

Bazı Süt Ürünlerindeki Riboflavin Miktarlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma*

Sıddık GÖNÇ¹ Sibel AKALIN² Nayil DİNKÇİ³

Summary

A research on the determination of riboflavin in some dairy products by high performance liquid chromatography (HPLC)

In the research, riboflavin contents of pasteurized milk, dried milk, kefir and childrens' growth milk were determined by HPLC using LichroCart 125-4 RP-18 (5 µm) cartridge column, water-acetic acid : methanol (70:30 v/v) acetic acid (1,5 ml) in 1 l water mobile phase, flow rate of 0,5 ml/min and wavelength of 270 nm. The correlation coefficient (r) between concentration of riboflavin standards and area counts of their HPLC chromatograms were found to be 0.999 and the recovery rate was calculated as 98,1 %. The highest content of riboflavin was found in dried milk (15,761 ± 0,059 and 14,034±0,044) among dairy products analyzed, then followed by childrens' growth milk and pasteurized milk. The lowest content of riboflavin was determined in kefir (1,094 ± 0,031).

Keywords : riboflavin, dairy products, HPLC

Giriş

Vitaminler; organizmadaki biyokimyasal reaksiyonların hızlı ve düzenli olarak yürümesi için gerekli olan ve genelde organizma tarafından yeterli miktarda sentezlenemediğinden dışarıdan besinlerle alınması gereken organik bileşiklerdir (6).

Eksikliği durumunda yorgunluk, iştahsızlık ve duyu organlarında anormalliklere neden olan B₂ vitamininin (riboflavin) önemli bir kısmı süt ve ürünleri ile karşılanmaktadır (15). Vücuda alınan vitamin miktarının değerlendirilmesi açısından, ışık ve oksidatif değişimlere karşı duyarlı olan riboflavinin son ürünlerdeki durumu önemlidir. Özellikle son yıllarda çeşitli gıda maddelerinin vitamin

* Bu çalışma E.Ü. Araştırma Fonunca desteklenen 98 ZRF 026 no'lu projeden alınmıştır

¹ Prof.Dr. E.Ü. Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü, 35100 Bornova – İzmir

² Doç Dr. E.Ü. Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü, 35100 Bornova - İzmir
e-mail: sakalin21@yahoo.com

³ Ar.Gör. E.Ü. Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü, 35100 Bornova - İzmir

analizinde doğru, duyarlı ve hızlı bir metot olan yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) yöntemi kullanılmaktadır (1). Ülkemizdeki bazı süt ürünlerinde riboflavin miktarlarının HPLC ile tesbitine ilişkin araştırmaya rastlanmadığı için, bu çalışmada ticari pastörize sütler, çocuk büyüme sütü, süttozu örnekleri ve kefirdeki riboflavin miktarlarının HPLC ile saptanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal

Bu araştırmanın materyalini oluşturan kefir örneği E. Ü. Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü'nden, 4 farklı marka pastörize içme sütü, iki süttozu ve bir çocuk büyüme sütü örneği İzmir'deki süper marketlerden temin edilmiştir.

Riboflavin Analiz Metodu

HPLC Cihazı ve Çalışma Koşulları

Analizlerde IH-980-01 model tutucu, 7125 Rheodyne valf, 20 µl örnek hacimli enjektör, JASCO PU-980 solvent dağıtıcı sistemi, LC-900 seri no'lu JASCO model (HPLC) cihazı, Jasco UV-980 dedektör kullanılmıştır.

Pastörize süt, çocuk büyüme sütü, kefir ve süttozu örneklerinde HPLC ile riboflavin miktarı tesbitinde en uygun koşulların belirlenmesi için literatürlerde geçen farklı kolonlar, değişik mobil fazlar ve farklı dalga boyları denenmiştir. Bu amaçla Nucleosil 100-5 C18AB ve LichroCart 125-4 RP – 18 (µm) kolonlar; 25 : 75 metanol : su ve % 0,15 sodyumdioktilsülfosükinat (pH: 2,7) ve 30 : 70 metanol : su ve % 0,15 asetik asit mobil fazları ile 254, 270 ve 430 nm dalga boylarında ölçüm yapılmıştır. Ayrıca mobil fazın çeşitli akış hızları denenmiştir. En iyi sonuçlar LichroCart 125-4 RP-18 (5 µm) kartuj kolon; 30 : 70 metanol : su ve % 0,15 asetik asit mobil faz, 0,5 ml/dak. akış hızı ve 270 nm dalga boyundaki ölçümlerde alınmıştır. Standard riboflavin çözeltileri ile ekstraksiyon sonrası örnek çözeltileri alete 20µL olarak enjekte edilmiştir.

Örneklerin Analize Hazırlanması

Mobil faz hazırlamada ve örnek ekstraksiyonlarında kullanılan tüm kimyasal maddeler HPLC kalitesinde veya ticari olarak mevcut olan en yüksek saflık derecesinde olup, seyreltmelerde Elgastat Maxima-HPLC (Ebiltem, E. Ü., Bornova) cihazından alınan bidestile su kullanılmıştır. Örneklerin HPLC cihazına enjeksiyonundan önce, taze hazırlanmış riboflavin standard çözeltisi iki defa enjekte edilerek aletin kontrolü yapılmıştır. Tüm örnekler ekstraksiyon ve diğer işlemler

sırasında ışıktan korunmuş, cam tüp, şişe ve balonlar alüminyum folyo ile kaplanmıştır.

Pastörize süt örnekleri Gauch ve ark. (3) tarafından önerilen yöntemle hazırlanmıştır. Bunun için yağlı süt örneği 10 °C'da 2000 d/d'da 20 dak. santrifüjlenerek yağı ayrılmıştır. Yağsız süttten 5 ml, 25 ml'lik ölçü balonuna konmuş ve saf su ile çizgisine kadar tamamlanmıştır. Üzerine 15 mg tripsin (Merck 24579) ve 15 mg clara-diasit (Fluka 27540) ilave edilip, iyice çalkalanmış ve 40°C'lık su banyosunda 30 dak. hidrolize edilmiştir. Soğuduktan sonra ara fazın 5 ml'si Whatmann marka 1 nolu filtre kağıdından süzölmüş ve C18 Sep-Pak Cartridge'den geçirilip, HPLC'ye verilmiştir.

Çocuk büyüme sütü örnekleri ile kefir örneklerinin ekstraksiyonu ise ön denemelerde daha iyi sonuç veren şu yöntemle yapılmıştır (11): Önce pH'sı glasiyel asetik asit ile 3,2'ye ayarlanan % 10'luk (m/v) kurşun asetat çözeltisi hazırlanmıştır. 25 ml süt veya kefir örneği üzerine bu çözeltiden 2,5 ml ilave edilip, iyice karıştırılmıştır. Whatman marka 42 nolu filtre kağıdından süzölen filtrattan 10 ml alınmış ve 0,45 mikron gözenek büyüklüğü olan HVLP 04700 filtreden geçirilmiştir. Sonra riboflavin belirtme için alete enjekte edilmiştir.

Süttozu örnekleri Rashid ve Potts (12) yönteminin modifikasyonu ile ekstrakte edilmiştir. Buna göre 1 g süttozu 20 ml destile su ile manyetik karıştırıcı kullanılarak iyice çözöndürölüp, üzerine 4 ml etanol eklenerek tekrar iyice karıştırılmıştır. Bunun üzerine pH'sı glasiyel asetik asit ile 3.2'ye ayarlanan 2,5 ml % 10'luk (m/v) kurşun asetat çözeltisi eklenip iyice karıştırılmıştır. Bunu takip eden diğer işlemler çocuk büyüme sütünde olduğu gibi gerçekleştirilmiştir.

Riboflavin Standardı ile Yapılan Çalışmalar ve Miktar Hesapları

HPLC saflığında ve kalitesinde olan riboflavin standardı Sigma firmasından satın alınmıştır (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

Riboflavin stok standardı hazırlanması için 50 mg riboflavin 800 ml destile suda 1,2 ml glasiyel asetik asit ilavesiyle karıştırılmış, ultrasonik banyoda çözöndürölmüş ve 1000 ml'ye bidestile su ile tamamlanmıştır. Bu stok standard çözeltiden 0.5 mg/lt, 1.0 mg/lt, 2.5 mg/lt, 3.75 mg/lt ve 5.0 mg/lt olarak 5 değişik konsantrasyonda riboflavin çözeltileri hazırlanmış ve alete 20 µL olarak enjekte edilmiştir.

Elde edilen pik alanları dikkate alınarak miktar belirleme işlemleri yapılmış ve oluşturulan lineer regresyon eğrisi denkleminde yararlanılmıştır :

$$y = 0,000132 x + 0,00105$$

Ayrıca geri kazanım çalışması için pastörize süt örneklerinden birine iki kez belirli miktarda riboflavin içeren standard çözeltiden karıştırılmış ve HPLC analizi için örnek hazırlamada anlatıldığı gibi ekstraksiyon uygulanarak riboflavin miktarları belirlenmiş, ortalama yüzde geri kazanım oranı hesaplanmıştır.

İstatistiksel Değerlendirme

Analiz sonuçlarının istatistik değerlendirilmesinde SAS programı kullanılmıştır. Varyans analizi sonucunda önemli ($p < 0,05$) olarak belirlenen örnekler Duncan testi uygulanarak örnekler kendi aralarında kıyaslanmıştır (14).

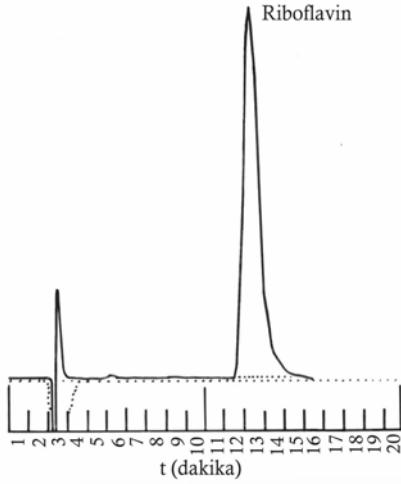
Araştırma Bulguları Ve Tartışma

Riboflavin standard çözeltisinin HPLC den elde edilen kromatogramı şekil 1’de, pastörize süte ait riboflavin kromatogramı ise şekil 2’de verilmiştir.

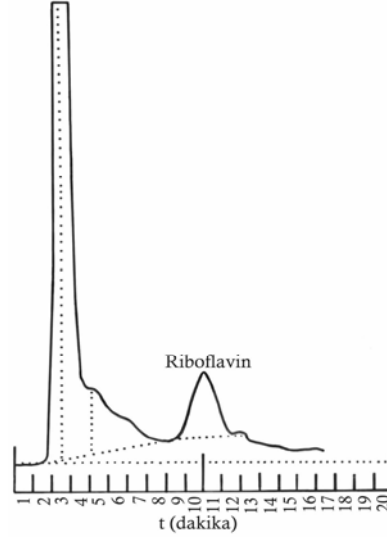
HPLC’de UV dedektörle yapılan riboflavin analizinde, hazırlanan riboflavin standard çözeltilerinin konsantrasyonları ile pik alan değerleri arasındaki korelasyon katsayısı (r), 0,999; % geri kazanım değeri de oldukça yüksek (% 98.1) bulunmuştur. Benzer HPLC çalışma koşulları ve örnek ekstraksiyonunun kullanıldığı çalışmada da korelasyon katsayısı 0,9973 ve geri kazanım değeri % $92,20 \pm 1,2$ olarak belirlenmiştir (11).

Çizelge 1’de 4 farklı marka yağlı pastörize süt örneğinde riboflavin miktarı sonuçları verilmiştir.

Buradan görüleceği gibi, pastörize sütlerin riboflavin miktarları arasındaki farklar varyans analizine göre önemli bulunmuş ve Duncan testi sonuçlarına göre en yüksek riboflavin miktarı 4 no’lu, en düşük miktarlar ise 1 ve 2 no’lu pastörize sütlerde tesbit edilmiştir.



Şekil 1. Riboflavin standart çözeltisinin kromatogramı



Şekil 2. Pastörize süt örneğinde riboflavin kromatogramı

Haddad ve Loewenstein (5) ısıtma işleminin sütteki bazı vitaminlere etkisi üzerine bir çalışmada; çiğ sütte 1,332 mg/l olarak tespit edilen riboflavin miktarının, süütün 80°C'da 16 saniye ısıtılması sonucunda 1,312 mg/l değerine, 140°C'da 3,5 saniye ısıtılması sonucunda 1,296 mg/l değerine azaldığı belirlenmiştir. Sütteki riboflavin miktarlarının HPLC'de fluorometrik yöntemle tespit edilmesi üzerine yapılan başka bir çalışmada (8) pastörize içme sütünde riboflavin içeriğinin 2,28 mg/l olduğu bulunmuştur. Russell ve Vanderslice (13) ise yağlı pastörize sütlerde 1,9±0,03 mg/l riboflavin olduğunu belirlemişlerdir.

Çizelge 1. Pastörize sütlerde ortalama riboflavin miktarları

Örnekler	Riboflavin (mg/l) ¹
1	0,955 ± 0,042 ^a
2	0,989 ± 0,036 ^a
3	1,219 ± 0,028 ^b
4	1,304 ± 0,013 ^c

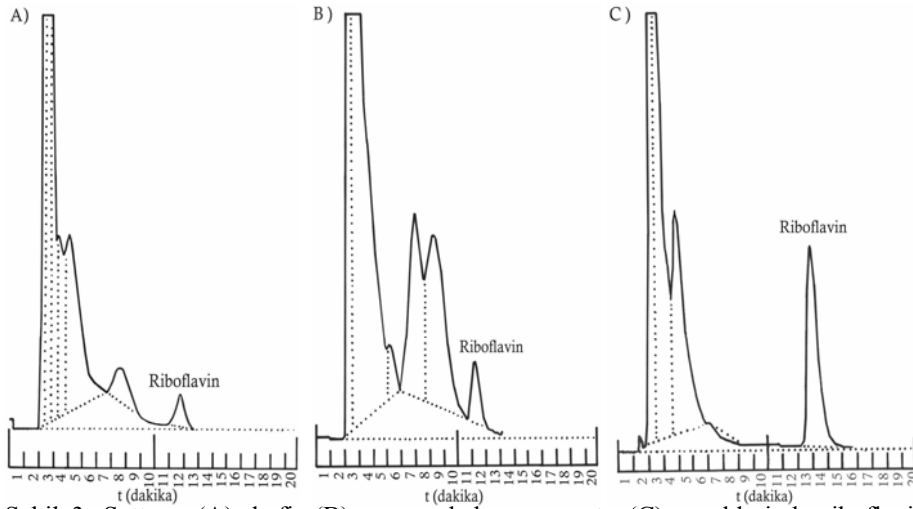
¹: Değerler üç enjeksiyon ortalaması ± standart sapmayı göstermektedir.

^{a, b, c}: Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (p<0.05).

Literatürlerde pastörize sütte riboflavin için belirlenen bu değerler bizim değerlerin ortalamasından daha yüksek bulunmuştur. Ancak Haddad ve Loewenstein'in pastörize süt için verdiği değer, bizim belirlediğimiz 4 numaralı örnekteki değerle eşdeğer ve 3 numaralı örnekteki miktara yakınlık göstermektedir. Bizdeki 1 ve 2

numaralı pastörize süt örneklerindeki değerler oldukça düşük bulunmuştur. Süt üretiminin bölgelere göre farklı oluşu, dolayısıyla sütün alındığı hayvanın cinsi, yemleme, laktasyon zamanının bu konuda etkili olduğu düşünülmüştür. Ayrıca çiğ sütün depolanma ve işleme koşullarının etkisi de göz ardı edilmemelidir.

Şekil 3'te süttozu, kefir ve çocuk büyüme sütü örneklerinden ekstrakte edilen riboflavin kromatogramları, çizelge 2'de bu örneklerde saptanan riboflavin miktarları görülmektedir



Şekil 3. Süttozu (A), kefir (B) ve çocuk büyüme sütü (C) örneklerinde riboflavin kromatogramları

Çizelge 2. Süttozu, kefir ve çocuk büyüme sütü örneklerinde riboflavin miktarları¹

Süt Tozu (mg/kg)	Kefir (mg/l)	Ç. B. Sütü (mg/l)
15,761 ± 0,059 ^a	1,094 ± 0,031 ^d	9,652 ± 0,048 ^c
14,034 ± 0,044 ^b		

¹ : Değerler üç enjeksiyon ortalaması ± standart sapmayı göstermektedir

a, b, c, d : Aynı satır ve sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (p<0,05)

Kefir örneğinde diğer örneklere göre oldukça düşük miktarda riboflavin belirlendiği, vitamin katkılı olarak üretilen çocuk büyüme sütü ve kuru madde bakımından çok zengin olan süt tozu örneklerinde ise oldukça yüksek miktarlarda riboflavin belirlendiği tesbit edilmiştir. Nitekim varyans analizi sonuçlarına göre riboflavin miktarları

bakımından ürün çeşitlerine ait ortalamalar arasındaki fark önemli bulunmuş ($p<0,05$), Duncan testi sonuçlarına göre en yüksek miktar sütte, en düşük miktar da kefirde elde edilmiştir. Ayrıca, süt tozu örneklerinin riboflavin miktarları istatistiksel olarak birbirinden farklı bulunmuştur ($p<0,05$). Kefirde daha önceki bulgularımızdan pastörize sütlere benzer miktarda riboflavin bulunduğu anlaşılmaktadır. Kneifel ve ark. (9); kefir kültürü ve kefir taneleriyle yapılan 3 farklı kefir örneğinde riboflavin miktarını ortalama $1,45 \pm 0,27$ mg/l tespit etmişlerdir. Avusturya’da inek sütünden kefir daneleriyle üretilen kefir örneklerinde sütte $1,74$ mg/kg olan riboflavin değerinin $1,51 \pm 0,18$ mg/kg’a düştüğü belirlenmiştir (10). Gliszczynska – Swiglo ve Koziolowa (4) HPLC de floresan dedektörle riboflavin türevlerinin tespit edildiği araştırmalarında kefirde $1,42 \pm 1,4$ mg/kg riboflavin bulunduğunu belirlemişlerdir. Bu sonuçlar bulgularımıza göre kefirde tespit ettiğimiz riboflavin miktarının biraz üzerindedir.

Süttozlarında riboflavin miktarları ile ilgili çalışmalarda bulunan değerlerin ise araştırma bulgularımız ile uyum içinde olduğu görülmüştür. Rashid ve Potts (12) yağsız süttozlarında fluorometre ile belirledikleri riboflavin miktarının $14,29$ mg/kg ile $15,39$ mg/kg arasında olduğunu, Ashoor ve ark. (2) HPLC de UV dedektör ile yağsız süttozlarının $15,0 \pm 0,06$ mg/kg riboflavin içerdiğini belirtmişlerdir. Bir yıl boyunca belirli bir tesiste üretilen yağlı süttozlarının toplanarak her ay vitamin analizlerinin yapıldığı bir çalışmada ortalama riboflavin miktarı $17,6 \pm 0,18$ mg/kg olarak belirlenmiştir (7). Arella ve ark. (1) ise HPLC de floresan dedektör ile 11 yağlı süttozu örneğinde riboflavin miktarını ortalama $11,3$ mg/kg olarak tespit etmiştir.

Özet

Araştırmada pastörize süt, süttozu, kefir ve çocuk büyüme sütü gibi süt mamullerinin riboflavin miktarları HPLC’de 270 nm dalga boyu, LichroCart 125-4 RP-18 ($5 \mu\text{m}$) kartuj kolon; $30 : 70$ metanol : su ve $\% 0,15$ asetik asit mobil faz ve $0,5$ ml/dak. akış hızı kullanılarak tespit edilmiştir. Riboflavin standart çözeltileri ile HPLC’den elde edilen pik alan değerleri arasındaki korelasyon katsayısının $0,999$ ve geri kazanım değerinin $\% 98,1$ olduğu hesaplanmıştır. Süt ve süt ürünlerinde riboflavin miktarı en yüksek seviyede ($15,761 \pm 0,059$ ve $14,034 \pm 0,044$) süt tozunda belirlenmiş, daha sonra bunu sırasıyla çocuk büyüme sütü ve pastörize süt örnekleri izlemiştir. En düşük riboflavin miktarı ise kefirde ($1,094 \pm 0,031$) saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: riboflavin, süt ürünleri, HPLC

Kaynaklar

1. Arella, F., Lahely, S., Bourguignon, J.B., Hasselmann, C. 1996. Liquid Chromatographic Determination of Vitamins B₁ and B₂ in Foods. A Collaborative Study. Food Chem. 56 (1): 81-86
2. Ashoor, S.H., Seperich, G.J., Monte, W.C., Welty, J. 1983. HPLC Determination of Riboflavin in Eggs and Dairy Products. J. Food Sci. 48: 92-94.
3. Gauch, R., Luenberger, U., Muller, U. 1992. Bestimmung der wasserlöslichen Vitamine B₁, B₂, B₆ und B₁₂ in Milch durch HPLC. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 195:312-315.
4. Gliszczynska-Swiglo, A., Koziolowa, A. 2000. Chromatographic Determination of Riboflavin and its Derivatives in Food. J. Chrom. A. 881: 285-297
5. Haddad, G. S., Loewenstein, M. 1983. Effect of Several Heat Treatments and Frozen Storage on Thiamin, Riboflavin and Ascorbic Acid Content of Milk. J. Dairy Sci. 66: 1601-1606.
6. Hışıl, Y., Ötleş, S. 1989. Gıdalardaki Vitaminlerin Tayin Metodları ve Karşılaşılan Sorunlar. E.Ü. Müh. Fak. Dergisi B5 (1): 69-77.
7. Indyk, H.E., Lawrence, R., Roda, D. 1993. The Micronutrient Content of Bovine Whole Milk Powder: Influence of Pasture Feeding and Season. Food Chem. 46: 389-396.
8. Kneifel, W. 1986. Fluorimetrische HPLC-Bestimmung von Riboflavin in Milch. D. Molkerei Zeitung. 9:212-216.
9. Kneifel, W., Erhard, F. And Jaros D. 1991. Production and Utilization of some Water-soluble Vitamins by Yogurt and Yogurt-related Starter Cultures. Milchwissenschaft 46 (11): 685-689.
10. Kneifel, W., Mayer, H.K. 1991. Vitamin Profiles of Kefirs Made From Milks of Different Species. Int. J. Food Sci. Techn. 26: 423-428.
11. Munoz, A., Ortiz, R., Murcia, M.A. 1994. Determination by HPLC of Changes in riboflavin Levels in Milk and Nondairy Imitation Milk During Refrigerated Storage. Food Chem. 49: 203-206.
12. Rashid, I., Potts, D. 1980. Riboflavin Determination in Milk. J. Food Sci. 45: 744 - 745.
13. Russel, L. F., Vanderslice, J. T. 1992. Comments on the Standart Fluorometric Determination of Riboflavin in Foods and Biological Tissues. Food Chem. 43: 79-82.
14. Sas User's Guide 1989 – Basic Statistics SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA.
15. Tolonen, M. 1990. Vitamins and Minerals in Health and Nutrition, Ellis Horwood Ltd, England.