

T.C.  
İstanbul Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Analitik Kimya Anabilim Dalı  
Anabilim Dalı Başkanı: Prof. Dr. Sedat İMRE

111698

**FLUVOKSAMİN MALEATIN  
2,4,6-TRİNİTROBENZENSÜLFONİK ASİD (TNBS)  
İLE SPEKTROFOTOMETRİK MİKTAR TAYİNİ**

Yüksek Lisans Tezi

111698

Kimyager  
Sevgi TATAR

Danışman  
Doç. Dr. Sedef ATMACA

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

İstanbul - 1993

*Bu tezin hazırlanmasına olanak sağlayan Anabilim  
Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. Sedat İMRE'ye, bilgi  
ve tecrübesiyle bana yol gösteren, yardımlarını esirgemeyen  
Sayın Hocam Doç.Dr. Sedef ATMACA'ya teşekkür  
ve saygılarımı sunmayı bir borç bilirim.*

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI .....	1
2. GENEL BÖLÜM .....	2
2.1. FLUVOKSAMİN MALEAT .....	2
2.1.1. Özellikleri .....	2
2.1.2. Analiz Yöntemleri .....	3
2.2. 2,4,6-TRİNİTROBENZENSÜLFONİK ASİD (TNBS) HAKKINDA GENEL BİLGİ VE YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	5
3. DENEYSSEL BÖLÜM .....	10
3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN MADDELER, ÇÖZÜCÜLER VE ÇÖZELTİLER .....	10
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler .....	10
3.1.2. Çözeltiler .....	10
3.2. ALETLER VE DİĞER GEREÇLER .....	12
3.3. MİKTAR TAYİNİ YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR .....	13
3.3.1. Fluvoksamin Maleatın TNBS İle Reaksiyon Koşullarının İncelenmesi .....	13
a) Çözücü ve Dalga Boyu .....	13
b) pH .....	14
c) Temperatür ve Reaksiyon Süresi .....	18
d) Belirteç Miktarı .....	20
e) Mol Oranı .....	21
f) Rengin Dayanıklılığı .....	23
3.3.2. Yöntem ve Ölçü Eğirisinin Hazırlanması .....	24
3.4. TABLETLERDE FLUVOKSAMİN MALEAT MİKTAR TAYİNİ .....	25
3.4.1. Geliştirilen Spektrofotometrik Yöntem İle Tayin .....	25
3.4.2. UV-Spektrofotometrik Yöntem İle Tayin (Kıyas Yöntemi I) .....	26

	<u>Sayfa</u>
3.4.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi İle Tayin (Kıyas Yöntemi II) .....	26
4. SONUÇLAR .....	29
4.1. GELİŞTİRİLEN YÖNTEMİN İSTATİSTİKİ DEĞERLENDİRİLMESİ .....	29
4.2. GELİŞTİRİLEN YÖNTEM İLE KIYAS YÖNTEMLERİNİN İSTATİSTİKİ DEĞERLENDİRİLMESİ .....	31
5. TARTIŞMA .....	33
6. ÖZET .....	37
7. SUMMARY .....	39
8. KAYNAKLAR .....	41



## 1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Fluvoksamin maleat, antidepresan etkili yeni bir ilaç maddesidir. Beyin nöronlarından serotonin salıverilmesini spesifik olarak inhibe ederek farmakolojik aktivite gösterir.

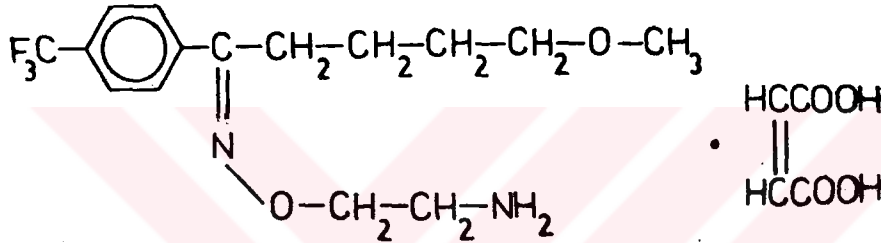
Yapılan literatür araştırmalarında fluvoksamin maleatın farmasötik preparatlarda miktar tayini için sadece bir tane polarografik yöntemle rastlanmıştır. Bildirilen diğer çalışmaların büyük bir kısmında fluvoksaminin biyolojik sıvılarda tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yönteminden yararlanılmıştır.

Bu çalışmada alifatik primer amin grubu içeren fluvoksamin maleatın tayini için basit, duyarlı ve güvenilir bir spektrofotometrik analiz yöntemi geliştirilmesi ve geliştirilen yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması düşünöldü. Bu amaçla amin grubu içeren maddelerle sulu ortamda reaksiyona girerek sarı-turuncu renkli türevler oluşturan 2,4,6-trinitrobenzensülfonik asid (TNBS) belirteç olarak seçildi.

## 2. GENEL BÖLÜM

### 2.1. FLUVOKSAMİN MALEAT

#### 2.1.1. Özellikleri



Kimyasal adı: 5-metoksi-1-[4-(trifluorometil)fenil]-1-pentanon (E)-0-(2-aminoetil)oksim maleatdır. Kapalı formülü C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>·C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>, molekül ağırlığı 434.4'dür. Beyaz renktedir. 120-121.5 °C de erir. Su, etanol, metanol, asetonitrilde çözünür. UV spektrumu suda 245 nm de ( $\epsilon = 0.46 \times 10^4$  l/mol.cm), etanolde 254.2 nm de ( $\epsilon = 0.15 \times 10^5$  l/mol.cm) ve metanolde 252.1 nm de ( $\epsilon = 0.47 \times 10^4$  l/mol.cm) maksimum absorpsiyon gösterir. KBr diski ile alınan IR spektrumunda 3450, 2950, 1700, 1620, 1480 cm<sup>-1</sup> de karakteristik bantlar verir.

Fluvoksamin 1983'den beri kullanılan ikinci jenerasyon anti-depresan bir ilaç maddesidir. Nöronlardan serotonin saliverilmesini spesifik olarak inhibe eder. Bu nedenle klinik aktivite gösterdiği düşünülmektedir (1-3). Fluvoksamin oral olarak alındıktan sonra gastro-intestinal kanaldan tamamıyla absorbe edilir. Plazma seviyesi 2-8 saat sonra maksimuma ulaşır. Yarılanma ömrü 15 saattir (4). Biyotransformasyonu çoğunlukla metoksi grubunun oksidatif eliminasyonu ya da deaminasyon ile olur. Metabolitleri farmakolojik

aktivite göstermez. Başlıcaları: fluvoksamino asid, fluvoks etanol, asetilfluvoksamino asiddir. Metabolitler idrarla atılır (5,6).

Fluvoksamin, maleat tuzu halinde oral olarak kullanılır. Günlük doz 100 ile 300 mg arasındadır. 100 mg'ı aşan dozlar bölünerek alınmalıdır (6).

### 2.1.2. Analiz Yöntemleri

Aralarında fluvoksaminin de bulunduğu 132 madde için iyon çifti ters faz ince tabaka kromatografisi ile yapılmış bir çalışmada maddeler fonksiyonel gruplarına göre sınıflandırılıp ayrıldıktan sonra tanınmışlardır. Amin grubu içeren maddeler için sodyum heptan-sülfonat veya sodyum metilsülfonatla emprenye edilmiş plaklarla çalışılmış ve lekeler önce ultraviyole ışık altında, sonra renklendirme belirteçleriyle (fluvoksamin için ninhidrin) saptanıp  $\Delta R_f$  değerleri bildirilmiştir (7). Literatürde fluvoksaminin çeşitli maddeler yanında ince tabaka kromatografisi (ITK) yardımıyla tanınması ile ilgili başka çalışmalara da rastlanmıştır (8,9).

Minder ve arkadaşları (10) fluvoksaminin insan serumunda diğer psikotrop ilaçlar yanında kalitatif analizini ters faz iyon çifti HPLC yöntemi ile fotodiod array detektör kullanarak yapmışlardır. Turcant ve arkadaşları (11) da buna benzer bir çalışma bildirmişlerdir.

Kalorimetrik bir çalışmada, fluvoksamin maleatın tablet yardımcı maddeleriyle geçimsizliği araştırılmıştır (12).

Literatürde tabletlerde fluvoksamin maleat miktar tayini için bir tek çalışmaya rastlanmıştır. Bu çalışmada fluvoksamin maleat pH 7.4 tampon çözeltisiyle tabletlerden ekstre edildikten sonra civa damla endikatör elektrod ve gümüş-gümüş klorür referans elektrod kullanılarak polarografik yöntemle analiz edilmiştir (13).

Fluvoksaminin biyolojik sıvılarda analizinde HPLC yöntemi yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Foglia ve arkadaşları (14)

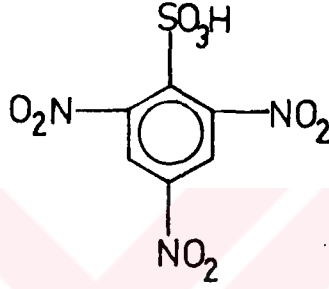
fluvoksaminin plazmada tayini için Nucleosil C<sub>8</sub> kolon ve UV detektör (215 nm) kullanmışlardır. İnsan ve fare plazmasında yapılmış bir çalışmada tek kademeli ekstraksiyondan sonra fluvoksamin normal faz HPLC ile tayin edilmiş, deteksiyon 254 nm de yapılmıştır (15). Härtter ve arkadaşları (16) plazma örneklerini önce ön kolona injekte ederek protein ve lipid gibi analize zararlı maddeleri sistemden uzaklaştırıp, fluvoksamini Nucleosil 100 CN kolonda 214 nm de UV detektör ile analiz etmişlerdir. Bu üç çalışmada da fluvoksamin, analiz koşullarında girişim yapabilecek diğer psikotrop ilaçlar yanında ayrılarak tayin edilmiş, ayrıca bu maddelere ait retansiyon zamanları da bildirilmiştir.

Fluvoksaminin fluoresans gösteren bir türevine dönüştürüldükten sonra miktarının tayin edilmesi, HPLC ile yapılan çalışmalarda önemli bir yer tutmaktadır. Bu çalışmaların hepsinde fluoresans detektör kullanılmıştır. De Jong (17) tarafından bildirilen bir çalışmada plazmada fluvoksamin tayini için belirteç olarak fluoreksamin seçilmiş, band genişlemesini minimuma indirmek için çeşitli ön kolonlar denenmiştir. Jong ve Zeeman (18) fluvoksamini yine fluoreksamin ile türevlendirdikten sonra HPLC ile tayin etmişlerdir. Türevlendirme belirteci olarak 7 - kloro - 4 - nitrobenzodioksazol (NBD-Cl) ün kullanıldığı bir çalışmada fluvoksamin içeren plazma örneği türevlendirmeden sonra Zorbax Sil kolona injekte edilerek normal faz HPLC ile ve ayrıca yüksek performanslı İTK ya uygulayarak fluorodansitometrik olarak tayin edilmiştir (19). Pommery ve Lhermitte (20) 5-dimetilaminonaftalen-1-sülfonil klorür (Dns-Cl) kullanarak fluvoksamini fluoresans gösteren türevine dönüştürdükten sonra gradient normal faz HPLC ile tayin etmişlerdir. Plazmada yapılmış bu çalışmada Hipersil ODS kolon 30 °C de ısıtılmış, gradient elüsyon su-asetonitril karışımı ile yapılmış ve iç standart olarak metapramin kullanılmıştır. Yine türevlendirme belirteci olarak Dns-Cl ün kullanıldığı bir çalışmada plazmada fluvoksamin bu kez izokratik ters faz HPLC ile Supelcosil LC-18-DB kolonda, asetonitril-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10mM (17:3) mobil faz sistemi kullanılarak tayin



edilmiş, iç standart olarak nortriptilin seçilmiştir (21). Kwakman ve arkadaşları (22) primer aminler için olan fluorijenik belirteçlerden naftalen -ve antrasen-2,3-dialdehid (NDA ve ADA) ile fluvoksamini türevlendirdikten sonra bu türevlerin peroksioksalat kemilüminesans deteksiyon sistemi içeren normal faz ve ters faz HPLC ye uygulanabilirliğini araştırmışlardır.

## 2.2. 2,4,6-TRİNİTROBENZENSÜLFONİK ASİD (TNBS) HAKKINDA GENEL BİLGİ VE YAPILAN ÇALIŞMALAR



2,4,6-Trinitrobenzensülfonik asid (TNBS) amin grubu içeren maddelerle sarı-turuncu renkli kondensasyon ürünleri oluşturur. Su, metanol ve etanolde kolay çözünen soluk sarı renkli bir maddedir.

Bazı amino asid ve peptidlerin içerdikleri primer amin grubu üzerinden TNBS ile reaksiyona girerek türevler oluşturduğu ilk kez 1960 yılında Okuyama ve Satake (23) tarafından bildirilmiş, izole edilen trinitrofenil (TNP) türevlerinin fiziksel, spektral ve kromatografik özellikleri belirtilmiştir. Bu çalışmada ayrıca TNBS nin sentezi de bildirilmiştir.

Kotaki ve arkadaşları (24), TNBS nin tiyol grubu içeren maddelerle oluşturduğu -S-TNP türevlerinin nötr veya zayıf alkali ortamda amin gruplarıyla kolaylıkla reaksiyon verdiğini ve TNBS nin reaktivitesini artırdığını bildirmişlerdir.

TNBS, birçok amin, amino asid ve proteinlerin tanınması ve miktar tayininde oldukça yaygın olarak kullanılan bir belirteçtir.

Azegami ve Iwai nükleik asidlerin ve bileşenlerinin bu belirteçle oluşturduğu türevleri kağıt kromatografisi yardımıyla izole etmişler (25) ve daha sonraki bir çalışmada da kırmızı-turuncu renkli nükleik asid-TNP türevlerinin fiziksel, spektral ve elektroforetik özelliklerini ve dayanıklılıklarını bildirmişlerdir (26). Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda, açil hidrazidlerin kağıt kromatografisi ile ayrılmalarından sonra lekelerin saptanmasında (27) ve amino asidlerin tanınmasında (28) renklendirme belirteci olarak TNBS çözeltisi kullanılmıştır. Başka bir kalitatif çalışmada idrar ve plazmadaki amino asidler türevlendirildikten sonra ITK-dansitometrik yöntemle analiz edilmişlerdir (29). Wilson ve arkadaşları (30) peptidleri kağıt kromatografisi-elektroforez kombinasyonu ile, Groendahl-Hansen ve arkadaşları (31) proteinleri poliakrilamid jel elektroforezi ile ayırdıktan sonra TNBS ile türevlendirerek tanımlamışlardır.

TNBS ile yapılmış ilk miktar tayini çalışması Satake ve arkadaşları (32) tarafından bildirilmiştir. Bu çalışmada amino asid ve peptidlerin TNP türevleri  $\text{NaHCO}_3$  lı ortamda  $40^\circ\text{C}$  de oluşturulmuş reaksiyon karışımı asidlendirildikten sonra absorban değerleri  $340\text{ nm}$  de ölçülmüştür. Amino asidlerin (33,34), serum ve plazmadaki aminlerin (35), idrarda amfetamin ve benzeri primer aminlerin (36) otoanalizör ile yapılan miktar tayinlerinde TNBS yaygın olarak kullanılmaktadır. Asid proteinaz enzimi aktivitesini tayin etmek amacıyla Holm (37) tarafından bildirilen bir çalışmada enzim, substrat olarak seçilen hemoglobin ile dializ edilmiş, sonra açığa çıkan amino asidler ve peptidler otoanalizörde TNBS ile türevlendirilip kolorimetrik olarak tayin edilmişlerdir. Literatürde peptid ve proteinlerdeki amin ve amino asidlerin miktar tayini için bu belirteç ile yapılan çalışmalara rastlanmıştır (38-41). Dymond ve Russel (42) kanda izoniazid tayininde TNBS ile reaksiyondan sonra türevi metil

isobutylketona alarak absorbansını 500 nm de ölçmüşlerdir. Bu belirteçten yararlanılarak bildirilmiş çeşitli spektrofotometrik analizlerde monoaminoksidaz (43), aminoglikozid antibiyotiklerinden kanamisin (44,45), gentamisin ve polimiksin (45) tayinleri yapılmıştır. Esansiyel bir amino asid olan lizinin hayvan protein konsantrelerinde (46), karbonhidrat bakımından zengin örneklerde (47) ve mısır tohumunda (48) spektrofotometrik tayini için TNBS kullanılmıştır. Charteris ve John (49) dopamin için geliştirdikleri bir miktar tayini yönteminde TNP-dopamini benzen ile ekstre ederek tayine zarar veren TNP-dopa'dan ayırdıktan sonra analiz etmişlerdir. Pietta ve arkadaşları (50) kloramfenikolün bozunma ürünü olan ve aktivitesi bulunmayan 1-(4'-nitrofenil)-2-amino-1,3-diol'ü TNBS ile türevlendirerek 340 nm de, 5-25 µg/ml konsantrasyon aralığında tayin etmişler ve yöntemi reaksiyon koşullarında tayine zarar vermeyen kloramfenikol ve bozunma ürünü birlikte içeren sentetik karışımların analizine uygulamışlardır.

Alifatik primer amin grubu içeren ilaç maddelerinden baklofen için Ersoy (51), traneksamik asid için Atmaca (52) TNBS ile reaksiyona dayanan spektrofotometrik yöntemler geliştirmişler ve bu yöntemleri farmasötik preparatlara uygulamışlardır. Qi ve arkadaşları (53) hidrazin ve hidrazidlerin yanyana spektrofotometrik analizlerinde aynı belirteci kullanmışlardır. Atmaca ve İskender (54) antidepresan etkili tranilsipromini TNBS ile türevlendirdikten sonra silikajel plaklara uygulayıp lekelerin reflektans şiddetini 340 nm de ölçerek ITK dansitometrik bir tayin yöntemi geliştirmişlerdir.

Gatt ve arkadaşları (55) tarafından bildirilen bir çalışmada 12-(1-piren)-dodekanoik asid (P12)'ın albumin ile yaptığı kompleksin fluoresans şiddetini artırmak için bu belirteçten yararlanılmıştır. Bu çalışmada albumin-TNP türevinin P12 ile yaptığı kompleksin fluoresans şiddeti ölçülerek kültür hücrelerinden P12 salıverilmesi izlenmiştir.

TNBS ile yapılmış HPLC çalışmalarında genellikle türevlendirmeden sonra, çeşitli kolon ve mobil fazlar kullanılarak ters faz sistemlerinde ve UV dedektör ile çalışılmıştır. Fabregas ve Beneyto (56) sefaleksinin lizinat tuzu içeren farmasötik preparatların analizi için sefaleksinin ve lizin karışımlarının HPLC de ayrılıp tayin edilmesine dayanan bir yöntem bildirmişlerdir. Kabra ve arkadaşları (57) serumda amikasin tayini için TNBS ile reaksiyondan sonra ürünü katı faz ekstraksiyonu ile temizlemiş ve kromatografik analizini 50°C de yapmışlardır. Wallace ve arkadaşları (58) insülin molekülünü bu belirteç ile türevlendirdikten sonra reaksiyon ürününü HPLC de gradient elüsyon sistemi uygulayarak analiz etmişler ve TNBS nin öncelikle insülin monomerindeki glisinin  $\alpha$ -amino grubuyla reaksiyon verdiğini bildirmişlerdir. Gürkan ve Özdemir (59) fare beyni dokusunda biojenik aminlerden dopamin, noradrenalin ve 5-hidroksitriptamin'in HPLC ile ayrılıp tayin edilmesinde kolon öncesi türevlendirmeden sonra TNP bileşiklerini  $\mu$ -bondapak C<sub>18</sub> veya  $\mu$ -bondapak CN ters faz kolonlarında, 340 nm de UV dedektör ile analiz etmişler, C<sub>18</sub> kolonun daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca literatürde aminofosfolipidlerin (60) ve 2-metilaziridinin (61) sıvı kromatografik analizleri bildirilmiştir.

TNBS ile aminler arasındaki reaksiyonun kinetiği çeşitli çalışmalarda incelenmiştir (62-65). Sarantonis ve arkadaşları (66) da bu amaçla trinitrobenzen sülfonat iyon seçici elektrodu yardımıyla potansiyometrik olarak çeşitli amino asitlerin TNBS ile reaksiyonlarının hız sabitelerini tayin etmiş ve reaksiyonların birinci dereceden olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar (67) daha sonra indirgen şekerlerin ve Cu (II) nin kinetik tayininde, Qian ve arkadaşları (68) glisin ve glutamik asidin kantitatif analizinde yine TNBS iyon seçici elektrodan yararlanmışlardır. Wentzell ve arkadaşları (69) glisin ve asparaginin TNBS ile reaksiyondan sonra birarada kinetik tayini için, bir analiz yöntemi bildirmişlerdir.

Literatürde rastlanan diferansiyel puls polarografisi ile yapılan bir çalışmada bazı amin ve amino asidlerin TNP türevleri sülfid iyonları beraberinde  $5 \times 10^{-6}$  M konsantrasyona kadar tayin edilmişlerdir. Aynı koşullarda peptid ve proteinlerin TNP türevlerinin polarografik bir pik oluşturmadığı bildirilmiştir (70).

Majima ve arkadaşları (71) tarafından bildirilen bir çalışmada, periferel kan monositleri, immuno kompleksler (antikor-TNBS) beraberinde lüminesans immunoassay yöntemi ile tayin edilmişlerdir.



## 3. DENEYSEL BÖLÜM

### 3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN MADDELER<sup>1</sup>, ÇÖZÜCÜLER<sup>1</sup> VE ÇÖZELTİLER

#### 3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Fluvoksamin maleat<sup>2</sup>, Faverin<sup>®</sup> tablet<sup>2,3</sup>, 2,4,6-trinitrobenzen-sülfonik asid (TNBS)<sup>4</sup>, nortriptilin hidroklorür<sup>5</sup>, borik asid, disodyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojen fosfat, potasyum hidrojen ftalat, potasyum klorür, sodyum bikarbonat, sodyum sülfat, sodyum hidroksid.

Etanol, kloroform, metanol, etilasetat, asetonitril (HPLC saf-lığında), hidroklorik asid ve distile su (HPLC çalışmalarında KMnO<sub>4</sub> üzerinden taze distillenmiş deiyonize su kullanıldı).

#### 3.1.2. Çözeltiler

##### 1. Stok çözelti

250 mg fluvoksamin maleat 50 ml lik balon jode etanolde çözülüp hacmine tamamlandı.

---

<sup>1</sup> Merck, E.Merck A.G. Darmstadt, Almanya.

<sup>2</sup> Duphar B.V., Weesp, Hollanda.

<sup>3</sup> Eczacıbaşı İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş., İstanbul.

Fluvoksamin Maleat ve Faverin<sup>®</sup> tabletlerinin sağlanmasında yardımları için firmaya teşekkür ederim.

<sup>4</sup> Sigma Chemical Co., ABD.

<sup>5</sup> Mustafa Nevzat İlaç San. A.Ş., İstanbul.

Deney koşullarının saptanması ve ölçü eğrisinin hazırlanması çalışmalarında stok çözeltiden gerekli seyreltmeler yapıldı.

Bu çözelti +4°C de karanlıkta 1 ay dayanıklıdır.

## 2. TNBS çözeltileri

Deney koşullarının saptanmasında % 0.76 lık, ölçü eğrisinin hazırlanmasında % 0.86 lık etanoldeki çözeltileri hazırlandı.

Bu çözeltiler +4°C de 1 hafta dayanıklıdır.

## 3. Tampon çözeltiler

### Ftalat tamponu (72)

pH sı 4.0, 5.0 ve 6.0 olan tampon çözeltilerini hazırlamak için 50 ml 0.2 M potasyum hidrojen ftalat çözeltisine gerekli miktar 0.2 M NaOH ilave edildi ve çözeltinin hacmi suyla 200 ml ye tamamlandı.

### Fosfat tamponu (73)

pH sı 7.0 ve 7.5 olan tampon çözeltilerini hazırlamak için 50 ml 0.2 M potasyum dihidrojen fosfat çözeltisine gerekli miktar 0.2 M NaOH ilave edildi ve hacimleri suyla 200 ml'ye tamamlandı.

### Borat tamponları (73)

pH sı 8.0, 8.5 ve 9.0 olan tampon çözeltilerini hazırlamak için 0.6189 g borik asid ve 0.7456 g potasyum klorür 50 ml suda çözülüp gerekli miktarlarda 0.2 M NaOH çözeltisi ilave edildi ve hacimleri suyla 200 ml ye tamamlandı.

### Karbonat tamponları (74)

pH sı 11.0 ve 12.0 olan tampon çözeltilerini hazırlamak için 50 ml 0.05 M sodyum bikarbonat çözeltisine gerekli miktar

0.1 M NaOH çözeltisi ilave edildi ve hacimleri suyla 100 ml ye tamamlandı.

#### 4. HPLC de kullanılan mobil faz sistemi

Asetonitril-0.025 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 4.6) (60:40). Mobil faz sistemi kullanılmadan önce 15 dakika degaze edilip süzüldü (Milipor filtre, 0.50  $\mu\text{m}$ ).

### 3.2. ALETLER VE DİĞER GEREÇLER

1. Spektrofotometre (Beckman Instruments, Model B) (Analitik çalışmalarda kullanıldı.)
2. Spektrofotometre (Shimadzu UV- 2100S UV-Visibl) (Absorbsiyon spektrumlarının alınmasında kullanıldı.)
3. HPLC (Waters Model, Waters Assoc. Milford, Mass. ABD)  
Ters fazlı  $\mu$ -bondapak  $\text{C}_{18}$  kolon (300x4 mm ID), model 6000 A pompa, U6K üniversal enjektör, model 440 UV detektör (254 nm filtre kullanıldı), Linear yazıcı içeren yüksek performanslı sıvı kromatografisi aleti.
4. 1 cm lik cam küvetler (OS 1000) (10x10x45 mm)
5. 1 cm lik kuartz küvetler (QS 1000) (10x10x45 mm)
6. pH-metre (Electronic Instruments Limited 7020)
7. Terazî (Mettler, H20)
8. Girdap karıştırıcı (Elektro-mag)
9. Çalkalayıcı (Köttermann Model 4010)



10. Su banyosu (Nüve 400 SB)
11. Ultrasonik banyo (Branson 221)
12. Santrifüj (Janetzki T5)
13. Hamilton enjektör (100  $\mu$ l lik), otomatik Fisher pipetler 25,50,100,250  $\mu$ l lik)
14. Hesap makinesi (Texas Instruments, TI-60)

Cam eşyaların temizlenmesi: Çalışmada kullanılan cam eşyaların tümü sırasıyla kromik asid çözeltisi, musluk suyu, distile su ve etanol ile yıkanıp 70°C de etüvde kurutuldu.

### **3.3. MİKTAR TAYİNİ YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR**

#### **3.3.1. Fluvoksamin Maleatın TNBS İle Reaksiyon Koşullarının İncelenmesi**

Bu belirteç ile daha önce yapılan analizler incelendiğinde TNBS ile aminler arasındaki reaksiyonun nötr ya da alkali pH larda, oda temperaturünde ya da ısıtılarak yürüdüğü görülmüştür. Absorbans değerleri genellikle türev bir organik çözücüye alınmadan ölçülmektedir.

Fluvoksamin maleat ile TNBS arasındaki reaksiyonun en iyi hangi koşullarda yürüdüğünü saptamak amacıyla maddenin 0.7 mg/ml etanoldeki çözeltisiyle çalışılarak çeşitli denemeler yapıldı.

#### **a) Çözücü ve Dalga Boyu**

Fluvoksamin maleatın TNBS ile oluşturduğu sarı renkli türevin (Fluvoksamin-TNP) maksimum absorpsiyon gösterdiği çözücü ve dalga boyunu saptamak için çeşitli çözücüler denendi.

Bu amaçla 10 ml lik 4 ayrı balon jøjeye fluvoksamin maleat, pH 8.0 borat tamponu ve belirteç çözeltilisinden 250 şer  $\mu$ l ilave edilip, karışım oda temperaturünde karanlıkta 40 dakika bekletildi, sonra herbir balon jøjeye 100  $\mu$ l pH 6.0 ftalat tamponu ilave edildi ve hacimleri etanol, metanol, etilasetat ve kloroform ile 10 ml ye tamamlandı. Türevlerin UV-Visibl absorpsiyon spektrumları aynı koşullarda hazırlanmış boş denemelere karşı alındı (Şekil 1).

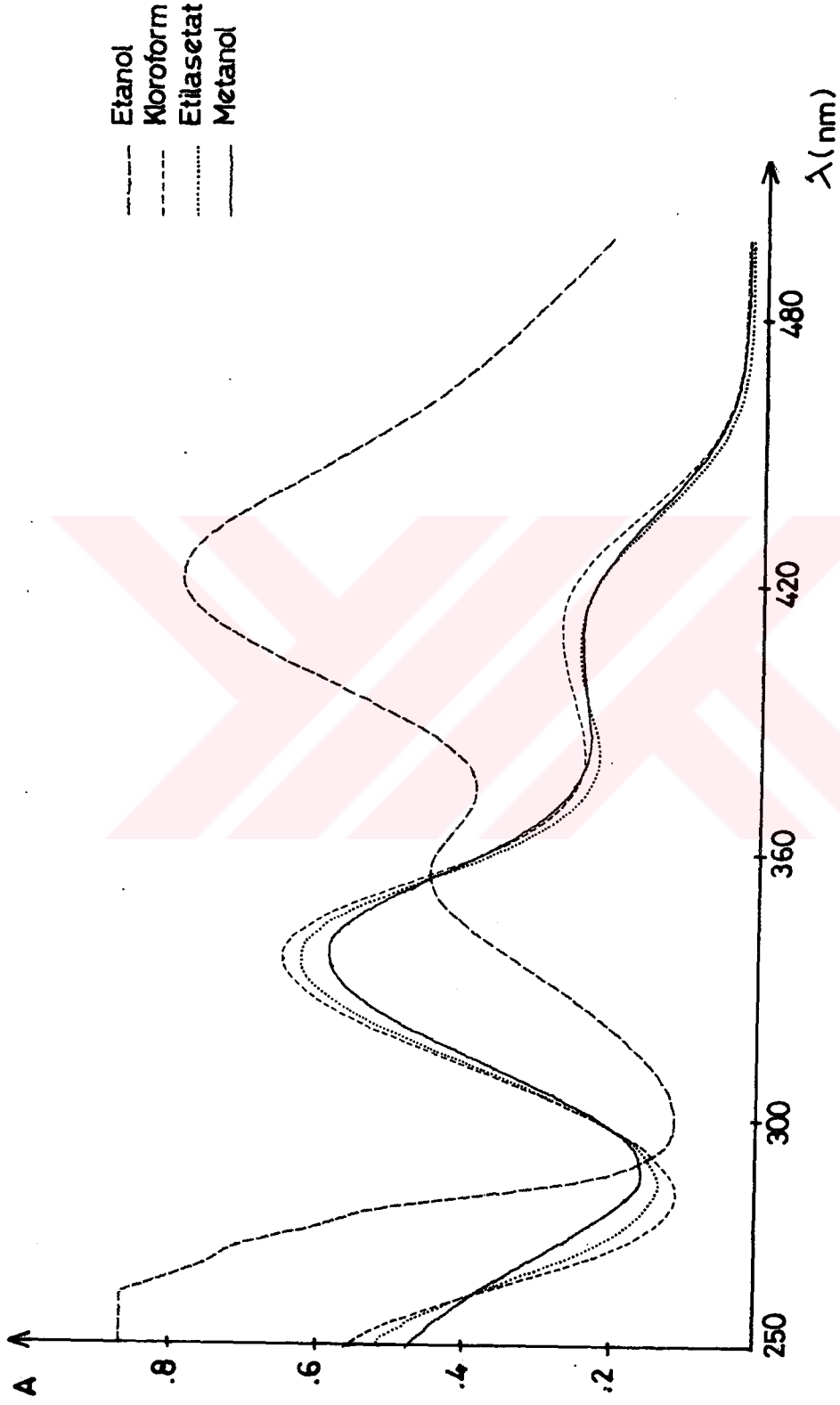
Kullanılan çözücüler arasında en yüksek absorbands değeri etanol ( $\lambda_{maks.}$ : 420 nm) ile elde edildiğinden çalışmalara bu çözücü ile devam edilmiştir. Fluvoksamin-TNP ve boş denemenin etanoldeki çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları Şekil 2 de görülmektedir.

Etanol ilavesinin tamamı 40 dak. sürenin bitiminde yapılırsa çözeltide hafif bir bulanıklık gözlenmektedir. Türev oluşumu reaksiyonu madde, tampon ve belirteç çözeltilerine 5 ml etanol ilave edilip 40 dakika bekletilerek gerçekleştirildiğinde ve bundan sonra çözeltilinin hacmi etanol ile tamamlandığında daha iyi sonuç alınmıştır.

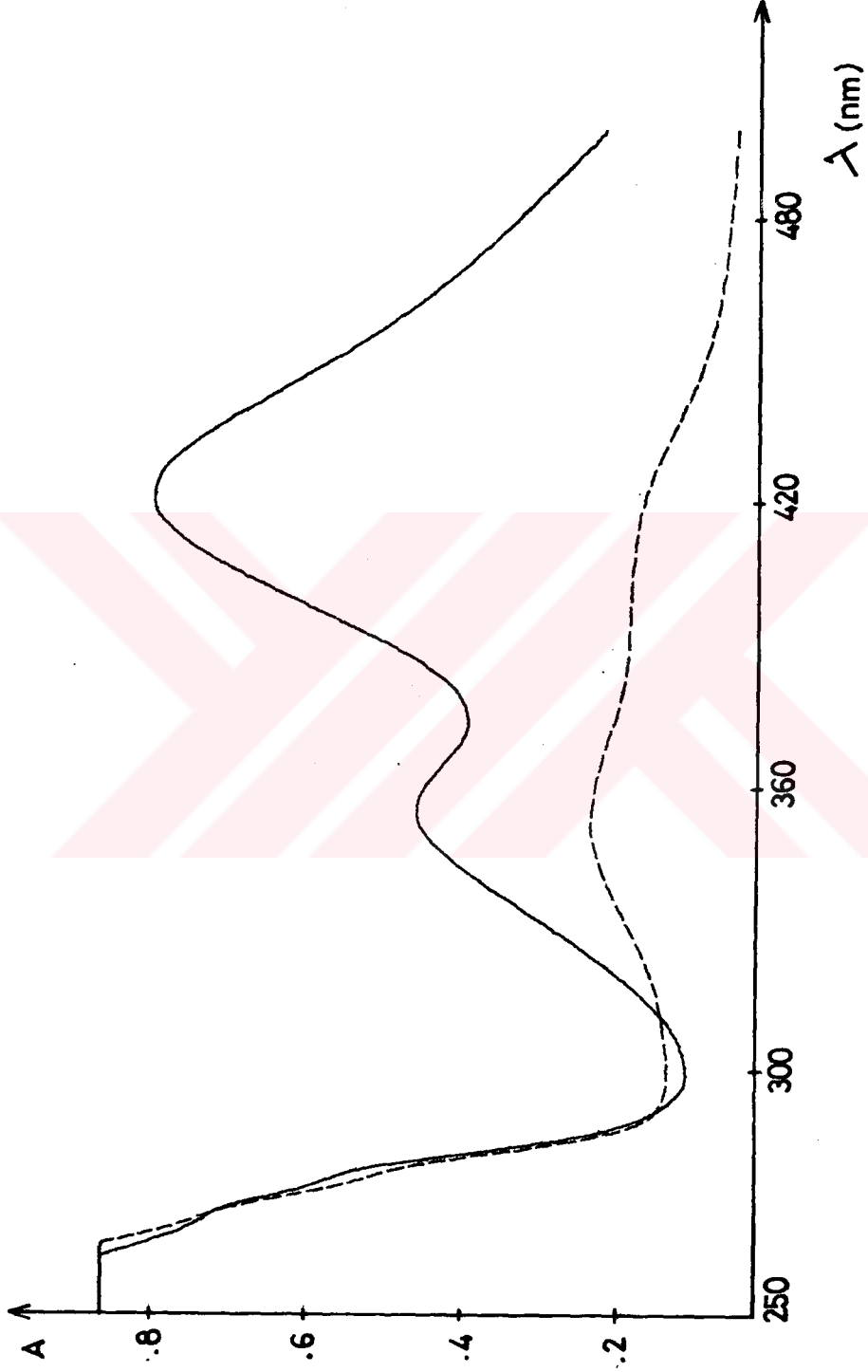
### **b) pH**

Fluvoksamin maleat ile TNBS arasındaki reaksiyonun en iyi hangi pH da yürüdüğünü saptamak amacıyla pH 7.0-12.0 arasında hazırlanmış bir seri tampon çözeltiliyle çalışıldı. Bu amaçla aynı konsantrasyondaki fluvoksamin maleat çözeltileri üzerine çeşitli pH lardaki tampon çözeltilerden ayrı ayrı ilave edildi. Belirteç çözeltilisinin de ilavesinden sonra türevlendirme reaksiyonu gerçekleştirildi. Alınan sonuçlar Cetvel 1 de gösterilmiştir. Bu dene-meler sonucunda en yüksek absorbands değeri veren pH 8.0 borat tamponuyla çalışmaya karar verildi.

pH 7.0-9.0 arasındaki tampon çözeltiler ile oluşturulan türevlerin etanoldeki absorpsiyon spektrumları Şekil 3 de görülmektedir.



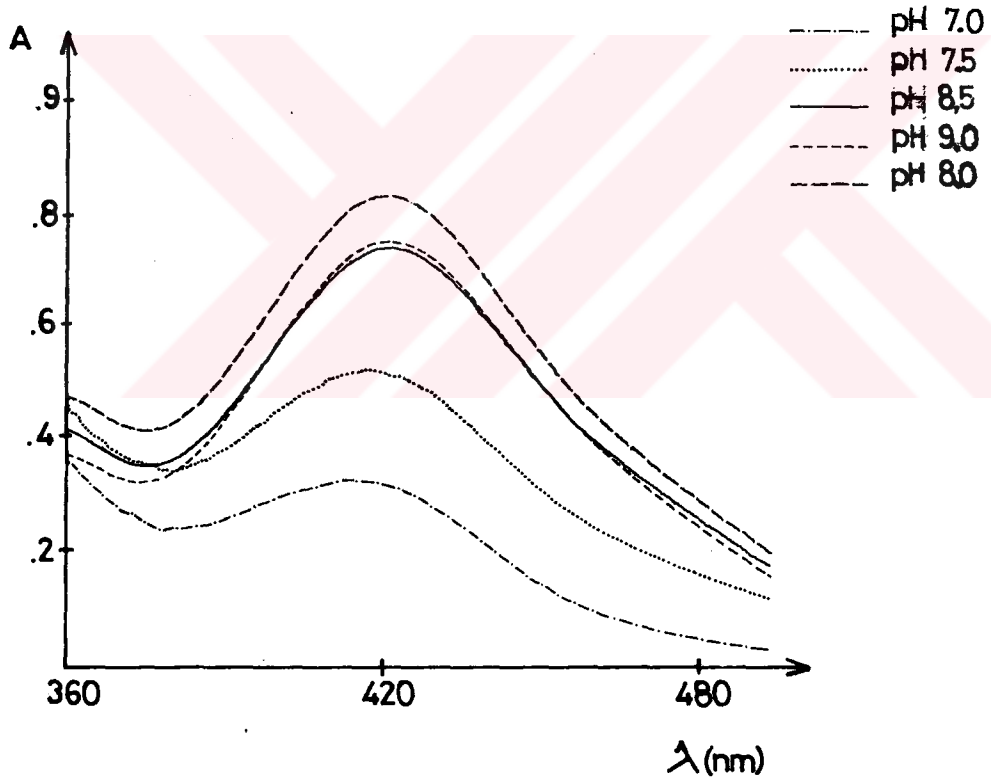
ŞEKİL 1- Fluvoksamin-TNP nin çeşitli çözücülerdeki absorpsiyon spektrumları.



ŞEKİL 2- Fluvoksamin-TNP nin (—) ve boş denemenin (---) etanoldeki absorpsiyon spektrumları.

**CETVEL 1- Çeşitli pH larda Oluşturulan Fluvoksamin-TNPnin Absorbans Değerleri .**

pH	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	10.0	11.0	12.0
Türevin Absorbansı	0.370	0.585	0.910	0.890	0.960	1.035	1.180	1.340
Boş Denemenin Absorbansı	0.050	0.065	0.100	0.160	0.210	0.300	0.410	0.550
$\Delta A$	0.320	0.520	0.810	0.730	0.750	0.735	0.770	0.790



**ŞEKİL 3- Çeşitli pH larda oluşturulan Fluvoksamin-TNPnin etanoldeki absorpsiyon spektrumları.**

### c) Temperatur ve Reaksiyon Süresi

Türevin kantitatif olarak hangi sıcaklıkta ve ne kadar sürede oluştuğunu saptamak amacıyla çeşitli sıcaklıklarda çalışıldı. 10 ml lik balon jöjelere fluvoksamın maleat, pH 8.0 tamponu ve belirteç çözeltilerinden ilave edildikten sonra reaksiyon karışımı oda sıcaklığında, 30°C, 40°C ve 50°C de 10 ile 60 dakika arasında bekletilerek türev oluşması izlendi (Cetvel 2). Ölçülen absorpsiyon değerleri ile çizilen grafikten (Şekil 3) de görüleceği gibi fluvoksamın-TNP nin oda sıcaklığında, 40 dakikada kantitatif olarak oluştuğu saptandı.

**CETVEL 2- Çeşitli Sıcaklık ve Sürelerde Reaksiyon Oluşumunun İncelenmesi.**

Oda sıcaklığı

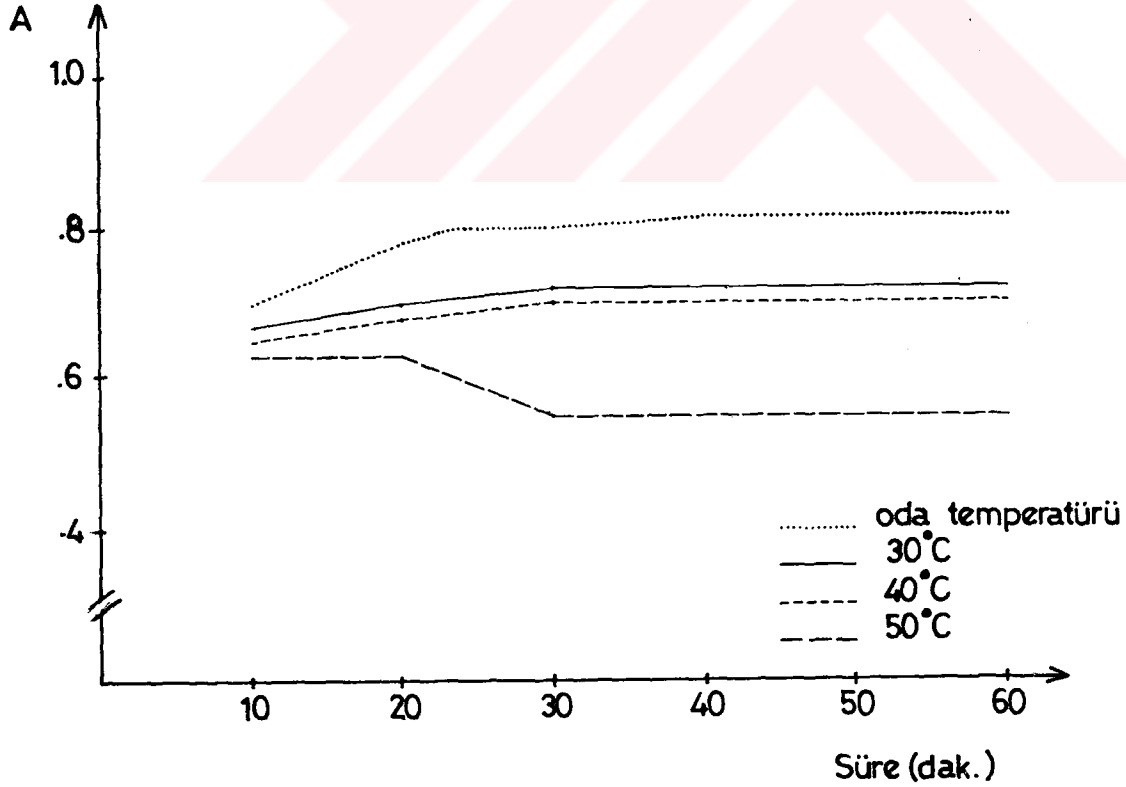
Süre(dak.)	10	20	30	40	50	60
Türevin Absorbansı	0.790	0.870	0.900	0.920	0.940	0.945
Boş Denemenin Absorbansı	0.090	0.090	0.100	0.110	0.130	0.135
$\Delta A$	0.700	0.780	0.800	0.810	0.810	0.810

30°C

Süre(dak.)	10	20	30	40	50	60
Türevin Absorbansı	0.865	0.900	0.930	0.930	0.940	0.940
Boş Denemenin Absorbansı	0.195	0.200	0.210	0.210	0.220	0.220
$\Delta A$	0.670	0.700	0.720	0.720	0.720	0.720

40°C						
Süre(dak.)	10	20	30	40	50	60
Türevin Absorbansı	0.870	0.905	0.930	0.940	0.940	0.945
Boş Denemenin Absorbansı	0.220	0.225	0.230	0.240	0.240	0.245
$\Delta A$	0.650	0.680	0.700	0.700	0.700	0.700

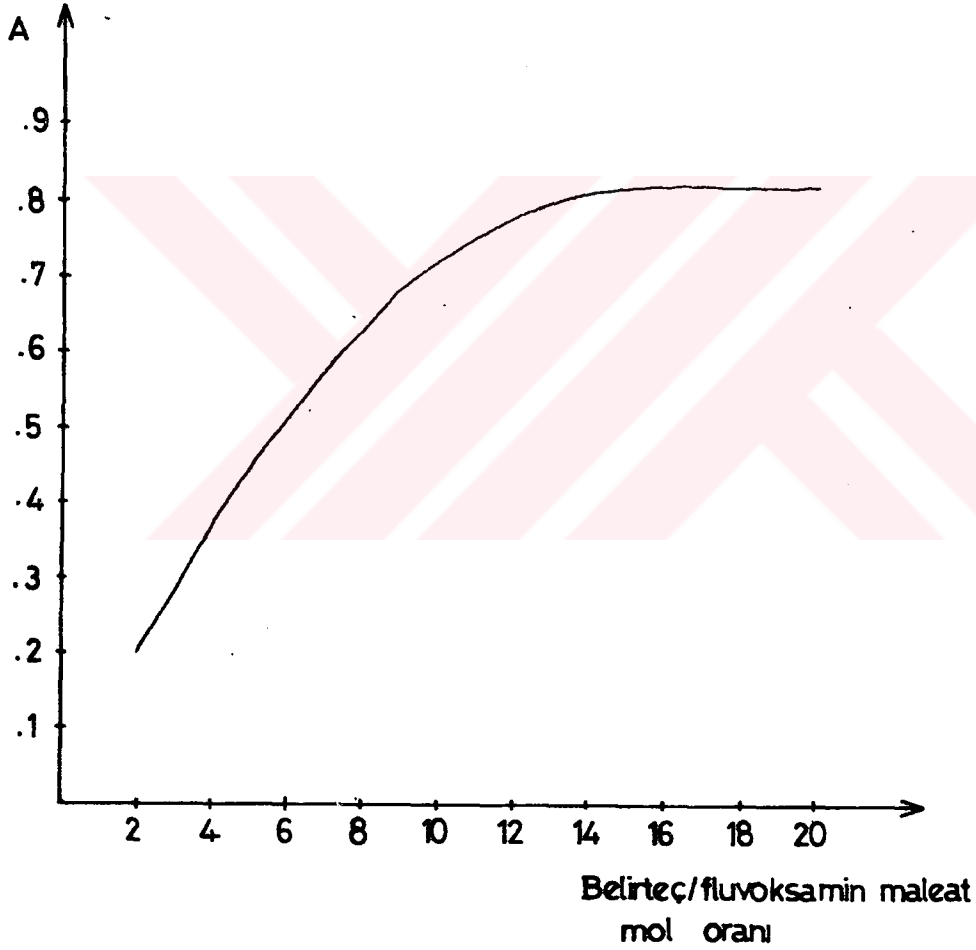
50°C						
Süre(dak.)	10	20	30	40	50	60
Türevin Absorbansı	0.850	0.850	0.850	0.855	0.800	0.805
Boş Denemenin Absorbansı	0.220	0.220	0.230	0.235	0.250	0.255
$\Delta A$	0.630	0.630	0.620	0.620	0.550	0.550



ŞEKİL 3- Fluvoksamin-TNP oluşması üzerine temperatur ve reaksiyon süresinin etkisi.

#### d) Belirteç Miktarı

TNBS ile fluvoksamin maleat arasındaki reaksiyonunun maksimum ürün vermesi için gerekli belirteç/fluvoksamin maleat mol oranını saptamak amacıyla madde miktarı sabit tutulup, TNBS mol katı 2-20 olacak şekilde bir seri belirteç çözeltisiyle çalışıldı. Fluvoksamin-TNP nin oluşması için, Şekil 4 de görüldüğü gibi 16 mol katı belirteç yeterli olmaktadır.



ŞEKİL 4- Fluvoksamin-TNP oluşumu üzerine belirteç miktarının etkisi.

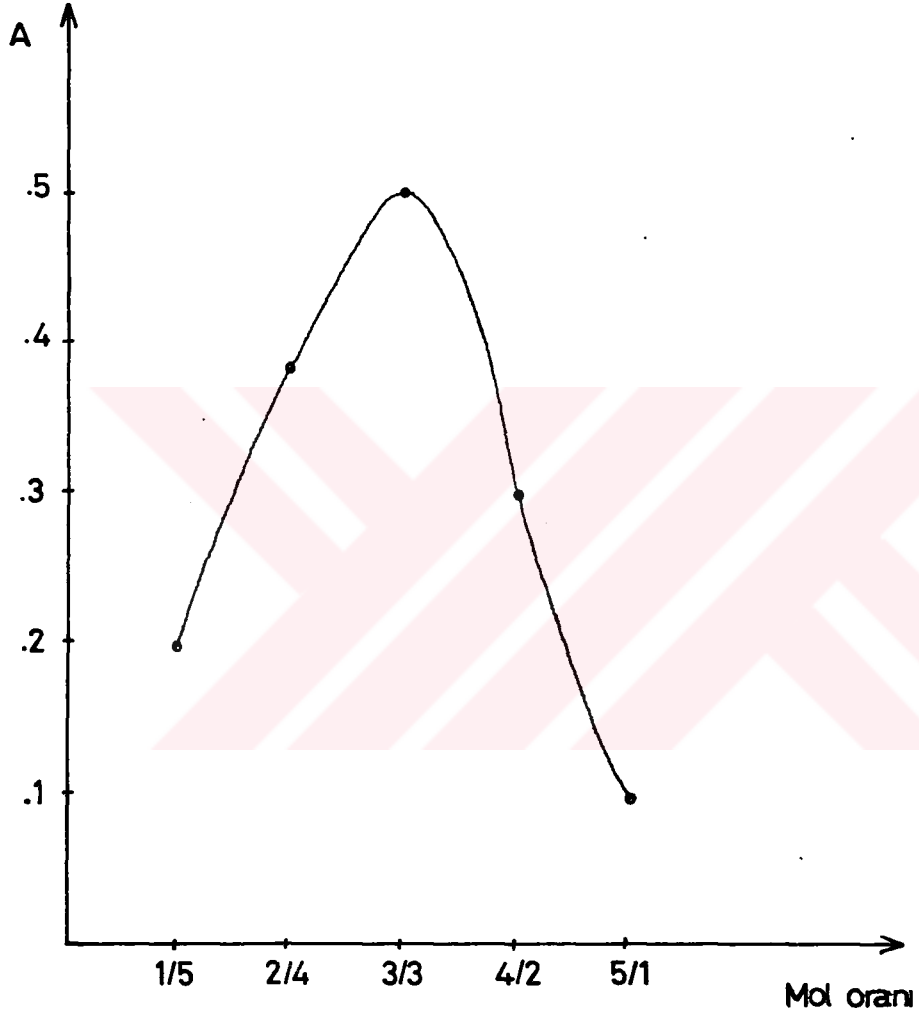


**e) Mol Oranı**

Fluvoksaminin TNBS ile türev oluştururken hangi mol oranında birleştiğini saptamak amacıyla Job'un sürekli değişim yönteminden yararlanıldı (75). Bu amaçla her iki maddenin aynı konsantrasyondaki ( $2.3 \times 10^{-4}$  M) ve pH 8.0 borat tamponunda hazırlanmış çözeltileri, toplam hacim aynı kalacak şekilde değişen miktarlarda karıştırıldı. Ölçülen absorbands değerleri Cetvel 3 de verilmiştir. Bu değerler yardımıyla çizilen Job eğrisinin (Şekil 5) incelenmesinden de anlaşılacağı gibi fluvoksamin ile TNBS 1:1 oranında reaksiyona girmişlerdir.

**CETVEL 3- Fluvoksamin/TNBS Mol Oranının İncelenmesi.**

Mol Oranı	Fluvoksamin (ml)	TNBS (ml)	Absorbans
1:5	1	5	0.200
2:4	2	4	0.380
3:3	3	3	0.500
4:2	4	2	0.300
5:1	5	1	0.100



ŞEKİL 5- Job'un sürekli değişim eğrisi.

### f) Rengin Dayanıklılığı

Fluvoksamin maleat ile TNBS nin reaksiyonu pH 8.0 tampon çözeltisiyle oda sıcaklığında 40 dakika içerisinde tamamlandıktan sonra türevin absorbansı 10 dakika değişmeden kalıp sonra yavaş yavaş artış gösterdi. Rengin dayanıklılığını arttırmak için reaksiyonun tamamlanmasından sonra karışıma pH sı 4.0, 5.0, 6.0 olan tampon çözeltilerden ve 0.1 N HCl çözeltisinden çeşitli miktarlar ilave edildi. En iyi sonuç 0.1 ml pH 6.0 ftalat tamponu çözeltisiyle elde edildi. Bu tamponun ilavesinden sonra çözelti karanlıkta bekletildiğinde, 1 saat süresince dayanıklı kaldığı gözlemlendi. Bundan sonra absorbans değeri giderek azalmaktadır (Cetvel 4).

**CETVEL 4-** Fluvoksamin-TNP nin Etanoldeki Çözeltisinin Oda Temperatüründe ve Karanlıkta Dayanıklılığının İncelenmesi.

	Başlangıçta	15 dak. sonra	30 dak. sonra	45 dak. sonra	1 saat sonra	2 saat sonra	24 saat sonra	48 saat sonra
Türevin Absorbansı	0.815	0.815	0.815	0.815	0.815	0.780	0.550	0.410

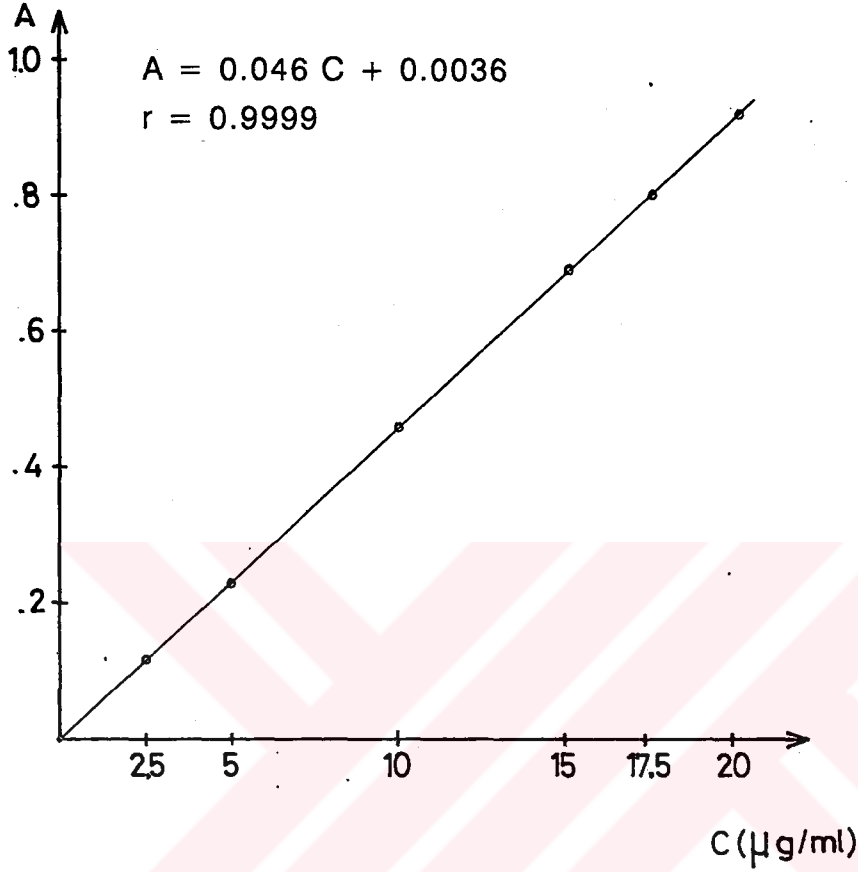
Yukarıdaki bulgular biraraya getirilerek:

Fluvoksamin maleat ile TNBS arasındaki reaksiyonun pH 8.0 borat tamponu ile etanolü ortamda TNBS/fluvoksamin maleat mol oranı 16 olması halinde, oda temperatüründe 40 dakika içerisinde kantitatif olarak tamamlandığı saptandı. Miktar tayinleri bu koşullarda gerçekleştirildi. Absorbans ölçümleri 420 nm de yapıldı.

### 3.3.2. Yöntem ve Ölçü Eğrisinin Hazırlanması

Lambert-Beer kanununun geçerli olduğu konsantrasyon aralığını saptamak ve miktar tayini yapabilmek için ölçü eğrisi hazırlandı. Bu amaçla 10 ml lik balon jodelere stok çözeltiden 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.4 ve 1.6 ml alınarak etanol ile hacmine tamamlandı. 6 farklı konsantrasyonda hazırlanan bu standard çözeltilerin herbirinden 10 ml lik balon jodelere 250  $\mu$ l kondu. Üzerine 250  $\mu$ l pH 8.0 borat tamponu çözeltisi, 250  $\mu$ l belirteç çözeltisi ve 5 ml etanol ilave edildi. Reaksiyon karışımı oda temperaturünde, karanlıkta 40 dakika bekletildikten sonra 100  $\mu$ l pH 6.0 ftalat tamponu ilave edildi ve etanol ile hacmine tamamlandı. Çözeltilerin absorbanları 420 nm de aynı koşullarda hazırlanmış boş deneme çözeltisine karşı okundu. Her bir konsantrasyon için 4 kez çalışılarak okunan absorban değerlerinin ortalaması alındı.

Absorbans değerleri ile fluvoksamin maleat konsantrasyonları arasında çizilen ölçü eğrisinin 2.5-20  $\mu$ g/ml konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu saptandı (Şekil 6).



ŞEKİL 6- Fluvoksamin maleatın TNBS ile miktar tayinine ait ölçü eğrisi.

### 3.4. TABLETLERDE FLUVOKSAMİN MALEAT MİKTAR TAYİNİ

#### 3.4.1. Geliştirilen Spektrofotometrik Yöntem İle Tayin

20 adet tablet tek tek tartılıp, ortalama tablet ağırlığı saptandı ve tabletler porselen havanda ince toz haline getirildi. 100 mg fluvoksamin maleata eşdeğer miktarda tablet tozu hassas olarak tartıldı. 25 ml etanol ile 50 ml lik balon jojeye alınıp 30 dakika

karıştırıcıda çalkalandı. Etanol ile hacmine tamamlandıktan sonra mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü, süzüntünün ilk 10 ml si atıldı. Geri kalan kısımdan 2 ml alınıp 10 ml lik balon jodede etanol ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden 250  $\mu$ l alınarak Bölüm 3.3.2. de anlatıldığı şekilde çalışıldı. Analiz işlemi 6 kez tekrarlandı. Fluvoksamin maleat miktarı daha önce hazırlanan ölçü eğrisi denklemi yardımıyla hesaplandı.

### **3.4.2. UV- Spektrofotometrik Yöntem İle Tayin (Kıyas Yöntemi I)**

Stok çözeltiden etanol ile seyreltilerek hazırlanmış fluvoksamin maleat çözeltisinden (0.5 mg/ml) 0.05-0.6 ml lik hacimler 10 ml lik balon jodelerde etanol ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltilerin absorbanları, maksimum absorbanın görüldüğü 254 nm de boş deneme çözeltisine karşı okundu.

Absorbans değerleri ile fluvoksamin maleat konsantrasyonları arasında çizilen ölçü eğrisinin 2.5-30  $\mu$ g/ml konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu saptandı ve doğru denklemi hesaplandı.

Tabletlerin analizi için 30 mg civarında fluvoksamin maleata eşdeğer tablet tozu tartıldı. 50 ml lik balon jodaye alınarak 20 ml etanolde 30 dakika çalkalandı. Aynı çözücü ile hacmine tamamlandıktan sonra mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntünün ilk 20 ml si atıldı. Geri kalan kısımdan 250  $\mu$ l alınarak 10 ml lik balon jodede etanol ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltinin absorbanı 254 nm de etanole karşı okundu. Tabletlerdeki fluvoksamin maleat miktarı ölçü eğrisi denkleminde hesaplandı.

### **3.4.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi İle Tayin (Kıyas Yöntemi II)**

Bölüm 3.4.1. de anlatıldığı gibi hazırlanan tablet tozu karışımından 10 mg fluvoksamin maleata eşdeğer tablet tozu tartıldı, 50 ml lik

balon jojeye alınarak 30 ml asetonitril ile 15 dakika ultrasonik banyoda tutuldu ve aynı çözücü ile hacmine tamamlandı. Mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü, süzüntünün ilk 10 ml si atıldı. Geri kalan çözeltinin 1 ml si, iç standart olarak seçilen nortriptilin hidroklorürün mobil fazda hazırlanmış çözeltisinin (0.2 mg/ml) 2 ml si ile 10 ml lik balon jojede karıştırılarak mobil faz çözücüsü ile hacmine tamamlandı ve süzüldü (Milipor filtre, 0.50  $\mu$ m). Bu şekilde hazırlanmış örnek çözeltisinden 5  $\mu$ l lik hacimler  $\mu$ -bondapak C<sub>18</sub> kolona injekte edildi. Mobil faz olarak asetonitril-0.025 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 4.6) (60:40) sistemi kullanıldı. Fluvoksamin ile iç standarda ait pik yükseklikleri oranı, aynı koşullarda kromatografiye edilen standard fluvoksamin maleatın iç standartla karıştırılarak hazırlanmış çözeltisi (ml sinde 0.02 mg fluvoksamin maleat ve 0.04 mg nortriptilin hidroklorür içermektedir) ile elde edilen değerlerle kıyaslanarak tabletlerin içerdiği madde miktarı aşağıdaki denklemden hesaplandı.

$$C_u = C_s \cdot \frac{r_u/r_{is}}{r_s/r_{is}} \cdot 500 \cdot 5$$

HPLC'ye injekte edilen  
örnekteki fluv.maleat  
konsantrasyonu (mg/ml) \_\_\_\_\_

Alınan tablet tozundaki fluv.maleat miktarı (mg) \_\_\_\_\_

Bir tabletteki fluv.maleat miktarı (mg) \_\_\_\_\_

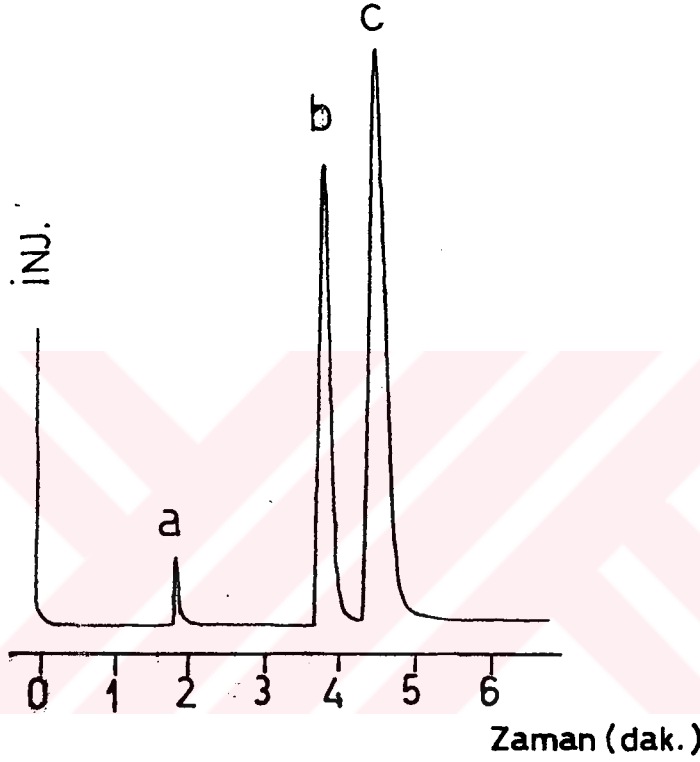
$C_s$  = Referans standardın konsantrasyonu (mg/ml)

$r_u$  = Örneğin pik yüksekliği

$r_s$  = Referans standardın pik yüksekliği

$r_{is}$  = İnternal standardın pik yüksekliği

Bu işlem aynı koşullarda 6 kez tekrarlandı. Fluvoksamin ve nortriptilin hidroklorüre ait retansiyon zamanları sırasıyla 3.40 ve 4.20 dakikadır. Retansiyon zamanı 1.50 dakika olan küçük pikin maleik aside ait olduğu standart maleik asid ile elde edilen kromatogramdan anlaşılmıştır (Şekil 7).



ŞEKİL 7- HPLC kromatogramı. a- Maleik asid, b-Fluvoksamin, c-Nortriptilin hidroklorür.

Mobil faz akış hızı: 1.2 ml/dak;

hassasiyet: 0.05 A.Ü.F.S.,

detektör: 254 nm; kağıt hızı: 1 cm/dak.



## 4. SONUÇLAR

### 4.1. GELİŞTİRİLEN YÖNTEMİN İSTATİSTİKİ DEĞERLENDİRİLMESİ

Bölüm 3.3.2. de anlatıldığı gibi çalışılarak Lambert-Beer kanununun geçerli olduğu konsantrasyon aralığı saptandı. 2.5-20 µg/ml fluvoksamin maleata eşdeğer fluvoksamin-TNP ile çalışıldığında konsantrasyon ile absorbands arasındaki bağıntının doğrusal olduğu görüldü. Yöntemden ileri gelebilecek hataların giderilmesi amacıyla bu konsantrasyon aralığında 6 farklı konsantrasyonda 4 kez aynı şekilde çalışıldı.

Ölçmelerin sonuçları, ortalama absorbands değerleri ( $\bar{A}$ ), standart sapma (s) ve bağıl standart sapma ( $s/\bar{A} \times 100$ ) değerleri Cetvel 5 de görülmektedir.

Elde edilen ölçü eğrilerinin regresyon analizinde en küçük kareler yöntemi uygulanarak en uygun doğru denklemleri aşağıdaki eşitliğe göre elde edildi.

$$A = aC + b$$

A: absorbands, a: eğim, C: konsantrasyon, b: intersept

Ölçü eğrilerinin regresyon analizi sonuçları Cetvel 6 da görülmektedir. Ortalama absorbands değerlerinden hesaplanan doğru denklemi ile her bir ölçü eğrisinin kendi absorbands değerleri kulla-

nılarak hesaplanan doğru denklemlerine ait ortalama değerler arasındaki fark çok az olduğundan tabletlerde fluvoksamin maleat tayininde ortalama absorbans değerlerinden elde edilen doğru denklemi kullanılmıştır.

**CETVEL 5- Fluvoksamin Maleatın Spektrofotometrik Tayini İçin Hazırlanan Ölçü Eğrilerine Ait Absorbans Değerleri ve Bunların İstatistik Verileri.**

No	C ( $\mu\text{g/ml}$ )	$A_1$	$A_2$	$A_3$	$A_4$	$\bar{A}$	s	$\frac{s}{\bar{A}} \times 100$
1	2.5	0.119	0.119	0.121	0.121	0.120	0.012	1.00
2	5	0.230	0.230	0.229	0.231	0.230	0.0008	0.35
3	10	0.459	0.461	0.462	0.458	0.460	0.018	0.39
4	15	0.690	0.691	0.689	0.690	0.690	0.0026	0.37
5	17.5	0.804	0.803	0.797	0.796	0.800	0.0040	0.51
6	20	0.921	0.919	0.928	0.912	0.920	0.0660	0.72

$\bar{A}$  değerlerinden hesaplanan doğru denklemi  
 $A = 0.046 C + 0.0036$   
 $r = 0.9999$

**CETVEL 6- Cetvel 5 deki Ölçü Eğrilerinin Regresyon Analizi Sonuçları.**

	1	2	3	4	Ortalama
a	0.046	0.046	0.046	0.045	0.046
b	0.0020	0.0031	0.0027	0.0064	0.0036
r	0.9999	0.9999	0.9998	0.9999	0.9999

## 4.2. GELİŞTİRİLEN YÖNTEM İLE KIYAS YÖNTEMLERİNİN İSTATİSTİKİ DEĞERLENDİRİLMESİ

50 mg fluvoksamin maleat içeren Faverin® tabletler Bölüm 3.4.1. de anlatıldığı şekilde geliştirilen spektrofotometrik yöntem ile analiz edildi. Aynı tabletler bir kez UV-spektrofotometrik olarak Bölüm 3.4.2. de anlatıldığı gibi, bir kez de HPLC yöntemi ile Bölüm 3.4.3. de anlatıldığı şekilde çalışılarak içerdikleri fluvoksamin maleat miktarı tayin edildi. Her üç yöntem ile bulunan sonuçlar ve bunların istatistiki değerlendirilmesi Cetvel 7 de görülmektedir.

Geliştirilen yöntemin kıyas yöntemleriyle ortalamalar yönünden karşılaştırılması t-testi, standart sapmalar yönünden karşılaştırılması F-testi uygulanarak yapıldı. Cetvel 8 in incelenmesinden de anlaşılacağı gibi hesaplanan t- ve F- değerleri, % 95 olasılık düzeyi ve 6 deneme için ilgili cetvellerde bildirilen değerlerden daha küçük olduğundan sonuçlar arasında anlamlı bir fark yoktur.

**CETVEL 7- Faverin Tabletlerin Analiz Sonuçları ve Sonuçların İstatistiki Değerlendirilmesi (50 mg Fluvoksamin Maleat/Tablet)**

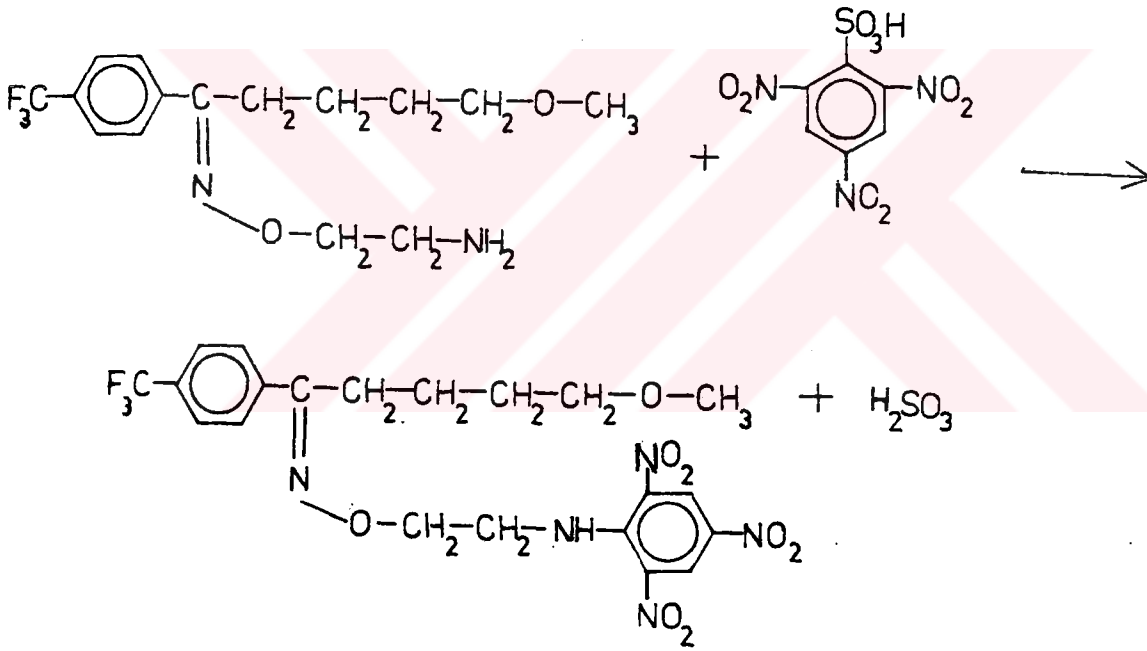
n	Spektrofotometrik Yöntem		UV-Spektrofotometrik Yöntem		HPLC Yöntemi	
	mg/tablet	%	mg/tablet	%	mg/tablet	%
1	49.89	99.78	49.46	98.92	50.07	100.14
2	50.11	100.22	49.57	99.14	50.17	100.34
3	50.22	100.44	50.11	100.22	50.22	100.44
4	50.33	100.66	50.33	100.66	50.25	100.50
5	50.55	101.10	50.78	101.56	50.51	101.02
6	50.55	101.10	50.78	101.56	50.58	101.16
$\bar{x}$	50.275	100.55	50.17	100.34	50.30	100.60
s	0.26		0.57		0.20	
$\frac{s}{\bar{x}} \times 100$	0.51		1.14		0.40	
t.s/ $\sqrt{n}$	0.270		0.60		0.21	
Güven sınırları	50.01 - 50.55		49.57 - 50.77		50.09 - 50.51	

**CETVEL 8- Analiz Sonuçlarının Ortalamalar ve Standart Sapmalar Yönünden Karşılaştırılması.**

Yöntemler	t	F
	$n_1=n_2=6$ $p=0.05$ $t=2.23$	$n_1=n_2=6$ $p=0.05$ $f=5.05$
Geliştirilen Spektrofotometrik Yöntem UV- Spektrofotometrik Yöntem	0.40	4.92
Geliştirilen Spektrofotometrik Yöntem HPLC Yöntemi	0.19	1.65

## 5. TARTIŞMA

Geliştirilen spektrofotometrik yöntem alifatik primer amin grubu içeren fluvoksamin maleat ile TNBS arasındaki nükleofilik aromatik sübstitüsyon reaksiyonuna dayanmaktadır.



TNBS ile aminler arasındaki reaksiyon genellikle alkali ortamda yürümektedir. Bu çalışmada TNBS ile fluvoksamin maleatın reaksiyonu için en iyi sonuç, pH 8.0 borat tamponu ile çalışıldığında elde edildi. Daha yüksek pH larda daha yüksek duyarlılık sağlanmasına karşın boş denemelerin absorpsanları da yükseldi. Buna sebep olarak kuvvetli alkali pH lardaki reaksiyonlar sırasında bazı

yan ürünlerin (pikrik asid gibi) meydana gelmesi gösterilmiş ve bu maddelerin absorpsiyon yaptıkları bildirilmiştir (32,37,59).

Türevin renginin dayanıklılığı da ortamın pH sından etkilenmektedir. pH 8.0 tampon çözeltisi kullanılarak reaksiyon tamamlandığında reaksiyon karışımının pH sı 9.8 olarak ölçülmüştür. Bu koşullarda çözeltinin absorpsiyonu 10 dakika dayanıklı kalıp, sonra zamana karşı giderek artmaktadır. Bunu önlemek için çözeltinin pH sınını azaltmak gerektiği düşünüldü, reaksiyonun tamamlanmasından sonra karışıma pH 6.0 ftalat tamponu katılarak çözeltinin pH sı 8.7 ye getirildi. Bu şekilde çalışılması halinde ve karanlıkta rengin en az bir saat dayanıklı kaldığı gözlemlendi. Çözeltinin renk şiddeti ise biraz azalmakta, bununla birlikte absorpsiyon değerleri analiz için yeterli duyarlılığı sağlamaktadır.

Türevin oluşumu oda sıcaklığında, 30°C, 40°C ve 50°C'lerde, zamana karşı incelendiğinde, reaksiyonun oda sıcaklığında 40 dakika içerisinde tamamlandığı görüldü. Isıtılarak yapılan çalışmalarda türevin absorpsiyonu azalırken, boş deneme absorpsiyonları artmaktadır.

Türevin kantitatif oranda oluşması için gerekli belirteç miktarı TNBS/fluvoksamini maleat mol oranı olarak incelendiğinde 16 kat belirtecin yeterli olduğu görüldü.

TNBS ile fluvoksamini 1:1 oranında birleşerek türev oluşturduğu Job'un sürekli değişim yöntemi uygulanarak saptandı.

Çeşitli çözücüler ile yapılan denemeler sonucunda maksimum absorpsiyon etanol ile 420 nm de ( $\epsilon = 2 \times 10^4$  l/mol.cm) elde edildi. Bu çözücü ayrıca türevin çözünürlüğünü de arttırdığından reaksiyon etanollü ortamda yapılmıştır.

Saptanan optimum reaksiyon koşullarında çalışılarak ölçü eğrisi hazırlandı. Absorpsiyon ile konsantrasyon arasındaki doğrusal ilişki, 2.5-20 µg/ml fluvoksamini maleat konsantrasyonları aralığında

geçerlidir. Ölçü eğrisinin regresyon analizi sonucunda bulunan doğru denklemi:  $A = 0.046 C + 0.0036$  ( $r=0.9999$ ) dir.

Geliştirilen spektrofotometrik yöntem fluvoksamin maleat içeren tabletlerin analizine uygulandı. Tabletlerdeki madde miktarı ölçü eğrisi denkleminde hesaplandı. Tabletler ayrıca kıyas yöntemiyle de analiz edildi.

Fluvoksamin maleatın gerek hammadde gerek tabletlerden analizi için farmakopelerde henüz kayıtlı bir yöntem bulunmamaktadır. Bu nedenle geliştirilen yöntemi kıyaslamak amacıyla fluvoksamin maleatın etanoldeki çözeltisinin 254 nm de maksimum absorpsiyon göstermesinden yararlanılarak UV-spektrofotometrik yöntem ile çalışıldı ve hazırlanan ölçü eğrisi denkleminde tabletlerdeki madde miktarı hesaplandı.

Geliştirilen spektrofotometrik yöntem ayrıca HPLC yöntemiyle de kıyaslandı. Bu çalışma  $\mu$ -bondapak C<sub>18</sub> kolonda, asetonitril-0.025 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (60:40) mobil faz sistemi ile, iç standart olarak nortriptilin hidroklorür kullanılarak 254 nm de UV detektör yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Tabletlerdeki madde miktarı pik yükseklikleri oranı yöntemiyle hesaplanmıştır. Bu yöntemin biyolojik sıvıların analizi için de uygun olabileceği düşünülmektedir.

Sonuçların istatistiksel değerlendirmeleri 6 deneme üzerinden standart sapma, bağıl standart sapma ve % 95 olasılık düzeyinde güven sınırları hesaplanarak yapıldı. Geliştirilen yöntemin kıyas yöntemleriyle ortalamalar yönünden karşılaştırılması t-testi, standart sapmalar yönünden karşılaştırılması F-testi uygulanarak yapıldığında anlamlı bir fark bulunmadı.

Literatürde fluvoksamin maleatın tabletlerde tayini için bir polarografik yöntem (13) kayıtlıdır. Bu yöntemin duyarlılığı geliştirilen yöntemle kıyasla çok düşüktür (43,44  $\mu$ g/ml). Fluvoksamin için bildirilen diğer çalışmaların çoğu biyolojik sıvılarda ve HPLC yöntemi ile yapılmıştır.

Geliştirilen spektrofotometrik yöntem çok basit, duyarlı ve ekonomiktir. Bağlı standart sapmasının % 1'den küçük olması tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. Oda sıcaklığında çalışılabilmesi, bir organik çözücüyle ekstraksiyon yapılmaması, absorpsiyon ölçümlerinin etanol gibi toksik olmayan ve ucuz bir çözücü ile yapılabilmesi, bu çözücüde rengin bir saat dayanıklı kalması, tekrarlanabilirliğinin yüksek olması bu yönetime bir üstünlük kazandırmaktadır. Ayrıca farmasötik preparatların analizine kolaylıkla uygulanabilmektedir.

Reaksiyon ortamı asidlendirildikten sonra türevin bir organik çözücüye alınarak çalışılması halinde geliştirilen yöntemin biyolojik sıvıların analizine de uygulanabileceği düşünülmüştür. Bu konuda çalışmalar sürdürülmektedir.





## 6. ÖZET

Bu çalışmada antidepresan etki gösteren fluvoksamin maleatın miktar tayini için 2,4,6 -trinitrobenzensülfonik asid (TNBS) ile türev oluşumuna dayanan spektrofotometrik bir yöntem geliştirildi.

Fluvoksamin maleatın içerdiği alifatik primer amin grubuyla TNBS arasındaki reaksiyon sonucu, etanolde 420 nm de maksimum absorpsiyon gösteren sarı renkli bir türev oluştu. Reaksiyon pH 8.0 de, oda temperaturünde 40 dakika içerisinde kantitatif olarak yürümektedir. Fluvoksamin maleata göre 16 kat belirteç aşırısı reaksiyonun tamamlanması için yeterli olmaktadır. Türevin çözünürlüğünü arttırmak için reaksiyon etanollü ortamda yapılmıştır. pH 6.0 ftalat tamponu ilavesinden sonra türevin rengi reaksiyon ortamında ve karanlıkta en az bir saat dayanıklı kalmaktadır. Fluvoksamin ile TNBS arasındaki stokiyometrik oranın 1:1 olduğu Job'un sürekli değişim yöntemiyle belirlendi. Bu koşullarda absorbans ile fluvoksamin maleat konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkinin 2.5-20 µg/ml arasında olduğu gözlemlendi. Ölçü eğrisine ait regresyon eşitliği  $A=0.046 C + 0.0036$ , korrelasyon katsayısı  $r= 0.9999$  dur. Bağıl standart sapmaların % 1 den küçük olması tekrarlanabilirliğin iyi olduğunu göstermektedir.

Geliştirilen spektrofotometrik yöntem, fluvoksamin maleatın tabletlerde miktar tayinine uygulandı. Sonuçlar UV-spektrofotometrik ve yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemlerle elde edilen sonuçlarla t- ve F- testleri uygulanarak istatistik olarak

kıyaslandı. Yöntemler arasında ortalamalar ve standart sapmalar yönünden % 95 olasılık düzeyinde anlamlı bir fark olmadığı saptandı.

Sonuç olarak, geliştirilen yöntem duyarlı ve spesifiktir. Isıtma ya da organik çözücü ile ekstraksiyon gerekmediğinden basittir. Fluvoksamin maleatın farmasötik analizleri için güvenle uygulanabilir.



## 7. SUMMARY

In this study a spectrophotometric method was developed for the assay of fluvoxamine maleate which exhibits antidepressant activity, by means of the derivative formed with 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS).

A yellow coloured derivative with an absorption maximum at 420 nm in ethanol was produced from the reaction between aliphatic primary amino group of fluvoxamine maleate and TNBS. Reaction was proceeded quantitatively at pH 8.0 and room temperature within 40 min. A 16 fold excess of reagent to fluvoxamine maleate was sufficient to complete the reaction. To increase the solubility of the derivative, reaction has been performed in ethanolic medium. After addition of the pH 6.0 phthalate buffer the colour intensity of the derivative was stable in reaction medium and dark for at least 1 hour. The stoichiometric ratio between fluvoxamine and TNBS was found to be 1:1 by Job's continuous variation method. At these conditions a linear correlation was observed between absorbance and fluvoxamine maleate concentration over the range of 2.5-20  $\mu\text{g/ml}$ . The regression equation of the calibration curve was  $A=0.046 C + 0.0036$  with a correlation coefficient  $r=0.9999$ . Relative standard deviations were found to be less than 1 %, indicating good reproducibility.

The proposed method was applied to the determination of fluvoxamine maleate in tablets and the results were compared statistically with those obtained by the UV-spectrophotometric and high performance liquid chromatographic methods using t- and F-tests. It was found that there was no significant difference between the methods in respect of mean values and standard deviations at 95 % confidence level.

As a result, the proposed method is sensitive and specific, because of no heating and no organic solvent extraction are needed is simple. It can be applied for the routine pharmaceutical analysis of fluvoxamine maleate confidently.



## 8. KAYNAKLAR

1. Benfield, P., Ward, A.: Fluvoxamine: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in depressive illness, *Drugs*, 32, 313-334 (1986).
2. Burton, S.W.: A review of fluvoxamine and its uses in depression, *International Clinical Psychopharmacology*, 6, 1-21 (1991).
3. Ottevanger, E.A.: The efficacy of fluvoxamine in patients with severe depression, *British Journal of Clinical Research*, 2, 125-132 (1991).
4. De Bree, H., Van der Schoot, J.B., Post, L.C.: Fluvoxamine maleate; disposition in man, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 8, 175-179 (1983). -Ref. Chem. Abstr., 99, 128243t (1983).
5. Overmars, H., Scherpenisse, P.M., Post, L.C.: Fluvoxamine maleate: metabolism in man, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 8, 269-280 (1983). -Ref. Chem. Abstr., 100, 61324p (1984).
6. Extra Pharmacopoeia, 29, 362 (1989).

7. Ruijten, H.M., Van Amsterdam, P. H., De Bree, H.: Qualitative ion-pair reversed-phase thin-layer chromatography, *J.Chromatogr.*, 252, 193-208 (1982).
8. Schuetz, H., Pielmeyer, A., Weiler, G.: Thin layer chromatographic screening of 500 toxicologically relevant substances by corrected R<sub>f</sub> values (R<sub>f</sub><sup>c</sup> values) in two systems, *Aerzt. Lab.*, 36, 113-123 (1990). -Ref. Chem. Abstr., 113, 110560 s (1990).
9. Ojanpera, I., Lillsunde, P., Vartiovaara, J., Vuori, E.: Screening for amphetamines with a combination of normal and reversed phase thin layer chromatography and visualization with Fast Black K salt, *J.Planar Chromatogr. -Mod TLC*, 4, 373-378 (1991). -Ref. Chem.Abstr., 116, 167942 j (1992).
10. Minder, E.I., Schaubhut, R., Minder, C.E., Vonderschmitt, D.J.: Identification of drugs in human serum by high performance liquid chromatography with photodiode array detection and a search algorithm for ultraviolet spectra, *J. Chromatogr.*, 419, 135-154 (1987).
11. Turcant, A., Premel - Cabic A., Cailleux, A., Allain, P.: Toxicological screening of drugs by microbore high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection and ultraviolet spectral library searches, *Clin. Chem.*, 37, 1210-1215 (1991).
12. Foda, N. H.: Compatibility study between fluvoxamine maleate, mebeverine hydrochloride and tablet excipients using differential scanning calorimetry, *J.Pharm.Sci.*, 33, 73-81 (1992). -Ref. Chem.Abstr., 117, 219850 v (1992).
13. Albert, K.: Polarographic determination of fluvoxamine maleate in tablets, *Deutschen Arzneimittel-Codex*, 3, 59-61 (1990). -Ref. Anal.Abstr., 54, 5G37 (1992).

14. Foglia, J. P., Birder, L.A., Perel, J.M.: Determination of fluvoxamine in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *J.Chromatogr.*, 495, 295-302 (1989).
15. Van der Meersch-Mougeot, V., Diquet, B.: Sensitive one-step extraction procedure for column liquid chromatographic determination of fluvoxamine in human and rat plasma, *J.Chromatogr.*, 567, 441-449 (1991).
16. Härtter, S., Wetzell, H., Hiemke, C.: Automated determination of fluvoxamine in plasma by column-switching high performance liquid chromatography, *Clin.Chem.*, 38, 2082-2086 (1992).
17. De Jong, G.J.: The use of a pre-column for the direct high-performance liquid chromatographic determination of the antidepressants clovoxamine and fluvoxamine in plasma, *J.Chromatogr.*, 183, 203-211 (1980).
18. De Jong, G.J., Zeeman, J.: Potential of pre-columns to improve detection properties in high-performance liquid chromatography, *Chromatographia*, 15, 453-458 (1982). - *Ref. Anal. Abstr.*, 44, 1D57 (1983).
19. Schweitzer, C., Spahn, H., Mutschler, E.: Fluorimetric determination of fluvoxamine or clovoxamine in human plasma after thin-layer chromatographic or high-performance liquid chromatographic separation, *J.Chromatogr.*, 382, 405-411 (1986).
20. Pommery, J., Lhermitte, M.: High-performance liquid-chromatographic determination of fluvoxamine in human plasma, *Biomed. Chromatogr.*, 3, 177-179 (1989). - *Ref. Anal. Abstr.*, 52, 11D51 (1990).

21. Pullen, R.H., Fatmi, A.A.: Determination of fluvoxamine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J.Chromatogr.*, 574, 101-107 (1992).
22. Kwakman, P.J.M., Koelewijn, H., Kool, I., Brinkman, U.A.T., De Jong, G.J.: Naphthalene-and anthracene-2,3-dialdehyde as precolumn labelling reagents for primary amines using reserved- and normal-phase liquid chromatography with peroxyoxalate chemiluminescence detection, *J. Chromatogr.*, 511, 155-166 (1990).
23. Okuyama, T., Satake, K.: On the preparation and properties of 2,4,6-trinitrophenyl-amino acids and - peptides, *J.Biochem.*, 47, 454-466 (1960).
24. Kotaki, A., Harada, M., Yagi, K.: Reaction between sulfhydryl compounds and 2,4,6-trinitrobenzene-1-sulfonic acid, *J.Biochem. (Tokyo)*, 55, 553-561 (1964). -Ref. Chem. Abstr., 61, 5756 f (1964).
25. Azegami, M., Iwai, K.: Specific modification of nucleic acids and their constituents with the trinitrophenyl group, *J. Biochem. (Tokyo)*, 55, 346-348 (1964). -Ref. Chem. Abstr., 61, 2098 h (1964).
26. Azegami, M., Iwai, K.: Trinitrophenylation of nucleic acids and their constituents, *J.Biochem. (Tokyo)*, 78, 409-420 (1975). -Ref. Chem. Abstr., 83, 143197 u (1975).
27. La Rue, T.A.: Detection of acyl hydrazides on paper chromatograms, *J.Chromatogr.*, 32, 784-785 (1968).
28. Waring, J.J., Bolton, W.: 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid as a color reagent for amino acid analysis, *Colloq. Amino Acid Anal.*, 5, 30-34 (1967). -Ref. Chem. Abstr., 70, 26246 e (1969).



- 
29. Philpott, D.: Thin-layer chromatography of trinitrophenyl derivatives of amino acids in urine and plasma, *J.clin.Path.*, 23, 315-318 (1970). -Ref. *Anal. Abstr.*, 21, 1368 (1971).
  30. Wilson, C., Kibler, R.F., Shapira, R.: Analysis with trinitrobenzenesulfonic acid of peptides separated on paper, *Anal. Biochem.*, 35, 371-376 (1970). -Ref. *Chem.Abstr.*, 73, 63027 s (1970).
  31. Groendahl-Hansen, J., Huang, J.Y., Nielsen, L.S., Andreasen, P.A., Danoe, K.: General detection of proteins after electroblotting by trinitrobenzene sulfonic acid derivatization and immunochemical staining with a monoclonal antibody against the trinitrophenyl group, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 12, 51-56 (1986). -Ref. *Chem.Abstr.*, 104, 31341 g (1986).
  32. Satake, K., Okuyama, T., Ohashi, M., Shinoda, T.: The spectrophotometric determination of amine, amino acid and peptide with 2,4,6-trinitrobenzene-1-sulfonic acid, *J.Biochem.*, 47, 654-660 (1960).
  33. Satake, K., Take, T., Matsuo, A., Tazaki, K., Hiraga, Y.: Amino acid analyzer using 2,4,6- trinitrobenzenesulfonic acid, *J.Biochem. (Tokyo)*, 60, 12-16 (1966). -Ref. *Chem.Abstr.*, 65, 14083 g (1966).
  34. Matsuo, A. : Autoanalysis of amino acids with 2,4,6-trinitrobenzene-1-sulfonic acid, *Seikagaku*, 38, 335-345 (1966). -Ref. *Chem.Abstr.*, 67, 71038 n (1967).
  35. Palmer, D.W., Peters, T.Jr.: Automated determination of free amino groups in serum and plasma using 2,4,6-trinitrobenzenesulfonate, *Clin. Chem.*, 15, 891-901 (1969). *Ref. Chem. Abstr.*, 71, 120375 p (1969).

36. Rutter, E.R.: Automated method for screening urine for amphetamine and some related primary amines, *Clin.Chem.*, 18, 616-620 (1972).
37. Holm, K.A.: Automated colorimetric determination of acid proteinase activity in fermentation samples using a trinitrobenzenesulphonic acid reagent, *Analyst*, 105, 18-24 (1980).
38. Kakade, M.L., Liener, I.E.: Determination of available lysine in proteins, *Analyt. Biochem.*, 27, 273-280 (1969). -Ref. *Anal.Abstr.*, 18, 3342 (1970).
39. Goodwin, J. F., Choi, S. Y.: Quantification of protein solutions with trinitrobenzenesulfonic acid, *Clin.Chem.*, 16, 24-31 (1970). -Ref. *Chem.Abstr.*, 72, 129284 m (1970).
40. Snyder, S. L., Sobocinski, P. Z. : Improved 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines, *Anal. Biochem.*, 64, 284-288 (1975). -Ref. *Chem. Abstr.*, 82, 151639 j (1975).
41. Perl Molnar, I., Thanouso, F., Vitanyi, G.M.: Reaction of amino acids, peptides and proteins with trinitrobenzenesulfonic acid: analytical applications of the interactions, *Magy. Kem. Foly.*, 92, 514-524 (1986). -Ref. *Chem. Abstr.*, 109, 19696 x (1988).
42. Dymond, L.C., Russell, D.W.: Rapid determination of isoniazid in whole blood with 2,4,6 - trinitrobenzenesulphonic acid, *Clin. Chim. Acta*, 27, 513-520 (1970). -Ref. *Anal. Abstr.*, 20, 1848 (1971).
43. Obata, F., Ushiwata, A., Nakamura, Y.: Spectrophotometric assay of monoamine oxidase using 2,4,6-trinitrobenzene-1-sulfonic acid, *J.Biochem. (Tokyo)*, 69, 349-354 (1971). -Ref. *Chem. Abstr.*, 74, 120382 a (1971).

- 
44. Benjamin, D.M., McCormack, J.J., Gump, D.W.: Use of newer amino group reagents for the detection and determination of kanamycin, *Anal. Chem.*, 45, 1531-1534 (1973).
  45. Velichko, T. I., Katrukha, G. S., Nifontova, M. A. : Determination of antibiotics immobilized on insoluble collagen-based materials, *Khim. Prir. Soedin.*, 3, 408-412 (1989). -Ref., *Chem. Abstr.*, 111, 160139 r (1989).
  46. Hall, R.J., Trinder, N., Givens, D.I.: Observations on use of 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid for the determination of available lysine in animal protein concentrates, *Analyst (London)*, 98, 673-686 (1973). -Ref. *Anal. Abstr.*, 26, 2362 (1974).
  47. Hall, R.J., Henderson, K. : An improvement in the determination of available lysine in carbohydrate-rich samples, *Analyst*, 104, 1097-1100 (1979).
  48. Obi, I.U.: Application of the 2,4,6-trinitrobenzene-1-sulphonic acid (TNBS) method for determination of available lysine in maize seed, *Agric. Biol. Chem.*, 46, 15-20 (1982). -Ref. *Anal. Abstr.*, 43, 3G7 (1982).
  49. Charteris, A., John, R. : Assay of dopamine using trinitrobenzenesulfonic acid, *Anal. Biochem.*, 66, 365-371 (1975). -Ref. *Chem. Abstr.*, 83, 4201 c (1975).
  50. Pietta, P. G., Agnellini, D., Pace, M. : Colorimetric determination of 1-(4'-nitrophenyl)-2-aminopropane-1,3-diol with 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid in the presence of chloramphenicol, *J. Pharm. Sci.*, 68, 1565-1566 (1979).
  51. Ersoy, L. : A spectrophotometric method for the determination of baclofen, *Pharmazie*, 40, 803-804 (1985).

52. Atmaca, S.: Spectrophotometric determination of tranexamic acid with 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid, Acta Pharm. Turc., 31, 115-118 (1989).
53. Qi, X. Y., Keyhani, N.O., Lee, Y.C.: Spectrophotometric determination of hydrazine, hydrazides and their mixtures with trinitrobenzenesulfonic acid, Anal. Biochem., 175, 139-144 (1988).
54. Atmaca, S., İskender, G.: TLC densitometric determination of tranlycypromine after derivatization with 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid, Acta Pharm. Turc., 31, 153-156 (1989).
55. Gatt, S., Nahas, N., Fibach, E.: Continuous spectrofluorimetric measurements of uptake by cultured cells of 12-(1-pyrene)-dodecanoic acid from its complex with albumin, Biochem. J., 253, 377-380 (1988).
56. Fabregas, J.L., Beneyto, J.E.: Simultaneous determination of cephalexin and lysine in their salt using high-performance liquid chromatography of derivatives, J.Pharm.Sci., 69, 1378-1380 (1980).
57. Kabra, P. M., Bhatnager, P. K., Nelson, M. A.: Liquid chromatographic determination of amikacin in serum with spectrophotometric detection, J.Chromatogr., 307, 224-229 (1984).
58. Wallace, G.R., McLeod A., Chain, B.M.: Chromatographic analysis of the trinitrophenyl derivatives of insulin, J. Chromatogr., 427, 239-246 (1988).
59. Gürkan, T., Özdemir, O. : Simultaneous determination of TNP - derivatized Dopamine, Noradrenaline and 5-hydroxytryptamine in rat brain tissue by high-performance liquid chromatography, Sci.Pharm., 56, 97-103 (1988).

- 
60. Hullin, F., Kim, H.Y., Salem, N.Jr.: Analysis of amino phospholipid molecular species by high performance liquid chromatography, *J.Lipid. Res.*, 30, 1963-1975 (1989). -Ref. Chem. Abstr., 112, 175006 q (1990).
61. Gaiind, V. S., Jedrzejczak, K., Huang, L., Vohra, K.: Determination of 2 - methylaziridine in workplace atmospheres, *Analyst*, 115, 925-928 (1990).
62. Freedman, R.B., Radda, G.K.: The reaction of glutamate dehydrogenase with 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid, *Biochem. J.*, 108, 5P (1968).
63. Schwerdtfeger, E. : Automated kinetic determination of enzyme activities and constituents of plants, 2. Determination of amino acids, *Z. Lebensm. -Unters. Forsch.*, 156, 266-270 (1974). -Ref. Chem. Abstr., 82, 40313 d (1975).
64. Kurono, Y., Ichioka, K., Mori, S., Ikeda, K.: Kinetic study on rapid reaction of trinitrobenzenesulfonate with human serum albumin, *J.Pharm.Sci.*, 70, 1297-1298 (1981).
65. Mirgorodskaya, O. A., Poletaeva, L. V., Evtikhieva, T.A.: Estimation of reactivity of amino groups of some proteins, *Khim. -Farm.Zh.*, 21, 12-17 (1987). -Ref. Chem. Abstr., 106, 134723 d (1987).
66. Sarantonis, E.G., Diamandis, E.P., Karayannis, M.I.: Kinetic study of the reaction between trinitrobenzenesulfonic acid and amino acids with a trinitrobenzenesulfonate ion-selective electrode, *Anal. Biochem.*, 155, 129-134 (1986).
67. Sarantonis, E.G., Karayannis, M.I.: Use of a trinitrobenzene sulphonate electrode for the kinetic determination of copper (II) and reducing sugars, *Analyst*, 115, 977-980 (1990).

68. Qian, X., Jiang, Q., Ma, Y., Hu, Z.: Preparation and application of trinitrobenzene sulfonate selective electrode, *Youji Huaxue*, **8**, 454-456 (1988). -Ref. Chem. Abstr., 110, 107335 e (1989).
69. Wentzell, P.D., Karayannis, M.I., Crouch, S.R.: Simultaneous kinetic determinations with the Kalman filter, *Anal. Chim. Acta*, 224, 263-274 (1989).
70. Al-Hajjaji, M.A.: The application of 2,4,6- trinitrobenzene-1-sulfonic acid in the differential pulse polarographic determination of amines, *Anal. Chim. Acta*, 181, 227-234 (1986).
71. Majima, T., Ishida, N.: Determination of human peripheral blood monocytes by luminescence immunoassay, *Jpn. Kokai. Tokyo, Koho JP*, 138, 459 (1989).
72. Remington's Practice of Pharmacy, eighth Edition, (1942) s. 547.
73. The British Pharmacopoeia (BP), The University Press, Cambridge (1988).
74. Meites, L.: Handbook of Analytical Chemistry, (Sec. 11-7) Mc Graw-Hill Book Company, Inc., U.S.A. (1963).
75. Job, P.: Formation and stability of inorganic complexes in solution, *Ann. Chim.*, 9, 113 (1928). -Ref. Chem. Abstr., 22, 2120 (1928).