmektedir.



Şekil 4.1. Tiamin, riboflavin, piridoksin, askorbik asit ve salisilik asitin elektroferogramları (Bilgisayar çıktısı)

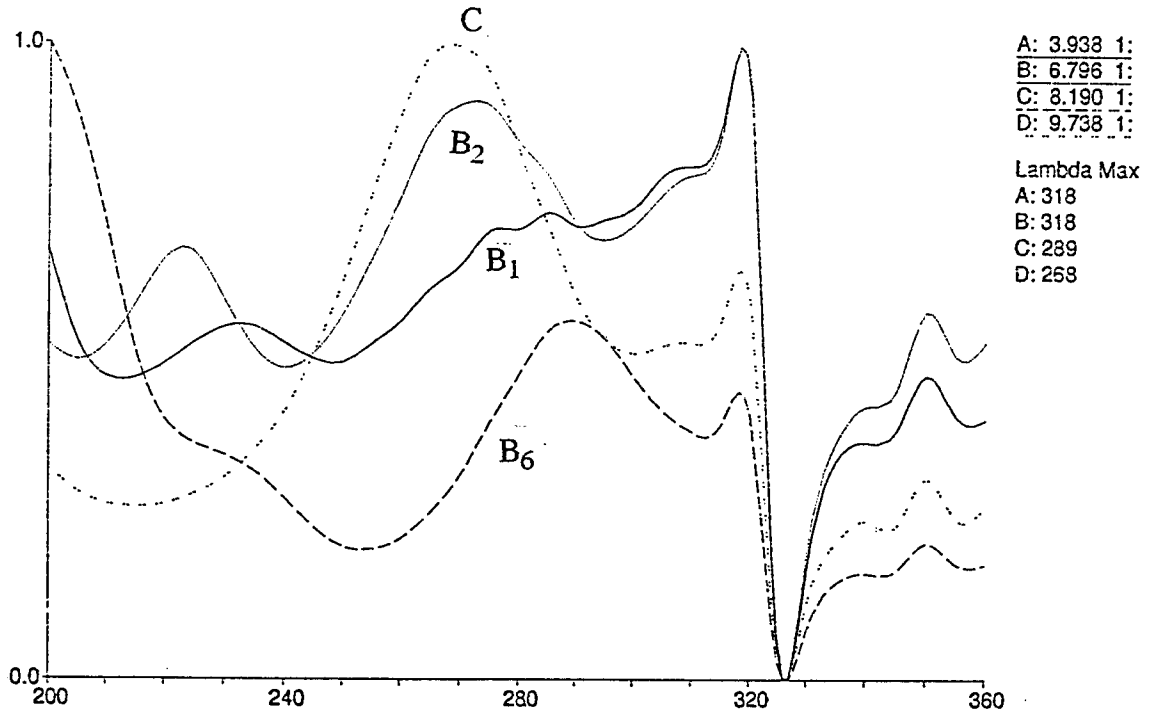
Elektroferogramda görüldüğü gibi bütün pikler birbirlerinden çok düzgün bir şekilde ayrıldığı (resolution), analitik açıdan değerlendirilebilir olduğu sonucu çıkmaktadır.

Pik alan veya yüksekliklerinin en iyi belirlediği dalga boyunun saptanması için aşağıdaki gibi çalışılmıştır.

Tarayıcı dedektörün bu tür çalışmalardaki üstünlüğü tartışma götürmemektedir. Tarayıcı (scanning) mod ile çalışıldığında istenilen dalga boyundaki pik absorpsiyonları belirlenebilmektedir. Bu çalışmada da, tarayıcı mod ile çalışılmış, kayıtlar 200 ile 360 nm'ler arasında yapılmıştır. Bilgisayar çıktıları ise bu modda üç ayrı dalga boyunda verilmektedir. Bu dalga boyları 200, 280 ve 360 nm dir.

Şekil 4.1. de 280 nm deki yapılan kayıtlar verilmiştir. En iyi absorpsiyonun belirlenmesi için bu araştırmada kullanılan maddelerin hızla kaydedilmiş spektrumları üst üste bindirilmiş ve en iyi absorpsiyonların 200 ve 280 nm'ler dolayında olduğu saptanmıştır

Bu çakışık spektrumlar Şekil 4.2 'de verilmektedir.



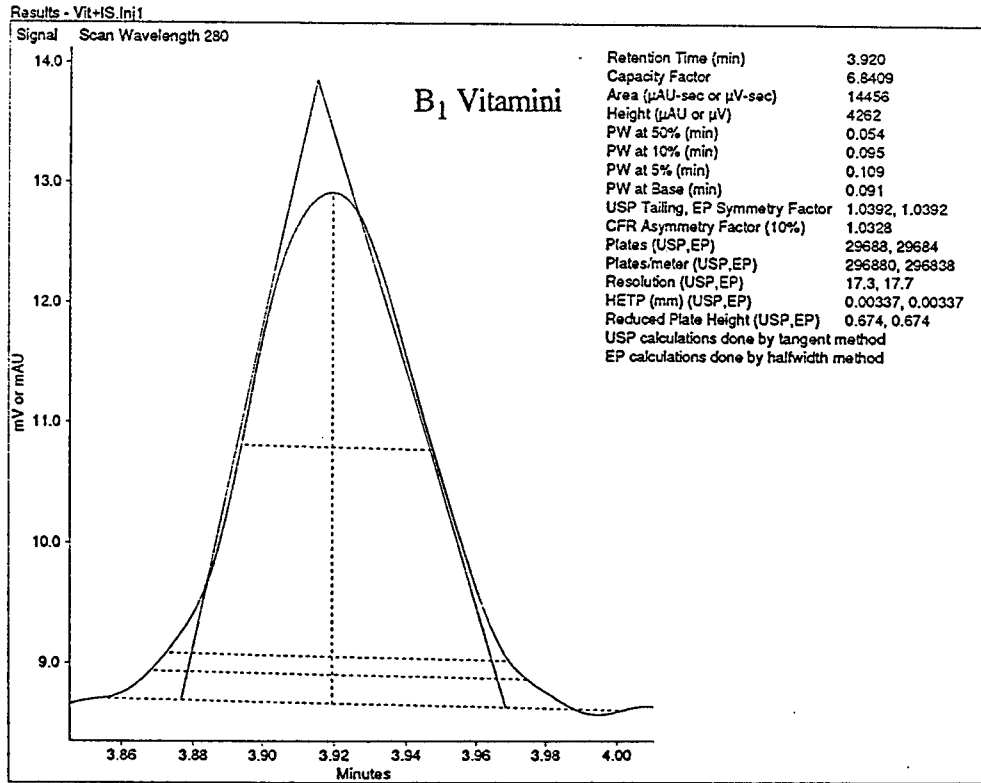
Şekil 4.2. Tiamin, riboflavin, piridoksin ve askorbik asitin çakışık spektrumları

Maddenin göçü ile ilgili yöntemlerde, birçok parametre taşınma hızını etkilemektedir. Taşınma hızı etkilendiğinde, taşınma zamanı ve pik boy veya alanları etkilenmektedir. Bu sakıncaların ortadan kaldırılması için iç standart kullanılmasına gerek vardır.

İç standart kullanımı ile yukarıda sözü edilen sakıncalar ortadan kalkmaktadır. Çünkü spektrum veya elektroferogramlardaki tüm değişiklikler iç standart sinyallerine oranlandığında oranın sabit olduğu ispatlanmıştır (12).

İç standart ile çalışmalarda kullanılan iç standart derişiminin kesinlikle aynı olma koşulu bulunmaktadır. Bu nedenle, bu araştırmada iç standart olarak kullanılan salisilik asitin sürekli 0.0202 mg/mL lik derişimi kullanılmıştır. Yapılan analizlerde tiamin, riboflavin, pridoksin, askorbik asit ve salisilik asitin spektral verileri incelenmiş ve bu parametrelerle ilgili sonuçlar Şekil 4.3. de verilmektedir.

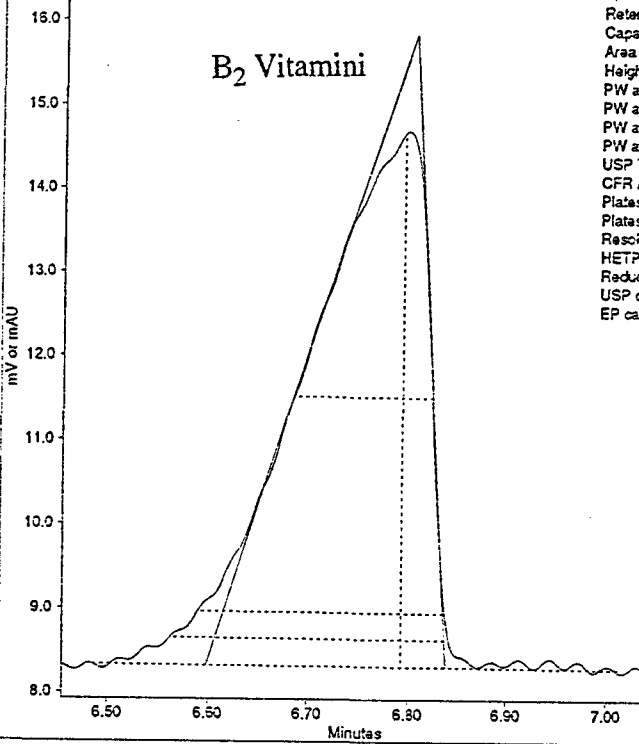
Bu veriler değerlendirildiğinde incelenen vitaminlerin tümünün incelenebilir nitelikte olduğu görülmektedir.





Results - Vit+IS.Inj1

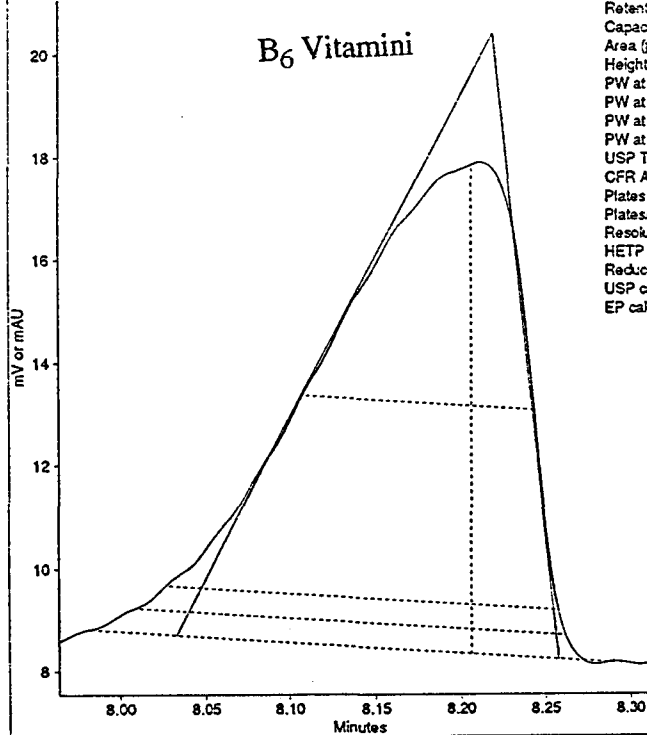
Signal Scan Wavelength 290



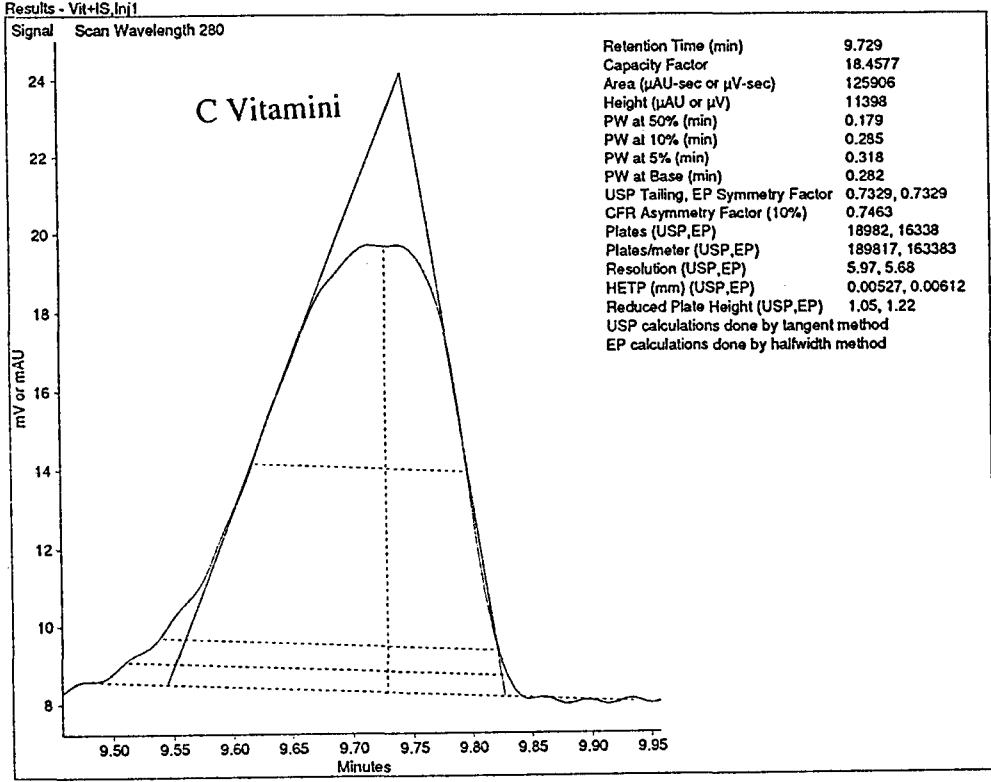
Retention Time (min)	6.795
Capacity Factor	12.5899
Area (μAU-sec or μV-sec)	55308
Height (μAU or μV)	5384
PW at 50% (min)	0.133
PW at 10% (min)	0.247
PW at 5% (min)	0.280
PW at Base (min)	0.240
USP Tailing, EP Symmetry Factor	0.6008, 0.6008
CFR Asymmetry Factor (10%)	0.6041
Plates (USP,EP)	12788, 13438
Plates/meter (USP,EP)	127877, 134383
Resolution (USP,EP)	6.04, 6.07
HETP (mm) (USP,EP)	0.00782, 0.00744
Reduced Plate Height (USP,EP)	1.56, 1.49
USP calculations done by tangent method	
EP calculations done by halfwidth method	

Results - Vit+IS.Inj1

Signal Scan Wavelength 290



Retention Time (min)	8.208
Capacity Factor	15.4162
Area (μAU-sec or μV-sec)	80302
Height (μAU or μV)	9184
PW at 50% (min)	0.136
PW at 10% (min)	0.231
PW at 5% (min)	0.252
PW at Base (min)	0.227
USP Tailing, EP Symmetry Factor	0.6370, 0.6370
CFR Asymmetry Factor (10%)	0.6384
Plates (USP,EP)	20875, 20063
Plates/meter (USP,EP)	208749, 200625
Resolution (USP,EP)	6.04, 6.07
HETP (mm) (USP,EP)	0.00479, 0.00498
Reduced Plate Height (USP,EP)	0.953, 0.997
USP calculations done by tangent method	
EP calculations done by halfwidth method	



Şekil 4.3. Tiamin, riboflavin, piridoksin ve askorbik asitin pikleri

Sonuçta suda çözünen tiamin, riboflavin, piridoksin ve askorbik asitin besinlerde ve farmasötik preparatlarda kolayca tayin edilebileceği bir kapiler zon elektroforez yöntemin geliştirildiğine karar verilmiştir.

Kapiler elektroforez ile yapılan çalışmalarla bu çalışmada gerçekleştirilen vitamin tayini yöntemi karşılaştırıldığında, miselsi elektrokinetik kromatografi tekniği ile yapılan tayinlerde piklerin birbirine çok yakın olduğu (5, 6) görülmektedir. Ayrıca kapiler zon elektroforez ile elde edileninkine göre göç hızlarının tam tersi şeklinde elde edildiği gözlenmektedir. Bu terslik tekniklerden kaynaklanan beklenen bir durumdur.

SDS kullanılarak yapılan çalışmaların birinde tayinler 210-220 (6), diğerlerinde de 254 nm'de (4, 5) ki absorpsiyonları ölçülmüştür. Oysa bu çalışmada taramalı dedektör kullanılarak bulunan en uygun dalga boylarının 200-280 nm dolaylarında olduğu savunulmaktadır.

Huopalathi ve Sunell (4) uyguladıkları yöntemi bir HPLC yöntemi ile karşılaştırmışlar, tekraredilebilirliğin ve standart sapmanın zayıflığını enjeksiyon yöntemine bağlamışlardır. Buna göre bir karşılaştırma yapılırsa bu çalışmada vakum enjeksiyon tekniğinin kullanıldığının belirtilmesi gerekir.

Geliştirilen yöntem içerisine vitamin katılan bonbon tipi şekerlere ve bir ilaç firmasının üretimi olan vitamin drajelerine uygulanmış ve son derece muntazam elektroferogramlar elde edilmiştir. Hem şeker hem de drajelerde bulunan diğer maddelerin elektroferogramı etkilemediği, içerdiği tiamin, riboflavin, piridoksin ve askorbik asitin büyük bir duyarlılık ve seçicilikle yapılabileceği sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Kayaalp, O., Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Nüve Matbaası, Ankara,1983,Cilt 3, S. 2355-411
2. Hashmi, M., Assay of Vitamins in Pharmaceutical Preparations, John Wiley and Sons, Chichester, 1985,
3. Kenndler, E., Schwer, C., Kaniansky, D., Purity control of riboflavin-5'-phosphate (vitamin B<sub>2</sub> phosphate) by capillary zone electrophoresis, J. Chromatogr., 1990, 508, 203-7
4. Huopalathi, R., Sunell, J., Use of capillary zone electrophoresis in determination of B vitamins in pharmaceutical product, J. Chromatogr., 1993, 636, 133-5.
5. Fujiwara, S., Honda, S., Analysis of water soluble vitamins by micellar electrokinetic capillary chromatography, J. Chromatogr., 1988, 109, 133-40.
6. Nishi, H., Tsumagari, N., Kakimoto, I., Terabi, S., Separation of water soluble vitamins by micellar electrokinetic chromatography, J. Chromatogr. 1989, 465, 331-43
7. Keskin, H., Besin Kimyası, Fatih Yayınevi Matbaası, İstanbul, 1981, S. 341-67
8. Jacobs, B., Chemical analysis of food and food products, Roberte Krieger publishing Co. Inc., Huntington, 1973, S. 705-15
9. Kirk, R.E., Othmer, D., Grayson, M., Eckroth, D., Kirk-Othmer Concise Encyclopedia of Chemical Tecnology, John Wiley and Sons New York, 1978, S. 1237-47
10. Yenson, M., İnsan Biyokimyası, Çeliker Matbacılık,İstanbul, 1981, S. 616-36
11. Li, S.F.Y., Capillary Electrophoresis Principles, Practice and Applications, Journal of Chromatography Library-volume 52, Elsevier, Amsterdam,1994,
12. Willard, H., Merritt, L., Dean, J., Settle, F., Instrumental Methods of Analysis, Litton Educational Publishing Inc.New York, 1981, S.452