

## Enteral beslenme ürünlerindeki toplam vitamin C miktarının HPLC yöntemi ile belirlenmesi\*

### Quantitative determination of total vitamin C in enteral nutritional products by using HPLC

Pınar KAYNAR<sup>1</sup>, Meşküre CANPOLAT<sup>1</sup>, Ayşe KAVAKLI<sup>1</sup>,  
Esra Jale ÖZEROĞLU<sup>1</sup>, Serdar Alp SUBAŞI<sup>1</sup>

#### ÖZET

**Amaç:** Belli bir beslenme gereksinimi bulunan hastaların diyetlerini düzenlemek amacıyla tıbbi gözetim altında kullanılan özel olarak üretilmiş veya formüle edilmiş enteral beslenme ürünleri; suda çözünen vitaminler ile yağda çözünen vitaminleri içermektedirler. Suda çözünen vitamin grubu içinde yer alan vitamin C bir başka adıyla askorbik asit, pek çok vücut fonksiyonu için önemli bir vitamindir. Bu çalışmada, söz konusu ürünlerdeki toplam vitamin C miktarının tayinine yönelik olarak UV dedektörü (280 nm) ile kolay, spesifik, duyarlı yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) yönteminin uygulanabilirliğini tespit etmek amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Toplam 28 adet enteral beslenme ürünündeki toplam vitamin C miktarının belirlenmesi için HPLC yöntemi kullanılmıştır. Kromatografik sistem; C-18 kolon (250x4,60 mm-5µ) ve 280 nm'ye ayarlı UV dedektör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak 1 ml/dak akış hızında heksansülfonik asit sodyum tuzu içeren tampon ve metanol (98:2) kullanılmıştır. Enteral beslenme ürünlerinde belirlenen toplam vitamin C miktarı ile ürün etiketlerinde beyan edilen miktarlar arasındaki ilişki bağımsız gruplarda T-testi kullanılarak, istatistiksel yönden değerlendirilmiştir.

#### ABSTRACT

**Objective:** Enteral nutritional products intended for the dietary management of patients and require to be used under medical supervision are specially processed or formulated. These products contain water soluble and fat soluble vitamins. The vitamin C (ascorbic acid) which is one of the water soluble vitamins is a important vitamin for many body functions. The aim of this study is to determine the applicability of UV detection (280 nm) method by the simply, specific and sensitive high pressure liquid chromatography (HPLC) for quantitative estimation of total vitamin C levels in enteral nutritional products.

**Method:** HPLC method was used for quantitative determination of total vitamin C in total 28 enteral nutritional products. The chromatographic system was done on a C18 column (250x4.60 mm-5 µ) with UV detection at 280 nm. Buffer containing hexanesulphonic acid sodium salt and methanol (98:2) was used as the mobile phase at a flow rate of 1 mL/min. In statistical evaluation; the relationship between the values determined for enteral nutrition products and the values declared on the labels of the products was made according to independent samples T-Test.

\* Bu çalışma, Hacettepe Beslenme ve Diyetetik Günleri-III. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu'nda (22-25 Haziran 2011, Ankara-TÜRKİYE) poster olarak sunulmuştur.

<sup>1</sup> Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Tüketici Güvenliği ve Sağlık Etkileri Araştırma Müdürlüğü, ANKARA

İletişim / Corresponding Author : Pınar KAYNAR

THSK, Tüketici Güvenliği Lab. Daire Bşk., Merkez Tüketici Ürünleri Mik. Laboratuvarı, ANKARA

Tel : +90 312 565 52 06

E-posta / E-mail : pinar.kaynar@thsk.gov.tr

Geliş Tarihi / Received : 24.01.2012

Kabul Tarihi / Accepted : 24.08.2012

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2012.80037

Kaynar P, Canpolat M, Kavaklı A, Özeroğlu EJ, Subaşı SA. Enteral beslenme ürünlerindeki toplam vitamin C miktarının HPLC yöntemi ile belirlenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2012; 69(3): 143-8.

**Bulgular:** Enteral beslenme ürünlerindeki toplam vitamin C miktarı HPLC yöntemi ile belirlenmiş ve toplam vitamin C miktarı 3,9-52,20 mg/100 ml arasında bulunmuştur. İstatistiksel değerlendirme ile bulunan değerlerin ürün etiketlerinde beyan edilen değerlere uygunluk gösterdiği belirlenmiştir ( $p>0,05$ ). Toplam vitamin C'nin alıkonma süresi yaklaşık beş dakika olarak tespit edilmiştir. Dedeksiyon limiti (LOD) ise 0,005 mg/100 ml olarak saptanmıştır.

**Sonuç:** Enteral beslenme ürünlerindeki toplam vitamin C miktarının belirlenmesinde HPLC-UV yönteminin kullanılabilceği görülmüş ve yöntemin duyarlı olması, uygulama süresi ile kolaylığı açısından avantajlı olduğu düşünülmüştür. Ayrıca, bu ürünler için beyan edilen vitamin C miktarının doğruluğu onaylanmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Enteral beslenme, diyet formülasyon, vitamin C (askorbik asit), HPLC

**Results:** HPLC method was used for quantitative determination of total vitamin C in enteral nutritional products. The values of total vitamin C of the products ranged from 3.9 to 52.20 mg/100 ml. In the statistical evaluation, it was observed that the values determined for enteral nutrition products were similar to the values declared on the labels of the products ( $p>0.05$ ). The retention time of vitamin C was determined as ca. five min. It was also found that the detection of limit (LOD) is 0.005 mg/100 ml.

**Conclusion:** It was showed that HPLC-UV can be applied for the quantitative determination of total vitamin C levels in enteral nutritional products. This had the advantages of improved simplicity, sensitivity and shorter application times. Also, it is approved that the values of total vitamin C declared on the labels of these products are accurate.

**Key Words:** Enteral nutrition, diet formulation, vitamin C (ascorbic acid), HPLC

## GİRİŞ

Enteral beslenme ürünleri; bireyin iştahsızlık, çeşitli hastalık ve/veya ameliyat gibi nedenlerle ağız yolu ile yeterli besin alamadığı durumlarda, besin alınımını takviye etmek ve/veya tüm besin öğeleri gereksinimini karşılamak için kullanılan ürünler olarak ifade edilmektedir (1). Enteral beslenme ürünlerinin içeriğinde vücut metabolizması için gerekli olan suda çözünen vitaminler ve yağda çözünen vitaminler bulunmaktadır. C vitamini (askorbik asit) suda çözünebilen vitaminlerden olup, vücudun kendisi tarafından üretilmeyen bir vitamindir (2). Vitamin C tayinine yönelik titrimetrik, kolorimetrik, kinetik, enzimatik, spektrofotometrik ve kromatografik gibi birçok yöntem kullanılmaktadır (3-8). Spesifik, duyarlılık, uygulama süresi ve kolaylığı açısından birçok avantajlara sahip olan yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) yönteminin kullanımının günümüzde arttığı görülmektedir. HPLC yöntemi ile yapılan çalışmalarda; UV, floresans, diod dizi, elektrokimyasal, refraktif indeks, kütle ve amperometrik gibi çeşitli dedeksiyon sistemleri kullanılmaktadır (9-12).

Bu çalışmada; enteral beslenme ürünlerindeki toplam vitamin C miktarının tayininde UV dedektör kullanılan HPLC yönteminin uygulanabilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Yöntemin uygulanabilirliğini test etmek amacıyla 2009 yılında, Refik Saydam Hıfızısıhha Merkezi Başkanlığı - Tüketici Güvenliği ve Sağlık Etkileri Araştırma Müdürlüğü'ne bağlı laboratuvarlarda 28 adet enteral beslenme ürünü çalışılmıştır. Enteral beslenme ürünlerinin analizinde aşağıdaki cihaz-ekipman, standart ve kimyasaldan yararlanılmıştır.

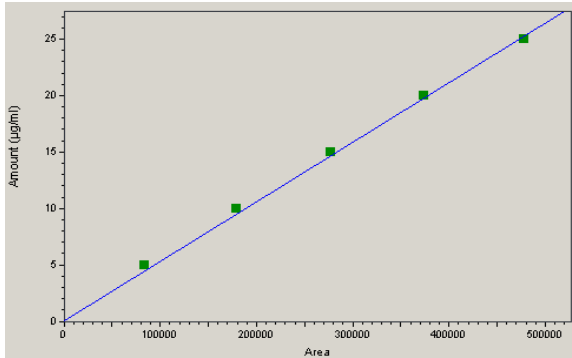
### Cihaz ve Kimyasallar

(a) **HPLC:** SpectraSystem P1000 model yüksek basınç pompası, SpectraSystem AS3000 model enjeksiyon bloğu ve SpectraSystem UV 1000 kullanılmıştır.

(b) **Analitik Kolon:** 250 x 4,60 mm-5µ boyutlarında ters faz C18 kolon (Phenomenex) kullanılmıştır.

(c) **Mobil Faz:** Akış hızı 1 ml/dak olan ve hekzansülfonik asit sodyum tuzu içeren tampon ile metanol (98:2) mobil faz olarak kullanılmıştır. Mobil faz günlük hazırlanmış ve kullanılmadan önce 0,45 µ filtreden geçirilmiştir.

(d) **Vitamin C Standart Çözeltilisi:** Vitamin C stok çözeltisi günlük olarak 0,25 mg/ml konsantrasyonda %3 metafosforik asit (Merck) içerisinde hazırlanmıştır. Stok çözeltiden asetonitril (Merck) içeren çözücü ile seyreltmek suretiyle 0,005, 0,010, 0,015, 0,020 ve 0,025 mg/ml konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi, konsantrasyona karşılık pik yüksekliği baz alınarak hazırlanmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. Vitamin C standart çözeltilerine ait kalibrasyon eğrisi

#### Örnek Hazırlanması

Toplam 28 adet enteral beslenme ürün örneğinden 0,005-0,025 mg/ml olacak şekilde tartımlar yapılmış ve son hacimlere %3 metafosforik asit ile tamamlanmıştır. Tamamlanmış çözeltiden uygun miktarlarda alınarak asetonitril içeren çözücü ilave edilmiştir. Daha sonra örnek 0,45 µ por çapındaki filtreden geçirilmiş ve filtratın 50 µl'si kolona enjekte edilmiştir. Ayrıca, dedeksiyon limiti (LOD) tayini için az olan konsantrasyonda örnek hazırlanarak kolona enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçların standart sapmasının üç katı olarak LOD değeri hesaplanmıştır.

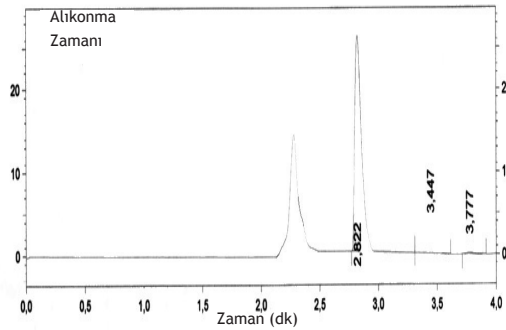
#### İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda; enteral beslenme ürünlerinin etiketlerinde beyan edilen vitamin C miktarı ile belirlenen vitamin C miktarının normal dağılıma uygunluğu kontrol edilmiş ve bağımsız gruplarda T-testine (independent samples T-test) göre etiket değeri ile saptanan miktar arasındaki fark araştırılmıştır. Bu fark,  $p < 0,05$  olduğunda anlamlı kabul edilmiştir.

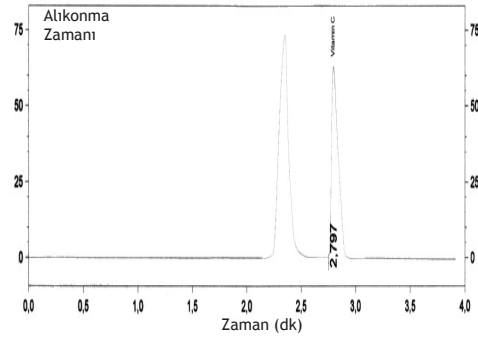
#### BULGULAR

Bu çalışmada; 28 adet enteral beslenme örneğindeki toplam vitamin C miktarı HPLC kullanılarak belirlenmiştir. Yöntemin doğrusal cevap aralığı 0,005-0,025 mg/ml olarak bulunmuştur. Vitamin C yaklaşık beş dakikalık bir elusyon süresinde analiz edilmiş ve dedeksiyon limiti (LOD) 0,005 mg/100 ml olarak saptanmıştır. Tablo 1'de 28 adet enteral beslenme ürün örneğinde saptanan toplam vitamin C miktarı ile beyan edilen etiket değerleri verilmiştir. Şekil 2 (a)'da vitamin C standart çözeltisi kromatogramı ve (b)'de enteral beslenme ürün örneğine (E19) ait vitamin C kromatogramı gösterilmiştir. Enteral beslenme ürünlerinin etiket değeri ile saptanan miktar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmadığı tespit edilmiştir ( $p > 0,05$ ).

0,005-0,025 mg/ml standart konsantrasyon aralığı için pik yüksekliği ile konsantrasyon arasındaki korelasyon katsayısı  $r = 0,999$  olarak saptanmıştır ( $n = 5$ ) (Şekil 1). Enteral beslenme ürün örneklerindeki toplam vitamin C miktarının 3,9-52,20 mg/100 ml arasında olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen değerlerin, ürün etiketlerindeki değerlere uygunluk gösterdikleri belirlenmiştir (Tablo 1). Çalışmamızda, bağımsız gruplarda T-testine (independent samples T-test) göre enteral beslenme ürünlerindeki etiket değeri ile saptanan miktar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmadığı tespit edilmiştir ( $p > 0,05$ ).



Şekil 2 (a). Vitamin C standart çözeltisi kromatogramı



Şekil 2 (b). Enteral beslenme ürününe ait (E19) vitamin C kromatogramı

Tablo 1. Enteral beslenme ürünlerinde saptanan toplam vitamin C miktarı ile etiket değerleri (mg/100 ml).

Enteral Beslenme Ürünün Kodu	Saptanan Değer	Etiket Değeri
E1	30,22	30,00
E2	18,01	18,00
E3	16,44	17,00
E4	7,38	7,00
E5	3,90	3,80
E6	18,80	18,00
E7	7,75	7,00
E8	8,12	8,00
E9	15,45	15,00
E10	6,89	6,70
E11	15,22	15,00
E12	12,00	12,00
E13	12,87	12,00
E14	5,14	5,00
E15	43,82	43,00
E16	5,39	5,00
E17	10,02	10,00
E18	12,80	11,00
E19	9,34	9,10
E20	4,98	5,00
E21	52,00	50,00
E22	5,59	5,00
E23	13,40	12,00
E24	16,12	15,00
E25	14,06	13,00
E26	19,11	18,80
E27	15,25	15,00
E28	4,00	4,60

## TARTIŞMA

Enteral beslenme ürünlerindeki toplam vitamin C miktarı yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) kullanılarak tespit edilmiştir. Bu ürünlerdeki toplam vitamin C miktarı 3,9-52,20 mg/100 ml arasında bulunmuş ve bulunan değerlerin ürün etiketlerinde beyan edilen değerlere uygunluk gösterdikleri belirlenmiştir. Kaynar ve ark. (13) söz konusu ürünlerdeki vitamin B2 miktarının belirlenmesi için HPLC kullanmışlardır. Friel ve ark. (14) ise enteral ve parenteral beslenme alan prematüre bebeklerde vitamin C, riboflavin, tiyamin ve piridoksin vitaminlerin durumlarını belirlemek için yaptıkları çalışmada; kolorimetrik ölçüm yanında yüksek basınçlı sıvı kromatografisinden yararlanmışlardır. Yapılan başka bir çalışmada da meyve suları, meyve-sebze püreleri ve bebek mamalarındaki toplam vitamin C miktarının belirlenmesi için HPLC-UV kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda, elde edilen vitamin C miktarının beyan edilen değerlere oldukça yakın olduğu saptanmıştır (15). Bebek mamalarındaki askorbik asit ve dehidroaskorbik asitin belirlenmesi için yapılan bir çalışmada da yüksek basınçlı sıvı kromatografi yöntemi kullanılmıştır. İncelenen bu ürünlerdeki toplam vitamin C miktarının etiketleri üzerinde beyan edilen değerlerden daha yüksek olduğu bulunmuştur (16). Fontannaz ve ark. (17) zenginleştirilmiş gıda ürünleri, premiks ve duomikslerdeki toplam askorbik asit (AA) miktarı için HPLC-UV yöntemini

geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemin bu tipteki farklı gıda ürünlerindeki askorbik asit (vitamin C) miktarını belirlemek için uygulanabileceğini ve zenginleştirilmiş gıda ürünlerindeki iso askorbik asit varlığının kontrolü için tavsiye edilebileceğini belirtmişlerdir. Çeşitli meyvelerdeki askorbik asidin belirlenmesi için de HPLC-UV yöntemi kullanılmış ve bu yöntemin kolay ve ucuz olmasından dolayı seçilebileceği ifade edilmiştir (18). Sanchez ve ark. (19) ise yeşil bezelyelerdeki (*Phaseolus vulgaris* L.) vitamin C'nin belirlenmesi için spektrofotometri yöntemi ile HPLC-UV kromatografik yöntemi karşılaştırmışlar ve HPLC-UV'nin daha uygun bir yöntem olduğunu belirlemişlerdir. Vinci ve ark. (20)'da farklı egzotik meyvelerdeki askorbik asit

seviyelerini HPLC metot ile belirlemişler ve 20-90 mg/100g arasında yüksek seviyede askorbik asit içerdiklerini tespit etmişlerdir.

Çalışmamızın sonucunda; enteral beslenme ürünlerindeki toplam vitamin C miktarının belirlenmesi amacıyla HPLC-UV kullanılabileceği tespit edilmiştir. Bu metodun; duyarlılığı, uygulama süresi ve kolaylığı açısından avantajlı bir yöntem olduğu görülmüştür. Ayrıca, enteral beslenme ürünlerinin üzerinde beyan edilen vitamin C miktarının doğruluğu onaylanmış ve bu ürünlerle beslenen bireylerin günlük vitamin C alımı açısından sorun veya komplikasyon yaşamayacakları düşünülmüştür.

## KAYNAKLAR

1. Arslan P. Enteral beslenme ürünleri. In: Sağlık Bakanlığı. Gıda Denetçi Eğitim Materyali. 1. Basım. Ankara: Aydoğdu Ofset Baskı, 1998: 515-6.
2. Özden H, Çelik C. Vitamin C'nin metabolik ve klinik önemi, yeni yaklaşımlar. T Klin Tıp Bilimleri, 1993; 13: 200-10.
3. Okiei W, Ogunlesi M, Azeez L, Obakachi V, Osunsanmi M, Nkenckor G. The voltammetric and titrimetric determination of ascorbic acid levels in tropical fruit samples. Int J Electrochem Sci, 2009; 4: 276-87.
4. Sultan SM, Abdennabi AM, Suliman FE. Flow injection colorimetric method for the assay of vitamin C in drug formulations using tris, 1-10-phenanthroline-iron (III) complex as an oxidant in sulfuric acid media. Talanta, 1994; 41 (1): 125-30.
5. Sultan SM, Walmsley AD. Simultaneous kinetic method for the determination of vitamin C, citrate and oxalate employing the kalman filter. Analyst, 1997; 122: 1601-4.
6. Danielczuk J, Pietrzykowski R, Zieliński W. Comparative study of the enzymatic method for determination of vitamin C with routine methods according to ISO. Pol J Food Nutr Sci, 2004; 13/54 (1): 41-6.
7. Bajaj KL, Kaur G. Spectrophotometric determination of L-ascorbic acid in vegetables and fruits. Analyst, 1981; 106: 117-20.
8. Hernanz A. High-performance liquid chromatographic determination of ascorbic acid in serum using paired-ion chromatography and UV spectrophotometric detection. J Clin Chem Clin Biochem, 1988; 26 (7): 459-61.
9. Ertaş E. Yüksek basınçlı sıvı kromatografi tekniği uygulamaları eğitim notları. Gebze: TÜBİTAK MAM Gıda Bilimi ve Teknolojisi Araştırma Enstitüsü. 2004; 1-34.
10. Speek AJ, Schrijver J, Schreurs WHP. Fluorometric determination of total vitamin C in whole blood by high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization. J Chromatogr B, 1984; 305 (1): 53-60.
11. Heudi O, Kilinc T, Fontannaz P. Separation of water-soluble vitamins by reversed-phase high performance liquid chromatography with ultraviolet detection: application to polyvitaminated premixes. J Chromatogr A, 2005; 1070 (1-2): 49-56.
12. Gazdik Z, Zitka O, Petrlova J, Adam V, Zehnalek J, Horna A, et al. Determination of vitamin C (ascorbic acid) using high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. Sensors, 2008; 8: 7097-112.

13. Kaynar P, Canbolat M, Bingöl M, Polat A. Enteral beslenme ürünlerindeki vitamin B<sub>2</sub> miktarının HPLC ile belirlenmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2007; 64 (3): 5-9.
14. Friel JK, Bessie JC, Belkhole SL, Edgecombe C, Steele-Rodway M, Downton G, et al. Thiamine, riboflavin, pyridoxine and vitamin C status in premature infants receiving parenteral and enteral nutrition. *J Pediatr Gastr and Nutr*, 2001; 33: 64-9.
15. Gökmen V, Acar J. HPLC ile gıdalardaki toplam vitamin C miktarının saptanması. *Gıda San Derg*, 1995; 39: 19-20.
16. Behrens WA, Madere R. Ascorbic and dehydroascorbic acid content of infant formula. *J Food Compos and Anal*, 1989; 2 (1): 48-52.
17. Fontannaz P, Kiliç T, Heudi O. HPLC-UV determination of total vitamin C in a wide range of fortified food products. *Food Chem*, 2006; 94 (4): 626-31.
18. Odriozola-Serrano I, Hernández-Jover T, Martín-Belloso O. Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food Chem*, 2007; 105 (3): 1151-8.
19. Sanchez-Mata FC, Camara-Hurtado M, Diez-Marques C, Torija-Isasa ME. Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Eur Food Res Techn*, 2000; 210 (3): 220-5.
20. Vinci G, Botrè F, Mele G, Ruggieri G. Ascorbic acid in exotic fruits: a liquid chromatographic investigation. *Food Chem*, 1995; 53: 211-4.