

KAPSAİSİNİN DANSİL TÜREVİ HALİNDE FLUORODANSİTOMETRİK YÖNTEM İLE MİKTAR TAYİNİ

FLUORODENSITOMETRIC DETERMINATION OF CAPSAICIN AS ITS DANSYL DERIVATIVE

Lale ERSOY *

SUMMARY

A fluorodensitometric method was developed for the determination of capsaicin by means of the derivative formed with dansyl chloride. The reaction proceeded quantitatively at room temperature in 20 min and in acetone- Na_2CO_3 (3:1) system when the molar ratio of reagent to capsaicin was 8. After TLC separation of reaction product on silica-gel plate the fluorescence intensity of the derivative was measured at 525 nm, using 366 nm excitation filter. The fluorescence intensity is linear over the concentration range of 5-500 ng capsaicin/spot.

The proposed method was applied to determination of capsaicin in capsicum fructus. The range of recovery from Capsicum fructus is 98.8-100.6 %

ÖZET

Kapsaisinin miktar tayini için dansil klorür ile oluşturduğu türevden yararlanılarak fluorodansitometrik bir yöntem geliştirildi. Reaksiyon oda sıcaklığında, 20 dakikada, aseton- Na_2CO_3 (3:1) sisteminde ve belirtecin kapsaisine mol oranının 8 olması halinde kantitatif olarak yürümektedir. Reaksiyon ürününün silikajel plakta kromatografiye edilmesinden sonra türev ait lekenin floresans şiddeti 5-500 ng kapsaisin/leke konsantrasyon aralığında doğrusaldır.

Geliştirilen yöntem kapsikum meyvalarında kapsaisinin miktar tayinine uygulandı. Kapsikum meyvalarından geri kazanılabilirlik alanı 98.8-100.6 % dir.

* Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı,
Nişantaşı/İSTANBUL.

GİRİŞ

Kapsikum meyvalarındaki acı lezzetli ve farmakolojik etkili (1) bir alkaloid alan kapsaisinin (4-OH, 3-OCH₃ -benzil -8 metilnon trans -6- enamid) miktar tayini için bugüne değin bir çok yöntem geliştirilmiştir. Kapsikum meyvalarında, farmasötik preparatlarda veya özellikle son yıllarda olmak üzere vücut sıvılarındaki kapsaisinin miktar tayini için geliştirilen bu yöntemlerden en çok kullanılanları, UV-spektrofotometri (2,3), kolorimetri (2, 4-7), gaz kromatografisi (8-12) ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisidir (13-16).

Aminlerin, aminoasitlerin, kateşolaminlerin, fosfolipidlerin ve anabolik steroidlerin analizlerinde, amin grupları ile kuvvetli fluoresans gösteren türevler oluşturan 5-dimetilamino-1-sülfonil klorür (DANS-Cl) belirtecinden yaygın bir şekilde yararlanılmaktadır (17-22).

Bu çalışmada kapsaisinin miktar tayini için bir fluorodansitometrik yöntem geliştirildi. Yöntem, DANS-Cl belirteci ile türevlendirme işleminden sonra ince tabaka kromatografisi ile ayırma ve türeve ait lekenin fluoresans şiddetinin doğrudan doğruya plak üzerinden ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

DENEYSEL BÖLÜM

Materyal ve Aletler

Dansil klorür BDH Chemicals Ltd. firmasından sağlandı. Kromatografik işlemlerde fluoresans endikatörü içermeyen Merck silica-gel (Art 5553) plakları kullanıldı. Kullanılan diğer tüm kimyasal maddeler ve çözücüler analitik saflıkta ve E. Merck, Darmstadt firmasının ürünleridir.

Kantitatif ölçmeler ZFM 4 fluoresans eki ve Camag Z-tarayıcısı ile donatılmış Zeiss PMQ II spektrofotometresi ile yapıldı. Işık kaynağı olarak 366 nm eksitasyon filtreli St 41 cıva lamba kullanıldı. Pikler bir Linear 355 stripchart yazıcısı kullanılarak ve kağıt hızı 12 cm/dak olacak şekilde kaydedildi. Eksitasyon ve emisyon spektrumları xenon arc lambalı Perkin Elmer 204 A spektrofluorometre aleti ile alındı. Çözeltilerin ince tabakaya uygulanmasında Hamilton şırıngalardan yararlandı.

Standart kapsaisin çözeltisi : 0.01 % ve 0.001 % lik, aseton
Dansil klorür çözeltisi : 0.267 % ve 0.026 % lik, aseton
ve taze
Trietanolamin çözeltisi : 20 % lik, isopropanolde hazırlandı.

Türevin Sentezi

20 mg kapsaisinin 1 ml asetondaki çözeltisine 50 mg DANS-CI ün 2 ml asetondaki çözeltisi ile 1 ml 0.1 M Na_2CO_3 çözeltisi katıldıktan sonra karışım oda sıcaklığında ve gün ışığından korunarak 20 dak. bekletildi. Aseton su banyosunda ve azot akımında uzaklaştırıldı. Sulu karışım benzen ile ekstre edildi. Benzen tabakaları birleştirildikten sonra artık, metanolden kristallendirildi. Koyu sarı renkli kristallerin $n_D^{20} = 1.488 - 1.490$ dir. Türevin silikajel plakta kloroform-metanol (100: 1) çözücü sistemindeki R_f değeri 0.55 dir.

Kapsaisin İçin Miktar Tayini Yöntemi

10 ml lik tüplere standart kapsaisin çözeltisinden 0.5-5 ml alındı ve su banyosunda çözücüsü buharlaştırıldı. Her bir tüpe 0.25 ml 0.1 M Na_2CO_3 ve 0.75 ml DANS-CI çözeltisi ilave edildikten sonra karışım oda sıcaklığında gün ışığından korunarak 20 dak. bekletildi. Aseton su banyosunda azot akımında buharlaştırıldı. Sulu karışım 3 kez 1 er ml benzen ile vorteks karıştırıcıda ekstre edildi. Birleştirilen benzen fazları 5 ml lik bir balonjerede aynı çözücü ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltilerden 5 er μl silikajel plağa uygulandı. Kromatografi işlemi kloroform-metanol (100:1) çözücü sistemi ile 10 cm yüksekliğe ulaşılan kadar ve plak gün ışığında korunarak yapıldı. Havada kurutulan plaklara trietanolamin çözeltisi püskürtüldükten sonra türeye ait lekelerin floresans şiddeti 366 nm ekstitasyon filtresi kullanılarak 525 nm de ölçüldü. Pik alanları, piklerin uniform bir transparan kağıda kopya edilmesinden sonra kesilip tartılarak değerlendirildi.

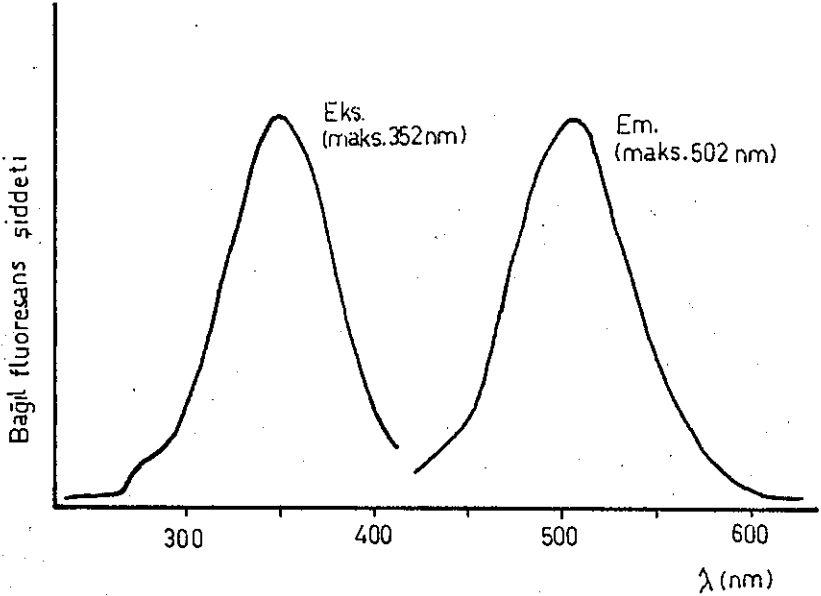
Kapsikum Meyvalarında Kapsaisin Miktar Tayini

Sapından ve tohumlarından arındırılmış, kurutulmuş ve toz edilmiş kapsikum meyvasından tartılan 250 mg örnek, geri çeviren

soğutucu altında 40 dak. kloroform ile ekstre edildi. Karışım süzülükten sonra çözücüsü vakumda distile edildi ve kalıntı ile "Kapsaisin için miktar tayini yöntemi" başlığı altında bildirildiği şekilde çalışılarak türevlendirme işlemi yapıldı. Örnek çözeltisi ve türevlendirilen standart kapsaisin çözeltileri aynı plağa uygulanarak kromatografiye edildi. Örnekteki kapsaisin miktarı aynı plaktaki standart çözeltilere ait lekelerin pik ağırlıklarından hazırlanan regresyon eşitliği yardımı ile hesaplandı.

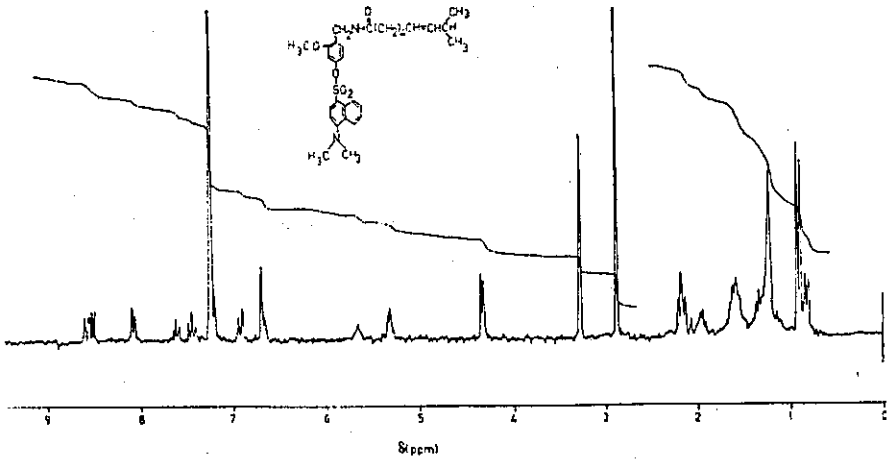
SONUÇ VE TARTIŞMA

Kapsaisin, DANS-CI belirteci ile alkali ortamda, eksitasyon maksimumu 352 nm, emisyon maksimumu 502 nm de (Şekil. 1) olan ve kuvvetli fluoresans gösteren bir türev oluşturmaktadır.

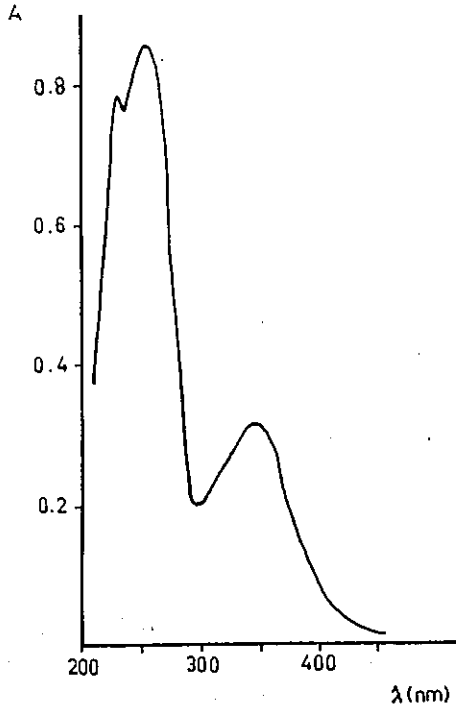


Şekil-1: Kapsaisinin dansil türevinin benzendeki fluoresans spektrumu. Eks: eksitasyon, Em: emisyon.

Türevin formülü, yüksek ayırma yetenekli kütle spektrometrisi yöntemi ile $C_{30}H_{38}N_2O_5S$ olarak saptandı (Hesaplanan M^+ 538.2657; ölçülen 538.2655). 220 Mz de alınan NMR spektrumunda ise sırasıyla aromatik (6.68-8.65 ppm), çifte bağa komşu (5.35 ve 5.65 ppm), azota komşu (4.35 ppm), metoksi (3.3 ppm) ve N-dimetil gruplarındaki (2.9



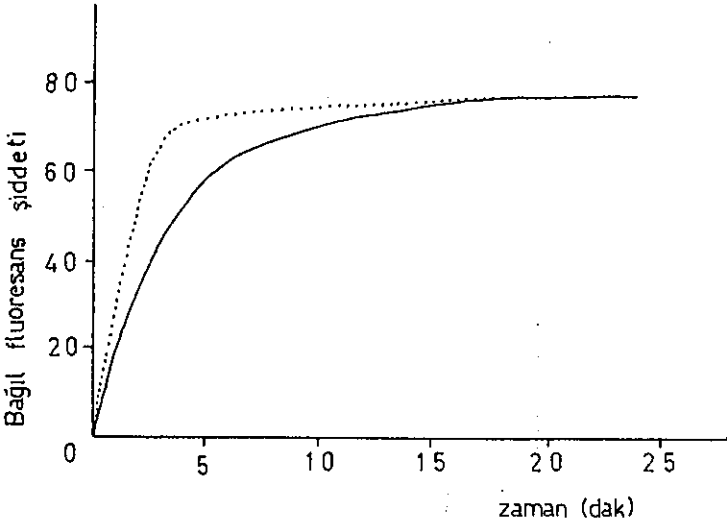
Şekil-2 : Kapsaisinın dansil türevinin dötorokloroformdaki NMR spektrumu (220 Mz)



Şekil-3: Kapsaisinın dansil türevinin UV ve görünür alandaki absorpsiyon spektrumu (metanolde).

ppm) ve yan zincirdeki diğer protonlara (0.8-2.2 ppm) ait pikler görülmektedir (Şekil. 2). Türevin metanolde alınmış absorpsiyon spektrumundaki maksimumlar 255 ve 342 nm dedir (Şekil. 3).

Kapsaisin ile DANS-CI arasındaki reaksiyonun bitiş süresini saptamak üzere oda sıcaklığında ve 45°C de çalışıldı. Reaksiyonun oda sıcaklığında 20, 45°C de ise 5 dakikada tamamlandığı görüldü (Şekil. 4). Isıtma ile reaksiyon daha kısa sürede tamamlanıyorsa da önemli bir zaman farkı olmadığından oda sıcaklığında çalışma koşulu tercih edildi.



Şekil-4: Fluorsans şiddetinin oda sıcaklığında (—) ve 45°C de (.....) zamana karşı değişimi.

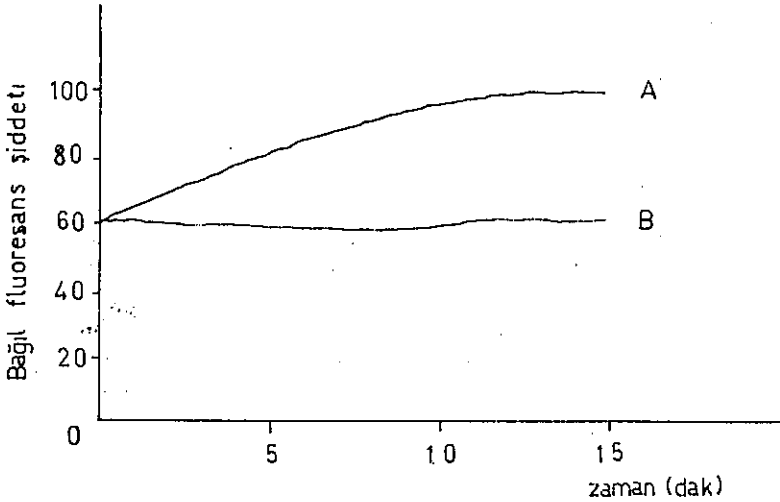
Saf madde ile çalışmada DANS-CI, mol oranı bakımından kapsaisinın 8 katı olması halinde reaksiyonun kantitatif olarak yürüdüğü saptandı. Ancak kapsikum meyvaları ile çalışırken ekstrede reaksiyon verecek başka maddeler de bulunduğundan 20 katı belirteç kullanıldı.

Sulu ortamda oluşan dansil-kapsaisinın kantitatif olarak benzen ile ekstre edilebilmesi, özellikle kapsikum meyvaları ile çalışırken yan ürünlerin çözücüye geçmemesi bakımından uygun olmaktadır.

Dansil türevlerinin floresans şiddetini arttırmak ve türevi daha dayanıklı hale getirmek amacıyla kromatografi işleminden

sonra plağa trietanolamin çözeltisi püskürtülmesi tavsiye edilmektedir (17). Bu nedenle trietanolamin çözeltisinin dansil-kapsaisin türevinin fluoresans şiddetine etkisi incelendi. Fluoresans şiddetinde önemli bir artma ve emisyon maksimumunda 15 nm lik hipsokromik bir kayma (540 nm den 525 nm ye) gözleendiği için çalışmada trietanolamin çözeltisi kullanıldı ve ölçmeler 525 nm de yapıldı.

Dansil türevleri genel olarak ışığa karşı duyarlı olduğundan (17) türevin benzen çözeltisindeki ve plak üzerindeki dayanıklılığı incelendi. 4°C de ve gün ışığından korunarak bekletilen benzen çözeltisinin 24 saat dayanıklı kaldığı görüldü. Plak üzerindeki lekelerin karanlıkta 8 saat dayanıklı olduğu, UV ışık altında bekletildiğinde ise fluoresans şiddetinin 10 dakika sürede arttığı sonra sabit kaldığı gözleendi. Trietanolamin çözeltisi püskürtüldükten sonra UV ışık altında bekletildiğinde ise UV ışının, lekenin fluoresans şiddetinde önemli bir farklılığa neden olmadığı gözleendi (Şekil. 5).



Şekil-5: UV ışının (366 nm) türeve (A) ve trietanolamin çözeltisi ile muamele edilmiş türeve (B) etkisi. Emisyon yarı aralığı A ve B için sırası ile 0.7 ve 0.2 mm dir.

Fluoresans şiddeti ile konsantrasyon arasındaki ilişki lekede 5-500 ng kapsaisine eşdeğer türev bulunması halinde doğrusaldır. Ölçü eğrisi lekedeki kapsaisin miktarı (ng) ile pik ağırlığı (mg)

arasında çizildi. 5-50 ve 50-500 ng kapsaisin miktarları için ayrı duyarlılıkta çalışıldı. İnce tabaka üzerinde saptanabilen en düşük kapsaisin miktarı 2 ng/lekedir.

Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliğinin saptanması amacı ile aynı konsantrasyondaki kapsaisin çözeltisi ile türevlendirme ve ölçme işlemleri aynı koşullarda olacak şekilde 5 kez çalışıldı. 100 ng kapsaisin/leke için bağlı standart sapma 1.82 % olarak bulundu.

Kapsikum meyvalarından geri kazanma oranının saptanması amacı ile önceden kapsaisin içermediği saptanmış kuru kapsikum meyvasına belirli miktarlarda kapsaisin (0.04-0.4 mg kapsaisin/250 mg kurumeyva) katılarak çalışıldı. 5 ayrı çalışmanın ortalama sonuçlarından hesaplanan geri kazanma oranı alanı 98.8-100.6 % ve ortalama ise 99.4 % dir (Tablo I).

Tablo-I: Kapsikum meyvasına değişik miktarlarda katılan kapsaisinin geri kazanma oranı.

Kapsaisin			
Katılan ^a	Bulunan ^{a,b}	SD	Geri Kazanma Oranı (%)
40.0	39.6	± 0.90	98.9
100.0	98.8	± 1.06	98.8
200.0	200.2	± 2.55	100.1
300.0	300.6	± 2.49	100.2
400.0	395.2	± 2.35	98.8

a: µg/250 mg kurumeyva

b: 5 çalışmanın ortalaması

Geliştirilen yöntem İnegöl, Gaziantep, Şanlıurfa ve Mustafakemalpaşa Teknik Ziraat Müdürlüklerinden sağlanan kapsikum meyvalarına uygulandı. 100 g kuru meyvadaki kapsaisin miktarları sırasıyla 172.0 mg; 133.4 mg; 128.0 mg ve 64.0 mg dir.

Literatürde kapsaisinin miktar tayini için önerilen diğer yöntemlerde genellikle güç ve zaman alıcı ayırma işlemlerine gerek duyulmaktadır. Geliştirilen bu yöntemde ise herhangi bir saf-laştırma işlemi olmaksızın, duyarlı bir şekilde ve oldukça kolay

sağlanabilir bir alet ile kapsaisin analizi mümkün olmaktadır. Yöntemin duyarlılığı özellikle son yıllarda sıklıkla uygulanan biyolojik sıvılarda kapsaisin tayinine de olanak sağlayabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Molnar, V.J.: *Arzneimittelforschung*, **15** 718 (1965)
2. Report of the Joint Committee of the Pharmaceutical Society and the Society for Analytical Chemistry: *Analyst*, **84**, 603 (1959).
3. Gonzalez, A.T., Tamirano, C.W.A.: *J. Food Sci.*, **38** 342 (1973).
4. Palacio, J.J.R. : *Journal of the A.O.A.C.*, **60**, 970 (1977).
5. Karawya, M.S., Balbaa, S. I., Girgis, A.N., Youssaf, N.Z. : *Analyst*, **92**, 581 (1967).
6. Jentzsch, K., Kubelka, W., Pock, H.: *Sci. Pharm.*, **37**, 153 (1969).
7. Tirimanna, A.S.L.: *Analyst*, **97**, 372 (1972).
8. Hartman, K.T.: *J. Food Sci.*, **35**, 543 (1970).
9. Müller-Stock, A., Joshi, R.K., Büchi, J.: *J. Chromatogr.*, **63**, 281 (1971).
10. Müller-Stock, A., Joshi, R.K., Büchi, J.: *Pharm. Acta Helv.*, **48**, 504 (1973).
11. Todd Jr., P.H., Bensinger, M.G., Biftu, T.: *J. Food Sci.*, **42**, 660 (1977).
12. Jurentisch, J.: *Sci. Pharm.*, **47**, 31 (1979).
13. Jurenitsch, J., Bingler, E., Kubelka, W.: *Planta Medica*, **36**, 54 (1979).
14. Saria, A., Lembeck, F., Skofitsch, G.: *J. Chromatogr.*, **208**, 41 (1981).
15. Games, D.E., Alcock, N.J., Greof, J.V.D., Nysson, L.M., Maarse, H., De Brauw, M.C.T.N.: *J. Chromatogr.*, **294**, 269 (1984).
16. Kawada, T., Watanabe, T., Katsura, K., Takami, H., Iwai, K.: *J. Chromatogr.*, **329**, 99 (1985).
17. Seiler N, Wiechmann M.: *Z. Anal. Chem.*, **220**, 109 (1966).
18. Engelhardt, H., Asshauer, J., Neue, U., Weigand, N.: *Anal. Chem.*, **46**, 336 (1974).
19. Grego, B., Hearn, M.T.W.: *J. Chromatogr.*, **255**, 67 (1983).
20. Schwedt, G., Bussemas, H.H. : *Z. Anal. Chem.*, **285**, 381 (1977).
21. Chen, S.S.H., Kou, A.Y., Chen, H.H.Y.: *J. Chromatogr.*, **208**, 339 (1981).
22. Williams, A.T.R., Winfield, S.A., Belloli, R.C.: *J. Chromatogr.*, **240**, 224 (1982).