

VAN YÖRESİNDE SATILAN İNEK SÜTLERİNDE VİTAMİN A'NIN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE TAYİNİ VE PASTÖRİZASYONUN ETKİSİ

Haluk Testereci¹, İbrahim H. Yörük²

Determination of Vitamin A in Cow milk Sold at Van Region by High Performance Liquid Chromatography and Effect of Pasteurization

Summary: Vitamin A retinol acetate of milk sold during winter month in Van region has been separated on C18 column by normal phase chromatography. Detection was made with fluorescence detector set excitation at 348 nm and emission at 470 nm. Methanol has been use as a mobile phase. Vitamin A retinol acetate level of milk sold at region was found to be 0.7 IU/ml. No differences in retinol acetate levels between raw and pasteurized milk has been observed. This confirms that vitamin stable for the pasteurization heat. Recovery of retinol acetate has been determined as 70.3-87.8%. This method allows a reliable measurement of vitamin A retinol in milk.

Özet: Van yöresinde kış ayında satılan sütlerin vitamin A retinol asetat C18 kolonunda normal fazlı kromatografisi ile ayrılmıştır. Tanıları Flouresans detektörün eksitasyonu 348 nm ve emisyonu 470 nm ye ayarlanarak yapılmıştır. Mobil faz olarak metanol kullanılmıştır. Yörede satılan sütlerde vitamin A retinol asetat düzeyi 0.7 IU/ml olarak bulunmuştur. Çiğ ve pastörize sütler arasında retinol asetat düzeyleri arasında önemli bir farklılık görülmemiştir. Bu da bu vitaminin pastörizasyon ısısına dayanıklılığını teyid etmektedir. Retinol asetatın geri alma oranı % 70.3-87.8 olarak tesbit edilmiştir. Bu metod sütlerde vitamin A retinol'ün güvenilir düzeyde tayinine imkan vermektedir.

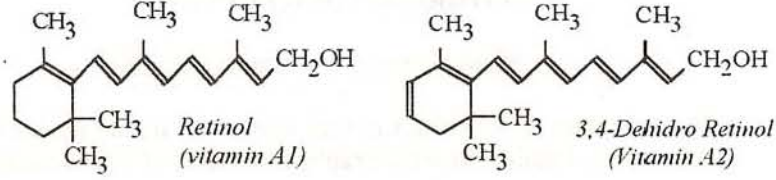
Giriş

Vitamin A yağda eriyen bir vitamindir. Vitamin A'nın iki izomeri vitamin A₁(retinol) ve vitamin A₂(3, 4 dehidroretinol) balık karaciğer yağında mevcuttur. Vitamin A₁, 325 nm'de vitamin A₂, 351 nm'de maximum absorpsiyon verir (2, 6, 8, 14). WHO (Dünya Sağlık Organizasyonu) gelişmekte olan ülkelere gönderdiği yağsız süt tozunda olması gereken Vitamin A miktarını 50-100 IU/gram olması

1:Yrd. Doç. Dr. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Fizyoloji Anabilim Dalı Van-TÜRKİYE

2:Uzman Kimyager. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Fizyoloji Anabilim Dalı Van-TÜRKİYE

zorunluluğu getirmiştir (16, 19). Taze süt yazın 1.6-4 IU/gram, kışın 0.25-0.75 IU/gram Vitamin A ihtiva ettiği bildirilmiştir (19). Süt tozunda Vitamin A düzeyi 10 IU/gram olarak bildirilmiştir (20). Süt ve süt ürünlerinin vitamince zenginleştirilebildikleri bilinmektedir (3, 10, 11, 16, 18).



Eğer vitamin A ihtiva eden numuneler için organik çözücülerde son bulan bir ekstraksiyon metodu izlenecek olursa, normal-fazlı (normal Phase) HPLC kullanılmalıdır. Bu özellikle vitamin A'nın optikal izomerlerinin rezolüsyonunda önemlidir. Sabunlaştırılmış süt numunelerinden vitamin A'nın ekstraksiyonu için dietil eter, petrol eter, hekzan ve petrol eter:dietil eter (1:1, v/v) kullanılmıştır. En iyi ekstraksiyonun dietileter-petrol eter (1:1) ile ekstraksiyonu olduğu bulunmuştur (6,12,14,17, 22).

Sıvı ve işlenmiş sütte retinolün esterleşme şekilleri geri dönüşümlü faz kromatografisi ile incelenmiştir. İnek sütlerinde bulunan vitamin A'nın bir seri tanınabilir ester homologları bulunduğu bildirilmiştir. Retinil palmitat sütte en çok bulunan esterdir, bunu retinil oleat izler. Isı muamelesi toplam vitamin A miktarını etkilediği halde, bu esterlerin çoğunun ısıdan etkilenmediği bildirilmiştir (21). Sütteki retinol miktarının pastörizasyondan etkilenmediği bildirilmiştir (1, 21).

Vitamin ve esterlerinin ayrılmasında normal fazlı veya geri dönüşümlü fazlar kullanılmaktadır. Geri dönüşümlü fazlar için metanol- 10mM sodyum asetat (80:20), asetonitril-%1 amonyum asetat (80:20), metanol, metanol-su (92:8) kullanıldığı bildirilmiştir. Normal fazlı ayırmada ise hekzan %5 dioksan, diklorometan-metanol (99.5:0.5) kullanıldığı kaydedilmiştir. Vitamin A ve esterleri UV detektörde 325-348 nm de, fluoresan detektörde eksitasyon 348 nm ve emisyon 470 nm de tanınabilmektedir (6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16).

Bu çalışmada, Van yöresinde yoğun geçen kış mevsiminde, halk tarafından satışı arz edilen sütlerin vitamin A düzeylerinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile tayini ve pastörizasyonun bu vitamin üzerine etkisi araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Standart çözeltisi : Saf retinol asetat 'tan tam olarak 20 mg. hassas terazide (Bosch S-2000) tartılarak, bir miktar metanolde çözündürüldü ve 3 ml ye

metanolle tamamlandı. 20 mg/3ml Stok retinol asetat solüsyonu ve daha sonra bu solüsyon metanolle dilue edilerek, 1.3 µg/ml retinol asetat çalışma standardı hazırlandı. 10 mg vitamin A palmitat 7 ml metanolde eritilerek stok çözeltisi ve bu stoktan 0.36 µg/ml vitamin A palmitat olacak şekilde çalışma standardı hazırlandı.

Kromatografik şartlar: Numunelerdeki vitamin A' lar Shimadzu LC10 AD pompası yardımıyla C18-(150x4,6 mm) kolonda ayrıldı. Koruyucu kolon (guard column, 10x4mm) kolonun ömrünü uzatmak amacıyla eklendi. Tanı için Shimadzu (Japon) RF-10 A floresans dedektörde eksitasyon 348 nm ve emisyon 470 nm lere ayarlanıp, standartlara karşı okundu. Numune konsantrasyonları C-R 6 A Chromopac'ta (Shimadzu) kaydedilip hesap edildi. Mobil faz olarak %96 lık metanol (E. Merck) vakum pompası ile (Millipore) degaz edildikten sonra 1 ml/dk akış hızıyla kullanıldı.

Numuncenin hazırlanması: Van yöresinde Şubat ayında halk tarafından satışa arz edilen açık sütlerden tesadüfi olarak 8 ayrı süt numunesi alınmıştır. Sütlerdeki vitamin A'nın ekstraksiyonları metanol ile yapıldı ve Collins ve Chow (1984)'un plazma için kullandığı metod süte adapte edildi. 500 µl süte 1000 µl Metanol eklendi ve 1 ml hekzan ilave edilerek vortex'te karıştırıldı. Faz ayrılması için 2000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan hekzan fazından 500 µl alınıp Argon gazı altında, sıcak su banyosunda 1 dakika içinde kurutuldu. Kalıntı 250 µl metanolde çözülüp, analitik kolona injekte edildi.

Pastörizasyonun etkisi: Çiğ süt numuneleri 70°C de 15 dakika bekletilerek pastörize edildi. Bu sütün vitamin A düzeyi de çiğ sütlerdeki gibi ölçüldü.

Geri alma oranının hesaplanması; 500 µl süt ve 250 µl satandard karışımı karıştırılıp metanol ile toplam hacim 1.5 ml ye tamamlanmıştır. Hekzan ile ekstraksiyon basamağından itibaren yukardaki işlemler tekrarlanmıştır.

Tartışma ve Sonuç

Çiğ ve pastörize sütlere ait retinol asetat değerleri aşağıda tablo 1' de verilmiştir. Standart ve sütte, retinol asetat ve vitamin A palmitat (kontrol standardı) n C₁₈ kolonuyla ayrılmasını gösteren tam kromatogramı şekil de gösterilmiştir.

Çiğ ve pastörize süt ortalama değerleri arasındaki farklılık Student-t testine (4) göre önemsiz bulunmuştur. Buna göre pastörizasyonda vitamin A retinol asetat esterinde önemli bir kayıp olmamıştır. Bu da vitamin A esterinin ısıya dayanıklı olduğuna ilişkin kaynakları teyid eder niteliktedir(1, 21). Standart vitamin A retinol asetatın 1 ng'mı 0.0028 IU ye tekabül etmektedir. Bu hesaplama kış şartlarına rağmen yörede satışa sunulan sütlerde ortalama 0.70 IU/ml vitamin A retinol asetat bulunmuştur. Bu miktar kış ayları için verilen miktar sınırları (0.25-0.75 IU/gram) arasındadır.

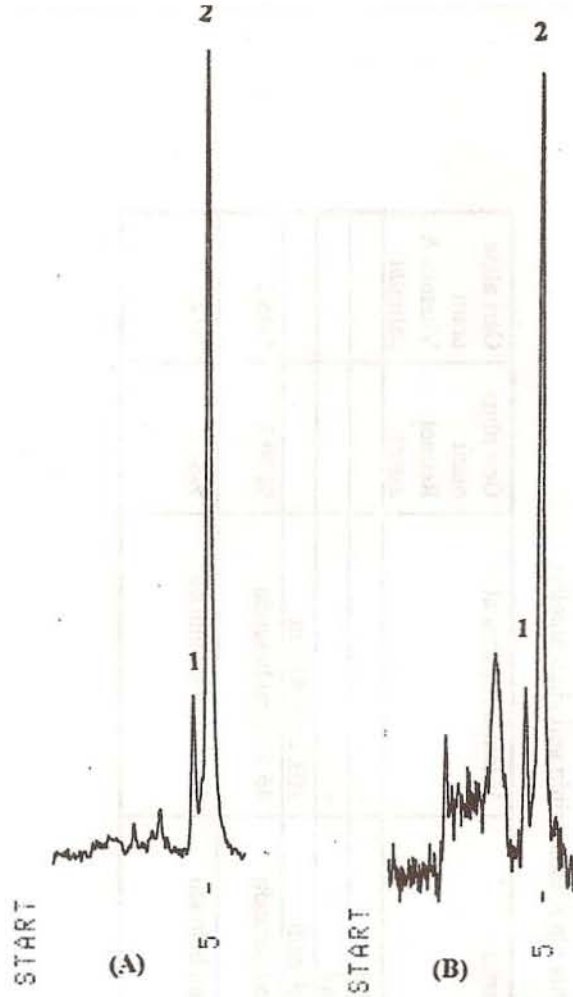
Süte eklenen retinol asetat ve palmitat ın geri alma oranları aşağıda tablo 2 de çıkarılmıştır. Buna göre Vitamina A retinol asetatın geri alma oranları % 70-87.8 arasında bulunmuştur. Vitamin A palmitatın geri alma oranları ise %45.3-126.7 arasında değişkenlik göstermektedir. Retinol asetatın geri alma oranları arasındaki yakınlık bu metodun geçerliliğini teyid eder niteliktedir. Metanol ekstraksiyonunu, hekzan ekstraksiyonun izlemesinin geri almayı artırıcı bir rol oynadığı sanılmaktadır. Benzer metodla retinolün plazmadan geri alma oranı % 85-99.1 e yakın bulunmuştur (5). Bu sonuca göre, plazma için kullanılan vitamin A retinol asetat metodunun, yapılan değişikliklerle süt için güvenle kullanılabileceğini söyleyebiliriz.

Tablo 1. Kış mevsiminde Van yöresindeki çiğ ve pastörize sütlerin retinol asetat değerleri

n	çiğ süt (ng/ml)	Pastörize süt (ng/ml)
	Retinol Asetat	Retinol Asetat
1	189.9	249.6
2	249.2	171.6
3	185.8	171.0
4	161.8	118.7
5	267.1	154.7
6	488.5	228.7
7	201.7	263.1
8	242.9	172.7
X	248.4	191.3
SD	103.5	50.3

Tablo 2. Çiğ ve pastörize süttten vitamin A esterlerinin geri alma oranları

	Retinol Asetat	Vitamin A palmitat	Geri alma oranı Retinol asetat	Geri alma oranı Vitamin A palmitat
Süt (normal)	248.4 ng/ml	-		
Süt (Pastörize)	191.3 ng/ml	-		
Standard karışım	293.1 ng eklendi	103.2 ng eklendi		
Süt (Normal)+ Standard karışımı	380.6 ng/ml bulundu	46.6 ng/ml bulundu	% 70.3	%45.3
Süt (Pastörize) +Standard karışımı	425.3 ng/ml bulundu	130.8 ng/ml bulundu	%87.8	%126.7



(A)-Standard Vitamin A retinol asetat¹ ve Vitamin A palmitat'ın² kromatogramı görülmektedir

(B)-Süt vitamin A retinol asetat ve vitamin A palmitat ile geri alma için zenginleştirilmesi. Vitamin A esterleri C₁₈ kolonunda ayrılmıştır. Retinol asetatın tutulma zamanı 4.5 dakika ve palmitatın tutulma zamanı 5.0 dakikadır. Tanılar fluoresans detektörle emisyonu 348 nm ve eksitasyonu 470 nm'ye ayarlanarak yapılmıştır. Mobil faz olarak %96 lık metanol kullanılmıştır.

Kaynaklar

1. Bilic, N, Sieber, R. (1988): *Determination of retinol and alpha-tocopherol in raw, pasteurized and cooked milk using HPLC. Dairy Science Abstracts 1988 050-04666.*
2. Brewster, M. A. (1984): *Vitamins. In Clinical Chemistry, Theory, Analysis and Correlation. Edited by L. A. Kaplan and A. J. Pesce. Th. C. V. Mosby Company, St. Louis. USA. 656-685.*
3. Bruhn, J.C., (1990): *Vitamin A and D Additions to Low fat and Nonfat Milk. J. Dairy Science. 73, Supplement 1,96.32-101.*
4. Cochran, W.G., (1950): *Cox, G.M., Experimental Designs, John Wiley & Sons, New York, USA. pp.1-611.*
5. Collins, C. A. and Chow, C. K.(1984): *Determination of Vitamin A and Vitamin A Acetate by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. J. Chromatography., 317, 349-354.*
6. Fallow, A., Booth, R. F. G., Bell, L. D., (1993): *Applications of HPLC in Biochemistry. In Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Ed by R. H. Burdon, P. H. van Knippenberg, Elsevier, New York. USA . 17:270-293.*
7. Grace, M. L., Bernhard, R. A., (1984): *Measuring Vitamins A and D in Milk. J. Dairy Science. 1984, 67: 8, 1646-1654.*
8. Henshen, A., Hupe, K-P., Lottspeich, F., Voelter, W. (1985):*High Performance Liquid Chromatography in Biochemistry. VCH Publishers, 303 N.W. 12 th Avenue, Deerfield Beach, FL, USA p. 536-565.*
9. Bonfanti, R. and Schüep, W. (1991): *Simultaneous Determination of Retinol, Tocopherols, Carotenes and Lycopene in Plasma by Means of High Performance Liquid Chromatography on Reversed Phase. J. Vit. Nutr. Int. 61, 232-238.*
10. McGee, T. S., Bruhn, J. C. (1989) : *Observations on the Variability of Vitamin A and D Concentrations in Fortified Milk from three California Plants . [Abstract]. Dairy Science Abstracts 1990 052-02324*
11. McNeill, J., Hincks, M., Kakuda, Y.(1990): *Effect of Sample Size and Concentration on High Performance Liquid Chromatographic Determination of Vitamin A in skim milk powder. J. Dairy Sci. 73, 1690-1693.*
12. Miller K. W., Looer N. A., Yang C. S. (1984): *Simultaneous Determination of Plasma Retinol, α -Tocopherol, Lycopene, α -Carotene, and β -Carotene by High- Performance Liquid Chromatography. Analytical Biochemistry 138: 340-345.*
13. Miller K. W., Yang C. S.(1985): *An Isocratic High- Performance Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Analysis of Plasma Retinol, α -Tocopherol, and Various Carotenoids. Analytical Biochemistry, 145: 21-26.*

14. Papadoyannis, I. H., (1990): *HPLC in the Analysis of Vitamins. Chromatographic Science, HPLC in Clinical Chemistry. CRC Press. USA. Vol 54. 441-477.*
15. Renterghem, R-van., Vilder, J.-de.,(1984): *Determination of Retinol (Vitamin A) in Dry-Mixing Fortified Dried Skim Milk with HPLC: Sources of Variation. Dairy Science Abstracts 1984 046-05631*
16. Reynolds, S. L. Judd, H. J. (1984): *Rapid Procedure for the Determination of Vitamin A and D in Fortified Skimmed Milk Powder Using High Performance Liquid Chromatography. Analyst. 109: 489-492.*
17. Rizzolo A., Polesello S.(1992) : *Review: Chromatographic Determination of Vitamins in Foods. J. Chromatography, 624: 103-152.*
18. Sweeney, M. A., Ashoor, S. H. (1989): *Fortification of Cottage with Vitamin A and C. J. Dairy Science. 72:3,587-590.*
19. Tekinşen, O. C., Yalçın, S .,(1988): *Süt ve Ürünleri. Vitaminler Selçuk Üniversitesi Yayınları no:46,1-38.*
20. Vergote, S. (1990) :*Dried skimmed milk. Determination of vitamin A content (Colorimetric and HPLC methods). Dairy Science Abstracts 1991 053-04419.*
21. Woollard, D. C., Indyk, H. (1989) :*The distribution of Retinyl Esters in Milks and Milk Products. Dairy Science Abstracts. 1990. 052-01139.*