

## İKİNCİ TÜREV UV-SPEKTROFOTOMETRE İLE KARIŞIMLARDA OKSİTETRASİKLİN VE SÜLFAMEZATİNİN TAYİNİ

### SIMULTANEOUS DETERMINATION OF SULPHAMEZATHINE AND OXYTETRACYCLINE IN MIXTURES BY SECOND DERIVATIVE UV SPECTROPHOTOMETRY

Meral TURABİK Türker AŞAN

Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Elazığ

**ÖZET:** Oksitetrasiklin (OTC) ve sülfamezatin (SM)'i ayrı ayrı ve birlikte içeren çözeltiler türev spektrofotometresi yöntemiyle analizlendi. Asetat tamponu ile pH= 4,8 de hazırlanan çözeltilerle güvenilir sonuçlar alındı.

Saf OTC çözeltilerinde OTC miktarı 275 nm de normal spektrum absorbans değerlerinden yararlanılarak elde edilen  $Y_{275} = (-3,35 \times 10^{-2}) + (3,658 \times 10^{-2}) C_{OTC}$  regresyon denklemi veya kalibrasyon grafiği,  $Y_{262} = (-3,39 \times 10^{-2}) + (6,808 \times 10^{-2}) C_{SM}$  denklemi veya kalibrasyon grafiği yardımıyla saf SM çözeltilerinde SM miktarı 262 nm de aynı şekilde belirlenebilmektedir.

OTC ve SM'i birlikte içeren çözeltilerde ise OTC miktarı 230,5 nm de ve SM miktarı 239,5 nm'de 2° türev spektrumları kullanılarak elde edilen regresyon denkleminde  $2D_{Y230,5} = (7,63 \times 10^{-5}) + (3,02 \times 10^{-4}) C_{OTC}$  ve  $2D_{Y239,5} = (3,58 \times 10^{-5}) + (6,082 \times 10^{-4}) C_{SM}$  veya kalibrasyon grafiklerinden yararlanılarak saptanabilmektedir.

Geri kazanma deneyleri, OTC+SM karışımlarında bulunan ilaçların 20 ppm düzeyine kadar % 90'ın üzerinde bir doğrulukla tayin edilebileceğini göstermiştir.

Yöntem, herhangi bir ön işlem ya da ayırma prosesine gerek duyulmadan uygulanabilmektedir.

**ABSTRACT:** Oxytetracycline (OTC), sulphamezathine (SM) and binary mixtures can be resolved by derivative spectrophotometry. In pure aqueous solutions (pH= 4,8). OTC and SM can be determined by using normal spektrum absorbans values at 275 nm and 262 nm respectively.

OTC in binary mixtures (pH= 4,8) can be determined from the second derivative spectra at 230,5 nm and SM from the values at 239,5 nm thereby absorbance effects and the interaction between the two compounds can be eliminated.

The method does not require any separation procedure. It is suitable for samples containing up to 20 ppm OTC or SM and the recovery is 90 %.

## GİRİŞ

Tetrasiklin ve türevleri (oksitetrasiklin, klortetrasiklin, doksisisiklin vb) tıp ve veteriner hekimlikte bakteriyostatik ve antibiyotik ilaçlar olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (SALINAS ve ark. 1991). Aynı şekilde sülfonamidlerden (sülfametaksol, sülfatiazol, sülfamezatin vb) çeşitli hastalıkların tedavisinde yararlanılmaktadır.

Farmasötik preparatlarda etken madde miktarlarının belirlenmesi ve gıdalarda ilaç kalıntılarının saptanması için son yıllarda birçok yöntem geliştirilerek rutin çalışmalar için önerilmiştir (mikrobiyolojik, gaz kromatografik, HPLC vb)(MIGUEL, 1991; MUINO ve LOZANO, 1991; HEMMERLING, 1987; NEVADO ve ark. 1991; SALINAS ve ark. 1991). Bu yöntemlerin: ön işlem gerektirme, uzun zaman isteme, hassaslığın sınırlı olması ve aşırı maliyet gibi kısıtlayıcı noktaları vardır.

Türev spektrofotometrisi, ilaç karışımlarının analizinde çok yararlı bir yöntemdir. Yöntem, normal spektrumun miktar tayinine elverişli olmadığı ya da tayinin çok zor yapıldığı durumlarda uygulanabilir. Türev spektrofotometri yönteminin, spektrumları üstüste çakışan karışımları ayırma, hassaslık ve ön işlem gerektirmeme gibi avantajları bulunmaktadır (SALINAS ve ark. 1991).

Bu çalışmada, oksitetrasiklin ve sülfamezatin ayrı ayrı ve ikili karışımlarda herhangi bir ön ayırma işlemi yapmaksızın türev spektrofotometrisi yöntemiyle analizlenmiştir.

## MATERYAL VE MEOT

### Materyal

Oksitetrasiklin HCl (OTC) ve sülfamezatin (SM) Doğu İlaç Firması'ndan sağlandı. İlaçların minimum ve maksimum etken madde içerikleri firma tarafından OTC için 834,0 µg/mg ve 889,4 µg/mg,

SM için ise 980 µg/mg ve 1010 µg/mg olarak belirlenmiştir. Her iki ilacın çözeltileri, ortalama etken madde miktarı (OTC- 861,7 µg/mg, SM = 995 µg/mg) hesaplanarak hazırlandı.

Tampon çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan analitik kalitede asetik asit, sodyum asetat, sitrik asit, sodyum sitrat ve pH'nın ayarlanmasında yararlanılan HCl ile NaOH Merck Firması'ndan temin edildi.

### **Ekipman**

Çalışmada, klavye ve mikroprosesörü bulunan CITIZEN D-120 yazıcıya bağlanmış SECOMAM marka SF-0086 model, sabit slit aralıklı (2 mm) UV-Görünür Bölge Spektrofotometresi ve 1 cm'lik kuvarz küvetler kullanıldı.

### **Metot**

#### **OTC ve SM Sulu Çözeltilerinin Hazırlanması**

200 ppm etken madde içeren OTC ve SM standard stok çözeltileri saf suyla hazırlandı (her iki ilacın çözeltileri bekletildiğinde, maksimum absorpsiyon veren dalga boyunda sapma ve OTC çözeltilerinde renk değişikliği gözlemlendiğinden, stok çözeltiler her çalışma için taze olarak hazırlandı).

Optimum analiz koşullarının belirlenmesi ve değişik parametrelerin etkilerinin incelenmesi çalışmalarında, stok çözeltilerden yararlanılarak 0-40 ppm etken madde içeren çalışma çözeltileri hazırlandı.

#### **Tampon Çözeltilerin Hazırlanması**

**Asetat Tamponu:** Saf suyla hazırlanan 0,2 M asetik asit ve 0,2 M sodyum asetat çözeltilerinden farklı pH'larda asetat tamponu hazırlanmasında yararlanıldı.

**Sitrat Tamponu:** Farklı pH'larda sitrat tamponu hazırlanmasında, 0,1 M sitrik asit ve 0,1 M sodyum sitrat çözeltilerinden yararlanıldı.

#### **Çalışma Koşullarının Optimizasyonu**

**Maksimum absorpsiyon dalga boyu seçimi:** Farklı konsantrasyonlarda OTC ve SM içeren çözeltilerin 200-400 nm sınırları arasında normal spektrumları elde edilerek, her iki ilacın maksimum absorpsiyon yaptıkları dalga boyları ile bunlara karşı gelen pikler belirlendi.

**Uygun pH ve tamponun belirlenmesi:** Değişik konsantrasyonlarda ilaç içeren OTC ve SM çözeltilerinin pH'ları 0,1 M HCl veya NaOH ile pH = 1-12'ye ayarlanıp 200-400 nm arasında taranarak uygun pH aralığı belirlendi.

Asetat ve sitrik tamponlarının uygun pH aralığındaki çözeltileri ile hazırlanan OTC ve SM çalışma çözeltilerinin maksimum absorpsiyon pikleri değerleri pH'ya karşı grafiğe alınıp, en uygun tampon ve pH değeri belirlendi.

**Konsantrasyonun lineer tayin sınırlarının saptanması:** pH ve dalga boyu sabit tutulup, çeşitli konsantrasyonlardaki OTC ve SM'in absorpsiyon değerleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek, OTC ve SM'in lineer olarak tayin edilebildiği konsantrasyon sınırları belirlendi.

**Spektrofotometre parametrelerinin seçimi:** OTC ve SM çözeltilerinin ve karışımlarının maksimum dalga boylarındaki normal spektrumları ile bunların 1°-4° türevleri, tarama hızı: 100,200,400,600 nm/dakika, rezolüsyon: 0,3;0,5;1,0;2,5;5,0;10;20 nm ve türev alma aşama sayısı 1-5 koşullarında ayrı ayrı çalışılıp elde edilen bulgular kıyaslanarak en iyi sonuç veren parametreler seçildi.

#### **Örneğin Analize Hazırlanması**

200 ppm standard OTC veya SM stok çözeltilerinden uygun miktar 50 ml'lik ölçülü balona aktarılıp 2 ml tampon çözelti eklendi ve saf su ile hacme tamamlandı.

### Sulu Saf Çözeltilerde OTC veya SM Tayini

Asetat tamponu (pH= 4,8) ile hazırlanan 2-20 ppm saf OTC veya SM içeren çözeltilerin absorpsiyon miktarları, ilaçların pik verdikleri dalga boylarında (OTC: 275 nm ve 355 nm de, SM: 240,4 nm ve 262 nm) ölçüldü. OTC ve SM için regresyon denklemleri ve kalibrasyon eğrileri elde edildi.

Çalışmanın amaçları ve etkili faktörler dikkate alınıp bulgular kıyaslanarak hangi eğrilerin kullanılabileceği saptandı.

### Normal Spektrum Yardımıyla İki İlacın Birlikte Tayini

Sulu saf OTC, SM ve OTC+SM çözeltilerinin 200-400 nm arasında normal spektrumları incelenerek, ikili karışımlarda OTC ve SM tayininin mümkün olup olmadığı araştırıldı.

### Spektrum Türevi Yardımıyla İki İlacın Birlikte Tayini

OTC ve SM'i birlikte içeren çözeltilerde, normal spektrum yardımıyla miktar tayininin sağlıklı olarak yapılabilmesi, 240,4 nm-275 nm arasında OTC ve SM piklerinin birbirini etkilemesi nedeniyle mümkün görünmediğinden, spektrumların 1°-4° türevleri incelendi.

Spektrum türevlerinde ilaçlardan birinin absorpsiyon yapmadığı diğerinin yaptığı dalga boyları saptandı (sıfır kesişme noktası).

OTC ve SM'i değişik konsantrasyonlarda birlikte içeren çözeltilerin spektrum türevlerinde dalga boyu, konsantrasyon ve absorpsiyon arasında lineer bir ilişkinin varlığı araştırıldı. Regresyon denklemleri ve kalibrasyon grafikleri elde edildi. Geri kazanma deneyleri ile yöntem test edildi.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

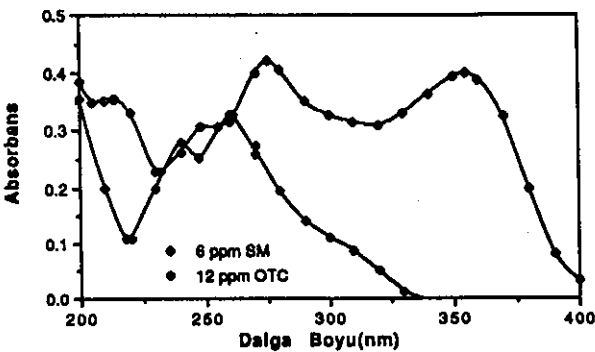
### OTC, SM ve OTC+SM'in Normal Spektrumları

Saf OTC ve SM'in her ikisinin de UV-bölgesinde absorpsiyon yaptıkları gözlemlendi (Şekil 1). Normal spektrumlarında OTC 275 nm ve 355 nm dalga boylarında, SM ise 240,4 nm ve 262 nm de pik vermektedirler.

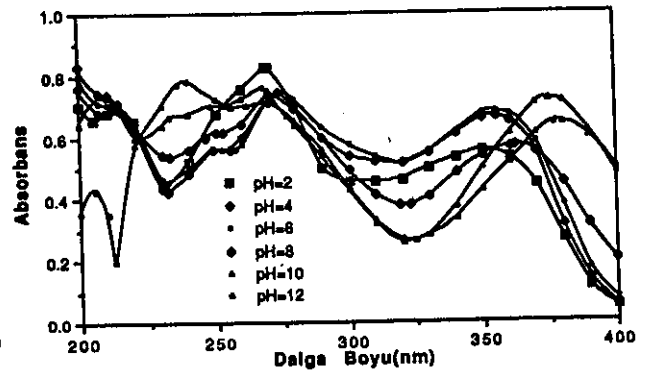
### pH ve Tamponun Etkisi

Farklı pH'larda elde edilen spektrumlar kıyaslandığında (Şekil 2-3), her iki ilacın absorpsiyon piklerinin çok düşük ve yüksek pH'larda yeterince belirgin olmadığı, piklerin keskinliklerini yitirdikleri gözlenmiştir.

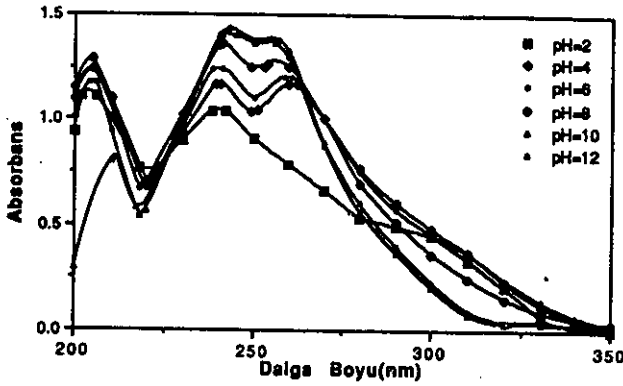
Çalışmalar için en uygun pH aralığının pH=4-6 olduğu saptanmıştır. pH=4,8 olan asetat tamponuyla hazırlanan örneklerle alınan sonuçlar kararlılık gösterdiğinden (Şekil 4) çalışmanın sonraki aşamalarının tamamında OTC ve SM çözeltileri pH=4,8 olan asetat tamponuyla hazırlanmıştır.



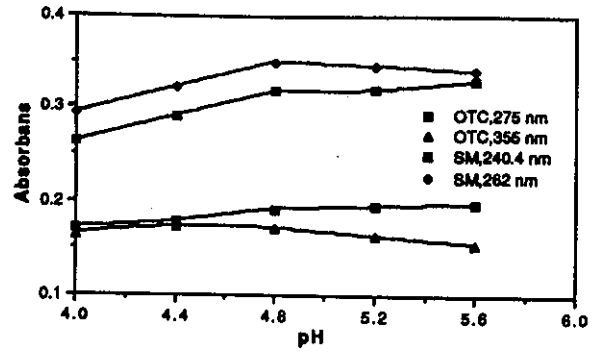
Şekil 1. 12 ppm OTC ve 6 ppm SM Çözeltisinin 200-400 nm Aralığında Spektrumları



Şekil 2. 20 ppm OTC Çözeltisinin Farklı pH'larda Spektrumu



Şekil 3. 20 ppm SM Çözeltisinin Farklı pH'larda Spektrumu



Şekil 4. Çeşitli pH'larda Asetat Tamponu İle Hazırlanan 6 ppm OTC ve 6 ppm SM İçeren Çözeltilerin

### OTC ve SM'i Tek Başına İçeren Çözeltilerde Miktar Tayini

DeneySEL bulgular, Çizelge 1'de verilen koşullarda saf OTC veya SM içeren çözeltilerin analizlerinde doğru ve tekrarlanabilir sonuçların alındığını göstermiştir (Şekil 5-6).

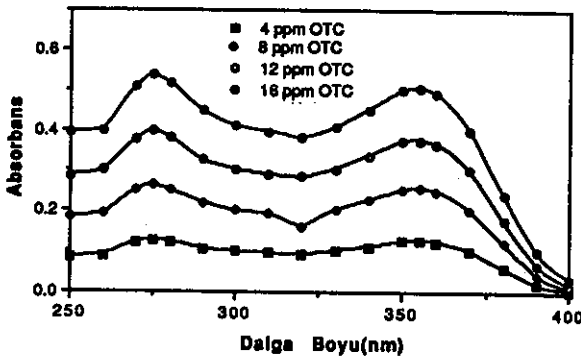
Çizelge 1. OTC ve SM Tayin Koşulları

	Tampon	pH	Lineer Tayin Aralığı (ppm)	Dalga Boyu (nm)	Tarama Hızı (nm/dak)	Rezölüsyon
OTC	Asetat	4,8	4-45	275	200	0,3
SM	Asetat	4,8	2-24	262	200	0,3

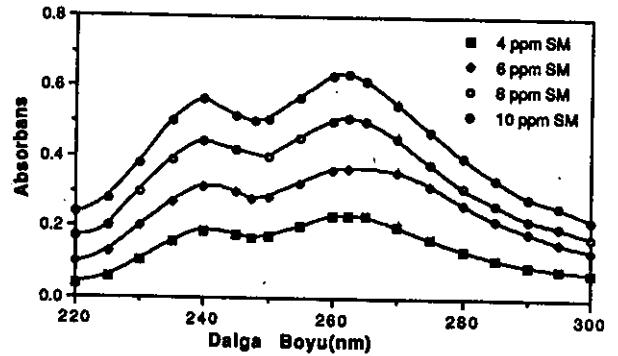
Kalibrasyon grafikleri ve regresyon denklemleri yardımıyla, saf OTC çözeltilerindeki OTC miktarı 275 nm de SM ise 262 nm de normal spektrum absorbans değerlerinden belirlenebilmektedir:

$$Y_{275} = (-3,35 \times 10^{-2}) + (3,658 \times 10^{-3}) C_{OTC}$$

$$Y_{262} = (-3,39 \times 10^{-2}) + (6,808 \times 10^{-2}) C_{SM}$$



Şekil 5. 4-16 ppm OTC İçeren Çözeltilerin Spektrumları

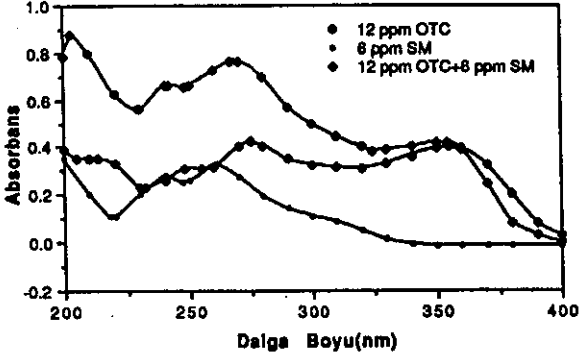


Şekil 6. 4-10 ppm SM İçeren Çözeltisinin Spektrumları

### Spektrum Türevi Yardımıyla OTC+SM İçeren Çözeltilerde İki İlacın Birlikte Tayini

OTC'nin 275 nm'deki piki SM'in 240,4 nm ve 262 nm'deki piklerine oldukça yakın bulunduğundan (Şekil 7), ikili karışımların normal spektrumlarında her iki ilacın piklerinin birbirinden etkilendiği

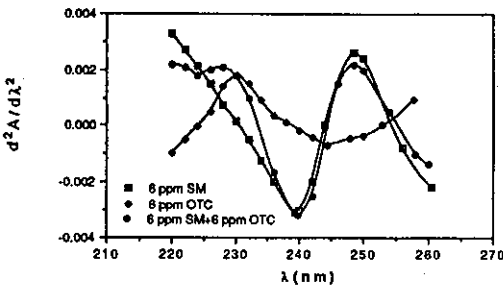
gözlenmektedir. Bunun için, bu bölgede OTC ve SM tayininin güvenilir şekilde yapılmasının mümkün olmadığı sonucuna varılmıştır.



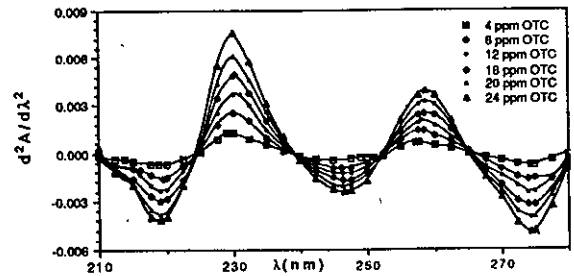
Şekil 7. 12 ppm OTC, 6 ppm SM ve 12 ppm OTC+6 ppm SM İçeren Çözeltilerin Spektrumu

<sup>4</sup>) $C_{OTC}$  regresyon denklemi veya kalibrasyon grafiği yardımıyla, SM miktarı ise 239,5 nm'de  $2^{\circ}$  türev spektrumu kullanılarak geliştirilen  ${}^{2D}Y_{239,5} = (3,58 \times 10^{-5}) + (6,082 \times 10^{-4})C_{SM}$  regresyon denklemi veya kalibrasyon grafiği yardımıyla saptanabilmektedir. Geri kazanma deneyleri, saf OTC+SM karışımlarında bulunan ilaçların 20 ppm düzeyine kadar % 90'ın üzerinde bir doğrulukla tayin edilebileceğini göstermiştir (Çizelge 2).

Bunun yanı sıra, OTC ve SM'i birlikte içeren çözeltilerin  $2^{\circ}$  türev spektrumlarında 230,5 nm de OTC konsantrasyonu ile absorpsiyon arasında ve 239,5 nm de SM konsantrasyonu ile absorpsiyon arasında lineer bir ilişkinin varlığı gözlenmektedir (Şekil 9-10). Bu ilişkilerden yararlanılarak OTC+SM içeren çözeltilerdeki OTC miktarı 230,5 nm'de  $2^{\circ}$  türev spektrumu kullanılarak geliştirilen  ${}^{2D}Y_{230,5} = (7,63 \times 10^{-5}) + (3,02 \times 10^{-4})C_{OTC}$  regresyon denklemi veya kalibrasyon grafiği yardımıyla, SM miktarı ise 239,5 nm'de  $2^{\circ}$  türev spektrumu kullanılarak geliştirilen  ${}^{2D}Y_{239,5} = (3,58 \times 10^{-5}) + (6,082 \times 10^{-4})C_{SM}$  regresyon denklemi veya kalibrasyon grafiği yardımıyla saptanabilmektedir. Geri kazanma deneyleri, saf OTC+SM karışımlarında bulunan ilaçların 20 ppm düzeyine kadar % 90'ın üzerinde bir doğrulukla tayin edilebileceğini göstermiştir (Çizelge 2).

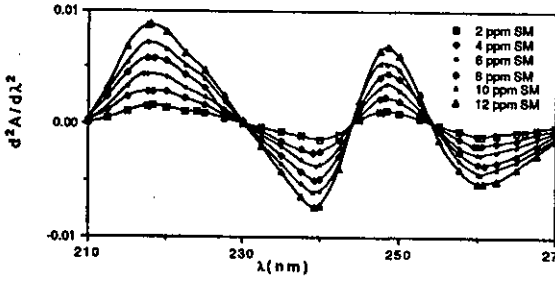


Şekil 8. OTC, SM ve OTC+SM İçeren Çözeltilerin Spektrum  $2^{\circ}$  Türevleri



Şekil 9. Değişik Konsantrasyonlarda OTC İçeren Çözeltilerin Spektrum  $2^{\circ}$  Türevleri

SALINAS ve ark. (1991) sulfatiazol ve oksitetrasiklin ile yaptıkları benzer çalışmada pH= 3,8 asetat tamponu ile hazırladıkları çözeltilerde  $4^{\circ}$  türev kullanarak 276 nm ve 293 nm de oksitetrasiklini ve 270,5 nm ile 288 nm de sulfatiazolü tayin etmişlerdir.



Şekil 10. Değişik Konsantrasyonlarda SM İçeren Çözeltilerin 2° Türev Spektrumları

Ayrıca, oksitetrasiklin tayini için 2° türev 293 nm ve 360 nm'yi sülfatiazol için ise 289 nm'yi önermişlerdir. Araştırmacıların kullandıkları pH ve ilaçlardan birisi farklı olduğundan, 2° türev için önerilen dalga boyunun bu çalışmadan farklı oluşu, ilaçların etkileşimine ve çalışma koşullarının farklılığına bağlanabilir.

Sonuç olarak, OTC ve SM'in saf karışımlarında, türev spektroskopisi yöntemiyle tayin edilebileceği gösterilmiştir. Yöntem, herhangi bir ön işlem ya da ayırma prosesine gerek duyulmadan uygulanabilmektedir.

Çizelge 2. OTC+SM İçeren Çözeltilerde Geri Kazanma Deneyleri Bulguları

Eklenen	OTC		SM	
	*Belirlenen (ppm)	Geri Kazanım (%)	*Belirlenen (ppm)	Geri Kazanım (%)
4 ppm OTC+2 ppm SM	3,60	90	2,04	102
8 ppm OTC+4 ppm SM	7,47	93	3,86	97
12 ppm OTC+6 ppm SM	11,38	95	5,73	95
16 ppm OTC+8 ppm SM	14,74	92	7,85	98
20 ppm OTC+10 ppm SM	19,20	96	9,81	98

\* (8 örnek x 2 analiz ortalaması)

## KAYNAKLAR

- HEMMERLING, C.H., 1987. Zurd Gaschromatographischen Rückstands-bestimmung von Amitraz in Bienenhonig. Die Nahrung, 31(8) 835-836.
- MIGUEL, AL., FERNANDEZ, M., and LOZANO, J.S., 1991. Simplified Method for the Determination of Organochlorine Pesticides in Honey. Analyst. 116: 269-271.
- MUINO, M.A.F., and LOZANO, J.S., 1991. Mass spectrometric Determination of PCP in Honey. Analy. Chim. Acta. 247: 121-123.
- NEVADO, J.J.B., MAHEDERO, M.C., OLIBARES, J.A., and SALINAS, F., 1991. Determination of Amitraz in Honey by First-Derivative Spectrophotometry. International Journal of Analytical Chemistry. 43: 187-194.
- SALINAS, F., MANSILLA, A.E., and NEVADO, J.J.B. 1991. Simultaneous Determination of Sulfathiazole and Oxytetracycline in Honey by Derivative Spectrophotometry. Microchemical Journal, 43: 244-252.