

11 MAYIS 1991

## II. OTURUM

OTURUM BAŐKANI: Prof.Dr.Sevim ROLLAS M.Ü. Eczacılık Fakóltesi  
Ecz.Nagehan KÖSEOĐLU Sakarya Ecz. Odası Gen. Sek.

**Zafer BİLGİÇ**

Sinefrin için bir spektrofotometrik miktar tayini yöntemi

**Sadef ATMACA-Zafer BİLGİÇ-Münevver AÇIKKOL**

Nortriptilin Hidroklorür ve perfenaz'in Tabletlerde dördüncü türev  
UV spektrofotometrisi ile miktar tayinleri

**Münevver AÇIKKOL-Bilgehan DURGUN-Sevim ROLLAS**

Alprazolamin yüksek basınçlı sıvı kromatografik ve  
UV spektrofotometrik miktarı tayini

**Zafer BİLGİÇ-Sedat TOSUNOĞLU-Nadir BÜYÜKTİMKİN**

Siprofloksasin için iyon çifti kompleksi oluşumuna dayanan  
iki yeni spektrofotometrik miktar tayini yöntemi

**Ahmet C.EKİNCİ- Servet BÜYÜKTİMKİN**

**Sedef ATMACA-Sedat TOSUNOĞLU-Nadir BÜYÜKTİMKİN**

Türkiye'de satılan iki muz türünün yenilmesini takiben idrardaki  
5.hidroksiindol 3- Asetik asit seviyelerinin incelenmesi

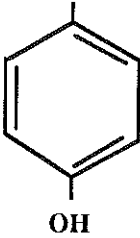
# SİNEFRİN İÇİN BİR SPEKTROFOTOMETRİK MİKTAR TAYİNİ YÖNTEMİ

\*Ecz.Zafer BILGIÇ

Sinefrin, diğer adı ile Oksedrin

(Şekil 1)

HOCHCH<sub>2</sub>NHCH<sub>3</sub>



1-(4-hidroksifenil)-2-metilaminoetanol formülüyle gösterilen adrenerjik ve vazopresör etkili bir ilaç maddesidir.

Farmakolojik yönden maddeye bakılırsa, sinefrin'in semptomimetik aminlerden,  $\alpha$ -adrenerjik reseptörleri selektif olarak direkt etkileyen bir madde olduğu görülür. Yapısı, benzen halkasındaki 3-mevkiinde-OH grubunun bulunmaması dışında adrenalin'e benzer.

Farmakolojik etki kalıbı bakımından ise fenilefrin'e ve dolayısıyla noradrenalin'e çok benzerlik gösterir.

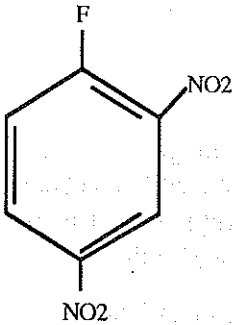
Amin azotu ile benzen halkası arasındaki mesafe, iki karbon atomu olduğu için semptomimetik etkinliği, bu mesafenin 2 karbon atomundan fazla veya az olduğu diğer ilaçlardan fazladır. Buna karşılık adrenalin'in benzen hal-

kasındaki tek hidroksili türevi olduğu için etkinliği adrenalin'e göre daha düşüktür.  $\beta$ -reseptörleri pek etkilemez ve etki süresi daha uzundur. Vazokonstriktör etkisi nedeniyle total periferik damar rezistansını belirgin bir şekilde artırarak kan basıncını yükseltir. Bu yüzden hipotaniye meyil gösteren hal-lerde, gebelikte görülen hipotansiyon'da, difteri, pnömoni, grip gibi enfeksiyon hastalıklarda görülen dolaşım bozukluklarında etken bir maddedir.

Sinefrin'in damla ve ampul şeklinde preparatları vardır. Dolayısıyla Per-os, İntramüsküler ve subkutan olarak uygulanır.

Solüsyonlarının 1g'ı 100 mg, injeksiyonluk preparatları ise ml.de 60 mg sinefrin tartarat içerir.

Maddenin farmakolojik özelliklerine kısaca değindikten sonra, çalışmanın analitik yönüne dönülürse; yapılan literatür araştırmasında maddenin biyolojik materyaller ve farmasötik preparatlarda fluorometre, GLC-HPLC ve MS ile yapılan miktar tayini yöntemleri yanında az sayıda UV-Spektrofotometrik tayi-nine de rastlanmıştır.



Bu spektrofotometrik çalışma, sinefrin'in 2,4-dinitrofluorobenzen kısaca "DNFB" ile, sulu etanollü ortamda oluşturduğu türevin absor-bansının 354 nm de ölçülmesi esasına dayanmak-tadır.

Belirteç olarak seçilen DNFB; aminler, fenol-ler, tiyoller'in de spektrofotometrik miktar tayi-ninde kullanılmaktadır.

(Şekil 2)

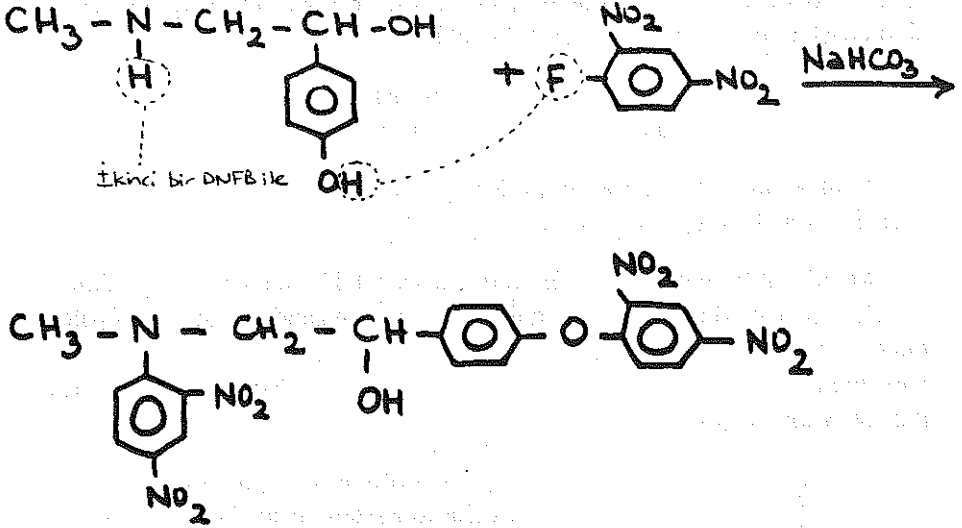
Sanger belirteci olarak da bilinen bu madde sinefrin ile sarı renkli bir türev verir.

Sinefrin ile DNFB arasındaki reaksiyon şu şekilde gerçekleşir: (Şekil 3)

Sinefrin ile DNFB arasındaki reaksiyonun optimum koşullarını saptamak amacıyla pH, temperatur ve süre, organik çözücü, belirteç aşırısının etkisi gibi parametreler ayrı ayrı incelendi.

Bu amaçla reaksiyon çeşitli pH'larda ve çeşitli organik çözücüler denene-rek yapıldı. Etanol ve metanol kullanıldığında tekrarlanabilir sonuçlar elde edildi. Etanol ucuzluğu ve toksisitesinin az olması nedeniyle tercih edildi.

Şekil 3:



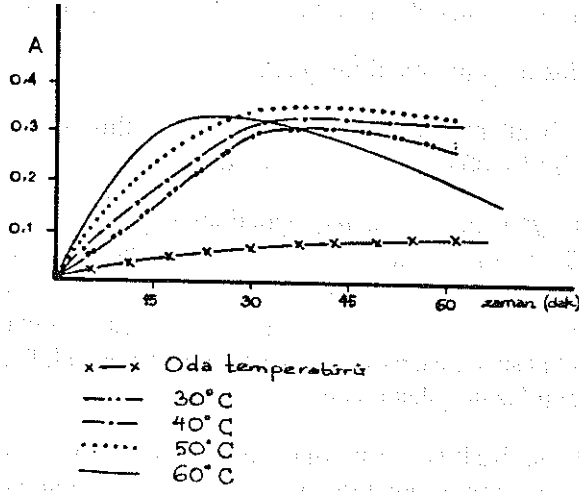
Reaksiyon çeşitli tampon çözeltiler ve NaHCO<sub>3</sub>'lü ortamda yapıldığında, NaHCO<sub>3</sub> ile en iyi sonuçlar elde edildi. NaHCO<sub>3</sub>'ün tercih edilme nedenlerinden biri de reaksiyon sırasında açığa çıkan HF'i tutmaktır. Düşük pH değerlerinde absorpsiyon okumalarının tekrarlanabilir olmadığı görüldü.

En uygun belirteç konsantrasyonu'nu saptamak amacıyla Sinefrin'in sabit bir konsantrasyondaki çözeltisi, belirtecin değişen konsantrasyonlardaki çözeltileriyle reaksiyona sokuldu. Belirteç/ sinefrin mol oranı 15 olduğunda reaksiyonun kantitatif olarak tamamlandığı saptandı. Aşırı belirteç ilavesi absorpsiyon değerlerini etkilemedi.

Renk şiddeti üzerine temperatur'ün etkisi incelendiğinde, 50°C'de 30' su banyosunda ısıtıldığında türevin kantitatif oranda oluştuğu saptandı.(Şekil 4)

Oluşan türev dayanıklı olup 24 saat boyunca +4°C'de karanlıkta bekletildiğinde absorpsiyon değerlerinde bir değişiklik gözlenmemiştir.

Türev oluşuktan sonra herhangi bir ayırma işlemine gerek yoktur. Çünkü DNFB'in alkali ortamda meydana gelecek olan hidroliz ürünlerinin interferansını önlemek için ortamda %3 HCl ihtiva eden etanol çözeltisi bulunmak(Şekil

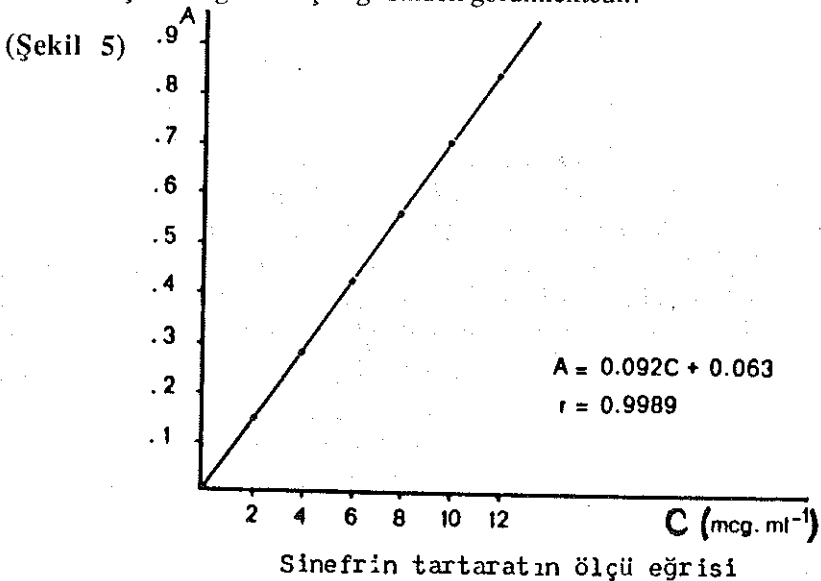


(Şekil 4)

tadır. Dolayısıyla çözeltiden direkt olarak absorbans ölçümleri yapılmıştır. Reaktanların ilave edilmiş sıralamasında değişikliğin absorbans üzerine önemli bir etkisi olmadı.

Böylece optimum reaksiyon koşulları belirlendikten sonra bu koşullarda çalışarak ölçü eğrisi hazırlandı. En küçük kareler yöntemine göre regresyon analizi yapılarak doğru denklemi hesaplandı.

2-12 mcg/ml sinefrin tartarat konsantrasyonları ile absorbanslar arasında doğrusal bir ilişki olduğu bu ölçü eğrisinden görülmektedir.



Sinefrin tartaratın ölçü eğrisi

Oluşan türevin molar absorptivitesi  $=3.4 \times 10^4$  litre. mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>,

Sandell Hassasiyeti:  $1.4 \times 10^{-2}$ mcg.cm<sup>-2</sup>

Yöntemin bağıl standard sapması n=10 olarak alındığında %0.31 olarak, geri kazanımı ise %100.05-100.10 olarak bulunmuştur.

Geliştirilen yöntem sinefrin'in preparatlarına uygulandı. Tabletlerdeki sinefrin miktarı ölçü eğrisindeki doğru denkleminde hesaplandı. Yöntem sinefrin'in preparatlarına uygulanırken, preparatlarındaki koruyucu maddelerin DNFB ile reaksiyona girerek daha yüksek absorbands değerleri vermesini önlemek için etil asetat ile ekstraksiyon yapılmıştır. Organik faz atıldıktan sonra geri kalan sulu faz ile çalışılmıştır.

Sonuç olarak, basit ve hassas olan bu yöntemin, sinefrinin tek başına ya da farmasötik preparatlarında miktar tayini için kolaylıkla uygulanabilir bir yöntem olduğu söylenebilir.

# Nortriptilin Hidroklorür ve Perfenazinin Tabletlerde Dördüncü Türev UV Spektrofotometrisi ile Miktar Tayinleri

\*Sedef ATMACA -\*\*Zafer BİLGİÇ-\*\*\*Münevver AÇIKKOL

Nortriptilin hidroklorür ve perfenazin bazı farmasötik preparatlarda birlikte bulunan, her ikisi de psikoaktif ilaç maddeleridir.

Yapılan literatür araştırmalarında bu iki maddenin yanyana tayinine ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak her iki madde için ayrı çeşitli miktar tayini yöntemleri geliştirilmiştir. Nortriptilin hidroklorür içeren tabletler, UV-spektrofotometrik, spektrofluorometrik ve yüksek performanslı sıvı kromatografik olarak analiz edilmişlerdir. Perfenazin ise çeşitli spektrofotometrik ve sıvı kromatografik yöntemlerle tayin edilmiştir.

Biz bu çalışmada, her iki maddenin -hiçbir önayırma işlemine gerek kalmaksızın- yanyana miktar tayinine olanak veren basit ve duyarlı bir analiz yöntemi geliştirmeyi amaçladık. Bunun için de günümüzde karışımların analizinde çok kullanılan "türev spektrofotometresi"nden yararlandık.

Türev spektrofotometresinde çalışma prensibi, diğer analitik spektrofotometrelerde olduğu gibi dalga boylarına karşılık absorbans ölçülmesi esasına dayanır. Bilindiği gibi UV ve görünür alanda elde edilen normal bir spektrumda absorbans, dalga boyunun bir fonksiyonudur ( $A=f(\lambda)$ ). Bu fonksiyonun her bir noktasındaki türev değeri matematik işlemlerle hesaplanabilir ( $dA/d\lambda$ ). Eğer bu türev değerleri dalga boyuna karşın grafiğe geçirilirse türev spektrumları elde edilir. Türev eğrilerinin hazırlanmasında, orjinal spektrumda-

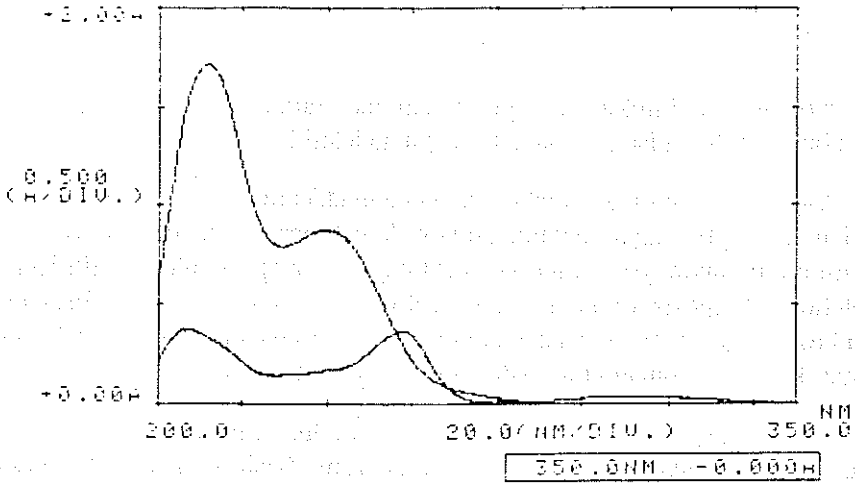
\* I.Ü. Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya A.B.D. Beyazıt -İst.

\*\* Adli Tıp Kurumu, Kimyasal Tahliller İhtisas Dairesi, C. Paşa-İst.

ki herbir noktanın türev değerinin hesaplanması gerekmektedir. Bu da oldukça güç bir işlemdir. Bu yüzden türev spektrofotometrelerinde bu işlemleri yapan bilgisayarlar vardır. Bir türev spektrofotometresinde iki monokromatör bulunur ve bunlardan çıkan, dalga boyları farklı iki ışın, örnek çözeltisinden geçer. Bu dalga boylarındaki absorbansların farklı alette okunur.

Türev spektrumu almanın en büyük avantajı, birbirine çok yakın dalga boylarında absorpsiyon yapan maddelerin, karışımları halinde iken absorpsiyon bantlarının belirgin olarak ayrılmasıdır.

Nortriptilin hidroklorür ve perfenazinin sıfırıncı dereceden absorpsiyon spektrumları incelendiğinde, her iki maddenin birbirine çok yakın dalga boylarında absorpsiyon yaptıkları görüldü (Şekil 1).

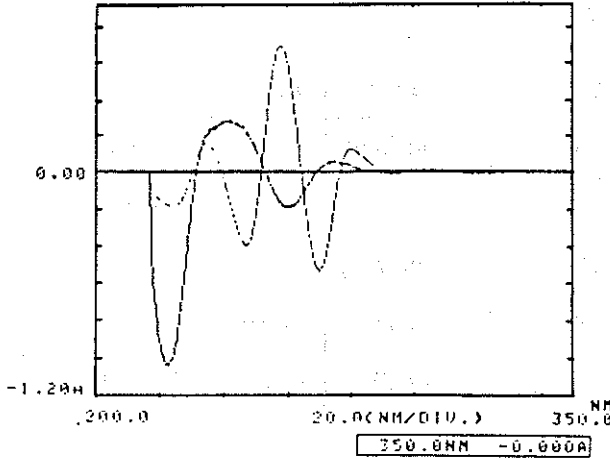


**Şekil 1-** Nortriptilin hidroklorür'ün (a) ve perfenazinin (b) sıfırıncı derece absorpsiyon spektrumları (Her birinin etanoldeki 10 mcg/ml çözeltisi).

Daha sonra maddelerin birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü türev spektrumları alındı. Değerlendirmelerimiz sonucunda analitik bir çalışma için en uygun spektrumun dördüncü türev spektrumu olduğunu saptadık. (Şekil 2). Türev absorpsiyon spektrumlarının değerlendirilmesi çeşitli şekillerde olmaktadır (pikten pike ölçüm, tanjant yönt., zero-crossing yönt.). Biz çalışmamızda uygun dalga boylarını zero-crossing yöntemi ile saptadık. Bu yöntemde, maddelerden birinin absorbansının sıfır olduğu dalga boyunda diğer maddenin türev absorbans değeri ölçülür. Ayrıca türev absorbans değerlerinin de düşük olmaması gerekir. Biz bu koşulları ancak dördüncü türev spektrumunda sağlayabildik. Perfenazinin absorbansının sıfır olduğu 239.6 nm'de nortripti-



lin hidroklorürün, nortriptilin hidroklorürün absorbensinin sıfır olduğu 268.8 nm de perfenazinin türev absorbens değerleri okundu.



**Şekil II-** Nortriptilin hidroklorür'ün (a) ve perfenazinin (b) dördüncü derece türev absorpsiyon spektrumları (Herbirinin etanoldeki 10 mcg/ml çözeltisi.)

Belirlenen dalga boylarında çalışılarak, her iki maddeye ait standard çözeltilerin türev değerleri etanole karşı okundu. Bütün ölçümler, Shimatzu UV-160 çift dalga boylu UV spektrofotometreyle yapıldı. Çalışma koşulları: Işık giriş aralığı, 3 nm; tarama hızı, 40 nm/sn; t arama alanı, 200-350 nm;  $\Delta\lambda=6.3$  nm.

Türev absorbens değerleri ile konsantrasyonlar arasında ölçü eğrisi çizildiğinde, konsantrasyon ile türev değerleri arasındaki doğrusal bağıntının nortriptilin hidroklorür için 3-25-mcg/ml, perfenazinin için 1-8 mcg/ml konsantrasyon aralığında olduğu gözlemlendi.

Doğru denklemleri:

$$\text{Nortriptilin hidroklorür: } D=0.025 C+0.06 \quad (r=0.9999)$$

$$\text{Perfenazinin: } D=0.118 C+0.02 \quad (r=0.9999)$$

(D= türev absorbens değeri; C= konsantrasyon, mcg/ml)

Nortriptilin hidroklorür ve perfenazini çeşitli oranlarda içeren sentetik karışımların analizi sonucu geri kazanım oranı, nortriptilin hidroklorür için %99.73, perfenazinin için %100.71 olarak hesaplandı. (Tablo I).

**Tablo 1: Bilinen miktarlarda nortriptilin hidroklorür ve perfenazın içeren sentetik karışımların analiz sonuçları.**

Konulan (mg)		Bulunan (mg)		Geri kazanım (mg)	
Nortriptilin	Perfenazın	Nortriptilin hidroklorür	Perfenazın	Nortriptilin hidroklorür	Perfenazın
16	2	16.27	2.03	101.74	101.65
16	4	15.57	4.01	97.32	100.31
20	4	19.69	4.13	98.48	103.21
20	8	19.96	8.04	99.81	100.57
24	8	24.14	7.89	100.62	98.68
24	12	24.09	11.98	100.38	99.89
Ortalama: 99.73				100.71	
Ortalamadan sapma: $\pm 1.59$				$\pm 1.55$	

Ölçüm çözeltilerinin dayanıklılığı incelendiğinde 24 saat boyunca türev absorbans değerlerinde bir değişiklik gözlenmedi.

Geçirttiğimiz yöntem, nortriptilin hidroklorür ve perfenazini bir arada içeren Norfen<sup>®</sup> tabletlerin analizine uygulandı. elde ettiğimiz sonuçlar, her iki madde için farmakopelerde bildirilen yöntemlerle istatistik olarak kıyaslandı. Nortriptilin hidroklorür için İngiliz Farmakopesi 1980'de bildirilen UVspektrofotometrik yöntem, perfenazın için de Amerikan Farmakopesi 1985'de bildirilen ve palladyum klorür ile renk oluşumuna dayanan spektrofotometrik yöntem kullanıldı.

Türev spektrofotometrisi ile farmakope yöntemleri, ortalamaları yönünden t-testi, presizyonları yönünden F-testi uygulanarak %95 olasılık

düzeyinde kıyaslandığında anlamlı bir farklılık görülmedi (Tablo 2).

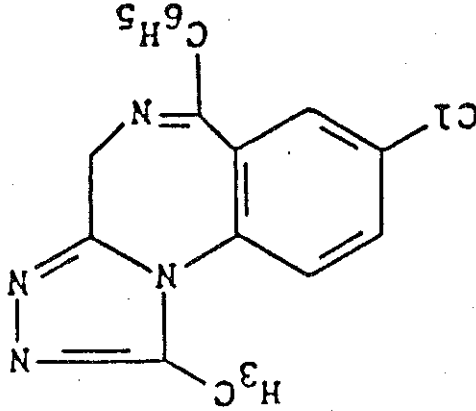
**Tablo 2: Nortriptilin hidroklorür ve perfenazin içeren tabletlerin analiz sonuçları (bir tablet 20 mg nortriptilin hidroklorür ve 4 mg perfenazin içermektedir.)**

İlaçlar	Geri Kazanım $\pm$ Standart Sapma, %	
	(n=6, p=0.05, t=2.23, F=5.05)	
	Türev spektrofotometrisi Yöntemi	Farmakope Yöntemi
Nortriptilin hidroklorür	92.92 $\pm$ 0.82	92.70 $\pm$ 1.23
	t=0.38	F=2.25
Perfenazin	94.89 $\pm$ 0.69	95.77 $\pm$ 0.44
	t=2.00	F=1.10

Geliştirdiğimiz bu yöntem, hiçbir ayırma işlemine gerek kalmaksızın nortriptilin hidroklorür ve perfenazinin birarada tayinine olanak vermektedir. Basit, duyarlı, doğruluk ve kesinlik derecesi yüksek olduğundan rutin farmasötik analizler için ve ilaçların kalite kontrol çalışmalarında kullanılabilir.

# ALPRAZOLAMIN YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİK VE UV SPEKTROFOTOMETRİK MİKTAR TAYİNİ

\* Münevver AÇIKKOL-\*\* Bilgehan Durgun BARLAS-\*\* Sevim ROLLAS



ALPRAZOLAM

8-kloro-1-metil-6-fenil-4H-[1,2,4] triazolo  
[4,3-a] [1,4] benzodiazepin.

ŞEKİL.1

\*Adli Tıp Kurumu, Kimyasal Tahkiler İhtisas Dairesi, İstanbul

\*\*M.Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, İstanbul.

Bu çalışmada, alprazolam için birisi yüksek basınçlı sıvı kromatografik ve diğeri ultraviyole spektrofotometrik olmak üzere iki yöntem geliştirildi.

Alprazolam, günlük yaşamın getirdiği sıkıntılar sonucu veya yapısal olarak ortaya çıkan ruhsal gerilim ve depresyonla seyreden psikoz durumlarında kullanılan yeni bir ilaçtır.

Araştırma sonucu elde edilen literatür bulguları da, alprazolamın trankilizan, antikonvülsan, adale gevşetici etkileri yanında diğer benzodiazepinlerde rastlanmayan antidepresan ve antipanic etkilere de sahip olduğunu göstermektedir.

Yapılan literatür araştırmasında, alprazolamın tabletlerden tayini için yalnız bir yöntem bulunduğunu ve tayinde yüksek basınçlı sıvı kromatografisinden yararlandığı görüldü.

Analizler, u-Bondapak CN tarz faz kolon, sabit akışlı 510 Model pompa, U6K Model Valf tipi injektör, değişken dalga boyulu 481 Model UV dedektör, 730 Model Data Module kaydediciden oluşan Waters marka HPLC sisteminde gerçekleştirildi. 35 Asetonitril: 65 su oranında hazırlanan karışım dakikada 0.5 ml 'lik akış hızı ile mobil faz olarak kullanıldı. Kromatografik işlem sonucu, elüatlar 0.05 a.u.f.s. hassasiyetle 254 nm'de detekte edildi.

Yüksek basınçlı sıvı kromatografik yöntem ile çalışmamızda tampon çözeltiye gereksinim olmamıştır. Bu durum, yöntemimizin, literatürde rastladığımız silika kolon ve tampon çözelti kullanılarak yapılan analiz yöntemine üstünlüğünü göstermektedir.

Çünkü silika kolonlar, bağlı faz kolonlardan daha az stabildir. Ayrıca tampon çözelti kullanıldıktan sonra, kolon içinde kristallenmeyi önlemek ve kolonun ömrünü uzatmak için kolonu yıkamak gerekmektedir. Bu da bir zaman kaybıdır.

HPLC yönteminde, alprazolam konsantrasyonları ile alprazolam ve lorazepamın pik alanı oranları arasında 1.2-12 ug/ml konsantrasyon aralığında doğrusal bir ilişki olduğu saptandı. Ölçü eğrisinin doğru denklemi  $Alpr./Lor. = 0.268C - 0.009$  ve korelasyon katsayısı  $r = 0.9998$  olarak bulundu.

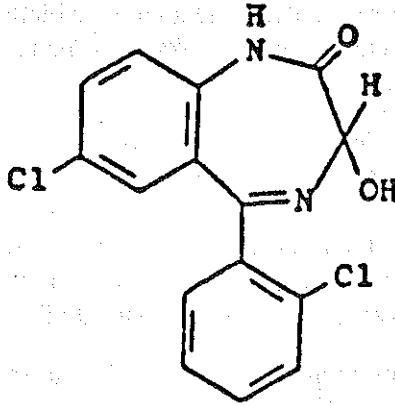
Tabletlerdeki alprazolam miktarı, ölçü eğrisinin doğru denkleminde hesaplandı.

Geliştirilen ikinci yöntem olan ultraviyole spektrofotometrik yöntem ile çalışmalarda, Shimadzu UV-160 Model spektrofotometre kullanıldı.

Bu nedenle, bulguları sunulan bu çalışmada, tampon çözelti gerektirmeyen yeni bir HPLC yöntemi ve her laboratuvar tarafından kolayca sağlanabilecek ultraviyole spektrofotometresinden yararlanarak UV spektrometrik bir yöntem geliştirilmesi amaçlandı.

Yüksek basınçlı sıvı kromatografik yöntemde, çalışma koşullarından gelebilecek hataları minimuma indirmek için bir iç standart kullanıldı. Araştırmalar sonucu en uygun iç standartın lorazepam olduğu saptandı.

ŞEKİL. 2

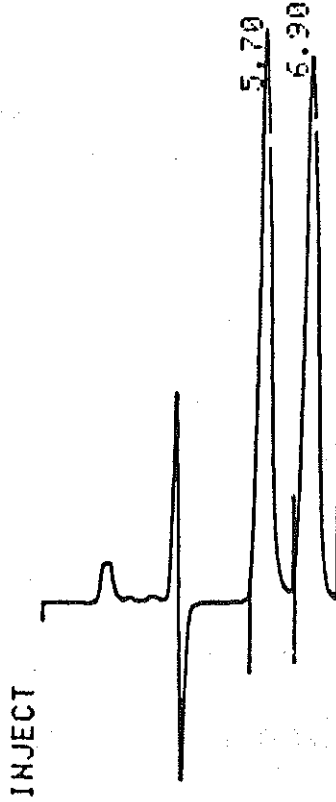


## LORAZEPAM

**7-kloro-5-(o-klorofenil)-1,3-dihidro-3-hidroksi-2H-1,4-benzodiazepin-2-on**

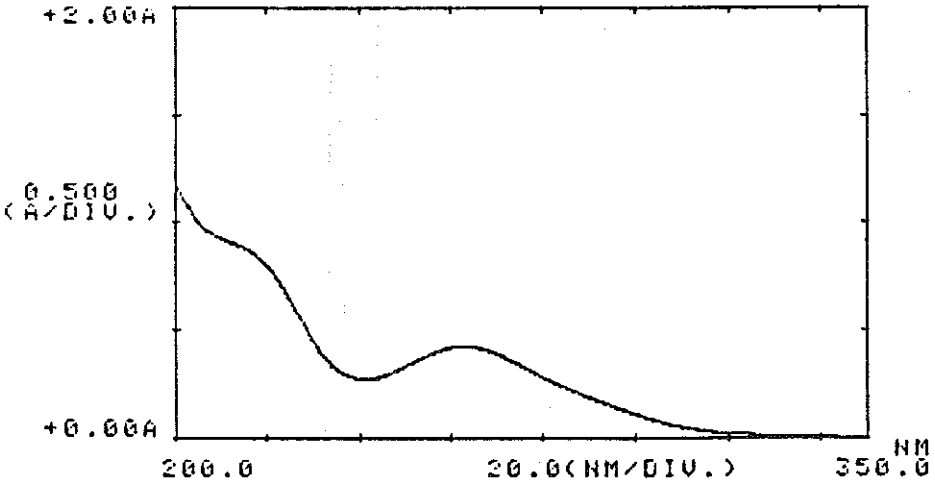
Çalışma koşullarında elde edilen kromatogramlardan biri Şekil 3'de görülmektedir. 5.7 dakikada çıkan pik lorazepam, 6.9 dakikada çıkan pik ise alprazolama aittir. Kromatogramda görüldüğü gibi, lorazepamın alprazolaminkine yakın retensiyon zamanında pik vermesi yanında, detektör cevabının alındığı lorazepam konsantrasyonunun da alprazolam konsantrasyonuna yakın olduğu belirlendi.

Şekil3. Kromatogram



Alprazolam'ın 0.1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisindeki ultraviyole spektrumu Şekil-4'de görülmektedir.

Yöntemin esası, alprazolamın 0.1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisinin 263 nm de gösterdiği absorbans değerleri ile, alprazolam konsantrasyonlarının 5-25 µg/ml konsantrasyon aralığındaki doğrusal ilişkiye dayanmaktadır. Ultraviyole spektrofotometrik yöntem ile elde edilen ölçü eğrisinin doğru denklemi  $A=0.043C-0.006$  ve korelasyon katsayısı  $r=0.9999$  olarak bulunmuştur. Her iki yöntem, alprazolam tabletlerine uygulandı. Her iki yöntemle elde edilen tayin sonuçlarına ait istatistik verileri Tablo I'de görülmektedir.



Alprazolam'ın 0.1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisindeki UV spekturumu.

ŞEKİL.4

Tayin sonuçlarının istatistik olarak kıyaslanmasında her iki yöntem arasında %95 olasılık düzeyinde, ortalamalar ve prezisyonlar yönünden anlamlı bir fark olmadığı görüldü. HPLC yönteminin duyarlık alt sınırı 10 ng, Ultraviyole yöntemininki 2 µg olarak belirlendi. Buna göre HPLC yöntemi, biyolojik sıvılardan da alprazolam tayinine olanak sağlayabilecektir. Bunun yanında UV yöntemi, HPLC yöntemi kadar duyarlı olmasa da, UV spektrofotometresi bulunan her laboratuvarında UV yöntemi ile alprazolam tayini mümkün olabilecektir.



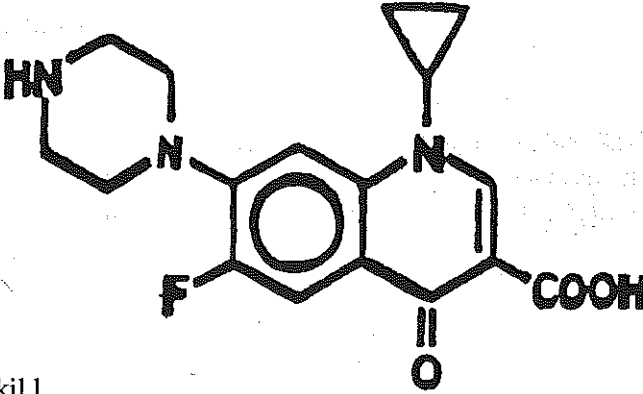
**Tablo-1. Alprazolam tabletlerine uygulanan HPLC ve UV yöntemleri ile elde edilen sonuçların istatistik olarak kıyaslanması (bir tablet 500 µg Alprazolam içermektedir.)**

	HPLC Yöntemi	UV Yöntemi
Ortalama	493	488
% Geri Kazanım	98.60	97.60
Standart Sapma	0.073	0.034
Bağıl Standart Sapma	1.49	0.69
Deney Sayısı	6	6
t testi	t=1.65	(p=0.05, t=2.23)
F testi	F=4.56	(p=0.05, F5.05)

Sonuç olarak, geliştirdiğimiz her iki yöntem de basit, duyarlı, kesinlik derecesi yüksek, kısa zamanda sonuç alınabilir yöntemler olması ve preparatlara uygulanabilirliği nedeniyle, rutin analizlerde de önerilebilir.

# SİPROFLOKSAZİN İÇİN İYON ÇİFTİ KOMPLEKSİ OLUŞUMUNA DAYANAN İKİ YENİ SPEKTROFOTOMETRİK MİKTAR TAYİNİ YÖNTEMİ

\*Zafer BİLGİÇ - \*\* Sedat TOSUNOĞLU - \*\* NADİR BÜYÜKTİMKİN



Şekil 1.

Siprofloksazin;1-siklopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-okso-7-(1-piperazinil)-3-kinolin karboksilik asid açık formülü ile gösterilen fluorokinolon türevi bir ilaç maddesidir. Fluorokinolonlar yapıca nalidiksik aside benzeyen 6-fluoro-4-kinolon karboksilik asid türevleridir.

Genelde I no'lu mevkideki N'a bağlı süstitüentleri değiştirmek suretiyle birçok fluorokinolon ilaç türü üretilmiştir (Norfloksazin, ofloksazin, pefloksa-

\*Adli Tıp Kurumu, Kimyasal Tahliller İhtisas Dairesi, Cerrahpařa, İstanbul

\*\*İ.Ü. Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Beyazıt, İstanbul

zin, amifloksazin gibi). Siprofloksazinde bunların içinde yer alır ve 7 no'lu C atomuna bağlanmış bir piperazin halkası içerir.

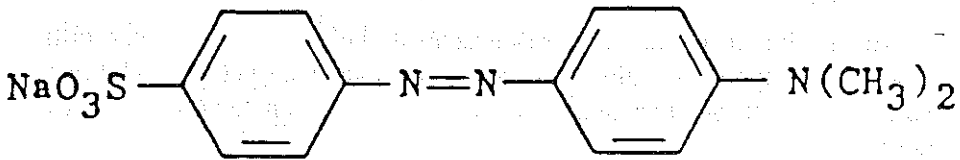
Fluorokinolonların en önemli üstünlükleri: Geniş spektrumlu, hızlı etkili, bakterisid özellikte olmalarıdır. Gram negatif basiller, penisiline rezistan olan mikroorganizmalar, gram pozitif bakterilerden stafilokoklar ve streptokoklar fluorokinolonlardan etkilenirler.

Siprofloksazin lipofilik karakterde bir bileşik olduğundan mide-barsak kanalında %60-80 oranında absorbe edilir, bu yüzden oral yol ile kullanılır. Hızlı bir absorpsiyon gösterir, alındıktan 1-3 saat sonra plasmada en yüksek düzeye ulaşır.

Siprofloksazin; alt ve üst solunum yolları enfeksiyonları, gastro-intestinal kanal, cilt ve yumuşak doku ile üriner sistem enfeksiyonlarında ayrıca osteomyelit'te kullanılır.

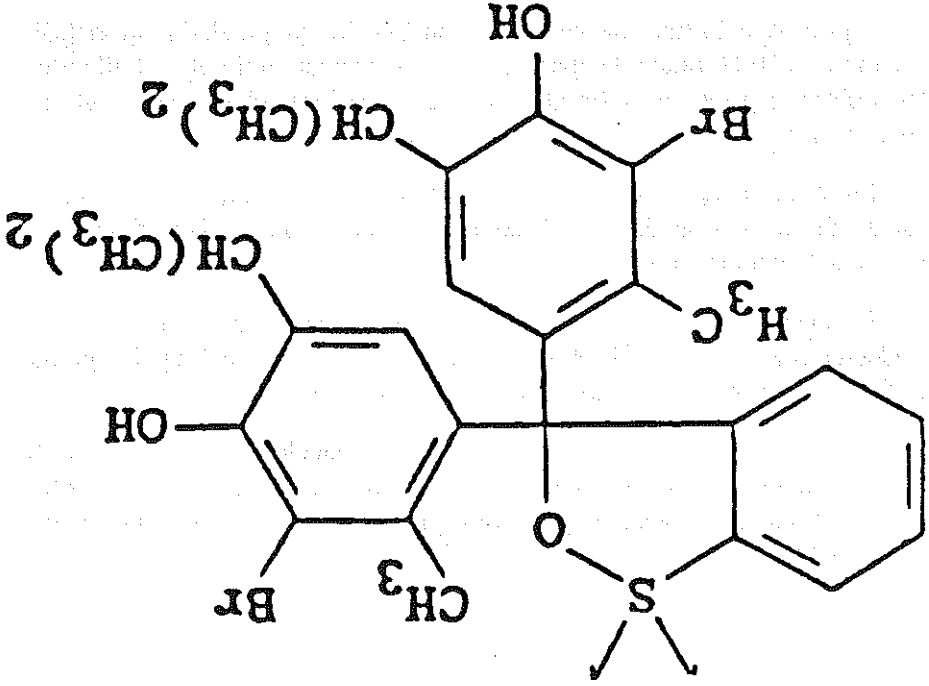
Madde analitik yönden incelenecek olursa, yapılan literatür araştırmasında maddenin biyolojik sıvılarda HPLC, farmasötik preparatlarda ise polarografik ve UV-spektrofotometrik miktar tayini yöntemleri görülmüştür.

Bu çalışmada; siprofloksazinin asidik boyar maddelerden metiloranj (MO) ve bromtimol mavisi (BTM) ile iyon çifti oluşturmasına dayanan iki spektrofotometrik miktar tayini yöntemi geliştirilmiştir. Seçilen asidik boyar maddelerden ilki metil oranjdir.



Şekil 2.

p- dimetilaminoazobenzen-sulfonik asid Na tuzu açık formülüyle gösterilen metiloranj %0.1'lik sudaki çözeltisi endikatör olarak kullanılan bir maddedir. Renk değiştirme pH alanı 3.1-4.4 arasındadır.



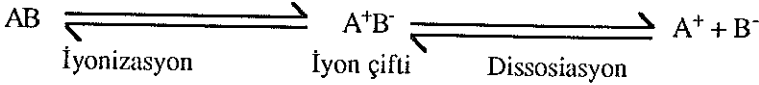
şekil 3.

Bromtimol mavisi ise 3, 3'-dibromotimolsulfonstalein açık formülü ile gösterilen bir asid-baz endikatörüdür. Bu maddenin renk değiştirme pH alanı 6.0-7.6 arasındadır.

Her iki boyar madde de siprofloksazin ile belirli bir pH da iyon çifti oluştururlar ve iyon çifti halinde sulu çözeltiden organik çözücüye geçebilirler. İyon çifti ekstraksiyonu ya da asid boyama tekniği denilen bu yöntemin esası şudur:

Protonlanmış amin veya katerner amonyum bileşikleri gibi pozitif yüklü ve küçük molekülleri bir azot bileşiği ile karşıt iyon olarak negatif yüklü ve büyük moleküllü boyar madde veya endikatör molekülleri arasında belirli bir pH da iyon çifti oluşur. Bu durumun tersi, genelde az kullanılır. Bu oluşun

iyon çifti, organik çözücü ile ekstre edilerek kolorimetrik olarak tayin edilir. İyon çifti oluşmasında bazı önemli etkenler vardır. Bunlardan ilki çözücü seçimidir. Şiyleki, bir AB maddesinin bir solventte çözünebilmesi için önce iyonlarına ayrılması, sonra bu iyonların çözücü molekülleri tarafından sanılarak solvate olması gerekir.



Sulu çözültide yukarıdaki iki olay aynı anda olur. Suyun dielektrik sabiti en büyüktür ( $D=80$ ). Bu yüzden sulu çözeltide iyon çifti oluşuktan sonra dissosiyeye olur. Oluşan iyon çiftinin dissosiyeye olmaması için dielektrik sabiti küçük olan bir çözücüde bulunması gerekir ki bu çalışmada ekstraksiyon çözücüsü olarak denenen çözücüler içinde en uygun olan diklormetan seçilmiştir. İyon çifti oluşmasında ortamın pH'sının da önemi büyüktür. Ortamın pH'sı aminin proton alabileceği ve boyanın iyonize olabileceği kadar asid olmalıdır.

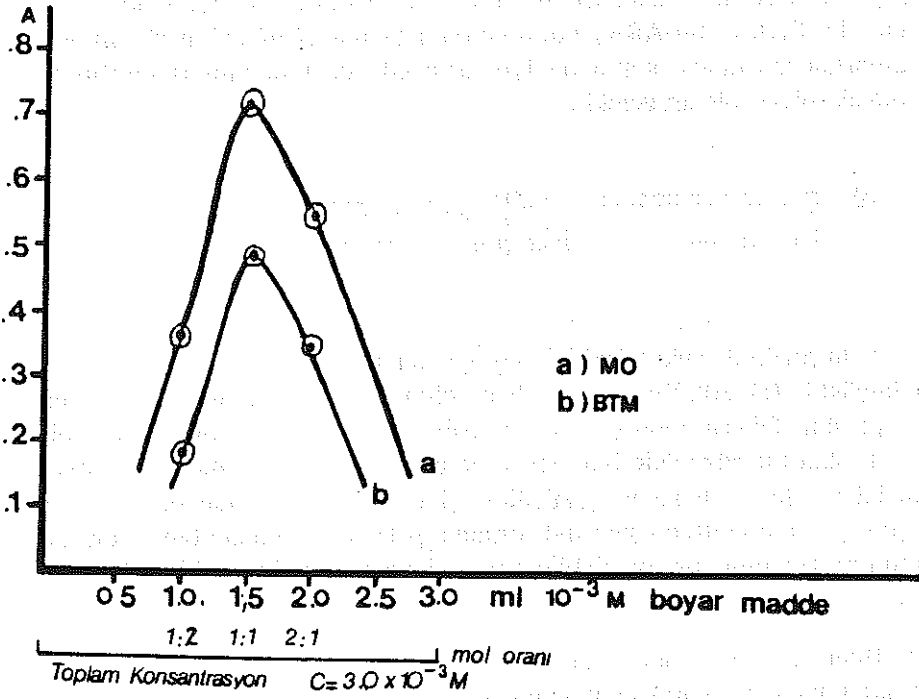
Bunun için optimum pH aralığı  $pK_b > pH > pK_a$  olarak verilmektedir. Bu pH aralığında çalışılarak en uygun pH saptanır. Bu çalışma da en uygun pH değerini saptamak için çeşitli tampon çözeltiler denenmiş sonuçta en uygun pH değeri olarak  $pH=4$  seçilmiştir. Kullanılan tampon çözelti potasyum hidrojen ftalat'dır.

En uygun boyar madde konsantrasyonu'nu saptamak amacıyla; siprofloksazinin sabit bir konsantrasyondaki çözeltisi, boyar maddelerin değişik konsantrasyonlardaki çözeltileriyle reaksiyona sokuldu. Boyar madde/siprofloksazinin mol oranı 5 olduğunda reaksiyonun kantitatif olarak tamamlandığı saptandı. Renk şiddeti üzerine temperaturün etkisi incelendiğinde ise; her iki boyar madde ile de siprofloksazinin oluşturduğu iyon çiftlerinin oda temperaturünde kantitatif oranda olduğu görüldü.

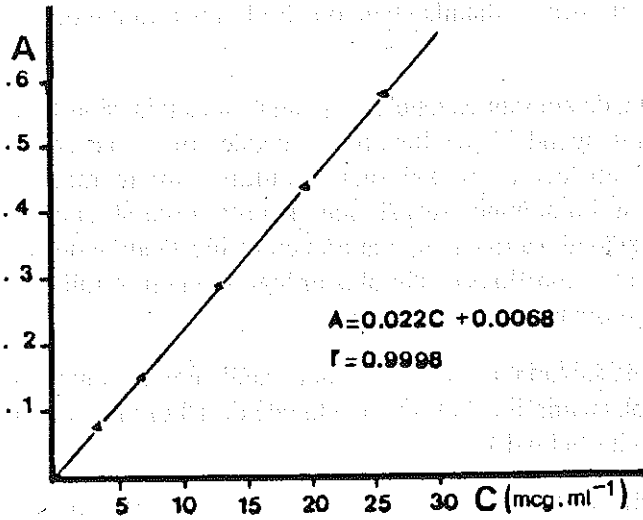
Stokiyometrik balans saptanması Job'un devamlı değişmeler yöntemine göre yapıldı ve siprofloksazinin her iki boyar maddeyle de 1:1 oranında iyon çifti oluşturduğu gözlemlendi. (Şekil 4.)

Absorbans ölçümleri, MO için 425 nm., BTM için 410 nm. de yapılmıştır. Bu şekilde optimum reaksiyon koşulları belirlendikten sonra ölçü eğrisi hazırlandı. En küçük kareler yöntemine göre regresyon analizi yapılarak doğru denklemi hesaplandı. (Şekil 5 ve 6.)

Şekil 4.

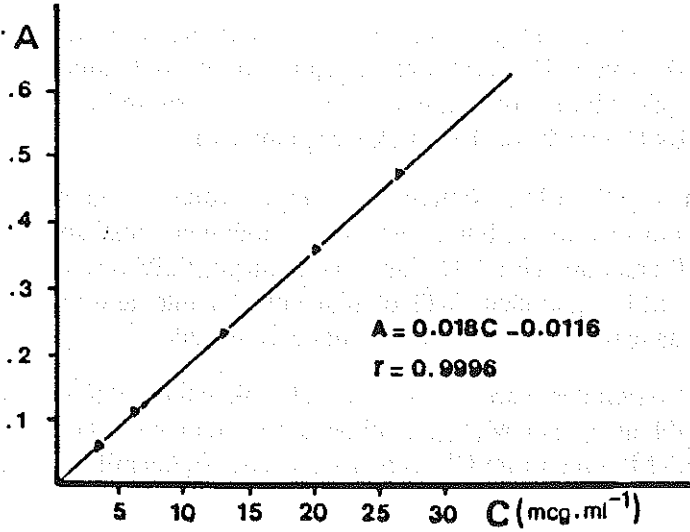


Şekil 5.



MO metodu için siprofloksazinin ölçü eğrisi (n=6)

Şekil 6. A



### BTM metodu için siprofloksazinin ölçü eğrisi (n=6)

Grafiklerde de görüldüğü gibi absorbans ve konsantrasyon arasındaki ilişki 3-25 mcg/ml siprofloksazin konsantrasyonları arasında doğrusaldır. Siprofloksazinin MO ve BTM ile oluşturduğu iyon çiftinin molar absorptivite MO yönteminde  $\epsilon = 6.25 \times 10^3 \text{ l.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , BTM yönteminde  $\epsilon = 6.45 \times 10^3 \text{ l.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , Sandell hassasiyeti ise MO yönteminde  $5.3 \times 10^{-2} \text{ mcg.cm}^{-2}$ , BTM yönteminde  $5.1 \times 10^{-2} \text{ mcg.cm}^{-2}$  olarak hesaplandı. Her iki analiz yöntemi maddenin tablet şeklindeki preparatlarına uygulanmış ve bulunan sonuçlar UV-spektrofotometrik yöntem ile kıyaslanmıştır.

Geliştirilen yöntemlerle elde edilen sonuçların t-ve F-testi kullanılarak UV spektrofotometrik yöntem ile kıyaslanması  
(Ciproxin<sup>®</sup> 250 mg/tablet)

Yöntem	Geri Kazanım (Ortalama $\pm$ standart sapma) %)	
	(n= 6,p=0.05, t=2.23,F=5.05)	
MO yöntemi	99.96 $\pm$ 0.54	t=2.52* F=2.62
BTM yöntemi	99.97 $\pm$ 0.44	t=2.09 F=3.92
UV yöntemi	100.16 $\pm$ 0.27	

\*Anlamlı fark

Tabloda da görüldüğü gibi, MO ve BTM yönteminde standart sapmalar sırasıyla 0.54 ve 0.44 olarak bulunmuştur. Kıyas yönteminde ise standart sapma 0.27 olarak bulunmuştur. % geri kazanımlar ise sırasıyla; %99.96,%99.97 ve %100.16 olarak hesaplanmıştır.

Ayrıca geliştirilen yöntemler ile kıyas yöntemi standart sapmaları yönünden incelenmiş ve buna göre; MO metodunda F testi sonucu 2.62 olarak, BTM metodunda ise 3.92 olarak bulunmuştur. %95 olasılık düzeyinde F değeri, F kritik değerinden küçük olduğu için yöntemler arasında standart sapmalar yönünden anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür.

İki seriyi ortalamaları yönünden kıyaslamak için t testini uyguladığımızda %95 olasılık düzeyinde MO yöntemi ile UV-yöntem arasında anlamlı bir fark olduğu, BTM yöntemi ile UV-yöntem arasında ise önemli bir fark olmadığı görülmüştür.

Elde edilen sonuçlar, önerilen her iki yöntemin gerek hammadde olarak ve gerekse farmasötik preparatlarda siprofloksazin miktar tayini için kolay ve hassas yöntemler olduğunu göstermektedir. Ayrıca sonuçlara ulaşabilmek için kısa bir süre gerekmektedir.



# TÜRKİYE'DE SATILAN İKİ MUZ TÜRÜNÜN YENİLMESİNİ TAKİBEN İDRARDAKİ 5-HİDROKSİİNDOL-3- ASETİK ASİT SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ

\*Ahmet C.EKİNCİ - \*\*S. BÜYÜKTİMKİN - \*\*\*S.ATMACA

\*\*\*S.TOSUNOĞLU - \*\*\*N.BÜYÜKTİMKİN

Sayın Başkan, Değerli Meslektaşlarım,

İnsan vücudundaki toplam miktarının 10 mg olduğu kabul edilen serotoninin veya diğer ismi ile 5-hidroksitriptaminin yaklaşık %90 kadarı mide ve barsak mukozasındaki enterokromaffin hücrelerinde bulunmaktadır. Kalan kısmının önemli bir bölümü ise kanda trombositlerde ve santral sinir sistemi içinde bulunur. Vücudumuzdaki serotoninin büyük kısmını sentez ederek depolayan mide-barsak mukozasının enterokromaffin hücrelerinde ayrıca P maddesi ve enkefalin gibi bazı peptitlerin olduğu ve depolandığı gösterilmiştir. Ayrıca serotonin içeren hücrelerin hücre dışından serotoninini aktif transport suretiyle alabildikleri bilinmektedir. Serotonin, hücrelerde besinler ile alınan bir aminoasid olan triptofan'dan önce 5 numaralı karbon atomunun hidroksillenmesi ve böylece oluşan 5-hidroksitriptofanın da sonradan dekarboksillenmesi ile iki basamakta meydana gelir. İlk olay triptofan hidroksilaz tarafından katalize edilir. İkinci basamak ise vücutta yaygın olarak bulunan aromatik aminoasid dekarboksilaz (DOPA dekarboksilaz) enzimi tarafından katalize edilir. Vücudumuzda triptofanın büyük kısmı protein sentezine girerken az bir kısmı niasin'e ve kinurenin'e çevrilir. Oluşan kinurenin de metabolitlerine çevrilir ve

---

Eczacılık Fakültesi, \* Farmakoloji, \*\* Farmasötik Kimya,

\*\*\* Analitik Kimya Anabilim Dalları, İstanbul Üniversitesi.

atılır.

Diğer taraftan enterokromaffin hücrelerden ve santral sinir sistemindeki serotonerjik sinir uçlarından serotoninin parsiyel ekzositoz suretiyle salıverildiği bilinmektedir.

Serotonin sitoplazmada mitokondriyel bir enzim olan MAO tarafından oksidatif deaminasyon suretiyle yıkılır. bu olay sonucu oluşan 5-hidroksiindolasetaldehidin büyük kısmı aldehid dehidrojenaz enzimi tarafından 5-hidroksiindol asetik asid'e (5-HIAA) oksitlenir ve böbreklerden idrar içinde atılır. İdrarla 24 saatte çıkarılan

5-HIAA miktarı vücutta serotonin sentez ve yıkımının bir ölçüsüdür. İşte mide-barsak mukozası, solunum yolları ve diğer bazı yerlerde bulunan ve serotonin sentez eden enterokromaffin hücrelerin tümörü olan karsinoid tümörlü hastalarda serotoninin sentezi ve serbestlenmesi de aşırı derecede artmıştır. Böyle hastalarda plazmada serotonin düzeyi ve idrarla itrah edilen 5-HIAA miktarı da fazlaşmıştır. Primer tümör, olguların çoğunda mide-barsak kanalındadır. Primer tümör karaciğerde metastaz yapmış ise veya başka bir dokuda oluştuğunda yükselme önemli olmaktadır. Serotoninin salıverilmesi periyodiktir ve tipik krizlere neden olur. Krizler sırasında yüzde ve gövdenin üst kısmında kızarma ve kan hücumu ile kan basıncında düşme ve yükselme, kolik, diyare ve bronşlarda spazm gibi belirtiler görülür. Bunlardan başka zamanla sağ kalp kapakçıklarında subendokardiyal fibrosiz meydana gelebilir. İlginç olarak Afrika'nın bazı bölgelerinde yerel beslenme özelliği nedeniyle fazla serotonin içeren muz gibi besinleri çok fazla yiyen kimselerde de aynı şekilde fibrosiz gelişmektedir. karsinoid tümörlü hastalarda görülen bu krizler esnasındaki belirtilerden biri olan diyarenin serotonin ile ilişkisi kesin olarak gösterilmiştir ve serotonin antagonistlerinden metiserjid bu diyareyi önlemektedir. Bu hastalarda vücuttaki triptofanın önemli bir kısmı tümör tarafından serotonin sentezinde kullanıldığı için serotonin yıkılınca metaboliti olan 5-HIAA'nın idrarla atılan miktarı da yüksek olmaktadır. 1960'lı yılların başlarında Afrika'nın bazı bölgelerinde halkın en önemli besin kaynağının muz olduğu topluluklarda yapılan çalışmalarla şahısların idrarla itrah ettikleri 5-HIAA miktarının 24 saatte 20-100mg olduğu saptanmıştır. Diğer taraftan Nijerya'da ve Uganda'da çok fazla muz yiyen ve dolayısıyla serotonin alan ve idrarla fazla 5-HIAA itrah eden kişilerde endomyokardiyal fibrosiz saptanmıştır. Arkadaşlarımız, Büyüktimkinlerin Amerika Birleşik Devletlerine gitmesine kadar yaptığımız çalışmamızda yurdumuzda satılan biri yerli diğeri Güney Amerika'dan, Ekvator'dan ithal edilen iki muz türünün yenmesini takiben idrardaki 5-HIAA seviyeleri araştırılmıştır. Yurdumuzda yetişen muz Turkish Musa acuminata CV "Robusta" ve ithal edilen muz ise Musa acumina-

ta Ecuador CV Cobana'dır. Bu teşhisleri yapan Doç.Dr. Kerim ALPINAR'a huzurunuzda teşekkür ederiz.

Karsinoid tümör teşhisinde önemli bir laboratuvar bulgusu, idrarla itrah edilen 5-HIAA miktarıdır. Karnisonid tümörlü hastalarda 24 saatte idrarla atılan 5-HIAA miktarı 100mg hatta çok daha yüksek değerlere çıkmaktadır. Halbuki normal olarak idrarla itrah edilen 24 saatlik 5-HIAA miktarı 3-8 mg'dır. İdrarında 5-HIAA miktar tayini yapılacak şahısların birkaç gün önceden bazı besinleri ve ilaçları almaması gerekmektedir. Örneğin; muz, ananas suyu ve konservesi yememesi ayrıca 5-HIAA miktar tayininde yanlışlığa neden olabilecek ilaçları almaması bildirilmelidir. Bu ilaçlar arasında levodopa, antidepresan ilaçlar örneğin İmipramin ve monoamin oksidaz inhibitörleri ayrıca metildopa, isoniazid, rezepin, fluorourasil, fenotiazinler, salisilatlar, asetaminofen, mefenesin ve gliseril gayakolat sayılabilir.

Çalışmamızın diğer amacı 5-HIAA miktar tayininde karşılaşılan zorlukların azaltılmasına yöneliktir. İdrarda 5-HIAA miktar tayini genellikle gaz kromatografisi, kağıt kromatografisi, kağıt kromatografisi, yüksek performans sıvı kromatografisi, ince tabaka kromatografisi, fluorometri ve spektrofotometri yöntemleri ile yapılmaktadır.

Genel olarak idrarla itrah edilen 5-HIAA'nın spektrofotometrik miktar tayini için klasik olarak 1-nitroso-2-naftol belirteci kullanılmaktadır. Fakat bu maddenin kullanılması birçok fenolik yapıdaki maddelerde reaksiyona girdiğinden tenkit edilmektedir. Goldenberg'in modifiye spektrofotometrik metodu ise daha güvenilir olmasına rağmen zaman alıcı olduğundan ve kötü kokulu reaktifler kullanılmayı gerektirdiğinden dolayı tenkit edilmektedir. Gaz likit kromatografisi ve HPLC yöntemlerinin kullanılması ise ülkemiz şartları için oldukça pahalı metodlardır ve yetişmiş elemanlara gereksinim göstermektedir.

Biz bu çalışmamızda orjinal spektrofotometrik metod ile modifiye ettiğimiz spektrofotometrik ve HPLC metodlarını kullanarak idrarda 5-HIAA miktar tayini yaptık. Orjinal spektrofotometrik metod ile 5-HIAA miktar tayini için sıvı-sıvı ekstraksiyonu uygularken modifiye spektrofotometrik medodda katı-sıvı ekstraksiyonu uyguladık.

MATERYEL ve METODLAR olarak çalışmamızda altı deneyin idrarında normal 5-HIAA miktarı tayini yapıldı. Aynı şahıslara 250 gram muz verildikten sonra 24 saatlik idrarları toplandı ve asitlendirilerek buzdolabında bekletildi.

Spektrofotometrik tayin için Beckman B spektrofotometrisi kullanıldıl HPLC sistemi olarak Model 6000 A pompası Model UGK injeksiyon sistemi

ve dalga boyları filtre ile ayarlanabilen (Waters Milford) Model ALC 202 UV absorbands dedektörü, ve Lincer marka yazıcı kullanılmıştır. Sütun olarak ters fazlı RP-18 sütunu seçilmiştir.

Çözücü sistemi olarak Draganac'ın sistemi alınmıştır.

Katı faz ekstraksiyonu için C18 Baker 10 SPE (Octadecyl C18) disposable yani bir defa kullanılıp atılan ekstraksiyon kartuşlarından yararlanılmıştır.

Spektrofotometrik olarak yapılan 5- HIAA miktar tayininde etil asetat, 1-nitroso-2-naftol, nitroz asit diklorometan kullanılmış ve oluşan rengin absorbandsı 540 nm'de ölçülmüştür.

Katı faz ekstraksiyonu yapılarak spektrofotometrik ve HPLC kullanılarak idrarda 5-HIAA miktar tayini yapılması için önce dösposable C18 ekstraksiyon sütunu önce metanol ve sonra distile su ile yıkanır.2,5 ml idrar kartuştan geçirilir. Elde edilen renksiz ya da çok açık renkli bu çözeltiden 2 ml alınır ve biraz önce anlattığım şekilde miktar tayini yöntemi uygulanır. HPLC kullanılarak yapılacak miktar tayininde ise bu çözeltiden 10 ml kromatografa injekte edilir.

Çalışmamızın sonuçlarını kısaca özetlersek:

1- İdrarında 5-HIAA miktar tayini yapılacak şahısların, yanlış sonuç çıkmasını önlemek için bu tayinden 2-3 gün önce yurdumuzda yetiştirilen veya Güney Amerika'dan ithal edilen muzları yememesi gerekmektedir.

2- İdrarda 5- HIAA'nın miktar tayini katı faz ekstraksiyonu yapılarak spektrofotometrik veya HPLC metodlarından birini kullanarak gerçekleştirilebilirse sonuçlar daha doğru ve tekrarlanabilir olmaktadır. C18 disposable kolon kullanılarak yaptığımız katı faz ekstraksiyonu basittir, doğru ve aynı zamanda tekrarlanabilir sonuçlar veren, fazla zaman gerektirmeyen ve pahalı olmayan bir usuldür. HPLC ile yapılan çalışmalarda 254 nm yerine 280 nm de ölçümler yapıldığında hassasiyet artmaktadır. Şekilde görüldüğü gibi orjinal spektrofotometrik metod ile saptanan idrardaki 5-HIAA miktarları diğer iki metoda göre biraz daha yüksek çıkmaktadır.

Teşekkür ederim.

