

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ELAZIĞ YÖRESİNDE SATILAN SÜZME BALLARDA
TÜREY SPEKTROFOTOMETRİ İLE OKSİTETRASİKLİN VE
SÜLFAMEZATİN TAYİNİ

Meral TURABİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Tez Yöneticisi : Prof.Dr.Türker AŞAN

ELAZIĞ
1995

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ELAZIĞ YÖRESİNDE SATILAN SÜZME BALLARDA
TÜREV SPEKTROFOTOMETRİ İLE OKSİTETRASİKLİN VE
SÜLFAMEZATIN TAYİNİ

Meral TURABİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu Tez, /0 /1995 Tarihinde, Aşağıdaki Belirtilen Jüri Tarafından
Oybirliği/ Oyçokluğu ile Başarılı/Başarısız Olarak Değerlendirilmiştir.

(İmza)

(İmza)

(İmza)

Danışman :

Prof.Dr.Türker AŞAN

ÖZET**Yüksek Lisans Tezi****ELAZIĞ YÖRESİNDE SATILAN SÜZME BALLARDA
TÜREV SPEKTROFOTOMETRİ İLE OKSİTETRASİKLİN VE
SÜLFAMEZATİN TAYİNİ****Meral TURABİK****Fırat Üniversitesi****Fen Bilimleri Enstitüsü****Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı**

1995, Sayfa 61

Oksitetrasiklin (OTC), sülfamazatin (SM) ve karışımları türev spektroskopisi yöntemiyle analizlenmiştir. pH= 4.8 asetat tamponuyla hazırlanan farklı konsantrasyon ve oranlarda OTC ve SM içeren sulu saf çözeltilerde, spektrumun 2^o türevi kullanıldığında, absorbans hataları ve ilaçların etkileşimi elimine edilerek, 230.5 nm de OTC'nin 239.5 nm de SM'in tayini yapılmıştır. Kalibrasyon eğrileri 4-16 ppm OTC ve 2-12 ppm SM düzeylerine kadar lineerdir. Farklı konsantrasyonlardaki OTC ve SM ile farklı OTC/SM karışımları % 90-96 düzeylerinde geri kazanılabilmektedir.

Balda OTC ve SM analizi için alınacak optimum bal örneği miktarı 0.5 g. dır. Spektrum 2° türevi 370 nm de OTC'nin, 1° türev ve 252 nm'de SM'in tayini, ön ayırma işlemlerine gerek kalmadan yapılabilmektedir. 8-20 ppm düzeylerinde bala eklenen ilaçların geri kazanılma oranları OTC için % 91-93 ve SM için % 94-98'dir. OTC + SM'i birlikte içeren bal örneklerinde OTC/SM oranı 1:1-3:1 aralığında, OTC geri kazanma oranı %90-95, SM/OTC oranı 1:1-1:3 aralığında ise %95-96 dır.

Özgeçmişini bilinmeyen bal örneklerinde standart ekleme yöntemiyle spektrum 2° türevi 230.5 nm de OTC ve 1° türev 254.6 nm de SM tayin edilebilmektedir.

SUMMARY**Masters Thesis****Determination of Oxytetracycline and
Sulphamezathine in Honey Sold in Elazığ Region
by Derivative Spectrophotometry****Meral TURABIK****Firat University****Graduate School of Natural and Applied Sciences****Department of Chemical Engineering**

1995, Page 61

Oxytetracycline (OTC), sulphamezathine and binary mixtures can be resolved by derivative spectrometry. In aqueous solutions (pH=4.8), OTC was determined at 230.5 nm using the 2° derivative and SM at 239.5 nm from the 2° derivative and thereby absorbance effects and the interaction between 2 compounds were eliminated.

The optimum amount of sample to be used for the analysis of honey containing OTC and SM was 0.5 g.

2° derivative and 370 nm was used for OTC and 252 nm 1° derivative was used determining the recoveries of OTC and SM added to honey.

In honey samples of which history is unknown, OTC was determined by standard addition procedure at 230.5 nm using the 2^o derivative while SM was determined at 254.6 nm using 1^o derivative.

The method does not require any separation procedure. The recoveries were over 90%.

Key Words :Oxytetracycline, sulphamezathine, honey analysis, derivative spectrophotometry, spectroscopy.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı yöneten ve çalışma boyunca büyük teşvik, yardım ve ilgilerini gördüğüm Prof.Dr.Türker AŞAN'a, sağladığı olanaklarla çalışmanın laboratuvarında gerçekleşmesini mümkün kılan Prof.Dr.Egüp ÖZDEMİR'e ve değerlendirme aşamasındaki büyük katkıları için Prof.Dr.Şeref KUNÇ'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	I
SUMMARY.....	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
ŞEKİLLER.....	IX
TABLolar.....	XII
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİ.....	4
2.1. Bal.....	4
2.1.1. Tanımı.....	5
2.1.2. Sınıflama ve Kalite Faktörleri.....	6
2.2. Yavru Çürüğü Hastalığı(Foulbrood).....	8
2.3. Oksitetra siklin ve Sülfamezatin.....	9
2.3.1. Oksitetrasiklin.....	9
2.3.2. Sülfamezatin.....	9
2.4. Spektroskopi.....	10
2.4.1. UV-Spektroskopisi.....	11
2.4.2. UV-Bölgesinde Soğurma.....	12
2.4.3. Lambert-Beer Yasası.....	12
2.4.4. UV-Spektroskopisi Uygulama Alanları.....	14
2.4.5. UV-Bölge Türev Spektroskopisi.....	15
2.5. Uluslararası ve Ulusal Çalışmalar.....	18

3. MATERYAL VE METOD.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Bal.....	23
3.1.2. İlaçlar ve Kimyasal Maddeler.....	23
3.1.3. Ekipman.....	24
3.2. Metod.....	24
3.2.1. İlaç Çözeltilerinin Hazırlanması.....	24
3.2.2. Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması.....	24
3.2.3. Çalışma Koşullarının Optimizasyonu.....	26
3.2.3.1. Maksimum Absorbsiyon Dalga Boyunun Seçimi.....	26
3.2.3.2. Uygun pH ve Tamponun Belirlenmesi.....	26
3.2.3.3. Konsantrasyonun Lineer Tayin Sınırlarının Belirlenmesi.....	27
3.2.3.4. Spektrofotometre Parametrelerinin Seçimi.....	27
3.2.4. Sulu Saf Çözeltilerde OTC veya SM Tayini.....	27
3.2.5. OTC+SM İçeren Sulu Saf Çözeltilerde İki İlacın Birlikte Normal Spektrum Yardımıyla Tayini.....	28
3.2.6. OTC+SM İçeren Çözeltilerde Türev Spektrumu Yardımıyla İki İlacın Birlikte Tayini.....	28
3.2.7. Balda OTC,SM ve OTC+SM Tayini.....	29
3.2.7.1. Analizde Kullanılacak Bal Miktarının Belirlenmesi.....	29
3.2.7.2. Dalga Boyu Seçimi.....	29
3.2.7.3. OTC+SM İçeren Balda OTC ve SM Tayini.....	30
3.2.8. OTC+SM İçeren Balda OTC ve SM'in Geri Kazanılması.....	30
3.2.8.1. Dalga Boyu Seçimi.....	30
3.2.8.2. OTC+SM İçeren Balda OTCve SM'in Geri Kazanılma Miktarlar	30

4. BULGULAR

4.1. OTC Spektrum Yardımıyla İki e SM'in Normal Spektrumları.....	31
4.2. pH ve Tamponun Etkisi.....	32
4.3. Saf OTC ve SM İçeren Çözeltilerin Analiz Koşulları.....	35
4.4. OTC ve SM'i Tek Başına İçeren Çözeltilerde Miktar Tayini.....	35
4.5. OTC+SM İçeren Çözeltilerde Normal Spektrum Yardımıyla İki İlacın Birlikte Tayini.....	37
4.6. Türev Spektrumu Yardımıyla OTC+SM İçeren Çözeltilerde İki İlacın Birlikte Tayini.....	38
4.7. OTC+SM İçeren Balda Türev Spektrumu Yardımıyla İki İlacın Birlikte Tayini.....	42
4.7.1. Bal Örneği Miktarı	42
4.7.2. Dalga Boyu Seçimi.....	43
4.7.3. Bal Örneklerindeki OTC ve SM'in Miktarlarının Belirlenmesi.....	45
4.8. OTC ve SM'in Geri Kazanılması.....	48
4.8.1. Dalga Boyu Seçimi.....	49
4.8.2. Konsantrasyon-Absorbans İlişkisi.....	50
4.8.3. OTC ve SM'in Geri Kazanılma Miktarları.....	52

5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	55
--------------------------	----

6.KAYNAKLAR.....	57
------------------	----

ŞEKİLLER

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Oksitetrasiklin.....	9
Şekil 2.2. Sulfamezatin.....	10
Şekil 2.3. Normal ve 1 ^o -4 ^o Türev Spektrumlar.....	16
Şekil 2.4. İki Maddenin Karışımlarının Normal ve 2 ^o Türev Spektrumları.....	17
Şekil 2.5. (X),(Y) Maddeleri ve Bunların (X+Y) Normal ve 1 ^o -2 ^o Türev Spektrumları.....	17
Şekil 2.6. Kantitatif Pik Yüksekliği Ölçümü.....	18
Şekil 4.1. 12 ppm OTC ve 6 ppm SM Çözeltilerinin 200-400 nm Aralığında Spektrumları.....	31
Şekil 4.2. 20 ppm OTC Çözeltisinin Farklı pH'larda Spektrumu.....	32
Şekil 4.3. 20 ppm SM Çözeltisinin Farklı pH'larda Spektrumu.....	33
Şekil 4.4. Çeşitli pH'larda Asetat Tamponu İle Hazırlanan 6 ppm OTC ve 6 ppm SM İçeren Çözeltilerin Maksimum Dalga Boylarında Absorbans Değerleri.....	34
Şekil 4.5. Çeşitli pH'larda Sitrat Tamponu İle Hazırlanan 6 ppm OTC ve 6 ppm SM İçeren çözeltilerin Maksimum Dalga Boylarında Absorbans Değerleri.....	34
Şekil 4.6. 4-16 ppm OTC İçeren Çözeltilerin Spektrumları.....	35
Şekil 4.7. 4-10 ppm SM İçeren Çözeltilerin Spektrumları.....	36
Şekil 4.8. 275 nm'de OTC Kalibrasyon Grafiği.....	36

Şekil 4.9. 262 nm'de SM Kalibrasyon Grafiği.....	37
Şekil 4.10. 12 ppm OTC,6 ppm SM ve 12 ppm OTC+6 ppm SM İçeren Çözeltilerin Spektrumları.....	38
Şekil 4.11. OTC,SM veOTC+SM İçeren Çözeltilerin 2° Türev Spektrum Kalibrasyon Grafiği.....	39
Şekil4.12. Değişik Konsantrasyonlarda OTC İçeren Çözeltilerin 2° Türev Spektrumları.....	40
Şekil 4.13. Değişik Konsantrasyonlarda SM İçeren Çözeltilerin 2° Türev Spektrumları.....	40
Şekil4.14. OTC+SM İçeren Çözeltilerde OTC Tayini İçin 230.5 nm'de 2° Türev Spektrum Kalibrasyon Grafiği.....	41
Şekil 4.15. OTC+SM İçeren Çözeltilerde SM Tayini İçin 239.5 nm'de 2° Türev Spektrum Kalibrasyon Grafiği.....	41
Şekil 4.16. Farklı Miktarlarda Bal İçeren Çözeltilerin Spektrumları.....	43
Şekil 4.17. Bal,OTC veSM'in 220-240 nm Aralığında 2° Türev Spektrumları.....	44
Şekil 4.18. Bal, OTC ve SM'in 245-263 nm Aralığında 1° Türev Spektrumları.....	44
Şekil 4.19. 4- 16 ppm OTC ve SM İçeren Bal Örneklerinin 220-250 nm Aralığında 2° Türev Spektrumları.....	45
Şekil 4.20.4- 16 ppm OTC ve SM İçeren Bal Örneklerinin 240-270 nm Aralığında 1° Türev Spektrumları	46

Şekil 4.21. (A) Marka Kodlu Bal'da, 2° Türev Spektrumunda 230.5 nm de OTC Miktarının Tesbit Edildiği Kalibrasyon Grafiği.....	47
Şekil 4.22. (A) Marka Kodlu Bal'da, 1° Türev Spektrumunda 254.6 nm de SM Miktarının Tesbit Edildiği Kalibrasyon Grafiği.....	47
Şekil 4.23. Bal, OTC ve SM'in 340-400 nm Aralığında 2° Türev Spektrumları (OTC'in Geri Kazanılması İçin Dalga Boyu= 370 nm, Bal= 0, SM=0).....	49
Şekil 4.24. 8-20 ppm OTC İçeren Bal Örneklerinin 370 nm'de 2° Türev Spektrumları.....	50
Şekil 4.25. 4-16 ppm SM İçeren Bal Örneklerinin 252 nm'de 1° Türev Spektrumları.....	51
Şekil 4.26. Değişik Oranlarda OTC ve SM İçeren Bal Örneklerinin 370 nm'de 2° Türev Spektrumları.....	51
Şekil 4.27. Değişik Oranlarda OTC ve SM İçeren Bal Örneklerinin 252 nm'de 1° Türev Spektrumları.....	52
Şekil 4.28. OTC+SM İçeren Bal Örneklerinde OTC'in Geri Kazanılması İçin 2° Türev 370 nm'de Saf OTC'in Kalibrasyon Grafiği.....	53
Şekil 4.29. OTC+SM İçeren Bal Örneklerinde SM'in Geri Kazanılması İçin 1° Türev 252 nm'de Saf SM'in Kalibrasyon Grafiği.....	53

TABLOLAR

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Balın Ortalama Kompozisyonu.....	4
Tablo 2.2. 1965 Yılında Bazı Ülkelerin Kovan Varlığı ve Bal Üretimi.....	5
Tablo 2.3. Gıda Tüzüğü ve bal Standardında Balın Yapısal Kriterleri.....	7
Tablo 3.1. Farklı pH'larda Asetat Tamponu Hazırlanmasında Kullanılan CH_3COOH ve $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$ Çözeltisi Miktarları.....	25
Tablo 3.2. Farklı pH'larda Sitrat Tamponu Hazırlanmasında Kullanılan $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ve $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Çözeltisi Miktarları.....	26
Tablo 4.1. OTC ve SM Tayin Koşulları.....	35
Tablo 4.2. OTC + SM İçeren Çözeltilerde Geri Kazanma Deney Bulguları.....	42
Tablo 4.3. Bal Örneklerinde Bulunan OTC Miktarları ve Regrasyon Denklemleri	48
Tablo 4.4. Bal Örneklerinde Bulunan SM Miktarları ve Regrasyon Denklemleri.....	48
Tablo 4.5. Bala İlave Edilen OTC ve SM'in Geri kazanılma Oranları.....	54

1. GİRİŞ

Mısır Piramitleri'nin yapımından bu yana bal, önemli gıdalar arasında yer almıştır (Sevimli ve ark. 1992). Günümüzde balın önemi, yalnızca beslenme açısından değil aynı zamanda çevre kirlenmesi indikatörü olması nedeniyle artmıştır (Sevimli ve ark. 1992, Miguel ve ark. 1991, Sancho ve ark. 1992). Buna bağlı olarak balın coğrafi kaynağı, polen tipleri, kompozisyonu, besleyici değeri ve kalitesi, yapılan tağsis ve hileler ile kirlilik düzeyi konularına ilgi duyan araştırmacıların ve uluslararası örgütlerin sayısı gün geçtikçe çoğalmaktadır (Codex 1970, Sancho ve ark, 1992 b, Muino ve Lozano 1991, Hemmerling 1987, Seijo ve ark 1992, Railonsala 1990, Campos, 1989, Salinas ve ark. 1991). Bu arada WHO, FAO ve AOAC gibi uluslararası kuruluşlarca önerilen standart analitik yöntemlerin güvenilirliği yeniden değerlendirilmekte, yeni geliştirilen yöntemlerin rutin çalışmalarda kullanımı yaygınlaşmaktadır (Miguel ve ark. 1991, Muino ve Lozano 1991, Hemmerling 1987, Nevado ve ark. 1991, Molzahn ve Werthmüller, 1993).

Tetrasiklin ve türevleri (oksitetrasiklin, klortetrasiklin, doksisiklin vb) bakteriostatik ve antibiyotik ilaçlar olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Aynı şekilde sulfanamidlerden (sülfamezatin, sulfametaksol vb.) çeşitli hastalıkların tedavisinde yararlanılmaktadır. Bu ilaçlar arıcılar tarafından, balarılarındaki (*Apis mellifera* L.) Amerikan ve Avrupa tipi yavru çürüğü hastalığının kontrolünde kullanılmaktadır. Arı kolonilerinin tedavisinde ilaçlar tek başlarına yada karışım olarak, arıların yiyeceklerine ilacın ilavesi şeklinde kullanılmaktadır (DİF, 1995).

Bu nedenle, gıdalarda istenmeyen kalıntı riski yaratmalarının yanısıra hassas kişilerde toksik ve allerjik reaksiyonlara sebep olduklarından dolayı, ilaçların analitik olarak kontrolleri gerekmektedir. Öte yanda, sağlık otoriteleri gıdalarla ilaç kalıntısı bulunmaması hususunda ısrarlı olduklarından birçok ülkede ithal ballardan, ilaç içermediğini gösteren sertifika istenmektedir (Salinas ve ark. 1991, Nevado ve ark. 1991).

Son yıllarda, gıdalarda ilaç kalıntılarının tayini için birçok metot önerilmiş ve geliştirilmiştir (mikrobiyolojik, gaz kromatografik, HPLC vb.) (Miguel ve ark. 1991, Muino ve Lozano 1991, Hemmerling, 1987, Nevado ve ark. 1991, Salinas ve ark. 1991). Bu yöntemlerin, ön işlem gerektirme, hassaslığının sınırlı olması, uzun zaman istemesi ve aşırı maliyet gibi kısıtlayıcı noktaları vardır.

Türev spektrometrisi yönteminin, spektrumları üstüste çakışan karışımları ayırmada büyük uygulama alanı olduğu gibi, hassaslık ve ön işlem gerektirmeme gibi avantajları bulunmaktadır. İncelenen uluslararası literatürde baldaki ilaç miktarının tayininde yöntemin kullanıldığı görülmüştür (Salinas ve ark. 1991).

Ülkemizde, gıdalardaki ilaç miktarlarının belirlenmesiyle ilgilenen araştırmacı ve yayın sayısı yok denecek kadar azdır. Bu konuda çalışan araştırmacıların da mikrobiyolojik yöntemleri tercih ettikleri görülmektedir. Balla ilgili tüm araştırma sayısı ise birkaçı geçmemektedir. Oysa "apimycin", "tetramezatin", "fumidil-A", "fumidil-B" gibi ticari adlarla reçetesiz olarak satılan ve etken madde olarak antibiyotik-sülfonamid

içeren ilaçların Elazığ yöresinde bile arıcılar tarafından yaygın olarak kullanıldığı gözlenmektedir (Yapar, 1995).

Bu çalışmanın amacı oksitetrasiklin ve sülfamezatinin ayrı ayrı ve karışımlarda birlikte tayini için türev spektrofotometrisi yönteminin denenmesi, Elazığ yöresinde satılan süzme ballarda bu ilaçların tayininde yöntemin kullanılabilirliğinin saptanmasıdır.



2. LİTERATÜR BİLGİ

2.1. Bal

Arı (*Apis mellifera*) ve balın başlangıç tarihine ait tahminler, Fransa'da 3. devir tabakalarında bulunan bir arı fosiline kadar uzanmaktadır. İlk tatminkar belgeler ise dört bin yıl öncesine aittir. Asya'daki arıcılık hakkında elde edilen ilk vesika Orta Anadolu'daki kazılarda ortaya çıkarılan Hitit Kanunu'dur ve bu kanunun son iki maddesi arıcılıkla ilgilidir (Tetik, 1968).

Arının esas ürünü olan bal, besleyici ve sağlık verici özellikleriyle büyük bir öneme sahiptir (Şenocak, 1971, Tablo 2.1). Balın yanısıra, yavru larvaları beslemek üzere işçi arıların salgıladığı "arı sütü" nün tedavi edici özelliklerinden modern hekimlikte yararlanılmaktadır (Tetik, 1968; Şenocak, 1971, TOBK, 1978). Balmumu, ötedenberi endüstride kullanılan değerli bir ham maddedir.

Tablo 2.1. Balın Ortalama Kompozisyonu
(Şenocak, 1971, Tetik, 1968).

Madde	%
Su	17
Fruktoz	40
Dekstraz	35
Sukroz	2
Dekstrin	1
Kil	0.2
Serbest asit	0.1
Diğer	4.7
Toplam :	100.0

1991 yılı istatistiklerine göre (DİE, 1991), ülkemizde mevcut toplam 3.418.000 kovanın 3.160.000 (% 92.4) adedi yeni tip, 258.000 adedi ise (% 7.6) eski tiptir. Bal üretimi 1965 yılında 9500 ton iken 1991 yılında 54.581 tona yükselmiştir. 1965 yılında kovan başına 6 kg olan bal verimi (Tablo 2.2), son yıllarda 16.0 kg'a ulaşmıştır.

Tablo 2.2. 1965 Yılında Bazı Ülkelerin Kovan Varlığı ve Bal Üretimi (Şenocak, 1971).

Ülke	Kovan Varlığı (Adet)	Bal Üretimi (Ton)	Yerim (kg/kovan)
ABD	5.611.000	129.610	23
TÜRKİYE	1.632.000	9.500	6
İSPANYA	604.000	9.580	16
JAPONYA	160.000	6.470	42
BELÇİKA	50.000	1.000	20

2.1.1. Tanımı

Bütün ulusal ve uluslararası standartlarda balın resmi tanımı yapılmıştır, ancak tanım kimi ülkelerde çok kısa kimisinde ise uzundur. Örneğin Belçika ve Hollanda'da "bal, arılar tarafından yalnızca bitkilerden toplanan öz sulardan meydana getirilen tatlı bir maddedir" şeklinde tanımlanırken; Almanya'da "bal, bal özünün veya bitkiler üzerinde bulunan diğer tatlı suların arılar tarafından alınması, vücutlarından katkıları ekliyerek zenginleştirilmesi, değişikliğe uğratılması, peteklerde depolanıp olgunlaştırılmasıyla oluşan tatlı bir madde" olarak tanımlanmaktadır (TOKB, 1978).

FAO standartlarında bal için "arıların bitki çiçek nektarlarından veya salgılarından toplayarak, dönüştürerek ve peteklerde depolayarak meydana getirdikleri tatlı bir maddedir" denilmekte, Latin Amerika Kodeksi'nde bal, "bal arıları (*Apis mellifica*, *Apis ligustica*) tarafından çiçek nektarı ve bitki salgısıyla meydana getirilen ve peteklerde depo edilen doğal ürün" şeklinde tanımlanmaktadır.

Türk bal standardına göre ise "bal, bitkilerin çiçeklerinde bulunan nektarların veya bitkilerin canlı kısımlarıyla bazı eşkanatlı böceklerin salgıladığı tatlı maddelerin bal arıları (*Apis mellifera*=*Apis mellifica*) tarafından toplanması, vücutlarında bileşimlerinin değiştirilip petek gözlerine depo edilmesi ve buralarda olgunlaşması sonucunda meydana gelen koyu kıvamda tatlı bir üründür (TSE, 1978).

Tanımlardaki farklılıklara rağmen, vurgulanan ortak noktalar, balın bitkisel kaynaklı oluşu ve arılar tarafından elde edilmesidir.

2.1.2. Sınıflama ve Kalite Faktörleri

Bal, kaynağına (çiçek balı, salgı balı) elde edilmesine (petek bal, süzme bal) topografik durumuna (ova balı, yayla balı) göre sınıflara ve tiplere ayrılmaktadır (Tekik, 1968). Bu sınıflama, balın kalitesi hakkında yeterli bilgi vermemektedir.

İleri ülke standartlarında, bu sınıflamanın yanısıra balın kalitesi hakkında da fikir vermek üzere, egemen polen tipleri, içerdiği katı madde

miktarı, kusurlu maddeler içermemesi, rengi, kokusu ve berraklığına göre yapılan puanlama ile kalite alt sınıflarına (örneğin süzme ballar A, B, C, D alt sınıflarına) ayrılmaktadır.

Balın yapısında, her biri değişik oranlarda bulunabilen çok sayıda öğeden sadece bir kısmı bal standartlarında kalite faktörü olarak dikkate alınmaktadır ve bunların balda bulunması gerekli görülen miktarları ülkeden ülkeye değişmektedir. Türkiye'de kalite faktörü sayılan maddeler ile bunların balda bulunabileceği sınırlar Tablo 2.3'de görülmektedir.

Tablo 2.3. Gıda Tüzüğü ve Bal Standardında Balın Yapısal Kriterleri (TOKB, 1987).

	Gıda Maddeleri Tüzüğü (1972)	TSE Bal Standardı (1978)
Su	> % 23	> % 23
İnvert Şeker	Çiçek < % 65 Salgı < % 60	Çiçek < % 65 Salgı < % 60
Sakkaroz	Çiçek > % 5 Salgı > % 10	Çiçek > % 5 Salgı > % 10
Kül	Çiçek > % 0.6 Salgı > % 1.0	Çiçek > % 0.6 Salgı petek > % 0.1 süzme > % 0.1 pres > % 0.5
Suda Çözünmeyen katı Madde Miktarı	Süzme > % 0.1 Pres > % 0.5	Çiçek petek > % 0.1 süzme > % 0.1 Pres > % 0.5
Asidlik	> 4/100 gr	> 40 meq/kg
HMF	> mg/kg	> 40 mg/kg
Diastas sayısı	< 8	< 8
Albüminli madde	0.6 cm ³ < Lund tüpünde	-

> = en fazla

< = en az

2.2. Yavru Çürüğü Hastalığı (Foulbrood)

Yetişkin arılarda bakteriyal hastalıklar kişisel kayıplara neden olmaktadır. Oysa hastalık bir kovandaki yavrulara bulaştığı zaman tüm arı ailesini ölüme götürmektedir. Yavru çürüğü hastalığı, bulaştığı bölgedeki tüm arılıkları tehlikeye soktuğu için "yavru vebası" olarak da adlandırılmaktadır.

Yavru çürüğü hastalığının etkeni bakteri, yavrunun midesine girerek orada çoğalıp yavruyu öldürmekte, ölen yavru çürüyüp kokuşmaktadır.

Hastalığı henüz kesinlikle tedavi edici bir ilaç bulunamamıştır. Hastalığa yakalanan arı ailesinin tamamını öldürüp kovan ve petekleri yakmak, uygulanan genel yöntemdir. Ancak, son yıllarda koruyucu ve tedavi edici olmak üzere çeşitli antibiyotikler ve sülfonamidler denenmektedir (Şenocak 1971, TOBK 1987). Ülkemizde de bu amaçla fumagillin içeren fumagil-A, oksitetrasiklin+sulfamezatin içeren tetramerazin vb. ilaçlar arıcılar tarafından kullanılmaktadır (Yapar, 1995). İlaçlar toz olarak pudra şekeline karıştırılarak yada şekerli çözeltileri hazırlanarak kovanlara tatbik edilmektedir. Koruyucu olarak ilkbaharda, tedavi edici olarak ise belirli aralıklarla birkaç defa uygulama yapılmaktadır (DİF, 1995).

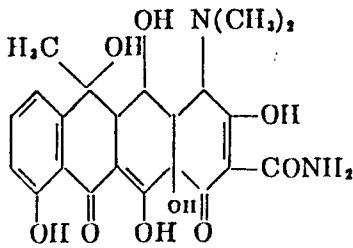
2.3. Oksitetrasiklin ve Sülfamezatin

2.3.1. Oksitetrasiklin (OTC, $C_{22}H_{24}N_2O_9$)

Uygun ortamlarda üreyen streptomyces rimosus'tan elde edilmektedir. Yapısı Şekil 2.1'de görülmektedir (Budavari, 1989). Molekül ağırlığı 460.44 olup, hidroklorid şeklinin suda çözünürlüğü, yaklaşık 1 g/ml dir.

UV-bölgesinde maksimum pik verdiği dalga boyları (pH=4,5 fosfat tamponu 0.1 M) 249 nm, 276 nm ve 353 nm'dir.

Tıp ve veteriner hekimlikte antibakterial antibiyotik olarak kullanılmaktadır. Sudaki çözeltileri pH=3.0-9.0 arasında antimikrobik etkisini 5°C'de 30 gün süreyle korunmaktadır.



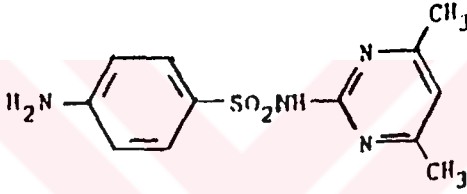
Şekil 2.1. Oksitetrasiklin (Budavari, 1989)

2.3.2. Sülfamezatin (SM, Sülfametazin, Sülfadimidin) ($C_{12}H_{14}N_4O_2S$)

Sulfonamid grubu ilaçlardan olup molekül ağırlığı 278.32, suda çözünürlüğü 37°C'de 1.5 mg/ml dir. Yapısı Şekil 2.2'de verilmiştir.

UV-bölgesinde maksimum pik verdiği dalga boyları : Sudaki çözeltisi için pH = 6.6 da 241 nm, 0.01 N NaOH'deki çözeltisi için 243 nm, 257 nm ve 0.01 N HCl'deki çözeltisi için 241 nm, 297 nm'dir.

Tıp ve veteriner hekimlikte antibakteriyal ilaç olarak kullanılmaktadır (Budavari, 1989).



Şekil 2.2. Sulfamezatin (Budavari, 1989)

2.4. Spektroskopi

Elektromagnetik ışımının madde ile etkileşmesini konu alan bilim dalına "spektroskopi" denir. Işımanın madde tarafından soğurulması inceleniyorsa "soğurma (absorbsiyon) spektroskopisi", yayınması inceleniyorsa "yayınma (emisyon) spektroskopisi" olarak adlandırılır (Erdik, 1993).

Yaygın olarak kullanılan 4 spektroskopik yöntem vardır :

1- Mor ötesi-görünür bölge (UV-VIS) spektroskopisi : Moleküllerin elektronik kuantum (foton) düzeyleri arasındaki geçişleri inceler.

2- Kırmızı ötesi (İR) spektroskopisi : Moleküllerin titreşme kuantum düzeyleri arasındaki geçişleri inceler.

3- Nükleer magnetik rezonans (NMR) spektroskopisi : Moleküldeki bazı çekirdeklerin spin kuantum düzeyleri arasındaki geçişleri inceler.

4- Kütle spektroskopisi : Madde, yüksek enerjili elektron demeti ile bombardıman edilip, oluşan pozitif iyonlar, kütle/yük oranına göre kaydedilir. Maddenin molekül kütlesi ve molekül formülü elde edilir (Erdik, 1993).

Bunlara ek olarak raman spektroskopisi, elektron spin rezonans spektroskopisi ve mikrodalga spektroskopisi gibi kullanım alanı giderek artan yöntemler vardır.

2.4.1. UV (Ultraviyole, mor ötesi) Spektroskopisi (Erdik, 1993)

Mor ötesi ışınması, elektromagnetik spektrumda X-ışınları ile görünür bölge arasında bulunur ve dalga boyu 10-400 nm arasında olan ışımadır. 10-200 nm aralığına "uzak mor ötesi", 200-400 nm arasına da "yakın mor ötesi" denir.

Uzak mor ötesi bölgede hava da soğurma yaptığı için, bu bölgenin kullanıldığı spektroskopik analizlerin vakumda yapılması gerekir. Öte yanda, 300 nm'nin altındaki dalga boylarında cam da soğurucudur, bu nedenle spektroskopik analizlerde kuvars hücreler kullanılması önerilir.

2.4.2. UV-Bölgesinde Soğurma

Mor ötesi ışımının soğurulması, elektronik uyardıya yol açar ve elektronlar düşük enerjili bir elektronik düzeyden daha yüksek enerjili bir düzeye geçer. Ancak, herbir elektronik düzeye titreşme düzeyleri karşılık geldiğinden, elektronik uyardı titreşme ve dönme uyardısına da yol açar. Sonuçta, ince bir mor ötesi soğurma piki yerine, geniş bir mor ötesi soğurma bandı elde edilir.

Spektrofotometrelerde mor ötesi spektrumu dalga boyu (λ) na karşı soğurma şiddeti (A veya % T) olarak kaydedilmekte ve soğurma bantlarının en yüksek veya en düşük (λ_{\max} , λ_{\min}) değerleri verilerek rapor edilmektedir. Doğrusu, soğurma bandının en yüksek soğurma değerinin şiddetinin değil, bandın altındaki alanın ölçülerek verilmesidir.

2.4.3. Lambert-Beer Yasası

Işımanın ortam tarafından soğurulan miktarı, iki temel bağıntı ile soğurucunun miktarına bağlıdır :

Beer Yasası : Gelen ışımının homojen soğurucu tarafından soğurulan miktarı, soğurucunun miktarı ile doğru orantılıdır.

Lambert Yasası : Gelen ışımının homojen soğurucu tarafından soğurulan miktarı, ışımının şiddetinden bağımsızdır.

Soğurucu ortam çözelti ise, soğurmanın miktarı, çözeltinin derişimine ve ışımaya yolunda çözeltinin kalınlığına bağılıdır.

İki yasa birleştirilip, soğurulan ışımaya miktarı ile çözeltinin derişimi ve çözeltideki ışımaya yolunun uzunluğu arasında

$$\log I_0/I = A = \epsilon C l$$

bağıntısı kurulur.

Burada :

I_0 = Gelen ışımmanın şiddeti

I = Çözeltiden çıkan ışımmanın şiddeti

A = Soğurganlık (absorbans, optik yoğunluk)

C = Çözeltinin molar derişimi (mol dm^{-3})

l = Çözeltinin konduğu hücrenin kalınlığı (cm)

ϵ = Molar soğuruculuk (molar absorbtivite, molar ekstinksiyon katsa-

yısı). Birim derişimdeki çözeltinin ($C=1 \text{ mol dm}^{-3}$) birim uzunlukta

($l = 1 \text{ cm}$) hücrede olduğu zamanki soğurganlığıdır ($10^3 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$)

dir.

Öte yanda "geçirgenlik" (transmittans = T) :

$T = I/I_0$ olarak tanımlanır. O halde,

$A = -\log I/I_0 = \log 1/T = -\log T$ yazılabilir.

$A = \infty \longrightarrow 0$ arasında değişirken $T = 0 \longrightarrow 1$ ve $\% T = 0 \longrightarrow 100$ arasında değişir. Öyleyse :

$A = 2 - \log \% T$ ve

$\% \text{ Soğurma} = 100 - \% T = 100 (1-T)$ yazılabilir.

Soğurganlığın bir özelliği de toplanabilir olmasıdır. Bir çözeltide molar soğuruculukları ϵ_1 ve ϵ_2 olan iki madde λ dalga boyunda soğurma yapıyorlar ise, A_T toplam soğurganlık

$$A_T = (\epsilon_1 C_1 + \epsilon_2 C_2) \lambda \text{ formülüyle verilir.}$$

Pek çok madde için, geniş bir derişim aralığında Lambert-Beer yasası geçerlidir. $A \rightarrow C$ eğrisinin lineerlikten sapmasının çeşitli nedenleri vardır. Ancak pratikte, mor ötesi spektroskopisi ile analiz yapılırken, derişimi bilinen çözeltiler hazırlayarak çizilen $A \rightarrow C$ eğrisi (kalibrasyon eğrisi, çalışma eğrisi) genellikle dar bir derişim aralığında doğrudur.

2.4.4. UV-Spektroskopisi Uygulama Alanları

Karışımların kantitatif analizi için UV-Spektroskopisi değerli, basit ve ucuz bir yöntemdir. Yapılacak iş, Lambert-Beer yasasına göre standart maddenin $A = \epsilon C l$, C derişimine karşı A soğurganlığını grafiğe aktararak kalibrasyon grafiğini çizmek ve sonra bilinmeyen maddenin A soğurganlığına karşı gelen C derişimini bulmaktır.

Bu yolla ilaç ve gıda endüstrisinde saflık kontrolü yapılmaktadır. Saflık kontrolünün esası, saf maddenin UV-bölgesinde soğurma yapmaması fakat safsızlıkların soğurma yapmasıdır.

UV-bölgede soğurma yapmayan bir madde, soğurma yapan bir başka bileşiğe dönüştürülerek analiz edilmelidir.

Proteinlerin, alkaloidlerin, steroidlerin vb. maddelerin analizinde enzim aktifliğinin ve reaksiyon hız sabitlerinin belirlenmesinde UV-spektroskopisi yaygın olarak kullanılmaktadır (Mach ve ark; 1992, Nevedo ve ark. 1991; Botsoglou, 1991, Yoo ve ark, 1990).

2.4.5. UV Bölge Türev Spektroskopisi

Karışımların normal spektroskopik yöntemle analizinin zorlukları vardır. Karışımı oluşturan maddelerin soğurmaları benzer (ancak aynı değil) olmalı, birbiriyle etkileşmemeli, dengeye girmemeli ve her biri Beer-Lambert yasasına uymalıdır. UV Spektrumunda keskin pikler yerine geniş spektrum bantlarının görülmesi, analizden yeterli bilginin elde edilememesine neden olmaktadır.

Türev spektroskopisi bu tür kolay değerlendirilmeyen ve az bilgi veren spektrumları yararlı şekle dönüştüren, normal spektrumda görünmeyen özellikleri ortaya çıkaran yeni bir tekniktir. Türev spektrumu, bir maddenin soğurganlığının (A) dalga boyu (λ) na karşı türevi alınarak elde edilmektedir. 1°, 2°, 3°, 4° ve daha yüksek dereceden türev spektrumları alınabilir.

$$A = f(\lambda) \quad \text{normal spektrum}$$

$$dA/d\lambda = f'(\lambda) \quad 1^\circ \text{ türev}$$

$$d^2A/d\lambda^2 = f''(\lambda) \quad 2^\circ \text{ türev}$$

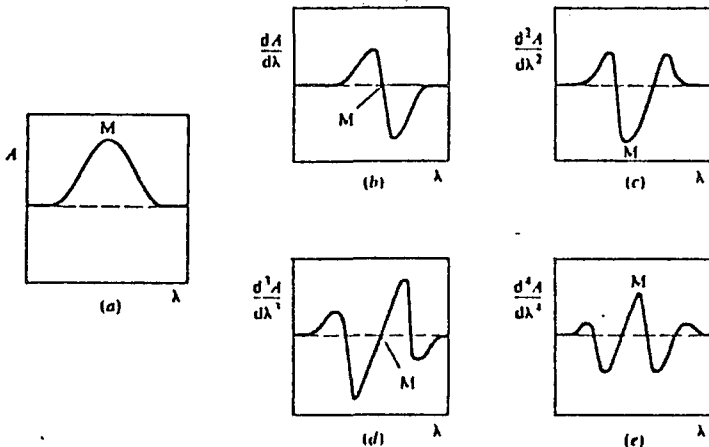
$$d^3A/d\lambda^3 = f'''(\lambda) \text{ vb} \quad 3^\circ \text{ türev}$$

Normal dağılım (Gaussian) gösteren bir spektrum absorpsiyon bandı ile bunun 1° - 4° türevleri Şekil 2.3'de görülmektedir. Esas banttaki pik yayvan olduğundan, maksimum absorpsiyon dalga boyunu kesin olarak belirlemek mümkün değildir. Halbuki 1° ve 3° türev spektrumlarında görülen bantlar, esas bantın ayrıştırılmış fonksiyonlarıdır ve maksimum dalga boyu (M noktası) kesin olarak belirlenebilir.

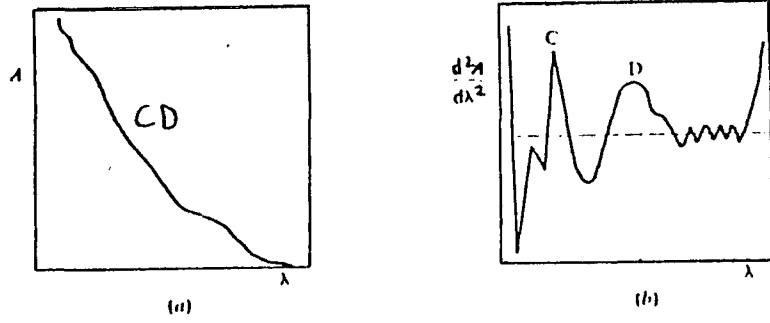
2° ve 4° türevlerde bir merkezi pik görülmektedir. Bu pikin sınırları esas banttan daha keskindir, fakat aynı yüksekliktedir ve işareti türev derecesinin artma sırasına bağlı olarak değişmektedir. Özellikle çift dereceden türev spektrumlarında ayrışmanın daha iyi olduğu gözlenmektedir.

Türev spektrumlarının bu özelliğinden, normal spektrumları üstüste gelen iki maddenin absorpsiyon bantlarının birbirinden ayrılmasında yararlanılabilir (Şekil 2.4). Normal spektrumlarında absorpsiyon bantları belirli olmayan iki maddenin karışımının normal spektrumdan türetilen 2° türev spektrumunda 280 nm ve 350 nm de iki pik verdiği gözlenmektedir.

Bir maddenin spektrumuna istenmeyen bir maddenin etkileri de türev spektrumu yardımıyla elimine edilebilir. Şekil 2.5. de (X) maddesinin, bunun

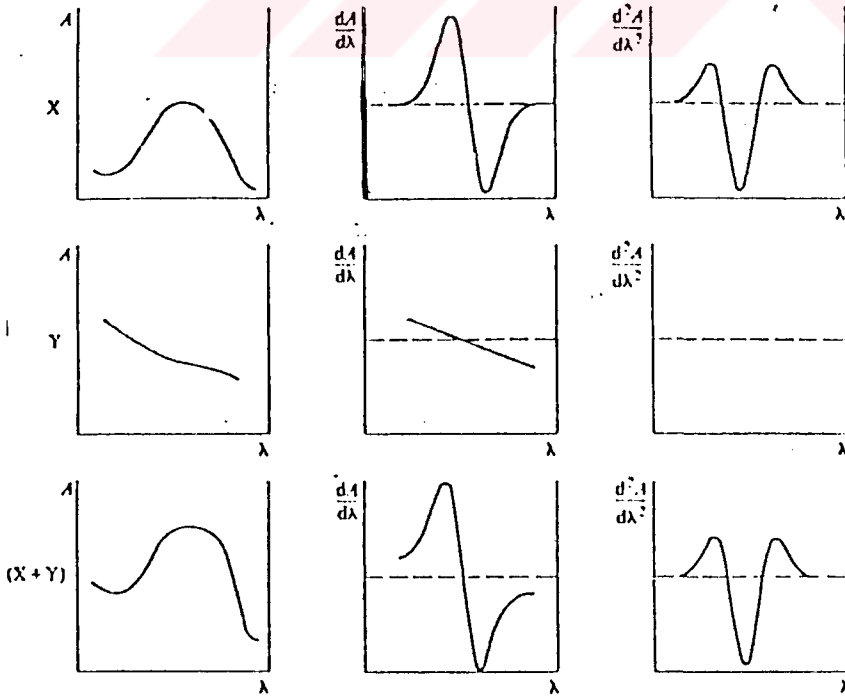


Şekil 2.3. Normal ve 1° - 4° Türev Spektrumlar (Jeffry ve ark., 1989).



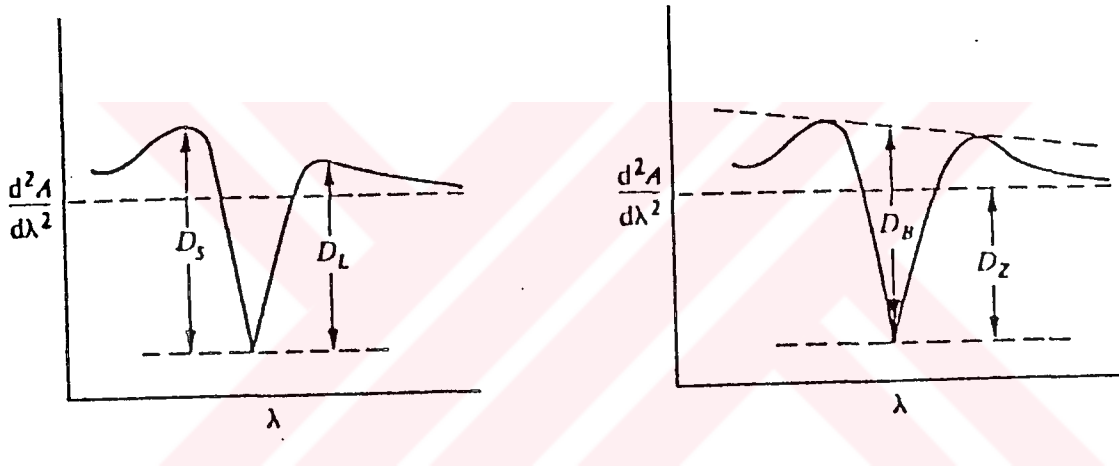
Şekil 2.4. İki Maddenin Karışımının Normal ve 2° Türev Spektrumları (Jeffry ve ark., 1989).

spektrumunu etkilediği düşünülen (Y) maddesinin ve (X+Y) nin normal spektrumları ile 1° ve 2° türev spektrumları görülmektedir. (X) ve (X+Y)'nin 2° türev spektrumlarının birbirinin aynı olması ve (Y)'nin 2° türev spektrumunda absorbanans yapmaması 2° türev spektrumunda (Y) nin (X) üzerine etkisinin yok edildiğine işaret etmektedir.



Şekil 2.5. (X), (Y) Maddeleri ve Bunların Karışımlarının (X+Y) Normal ve 1°-2° Türev Spektrumları (Jeffry ve ark., 1989).

Türev spektrumlarında pik yüksekliklerinin kantitatif ölçümü (mm olarak) çeşitli şekillerde yapılabilmektedir (Şekil 2.6). Uzun dalga pik yüksekliği (D_L), kısa dalga pik yüksekliği (D_S) ya da pik uç noktası-tanjant hattı arası (D_B), pik uç noktası-sıfır çizgisi arası (D_Z) ölçümlerinden birisi tercih edilmektedir.



Şekil 2.6. Kantitatif Pik Yüksekliği Ölçümü (Jeffrey ve ark., 1989).

2.5. Uluslararası ve Ulusal Çalışmalar

Toplumlar, tarih boyunca tüm olanaklarını daha iyi, daha etkili, daha verimli, daha ucuz olanın elde edilmesi için harcamış, insanın sağlıklı ve mutlu yaşamasını hedef almıştır. Bu çabaların sektör bazında insanı en ilgilendireni hiç kuşkusuz gıda ve sağlık konularıdır.

Gıda ve sağlık sektörlerindeki gelişmeler ve yenilikler eskiden karşılaşılan bazı sorunları ortadan kaldırırken, beraberinde bazı yeni

sorunlar getirmiştir. Örneğin gıda sektöründe verim artışı, kayıpların minimize edilmesi, ürünlerin dayanma sürelerinin uzatılması ve yeni gıdaların üretimi konularında kaydedilen önemli aşamalara karşılık çevre kirlenmesi, katkı maddeleri, tarımsal mücadele ilaçları kalıntıları, radyoaktif madde kalıntıları gibi sorunlar toplum sağlığını tehdit etmektedir (Saldamlı, 1958).

Bu nedenle, ürün kompozisyonunun belirlenmesi, kalitenin tesbiti ve standardizasyon konuları WHO ve FAO gibi uluslararası kuruluşların öncelikli gündemini oluşturmakta ve yeni yasal düzenlemelere başvurulmaktadır.

Öte yanda, kısa sürede doğru sonuç veren, basit, ekonomik ve güvenilir analiz yöntemlerinin geliştirilerek rutin uygulamalarda kullanılması yönündeki çalışmalar son yıllarda büyük bir ivme kazanmıştır.

Çevre kirliliği indikatörü olması sebebiyle, günümüzde bala verilen önem artmış, balın coğrafi kaynağı (Seijo ve ark. 1992), polen tipleri (Sorkun ve Inceoğlu 1984 (a), (b), Sorkun ve ark,1989, Çakır ve Tümen 1992), kompozisyonu (Campos 1989, Sevimli ve ark., 1992, Sancho ve ark., 1992 (a)), besleyici değeri ve kalitesi (Şenocak 1971, FAO/WHO 1969, CAC 1970) ile kirlilik düzeyi (Miguel ve ark 1991, Muino ve Lozano 1991, Hemmerling 1987, Molzahn ve Wertmüller 1993) çok sayıda araştırmacı tarafından incelenmiştir.

Türev spektrumları optik, elektronik ve matematiksel yollarla elde edilmektedir. En tatmin edici sonuçlar matematiksel yöntemle spektrofotometreye bağlanmış bilgisayarla alınmaktadır (Erdik, 1993).

Türev spektroskopisi için kullanılan ekipmanın maliyeti yüksek ise de, araştırıcılar bu yöntemi kullanarak güvenilir sonuçlar almaktadırlar.

Onur ve Acar (1992), ilaç formüllerindeki idrar yolu antiseptikleri metilen mavisi, heksametilen tetramin ve rezorsinolün ikili karışımlarını hazırlayarak, metilen mavisini 273 nm de, heksametilen tetramini 221.3 nm de ve rezorsinolü 300 nm de tayin etmişlerdir. Aynı araştırıcılar (Acar ve Onur 1991), yüksek tansiyon ve astım tedavisinde kullanılan efedrin HCl'yi ve niketamidi iki ilacı birlikte içeren çözeltilerin 1° türev spektrumlarından 256.1 nm ve 261.1 nm'de belirlemişlerdir.

Ağrı kesici ilaçlardan parasetamol ve fenorobamatın miktarlarının klasik spektrometrik yöntemlerle belirlenmesi için, bu ilaçlar birbirlerini etkilediklerinden, bir seri analiz öncesi ayırma işlemi uygulanması gerekmektedir. Oysa, ön ayırma işlemine tabi tutulmayan çözeltilerin 1° türev spektrumlarından 260 nm de parasetamol ve 249.2 nm de de fenaorobomat miktarları kolayca belirlenebilmektedir (Onur ve Acar, 1989).

Son yıllarda birden fazla etken madde içeren ilaçların üretimi ve kullanımı artmıştır. Bu tür ilaçların klasik yöntemlerle analizi, ön ayırma işlemlerini gerektirmekte veya çeşitli renk reaksiyonlarından yararlanmayı zorunlu kılmaktadır.

İki antibiyotiği birlikte içeren çözeltilerde antibiyotik miktarlarının belirlenmesi için türev spektroskopisi yöntemleri geliştirilmiştir. Murillo ve ark (1990), pensilin ve sefalosporin grubunun β -laktam antibiyotikleri olan amoksilin ve sefaleksinin iki ilacı birlikte içeren çözeltilerdeki

konsantrasyonlarını, sefaleksin için 276 nm de 2° türeyden, amoksilin için ise 267.5 nm de yine 2° türeyden yararlanarak saptamıştır.

İkili karışımlardaki sulfametaksol ve (SMX) ve trimetoprim (TMP) miktarlarını belirlemek için yeni bir yöntem geliştirme çalışması yapan Nevado ve ark., (1992), 1° türev spektrumundan SMX; 287.5 nm de ve TMP'yi 225.5 nm de saptamayı başarmışlardır.

Geniş spektrumlu antibiyotiklerden sikloserinin miktarı 9-kloro-10-metil akridinum triflat ile reaksiyonu sonucu oluşan akridinyum bileşiğinin 442 nm de 2° türev spektrumundan yararlanarak saptanmıştır (Yoo ve ark., 1990).

Türev spektroskopisinin gıda analizleri ve kalite kontrolünde de emniyetle kullanılabileceğine işaret eden araştırmalar bulunmaktadır.

Fletouris ve ark., (1993) proteinlerde kalitenin tesbiti amacıyla, 285.5 nm de 4° türev spektrumunu kullanarak amino asit triptofan miktarını saptamışlardır. Normal spektrumda ve 2° türev spektrumunda görülen etkileşimleri, safsızlıkları ve bulanıklığı böylece elimine etmişlerdir.

Sanchez ve ark., (1990) alkollü içkilerden romda aroma ve tad maddeleri olan vanilin ve siringaldehit konsantrasyonlarının 1° türeyden yararlanarak 352 nm ve 368 nm'lerde belirlenmesini sağlayan türev spektroskopisi yöntemi geliştirmişlerdir.

Pamuk çiğiti ve küspesinde bulunan ve beslenmeyi engelleyici toksik özelliklere sahip bir aldehit olan gosipolun miktarının 300 nm de 2° türev

kullanılarak saptanabileceği Botsoglou (1991)'nun çalışması ile kanıtlanmıştır.

Salinas ve ark., (1991), sulfatiazol ve oksitetrasiklini çeşitli oranlarda ve konsantrasyonlarda içeren çözeltilerin davranışını türev spektroskopisi yöntemiyle incelemişlerdir. Spektrumun 4° türevi kullanıldığında, oksitetrasiklinin 363 nm de sulfatiazolun ise 285.5 nm de , ön ayırma işlemlerine gerek kalmadan tayin edilebileceğini kanıtlamışlardır. Yöntemi, değişik üreticilerden sağlanan bal örneklerine uygulayan araştırıcılar, iyi sonuçlar almışlardır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bal

Elazığ il merkezinde satışı sunulan farklı firmalara ait hazır süzme ballardan 0.5 kg'lık cam ambalajda ve her markadan 1'er adet olmak üzere 4 süzme, karakovan ballarından da 2 adet olmak üzere toplam 6 bal örneği tesadüfi örnekleme yöntemiyle sağlandı.

Etiket bilgileri kaydedilip, örnek ve üretici firma kodu verildikten sonra analize kadar oda sıcaklığında saklandı.

3.1.2. İlaçlar ve Kimyasal Maddeler

Oksitetrasiklin. HCl (OTC) ve sülfamezatin (sülfamethazin. sülfadimidin sodium SM) Doğu İlaç Firması'ndan temin edildi.

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 ile pH'nın ayarlanmasında yararlanılan hidroklorik asit ve sodyum hidroksit Merck firmasından temin edildi.

3.1.3. Ekipman

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

3.2. Metod

3.2.1. İlaç Çözeltilerinin Hazırlanması

OTC stok çözeltisi (200 mg/l) : 11.6 mg OTC 50 ml damıtık suda çözüldü.

SM stok çözeltisi (200 mg/l) : 10.1 mg SM 50 ml damıtık suda çözüldü.

Her iki maddenin çözeltileri bekletildiğinde, maksimum absorpsiyon piki veren dalga boyunda sapma ve OTC çözeltilerinde renk değişikliği gözlemlendiğinden, her çalışma için stok çözeltiler taze olarak hazırlandı.

Çalışma çözeltileri : Optimum analiz koşullarının belirlenmesi ve değişik parametrelerin etkilerinin çalışılması sırasında, stok çözeltilerden yararlanılarak 0-20 ppm etken madde içeren çalışma çözeltileri hazırlandı.

3.2.2. Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması

Asetat Tamponu :

Asetik asit (0.2 M) : 5.575 ml asetik asit (CH_3COOH), 500 ml damıtık su ile karıştırıldı.

Sodyum asetat (0.2 M) : 13.6 g sodyum asetat ($C_2H_3O_2Na.3H_2O$), 500 ml damıtık suda çözüldü.

Farklı pH'larda asetat tampon çözeltisi hazırlamak için, Tablo 3.1'de verilen oranlarda CH_3COOH ve $C_2H_3O_2Na$ çözeltileri alınarak su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Tablo 3.1. Farklı pH'larda Asetat Tamponu Hazırlanmasında Kullanılan CH_3COOH ve $C_2H_3O_2Na$ Çözeltisi Miktarları (Werner, 1982).

pH	CH_3COOH (ml)	$C_2H_3O_2Na.3H_2O$ (ml)
4.0	41.0	9.0
4.4	30.5	19.5
4.8	20.0	30.0
5.2	10.5	39.5
6.0	4.8	45.2

Sitrik asit (0.1 M) : 10.5 g sitrik asit ($C_6H_8O_7$), 500 ml. damıtık suda çözüldü.

Sodyum sitrat (0.1 M):14.705 g sodyum sitrat ($C_6H_5O_7Na_3.2H_2O$), 500 ml damıtık suda çözüldü.

Tablo 3.2'deki oranlarda sitrik asit ve sodyum sitrat çözeltileri alınıp, 100 ml'ye tamamlanarak farklı pH'larda sitrat tamponu çözeltileri hazırlandı.

Tablo 3.2. Farklı pH'larda Sitrat Tamponu Hazırlanmasında Kullanılan $C_6H_8O_7$ ve $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ Çözeltisi Miktarları (Werner, 1982).

pH	Sitrik Asit (ml)	Sodyum Sitrat (ml)
4.0	33.0	17.0
4.4	28.0	22.0
4.8	23.0	27.0
5.2	18.0	32.0
5.6	13.7	36.3

3.2.3. Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

3.2.3.1. Maksimum Absorbsiyon Dalga Boyunun Seçimi

Farklı konsantrasyonlarda OTC ve SM içeren çözeltiler ile 200-400 nm sınırları arasında normal spektrumlar elde edilerek, her iki ilacın maksimum absorpsiyon yaptıkları dalga boyları ve bunlara karşı gelen pikler belirlendi.

3.2.3.2. Uygun pH ve Tamponun Belirlenmesi

20 ppm ilaç içeren OTC ve SM çözeltilerinin pH'ları 0.1 M HCl veya 0.1M NaOH ile pH=1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 ve 12 ye ayarlandı. Her çözeltinin kendi pH'sına uygun kör çözelti kullanılarak dalga boyu 200-400 nm arasında taranarak uygun pH aralığı belirlendi.

Asetik asit ve sitrat tamponlarının uygun pH aralığında olmak üzere değişik pH lardaki çözeltileri hazırlandı. Bunlarla hazırlanan OTC ve SM

çalışma çözeltilerinin maksimum absorpsiyon pikleri değerleri pH'ya karşı grafiğe geçirildi, en uygun tampon ve pH belirlendi.

3.2.3.3. Konsantrasyonun Lineer Tayin Sınırlarının Belirlenmesi

pH ve dalga boyu sabit tutularak, OTC ve SM'in çeşitli konsantrasyonlarının absorpsiyon değerleri, konsantrasyona karşı grafiğe aktarıldı. OTC ve SM'in lineer olarak tayin edilebildiği konsantrasyon sınırları hesaplandı.

3.2.3.4. Spektrofotometre Parametrelerinin Seçimi

OTC ve SM çözeltilerinin ve karışımlarının maksimum dalga boylarındaki normal spektrumları ve bunların 1^o,2^o,3^o,4^o türevleri : tarama hızı 100,200,400,600 nm/dakika, resolusyon : 0.3,0.5,1.0,2.5,5.0, 10 ve 20 nm ve türev almadaki aşama sayısı 1-5 koşullarında ayrı ayrı denenip bulgular kıyaslanarak en iyi sonuç veren parametreler seçildi.

3.2.4. Sulu Saf Çözeltilerde OTC veya SM Tayini

2-16 ppm saf OTC veya saf SM içeren asetat tamponu (pH=4.8) ile hazırlanan çözeltilerin, OTC ve SM'nin pik verdikleri dalga boylarındaki (OTC:275 nm ve 355 nm, SM:240.4 nm ve 262 nm) absorpsiyon miktarları ölçüldü. Regresyon denklemleri elde edilip, absorpsiyon değerleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek, OTC ve SM'in kalibrasyon grafikleri elde edildi.

Bulgular, etkili faktörler ve çalışmanın amaçları dikkate alınarak kıyaslanıp hangi eğrilerin kullanılabilceği saptandı.

Bilinmeyen miktarlarda OTC veya SM içeren çözeltilerdeki OTC ve SM miktarı, absorpsiyon değerleri ve standart eğriler yardımıyla hesaplandı.

3.2.5. OTC+SM İçeren Sulu Saf Çözeltilerde İki İlacın Birlikte Normal Spektrum Yardımıyla Tayini

12 ppm OTC, 6 ppm SM ve 12 ppm OTC+6 ppm SM içeren çözeltiler 200-400 nm arasında incelenerek, ikili karışımda OTC ve SM'nin tayininin mümkün olup olmadığı araştırıldı.

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

OTC ve SM'i birlikte içeren çözeltilerde, 240.4 nm-275 nm arasında OTC ve SM'in pikleri birbirlerini etkilediklerinden, bu bölgede normal spektrum yardımıyla OTC ve SM'in miktar tayinini sağlıklı olarak yapabilmek mümkün görünmediği için OTC ve SM'in UV-spektrumlarının 1°-4° türevleri incelendi.

Spektrum türevlerinde maddelerden birinin absorpsiyon yaptığı diğer maddenin absorpsiyon yapmadığı dalga boyu saptandı. (sıfır kesişme noktası metodu)

OTC ve SM'i tek başına ve birlikte değişik konsantrasyonlarda içeren çözeltilerin spektrum türevlerinde dalga boyu, konsantrasyon ve absorbans arasında linear bir ilişkinin varlığı araştırıldı. Regresyon denklemleri ve kalibrasyon grafikleri elde edildi.

3.2.7. Balda OTC, SM ve OTC + SM Tayini

3.2.7.1. Analizde Kullanılacak Bal Miktarının Belirlenmesi

0.1 g, 0.5 g, 1 g ve 2 g süzme bal örnekleri 50 ml'lik beherlere tartıldı. 2 ml. asetat tampon çözeltisi ile bir miktar damıtık suda çözüldü. 25 ml'lik balon jöjeye aktarılıp damıtık su ile hacme tamamlandı.

Çözeltilerin 200-400 nm arasında normal spektrumları ile 1°-4° arasında türev spektrumları incelenerek analizde kullanılacak uygun bal miktarı saptandı.

3.2.7.2. Dalga Boyu Seçimi

0.5 g bal+OTC, 0.5 g bal+SM ve 0.5 g bal+OTC+SM çözeltileri farklı oranlarda OTC, SM ve OTC+SM içerecek şekilde hazırlandı. Çözeltilerin normal spektrumları, 200-270 nm, 270-340 nm ve 340-400 nm arasında 1°-4° türev spektrumları incelenerek ilaçların ayrı ayrı ve birlikte tayini için elverişli dalga boyları araştırıldı.

3.2.7.3. OTC+SM İçeren Balda OTC ve SM Tayini

Standart ekleme yöntemi ile 0.5 g balda belirli konsantrasyonlarda ve oranlarda OTC, SM ve OTC+SM bulunacak şekilde örnek çözeltileri hazırlandı.

OTC için 230.5 nm 2° türev spektrumlarında SM için 254.6 nm 1° türev spektrumlarında absorban-konsantrasyon ilişkileri değerlendirildi, OTC ve SM regresyon denklemleri ve kalibrasyon grafikleri elde edildi.

3.2.8. OTC+SM İçeren Balda OTC ve SM'in Geri Kazanılması

3.2.8.1. Dalga Boyu Seçimi

0.5 g bal+OTC, 0.5 g bal+SM ve 0.5 g bal+OTC+SM çözeltileri farklı oranlarda OTC, SM ve OTC+SM içerecek şekilde hazırlandı. Çözeltilerin normal spektrumları, 200-270 nm, 270-340 nm ve 340-400 nm arasında 1°-4° türev spektrumları incelenerek ilaçların ayrı ayrı ve birlikte tayini için elverişli dalga boyları araştırıldı.

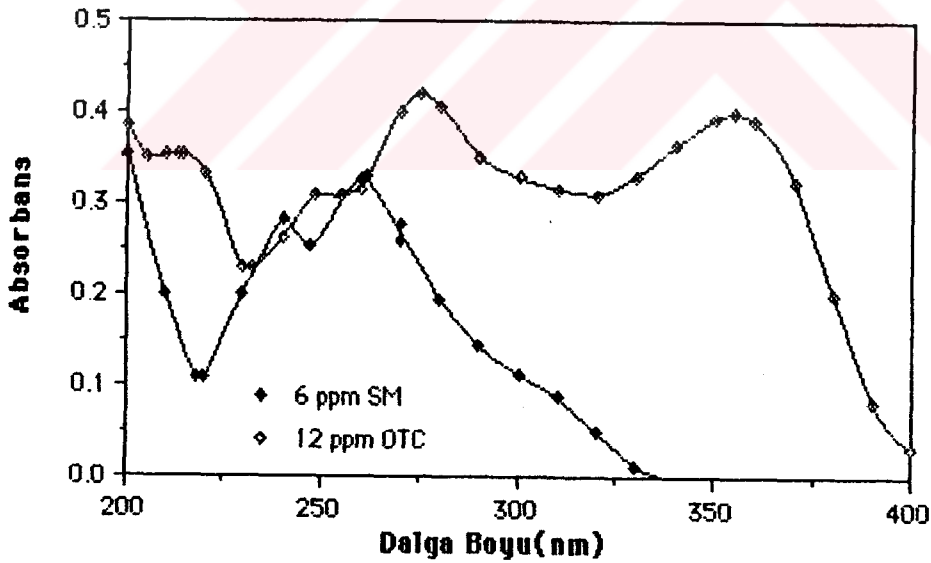
3.2.8.2.OTC+SM İçeren Balda OTC ve SM'in Geri Kazanılma Miktarları

Değişik oranlarda OTC ve SM içeren bal örneklerinden OTC ve SM'in geri kazanılma miktarları ve oranları belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. OTC ve SM'nin Normal Spektrumları

OTC ve SM'nin her ikisinin de 200-400 nm dalga boyları aralığında ultraviyole bölgesinde absorpsiyon yaptıkları gözlemlendi. 12 ppm OTC ve 6 ppm SM içeren çözeltilerin tipik spektrumları Şekil 4.1 de görülmektedir. 275 nm ve 355 nm dalga boylarında OTC'nin, 240.4 nm ve 262 nm de ise SM'nin maksimum absorpsiyon piklerinin bulunduğu saptandı. Çalışmanın ilgili aşamalarında bu dalga boyları kullanıldı.

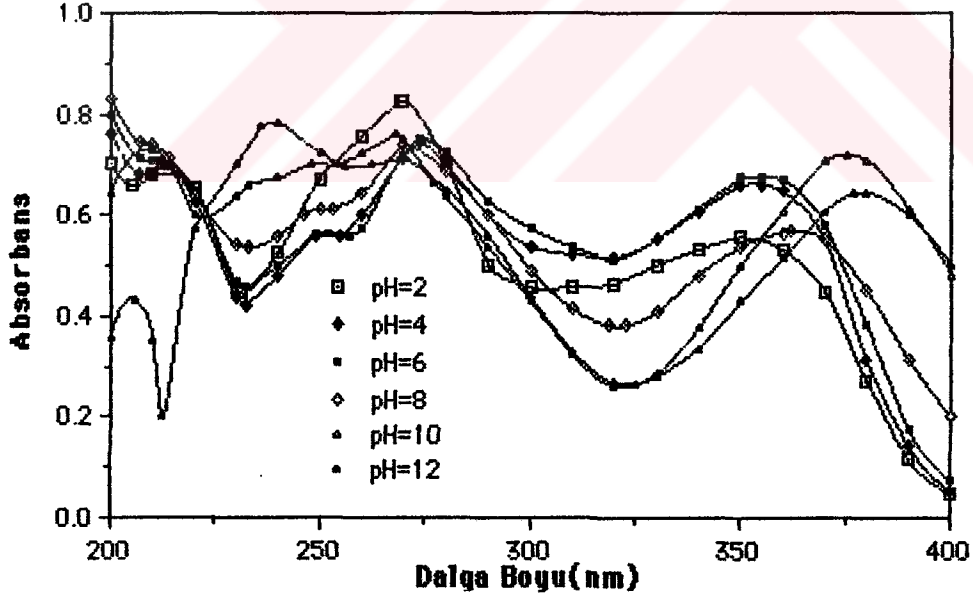


Şekil 4.1.12 ppm OTC ve 6 ppm SM Çözeltilerinin 200-400 nm Aralığında Spektrumları

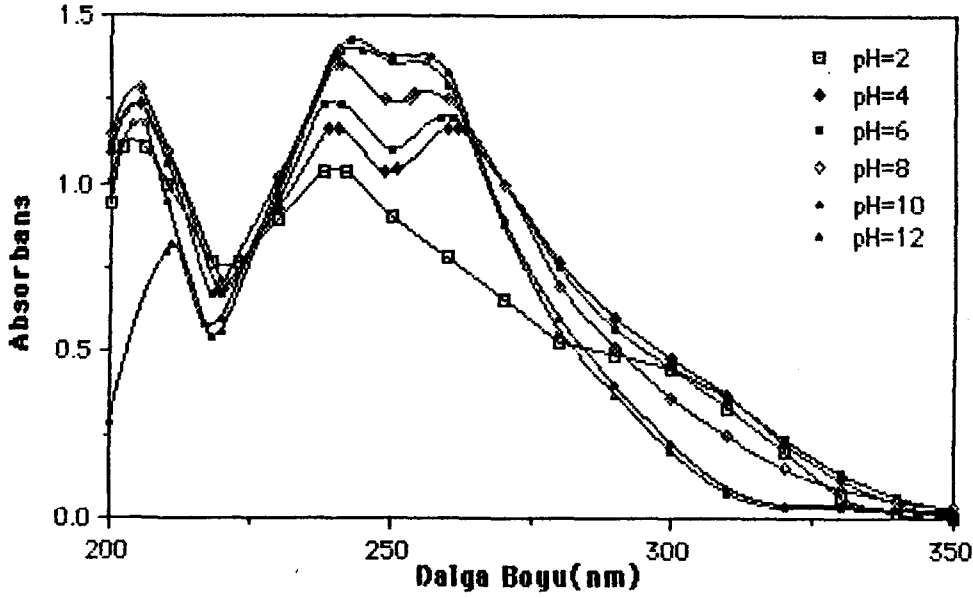
4.2. pH ve Tamponun Etkisi

20 ppm etken madde içeren OTC ve SM çözeltilerinin pH = 2,4,6,8,10,12 ve 200-400 nm aralığındaki absorbans değerleri Şekil 4.2 ve 4.3 de görülmektedir. Farklı konsantrasyonlar ve farklı pH'larda elde edilen spektrumlar kıyaslandığında, her iki ilacın absorpsiyon piklerinin çok düşük ve yüksek pH'larda yeterince belirgin olmadığı, piklerin keskinliklerini yitirerek yayvanlaştığı gözlemlendi.

Deneyisel çalışmalar için en uygun pH aralığının pH = 4-6 olduğu belirlendi.



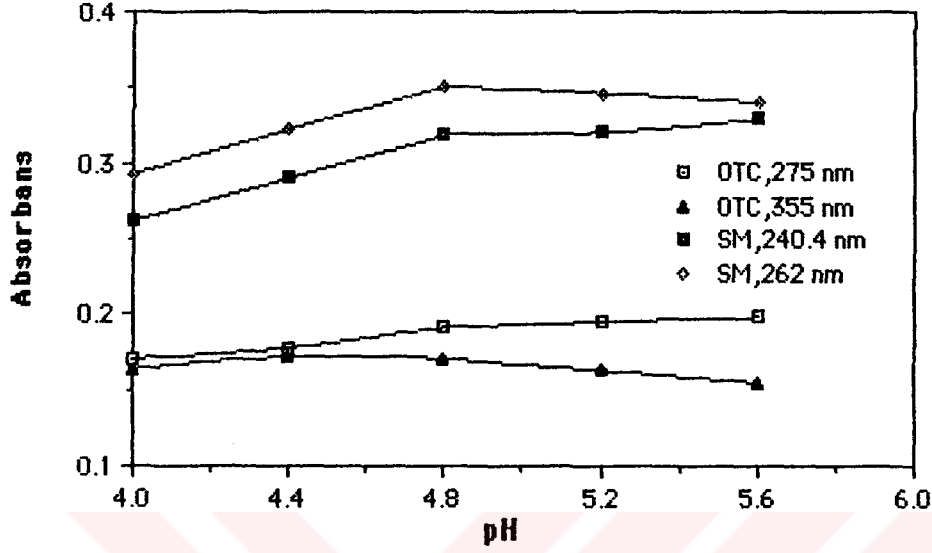
Şekil 4.2. 20 ppm OTC Çözeltisinin Farklı pH'larda Spektrumu



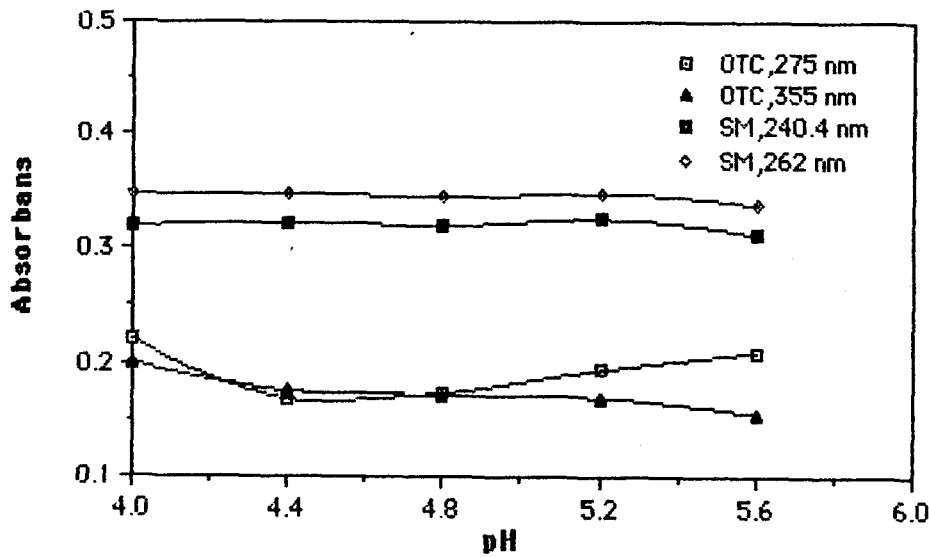
Şekil 4.3. 20 ppm SM Çözeltisinin Farklı pH'larda Sepktrumu

En uygun pH'nın tesbiti için, pH = 4-6 yı sağlayabilecek asetat ve sitrat tamponları ile maksimum dalga boylarında yapılan çalışmalara ait tipik bulgulara iki örnek Şekil 4.4 ve 4.5 de görülmektedir.

Bulguların değerlendirilmesi sonucunda, asetat tamponu ve pH = 4.8'in en uygun olduğu görülerek, deneysel çalışmanın sonraki aşamalarının tamamında OTC ve SM çözeltilerinin hazırlanmasında pH = 4.8 olan asetat tamponu kullanıldı.



Şekil 4.4. Çeşitli pH'larda Asetat tamponu ile Hazırlanan 6 ppm OTC ve 6 ppm SM içeren Çözeltilerin Maksimum Dalga Boylarında Absorbans Değerleri



Şekil 4.5. Çeşitli pH'larda Sitrat Tamponu Kullanılarak Hazırlanan 6 ppm OTC ve SM içeren Çözeltilerin Maksimum Dalga Boylarında Absorbans Değerleri

4.3. Saf OTC ve SM İçeren Çözeltilerin Analiz Koşulları

pH, tampon, spektrofotometre tarama hızı, rezolüsyon, türev, işlem sayısı ve OTC ile SM'nin lineer olarak tayin edilebildiği konsantrasyon

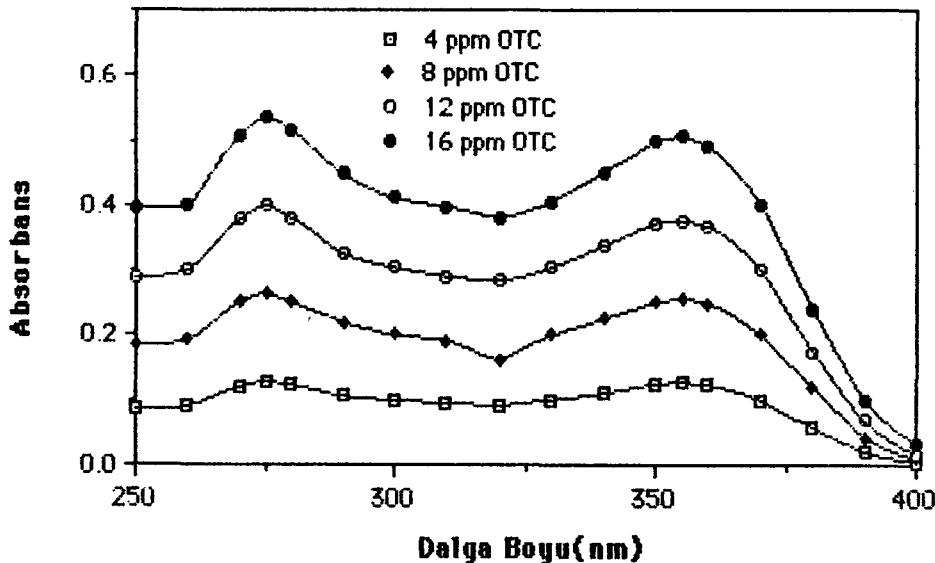
sınırlarıyla ilgili deneysel bulgular, Tablo 4.1'de verilen koşullarda, saf OTC ve SM içeren çözeltilerin analizlerinde doğru ve tekrarlanabilir sonuçların alındığını gösterdi.

Tablo 4.1. OTC ve SM Tayin Koşulları

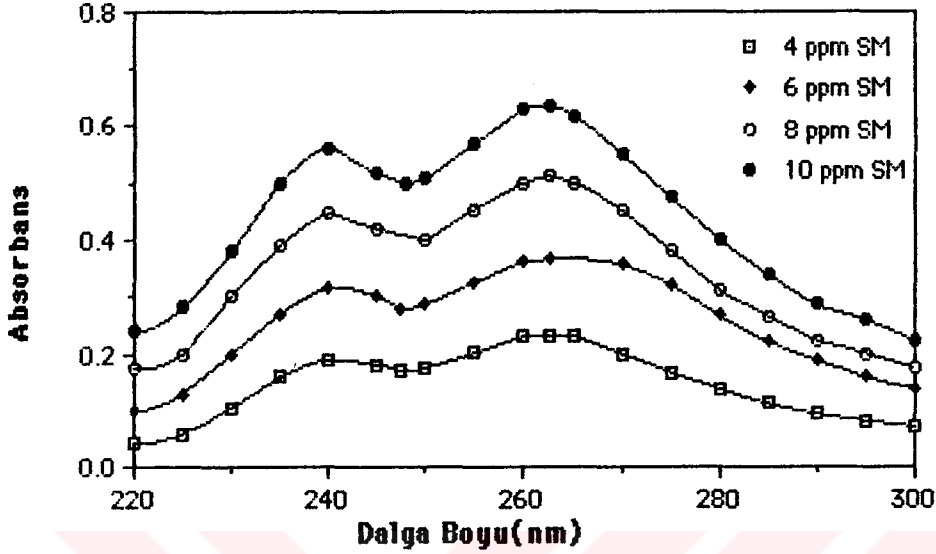
	Tampon	PH	Lineer Tayin Aralığı (ppm)	Dalga Boyu (nm)	Tarama Hızı (nm/dak)	Rezolüsyon	Türev
OTC	Asetat	4.8	4-45	275	200	0.3	2 ^o
SM	Asetat	4.8	2-24	262	200	0.3	2 ^o

4.4. OTC veya SM'i Tek Başına İçeren Çözeltilerde Miktar Tayini

4-16 ppm OTC ve 4-10 ppm SM içeren çözeltilerin spektrumları Şekil 4.6 ve 4.7 de görülmektedir.

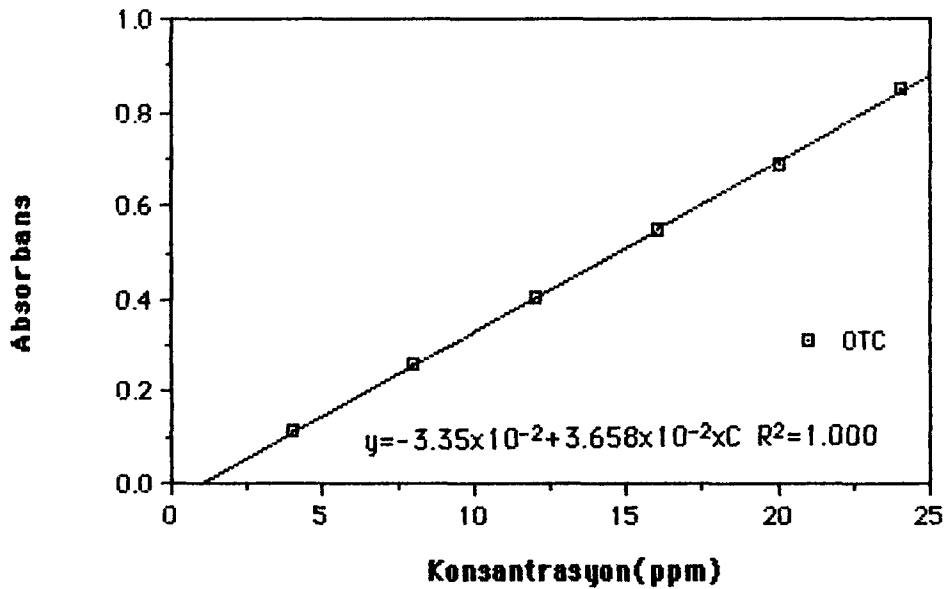


Şekil 4.6. 4-16 ppm OTC İçeren Çözeltilerin Spektrumları

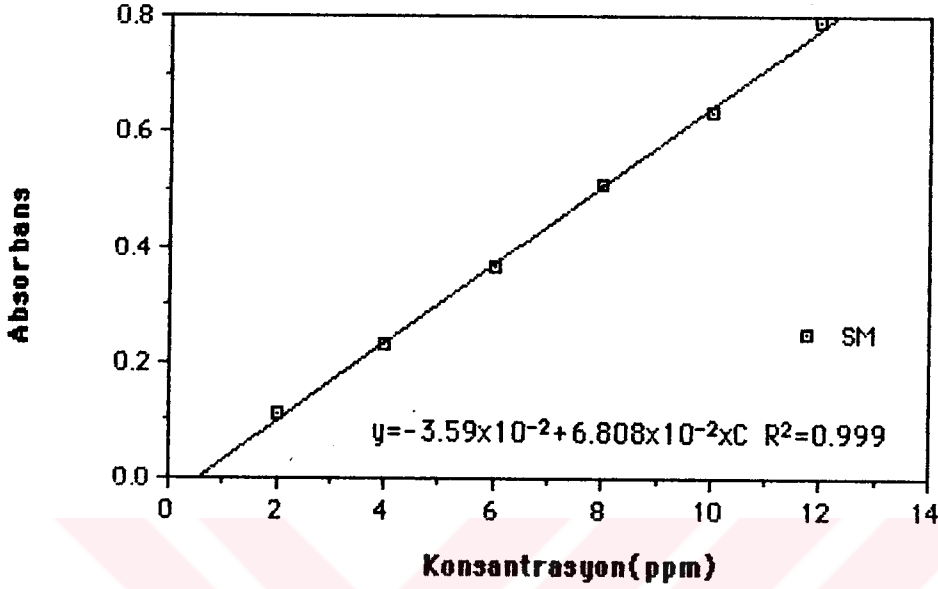


Şekil 4.7. 4- 10 ppm SM İçeren Çözeltilerin Spektrumları

Şekil 4.8'de 275 nm de OTC'nin ve Şekil 4.9'da 262 nm'de SM'nin kalibrasyon grafikleri görülmektedir. OTC ve SM konsantrasyonu bilinmeyen örnekler olarak hazırlanan çözeltilerin absorpsiyon değerleri ve standard eğriler yardımıyla yapılan miktar tayinlerine ilişkin deneylerle, sistemin çalıştığı gözlenmiştir.



Şekil 4.8. 275 nm de OTC Kalibrasyon Grafiği (8 Örnek x 2 analiz ortalaması)

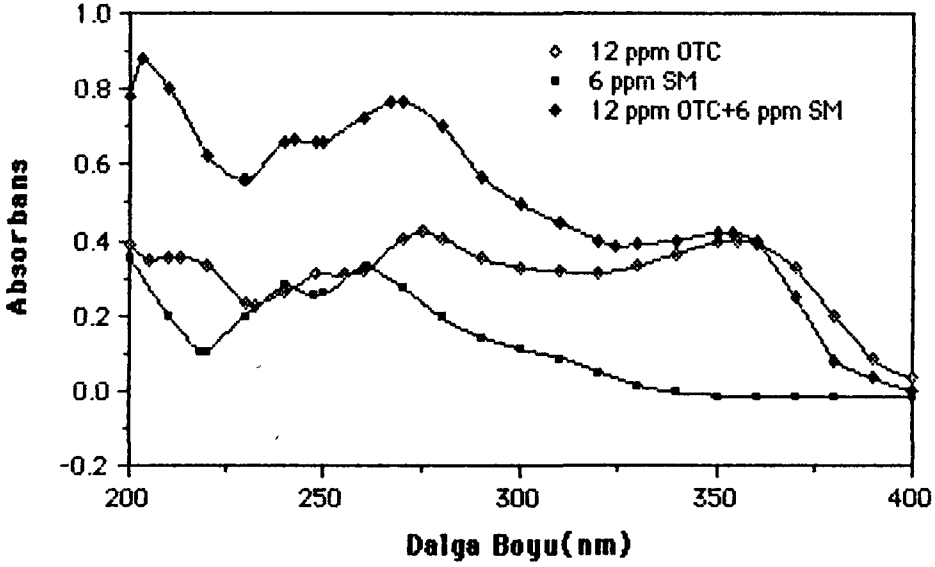


Şekil 4.9. 262 nm de SM Kalibrasyon Grafiği (8 Örnek x 2 analiz ortalaması)

4.5. OTC+SM İçeren Çözeltilerde Normal Spektrum Yardımıyla İki İlacın Birlikte Tayini

OTC, SM ve OTC+SM içeren çözeltilerin normal spektrumlarına bir örnek Şekil 4.10 da verilmiştir. OTC'nin 275 nm deki absorpsiyon piki SM'nin 240.4 nm ve 262 nm deki piklerine oldukça yakındır. Bu nedenle, ikili karışımlarda her iki maddenin piklerinin birbirinden etkilendikleri gözlenmektedir. Bunun için, bu bölgede OTC ve SM'nin tayininin güvenilir bir şekilde yapılmasının mümkün olmadığı sonucuna varılmıştır.

Ancak, güvenilir olmasa da, 360 nm de SM absorbans yapmadığından (SM=0) (Şekil 4.10), ikili karışım çözeltisinde OTC tayini mümkün görünmektedir. Bu nokta, çalışmanın amacı dışında bulunduğundan, incelenmemiştir.



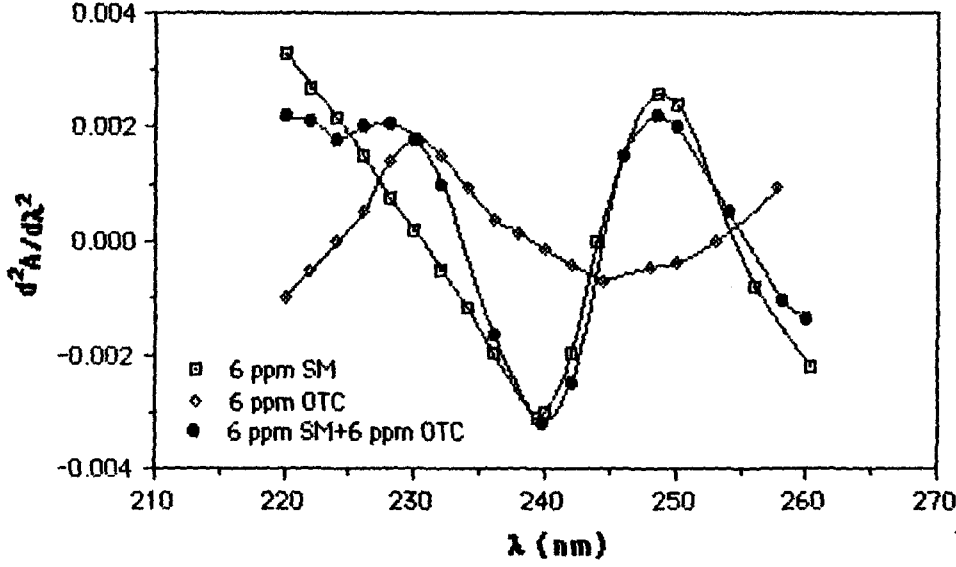
Şekil 4.10. 12 ppm OTC, 6 ppm SM ve 12 ppm OTC+6 ppm SM içeren Çözeltilerin Spektrumu

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

Değişik oranlarda OTC ve SM içeren çözeltilerin 1° - 4° türev spektrumlarının incelenmesi sonucu, 2° türev spektrumunun amaca uygun olduğu belirlendi.

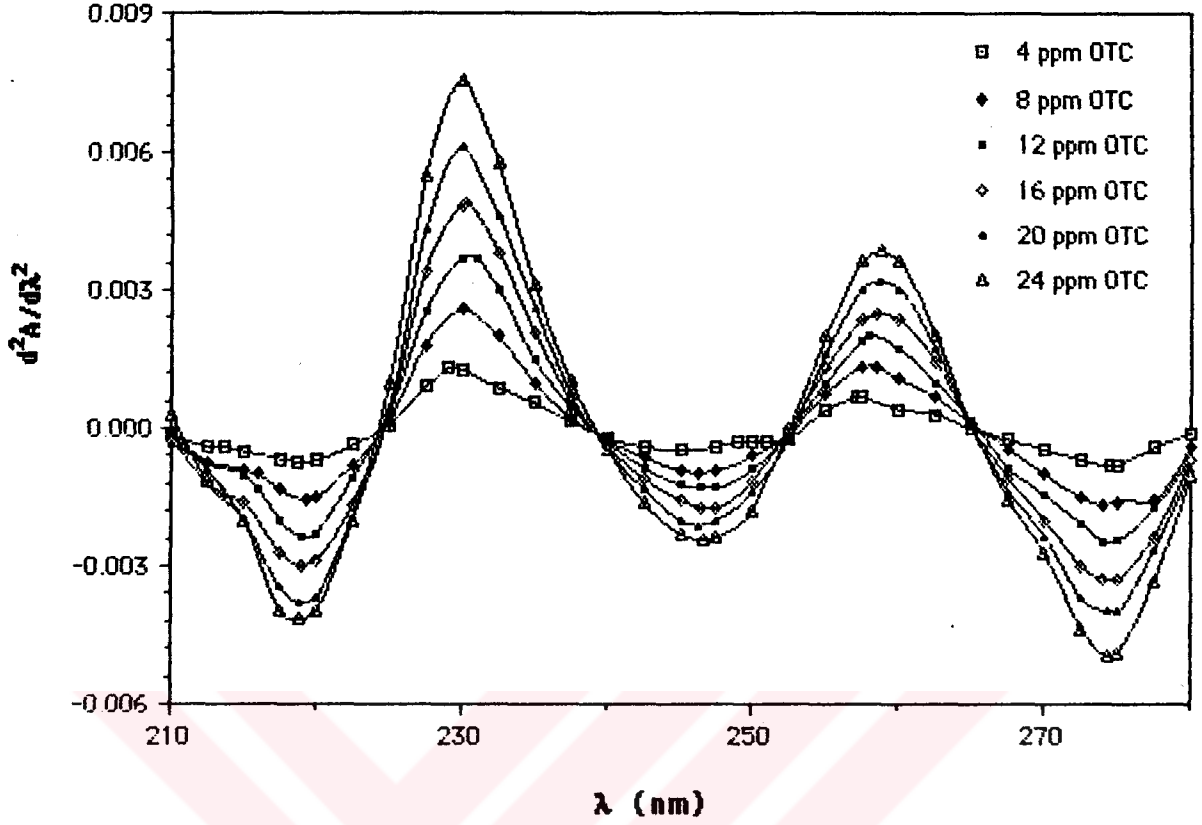
OTC, SM ve OTC+SM içeren çözeltilerin spektrum 2° türevleri (Şekil 4.11) incelendiğinde, 230.5 nm'de SM'in absorpsiyon yapmadığı (SM=0), buna karşılık OTC'nin bu dalga boyunda absorpsiyon yaptığı görülmektedir.

Aynı şekilde, OTC'nin 239.5 nm de absorpsiyon yapmadığı, fakat SM'in yaptığı görülmektedir.

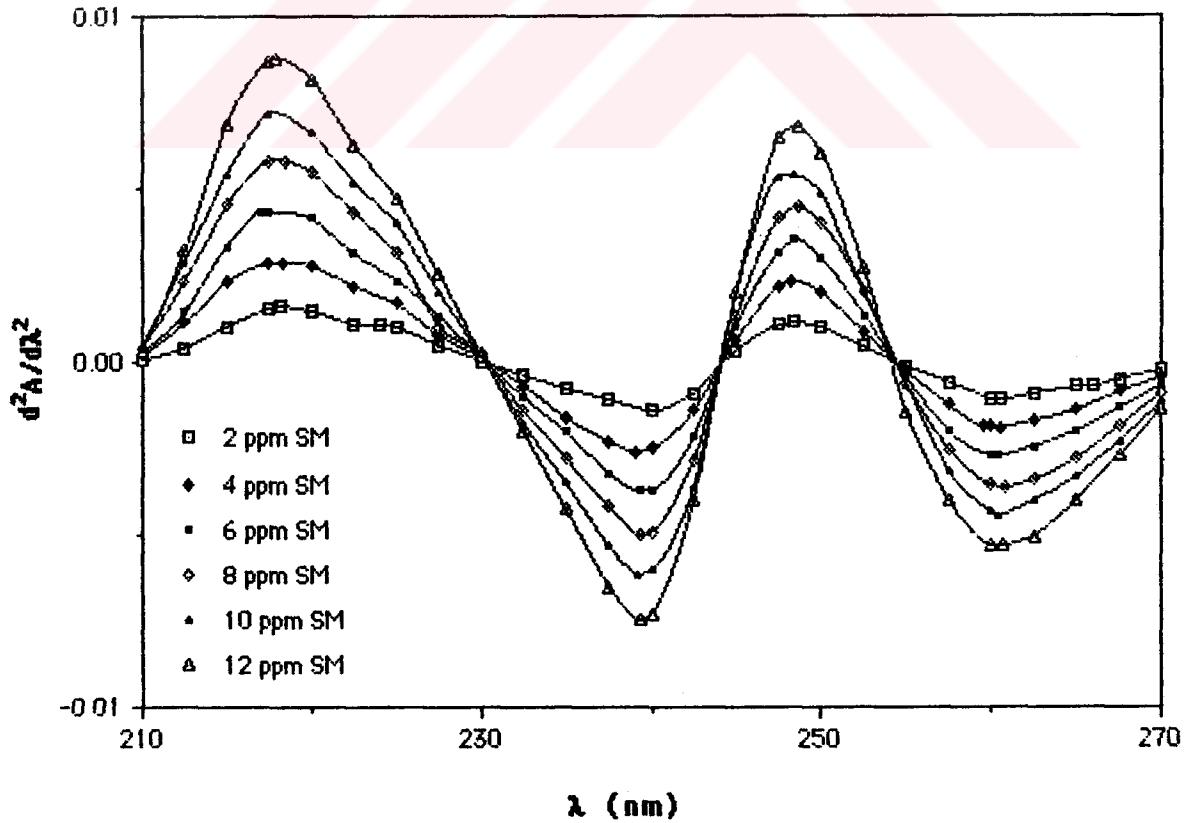


Şekil 4.11. OTC, SM ve OTC+SM içeren Çözeltilerin Spektrum 2° Türevleri

Öte yanda, 4-24 ppm OTC ve 2-12 ppm SM içeren çözeltilerin 2° türev spektrumları (Şekil 4.12 ve 4.13) incelendiğinde 230.5 nm'de OTC konsantrasyonu ile absorpsiyon arasında ve 239.5 nm'de ise SM konsantrasyonu ile absorpsiyon arasında lineer bir ilişki olduğu gözlenmektedir.

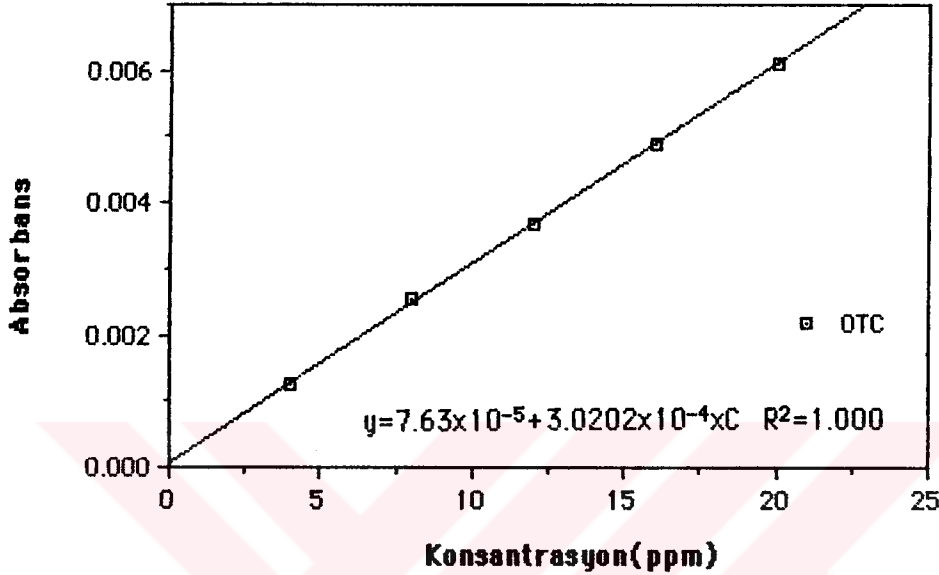


Şekil 4.12. Değişik Konsantrasyonlarda OTC İçeren Çözeltilerin Spektrum 2° Türevleri

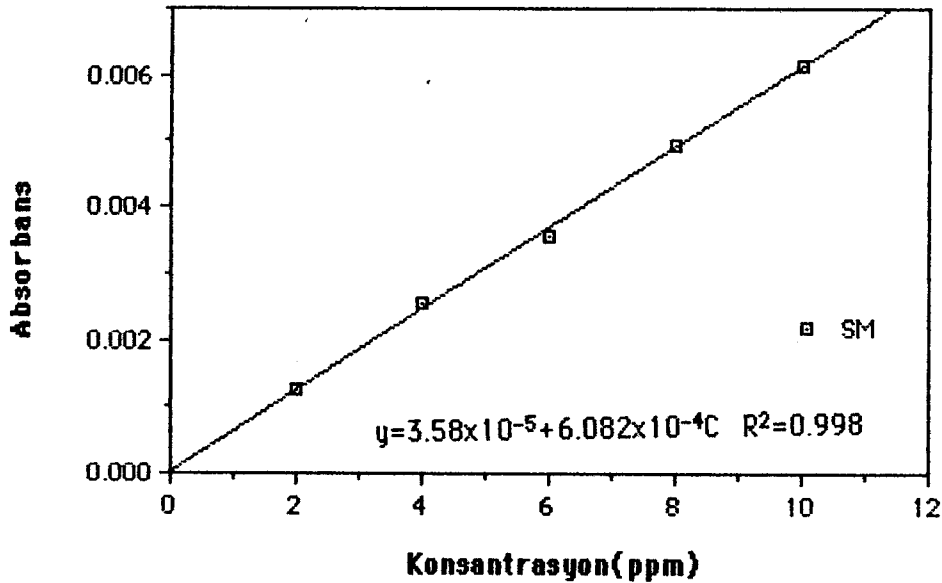


Şekil 4.13. Değişik Konsantrasyonlarda SM İçeren Çözeltilerin 2° Türev Spektrumları

OTC+SM'in birlikte tayininde yararlanılmak üzere geliştirilen spektrum 2° türev kalibrasyon grafikleri Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'de görülmektedir.



Şekil 4.14. OTC+SM İçeren Çözeltilerde OTC Tayini için 230.5 nm'de Spektrum 2° Türev Kalibrasyon Grafiği (8 örnek x 2 analiz ortalaması)



Şekil 4.15. OTC+SM İçeren Çözeltilerde SM Tayini için 239.5 nm de 2° Türev Spektrumu Kalibrasyon Grafiği (8 örnekx2 analiz ortalaması)

Yöntem, Tablo 4.2'de sonuçları verilen geri kazanma deneyleri ile test edilerek % 90'ın üzerinde tekrarlanabilir doğru sonuçlar alınmıştır.

Tablo 4.2. 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

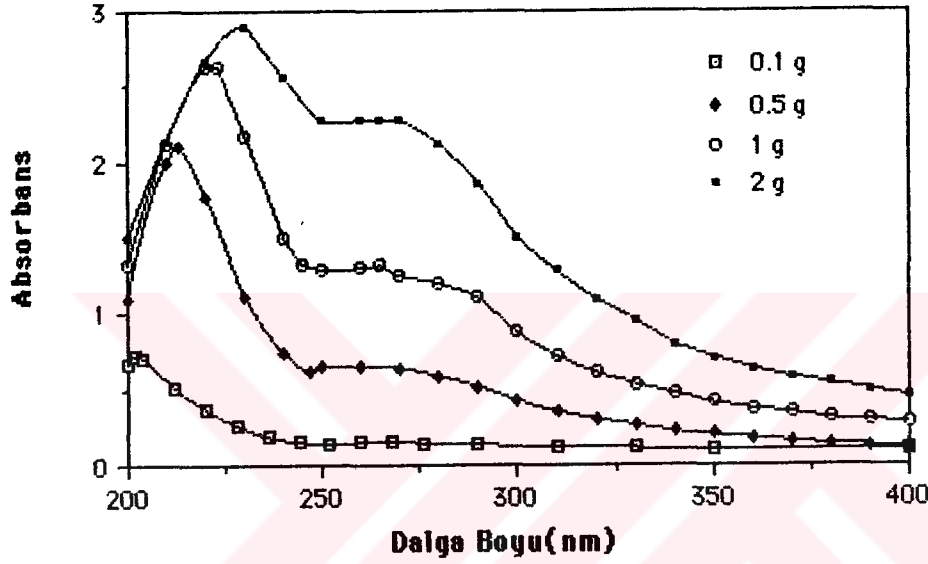
* (8 örnek x 2 analiz ortalaması)

4.7. OTC + SM İçeren Balda Türev Spektrumu Yardımıyla İki İlacın Birlikte Tayini

4.7.1. Bal Örneği Miktarı

Balda ilaç tayini için kullanılacak bal örneği miktarının tesbiti amacıyla 3.2.7.1'de açıklandığı şekilde hazırlanan bal örneklerinin elde edilen spektrumları incelendiğinde (Şekil 4.16) : 1 g ve 2 g bal içeren çözeltilerin, yüksek absorpsiyon yapmaları nedeniyle analiz sınırlarını aştıkları gözlenmektedir. 0.1 g bal örneğinin normal spektrumu ve türev spektrumlarında çok belirgin pikler vermediği saptanmıştır. Ayrıca, örnek miktarının çok düşük olmasının yapılacak analizin doğruluğunu olumsuz etkileyeceği düşünülmüştür.

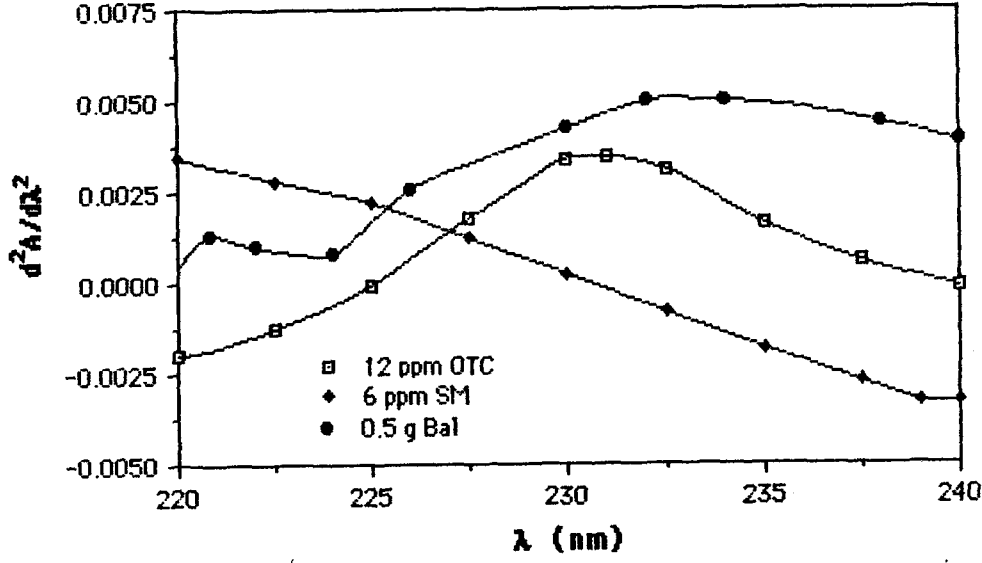
0.5 g bal örneğinin absorpsiyon piklerinin analiz için uygun olduğu belirlendi. Bu nedenle çalışmada 0.5 g bal örnekleri kullanıldı.



Şekil 4.16. Farklı Miktarlarda Bal İçeren Çözeltilerin Spektrumları

4.7.2. Dalga Boyu Seçimi

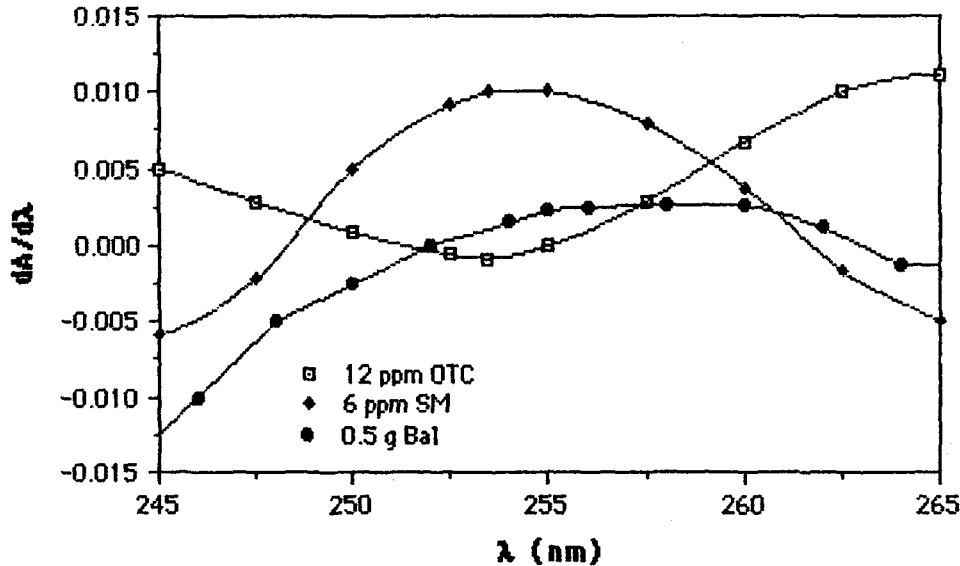
Bal, OTC ve SM ile bal + OTC, bal + SM ve bal + OTC + SM örneklerinin normal spektrumları ve 1°-4° türev spektrumları karşılaştırıldı. OTC ve SM'nin saf çözeltilerde tayinine olanak sağlayan 2° türev spektrumunda OTC'nin tayin edildiği 230.5 nm'de, bal örneği pik verdiği halde SM'in pik vermediği (SM=0), SM'in tayin edildiği 239.5 nm'de de SM ile balın pik vermelerine karşılık karışımlarda bu piklerin birbirlerini etkiledikleri saptandı (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Bal, OTC ve SM'in 220-240 nm Aralığında 2° Türev Spektrumları

Bal, OTC ve SM'in 245-265 nm aralığında elde edilen 1° türev spektrumlarında 254.6 nm dalga boyunda SM ve balın pik verdikleri buna karşılık OTC'in pik vermediği (OTC = 0) belirlendi (Şekil 4.18).

Bu nedenler OTC + SM içeren ballarda OTC'nin tayin edilmesi için 2° türev spektrumunda 230.5 nm, SM'in tayin edilmesi içinde 1° türev spektrumunda 254.6 nm dalga boyları seçildi.

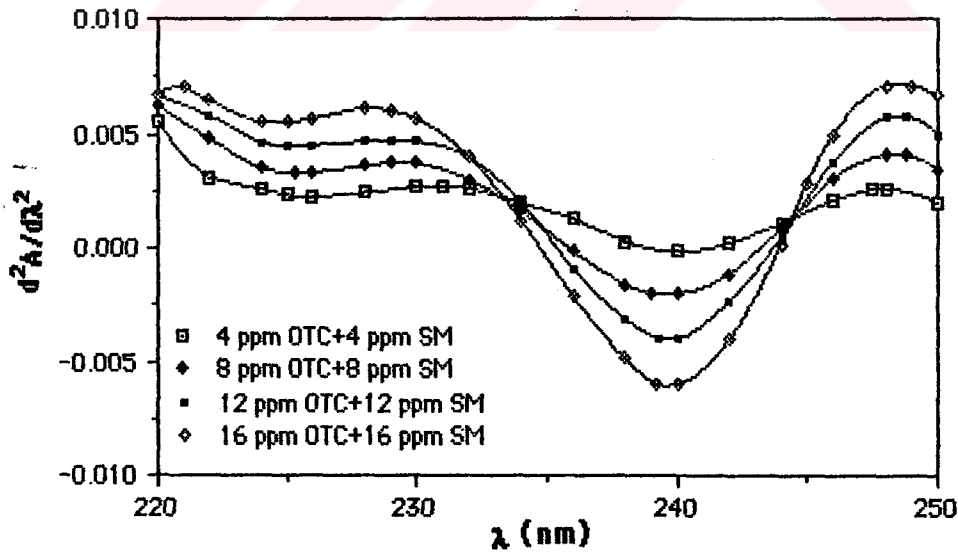


Şekil 4.18. Bal, OTC ve SM'in 245-265 nm Aralığında 1° Türev Spektrumları

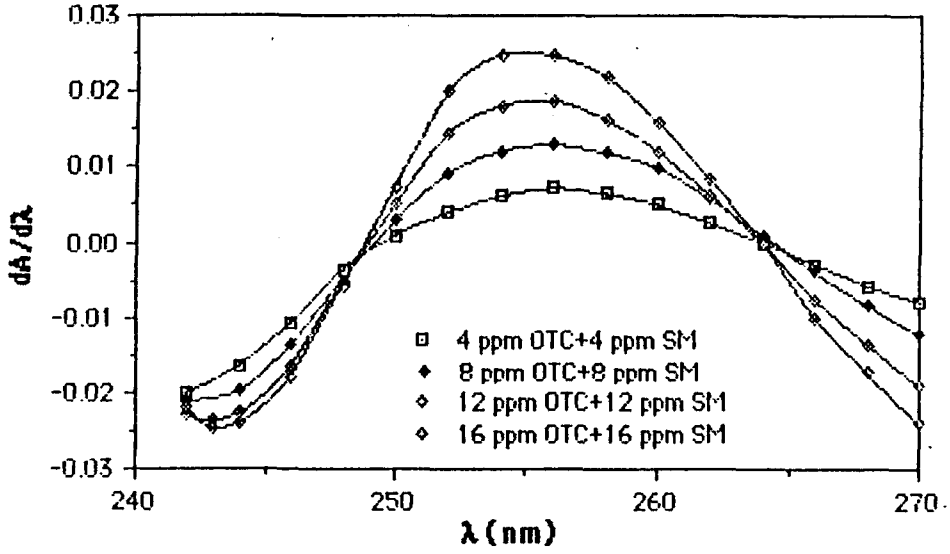
4.7.3. Bal Örneklerindeki OTC ve SM'in Miktarlarının Belirlenmesi

0.5 g bal örneği ve 4-16 ppm OTC ve SM bulunduracak şekilde 3.2.7.1'de açıklandığı şekilde hazırlanan bal çözeltilerinin, OTC'nin tayini için 2° türev spektrumunda 230.5 nm, SM'in tayini için 1° türev spektrumunun 254.6 nm'de standart ekleme yöntemi ile OTC ve SM miktarları bütün bal örnekleri için belirlendi.

Değişik konsantrasyonlarda OTC + SM içeren bal örneklerinde 220-250 nm arasında 2° türev spektrumu ve 240-270 nm arasında 1° türev spektrumunda, ilaç konsantrasyonlarıyla absorbanans arasındaki ilişkiyi gösteren türev spektrumları Şekil-4.19 ve Şekil-4.20'de görülmektedir.

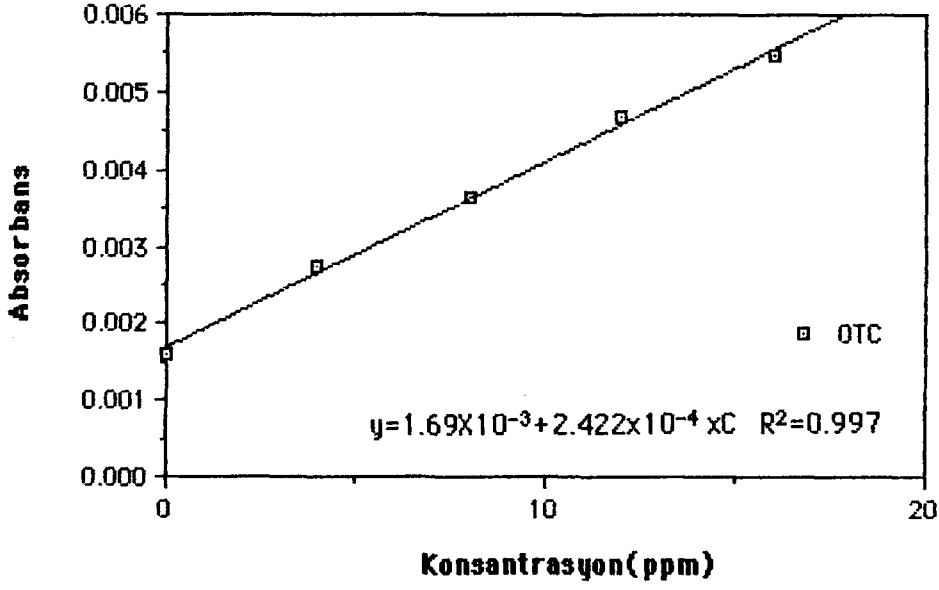


Şekil 4.19. 4-16 ppm OTC ve SM içeren Bal Örneklerinin 220-250 nm Aralığında 2° Türev Spektrumları

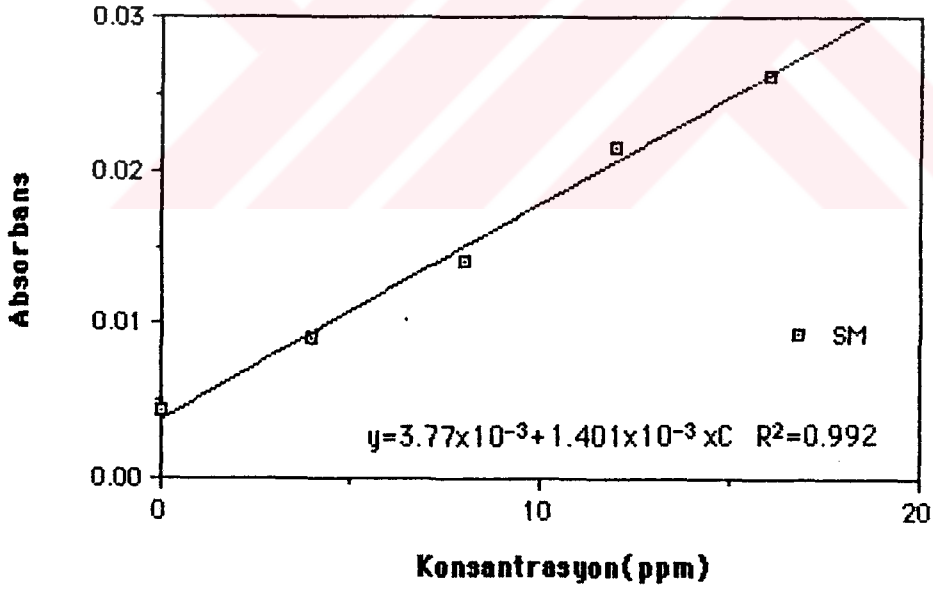


Şekil 4.20. 4-16 ppm OTC ve SM içeren Bal Örneklerinin 240-270 nm Aralığında 1° Türev Spektrumları

Bal örneklerindeki OTC ve SM in miktarlarının belirlenmesi için standart ekleme yöntemiyle, OTC için 2° türev spektrumunda 230.5 nm de, SM için 1° türev spektrumunda 254.6 nm de, bala ilave edilen OTC + SM konsantrasyonlarına karşılık elde edilen absorban değerlerini gösteren standart eğriler Şekil 4.21 ve Şekil 4.22'de görülmektedir.



Şekil 4.21. (A) Marka Kodlu Balda, 2° Türev Spektrumunda 230.5 nm de OTC Miktarının Tesbit Edildiği Kalibrasyon Grafiği



Şekil 4.22. (A) Marka Kodlu Balda, 1° Türev Spektrumunda 254.6 nm de SM Miktarının Tesbit Edildiği Kalibrasyon Grafiği

Şekil 4.21 ve Şekil 4.22'deki gibi her bir bal örneğinde tesbit edilen OTC ile SM miktarları ve regresyon denklemleri için elde edilen sonuçlar Tablo 4.3 ve 4.4'de görülmektedir.

Tablo 4.3. Bal Örneklerinde Bulunan OTC Miktarları ve Regrasyon Denklemleri

Marka Kodu	Denklem	R	OTC* (ppm)
A	${}^2D_{230.5} = 1.691 \times 10^{-3} + 2.422 \times 10^{-4}C$	0.998	6.98
B	${}^2D_{230.5} = 5.948 \times 10^{-4} + 2.210 \times 10^{-4}C$	0.994	2.69
C	${}^2D_{230.5} = 4.505 \times 10^{-3} + 2.717 \times 10^{-4}C$	0.991	16.58
D	${}^2D_{230.5} = 5.209 \times 10^{-3} + 2.901 \times 10^{-4}C$	0.993	17.95
E	${}^2D_{230.5} = 2.618 \times 10^{-3} + 2.700 \times 10^{-4}C$	0.995	9.69
F	${}^2D_{230.5} = 3.359 \times 10^{-3} + 2.758 \times 10^{-4}C$	0.992	12.18

* (8 örnek x 2 analiz ortalaması) ${}^2D_{230.5} = \lambda^0$ türev, 230.5 nm

Tablo 4.4. Bal Örneklerinde Bulunan SM Miktarları ve Regrasyon Denklemleri

Marka Kodu	Denklem	R	OTC* (ppm)
A	${}^1D_{254.6} = 3.774 \times 10^{-3} + 1.401 \times 10^{-3}C$	0.996	2.69
B	${}^1D_{254.6} = 7.952 \times 10^{-3} + 1.351 \times 10^{-3}C$	0.997	5.88
C	${}^1D_{254.6} = 1.416 \times 10^{-3} + 1.260 \times 10^{-3}C$	0.998	1.12
D	${}^1D_{254.6} = 1.942 \times 10^{-3} + 1.086 \times 10^{-3}C$	0.994	1.78
E	${}^1D_{254.6} = 3.960 \times 10^{-3} + 1.246 \times 10^{-3}C$	0.994	3.17
F	${}^1D_{254.6} = 1.620 \times 10^{-2} + 1.202 \times 10^{-3}C$	0.991	13.48

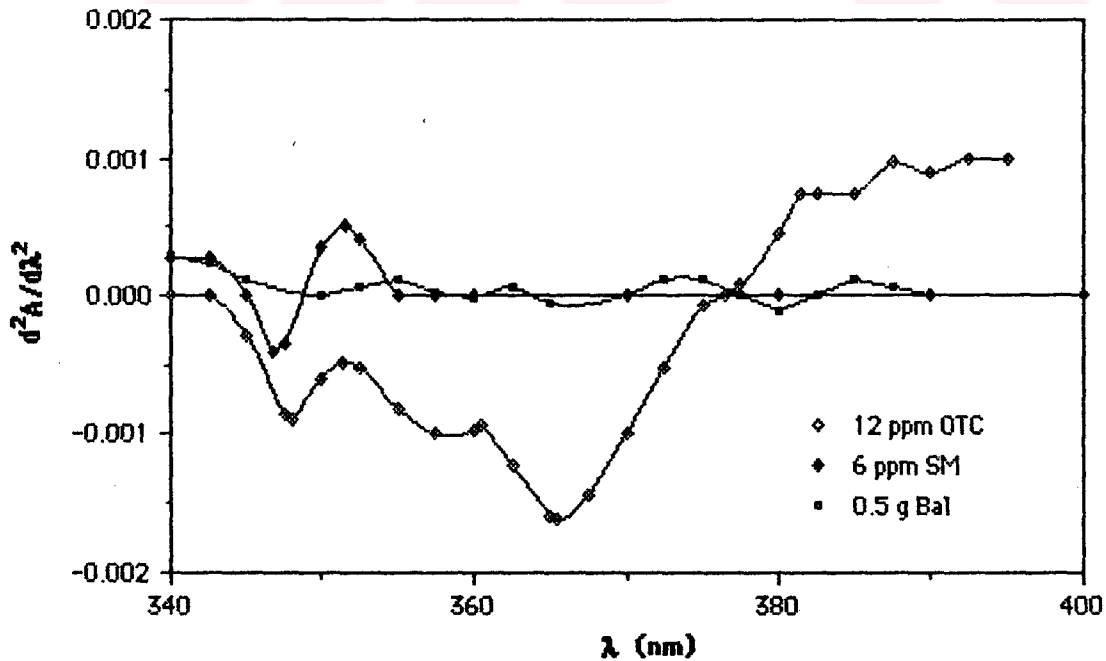
* (8 örnek x 2 analiz ortalaması) ${}^1D_{254.6} = \lambda^0$ türev, 254.6 nm

4.8. OTC ve SM'in Geri Kazanılması

4.8.1. Dalga Boyu Seçimi

Bal, OTC ve SM ile bal+OTC, bal+SM ve bal+OTC+SM örneklerinin normal spektrumları ve 1°-4° spektrum türevleri karşılaştırıldı.

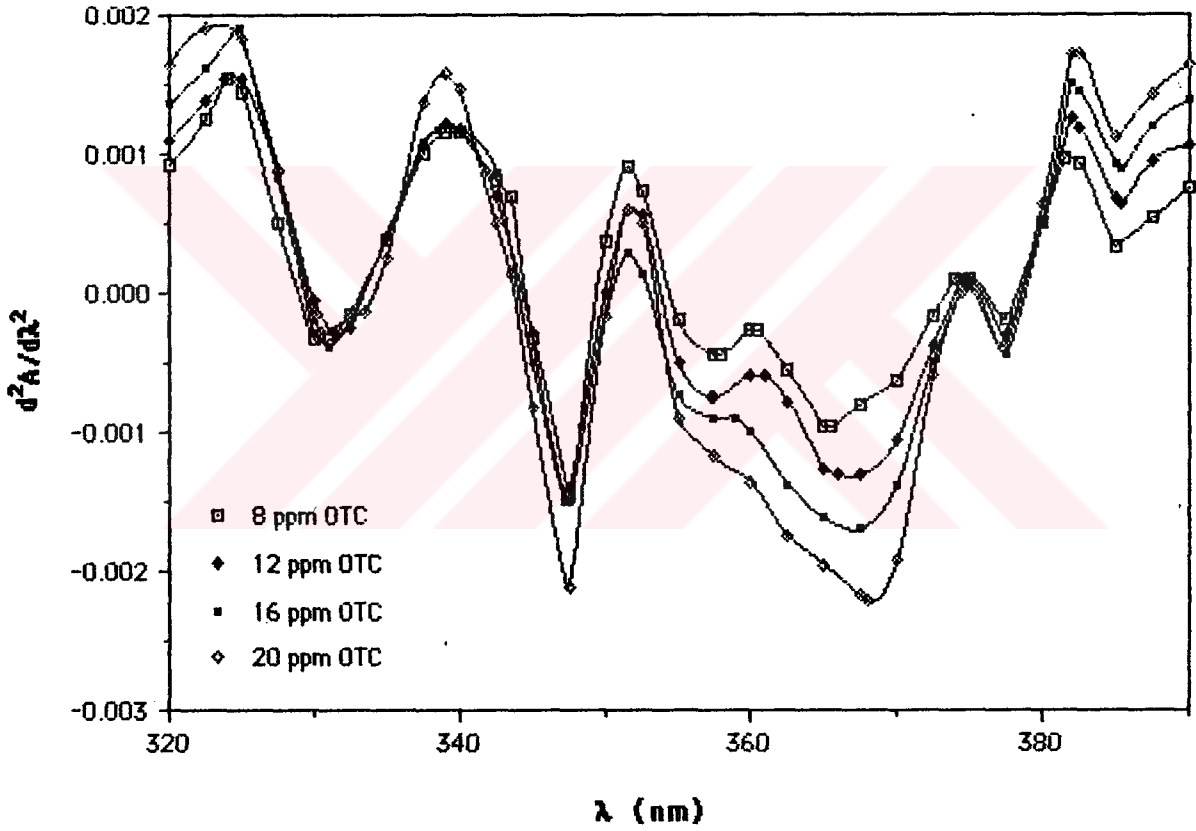
Bal, OTC, SM'in 340-400 nm aralığında elde edilen 2° türev spektrumlarında OTC'nin 370 nm dalga boyunda pik vermesine karşılık bal ve SM'in absorpsiyon yapmadıkları (bal=0, SM = 0) belirlendi (Şekil 4.23). Bunun yanında 245-265 nm aralığında elde edilen 1° türev spektrumlarında SM'in 252 nm dalga boyunda pik vermesine karşılık bal ve OTC'in absorpsiyon yapmadıkları (bal = 0, OTC = 0) saptandı (Şekil 4.18). Bu nedenle bala ilave edilen OTC ve SM'nin geri kazanılma düzeylerinin belirlenmesinde OTC için 2° türev 370 nm ve SM için 1° türev 252 nm kullanıldı.



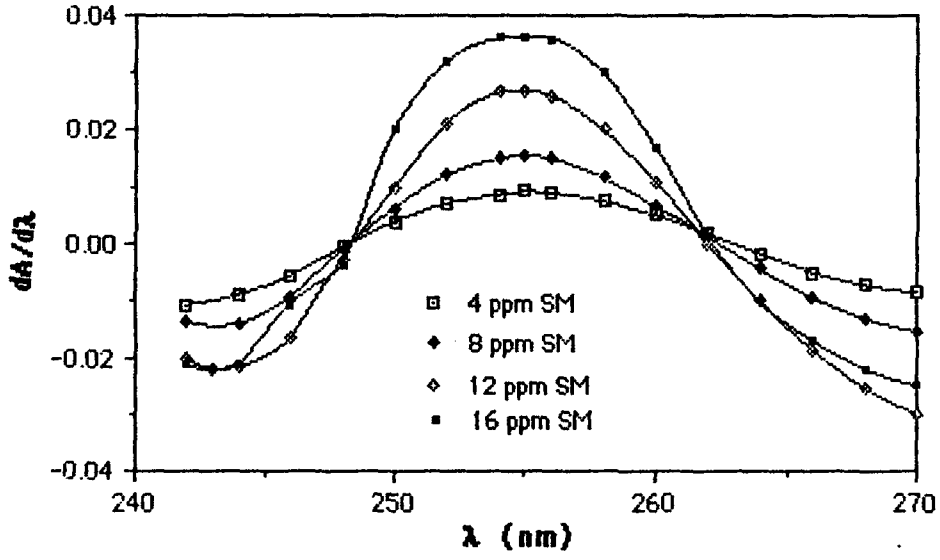
Şekil 4.23. Bal, OTC ve SM'in 340-400 nm Aralığında 2° Türev Spektrumları
(OTC'nin geri kazanılması için dalga boyu = 370 nm, Bal = 0, SM = 0).

4.8.2. Konsantrasyon-Absorbans ilişkisi

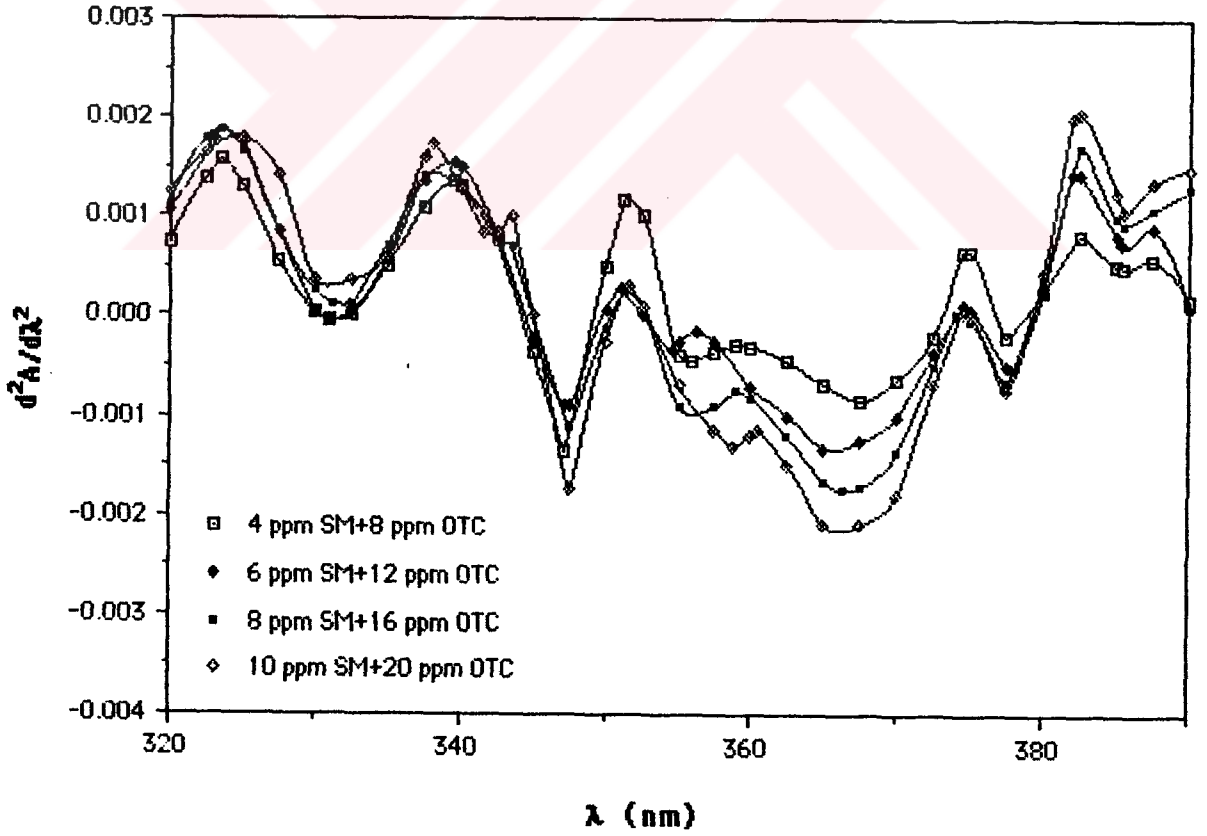
Değişik konsantrasyonlarda OTC, SM ve OTC + SM içeren bal örneklerinde ilaç konsantrasyonlarıyla absorbans arasındaki ilişkiyi gösteren türev spektrumları. Şekil 4.24-4.27'de görülmektedir.



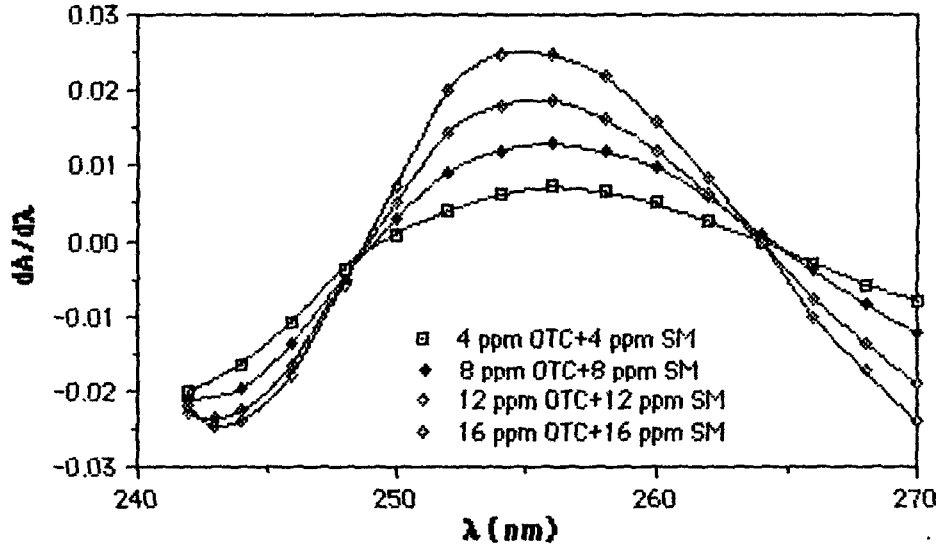
Şekil 4.24. 8-20 ppm OTC İçeren Bal Örneklerinin 370 nm'de 2° Türev Spektrumları



Şekil 4.25. 4-16 ppm SM İçeren Bal Örneklerinin 252 nm'de 1° Türev Spektrumları



Şekil 4.26. Değişik Oranlarda OTC ve SM İçeren Bal Örneklerinin 370 nm de 2° Türev Spektrumları



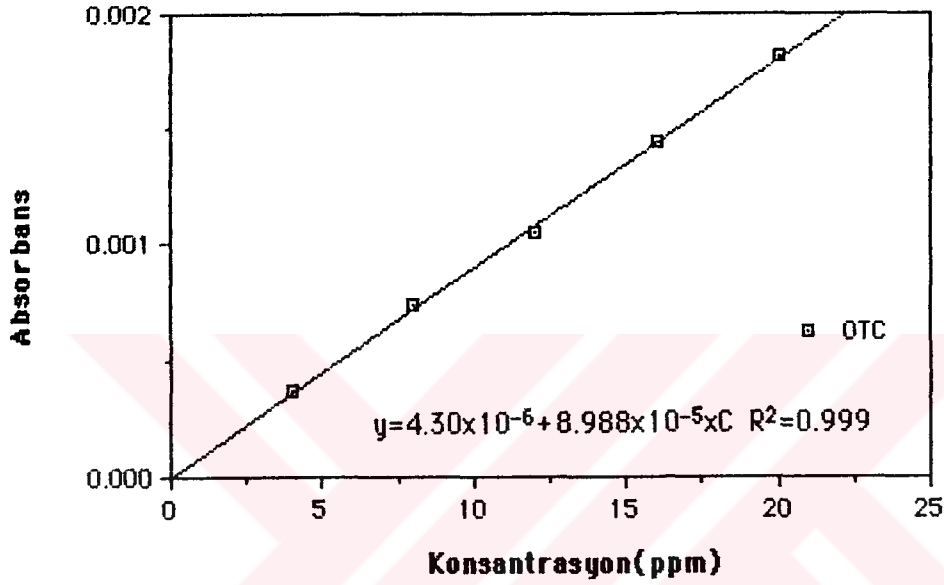
Şekil 4.27. Değişik Oranlarda OTC ve SM İçeren Bal Örneklerinin 252 nm'de 1° Türev Spektrumları

Değişik oranlarda OTC, SM bulunduran bal+OTC, bal+SM, bal+OTC+SM çözeltilerinde konsantrasyonla-absorbans arasında lineer bir ilişkinin olduğu saptandı.

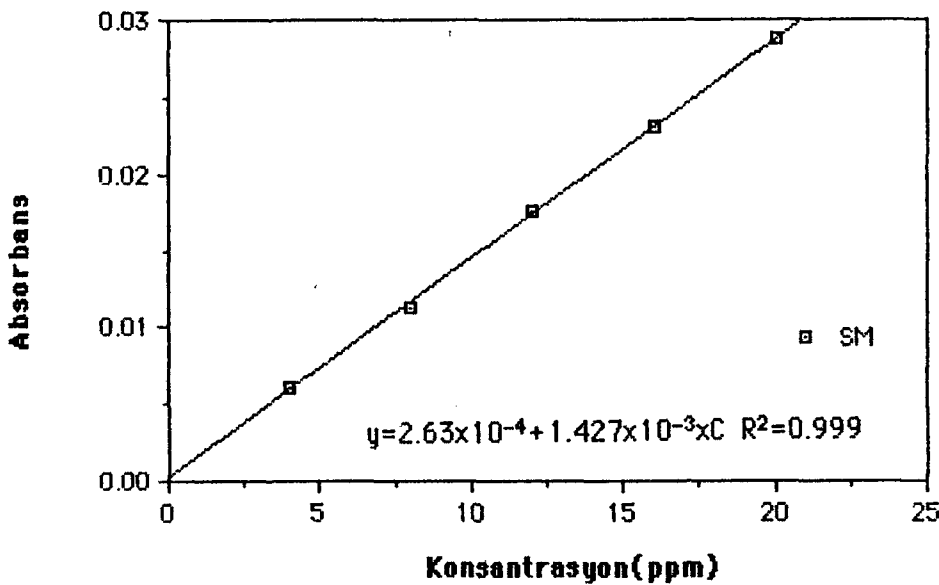
4.8.3. OTC ve SM'in Geri Kazanılma Miktarları

Bal örneklerinde ilave edilen OTC'nin geri kazanılma oranını belirlemek için, 0-20 ppm arasında saf OTC içeren çözeltilerin 370 nm'de 2° türev absorbans değerleri (bal=0, SM=0) kullanılarak elde edilen OTC kalibrasyon grafiği Şekil 4.28'de görülmektedir. Aynı şekilde saf SM içeren çözeltilerin 252 nm 1° türev absorbans değerleri (bal=0, OTC=0) kullanılarak elde edilen SM kalibrasyon grafiği Şekil 4.29'da verilmiştir.

Değişik oranlarda OTC ve SM içeren bal örneklerinin; OTC için 370 nm'de 2° türev, SM için 252 nm'de 1° türev absorbans değerleri ve kalibrasyon grafikleri yarımdıyla bulunan geri kazanma oranları Tablo 4.5'de görülmektedir.



Şekil 4.28. OTC+SM İçeren Bal Örneklerinde OTC'nin Geri Kazanılması İçin 2° Türev 370 nm de Saf OTC'in Kalibrasyon Grafiği



Şekil 4.29. OTC+SM İçeren Bal Örneklerinde SM'in Geri Kazanılması İçin 1° Türev 252 nm de Saf SM'in Kalibrasyon Grafiği

Tablo 4.5. Bala İlave Edilen OTC ve SM'm Geri Kazanılma Oranları

Örnek	Tayin Edilen	İlave edilen Miktar (ppm)	OTC/SM Oranı	Geri Kazanılan Miktar (ppm)	Geri Kazanma Oranı (%)
Bal + OTC	OTC	4.0		4.1*	102
		8.0		7.3	91
		12.0		11.3	94
		16.0		14.7	91
		20.0		18.6	93
Bal + SM	SM	4.0		3.8	95
		8.0		7.5	94
		12.0		11.8	98
		16.0		15.4	96
		20.0		19.0	95
Bal+OTC+SM	OTC	5.0	1:1	4.5	90
		10.0	2:1	9.4	94
		15.0	3:1	14.3	95
	SM	5.0	1:1	4.8	96
		10.0	1:2	9.5	95
		15.0	1:3	14.5	96

*(8 örnek x 2 analiz ortalaması)

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Saf Oksitetrasiklin ve Sulfamezatinin her ikisinde UV - bölgesinde absorpsiyon yapmaktadırlar (Şekil 4.1). Normal spektrumlarında OTC 275 ve 355 nm dalga boylarında, SM ise 240.4 nm ve 262 nm de pik vermektedirler. Her iki ilacın analizi için uygun pH aralığı 4-6 dır. pH= 4.8 olan asetat tamponu ile hazırlanan örneklerle alınan sonuçlar kararlılık göstermektedir (Şekil 4.2-4.7). Saf OTC çözeltilerindeki OTC miktarı 275 nm de normal spektrum absorpsiyon değerlerinden, SM ise 262 nm de belirlenebilmektedir. İki ilacı birlikte içeren çözeltilerde spektrumlar (Şekil4.10) birbirlerini etkilediği için güvenilir sonuçlar alınamamaktadır.

Buna karşılık OTC+SM içeren saf çözeltilerin 2° türevlerinde 230.5 nm de OTC konsantrasyonu ile absorpsiyon arasında, lineer bir ilişki saptanmıştır. SM için aynı ilişki 239.5 nm de görülmektedir (Şekil 4.12-4.15). Bu ilişkinin kullanıldığı geri kazanma deneyleri saf OTC + SM karışımlarında bulunan ilaçların 20 ppm düzeyine kadar % 90'nın üzerinde bir doğruluk ile tayin edilebileceğini göstermiştir (Tablo 4.2).

Salinas ve ark. (1991) Sulfatiazol ve Oksitetrasiklin ile yaptıkları benzer çalışmada pH= 3.8 asetat tamponu ile hazırladıkları çözeltilerde 4° türev kullanarak OTC 276 nm ve 293 nm'lerde, Sulfatiazol ise 270.5 nm ve 288 nm'lerde tayin etmişlerdir. 2° türev kullanarak OTC tayini için 360 nm ve 293 nm'leri ve Sulfatiazol için 289 nm'yi önermişlerdir. Araştırmacıların kullandıkları ilaçlardan birisi ve pH farklı olduğundan, 2° türev için önerilen dalga boyunun bu çalışmadan farklı oluşu ilaçların etkileşimine bağlanabilir.

Balda OTC ve SM tayini için alınacak uygun bal örneği miktarının 0.5 g olduğu belirlenmiştir. Daha fazla miktarlarda alınan örnekler fazla absorbsiyon yapmaları nedeniyle analiz sınırını aşmakta, daha düşük miktarlar bir yandan analizin doğruluğunu olumsuz yönde etkilemekte öte yanda da belirgin pik vermemektedir.

Balda, OTC'in 370 nm de 2° türev (bal=0 , SM=0, absorbsiyon) (şekil 4.18) SM'in 252 nm 1° türev (bal = 0, OTC =0, absorbsiyon) kullanılarak yapılan ilaçları geri kazanma deneyleri (Tablo 4.3), bala farklı miktar ve oranlarda eklenen ilaçların geri kazanma oranının % 90 ve üzerinde olduğunu göstermiştir. Bulgular, diğer ilaçlar için literatürde verilen oranlarla uyum halindedir (Murillo ve ark.1990, Nevado ve ark. 1991-1992, Onur ve Acar, 1989).

Satın alınan ballarda OTC analizi için 230.5 nm (SM=0) 2° türev, SM tayini için de 254.6 nm (OTC=0) 1° türev (şekil:4.17-4.18) seçilerek, örnekler standart ekleme yöntemi kullanarak analiz edildi. Piyasada satılan balların 2.69 ppm -17.95 ppm OTC ve 1.12 ppm-13.48 ppm SM içerdikleri saptandı. Arjantin ve Kanada'da en çok 7 ppm, Japonya'da gıdalarda 1ppm oksitetrasikline (Saldamlı, 1985) izin verildiği, Avrupa ülkelerinde gıdaların ilaç kalıntısı içermemesi yönünde yasal düzenlemelere gidildiği dikkate alındığında bulgular arıcılarımızın bilinçsizce ilaç kullandıklarını ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak: OTC ve SM'i saf karışımlarında ve balda türev spektroskopisi yöntemiyle tayin edilebileceği gösterilmiştir. Yöntem herhangi bir ön işlem yada ayırma prosesine ihtiyaç duymadan uygulanabilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- ABDETHAY, M.H., and EL-WAILLY, A.M., 1993. Simultaneous Analysis of a Ternary Mixtures of Pharmaceuticals Containing Trimethoprim, Sulfamethoxazole and Phenazopyridine Hydrochloride Using Third Derivative and Zero-Order Photodiode Array Spectrophotometry. *Spectroscopy Letters*, 26(9) : 1745-1759.
- ACAR, N., and ONUR, F., 1991. Determination of Ephedrine Hydrochloride and Nikethamide in Combination by Second Derivative UV-Spectrophotometry. *J.Fac. Pharm. Gazi*. 8(2) : 81-87.
- BOTSOGLOU, N.A., 1991. Determination of Free Gossypol in Cottonseed and Cottonseed Meals by Second-Derivative Ultraviolet Spectrophotometry. *J.Agric.Food Chem.* 39 : 478-482.
- BUDAYARI, S., ve Ark., 1989. The Merck Index. Merck and Co. Inc. Rahway, N.J. Sayfa 1103-1104, 1406.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (CAC). 1970. Recommended European Standard for Honey. *Bee World*. 51(2) : 79-91.
- CAMPOS, M.G.R., 1989. Detaccao de Melibiose nos Glucidos do mel por Cromatografia Liquida de alta Pressao. *Revista Portuguesa de Farmacia*. 39(3) : 101-103.
- ÇAKIR, H., VE TÜMEN, G., 1992. Balıkesir Yöresi Ballarındaki Dominant ve Sekonder Polenler. Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bilimsel Raporlar Serisi, No : 16, Bursa, 9 sayfa.

DİE, 1991, İstatistik Yıllığı. Devlet İstatistik Enstitüsü, Ankara, sayfa 290

DİF, 1995. Tetramerazin Kullanım Talimatı. Doğu İlaç Fabrikası A.Ş. İstanbul.

ERDİK, E., 1993. Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler. Gazi Büro Basımevi, Ankara 531 sayfa.

FAO/WHO, 1969. Recommended European Regional Standard for Honey. CAC-RS-12, Rome,

FLETOURIS, D.F., BOTSOGLU, N.A., PAPAGEORGIOU, G.E., and MANTIS, A.J. 1993. Rapid Determination of Tryptophan in Intact Proteins by Derivative Spectrophotometry. JAOAC. Int. 76(6) : 1168-1173.

HEMMERLING, C.H., 1987. Zur Gaschromatographischen Rückstandsbestimmung von Amitraz in Bienenhonig. Die Nahrung, 31(8) : 835-836.

JEFFRY, G.H., BASSETT, J., MENDHAM, J., and DENNEY, R.C. 1989. Textbook of Quantitative Chemical Analysis. Longman, London. 5 : 668-670.

MACH, H., MIDDAUGH, C.R., and LEWIS, R.V., 1992. Detection of Proteins and Phenol in DNA Samples With Second-Derivative Absorbtion Spectroscopy. Anal. Biochem. 200 : 20-26.

MIGUEL, AL., FERNANDEZ, M., and LOZANO, J.S., 1991. Simplified Method for the Determination of Organochlorine Pesticides in Honey. Analyst. 116 : 269-271.

- MOLZAHN, D., and WERTHMÜLLER, U.A., 1993. Cesium Radioactivity in Several Selected Species of Honey. *The Science of the Total Environment*. 130/131: 95-108.
- MUÑO, M.A.F., and LOZANO, J.S., 1991. Mass spectrometric Determination of PCP in Honey. *Analy. Chim. Acta*. 247 : 121-123.
- MURILLO, J.A., RODRIGUEZ, J., LEMUS, J.M., and ALANON, A., 1990. Determination of Amoxicillin and Cephalexin Mixtures by Second-Derivative Spectrophotometry. *Analyst*. 115: 1117-1119.
- NAIR, D.S., RAD, T.P., Iyer, C.S.P. and Demodaran, A.D., 1993. Forth Order Derivative Spectrophotometric Determination of Lead with the 1,10-Phenanthroline and Rose Bengal. *Anal. Lett.* 26(3) : 523-539.
- NEVADO, J.J.B., MAHEDERO, M.C., OLÍBARES, J.A., and SALINAS, F., 1991. Determination of Amitraz in Honey by First-Derivative Spectrophotometry. *International Journal of Analytical Chemistry*. 43 : 187-194.
- NEVADO, J.J.B., GALLEGO, J.M.L., and Penalvo, G.C. 1992. Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim by Ratio Spectra Derivative Spectrophotometry. *Fres. J. Anal. Chem.* 342 : 723-728.
- ONUR, F., and ACAR, N., 1989. Determination of Paracetamol and Phenoprobamate in Sugar-Coated Tablets by First-Derivative Ultraviolet Spectrophotometry. *J. Fac. Pharm. Gazi*. 6(1) : 23-30.

ONUR, F., ACAR, N., 1992. Simultaneous Determination of Methylene Blue, Hexamethylene Tetramine and Resorcinol in Pharmaceutical Formulations by First-Derivative UV-Spectrophotometry. *Int. J.Pharmaceutics*. 78 : 89-91.

RAILONSALA, I., 1990. Honey and Its Physical Features. Doktora Tezi, University of Helsinki, 65 sayfa.

SALDAMLI, İ., 1985. Gıda Katkı Maddeleri ve İngrediyenler. H.Ü. Basımevi, Ankara, 197 sayfa.

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.

SANCHES, F.G., ve Ark., 1990. Simultaneous Determination Vanilin and Syringaldehyde in Rum by Derivative Spectrophotometry. *Analyst*. 115:1121-1143.

SANCHO, M.T., MUNIATEGUI, S., SANCHEZ, P., HUIDOBRO, J.F., and LOZANO, J.S., 1992(a) Study of Ash in Honey. *Bee Science*. 2(3) : 147-153.

SANCHO, M.T., MUNIATEGUI, S., HUIDOBRO, J.F., and LOZANO, J.S. 1992(b). Aging of Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40(1) : 134-138.

SEIJŌ, M.C., AİRA, M., INGLESİAS, I., JATO, M.V. 1992. Palynological Characterization of Honey from LaCoruna Province (NW Spain). *Journal of Agricultural Research*, 31(3/4) : 149-155.

- SEVİMLİ, H., BAYÜLGEN, N., VARİNLİOĞLU, A., 1992. Determination of Trace Elements in Honey by INAA in Turkey. J. Radional Nucl. Chem. Letters. 165(5) : 319-325.
- SORKUN, K., İNCEOĞLU, Ö., 1984(a). İç Anadolu Bölgesi Ballarında Bulunan Dominant Polenler, Doğa Bilim Dergisi, A₂ - 8, 3, 377-381.
- SORKUN, K., İNCEOĞLU, Ö., 1984(b). İç Anadolu Bölgesi Ballarında Polen Analizi, Doğa Bilim Dergisi, A₂ - 8, 2, 222-228.
- SORKUN, K., GÜNER, A., VURAL, M., 1989. Rize Ballarında Polen Analizi, Doğa-TU Botanik Dergisi, 13. 3, 547-554.
- ŞENOCAK, C., 1971. Arıcılık, Balkanlıoğlu Matbaacılık, Ankara, 120 sayfa.
- TETİK, İ., 1968. Yerli Tabii, Süzme Ballarımızın Besleyici Değeri ve Gıda Tüzüğü Yönünden Kimyasal Bileşimi Üzerine Araştırmalar. Yargıçoğlu Matbaası, Ankara, 80 sayfa.
- TOKB, 1987. Türkiye I. Arıcılık Kongresi, 22-24 Ocak 1980. TOK Bakanlığı TEDGEM Yayın No : 154. TOK Bakanlığı Basımevi, Ankara, 232 sayfa.
- TSE, 1978. Türk Standartları. 3036. Bal. TSE, Ankara.
- WERNER, M., 1982. CRC Handbook of Clinical Chemistry. Vol:1 CRC Press. Florida. 559 Pages.
- WILLARD, H.H., MERCİTT, L.L., DEAN, J.A., and SETTLE, F.A., 1981. Instrumental Methods of Analysis. Divan Nostrand CO. New York, 1030 sayfa.
- YAPAR, Y., 1995. Şahsi Görüşme.
- YOO, G.S., CHOI, K., and STEWART, J.T., 1990. Second Derivative Ultraviolet Spectrophotometry and HPLC With Fluorometric Detection of Cycloserine Using q-Chloro-10-Methyl Acridinum Triflate As a New UV and Fluorescent Labeling. Analytical Letters, 23(7) : 1245-1263.