

278985

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK FAKÜLTESİ GALENİK FARMASI BİLİM DALI

**ENJEKTABL ÇÖZELTİLERDE PİRİDOKSİN
HİDROKLORÜRÜN STABİLİTESİ VE SODYUM
NOVAMİNSÜLFONAT İLE ETKİLEŞİMLERİ**

Ecz. Murat Şumnu

Doktora Tezi

Ankara, 1976

Hacettepe Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi Galenik Farmasi Bilim Dalı

ENJEKTABL ÇÖZELTİLERDE PİRİDOKSİN HİDROKLORÜRÜN
STABİLİTESİ VE SODYUM NOVAMİNSÜLFONAT
İLE ETKİLEŞİMLERİ

Ecz. Murat Şimnu

Doktora Tezi

Ankara, 1976

Tezimin yazılmasına yön veren Prof.Dr.S.Oğuz Kayaalp'e; çalışmamı yöneten ve bana her yönden yardımcı olan, bilgi ve fikirlerinden yararlandığım Dr.Sci.Pharm.Turan Altinkurt'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Spektrumların alınması ve değerlendirilmesinde bana yardımcı olan Dr.Sci.Pharm.Altan Bilgin'e; çalışmalarım esnasında gösterdiği yakın alaka ve yardımdan dolayı Ass.Ecz.Sema Önay'a; tezimin daktilo edilmesinde desteğini gördüğüm Serpil Doğanay'a ayrıca teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

I-GİRİŞ

A- B ₆ VİTAMİNİNİN KİMYASAL YAPISI.....	2
B- B ₆ VİTAMİNİ VE TÜREVLERİNİN ELDE EDİLİŞİ.....	4
C- B ₆ VİTAMİNİNİN ÖZELLİKLERİ.....	8
a- Fiziksel özellikleri.....	8
b- Kimyasal özellikleri.....	10
c- Farmakolojik özellikleri.....	12
D- TEŞHİS METODLARININ GÖZDEN GEÇİRİLMESİ.....	14
a- İnce tabaka kromatografisi ile teşhis.....	14
b- Kağıt kromatografisi ile teşhis.....	19
c- İyon değişim ve kolon kromatografisi ile teşhis....	22
d- Gaz kromatografisi ile teşhis.....	25
e- Kimyevi reaksiyonlar ile teşhis.....	26
f- IR,NMR ve kütle spektroskopisi ile teşhis.....	29
E- MİKTAR TAYİNİ METODLARININ GÖZDEN GEÇİRİLMESİ.....	32
a- Kimyasal ve fizikokimyasal metodlar.....	32
1- Kolorimetrik metodlar.....	32
- 2,6-Diklorokinon-klorimid (Gibbs) metodu....	32
-Dietil-p-fenilendiamin metodu.....	35
-Diazo reaksiyonuna dayanan metodlar.....	37
-Diğer kolorimetrik metodlar.....	39
2- Spektrofotometrik metodlar.....	40
3- Fluorometrik metodlar.....	42
4- Polarografik metodlar.....	43

5- Titrimetrik metodlar.....	44
b- Mikrobiyolojik ve enzimatik metodlar.....	46
c- Biyolojik metodlar.....	48
F- B ₆ VİTAMİNİNİN STABİLİTESİ.....	49
a- B ₆ vitamerlerin stabilitesi.....	49
b- B kompleks preparatlarında B ₆ vitamininin stabilitesi.....	58
c- Multivitamin preparatlarında B ₆ vitamininin stabilitesi.....	60
G- SODYUM NOVAMİNSÜLFONATIN GENEL ÖZELLİKLERİ VE STABİLİTESİ.....	62
a- Genel özellikleri.....	62
b- Stabilitesi.....	66
H- ÇALIŞMANIN AMACI.....	70
II- MATERYELLER VE METODLAR.....	71
A- MATERYELLER.....	71
a- Solvanlar.....	71
b- Kimyasal maddeler.....	72
c- Aletler ve malzemeler.....	73
B- METODLAR.....	75
a- Piridoksin hidroklorür ve piridoksin hidroklorür-sodyum novaminsülfonat çözeltilerinin hazırlanması.....	75
b- Piridoksin hidroklorür ve sodyum novaminsülfonatin teşhis metodlarının seçimi.....	82
1- Kromatografi sisteminin seçimi.....	82
2- İnce tabaka sisteminin hazırlanması ve kullanılması.....	91

3- Reaktif seçimi ve çeşitli reaktiflerin hassasiyetlerinin tayini.....	92
c- Piridoksin hidroklorür için tayin metodunun seçimi.....	96
1- Tayin metodu.....	96
2- Rengin dayanıklılık derecesi.....	102
3- Metodun kesinlik derecesi.....	103
d- Piridoksin hidroklorür türevlerinin sentezi.....	103
III- BULGULAR.....	108
A- MİKTAR TAYİNİ NETİCELERİ VE AMPULLERİN İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ İLE GÖZLENMESİ.....	108
B- MADDELERİN İNCE TABAKA KROMATOĞRAMLARINDAN ELÜSYON İLE ELDE EDİLMESİ.....	137
C-TEŞEKKÜL EDEN MADDELERİN SPEKTRAL ANALİZLERİ.....	139
IV - TARTIŞMA VE HÜKÜM.....	167
ÖZET	
KAYNAKLAR	

I- GİRİŞ

Tiyamin ve riboflavin gibi B-kompleks vitaminlerin izole edilmeleri ve sentezlerinin gerçekleştirilmesinden sonra, György, 1934 ve 1935 senelerinde arka arkaya yaptığı çalışmalarda, sıçanlara gerekli vitamin B₁ ve vitamin B₂ verdiği halde, hayvanların büyümesinde azalma olduğunu ve dermatitis görüldüğünü belirtti. Bu arazlara sebep olan maddeye, araştırmacı tarafından vitamin B₆ adı verildi (György, 1934 ve 1935; György, Kuhn ve Wagner-Jauregg, 1934).

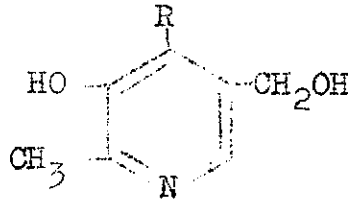
Vitamin B₆ ilk defa 1938 senesinde, pirinç kepeğinden hidroklorür tuzu halinde, izole edildi (Lepkovsky, 1938). Aynı seneler içinde, çeşitli gruplar tarafından, maddenin sentezi gerçekleştirildi ve 3-hidroksi - 4,5- dihidroksimetil - 2- metilpiridin yapısında olduğu gösterildi (Harris ve Folkers, 1939 b; Kuhn, Westphal, Wendt ve Westphal, 1939 b; Ichiba ve Michi, 1939 a). Maddeye piridin türevi olması nedeni ile, PİRİDOKSİN adı verildi.

Tabiatta vitamin B₆ aktivitesi gösteren tabii droglarda, aktivitenin sadece piridoksinden ileri gelmediğinin görülmesi üzerine, farelerde benzer farmakolojik aktiviteyi gösteren iki

maddenin sentezleri de gerçekleştirilmiştir (Snell, 1944 a ve b; Harris, Heyl ve Folkers, 1944 a). Bu bileşiklerden biri, piridoksinin 4- formil türevi PİRİDOKSAL ve diğeri de 4- aminometil türevi, PİRİDOKSAMİN'dir.

A- B₆ VİTAMİNİNİN KİMYASAL YAPISI :

Yukarıda belirtildiği gibi piridoksin, 3- hidroksi -4,5- dihidroksimetil - 2- metilpiridin yapısındadır (Harris ve diğ., 1939 b; Kuhn ve diğ., 1939 b; Ichiba ve diğ., 1939 a). Tabiatta vitamin B₆ aktivitesi gösteren tabii maddelerin, piridoksinde farkı, 4- pozisyonundaki substitüsyondur. Piridoksinde hidrok- simetil (-CH₂OH), piridoksalde formil (-CHO) ve piridoksaminde ise aminometil (-CH₂NH₂) substitüsyonları bulunur.



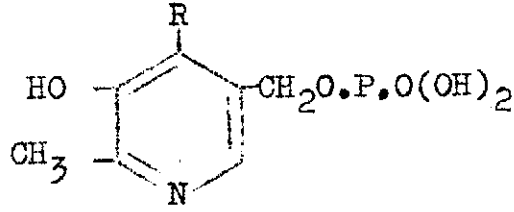
Piridoksin (R = -CH₂OH) : 3- hidroksi-4,5- dihidroksimetil-2- metilpiridin

Piridoksal (R = -CHO) : 3. hidroksi- 4- formil-5- hidroksime- til-2- metilpiridin

Piridoksamin (R = -CH₂NH₂) : 3- hidroksil-4- aminometil-5- hid- roksimetil-2- metilpiridin

Bu üç maddenin izole ve sentez edilmesinden sonra, piri- doksalin fosfatlanmış türevi, PİRİDOKSAL -5- FOSFAT (KODEKARBOK- SİLİZ) sentezi gerçekleştirildi (Gunsalus, Umbreit, Bellamy ve

Faust, 1945). Daha sonraları da piridoksin ve piridoksaminin fosfatlanmış türevlerinin sentezleri yapılmıştır (Umbreit, O'Kane ve Gunsalus, 1946; Heyl, Luz, Harris ve Folkers, 1951).



Piridoksin-5-fosfat (R = -CH₂OH) : 2- metil-3- hidroksi-4- hidroksimetil-5- piridilmetilfosforik asid

Piridoksal-5- fosfat (R = -CHO) : 2- metil-3- hidroksi-4- formil-5- piridilmetilfosforik asid

Piridoksamin-5- fosfat (R = -CH₂NH₂) : 2-metil-3- hidroksi-4- aminometil-5- piridilmetilfosforik asid

Bu maddeler arasındaki fark, yukarıda görüldüğü gibi, sadece -4- pozisyonundaki substitüsyon olduğu için, maddelerin isimlendirilmesinde çeşitli güçlüklerle karşılaşmıştır. Nomenklatürdeki ilk kayıt, 1960 senesinde yayınlanan IUPAC kaideleridir: Piridoksin sözcüğünün vitamin B₆ ile eş anlamda kullanılmasına, alkol şekline piridoksol denilmesine karar verilmiştir (IUPAC- IUB Comm. on Biochem. Nomenclature, 1960). Ancak 1966 senesinde yayınlanan ikinci bir nomenklatür çalışmasında, önceki alışkanlıkların piridoksin ve piridoksol sözcüklerinin karışmasına sebep olduğu, piridoksin ile piridoksol isimlerinin eş anlamda kullanılması ve vitamin B₆ tabirinin de piridoksin ile aynı aktivitedeki 2-metilpiridin türevlerini ifade etmesi,

piridoksinin oksidasyonu sonucu meydana gelen 3- hidroksi-5- hidroksimetil -2- metilpiridin -4- karboksilik asid ve laktonu için de 4- piridoksik asid ve 4- piridoksik asid lakton isimlerinin verilmesi kararlaştırılmıştır (IUPAC - IUB Comm. on Biochem. Nomenclature, 1966; Rennagel ve Korytnyh, 1968; IUPAC - IUB. Comm. on Biochem. Nomenclature, 1970; 1974 a ve b).

Bundan başka vitamin B₆ ya, "fare antidermatitis faktörü" "antiakrodinia faktör" "vitamin H" ve "adermin" gibi isimler de verilir (Lepkovsky, Jukes, Krause, 1936).

B₆ vitaminleri grubundan olan piridoksin hidroklorür T.F. 1974, B.P. 1968, D.A.B. VII, Pharm.Franc. IX, Hung.P.1970; Pharm.Helv. VI; S.P. IX; Pharm.Ital, 1965 ve U.S.P. XVIII de kayıtlıdır. Extra Pharmacopoeia Martindale (1973) maddenin Avusturya, Belçika, Brezilya, Çekoslovakya, Hindistan, İspanyol, Japon, Portekiz kodekslerinde de kayıtlı olduğunu bildirmektedir.

B- B₆ VİTAMİNİ VE GÜREVLERİNİN ELDE EDİLMESİ :

B₆ kompleks vitaminler grubundan olan piridoksin, hayvan ve bitki aleminde yaygın bir şekilde, büyük bir kısmı nişasta ve proteine bağlı olarak, düşük konsantrasyonlarda bulunur. Maya, süt, yumurt sarısı, karaciğer, sperma, yeşil bitkiler zengin olarak bulunduğu kaynaklardır.

Piridoksin ilk defa 1938 senesinde pirinç kepeğinden hidroklorür tuzu halinde izole edildi (Lepkovsky, 1938). Aynı senelerde değişik gruplar tarafından maddenin sentezi gerçekleştirildi (Harris ve diğ., 1939 b; Kuhn ve diğ., 1939 b; Ichiba ve diğ., 1939 a). Bu tarihten sonra, piridoksin ve hidroklorür tuzu için, bir kısmı patentli olmak üzere, çok farklı sentez

metodları geliştirildi ve bu metodların da çeşitli tadilleri yapıldı (Jones ve Kornfeld, 1951; Cohen, Haworth ve Hughes, 1952 a; Stevens, 1956, Mowat ve Webb, 1960; Harris, 1962; Lutz, 1967; Zhukova ve Zhdanovich, 1968; Kawazu, 1969). T.F. (1974) 105°C de sabit ağırlığa kadar kurutulmuş madde üzerinden hesaplamak şartıyla, % 98.5'tan az $C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$ ihtiva etmemesini bildirmektedir.

Literatürde piridoksinde başka çeşitli türevlerinin sentezleri için çok sayıda çalışma vardır. Bunlardan önemlilerini şu şekilde sıralıyabiliriz :

4-PİRİDOKSİK ASİD ($C_8H_9NO_4$) : 3- hidroksi -5- hidroksimetil-2- metilpiridin -4- karboksilik asid yapısında olan 4- piridoksik asid (4- PIA), insanlarda B₆ vitamininin, ana üriner metabolitidir. İlk defa 1941 senesinde, idrardan izole edilmiştir (Signal ve Sydentricker, 1941). İlk sentezi de 1944 senesinde gerçekleştirmiştir (Huff ve Perlzweig, 1944). Bu tarihten sonra da çeşitli araştırmacılar tarafından farklı metodlar ile sentezi yapılmıştır (Harris, Heyl ve Folkers, 1944 b; Scott, Norris, Hauser ve Bruce, 1945; Heyl, 1948).

Kama şeklinde, kristalize bir maddedir. 247-248°C'de parçalanarak erimektedir. Su, alkol ve piridinde kısmen çözünür. Eter ve sulu asidik çözeltilerde çözünmez. Biri fenolik ve diğeri karboksilik olmak üzere iki asidik grup ihtiva eder. Bunların pK değerleri 9.75 ve 5.50' dir. Sulu çözeltilerinde, pH 3 ile 4 arasında maksimum olmak üzere, karakteristik mavi floresans gösterir. Floresans hidrosülfat ile redüklenince kaybolur, ancak hidrojen peroksit ile oksitlenince, kaybolan floresans eski şiddetini kazanır. Sulu çözeltilerinden zeolite adsorbe ettirilip, buradan yüzde yirmibeşlik potasyum klorür çözeltisi

kullanmak sureti ile elüe edilebilir. Nötral eluatların butanol ekströlerinde, asetik asid konsantrasyonu artışı ile orantılı olarak şiddet artar, karakteristik mavi fluoresans görölür. Alkalilerle ısıtmaya karşı dayanıklıdır. Ancak 0.5 N asidlerle ısıtıldığı zaman, laktonuna (β - pirasin) dönüşür.

4-Piridoksik asid lakton ($C_8H_7NO_3$) 263-265°C'de parçalanarak erir. Suda çözünürlüğü ve fluoresans şiddeti 4- piridoksik aside oranla daha fazladır. İhtiva ettiği asidik grubun pK değeri 7.05' dir.

5-PIRIDOKSİK ASİD ($C_8H_9NO_4$) : Bazı mikroorganizmalarda, vitamin B₆ metaboliti olan 5- piridoksik asid, 3- hidroksi -4- hidroksimetil -2- metilpiridin -5- karboksilik asid, kimyasal yapısındadır. İlk defa 1939 senesinde sentez edilmiştir (Harris ve diğ., 1939 a). Bu tarihten sonra da çeşitli araştırmacılar tarafından 5- piridoksik asid, 5- piridoksik asidin dilüe asetik asid ile ısıtılması sonucu meydana gelen, 5- piridoksik asid lakton (α - pirasin) ve birçoğu vitamin B₆ antagonisti olan çeşitli türevleri hazırlanmıştır (Harris ve diğ., 1944 b; Cohen ve Hughes, 1952 b; Korytnyk, kris ve singh, 1964; Korytnyk, 1965). 5- piridoksik asid laktonun erime derecesi 272-276°C (parçalanarak)' dir.

4,5- DİPIRIDOKSİK ASİD ($C_8H_7NO_5$) : Ichiba ve Michi (1938) piridoksinin kimyasal yapısını aydınlatmak gayesi ile yaptığı çalışmada, piridoksinin metil türevinin potasyum heksasiyanoferrat (III) ile, alkali ortamda, oksidasyonu sonucu iki oksidasyon ürününün meydana geldiğini bildirilmiştir. Kloroform ile ekstre edilebilen maddenin erime derecesi 105-107°C ve kloroform ekstraksiyon bakiyesinin eter ekstresinden, elde edilen diğere

maddenin de erime derecesi 218-220°C olarak bulunmuştur. Daha sonra bu maddelerin 2-metil -3- metoksipiridin -4,5- dipiridoksik asid ve laktonu olduğu gösterilmiştir (Ichiba ve Michi, 1939 b). Bu tarihten sonra da, 4,5- dikarboksilik asid (2- metil -3- hidroksipiridin -4,5- dikarboksilik asid), laktonu ve metil türevi, çeşitli araştırmacılar tarafından sentez edilmiştir (Stilller, Keresztesy ve Stevens, 1939; Harris ve diğ., 1939 a; Ichiba ve Emoto, 1941).

4,5- dipiridoksik asid 258-259°C' de parçalanarak erir. Monometil türevi ($C_9H_9NO_5$) ve laktonu da ($C_9H_9NO_3$) 218-220°C ve 107-108°C' de parçalanarak erimekte-dirler.

İSOPİRİDOKSAL ($C_8H_9NO_3$) : Laktik asid bakterilerinin büyümesinde inaktif bulunan izomerik aldehit, 2-metil -3- hidroksi-4- hidroksimetil -5- formilpiridin yapısında olup, ilk defa 1944 senesinde sentez edilmiştir (Harris ve diğ., 1944 a). Bu tarihten sonra da çeşitli araştırmacılar tarafından, isopiridoksal ve hidro klorür tuzunun sentezleri gerçekleştirilmiştir (Korytnyk ve Kris, 1964; Korytnyk, Kris ve Singh, 1961).

VİTAMİN B₆ DİMER ($C_{16}H_{20}O_5N_2$) : Merck firmasında hazırlanan vitamin B₆ ampullerde, suda çözünmeyen bazı bileşikler meydana geldiği görülmüş ve yapılan inceleme sonucu, bu bileşiğin piridoksinin bir molekül su kaybederek polimerizasyonu sonucu meydana gelen piridoksin dimer olduğu gösterilmiştir. Piridoksinin nötral çözeltilerinde bulunan totomeri "zwitterion" ile, aktif 4- hidroksimetil grubu reaksiyona girerek, bir molekül su açığa çıkar, piridoksin dimer meydana gelir (Harris, 1941).

Molekül ağırlığı 320 olan piridoksin dimerin, erime derecesi 205-209°C' dir. Vitamin B₆ aktivitesi, piridoksin-den 40 defa azdır.

4,5- DIFORMİL -3- HİDROKSİ -2- METİLPİRİDİN ($C_8H_9NO_4$) :
Bazı mikroorganizmaların büyümesini arttırıcı özellikte bulunan
4,5- diformil -3- hidroksi -2- metilpiridin (o-piridoksidial),
Sattsangi ve Argoudelis (1968) tarafından sentez edilmiştir.
Madde $158-161^{\circ}C$ ' de erimeden parçalanmaktadır.

C- B₆ VİTAMİNİNİN ÖZELLİKLERİ:

a- Fiziksel özellikleri :

Daha önce de belirtildiği gibi vitamin B₆ aktivitesi gösteren üç değişik kimyasal yapıda vitamer vardır. Bu bileşiklerin hidroklorür tuzlarının fiziksel özellikleri aşağıya tablo halinde çıkarılmıştır.

T.F. (1974) kokusuz, tuzlu, tadlı, renksiz veya beyaz billur veya billûri toz olan piridoksin hidroklorürün $205-211^{\circ}C$ 'de kısmen ayrışarak eriyeceğini; sudaki yüzde 10 a/h mahlûlünün pH' sı takriben 3 olduğunu; $105^{\circ}C$ ' de sabit ağırlığa kadar kurutulduğunda ağırlığının yüzde 0.5 inden fazla kayba uğramamasını; kül miktarının yüzde 0.1' den fazla olmamasını; milyonda 30 kısımdan fazla ağır metaller ihtiva etmemesini ve 5 kısım suda, 100 kısım etanol (yüzde 95) R. de eriyeceğini; kloroform R. ve eter R. de pratik olarak erimeyeceğini belirtmektedir. Ayrıca $105^{\circ}C$ 'de sabit ağırlığa kadar kurutulmuş madde üzerinden hesaplanmak şartı ile yüzde 98,5'dan az $C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$ ihtiva etmemesini, sinonimlerinin Pyridoxinii Chloridum ve Vitamin B₆ olduğunu bildirmektedir.

b- Kimyasal Özellikleri :

Piridoksin 3- hidroksi -4,5 bis (hidroksimetil) -2- metilpiridin yapısında, zayıf tersiyer bir amindir. Hidroklorür sulfat, fosfat gibi çeşitli tuzları hazırlanmıştır (Harris ve diğ., 1939 b; Kuhn ve diğ., 1939 b; Ichiba ve diğ., 1939 a; Umbreit ve diğ., 1946; Heyl ve diğ., 1951; Jones ve diğ., 1951; Cohen ve diğ., 1952 a; Stevens, 1956; Mowat ve diğ., 1960; Harris, 1962; Kuroda, 1963; Lutz, 1967; Zhukova ve diğ., 1968; Kawazu, 1969).

Piridoksin, triasetat ve tribenzoat verir ki bu maddenin, üç aktif hidroksil grubuna sahip olduğunu gösterir (Harris, 1940). Ancak diazometan ile monometil eter vermesi, bu hidroksil gruplarından iki tanesinin alkolik özellikte olduğunu işaretidir. Bu özelliği, piridoksinin monometil eterin hidrobromik asid ile reaksiyona girerek, hidrobromür vermesi, doğrular ($C_8H_{10}O N.Br_2$). Reaksiyonunda monometil eter bozulur ve iki alkolik grupta metilbromüre dönüşür. Bu maddenin gümüş asetat ile muamelesinde, tekrar piridoksin meydana gelir (Ichiba ve diğ., 1938; Harris, Webb ve Folkers, 1940).

Piridoksinin diazolanmış sülfanilik asid ile birleşmesi, maddenin enolik grup ihtiva ettiğini, Folin - Denis reaktifi ile renk vermesi, 2- veya 4- hidroksipiridin yapısında olduğunu ve Gibbs reaktifi ile de renk teşekkülü, para pozisyonunda substitüsyon bulunmadığını gösterir.

Piridoksin baz halinde metil, butil ve benzil alkollerde, $125^{\circ}C$ ' de geriçeviren soğutucu altında, 4- alkiloksimetil, buna karşılık asetikanhidr ile triasetat verir ki bu da bileşiğin, 6- metil -5- hidroksi -3,4- di(asetoksimetil) piridin hidroklorürden, farklı olduğunu delilidir (Harris ve diğ., 1939 b).

Piridoksinin Adams katalizörü ile hidrojenasyonu sonucu, 4- hidrokümetil grubu, metil grubuna redüklenir (Harris, 1940; Cohen ve diğ., 1952 b). Buna karşılık, oksidasyonunda 5- hidrokümetil grubu, karbonil grubuna dönüşür (Harris ve diğ., 1939 a). Ancak piridoksinin dikkatli oksidasyonu neticesi, 4- aldehit yani piridoksal hazırlanabilir (Harris ve diğ., 1944 a ve b). İsoomerik 5- aldehit (Harris ve diğ., 1944 a; Korytnyk ve diğ., 1961; Korytnyk ve diğ., 1964) laktik asid bakterilerinin büyümesinde inaktif olarak bulunmuştur. Piridoksal amino asidler ve amino esterlerinde dahil olduğu çeşitli aminlerle reaksiyona girerek "Schiff" bazı verir ve bu bazın metal kompleksleri, transaminasyon reaksiyonlarında ara kademe olduğu kabul edilir (Snell, 1944 a; Harris ve diğ., 1944 a; Heyl ve diğ., 1951; Metzler ve Snell, 1952; Okumura, Kotera, Oine ve Oda, 1967; Korytny, ve Ahrens 1970; Hill, 1972; Yamada, Kuma ve Yamanouchi, 1974).

Piridoksalin, hidroksilamin ile reaksiyona sokulması sonucu, piridoksal oksim ve bunun da oksidasyonu ile 4- piridoksik asid oluşur (Heyl, 1948).

Piridoksinin gümüş karbonat ve metil iyodür ile N- metil türevi vermesi, bileşiğin fenol betain veya "zwitterion" olduğunu gösterir (Harris, 1940). Nötral ortamda "zwitterion" halinde bulunan piridoksin, 120°C' de, diğer bir molekül piridoksinin 4- hidrokümetil grubu ile reaksiyona girer ve bir mol su açığa çıkararak dimer, eğer ısıtma 120°C' nin üzerinde veya çok uzun süre yapılırsa, polimer meydana gelir. Dezoksi piridoksin ise bu şekilde polimerizasyon reaksiyonu vermez (Harris, 1941).

Piridoksin aseton ile, asid ortamda, isopropiliden türevi ve bunun potasyum heksasiyanoferrate (III) ile oksidasyonu sonucu 5- piridoksik asid meydana gelir (Cohen ve diğ., 1952 b).

Hata, Yamakawa, Anraku ve Sano (1966); Adams (1969) Piridoksal ve piridoksal fosfatın, bisülfidler ile reaksiyona girerek piridoksal (fosfat) in 4- hidroksi sülfanik asid türevlerinin meydana geleceğini belirtmiştir.

Ichiba (1948) B₆ vitaminlerinin sentez ve kimyasını derlemiştir.

c- Farmakolojik Özellikleri :

Vitamin B₆ düşük konsantrasyonlarda hayvan ve bitki aleminde, geniş bir şekilde, büyük bir kısmı proteinler ve nişasta ile bağlı halde bulunur. Serbest Vitamin B₆ suda eridiğinden yemeklerin hazırlanması esnasında pişirme sularına geçer ve hızla barsaklardan absorbe olur. Ancak besin maddelerinde B₆ vitamininin büyük bir kısmı proteinlere bağlı bulunduğu ve bu durumda suda çözünmediğinden barsaktan absorbe olmaz. Bağlı halde bulunan B₆ vitamininin absorbe olabilmesi için serbest hale geçmesi gereklidir. Vitamin B₆ dokularda önemli ölçüde depo edilmez. Karaciğer, adale ve böbrekler en fazla yığılma gösterdiği organlardır. Vücuttan idrarla, 4- piridoksik asit halinde atılır.

Maya, pirinç kabuğu, buğday ve mısır, vitamin B₆ bakımından en zengin kaynaklardır. Balık, memeli hayvanlar ve balık karaciğerinde de vitamin B₆ bulunur. Süt, yumurta, yeşil yapraklı sebzelerde vitamin B₆ miktarı oldukça azdır.

B₆ vitamini eksikliği hayvanlarda dermatitis, anemi, konvülsiyon nöbetleri gibi tezahürlere sebep olursada, insanlarda bariz bir klinik tablo meydana getirmez. Bu bakımdan B₆ vitamininin farmakolojisi üzerinde çok sayıda araştırma (György 1934, Adler ve Shwartzman, 1950; Vannotti, 1950; Schwartz ve Kjeldgaard, 1951; Robinowitz ve Snell, 1953 a ve b; Marakova, Hoch, Secká,

1959; Hung, 1961; Stokstad, 1962; Rudchenko ve Yanovsky, 1962; Rudowske, 1967; Kraut ve Imhoff, 1968; Contractor ve Shane, 1968; Rukui ve Ohishi, 1969; Louis, 1969; Martin, 1970; Korytnyh ve Ahrens, 1970; Hill, 1970; Danno, Hashiguchi, Nekoma ve Masukawa, 1971; Hill, 1972) ve derleme (Snell, 1950; Mahadevan, 1951; Snell, 1953; Snell ve Metzler, 1956; Machowski, 1959; Leitch ve Hepburn, 1961; Axelrod ve Martin, 1961; Pol, 1961; Holtz ve Palm, 1964; Nose ve Kawasaki, 1966; Jitka, Jaraslava ve Jarmilo, 1972; Markis ve Gershoff, 1973; Zehaluk ve Walker, 1973; Johansson ve Tiselius, 1973; Driskell ve Foshee, 1974; Rasmussen, 1974). yapılmıştır.

Vitamin B₆'nın aktif şekli piridoksal -5- fosfattır. Piridoksin, piridoksamın ve fosforlu türevleri, organizmada piridoksal -5- fosfata dönüşerek, tesir gösterirler. Piridoksal -5- fosfat, amino grubu transfer, dekarboksilasyon, rasemizasyon ve diğer transformasyon reaksiyonlarını katalize eden özel enzimlerin koenzimi olduğu, kabul edilir. Ayrıca doymamış yağ asidlerinin ve triptofandan nikotinamid, sentezinde rol oynar. Şualandırma tedavisi esnasında meydana gelen kusmalara, gebelik kusmalarına ve izoniazidin sebep olduğu periferik nevrite karşı kullanılır.

B₆ vitamininin izonikotinic asid hidrazid bileşiği de tüberküloza karşı kullanılmıştır.

4- dezoksi piridoksin, metopiridoksin, toksopirimidin, 4-metoksipiridoksin gibi bileşiklerin vitamin B₆ antagonisti tesiri vardır.

Farmakopelerde piridoksin hidroklorür için belirtilen mutlak dozlar, peroz bir defada 0.02-0.05 gram ve günde 0.05 gramdan 0.50 grama kadar; intravenöz veya intramuskuler kullanışta ise bir defada 0.025 gram ila 0.050 gramdır.

D- B₆ VİTAMİNİNİN TEŞHİS METOTLARI :

a) İnce Tabaka Kromatografisi ile Teşhis

B₆ vitamerlerinin, ince tabaka kromatografisi ile, ilk teşhisi 1960 senesinde gerçekleşmiştir (Nürnberg, 1960). Silikagel-G tabakalarında, birinci yönde aseton, ikinci yönde de aseton-dioksan- % 25 amonyak (4.5 : 4.5 : 1) solvan sistemleri kullanılarak, teşhis, çift yönlü ince tabaka kromatografisi ile yapılmıştır. Ayırından önce, vasatta bulunan piridoksalın tamamının asetal şekline dönmesini sağlamak için, bir saat metanolde geri çeviren soğutucu altında, kaynatılmıştır. Rf değerleri piridoksin hidroklorür için (Rf₁= 0.10, Rf₂= 0.20), piridoksamın hidroklorür için (Rf₁= 0.1, Rf₂ = 0.55) ve piridoksal metilasetal için de (Rf₁= 0.3, Rf₂= 0.25) bulunmuştur. Lekelerin tespiti için, % 0.4 lük, dibromokinon-klorimidin metanoldeki çözeltisi kullanılmıştır.

Bu tarihten sonra vitamin B₆ grubu maddelerin teşhisi için, Yamada ve Tanaka (1965) dioksan - su (7 : 3); Güven ve Gürkok (1967) metanol; Demet'eva, Drobinskaya, Ionova ve Florentev (1968) etilasetat - aseton - % 25 amonyak (20 : 10 : 15) solvan sistemleri kullanmışlardır. Demet'eva ve diğ., (1968) fosforlu türevlerinin teşhisi için, butanol - etanol - % 5 amonyak - aseton (10 : 10 : 10 : 1) solvan sisteminin, kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Adsorban olarak, silikagel-G ve lekelerinin tespiti için de UV ışığından faydalanılmıştır. Ahrens ve Korytnyh (1969) silikagel-HF₂₅₄ ve sellüloz-MN 300 G tabakalarında çalışmış, % 0.2 amonyak ve kloroform - metanol (75 : 25) solvan sistemleri, kullanarak silikagel-HF₂₅₄ tabakalarında, buldukları Rf değerleri, piridoksin (0.02 ve 0.47), piridoksal (0.68 ve 0.56) piridoksamın

(0.12 ve 0.05), 4-piridoksik asid (0.91 ve 0.49) piridoksin fosfat (0.86 ve 0.00) ve n.butanol - asetik asid - su (15 : 10 : 10); n.butanol - konsantre hidroklorik asid - su (25 : 5 : 10); n.butanol - derişik hidroklorik asid (100 : doyurulmuş) solvan sistemleri kullanarak, sellüloz MN 300 G tabakalarında, Rf değerleri, piridoksin fosfat (0.47, 0.68 ve 0.70), piridoksal fosfat (0.64, 0.80 ve 0.78), piridoksamın fosfat (0.07, 0.36 ve 0.62) olarak bulunmuştur. Çalışmada lekelerin tespiti için Gibbs reaktifi, diazolanmış p-nitro anilin reaktifi, ninhidrinin n.butanoldeki % 0.3 lük çözeltisi ve % 5 lik fenil hidrazin çözeltisi kullanılmıştır. Smith ve Dietrich (1971) beş saat 110°C' de aktive edilmiş silikagel-H tabakalarında, onbir solvan sistemi deneyerek, en uygununun etilasetat - piridin - su (2: 1 : 2) olduğunu belirtmiştir. Rf değerleri piridoksin 0.49, piridoksal 0.51, piridoksamın 0.12, 4-piridoksik asid 0.37, 4-piridoksik asid laktan 0.97 ve piridoksal fosfat 0.07 olarak tespit etmişlerdir.

Piridoksinin sülfür türevlerinin teşhisini yapabilmek, için bu maddelerin azo türevleri hazırlanıp, etil alkol - amil - amil alkol - su (1 : 1 : 1) solvan sistemi (Deyl ve Rosmus, 1962), diğer piridoksin türevlerinin teşhisini yapabilmek için de asetik asid - metanol - benzen - aseton (5 : 20 : 70 : 5) solvan sistemi (Ishikava ve Katsui, 1964) kullanılmıştır. Her iki çalışmada da adsorban alüminyum oksiddir.

Gonnard, Camier ve Boigne (1964) piridoksal fosfat ve isonikotinil hidrazon türevinin stabilitesini mukayese edebilmek için silikagel-G tabakalarında üç solvan sistemi denemiş, n.butanol - fosforik asid - su (3 : 1 : 3) karışımının en iyi neticeyi verdiğini belirtmişlerdir. Çalışmada ayrıca, farklı firma-

lardan tedarik edilse de, piridoksal fosfatın birden fazla leke verdiği gösterilmiştir. Rf değerleri piridoksal fosfat için 0.61 ve 0.67, piridoksal fosfat isonikotinilhidrazin için de 0.10 bulunmuştur.

Piridoksinin nötr vasatta polimerizasyonu sonucu teşekkül eden ürünler, silikagel-G tabakalarında, aseton - dioksan - % 25 amonyak (4.5 : 4.5 : 1) solvan sistemi ile teşhis edilmiştir. Rf değerleri, piridoksin 0.72, piridoksin dimer 0.52 ve piridoksin polimer de 0.43 olarak bulunmuştur (Hüttenrauch, 1966).

Litaratürde vitamin karışımlarının teşhisi üzerinde çok sayıda çalışma vardır. Bunları şu şekilde özetleyebiliriz : Ganshirt ve Malzacher (1960) silikagel-G tabakalarında asetik asid- aseton - metanol - benzen (5 : 5 : 20 : 70) solvan sisteminde, suda çözünen vitaminlerin teşhisini yapmışlardır. Piridoksin hidroklorür için Rf değeri 0.15 hesaplanmış ve B₆ vitaminin tespiti için de Gibbs reaktifi kullanılmıştır. Ishikava ve Katsui (1964) aynı solvan sistemini kullanarak suda çözünen vitaminlerin teşhisini silikagel-G ve alüminyum oksid-G tabakalarında gerçekleştirmişlerdir. Piridoksin hidroklorür için Rf değeri silikagel-G tabakalarında 0.12 ve alüminyum oksid-G tabakalarında da 0.26 olarak bulunmuştur. Frodyma ve Liev (1967); Aksenova, Knizhnik, Senov ve Churyukonova (1968); Sellès ve Camachoi (1970); Bičan-Fišvter ve Drazin (1973) aynı solvan sistemini kullanarak, suda çözünen vitaminlerin teşhisi üzerinde çalışmışlardır. Frodyma ve diğ. (1967) silikagel-G tabakalarında vitaminlerin teşhisine ilaveten, spektrofotometrik tayinlerini de incelemiştir. Aksenova ve diğ. (1968) bu solvan sisteminden başka n-butanol - asetik asid-su (4 : 1 : 5) solvan sistemini de denemişlerdir. Sellès ve diğ.

(1970) adsorban olarak silikagel-G ve alüminyum oksid-G kullanarak, piridoksin hidroklorür için Rf değerini 0.15 ve 0.26 olarak bulmuşlardır. Ayrıca çalışmada piridoksin hidroklorür ile piridoksal -5- fosfatın tefrikleri için, n.butanol - n.asetik asid (83 : 17) solvan sisteminde, aktif sellüloz tozu tabakalarında da çalışılmıştır. Rf değerleri piridoksin hidroklorür için 0.73 ve piridoksal -5- fosfat için de 0.26 olarak, gözlenmiştir.

Suda çözülen vitaminlerin teşhisini Jablonowski (1967) silikagel tabakalarında farklı sekiz solvan sistemi ile, Massa (1969) metilisobutylketon - metanol - asetik asid - kloroform (3 : 2 : 1 : 14) solvan sistemi ile gerçekleştirmişlerdir. Adsorban olarak silicagel-HF₂₅₄ kullanılmış, vitamin B₆ için Rf değeri 0.50 bulunmuştur. Hashmi, Chughtai ve Chughtai (1969) su - etanol (% 96) - 2M hidroklorik asid (45 : 48 : 0.2) solvan sistemi ile, silikagel-DO tabakalarında, suda çözülen vitaminlerin ayırımını ve ayrılan lekelerin tespiti için, kullanılan reaktiflerin hassasiyetini incelemiştir. Rf değeri 0.61 olan piridoksin, % 10 luk FeCl₃ çözeltisine karşı 0.7 mikrograma kadar hassas olarak bulunmuştur. Cadorniga, Dominique-Gil ve Gonzalus (1972); Tatjana ve Vijislava (1973) silikagel tabakalarında muhtelif solvan sistemleri deneyerek teşhisini, bu lekelerin dansitometik veya spektrometik olarak miktar tayinini yapmışlardır.

Suda çözülen vitaminlerin teşhisleri, % 5 luminophere N83 W ihtiva eden Supergel-Gips tabakalarında (Ludwig ve Freimuth, 1965), sellüloz tabakalarında (Amormino ve Cingolini, 1966; Dittmann, 1967; Gill, 1967), nişasta tabakalarında (Petrovic, Belia ve Vukazlovic, 1968) ve poliamid-silikagel karışımında (Chiang ve Wu, 1970) yapılmıştır.

Ganshirt (1960), Hakanson (1964), Ishikawa ve diğ. (1964); Hashmi, Chughtai, Adil ve Qureshi (1967), Aksenova (1968) ve Kusuo (1969) multivitamin karışımlarında vitaminlerin teşhisi üzerinde çalışmıştır.

Vitaminlerin teşhisi ve lekelerin tespiti için kullanılacak reaktifleri ihtiva eden çeşitli derlemelerde yapılmıştır (Gaichira, 1964; Gaichira 1965; Mathis ve Gorel 1965).

Chakrabarty ve Dutta (1965) vitamin preparatların ince tabaka elektroforezi ile teşhis edilebileceğini ve bu teşhisin Sephadex G 50 ile yapılan teşhisten daha iyi netice verdiğini belirtmiştir.

Aksenova (1968) silikagel-KSK ve kalsium sülfat tabakalarında vitaminlerin teşhisini, ince tabaka elektroforezi ile, 0.02 M oksalik asid, 0.02 M sitrik asid, 0.02 M tartarik asid veya % 5 asetik asid çözeltisi solvan sistemlerinde, 980-1000 volt ve 900-1000 miliamperde, yapmıştır. Aksenova, Knizhnik, Pechennikov ve Senov (1969) aynı tabaka ve şartlarda vitaminler, aromatik aminler, pürin ve pirazolon türevlerinin teşhisi üzerinde çalışmışlardır.

Ahrens ve diğ. (1969) piridoksin ve parçalanma mahsullerini ince tabaka elektroforezi ile teşhisini denemiş, ancak ince tabaka kromatografisi ile yapılan teşhisin, iyon değişim kromatografisi ve ince tabaka elektroforezinden, daha iyi netice verdiğini belirtmişlerdir.

Contractor ve Shane (1969) Whatmann CC 41 sellüloz tabakalarında, piridoksal ¹⁴C ve ³H metabolitlerinin dioksan - su (6 : 1) solvan sistemi ile teşhisi ve etografik olarak tayini üzerinde çalışmışlardır.

Colombini ve McCoy (1970) dokularda ^{14}C ile işaretlenmiş B_6 vitamerlerinin ince tabaka elektroforezi ile teşhis edilebileceğine, metodun işaretersiz B_6 vitaminleri için de kullanılabilceğine, işaret etmiştir.

b) Kağıt Kromatografisi ile Teşhis

Hanes ve İsherwood (1949), Block (1950) ve Bandurski ve Axelrod (1951) B_6 vitaminleri grubu maddelerin, teşhisi üzerinde çalışmışlardır. Peterson ve Sober (1953) bu araştırmaları gözden geçirmiş, Whatman No: 1 ve Schleicher and Schull 598 kağıtta, t.butil alkol - su - % 89 formik asid - % 77 etanol (70 : 15 : 15) solvan sistemi ile, en iyi neticenin alınabileceğini belirtmiştir. Piridoksamın fosfat, piridoksal fosfat, piridoksin fosfat, piridoksamın, piridoksal ve piridoksin için gözlenen R_f değerleri Whatman No: 1 kağıtta (0.20, 0.33, 0.47, 0.58, 0.70, 0.74) Schleicher and Schull 598 kağıtta da (0.24, 0.42, 0.56, 0.40, 0.78, 0.80) olarak bulunmuştur. U V altında piridoksal, piridoksamın, piridoksin ve fosfat esterlerinin mavi flouresans gösterdiğini ve floresans şiddetinin amonyak buharına tutulduğu zaman arttığını belirtmişlerdir.

B_6 grubu vitaminler ve türevlerinin, kağıt kromatografisi ile teşhisi için, etil asetat - su - piridin (2 : 1 : 1), n.propanol - % 10 formik asid (20 : 20) solvan sistemleri kullanılmıştır. (Puzztai, 1954; Fasella ve Baglioni.1956). 1961 senesinde de, B_6 kompleks vitaminlerin stabilitelerini mukayese etmek için, bu maddeler kağıt kromatografisi ve iyon değiştirme kromatografisi ile ayrılmış ve miktar tayini yapılmıştır. Ayrıca çalışmada kul-

lanılan reaktiflerin, hassasiyetlerinin mukayesesi de belirtilmiştir (Shiroshi ve Hayakawa, 1961). Onada (1964) n.butanol - asetik asid - su (12 : 1 : 7) solvan sistemi kullanılarak, B₆ kompleks vitaminlerin teşhisinin yapılabileceğini bildirmiştir. Guvstanson, Ledin ve Furst (1966) piridoksin, piridoksal, piridoksamin ve fosforlu türevlerinin piridin - butanol - su (1 : 2 : doymuş) solvan sistemi ile sade pH 9' da ayrılabilceğine ve pH büyümesi ile orantılı olarak da lekelerin küçüldüğüne, işaret etmişlerdir. Kraut ve Imhoff (1968) literatürde kayıtlı solvan sistemlerini gözden geçirmiş ve amil alkol - aseton - su (2 : 1 : 2) solvan sistemi ile hepsinden daha iyi netice alınacağını belirtmişlerdir. Çalışmada Fa.Macharey Nr. 2214 kağıt kullanılarak elde edilen Rf değerleri piridoksal 0.18, piridoksamin fosfat 0.20, piridoksamin 0.35, piridoksin 0.6, 4-piridoksik asid 0.75'dir.

Ikeda, Oka, Ohishi ve Fukui (1968) üçüncüye edilmiş, piridoksin çözeltilerinin fotolizini incelemiş ve parçalanma mahsullerini, Toyo-Filter paper No: 35 kağıt üzerinde, t.butanol - aseton - su - dimetilamin (40 : 35 : 20 : 5) solvan sistemi ile ayırmışlardır. Rf değerleri piridoksin 0.56; piridoksal 0.80; 4-piridoksik asid 0.90; 4-piridoksik asid lakton 0.76; isopiridoksal 0.60; 5-piridoksik asid 0.30; 5-piridoksik asid lakton 0.76; 4,5-dipiridoksik asid 0.45 ve piridoksin dimer 0.46, olarak bulunmuştur. Çalışmada ayrıca bu maddelerin U.V ışığı altında verdiği renkler ve hassasiyetleri de gözden geçirilmiştir. Oike, Yokoi ve Hiruta (1960) piridoksal fosfat sentezinde, piridoksal fosfatın teşhisi ve saflığının kontrolü için, etil asetat - 2,4 lutidin - etanol - su (4 : 2 : 1 : 2) solvan sisteminin kullanılmasını tavsiye etmişlerdir.

Rodwell, Volcani, Ikawa ve Snell (1958) piridoksin, piridoksal, piridoksamın, 4-piridoksik asid, isopiridoksal, 5-piridoksik asid ve piridoksin polimerlerin Whatman No. 1 kağıtta teşhisini; Turano, Fasella, Vecchini ve Giartosio (1964) amino asidlerin piridoksal türevlerinin hazırlanışını ve bunların Whatman 3MM kağıtla, n.butanol - asetik asid - su (40:10:50) solvan sistemi kullanılarak ayrılabilceğini, belirtmişlerdir.

B kompleks vitaminlerin (Ransy, 1952; Radhokrishnamuty ve Sarma, 1953; Bergamini, 1953; Rodrigues ve Salvia, 1955; Simatoepang, 1959; Gough ve Silberman, 1963, Amermino ve Cavina, 1965, Bayer, 1964) ve multi vitamin karışımlarının kağıt kromotografisi ile teşhisi (Brown ve Marsh, 1952; Schoen, 1953; Lacourt, Delande ve Gupaduwa, 1956; Hernanen, Mytty, Paavola ve Vertiornen, 1958; Santos, 1958; Godsheu, Edwards ve Edwards, 1960; Murai, 1961 a; Murai 1961 b; Aksenova, 1964; Gonnard ve diğ., 1964; Daniloviç, Lavica ve Savic, 1966; Barbiroli, 1967; Kohen ve Russeva, 1968; Herbert, Lau ve Gottlieb, 1968; Hashmi, Chugtai ve Şahid, 1969; Scapi, v. d. n. d. e. l. l. i., Innocenti, 1966) yapılmıştır.

Ayrıca literatürde B₆ vitaminler ve türevlerinin (Enriquez ve Kubac, 1962; Aksenova, 1964; Nakken, 1966; Aliev ve Onov, 1972), vitamin kombinasyonlarının (Benhamou ve Amouch, 1959; Cunha, 1965; Charkrabarty ve diğ., 1965; Ikeda ve diğ., 1968; Teruv ve Kazuko, 1970) kağıt kromotografisi ile teşhisi için, çeşitli çalışmalar kayıtlıdır.

c) İyon Değişim Kromatografisi ve Kolon Kromatografisi
ile Teşhis

Scudi, Koones ve Keresztesy (1940 a) ve Scudi (1941) B₆ vitamininin kolorimetrik tayininde, deneye etki eden maddeleri etkisini yok etmek için, sudaki çözeltilerini Decalso iyon değiştirici doldurulmuş kolondan geçirip, sıcak % 10' luk potasyum klorür çözeltisi ile, peridoksini elue etmişlerdir. Brown, Bina ve Thomas (1945) B₆ vitamininin, p-aminoasetofenonun diazonyum bileşiği ile miktar tayininde, maddenin pH 4,5 asetat tamponu ile tamponlanmış sudaki çözeltisini, Amberlite IR-4 iyon değiştiricisi ile karıştırarak, deneye etki eden maddeler ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Piridoksin diazo reaksiyonu ile tayininde, deneye etki eden maddeleri ortamdaki uzaklaştırmak için de, sulu çözeltiler permutit kolondan geçirilip, piridoksin sıcak potasyum klorür-hidroklorik asid çözeltisi ile, elue edilmiştir (Kuri, 1951).

Shimizu ve Shiba (1951) karboksilik asid tip katyon değiştirici reçine ile B₆ vitamininin teşhisinin mümkün olduğunu belirtmiştir.

Peterson ve diğ., (1954) piridoksin, piridoksal, piridoksamin ve fosfat türevlerinin sentezlerini gerçekleştirdikten sonra, saflandırmak için, iyon değiştirme kromatografisinden faydalanmışlardır. Amberlite XE-64 kolondan piridoksin fosfat, piridoksal fosfat, piridoksamin fosfat ve 4-piridoksik asid su ile; piridoksin, piridoksal ve piridoksamin de % 5 asetik asid çözeltisi ile elue edilmiştir. Metod bu tarihten sonra da çeşitli araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (Loo ve Bodger, 1969; Ahrens ve Korytnyk, 1969).

Fujita Fujita ve Fujino (1955) B₆ vitamininin florometrik tayininde, hassasiyeti arttırabilmek için, sudaki çözeltilerini Amberlite IR-112 iyon değiştirici kolondan geçirerek, piridoksal 1N sodyum hidroksid çözeltisi ile; 4-piridoksik asid ise Amberlite IRA-410 iyon değiştirici kolondan, asetik asid ile elue edilmiştir. Metod, daha sonra, çeşitli araştırıcılar tarafından kullanılmıştır (Mac Arthur ve Lehman, 1959; Shiroishi ve Hayakawa, 1961; Hennessy ve diğ., 1960).

Hedin (1963) Amberlite IR-120 kolondan, piridoksin, piridoksal ve piridoksaminin fosfat tamponu ile, teşhis edilebileceğini belirtmiştir. Loo ve diğ., (1969) beyin dokularında bulunan vitamin B₆ ve türevlerini Amberlite CG-120 kolondan ayırmayı gerçekleştirmiştir. Kolondan piridoksal fosfat, sıcak su ile; piridoksamin fosfat pH 4 asetat tamponu ile; piridoksal pH 5 asetat tamponu ile; piridoksin pH 6.5 fosfat tamponu ile; ve piridoksaminde 0.1 M sodyum dihidrojen fosfat çözeltisi ile, elue edilmiştir.

B₆ vitaminlerinin, iyon değiştirme kromatografisi ile, teşhisinde en ilginç alışma, Mac Arthur ve diğ., 1959) tarafından, beyin ekstrelelerindeki B₆ vitaminleri ve türevlerinin teşhisi için yapılmıştır. Metod sulu ekstrenin Dowex 50 kolona tatbik edilip, maddelerin bir seri sıcak potasyum asetat tamponu ile elue edilmesine dayanmaktadır. Bu tarihten sonra kendisi ve birçok araştırıcı, metodu çeşitli şekillerde tadil ederek kullanmışlardır (Toepfer ve Lahman, 1960 ; Toepfer ve Lehman, 1961; Okumura, 1961; Storvick, Benson, Edwards ve Woodring, 1964; Thiele ve Brin, 1966).

Lyon, Bain ve William (1962) vitamin B₆ ve fosforlu türevlerini Dowex 50-K (X-8) ve Dowex I format (X-8) iyon değiştirici reçine karışımında teğhis etmiştir. Kolondan fosforlu türevler pH 4,25 (0.05 M potasyum sitrat + 0.15 M potasyum klorür) tamponu kullanılarak fraksiyonel elusyon metodu ile; fosforsuz bileşikler de pH 4,35 ila 6.8 arasında bulunan (0.05 M potasyum sitrat + 0.5 M potasyum klorür) tamponu ile, elue edilmiştir. Fukui ve Oishi (1966) B₆ vitamerlerin ve fosforlu türevlerinin teğhisi için Dowex I-XG (ACO') ve Amberlite G-50 iyon değiştirici reçinelerden istifade etmişlerdir.

Myron (1970) Dowex AG- 50W (X-B) iyon değiştirici kolondan, piridoksali kaynar 0.04 M potasyum asetat tamponu (pH 6.0) ile; piridoksini kaynar 0.1 M potasyum asetat tamponu (pH 7.0) ile; piridoksamini de kaynar potasyum klorür - dipotasyum hidrojenfosfat tamponu (pH 7.0) ile, elue etmiştir. Toepfer ve Polansky (1970), aynı metodu kullanarak, B₆ vitamini ve bazı türevlerinin teğhisini geręekleřtirmiřtir.

Literatürde B₆ vitaminleri ve türevlerinin, sellüloz ve sülfanilik asid iyon değiştirici reçineler kullanarak, teğhisi için, çalışmalar kayıtlıdır (Hedin, 1963; Contractor ve Shane 1968; Ahrens ve Korytnyk, 1969).

Ayrıca B₆ vitamininin, Sephadex kolonlarda, teğhisi için çeşitli çalışmalarda yapılmıştır (Chakrabarty ve diğ., 1965; Lerner ve Schepartz 1969).

Multivitamin preparatlarından B₆ vitaminini, Jindra (1959) Amberlite IR A- 401 ile; Bardham (1960) Decolorit iyon değiştirici ile; Foster ve Mufin (1961) alginik asid iyon değiştirici ile; Klotz ve Poethke (1964 a ve b) Wofatit CP-300 ile; aynı

araştırıcı Amberlite XE-100 ile (Klotz ve Poethke, 1964 c); Gerasimov ve Kuleshova (1965) Aligote - A ve Rissling - R ile; Nerlo, Pawlak ve Czarnecki (1969) Amberlite IR-400 ile; Saccani ve Neri (1970 a ve b) Amberlite G-50 kullanarak, teşhis etmiştir. Ayrıca multivitamin karışımından B₆ vitamininin teşhisi için, Hüttenrauch ve Klotz (1963) ve Watanabe (1970) Amberlite WA-2 iyon değiştirici kağıt; Klotz ve Hüttenrauch (1963) Amberlite SB-2 ve Amberlite WB-2 iyon değiştirici kağıt kullanmışlardır.

Roushdi ve Hussein (1967) vitamin karışımlarını ilk başta talk, bundan sonra alüminyum oksid kolonlardan geçirerek analiz edilebileceğini belirtmiştir.

d) Gaz Kromatografisi ile Teşhis

Vitamin B₆ gaz kromatografisi için gerekli ısıya dayanıklı olmadığından türevleri hazırlıyarak çalışılır.

Korytnyk (1966) B₆ vitamini ve diğer bazı vitaminlerin isopropilinden, asetil, trimetasil ve 3-O-benzil türevlerinin hazırlanmasını, % 1.2 silicone Gum Rubber SE-20 / chromosorb G kolonda, teşhisi üzerinde çalışmış ve bu tarihe kadar yapılan çalışmaları derlemiştir.

Leemans ve McCloskey (1967) B₆ vitaminlerinin o-trimetilsilil türevlerini % 1 Gum Rubber SE-30 kolonda ayırıp, kütle spektroskopisi ile teşhisine çalışmışlardır.

Ohnishi, Horri ve Makita (1967) piridoksin, piridoksal ve piridoksamin trimetasitasetamid türevlerini hazırlamış ve bu maddeleri, % 3,5 E-52 Gas Chrom. P. (60-80 mesh) kolondan, 165^oC' de, dakikada 50 ml akış hızında gaz geçirerek, teşhis edilebileceğini

belirtmişlerdir. İmanari ve Tamura (1967) vitamin B₆ vitamerler ve 4-piridoksik asid laktonunun, trifloroasetil türevlerini hazırlayarak, gaz kromatografisi ile teşhis etmişlerdir.

Kuniko ve Tanimura (1968); Kawahara ve Tanimura (1968), % 5 SE-30 kolonda multivitamin karışımlarını; Prosser, Sheppard ve Libby (1967) SE,30 kolonda B₆ vitamerleri; Sennello ve Argoudelis (1969) piridoksin, askorbik asid ve nikotinamidin, % 15 Silicone grease / Gas Chrom.Q kolonda; Janecke ve Voegelé (1968) multivitamin karışımlarının, gaz kromatografisi ile, teşhisi üzerinde çalışmışlardır.

e- Kimyevi Reaksiyonlar ile Teşhis

B₆ vitamininin teşhisi için yapılan çalışmaları, şu şekilde özetleyebiliriz :

Laubic (1949) B₆ vitamininin teşhisi için çeşitli metodlar geliştirmiştir.

a) 1 ml vitamin B₆ çözeltisi, % 3' lük bakır sülfat çözeltisi ve 1 damla doymuş amonyumtiyosiyanyür çözeltisi ile karıştırılınca, kloroformda çözünmeyen, yeşil renkte çökelti meydana gelir.

b) 1 ml vitamin B₆ çözeltisi, bir damla % 5 uranil asetat çözeltisi ile karıştırılıp, amonyak buharına tutulunca, vitamin B₆ konsantrasyonuna bağlı olarak, sarı veya turuncu renk meydana gelir.

c) 1 ml vitamin B₆ çözeltisi, 1 damla sodyum hidroksid çözeltisi ve birkaç damla doymuş bakır sülfat çözeltisi ile karıştırılınca, yeşil renk meydana gelir.

1 mg vitamin B₆ çözeltisine, % 3,7 hidroklorük asid ve % 10 potasyum bromür karışımındaki (1 : 2) % 1' lik brom çözeltisinden, 2 damla ilave edilip kaynar suda 5 dakika ısıtılır. Reaksiyona girmemiş brom ortamdan ısıtılarak uzaklaştırılır, 5 ml distile su ilave edilir, alkol ile, (1 : 1) oranında dilüe edilir, kırmızı renk meydana gelir. Deneye diğer vitaminlerin etkisi, alkol seyreltmesinden sonra eter ekstraksiyonu ile önlenir (Baltazar ve Marganide, 1953).

Feigl ve Jungreis (1958) vitamin B₆ teşhisi için Gibbs reaksiyonunun (Gibbs, 1927), Hochberg, Melnick ve Oser (1944a) tadilini, filtre kağıdına uygulamıştır. Filtre kağıtları 2,6-diklorokinon - klorimidin etanoldeki % 1' lik çözeltisine batırıp kurutulur. Tiyamin, Riboflavin ve askorbik asidin deney üzerinde etkisine mani olabilmek için fosfomolibdik asid ile çöktürülür. Amonyak buharına tutulan filtre kağıdındaki mavi renk, vitamin B₆ mevcudiyetini gösterir.

Vaisman, Bushkova ve Repeport (1963) tiyamin, riboflavin, piridoksin ve askorbik asid için geliştirilen renk reaksiyonlarını inceliyerek, hassasiyetlerinin mukayeselerini yapmışlardır.

Bendor (1964) piridin - aldehid ve o-hidroksilaldehid grupları bulunan bileşikler için özel renk reaksiyonları geliştirmiştir :

a) 1 damla numune çözeltisi ve 1 damla % 1 fenilhidrazin asetat çözeltisi karıştırılınca, sarı renk piridin-aldehid mevcudiyetini gösterir. Hassasiyet 0.5 mcg dir.

b) Filtre kağıdı % 5'lik hidrazin asetat çözeltisine batırılır, kurutulur, üzerine bir damla numune dökülür, UV ışığı altında sarı fluoresans görülmesi, maddenin o-hidroksilaldehid olduğunu gösterir.

Piridoksamın yapısında bulunan amin grubundan yararlanılarak, diğer B₆ vitaminlerinden, ayırımı yapılmıştır (Ahrens, 1969).

Piridoksin hidroklorür teşhisi için kodekslerde metodlar kayıtlıdır : T.F. (1974) tanıma için verdiği metodlar şu şekildedir: (A) Sudaki % 0.001 a/h mahlülünden iki tübe 1'er ml koyun. Her iki tübe sodyum asetat R nin sudaki % 20 a/h mahlülünden 2'er ml ilave edin. Birinci tübe 1 ml su ve ikinciye borik asit R nin sudaki % 4 a/h mahlülünden 1 ml koyun ve karıştırın. Her iki tübü takriben 20°C'ye soğutun ve her ikisine de süratle 2,6-diklorokinon - klorimid R nin etanol (% 95) R' deki yüzde 0.5 a/h mahlülünden 1'er ml ilave edin; birinci tübte mavi renk hâsıl olur, bu renk süratle kaybolur ve birkaç dakika içinde kırmızı olur; fakat ikinci tübte mavi renk hâsıl olmaz. (B) Sudaki % 0.5 a/h mahlülünün 2 ml'sine 0.5 ml fosfotungustik asit TS ilave edin; beyaz bir rüsup hâsıl olur. (C) Klorürlerin karakteristik reaksiyonlarını verir. British Pharmacopeia (1968) teşhis için Gibbs reaksiyonu, klorürlerin karakteristik reaksiyonları, maddenin U.V. spektrumu ve erime derecesinden; British Pharmaceutical Codex(1968) Gibbs reaksiyonundan; State Pharmacopoeia of Soviet Socialist Republic IX ve Deutsches Kommenter (1970) de Gibbs reaksiyonu ve demir III klorür ile meydana gelen kırmızı - kahverengi renkten; Farmacopea Ufficiale Della Repubblica Italiana (1965) da Gibbs reaksiyonu, klorür iyonu reaksiyonları ve fosfotungustik asit ile çökmesinden, istifade edilebileceği, kayıtlıdır.

Vitamin B₆ teşhisi için kromatografik çalışmalarda, Gibbs reaksiyonuna bağlı olarak meydana gelen mavi renkten (Harris, 1941; Rodhokrishnamurty ve diğ., 1953; Santos, 1958; Serpa, 1958; Rodwell ve diğ., 1958; Simatoepango, 1959; Nurnberg, 1961; Klotz ve

diğ., 1963; Ishikawa ve diğ., 1964; Gonnard ve diğ., 1964; Kutsui, 1964; Yamada ve diğ., 1965; Huttenrauch, 1966; Danilovic ve diğ., 1966; Huttenrauch ve diğ., 1967; Koen ve diğ., 1968; Ahrens ve diğ., 1968; Selles ve diğ., 1970); %10 demir(III) klorür çözeltisi ile verdiği kırmızı - kahverengi renkten (Hashmi ve diğ., 1967 ve 1969); diazolanmış nitro anilin ve diazolanmış p-aminoasetofenon reaktifi ile reaksiyonundan (Fasella ve diğ., 1956; Rodwell ve diğ., 1958; Danilovic, 1966; Ahrens ve Karytnyk, 1969; Colombini ve diğ., 1970) o-toluidin çözeltisinden (Hashmi, 1967); rodamin B çözeltisinden (Chiang ve diğ., 1970); U.V. ışığı altında gösterdiği fluoresanstan (Puzztai, 1954; Fasella ve diğ., 1956; Simatoepang, 1959; Gough ve diğ., 1963; Gonnard ve diğ., 1964; Turano ve diğ., 1964; Kutsui, 1964; Ludwig ve diğ., 1965; Aksenova, 1968; Ikeda ve diğ., 1968; Dement'eva ve diğ., 1968; Ahrens ve diğ., 1969; Massa, 1969; Colombini ve diğ., 1970; Smith ve diğ., 1970; Cadorniga ve diğ., 1972), istifade etmişlerdir.

Bu teşhis reaksiyonlarından, Gibbs reaksiyonunun hassasiyeti 0.1 mcg, diazolanmış nitroanilin reaktifinin hassasiyeti 0.1 mcg, diazolanmış p-amino asetofenon reaktifinin hassasiyeti 1 mcg, ferri klorür reaktifinin hassasiyeti 0.7 mcg, o-toluidin reaktifinin hassasiyeti 0.2 mcg olarak belirtilmiştir.

f) IR, NMR ve Kütle Spektroskopisi ile Teşhis

Piridoksin hidroklorürün potasyum bromür tabletlerinde, karakteristik bantları 1536, 1273 ve 1207 cm^{-1} de; piridoksal için ise, karbonil grubuna ait karakteristik bant, dötronlanmış su, potasyum bromür tabletleri ve nujolde 1650 - 1660 cm^{-1} de,

görüreceği belirtilmiştir (Anderson ve Martell, 1964). Ayrıca piridoksal ve fosfat türevinin, amino asitler ile verdiği bileşikler (Parker, 1961); piridoksal -5- sulfat, piridoksamin -5- sulfat, piridoksin -5- sulfat, dezoksipiridoksin -5- sulfat, piridoksal monoetilasetal -3- sulfat (Kuroda, 1963); 5- piridoksik asit ve türevleri (Korytnyk, 1965); piridoksal homosistein (Okumura, Kotera, Oine ve Oda, 1967) teşhisi için, IR spektroskopisi ile, çalışmalar yapılmıştır.

Korytnyk ve Singh (1967) piridoksin ve benzer yapıda olan vitamin B₆ aktivitesi gösteren vitamerleri, NMR spektroskopisi yardımı ile, karakterize etmiştir. Gansow ve Holm (1968) da aynı konu üzerinde çalışmıştır. 5- piridoksik asit ve türevlerinin çeşitli solvanlarda (Korytnyk, 1965); n-nikotinoil - piridoksamin trinikotinat ve piridoksal dinikotinatın nujol içinde (Okumura, Imado ve Oda, 1967); polifonksiyonel amino asitlerin piridoksal ile meydana getirdiği bileşiklerin D₂O çözeltisi içinde NMR spektroskopisi ile karakterizasyonuna ait çalışmalar yapılmıştır. (Abbott ve Martell, 1970).

Reiber (1972) piridoksal -5- fosfatın stabilitesine etki eden nedenleri göstermek için, irradiye ettikleri çözeltilerin, muayyen aralarla NMR spektrumlarını almış ve formil proton sinyali vermeyen, en az iki bileşiğin mevcudiyetinden bahsetmiş ve bu bileşiklerden birinin 4- piridoksik asit olduğunu, ileri sürmüşlerdir.

Kütle spektroskopisi vitamin B₆ ve türevlerinin yapı analizi ve teşhisinde geniş şekilde kullanılmıştır (DeJongh, Perricone ve Korytnyk, 1966; De Jongh, Perricone ve Gay, 1968; DeJongh ve Korytnyk, 1970). DeJongh ve diğ., (1968) B₆ vitamininin ana

metaboliti olan 4-piridoksik asid ve laktonunun teşhisini, bu bileşiklerin 5- piridoksik asid ve laktonundan tefrikini ve birçok vitamin B₆ türevinin yapı analizini, kütle spektroskopisi ile gerçekleştirmişlerdir.

Korytnyk, Fricke ve Paul (1966); Richter, Vecchi, Vetter ve Walter (1967); Leemans ve McClosky (1967) B₆ vitaminlerinin o-trimetilsilil türevlerini hazırlayıp, gaz kromatografisi ile ayırdıktan sonra, kütle spektroskopisi ile teşhisi üzerinde çalışmışlardır.

Hüttenrauch ve Tummler (1967) piridoksinin nötral çözeltilerinin ısıtılması sonucu meydana gelen, piridoksin dimer ve piridoksin trimerin yapı analizini kütle spektroskopisi ile karakterize etmeye çalışmışlar, piridoksin dimerin bis-(-2-metil -3- hidroksi -5- metilopiridin (4,4')) glikol yapısında olduğunu, ileri sürmüşlerdir.

Elliott ve Walter (1972); Tsukida (1973) vitaminlerin kütle spektroskopisi ile, yapı analizi ve teşhisini konu alan derlemeler yapmışlardır.

Ayrıca literatürde, B₆ vitaminlerinin X-ışını spektroskopisi (Planta, 1961; Nakken, 1966) ve ESR spektroskopisi (Asahi, Terao, Fujita ve Muramatsu, 1969) ile karakterizasyonuna ait çalışmalar kayıtlıdır.

E- MİKTAR TAYİNİ METODLARININ GÖZDEN GEÇİRİLMESİ :

Vitamin B₆ ve türevlerinin, miktar tayininde kullanılan metodları, 3 başlık altında inceleyebiliriz :

- a- Kimyasal ve fizikokimyasal metodlar
- b- Mikrobiyolojik ve enzimatik metodlar
- c- Biyolojik metodlar

B₆ vitamininin miktar tayini metodlarını konu alan çok sayıda derleme yayınlanmıştır (Watanabe, 1958; Kakâc ve Vejdélek, 1961; Peneva, 1963; Cerna, 1963; Aliev, 1967; Sellés ve Camachoi, 1970; Takanashi, 1971; Cerna, Pickova ve Blottna, 1972).

- a- Kimyasal ve Fizikokimyasal metodlar :

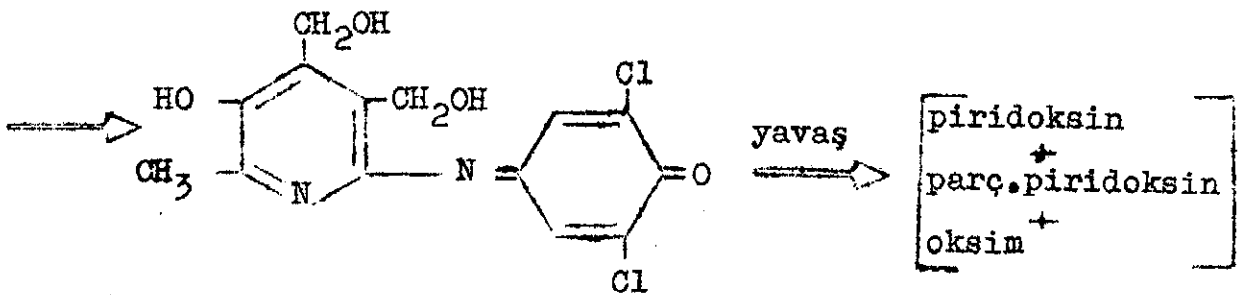
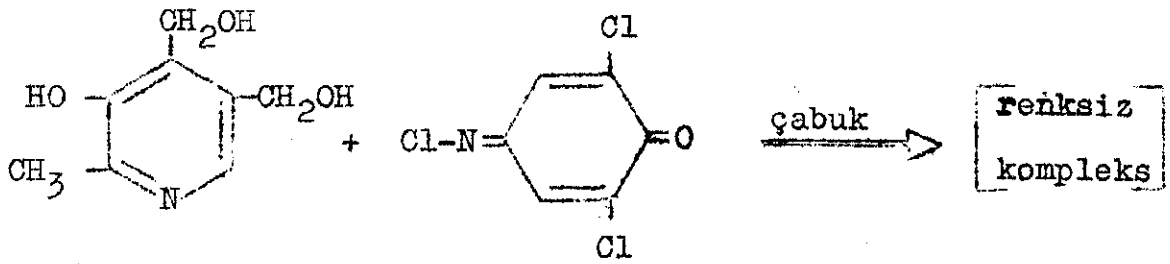
Miktar tayini tablet, draje, kapsül gibi katı preparatlarda yapılacaksa, vitamin B₆ genellikle su ile ekstre edilir. Zira preparat imalinde stabilite ve çözünürlük bakımından, pirodksin hidroklorür kullanılır. Bu madde de en çok suda çözünür. Ancak vitamin B₆ yanında, diğer vitaminler de bulunuyorsa, ekstrasyonun 0.1N hidroklorik asid ile yapılması tavsiye edilir. Vitamin B₆ fenolik yapıda olduğu için ekstraksiyonda seyreltik sodyum hidroksid çözeltileri kullanılabilirse de, bu şartlarda B₆ vitamininin dayanıklı olmadığı göz önünde tutularak, gerekli tedbirler alınmalıdır.

- 1- Kolorimetrik Metodlar :

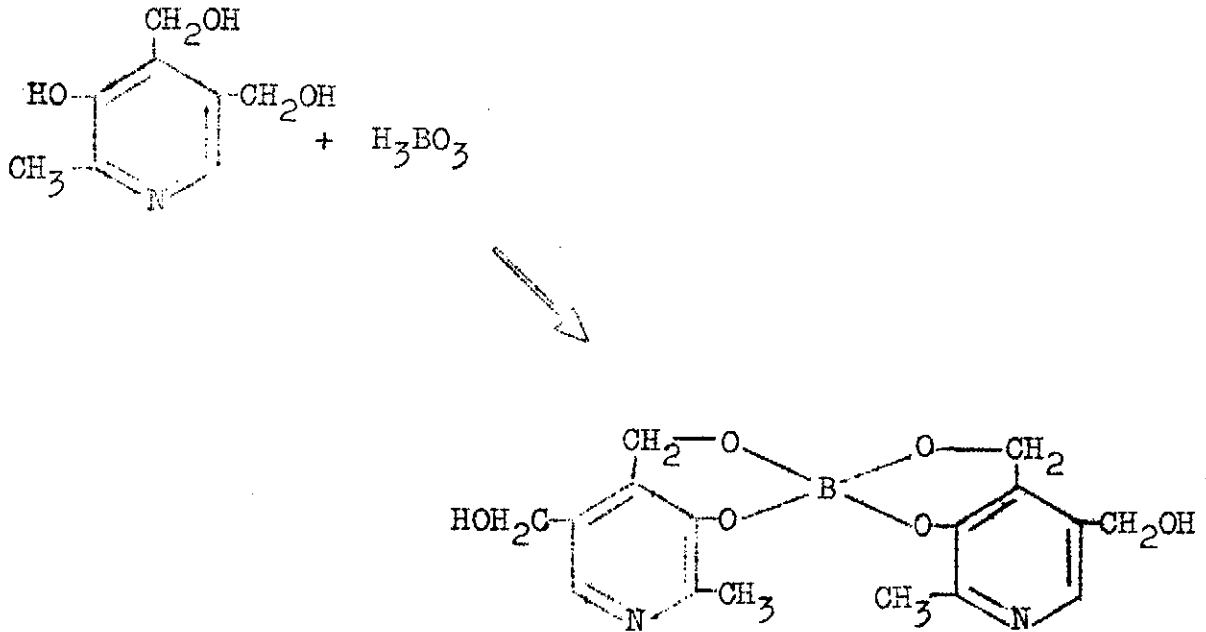
2,6 Diklorokinon-klorimid (GIBBS) Metodu

Kolorimetrik miktar tayini metodları içinde, en hassası Gibbs (1927) tarafından, para pozisyonunda substitüent ihtiva

etmeyen fenoller için geliştirilen; alkali ortamda fenollerin 2,6- diklorokinon-klorimid ile, indofenol teşekkülüne dayanan metoddur. Gibbs metodu Scudi, Koones ve Keresztesy (1940 a ve b) tarafından tadil edilerek, B₆ vitaminine uygulanmıştır. Metod B₆ vitamininin 2,6- diklorokinon-klorimid reaktifi ile, alkali ortamda mavi indofenol boyası vermesine ve bu renk şiddetinin ölçülmesine dayanmaktadır. Ancak Scudi metodu hassas bulunmadığı ve reaksiyon süresi 40 dakika olduğu için tadil edilmiştir (Hochberg, Melnick ve Oser, 1944 a ve b; Melnick, Hochberg, Himes ve Oser, 1945). İki fazlı butanol - su solvan sistemi yerine, isopropanol - su solvan sistemi ve veronal tamponu yerine de, alkaliliği daha fazla olan amonyum klorür - amonyum hidroksid tamponu kullanılmıştır. Böylelikle reaksiyon hassasiyeti yaklaşık olarak 3 misli çoğaltılmış, reaksiyon süreside 40 dakikadan



60 saniyeye indirilmiş ve miktar tayini metodu da kolaylaştırılmıştır. Metodun tenkit edilen yönü, diğer fenollerin, aminlerin ve bazı bileşiklerin de reaktif ile renk vermesidir. Ancak bu potansiyel hata, reaksiyonun fazla miktarda borik asid bulunan ortamda yapılması ile bertaraf edilmiştir (Scudi, Bastedo ve Webb, 1940). Borik asid uygun şartlarda piridoksin ile reaksiyona girerek, piridoksin-borik asid kompleksi meydana gelir (Scudi ve diğ., 1940 a ve b; Hochberg ve diğ., 1944 a; Roth ve Surborg, 1968; Huttenrauch, 1970). Piridoksinin reaktif ile reaksiyona girmesine mani olur. Böylelikle borik asid bulunan ve bulunmayan ortamlarda elde edilen neticelerin farkından piridoksin veya deney üzerinde etkisi olan maddelerin miktarları kolaca hesaplanabilir.



Metodun dezavantajı renk şiddetinin devamlılığının çok kısa olmasıdır. Ölçüm reaktif ilavesinden 60-80 saniye, tercihen 60 saniye sonra yapılıır. Renk şiddetinin devamlılığını arttırmak için Sweeney ve Hall (1952 ve 1955) amonyum klorür - amonyum hidroksid tamponu yerine, aynı pH'da bulunan sodyum asetat ihtiva eden tamponların; Utsumi, Tanaka, Harada ve Usuki (1957) ve Richter (1962) isopropanol yerine metanol; Iwasa, Takeuchi ve Kawabata (1959) pH 7.8 veronal tamponunu; Denyatnin ve Federo-rova (1961) pH 7.8 tamponları; Leurquin ve Herman (1962) isopropanol yerine dioksan kullanılmasını tavsiye etmişlerdir.

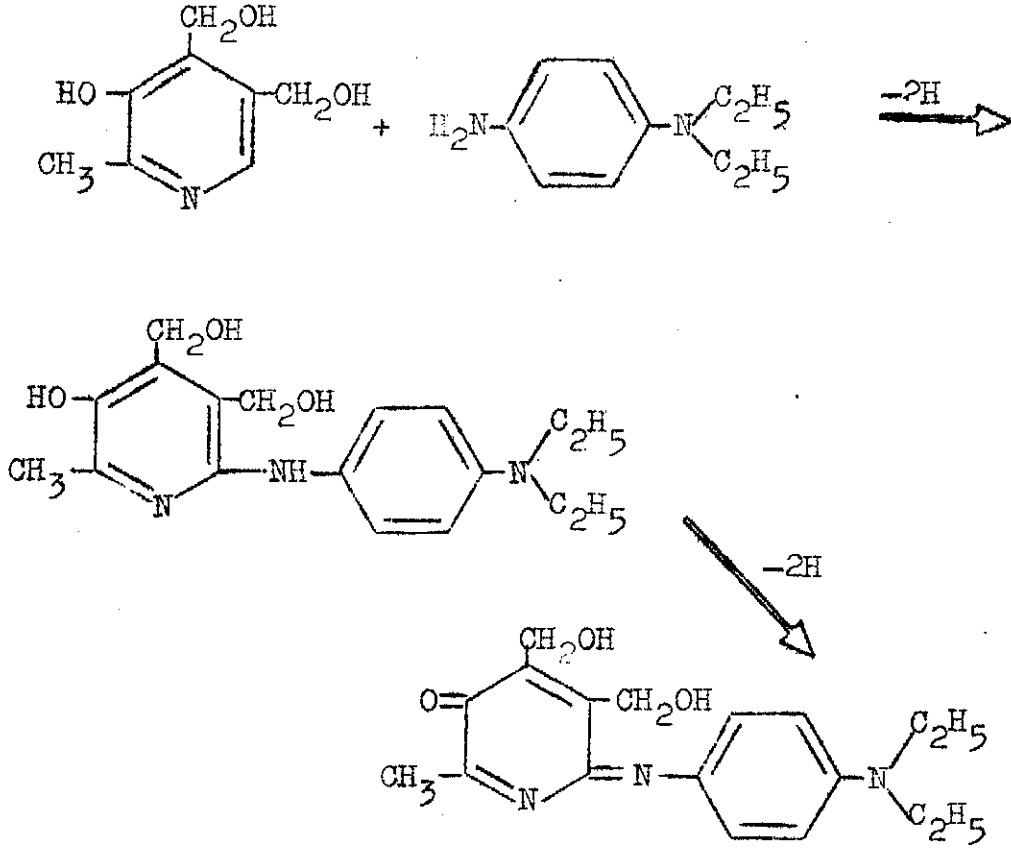
Metodun tadil edilmiş şekli U.S.P. XVIII' de kayıtlıdır. Ancak metoda tiyamin, riboflavin ve askorbik asid (Aihira ve Satoh, 1954 ve 1955; Haertelt, 1964); demir kolin sitrat (Raut, Gagrat ve Banerjee, 1966; Baczyk ve Kochetska, 1966) ve izonikotinik asid hidrazit (Canuti ve Frittoli, 1969) etki ettiği için, çeşitli şekillerde tadil edilmiştir.

Bu yukarıda bahsedilen metodların literatürde kullanışları çok fazladır (Canböck ve Lindholm, 1945; Watanabe ve Harikawa, 1949; Compiolivia ve Giannini, 1956; Hall, Bruening ve Parrish, 1956; Benhamou ve Lacroix, 1958; Coursin ve Brown, 1958; Leurquin ve Herman, 1962; Berndorfer ve Kraszner, 1970; Cascioli, Celletti, Petrangeli ve Fullo, 1971; Cavalli ve Rurali, 1971).

Dietil-p-fenilendiamin Metodu :

Vitamin B₆ tayininde yararlanılan diğer bir kolorimetik metod, vitamin B₆ ve dietil -p- fenilendiamin ihtiva eden çözeltilere, potasyum heksasiyanoferrat (III) veya diğer bir oksidan ajan ilavesi sonucu, mavi indofenol boyası teşekkülüne dayan-

maktadır (Hırdy ve Urbanova, 1957). Meydana gelen indofenol, boyası, sulu ortamda dayanıklı olmadığından, benzen ile ekstre



edilip renk şiddeti tayin edilir. Renk bir kaç dakika sabit kalır. Gibbs reaksiyonunda olduğu gibi 60 saniye sonunda ölçüm yapmaya lüzum yoktur. Okuma birkaç dakika içinde yapılabilir. Metod için en uygun konsantrasyon, 5-50 mcg / 10 ml' dir. Hassasiyetide Gibbs metodunun (Gibbs., 1927), Scudi tadili (Scudi ve diğ., 1940 a ve b) kadardır.

Dietil -p- fenilendiamin diğer fenollerle, aynı renk reaksiyonu verir. Ancak piridoksin fazla miktarda borik asid bulunan ortamda, bu madde ile kompleks vereceği için (Scudi ve diğ., 1940 a ve b; Hochberg ve diğ., 1944 a; Roth ve diğ., 1968; Huttenrauch, 1970), dietil -p- fenilendiamin ile reaksiyona giremez.

Borik asid bulunan ve bulunmayan ortamlarda, elde edilen sonuçların farkında piridoksin miktarı hesaplanabilir.

Metoda askorbik asid ve salisilik asid de etki eder. Diğer vitaminlerin metod üzerinde etkisi yoktur. Deneye etki eden askorbik asidin, tesirini bertaraf edebilmek için (Hrdy ve diğ., 1957; Tsuji, 1968) ortamda bulunan askorbik asid konsantrasyonu ile orantılı olarak potasyum heksasiyanoferrat (III) konsantrasyonunun çoğaltılmasını (Sato, 1959); Tsuji, Mizukami ve Yarimizu (1964) askorbik asidin iyot çözeltisi ile oksitlenmesini ve benzen yerine de kloroform kullanılmasını, Murai (1961 b) maddelerin kağıt kromatografisi ile ayrılmasını ve benzen yerinede isopropanol kullanılmasını, Moszczyński ve Kubicka (1972) karışımından piridoksinin, kaynar etanol ile ekstre edilmesini, tavsiye etmişlerdir. Salisilik asidin de deney üzerindeki etkisini yok edebilmek için, asitlendirilmiş çözeltilerden, maddenin eter ile ekstre edilmesi önerilmiştir (Hrdy ve diğ., 1957).

Diazo Reaksiyonuna Dayanan Metodlar :

Swaminathan (1940) piridoksinin, diazolanmış sulfanilik asid ile reaksiyonu sonucu meydana gelen azo boyasının, kolorimetrik tayinde kullanılabileceğini belirtmiştir. Ancak metod, piridoksin için özel olmaması nedeni ile, Bina, Thomas ve Brown (1943) deneye etki eden maddelerin sodyum tungustat ile çöktürülmesini, Süperfiltrol kolondan piridoksinin, alkali alkol ile secimli elue edilmesini, tavsiye etmişlerdir. Alkali alkolün ayrıca renk reaksiyonunu stabilize ettiği ve meydana gelen rengin daha dayanıklı olduğunu belirtmişlerdir. Ryu (1950) kan numunelerindeki deneye etki eden maddelerin ekstrasyonunu, Kuri (1951)

histiden ve histaminin cıva tuzları halinde uzaklaştırılmasını önermişler, Kishibe ve Fukui (1951); Laszlovszky ve André - Stiglamayer (1967)' de metodu galenik preparatlara uygulanacak şekilde tadil etmişlerdir.

Brown ve diğ. (1945) piridoksinin kolorimetrik tayini için, diazolanmış p-aminoasetofenon kullanmışlardır. Deneye etki eden maddeleri ortandan uzaklaştırmak için de Amberlite IR-4 recine uygun bulunmuştur. Alkali alkolün bu reaksiyon üzerine stabilizan etkisi görülmemiştir. Alkali pH yerine, neutr vasatta çalışıldığından, diazolaşmış sulfanilik asidle yapılan reaksiyondan daha hassastır (0.5 - 2.0 mcg/ml). Renk, 2-5 dakika dayanıklı kalmaktadır. Micki ve ve Noneka (1951) metodu tadil edip, farmasötik preparatlara uygulamışlardır.

Aliev (1964 ve 1968); Aliev ve Onov (1968) Onov (1969); Onov (1970) piridoksin tayini için norsulfazol diazo tuzu kullanmışlar ve meydana gelen kırmızı-viole rengi çinko veya cıva tuzları ile stabilize etmişlerdir.

Urbanyi ve Budavari (1968) o güne kadar geliştirilen diazo reaksiyonlarının, hassas bulunmadığı ve uzun işlemler yapıldığı gerekçesi ile, piridoksin hidroklorür tayini için 4- amino-6- kloro-m- benzydinsulfonamid kullanmışlardır. Metodunun hassas olduğunu; vitaminlerin, alkaloitlerin ve birçok dolgu maddesinin, deney üzerinde etkisi olmadığını belirtmişlerdir. Tadera, Yasu-moto, Tsuji ve Mitsuda (1974) 5- kloroanilin -2,4- disulfanil klorür kullanarak, B₆ vitaminlerinin seçimli olarak, 0.0 - 12.5 mcg/ml konsantrasyonlarda, tayin edilebileceğini bildirmişlerdir.

Diğer Kolorimetrik Metodlar :

B₆ vitamininin kolorimetrik tayini için, Folin-Denis reaktifinin (Kuhn ve Low, 1939a), sayanogen bromür ve sulfanilik asid ile piridin halkasının özel renk reaksiyonlarının (Sweenley, ve Hall, 1952), tiyofen ile meydana gelen yeşil rengin (Levine ve Hansen, 1958), amonyum raynekat ile renk reaksiyonunun (Base ve Dutta, 1962), piridin halkasının kloroform ile alkali ortamda ısıtılarak açılıp, çeşitli aminlerin % 1 lik çözeltisinin ilavesi ile meydana gelen boyanın (Luk'yanchikova, Bernshstein, ve Stepanyuk, 1969); uranil asetat ile çeşitli piridoksin tuzlarının verdiği sarı rengin (Crockett, Mesnard, Grenie ve Dang, 1969) kullanılabileceği de belirtilmiştir.

Literatürde demir III klorür kullanılarak B₆ vitamininin teşhisi ve tayini yapılabileceği kayıtlı ise de (Sutton ve Beer-sfecher, 1951; Singh ve Kannan, 1959) metodun hassasiyeti, kullanılmasını çok kısıtlamıştır.

Wada ve Snell (1961) piridoksal ve piridoksal -5- fosfatın, fenilhidrazin ile sarı renk vermesine dayanan (Tmax = 410 nm.) bir metod geliştirmiştir. Piridoksal reaktifle çok daha yavaş reaksiyona girdiğinden, sıfır derecede ve asidik ortamda deney yürütülerek, piridoksalin reaksiyona girmesi önlenebilir. Böylelikle piridoksal bulunan ortamda dahi, piridoksal -5- fosfatın bu metodla kolorimetrik tayini mümkün olur.

2- Spektrofotometrik Metodlar :

Piridoksinin absorpsiyon spektrumu pH ile ilgilidir. Asid ortamda (pH 2-7) biri 267 nm ve diğeri de 303.7 nm' de iki; kalevi ortamda da 231.5 nm, 254.7 nm ve 315 nm' de üç izobestik nokta verir. Kantitatif tayinde pH ikide 290.5 nm' de meydana gelen, absorpsiyon maksimumu kullanılır. Zira bu bölgede ekstinksiyon maksimumudur ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 430$). Saf piridoksin tayini için, normal hidroklorik asidi içinde % 1-2 mg konsantrasyonda ve pH iki civarında çözeltisi hazırlanır. Ölçüm 290.5 nm' de, aynı konsantrasyonda hidroklorik asid çözeltisi, şahit olarak kullanılmak sureti ile yapılır. Krisciuniena ve Jonaitis (1969), Jonaitis ve Kriscuniena (1969) ve Bazhulina, Lomakin, Morozov ve Savin (1970) B₆ vitaminlerinin spektral özellikleri ve bu özellikler üzerine pH, temperatur ve konsantrasyonun etkilerini incelemişlerdir.

Piridoksal hidroklorür, pH ikide, 286.5 nm'de, maksimum absorpsiyon gösterir ve spesifik ekstinksiyonu $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 440$ dır. Tayin aynen piridoksin gibi yapılır. Kantitatif tayinde 240.9, 299.4 ve 388.5 nm deki absorpsiyon maksimumlarının kullanılması, madde kalevi ortamda ışığa karşı hassas olduğundan tercih edilmez.

Piridoksal -5- fosfatın spektrofotometrik tayini için, Bonavita ve diğ. (1959) maddenin potasyum siyanür ile reaksiyonu sonucu 385 nm' deki absorpsiyon maksimumunun kaybolmasına dayanan bir metod geliştirmişlerdir. Fazla miktarda potasyum siyanür bulunan ortamda, 385 nm' deki optik yoğunluğun azalmasının 0-25 mcg aralığında piridoksal -5- fosfat konsantrasyonu

ile orantılı olduğunu belirtmişlerdir. Deneye piridoksin hidroklorür, piridoksamın hidroklorür ve fosfatları etki etmez. Oike ve diğ., (1960) piridoksal -5- fosfat tayini için diğer maddelerin kromatografik olarak ayrılmasını ve ölçümün pH yedide, 388 nm' de, yapılmasını tavsiye etmişlerdir. Morozov (1967) ve Evangelopoulos (1967) piridoksal -5- fosfatın spektral özelliklerini ve bunun üzerine temperatur etkisini incelemiştir. Soda, Yorufuji, Misano ve Moriguchi (1969) piridoksal ve piridoksal -5- fosfatın 3- metil -2- benzotiazolon hidrazon hidroklorür ile reaksiyona sokularak, spektrofotometrik olarak tayin edilebileceğini belirtmişlerdir.

Siegel ve Blake (1962) piridoksamın ve piridoksin bulunan ortamda piridoksalın spektrofotometrik tayinini, maddeyi aseton ile reaksiyona sokarak gerçekleştirmiştir. Metod 10 ile 100 mcg aralığında hassastır.

Piridoksin, piridoksal ve piridoksamın karışımının tayini pH 6.75 de 325 nm' de ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) yapılmıştır (Melnick, Hochberg ve Oser, 1945). Bu metod ile vitamin B₆ tayini, birçok araştırmacı tarafından da kullanılmıştır (Fasella ve diğ., 1956; Gaudiano, Polizzi-Sciairone, 1965; Bandi, 1966; Loo ve diğ., 1969).

Brown ve diğ. (1952); Burger (1962), Machek ve Lorenz (1964); Haertelt (1964); Shah, Raman ve Mehta (1965); Koziol (1965); Volta (1968); Kohen ve diğ. (1968); Weber, Urbigkit ve Senkowski (1968); Serrat (1970) multivitamin kombinasyonlarında; Sumanović ve Stanković (1966) meklizin bileşimlerinde vitamin B₆'nın tayini üzerinde çalışmışlardır.

Bican-Fister ve diğ. (1973) B kompleks vitaminleri silikagel-HF₂₅₄ tabakalarında ayırdıktan sonra, bu vitaminlerin

spektrofotometrik tayinini gerçekleştirmiştir. Bunun için piridoksin hidroklorür adsorbandan, pH 2.0 sitrat tamponu ile elue edilmiş ve 291 nm' de, şahide karşı ölçülmüştür.

Petrangeli, Moretti, Celletti, ve Favilli (1974) B₆ vitaminlerinin spektrofotometrik tayini için literatürde kayıtlı çeşitli metodları mukayese etmişlerdir.

Castillo, Lopez, Valls ve Vilas (1973) piridoksal ve fosfat t. arevinin glisin ile verdiği bileşiklerin spektrofotometrik tayini üzerinde çalışmıştır.

3- Fluorometrik Metodlar :

Vitamin B₆ tayininde istifade edilen fluorometrik metodları, iki grup altında toplıyabiliriz.

Bunlardan birincisi, piridoksin ve piridoksalin potasyum permanganat ile 4-piridoksik aside oksitlenmesi, bu maddenin asid ortamda ısıtılması sonucu meydana gelen laktonun, gösterdiği fluoresansın ölçülmesine dayanır (Fujita, Matsuura ve Fujino, 1955; Fujita, Fujita ve Fujino, 1955; Fujita, Matsuura ve Fujino, 1956). Piridoksamının direkt olarak 4-piridoksik aside oksitlenmesi mümkün değildir. Bunun için piridoksamın ilk başta piridoksine çevrilir. Deneye çeşitli maddeler etki ettiği için kromatografik metodlarla bu maddelerin ayırımı yapılmış ve metod çeşitli şartlara göre tadil edilmiştir (Sterscu ve diğ., 1957; MacArthur ve diğ., 1959; Wallace, 1959; Bogdanova, 1959; Kaziol, 1961 a ve b; Starshou, 1962; Kaziol ve Zokresu, 1964; Polansky, Cammaro ve Toepfer, 1964; Bonasera, Guarneri ve Bonavita, 1964; Yamada, Saito ve Tamura, 1966; Schulz ve Sanchez, 1967; Contractor ve diğ., 1968; Kraut ve diğ., 1968; Loo ve diğ., 1969; Fiedlerova ve Davidek, 1974).

Piridoksal, piridoksal hidroklorür ve piridoksal fosfatın 4-formil grubunun siyanohidrin reaksiyonu, ilk olarak, Bonavita ve Scardi (1958 ve 1959) tarafından gösterilmiştir. 1960 senesinde de bu reaksiyondan istifade ederek fluorometrik metod geliştirmiştir (Bonavita, 1960). Piridoksal potasyum siyanür ile piridoksal siyanhidrit verir ki, bu bileşiğin 0.01-0.50 mcg / ml konsantrasyon aralığında gösterdiği fluoresans lineerdir. Metodenin avantajı piridoksal ve türevleri için spesifik olmasıdır. Ancak piridoksin mangan dioksit ile piridoksale oksidlenip; piridoksaminde pH 7.4 de aliminyum tuzları bulunan ortamda glioksilik asitle piridoksale çevrilip, bu metod ile tayin edilebilir. (Teopfer, Polansky ve Hewston, 1961) . Bu tarihten sonra metod üzerinde, çeşitli araştırmalar ve tadiller yapılmıştır (Kurioka ve Makina, 1969; Adams, 1969; Takanashi ve Tamura, 1970; Smith ve diğ., 1971).

4- Polarografik Metodlar :

B₆ vitamininin polarografik tayini üzerine çeşitli araştırmalar yapılmıştır (Lingane ve Davis, 1941; Knobloch, 1947; Nakay, 1960). Ancak piridoksinin farmasötik preparatlarda polarografik tayini 1961 senesinde gerçekleştirilmiştir (Manoušek ve Kocová, 1961). Tayin piridoksinin amonyak - amonyum klorür tamponu içinde redüksiyonuna ve veronal tamponunda (pH = 8.3) katalitik fazının oluşumuna dayanır. Enjeksiyon çözeltilerinde $1.10^{-3}M$ ve tabletlerde $8.10^{-4}M$ konsantrasyonlar da çalışılabilir. Kapilerin damlama zamanı 3-4 saniye ve akış hızı da 2-6 mg/saniye olarak verilmiştir. Polarografi hücresine 5 ml çözelti

ve 5 ml 0.2 M amonyak - amonyum klorür tamponu (pH = 8.7) konulur. Tayinler azot gazı altında yapılmıştır.

Diğer bir çalışmada piridoksin, piridoksal, piridoksamin ve fosfat ekstrelerinin polarografisi incelenmiştir (Manuşek ve Zuman, 1964). Piridoksinin, tetrametilamonyum bromürdeki % 1 lik çözeltisi, -2.0 voltluk yarım dalga potansiyeli gösterir. Piridoksal -5- fosfat ise hem asidik hemde bazik çözeltilerde, polarografik dalga verir. Ancak yarım dalga potansiyeli pH ile orantılıdır. pH arttıkça yarım dalga potansiyeli de negatif tarafa kayar.

Piridoksin hidroklorür için en uygun elektrolit olarak jelatin ihtiva eden % 1 lityum klorür çözeltisi bulunmuştur. Bu çözeltide piridoksin hidroklorürün yarım dalga potansiyeli -1.47 voltur.

Enriquez ve Kubac (1962) B- kompleks vitaminlerin, Manuşek ve Zuman (1964) piridoksin ve türevlerinin, Masukawa, Furusaki, Monaka, Tadashi ve Okumuro (1968) piridoksal homosisteinin, Parrak ve Oravcova (1969) B₆ vitaminlerinin, polarografisi üzerinde çalışmışlardır.

Kravchenyuk ve Miskidzhyan (1967); Zuman (1973) vitaminler, alkoloitler, hormonlar, glikozitler, sulfamitler ve antibiyotiklerin polarografik tayinlerini derlemiştir.

5- Titrimetrik Metodlar :

Pharm.T. 1974,U.S.P. XVIII'e göre, susuz ortamda 0.1N perklorik asid ile titrasyonda, piridoksin hidroklorür glasiel asetik asid ve asetik asidli cıva asetat karışımında hafif ısıtılarak çözülür. 15°C'ye soğutulduktan sonra kristal viyole

indikatörüne karşı 0.1N perklorik asid ile titre edilir. 1 ml 0.1N perklorik asid 20.56 mg piridoksin hidroklorüre ekuvalandır. Aynı metod ile piridoksal hidroklorür de titre edilebilir. 1 ml 0.1N perklorik asid 20.363 mg piridoksal hidroklorüre ekuvalandır. Llopis (1955); İkrım, Miana ve İslam (1963) metodu tadil edip kullanmışlardır.

B₆ vitamini fenolik grup ihtiva ettiğinden, bromür çözeltisi ile titre edilmesi mümkün olur. Bunun için madde veya preparat suda çözülür, üzerine fazla miktarda standard bromat ve bromür çözeltileri ilave edilir, asidlendirilip, 45 dakika beklenir, belli miktar standard potasyum iyodür çözeltisi ilave edilir ve 5 dakika sonra 0.1N tiyosülfat çözeltisi ile geri titre edilir (Szabo, 1953; Takeuchi, Kawabata ve Iwesa 1968).

Saxena (1970) B₆ vitamini altın klorür ile, alkali ortamda, titre ederek tayin etmiştir. Vitamin B₆ çözeltisi üzerine fazla miktarda standard altın klorür çözeltisi ilave edilip ısıtılır, çöken altın klorür ortam asidlendirilip n-fenilantranilik asid indikatörüne karşı standard seriksulfat çözeltisi ile geri titre edilir. Çöken altın klorür okside olan B₆ vitaminine ekuvalandır.

Ayrıca literatürde B₆ vitaminlerin hidroklorür tuzlarının, ihtiva ettiği klorürün titrasyonu şüeti ile miktar tayini de kayıtlıdır (Anastasi, Mecarelli ve Nebbue, 1952; Kleflin ve Šunanovic, 1958).

Abramove (1969) tiyamin hidrobromür ve piridoksin hidroklorür için, sodyum nitrat kullanarak, emperometrik titrasyon metodu geliştirmiştir.

b- Mikrobiyolojik ve Enzimatik Metodlar :

Vitamin B₆ grubunun mikrobiyolojik tayini, ilk defa Atkin, Schulz, Williams ve Frey (1943) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bugün B₆ vitamininin mikrobiyolojik tayini için çok sayıda mikroorganizmadan istifade edilmektedir. Bunlar *Saccharomyces carlsbergensis* (Atkin ve diğ., 1943), *Neurospora sitophila* (Stokes, Larsen, Woodward ve Foster, 1943), *Streptococcus faecalis* R. (Rabinowitz ve Snell, 1947), *Lactobacillus casei* (Rabinowitz, Mondy ve Snell, 1948), *Escherichia coli* (Diding, 1955) ve *Tetrahymena pyriformis* (Baker ve Sobotka, 1962) dir.

Saccharomyces carlsbergensis piridoksin, piridoksal ve piridoksamin ve fosforlu türevlerine karşı hemen hemen aynı aktiviteyi gösterir; bu nedenle total vitamin B₆ tayininde kullanılır. *Streptococcus faecalis* ile piridoksal ve piridoksamin tayin edilebilir. *Lactobacillus casei* ise piridoksal için özeldir. *Neurospora sitophila* ile tayinde piridoksin, piridoksal, piridoksamin, piridoksal fosfat, piridoksamin fosfat aynı aktiviteyi gösterir. Ancak 5 gün inkübasyon süresine ihtiyaç olması ve metodun zorluğu, kullanılmasını kısıtlamıştır. *Tetrahymena pyriformis* biyolojik materyallerde total vitamin B₆ tayini için kullanılmıştır. Uzun zaman alması ve piridoksinin, piridoksamin ve piridoksale nazaran daha az aktif bulunması, bu metodun da kullanılmasını kısıtlamıştır. Piridoksin bulunmayan bitkisel materyallerin tayininde kullanılabilir.

Literatürde *Saccharomyces carlsbergensis* kullanılarak yapılan mikrobiyolojik tayinlerin çeşitli tadilleri vardır (Clegg ve Hinton, 1958; Toepfer ve diğ., 1961; Osaka, 1966; Thiele ve Brin, 1966; Myszkowska, Tautt ve Tuszyńska, 1967;

Oshiba ve Kawakita, 1967; Toda ve Matsuda, 1967; Kawasaki, Kishi ve Nishihara, 1968; Kawasaki, Nishihara, Nagano ve Kondo, 1968; Pantorin ve Secomska, 1969; Brin, 1970; Teopfer ve diğ., 1970; Takako, Tahru, 1972 a ve b).

Krueger ve Peterson (1945); Haskell ve Wallnoefer (1967); Anderson ve Cowan (1968); Lactobacillus casei metodunu, McCoy ve Snyder (1952); Krueger ve diğ., (1945); Haskell ve diğ., (1967) Streptococcus faecalis metodunu çeşitli şekillerde tadil edip kullanmışlardır.

Ayrıca literatürde vitamin B₆ tayini için bu metodların kullanıldığı çok sayıda çalışma kayıtlıdır (Knorr, 1949; Jones ve Morris, 1950; Meisel ve Pomoshchnikova, 1952; Fukui, 1953; Jones, 1954; Meyer, Burlet ve Faudi, 1955; Parrish ve Loy, 1955; Pomoshchnikova, 1956; Parrish ve Loy, 1956; Clegg ve Hinton, 1958; Princivalle, 1958; Loy, 1958 ve 1959; Adrian, 1959; Base, Mukherjee, Des ve Dutta, 1961; Wright, 1961; Wright, 1962; Kniewald ve Mildner, 1962; Mukherjee ve Dutta, 1962; Base, Mukherjee ve Dutta, 1963; Kruchakova Rudchenko, 1964; Sato, Itagaki, 1966; Iwai, Okinaku, Yokomizo, 1967; Yamada, Inakoshi ve Tsukahara, 1967; Itagaki ve Tsukara, 1967; Adrian, 1967; Camagni, 1968; Isaac, 1968; Yamada, 1969; Rappe, 1969; Berg ve Behagel, 1972; Smith, 1973; Appleyard ve Stanley, 1973). Bu konuda çeşitli derlemeler de yapılmıştır (Novak, Gama, Liuzzo ve Rubloff, 1953; Ostrowski, 1954; Kjellman, 1960; Filojdic, Gruner ve Urancic, 1961; Thoss, 1964; Wright, 1967; Oberzill, 1968 a ve b; Miyazawa, 1971).

Piridoksal fosfat bir çok enzim komplekslerinin koenzimi olduğu için, çeşitli enzimatik metodlar ile, maddenin tayin edilebileceği düşünülebilir. Bugüne kadar iki enzimatik metod ge-

liştirilmiştir. Bunlardan biri tirozin, dekarboksilaz tesiri ile karbon dioksit teşekkülüne (Umbreit, Bellamy ve Gunsalus, 1945), diğeri de triptofanın triptofanes katalizi ile indol, purivik asid, ve amonyak teşekkülüne (Wada, Morisue, Sakamoto ve Ichihava, 1957) dayanır. Bu konuda diğeri araştırmalar varsa da, bu iki metod kadar hassas netice vermemektedir (La Due, Wróblewski ve Karmen, 1954; Holzer, Gerlach, Jacobi ve Gnoth, 1958; Maruyama ve Coursin, 1968).

c- Biyolojik Metodlar :

Vitamin B₆ etkisi gösteren bileşiklerin, biyolojik aktiviteleri sıçan akrodinia deneyi (Halliday ve Evans, 1937); civciv ve sıçan büyüme deneyi (Sarma, Snell ve Elvehjem, 1946); kan hücre transaminaz deneyi (Cabaud, Leeper ve Wróblewski, 1956) ve triptofan yükleme deneyi (Körner ve Novak, 1966) ile tayin edilir.

Sıçanlar B₆ vitaminsiz diyet ile beslenince, karakteristik reaksiyon (cilt lezyonu) meydana gelir, akrodinia adı verilir. Bu semptomları yok etmek için verilmesi lazım gelen vitamin B₆ miktarının bulunması, sıçan akrodinia deneyinin esasıdır. Ancak metodun birçok bakımdan tenkit edilmesi (Sarma ve diğ., 1946), sıçan ve civciv büyüme tayininin gelişmesine sebep olmuştur. Bu tayin, çözelti veya enjeksiyon yoluyla, sıçan veya civcivlere verilen vitamin B₆ aktivitesi gösteren bileşiklerin, büyüme üzerinde mol/mol olarak, biyolojik aktivitesinin ölçülmesine; triptofan yükleme deneyi ise, triptofan yüklenmeden ve yüklendikten sonra, ksanturenik asid salgısının oranının, vitamin B₆ yetmezliğinin kriteri olmasına dayanır.

Literatürde tayin için kullanılan hayvanların diyetini, metodun çeşitli durumlara göre tadilini ve bu metodları mukayesini konu alan birçok çalışma vardır (Arima, 1950; Coates, Ford ve Harrison, 1952; Tamura, Tsunada, Miyazawa ve Kirimura, 1952; Kurtaev, 1953).

B₆ aktivitesi gösteren tabii droglarda, bağlı veya serbest vitamin B₆ türevlerinin biyolojik metodlar ile yapılabilirse de, deneylerin oldukça uzun zaman alması, pahalı olması kullanılışlarını kısıtlamıştır.

F- B₆ VİTAMİNİNİNİN STABİLİTESİ

Konu çeşitli başlıklar altında incelenecektir Bunlar :

- a- B₆ vitamerlerin stabilitesi
- b- B- kompleks preparatlarında B₆ vitamininin stabilitesi
- c- Multivitamin preparatlarında B₆ vitamininin stabilitesi

a- B₆ Vitamerlerin Stabilitesi :

Piridoksal ve piridoksamın birçok mikroorganizma üzerinde, piridoksine nazaran daha aktiftir. Ancak ilerde üzerinde durulacağı gibi, bu iki maddenin de piridoksine nazaran çok dayanıksız bulunduğu ve insanlar üzerindeki aktiviteleri arasında, bariz fark görülmediği için, galenik preparat hazırlanmasında piridoksin ve çözünürlük bakımından da, tercihan hidroklorür tuzu kullanılır.

B₆ vitamerlerin stabilitesi üzerinde ışığın önemli etkisi olduğu ve parçalanma sonucu çözeltilerinin sarı renk aldığı, daha bu maddelerin sentezi gerçekleştirilip, yapıları aydınlatıl-

madan belirtilmiştir (György, 1935). Piridoksinin ışığa karşı hassas bulunduğu, bilhassa nötral ve alkali pH'larda. ışık tesirinin çok daha belirgin olduğu, Hochberg ve diğ. (1944 c) tarafından, ifade edilmiştir. Buna karşılık 0.1N hidroklorik asid ile hazırlanan preparatlarda, ışık tesiri ile parçalanmanın, çok az olduğu görülmüştür. Bu bulgular Carpenter ve Strong (1944) tarafından da doğrulanmıştır. Cunningham ve Snell (1945) piridoksin, piridoksal ve piridoksamin üzerinde, ışık etkisini incelemiştir. pH 9 ila 13 arasında ki çözeltilerinin, bir saat direkt güneş ışığı altında tutulması sonucu, her 3 maddenin de % 99' dan daha fazla oranda inaktive olduğunu; pH 3 ve 1' de ise inaktivasyonun piridoksin için % 39 ve % 30, piridoksamin için % 95 ve % 84, piridoksal için de % 93 ve % 27 oranında bulunduğunu belirtmişlerdir. Netice olarak da, bu 3 maddenin nötral ve kalevi çözeltilerde çok kısa sürede inaktive olduğu, buna karşılık piridoksin ve piridoksalin 0.1N asidlerde oldukça dayanıklı kaldığı, bu parçalanmalarda oksijenin etkisi görülmediği, açıklanmıştır.

Adler ve diğ., (1950) piridoksamin çözeltileri irradiye edildiği zaman, antibakteriyel aktivitenin önemli ölçüde arttığını, 293 nm' deki karakteristik absorbsiyon maksimasının kaybolduğunu, 220 nm' de yeni absorbsiyon maksimasının meydana geldiğini, aseton ile çöktürülebilen bu maddenin ısıya karşı daha dayanıklı bulunduğunu, kuvvetli kalevilerle muamele edilince amonyak açığa çıktığını göstermişlerdir. Piridoksinin absorbsiyon spektrumunda ise bu şekilde bir değişmeye raslanmamış, ancak antibakteriyel aktivitedeki artmanın, aynı reaksiyonun bu maddede de meydana geldiği intibağını uyandırdığı belirtilmiştir.

Morrison ve Long (1958) piridoksal -5- fosfat monohidratın 100 ml distile sudaki çözeltisinin, bir saat parlak yaz güneşi altında tutulduğu zaman, maddenin hemen hemen tamamen parçalandığını, 337 nm' deki karakteristik absorpsiyon maksimasının kaybolduğunu ve 288 nm' de yeni bir absorpsiyon maksiması meydana geldiğini belirttiler. Bu çözeltiyi Amberlete XE-97 iyon değiştirici reçineden geçirerek, piridil (5,5'-bis (dihidroksifosfoniloksimetil)-3,3'-dihidroksi-2,2'-dimetil-4,4'-piridil) ve az miktarda da 4-piridoksik asid -5- hidrojen fosfat teşekkül ettiğini, foto parçalanma esnasında vasattan devamlı oksijen geçirilince, karboksilik asidin tek mahsul olduğunu, gösterdiler. Daha sonra da, aynı değişime Yamada ve Tanaka (1965) işaret ettiler.

Shiroishi ve Hayakawa (1961) B₆ vitaminleri ve 4-piridoksik asidin pH 3.0, 7.0, ve 9.0' da sudaki çözeltisini güneş ışığı altında tutarak, stabilitelerini inceledi. Piridoksin ve piridoksamının asid vasatta oldukça dayanıklı olduğunu, buna karşılık piridoksalin pH'ya bağlı olmadan parçalandığını, bu parçalanmada oksijenin etken olduğunu ve bakır iyonlarının parçalanmayı katalize etmediğini belirttiler. Çözeltiden asetik asid ve azot ihtiva etmeyen, Fehling çözeltisini indirgeyen aseton ve fosfotungustik asid ilavesi ile çöken, kırmızı kahverengi bir madde tecrit ettiler.

Ikeda ve diğ., (1968) nötral piridoksin çözeltilerini, 2537 A° dalga boyunda ışık veren ultra viyole lambası altında, irradiye ederek, parçalanmayı kağıt kromatografisi ve iyon değiştirme kromatografisi ile incelediler. Aerobik şartlarda, piridoksin → piridoksal → 4- piridoksik asid (4- piridok-

sik asid lakton) \longrightarrow 4,5 -dipiridoksik asid ve piridoksin \longrightarrow isopiridoksal \longrightarrow 5- piridoksik asid (5- piridoksik asid lakton) \longrightarrow 4,5 dipiridoksik asid şeklinde; anaerobik şartlarda ise piridoksin dimere, parçalandığını; 4,5-dipiridoksik asidin de daha ileri kademelerde amonyak, asetik asid ve karbon dioksitde parçalandığını bildirdiler.

Ahrens ve Korytnyk (1969); Asahi, Terao, Fujita ve Muramatsu (1969); Reiber (1972) piridoksal ve fosfat türevlerinin fotoparalanmasında piridil ve 4-piridoksik asidin ana parçalanma ürünleri bulunduğunu, parçalanmada ara mahsüllerin kırmızı renkte bir radikal olduğunu, ince tabaka kromatografisi, iyon değişim kromatografisi ve maddelerin UV, ESR ve NMR spektrumlarından faydalanarak gösterdiler.

Masukawa, Furusaki, Ueda ve Okumura (1968) piridoksal ve homosistein türevinin stabilitesini mukayese ederek, piridoksal homosisteinin metanolde dayanıklı olduğunu, piridoksalin ise ışık tesiri ile parçalandığını gösterdiler. Ancak sulu ortamda ise, piridoksin homosisteinin hidroliz olarak, kısa sürede parçalandığına işaret ettiler.

Galatzeanu ve Ferenc (1966) B₆ vitaminleri üzerinde gama ışınlarının, Nakken (1966) ve Ladner (1966) X-ışınlarının etkisini incelemişlerdir.

Keresztesy ve Stevens (1938); Hochberg ve diğ. (1944 c); Carpenter ve diğ. (1944) B₆ vitamininin, nötral ve alkali çözeltilerde kısa sürede parçalandığına, buna karşılık 0.1N hidroklorik asid içinde parçalanmanın çok az olduğuna, deney azot atmosferi altında tekrarlandığı zaman benzer neticelerin elde edildiğine, bu neden ile parçalanmanın fotolitik oksidasyon neticesinde

olmadığına işaret ettiler. Cunningham ve diğ. (1945) B₆ vitaminlerinin parçalanması üzerine pH' nin etkisini göstermek gayesi ile piridoksin, piridoksal ve piridoksamın çözeltilerini (pH 1.0, 3.0, 6.8, 9.0, ve 13.0) üç saat laboratuvar ışığı ve 2 saatte direkt güneş ışığı altında tuttular. Piridoksamın bütün pH'larda % 85' den fazla oranda parçalandığını, piridoksinin pH 1.0 ve 3.0' de, piridoksalin ise pH 3.0' de dayanıklı bulunduğunu belirttiler. Shiroishi ve diğ. (1961) ise piridoksin ve piridoksamının asid vasatta oldukça dayanıklı olduğunu, piridoksalin parçalanmasında pH' nin etkisi bulunmadığını, oksijenin etkisi ile parçalandığını gösterdiler. Reiber (1972) piridoksalin ışığa bağlı parçalanmasının azot altında çalışarak önlenebileceğini, oksijen mevcudiyetinde foto parçalanma sonucu, 4-piridoksik asid teşekkül ettiğini belirtti.

Negoro, Miki, Ueda, Okada (1959) B₆ vitamininin asid pH' larda dahi inanıldığı kadar dayanıklı olmadığına, oksijen bulunan ortamda zamanla sarardığına, sararmanın en fazla pH 5.5' da, maddenin yapısının değişmesinden ileri geldiğine işaret ettiler. Bu bulgular Ahrens, Maass, Schuster ve Winkler (1969) tarafından da doğrulandı.

Nikolov ve Nedelewa (1966) B₆ vitamini için, optimum pH' nin 2.8-3.0 olduğunu ve bu pH'da stabilizan olarak sodyum bisülfid ihtiva eden ampullerin, aseptik şartlarda doldurulmasını sağlık verdiler.

Isının piridoksinin stabilitesi üzerindeki etkisi, ilk olarak 1941 senesinde gösterilmiştir (Harris, 1941). Piridoksinin nötral çözeltilerinde bulunan totomeri (Harris, 1940) ile, diğer bir molekülün aktif 4- hidroksimetil grubu, otoklav steri-

lizasyon şartlarında reaksiyona girerek, bir mol su açığa çıkar ve piridoksin dimer, ısının daha fazla yükseltilmesi sonucu ise, yüksek polimerler meydana gelir. Bu maddelerin yapısı aydınlatılması için, araştırmalar yapılmış (Hüttenrauch ve Zahn, 1966; Hüttenrauch ve Tümmler, 1967) piridoksin dimerin, bis- [2-metil -3- hidroksi -5- metilolpiridin- (4.4')] glikol olduğu gösterilmiştir. Ancak asid pH' larda bu maddenin teşekkülüne dair kayıt yoktur. Harris (1941) maddenin aktivitesinin, piridoksine nazaran 40 defa daha az olduğunu belirtmiştir. Carpenter ve diğ., (1944) piridoksinin 1 N sodyum hidroksiddeki çözeltisinin, 15 dakika 15 pound basınç altında otoklavda sterilizasyonu sonucu, piridoksine nazaran *Lactobacillus casei* suşlarının büyümesini, 2.5 misli artıran bir maddenin meydana geldiğini belirtmişlerdir. Ancak Hochberg, Melnich ve Oser (1944 c) piridoksinin 15 dakika 15 pound basınç altında 1 N hidroklorik asid veya 1 N sodyum hidroksid içindeki çözeltilerinin otoklav ile sterilize edilmesinin, piridoksinin aktivitesi üzerinde etkisi olmadığını belirtmiştir. Ikeda ve diğ. (1968) piridoksin dimerin anaerobik şartlarda saklanan preparatlarda meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Işıktan korunan piridoksin çözeltileri üzerinde, normal depolama hararetinin etkisi olmadığı bir çok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Wokes ve Norris, 1956; Harding, Plough ve Friedemann, 1959; Yamada ve diğ., 1965). Nikolow ve diğ. (1966) Piridoksin çözeltilerinin pH 2.8-3.0' de tamponlanmasını, stabilizan olarak sodyum bisülfid kullanılmasını ve doldurulmanın aseptik şartlarda yapılmasını sağlık vermiştir. Görner ve Oravcova (1970) 20, 30 ve 50°C' de süttozu hazırlanmasında vitamin B₆ kaybının yüzde 3.9-19.7 arasında değiştiğini ve kaybın piri-

doksinin, piridoksal sistemine dönüşmesi suretiyle olduğunu ileri sürmüştür. Feldheim (1971) B₆ vitamininin stabilitesi üzerine ısının etkisini inceliyerek, preparatların 100°C' de sterilize edilmesini, ancak bu şartlarda dahi bir miktar aktivite kaybı olacağını belirtmiştir. Franjo ve Olivera (1971) B₆ vitaminini 50-90°C arasında ki aktivite kaybını inceliyerek, bulgularını kinetik olarak değerlendirmişlerdir.

B₆ vitamini nitrik asid bulunan ortamda çok kısa sürede inaktive olur. Bu nitrik asidin oksidatif etkisindedir (Hochberg ve diğ., 1944 c; Cunningham ve diğ., 1945). Nitrik asidin oksidatif etkisine en hassas olarak piridoksamin ve en dayanıklı olarak da piridoksal bulunmuştur. Bu parçalanma sonucu meydana gelen maddeler, Gibbs reaktifi ile reaksiyona girmediği belirtilmiştir (Hochberg ve diğ., 1944 b).

Piridoksin kalevi ortamda, mangan dioksid etkisi ile parçalanmaz (Hochberg ve diğ., 1944 a; Cunningham ve diğ., 1945). Ancak asidik çözeltilerde oda temperaturünde dahi, kısa sürede parçalanır (Snell, 1944; Hochberg ve diğ., 1944 a; Cunningham ve diğ., 1945). Hidrojen peroksid ise B₆ vitamerleri daha yüksek ısılarda parçalar. Mesela 25°C de potasyum permanganat etkisi ile bir saatte % 99 oranında parçalanma görülür. Aynı şartlarda ve dört saatte hidrojen peroksit tesiri ile, ancak % 56 oranında kayıp olduğu belirtilmiştir.

Oksijenin etkisi incelendiği zaman, bu maddenin piridoksin ve piridoksaminin parçalanmaları üzerinde etkisi olmadığı, ancak piridoksalin parçalanmasını hızlandırdığı belirtilmiştir (Cunningham ve diğ., 1945). Oksijen bulunan ortamda ışık tesiri ile piridoksin hidroklorür % 49, piridoksamin % 91, ve piridoksal

% 76 oranında, oksijen bulunmayan ortamda ise piridoksin hidroklorür % 56, piridoksamın % 89, piridoksal % 55 oranında inaktive olduğu belirtilmiştir.

B₆ vitamininin fosfat türevlerinin asid ve alkali hidrolizi çeşitli şartlarda incelenmiştir (Peterson ve diğ., 1954). Bu üç vitamerden piridoksal fosfat hidrolize en hassas olarak bulunmasına rağmen, buzdolabında saklanan sudaki çözeltilerinde, 54 gün sonunda % 2 oranında inorganik fosfor tespit edilmiştir. N hidroklorik asid içinde bulunan çözeltilerde ise bu değerin, piridoksal fosfat için % 9 ve diğer vitamerler için de % 1 olduğu görülmüştür. Ancak N sodyum hidroksid içinde ise, hidrolize en mukavim madde olarak piridoksal fosfat bulunmuştur.

Nuns, Sundaram, Zoch ve Sneil (1963) B₆ vitamininin mikrobiyolojik parçalanmasını incelemişlerdir.

Hata ve diğ. (1966) ve Adams (1969) piridoksal ve fosfat türevinin sodyum bisülfid ile reaksiyona girerek 4-hidroksi sulfonik asid türevinin meydana geleceğini ve bu maddenin piridoksal ve piridoksal fosfata nazaran daha dayanıklı olduğunu belirtmişlerdir.

Nikolov ve diğ. (1966) vitamin B₆ ampullerin stabilitesi üzerine pH, temperatur ve stabilizanların etkisini inceliyerek, % 2.5 - 5.0 vitamin B₆ ihtiva eden ampullere, % 0.1 oranında sodyum bisülfidin stabilizan olarak ilavesini, pH' nin da 2.8 -3.0 arasında tutulmasını ve aseptik şartlarda çalışılmasını, sağlık verdiler. Stabilizan olarak incelenen rongalit vitamin B₆ ile sterilizasyon şartlarına göre çökme veya bulanıklık verdiğini belirttiler.

Fumito, Matsuura, Miyao ve Naito (1964) piridoksal fosfatın pH 7.0 . 0.1 M Sörensen tamponunda, 1-4 mol sodyum metabisülfid ihtiva eden çözeltilerin, 40°C' de 30 gün dayanıklı olduğunu; Mesami, Toshimitsu ve Isao (1968) 10 mg piridoksal -5- fosfatın 2 ml pH 7.0 0.1 M Sörensen tamponunda, 3.6 - 7.2 mg sodyum metabisülfid ihtiva eden çözeltisine 6.8 - 13.6 mg glukoz ilave edip, süzöldükten sonra renkli ampullere doldurulunca 50°C' de 10 gün saklama sonucu.piridoksal fosfatın % 25 oranında kayba uğradığını, sodyum metabisülfid bulunmayan ampullerde ise bu kaybın % 65 oranında olduğunu belirtmişlerdir. Aynı şartlarda hazırlanıp azot gazı geçirilen ampullerde ise kayıp % 5 oranında bulunmuştur. Tashiaku (1971) % 5 piridoksal fosfat ve % 0.25 valin ihtiva eden liyofilize ampullerin 50°C' de 7 gün tutulduğu zaman kaybın, % 3.8 olduğunu ifade etmiştir. Masukawa ve diğ. (1968) piridoksalın homosistein türevinin susuz ortamda dayanıklı olduğunu; Kamatsu, Abe ve Watanabe (1970) 1 g piridoksal fosfat, 0.7 g sodyum sülfid ve 0.25 g borik asidin 80 ml suda çözüldüğü, % 5 lik sodyum hidroksid çözeltisi ile pH 6.5' a ayarlanıp, 100 ml ye tamamlanan çözeltileri, renkli ampullere azot gazı altında doldurulması sonucu, 30°C' de 6 ay sonunda kayıp tespit edilmediğini belirtmiştir. Asahi ve diğ. (1969) piridoksal fosfatın borik asid bulunan ortamda ışık ve ısıya karşı dayanıklı olduğunu göstermiştir. Sadakichi(1971) piridoksal fosfatın sodyum sülfid, sodyum bisülfid veya diğeri sülfid veren maddeler bulunan ortamda hazırlanıp, odun kömüründen süzölen çözeltilerinin renksiz olduğunu belirtmiştir. Shiroishi ve diğ. (1961) piridoksin ampullerinin borik asid ile; Masukawa, Furusaki, Shigenaka ve Okumura (1969) homosistein veya homosis-

tein tiyol lakton ile; Toyao, Naaki ve Akira (1971) metiyonin ile stabilize edilebilineceğini belirtmişlerdir.

Said, Amer ve Girgis (1969) çeşitli antibiyotikler ihtiva eden, piridoksin hidroklorür kapsüllerin stabilitesini incelemişlerdir.

b- B-Kompleks Preparatlarında B₆ Vitamininin Stabilitesi:

B₆ vitaminlerin B-kompleks vitaminleri ile birlikte bulunduğu preparatların stabilitesi, geniş bir şekilde incelenmiştir.

Terp ve Trolle-Lassen (1952) tiyamin hidroklorür, riboflavin, piridoksin hidroklorür, niasinamid ve kalsiyum pentotonat ihtiva eden ampul ve şurupların stabilitesini pH 4.8' de incelemiş, piridoksin hidroklorürün ampullerde 1 saatte 100°C' de % 0.0 ve 120°C' de de % 5.0, sikloserin ve sodyum sülfat ihtiva eden şuruplarda ise 22°C' de 90 günde % 1, 147 günde % 4 kayba uğradığı tespit etmişlerdir.

Macek ve Feller (1955) 15 mcg vitamin B₁₂, 10 mg vitamin B₁, 0.5 mg vitamin B₂ ve 5 mg vitamin B₆ ihtiva eden çözeltilerin stabilitesini, oda temperaturünde incelemiş, en dayanıksız olarak vitamin B₁ ve vitamin B₁₂ bulunmuştur. B₆ vitamininin ise oldukça dayanıklı olduğu belirtilmiştir.

Prista, Morgado ve Guerra (1956) B kompleks preparatlarının hazırlanması için en uygun pH'nın 5.5 olduğunu ve preparatların 100°C' de 30 dakika sterilize edilmelerinin tavsiye etmişlerdir.

Sibi, Batcu ve Trandofar (1958) ışık bulunan ortamda vitamin B₂ ve vitamin B₆' nin ilk başta okside olarak formazona, bilahare hidrojenasyon sureti ile tetrazolyuma değiştiğini,

ancak vitamin B₁ bulunan ortamda, bu madde tiyokroma dönüşeceğinden reaksiyonun yürümeyeceğini, belirtmiştir.

Agrawal ve Rao (1961) vitamin B₁, vitamin B₂, vitamin B₆ ve niasin amid ihtiva eden şuruplarda, vitamin B₁'in parçalanmasının, vitamin B₆ bulunan ortamlarda en az olduğunu ileri sürmüştür. Zoni ve Lazzeretti (1967) suspansiyon tipi B- kompleks preparatlarına, suspansiyon ajanı olarak polivinilprolidon ilavesinin stabiliteyi artıracaklarını belirtmiştir.

Bojarski, Blitek ve Borkowski (1967); Beral, Murea, Russu ve İacob (1961) B- kompleks vitaminlerin renkli ampullere konulmasını ve fazla ısıdan kaçınılmasını belirtmiştir. Kassem, Rafael, El-Soud ve Montasser (1970) liyofilize halde hazırlanan B- kompleks preparatlarının, çözeltilerinden on defa daha dayanıklı olduğunu göstermiştir.

Galal, Ghoneim ve Gobba (1971) parentral B- kompleks çözeltileri üzerinde, % 1 benzil alkol, % 0.5 klorobutanol veya klorokrezolun koruyucu etkisi olmadığını göstermiştir.

Fujita, Aoki, Asahi ve Kawajiri (1972) piridoksal fosfatın, ışığa karşı dayanıklı olan hidrosikobalamin çözeltilerinde, maddenin fotoparalanmasına sebep olduğuna işaret etmiştir. Verna ve Chauhan (1973) vitamin B₁, vitamin B₆ ve hidrosikobalamin ihtiva eden dayanıklı bir preparat hazırlamıştır. Bunun için çeşitli stabilizanlar antioksidanlar, kelat teşkil edici ajanlar ilave edilmiş ve preparatın pH' sı 4.3 - 4.4'e ayarlanmıştır.

Stayle, Ouelle t. ve Harus (1962), Hussein, Kassem ve Darwish (1969), Kassem ve Darwish (1972) B- kompleks tabletlerinin, Barasanova, Azhgikhin, Umanskii (1973) B- kompleks supozituarlarının stabilitesini incelemiştir.

c- Multivitamin Preparatlarında B₆ Vitamininin
Stabilitesi :

Multivitamin preparatlarında bulunan diğer vitaminler ile, B₆ vitamininin direkt geçimsizliğine dair literatürde kayıt yoktur.

Ito, Inami ve Ohara (1954); Campbell ve McLeon (1955); Utsuni, Tanaka, Harada, Usuki ve Kuzu (1958); İosikova ve Krauchina (1959); Finzi ve Mattenzi (1963); Uprety, Basu ve Rao (1963); Martinez, Marzal (1967); Maekawa ve Egawa (1972) multivitamin çözelti ve ampullerinin stabilitesini inceliyerek, kullanılan vitaminler içinde vitamin B₁, vitamin A ve vitamin B₁₂ en dayanıksız olarak bulunmuştur. Vitamin B₂ ve vitamin B₆ ise oldukça dayanıklı görülmüştür. Finzi ve diğ. (1963)' de bu preparatların liyofilize halde hazırlanması suretiyle, en fazla aktivitenin elde edileceğini belirtmiştir.

Parikh ve Frederick (1958) yaptığı çalışmada, % 1 konsantrasyonda nordihidroguaretik asid veya % 0.05 oranında butilhidroksianisolur antioksidan olarak ve metil veya propil parabenin de prezervatif olarak kullanılmasının en iyi neticeyi vereceğini belirtmişlerdir. Ayrıca çalışmada, şuruptaki su miktarının, vehikül tipi ve konsantrasyonunun, pH'nın stabilite üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Prista, Morgado ve Guerra (1956) multivitamin preparatlarının stabilitesini kinetik olarak inceliyerek, dayanıklı olduğunu ileri sürdüğü iki formül geliştirmiştir. Karterbungskii, Konstantinouskaya ve Zamlyanoi (1965) ağız sıkı bir şekilde kapatılmış, renkli şişelerde saklanan, multivitamin preparatlarında fazla bir parçalanma olmayacağını belirtmiştir. Esh, Som, Bhattacharya ve Bhattacharya (1963) pH'nın multivitamin

preparatlarının stabilitesinde ki etkisini incelemişler, propil gallat ve sistein hidroklorür kullanılmasını tavsiye etmişlerdir. Gupta ve Laloren (1964)'de multivitamin şuruplarını stabilize edebilmek için, propil glikol-poliyeten glikol karışımı (1 : 3), antioksidan ve kelat yapabilen ajanların kullanılmasını sağlık vermiştir. Sabri ve Rao (1965) multivitamin şuruplarında, vehikül olarak % 75'lik gliserin şurubu, stabilizan olarak da propil gallat, metiyonin veya butilhidroksianisol ve kelat teşkil edici ajan olarak da etilendiamintetraasetik asid kullanılmasının, stabilite bakımından en uygun olacağını belirtmişlerdir. Lin (1972) multivitamin preparatlarındaki değişimleri inceliyerek, stabilizasyonuna çalışmıştır.

Hideyicki, Kinzaburo ve Teruo (1966); Cascioli ve diğ. (1971) U.S.P. XVIII' da kayıtlı dekavitamin preparatının ve multivitamin granülelerinin hazırlanışı ve stabilitelerini incelemişlerdir.

Multivitamin preparatlarının stabilizasyonu için çok sayıda patentli çalışma da vardır (Takahashi ve diğ., 1953; Wojenski, Jaskulski, Baryla, Florezuk ve Krowczyuski, 1962; Igoda, 1966; Hackbart ve Weiss, 1967; Cavill ve Magid, 1969; Reiser, Nook ve Eidebenz, 1970; Magid, 1972).

Hüttenrauch (1968); Lutomsky (1969); Ban, Rub-Saidac ve Ciocanelea (1972); Saxena (1972) vitamin preparatlarında stabilizeye etki eden faktörleri ve bunlara bağlı olarak meydana gelen kimyasal değişimleri kapsayan derlemeler yapmışlardır.

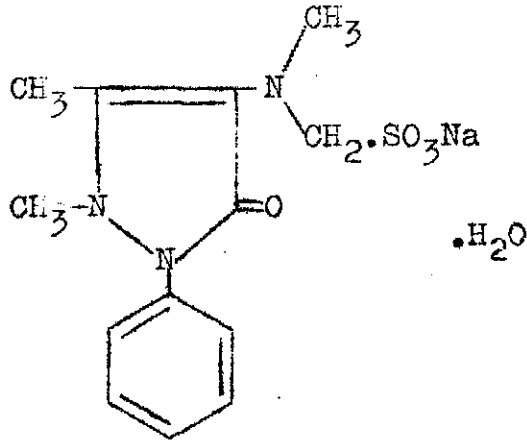
Olszewski, Krutel ve Tarantowicz (1973) vitamin preparatlarının mikrobiyolojik kontaminasyonunu ve stabilite üzerindeki etkisini incelemişlerdir.

Sina, Kasse, İbrahim ve Atilla (1973) polietilen kaplar içine konan vitamin preparatlarının stabilitesine, polietilenin etkisini incelemişlerdir. Çalışmada ayrıca polietilenin antimikrobial ajanlar üzerindeki tesiri de işlenmiştir.

G- SODYUM NOVAMİNSÜLFONATIN GENEL ÖZELLİKLERİ VE STABİLİTESİ:

a- Genel Özellikleri :

Sodyum novaminsülfonatın kimyasal yapısı, (2,3-dimetil-5-okso-1-fenil-3-pirazolin-4-il) metilaminosülfonik asid sodyum tuzu ($C_{13}H_{16}N_3O_4SNa$) olup, molekül ağırlığı 351.4'dür. Çeşitli kaynaklara göre farklı şekilde isimlendirilmekte ve değişik patent isimleri ile anılmaktadır : Novalgin, Metamizol, Sulpyrin, Analgin, Dipyron, Methanpyrone, metil melubrin, sodyum noramidopirin metansülfonat gibi.

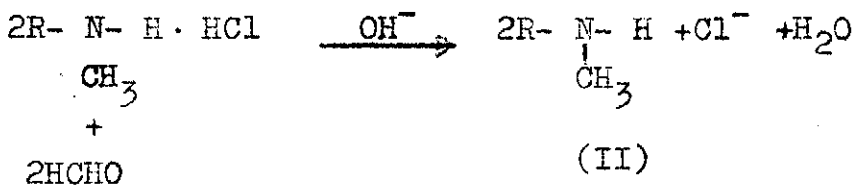
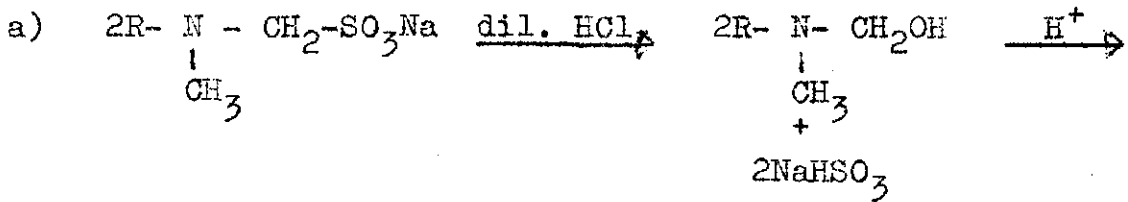
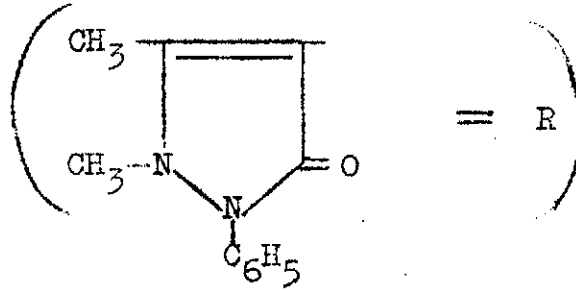


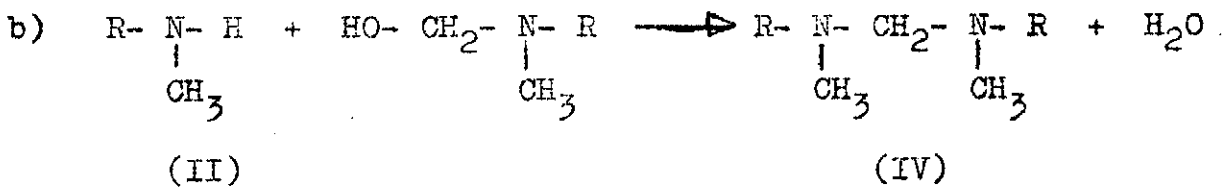
Sodyum novaminsülfonat 20 kadar değişik ofisinal isim altında Avusturya, Batı Alman, Doğu Alman, İsviçre, Japon, Macaristan, Norveç, Polonya, Romanya, Rus farmakopelerinde (Extra Pharm. Martindale, 1973) ve Türk Farmakopesi (1974)' de kayıtlıdır.

Beyaz veya sarı-beyaz, kokusuz kristal veya toz halinde bir maddedir. 1 k madde 1 k suda ve 30 k % 96'lık etil alkolde çözünür. Pratik olarak aseton, benzen, eter ve kloroformda çözünmez. Sulu çözeltileri turnusol kağıdına karşı nötral reaksiyondadır. Sudaki % 4.65'lik çözeltileri izotoniktir.

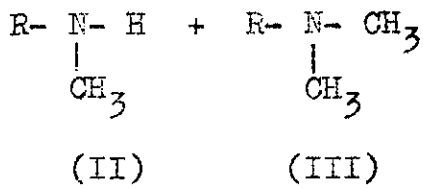
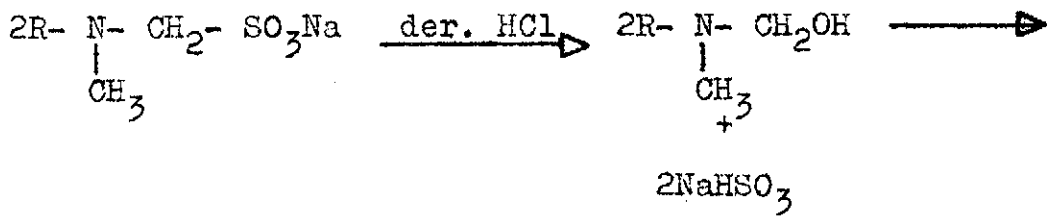
Sodyum novaminsülfonat analjezik tesirdedir ve ayrıca antienflamatuvar ve antipiretik etkileri de vardır. Per os bir defada 600 mg alınır. Günde 5 g'a kadar alınabilir. % 50 lik enjektabl çözeltileri 1, 2 ve 5 ml'lik ampuller halinde bulunur. 0.5 - 2.5 gram dozunda intramüsküler zerk edilir. 1 ml'lik enjektabl çözeltileri yavaş olarak intravenöz de verilebilir (Kayaalp, 1973).

Takahashi, Okada ve Hori (1956); Wagner (1956)'e göre sodyum novaminsülfonat (I) dilue asid ve alkalilerde 4-metilaminofenazon (II) ve 4.4'-(metilenbismetilamino) fenazona (IV) dönüşür. Derişik asidlerde ise 4-metilaminofenazon (II), 4-dimetil-

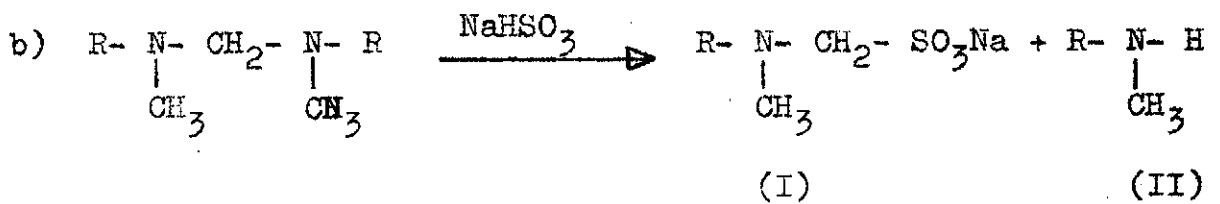
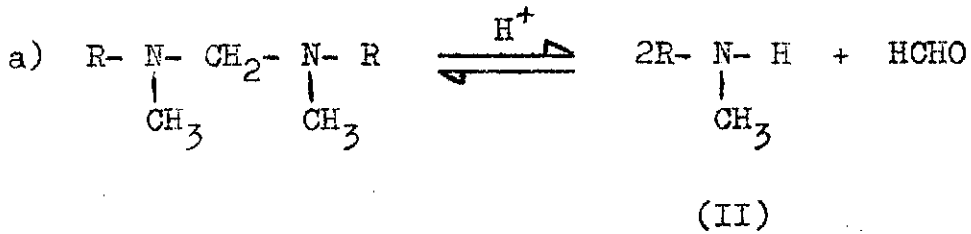




aminofenazon (III) ve 4.4'-(metilenbismetilamino) fenazon (IV) meydana gelir.

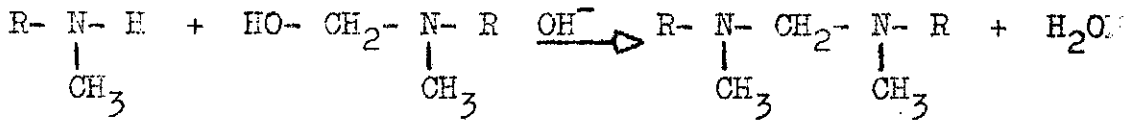
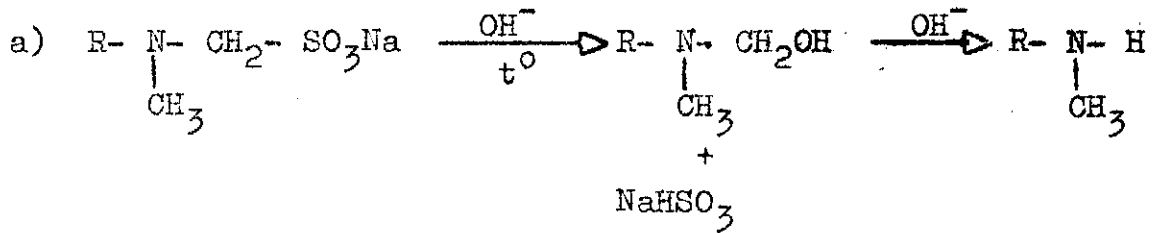


4.4'-(metilenbismetilamino) fenazon asitler, sodyum bisülfid, formik asid ile reaksiyonu aşağıda formüle edildiği şekilde ceryan eder.



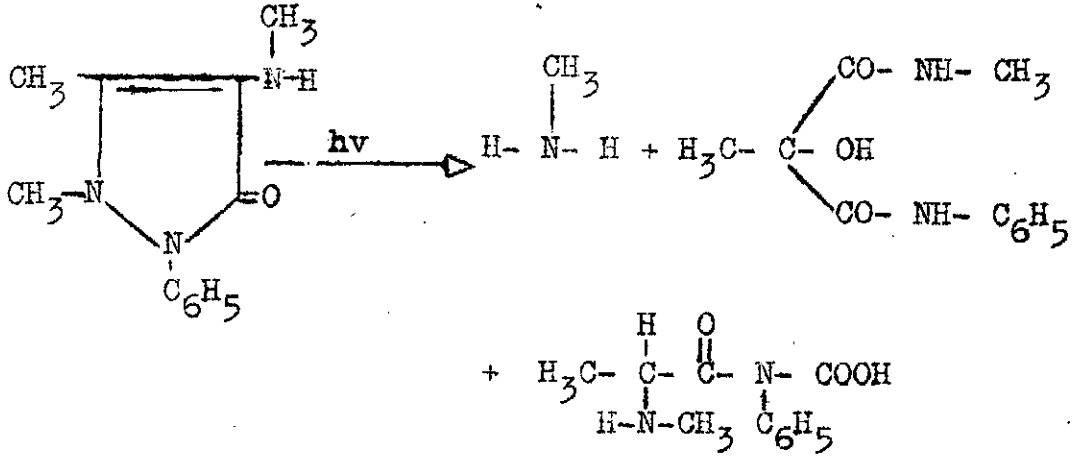


Morila (1966) sodyum novaminsülfonatin asidlerle muamelesi sonucu meydana gelen 4-metilaminofenazon ve 4.4'-(metilenbismetilamino) difenazon, ayrıca sodyum novaminsülfonatin N sodyum hidroksid ile sıcakta muamele edilmesi neticesinde de hazırlanabileceğini göstermiştir.



Pechtold (1964a); Ono, Onishi ve Kawamura (1966); sodyum novaminsülfonatin sulu çözeltilerinde hidroliz sonucu, 4-metilaminofenazon ve sodyum hidroksimetansülfonat meydana geldiğini, ancak normal şartlarda 4-aminofenazon, 4-formilaminofenazon, iminobisfenazon, 4.4'-(metilenbismetilamino) difenazon teşekkülüne rastlanmadığını belirtmiştir.

Reisch (1967) sodyum novaminsülfonat üzerine, ışığın etkisini göstermek için, cıva immersiyon ark lambası ile, 100 saat irradiasyona tabii tutmuştur. Reaksiyon mekanizması şematik olarak şu şekilde açıklanmıştır.

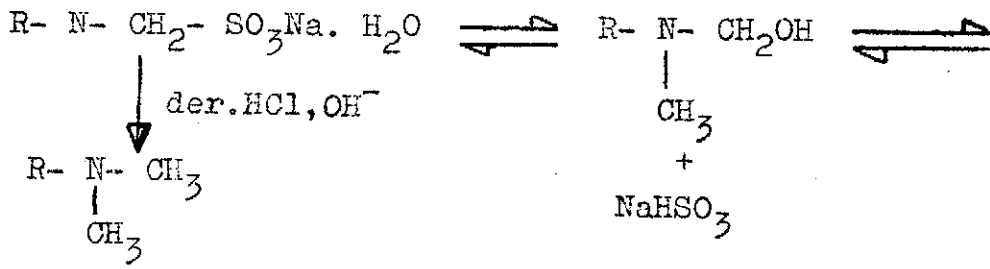


b) Stabilitesi :

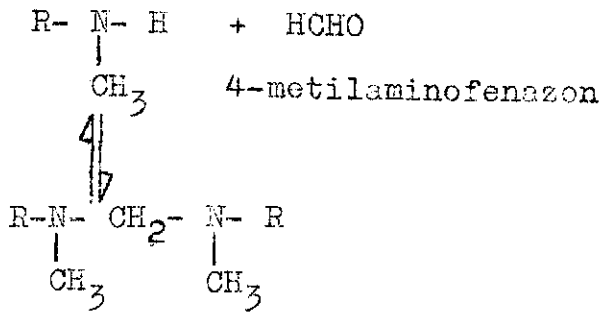
Sodyum novaminsülfonat çözeltilerinin stabilitesine etkileyen faktörler pH, oksijen, ısı, ışık, v.s. dir. Bu faktörler üzerinde, bugüne kadar yapılan önemli çalışmalar aşağıya çıkarılmıştır:

Sodyum novaminsülfonatin parçalanması esas olarak hidrolize dayanmaktadır. Végh, Szasz ve Kertesz (1961) sodyum novaminsülfonat çözeltilerinin hidrolizini ultra viyole absorpsiyon tayin metodu ile incelemiş, ancak netice alamamıştır. Çalışmada hidroliz derecesi, hidrolize uğramış bileşik miktarının, başlangıçta mevcut madde miktarına oranı olarak verilmiştir. Işıktan korunan çözeltiler 18 saat süre ile incelenmiş ve optimum pH 7.3- 9 olarak saptanmıştır. Pechtold (1964a) hidrolizi muhtelif pH ve değişik konsantrasyonlarda incelemiştir. pH 5.3' de bromkrezol purpur ile hidroliz mahsullerinin kantitatif ekstraksiyonu mümkün olmamıştır.

Samejima ve Sugimoto (1966 a) çözeltilerdeki bu parçalanmayı şu şekilde formüle etmişlerdir. Stabilite üzerinde pH' nin etkisini, sabit sıcaklıkta (30°C), pH 3-10.5 arasında incelemiştir, sodyum novaminsülfonatın birkaç saat dayanıklı kaldığını ve



4-metilaminofenazon



4,4'-(metilenbismetilamino) fenazon

bu nedenle parçalanma reaksiyonunun çift yönlü olduğunu ileri sürmüşlerdir. Çalışmada denge haline gelen çözeltilerde, maksimum sodyum novaminsülfonat bakiyesi pH 6-9' da elde edilmiş ve stabilitenin ilk madde konsantrasyonuna bağlı olduğu da belirtilmiştir. Nötral pH' larda ana parçalanma ürününün 4-metilaminofenazon olduğu ince tabaka kromatografisi ile gösterilmiştir.

Erbe (1966) enjektabl çözelti, supozituar, tablet gibi preparatlarda sodyum novaminsülfonatın stabilitesi üzerinde sit-

rik asid - etilendiamintetraasetik asid, butilhidroksianisol, butilhidroksitoluen v.b. antioksidanların etkilerini incelemiştir. Antioksidan bulunmayan çözeltilerde ışık altında 1 gecede, sitrik asid - etilendiamintetraasetik asid ihtiva eden preparatlarda ise 6 hafta sonunda sararma olduğu belirtilmiştir. Ayrıca çalışmada ışığın stabilite üzerindeki etkisi de incelenmiştir.

Dubash ve Moore (1972) sodyum novaminsülfonatın oksidatif parçalanmasını incelemişlerdir. Otooksidasyonun sulfid grubu taşıyan diğer maddelere benzer şekilde yürüdüğü, sudaki veya atmosfer oksijeninin oksidasyon için yeterli olduğu ileri sürülmüştür. Otooksidasyon bazik ortamda, asid ortama nazaran daha kolay olmakta ve bisülfid dissosiasyonuna bağlı olarak artmaktadır. Çalışmada iki tip % 3.5' luk çözelti hazırlanmıştır. 1. tipte, madde kaynatılarak gazlarından kurtarılmış su, 2. tipte ise azot gazı ile doyurulmuş su kullanılarak preparatlar hazırlanmış ve her iki tipte aynı şartlarda sterilize edilmiştir. 7 saat sonunda 1. tipte % 22.38, 2. tipte de % 5.36 kayıp tespit edilmiş, preparatların inert gaz ile doldurulması önerilmiştir.

Pellerin ve Letavernier (1973) sodyum novaminsülfonatın stabilitesini değişik şartlarda hazırladığı preparatlarda, gaz kromatografisi ile incelemiştir. Çalışmada sodyum novaminsülfonat kaybı, aminofenazon ve metilaminofenazon üzerinden belirtilmiştir. Oksijensiz su kullanılarak, optimum pH ve sterilizasyon şartlarının ayarlanması ile metilaminofenazon miktarının minimuma indirilebileceği ileri sürülmüştür.

Madde konsantrasyonunun stabilite üzerindeki etkisi, ilk olarak Pechtold (1964b) tarafından incelenmiştir. pH 7.3' e ayarlanmış çözeltilerde ki hidroliz derecesi 18 saat sonunda araştı-

rılarak, hidroliz için optimum konsantrasyonunun % 50 olduğu belirtilmiştir. Petrova ve Yankova (1969) % 20 konsantrasyonda sodyum novaminsülfonat çözeltilerini inceleyerek, Pechtold (1964b)'un bulgularını desteklemişlerdir. Çalışmada ampuller kloroform ile ekstre edilmiş ve kloroform fazında, ince tabaka kromatografisi ile 3 leke tespit edilmiştir. Lekelerden sarı olanı, rubazon asidinde ki renk teşekkülüne benzetilmiş ve rubazon asidi teşekkülü için muhtemel reaksiyon mekanizması izah edilmiştir. Ayrıca rengin değişmesine sebep olduğu sanılan, kuvvetli polar bazı bileşiklerin mevcudiyeti üzerinde de durulmuş, ancak bunların ekstre edilmesi gerçekleştirilememiştir.

Coste ve Chanal (1969) sodyum novaminsülfonatin sulu çözeltilerinde meydana gelen parçalanma üzerine temperatur ve pH'nın etkisini incelemiş, değişik ısı ve pH' da denge sabitelerini saptamıştır. Denge sabitelerinin tayini için C^{14} ile işaretlenmiş, sodyum novaminsülfonatin % 1 lik çözeltileri muhtelif pH' lara ayarlanmış, ampullere doldurulup ağzı kapatıldıktan sonra, 25- 75°C ler arasında, farklı ısılarda tutulmuştur. Elektroferez ile yapılan tayinlerden elde edilen sonuçlara göre C^{14} ile işaretli sodyum novaminsülfonatin asid pH' larda dayanıksız, pH 7-8 arasında ise dayanıklı olduğu belirtilmiştir.

Sodyum novaminsülfonat ve tiyamin kombinasyonlarının stabilitesi İnazu ve Yamamoto (1966a) tarafından incelenmiştir. Tiyaminin stabilizasyonu için urotropin gibi formaldehid veren maddeler veya formaldehid kullanılmasına tavsiye etmişlerdir. Araştırmacılar 1966 senesinde yaptıkları ikinci bir çalışmada da sodyum novaminsülfonatin parçalanma ürünlerinin, tiyamin stabilitesinde ki etkisini incelemişlerdir (İnazu ve Yamamoto, 1966b).

Parçalanmış maddelerin bazik kısmı ile tiyaminin yer değiştirdiğini, reaksiyon hızının bisulfit konsantrasyonuna bağlı olduğunu ve reaksiyon hızının pH 3-7 arasında maksimum olduğunu belirtmişlerdir. Aynı sene diğer bir grup araştırmacı da, ortama tiyaminin parçalanma ürünlerini ilave ederek, tiyaminin stabilitesini incelemiştir. Sodyum novaminsülfonatın parçalanması sonucu meydana gelen bisülfitin, tiyaminin parçalanmasını katalize ettiği bildirilmiştir (Samejima, Sugimoto ve Utsumi, 1966 b).

İzgü (1967) sodyum novamin sülfonatın, siyanokobalaminin stabilitesi üzerindeki etkisi incelenmiş ve sodyum novaminsülfonat konsantrasyonunun artmasının siyanokobalamin stabilitesi üzerinde etkisi olmadığı neticesine varılmıştır.

H - ÇALIŞMANIN AMACI

Piyasada bulunan ve tıbbi kullanımı olan piridoksin hidroklorür enjektabl çözeltilerinin stabilitelerinin incelenmesi amacı ile bugüne kadar yapılmış çok az sayıda araştırma, konuyu bütünü ile açıklayamaması ve bulgular arasında büyük farklar olması nedeni ile piridoksin hidroklorürün tek başına ampullerde stabilitesinin araştırılması çalışmanın ana amacıdır. Ayrıca sodyum novaminsülfonat ve piridoksin hidroklorür arasında etkileşim olup olmadığının incelenmesi, çalışmanın diğer bir gayesidir.

II-MATERYELLER ve METODLAR

A- MATERYELLER

a- Solvanlar

Amonyak (E.Merck,%25,d=0.91)
Asetik anhidrid (E.Merck)
Asetik asid (E.Merck)
Aseton (E.Merck)
Benzen (E.Merck)
Dietilamin (Carlo Erba)
Dimetilformamid (Riedel)
Dioksan (Riedel)
Distile su
Etanol absolu (Tekel)
Eter (E.Merck)
Etil asetat (E.Merck)
Hidroklorik asid (E.Merck)
Isopropanol (E.Merck)
Kloroform (Hoechst)
Metanol (E.Merck)
Metanol (Pür Kinya)
Metiletiketone (Riedel)
Petrol eter 40-50° (E.Merck)

Petrol eter 50-70° (E.Merck)

Sülfürük asid (E.Merck)

Toluen (E.Merck)

b-Kimyasal Maddeler

Aluminyum oksid H (E.Merck)

Aluminyum oksid GF 254 (E.Merck)

Bismut III nitrat (E.Merck)

Borik asid (E.Merck)

Bromkrezol yeşili (E.Merck)

Demir III klorür (Riedel)

Desoksipiridoksin hidroklorür (Sandoz)

2,6-Diklorokinon-klorimid, pro analiz (E.Merck)

Dimetilamino antipirin (Hoechst)

4-Dimetilaminobenzaldehid (Riedel)

Disodyum edetat (E.Merck)

Gümüş nitrat (Taras)

Hidroksilamin hidroklorür (E.Merck)

İsopiridoksal dimetilasetal (Sattsangi, P.D.'den alındı)

İyon değiştirici reçine No:I (E.Merck)

İyon değiştirici reçine No:III (E.Merck)

İyot (E.Merck)

Kongo kırmızısı (Riedel)

Krom III oksid (E.Merck)

Mangan dioksid (Riedel)

p-Nitroanilin (E.Merck)

Piridoksal hidroklorür (Fluka)

- Piridoksin hidroklorür (E.Merck)
Potasyum asetat (Riedel)
Potasyum bromür (Riedel)
Potasyum dikromat (E.Merck)
Potasyum heksasiyanoferrat III (E.Merck)
Potasyum iyodür (Etablissements Roques)
Potasyum klorür (E.Merck)
Potasyum permanganat (E.Merck)
Selüloz mikrokristalin (Camag)
Silikagel GF₂₅₄ (E.Merck)
Silikagel HF₂₅₄ (E.Merck)
Sodyum asetat (E.Merck)
Sodyum barbital (Aarhus)
Sodyum bikromat (Riedel)
Sodyum formaldehidsülfoksilat (E.Merck)
Sodyum hidroksid (E.Merck)
Sodyum klorür (Panreac)
Sodyum metabisülfid (E.Merck)
Sodyum nitrit (Riedel)
Sodyum novaminsülfonat (Hoechst)
Tiyüre (E.Merck)
o-Toluidin (E.Merck)
- c- Aletler ve malzemeler
- Developman tankı (Camag 25250)
Enjektör (Hamilton 7005)
Etüv sirkilasyonlu (Elektromat)

Erime derecesi tayin cihazı (Ernest Leitz Platin.)
Gaz dağıtım aygıtı (Schott D 1)
IR spektrofotometre (Unicam ST 1110)
Mekanik karıştırıcı (Yerli)
NMR (Varian S-60)
Otoklav (Yerli)
pH metre (Beckman-72)
Polarograf (Heath Build, Mod.:EUA-19-6)
Rotavapor (Buchi-R)
Santrifüj (Hettich Eba III)
Spektrofotometre (Bausch-Lomb, Spectronic 88)
Spektrofotometre (Beckman DB-GT)
Terazi (Mettler H20)
Ultra-Viole lambası (Camag 29200)
Yayıcı kromatografi için (Shandon-Unoplan)
Yazıcı kromatografi için (Shandon)

B- METODLAR

a- PİRİDOKSİN HİDROKLORÜR VE PİRİDOKSİN HİDROKLORÜR- SODYUM NOVAMİNSÜLFONAT ÇÖZELTİLERİNİN HAZIRLANMASI

Gaye piridoksin hidroklorür ve piridoksin hidroklorür-sodyum novaminsülfonat kombine ampullerde piridoksin hidroklorürün stabilitesi ve piridoksin hidroklorür ile sodyum novaminsülfonatin etkileşmesinin incelenmesi olduğundan, aynı şartlarda bir seri piridoksin hidroklorür ampul, bir seri de piridoksin hidroklorür-sodyum novaminsülfonat kombine ampul hazırlandı. Bu ampuller karşılaştırılarak, piridoksin hidroklorürün stabilitesi ve etkileşme incelendi.

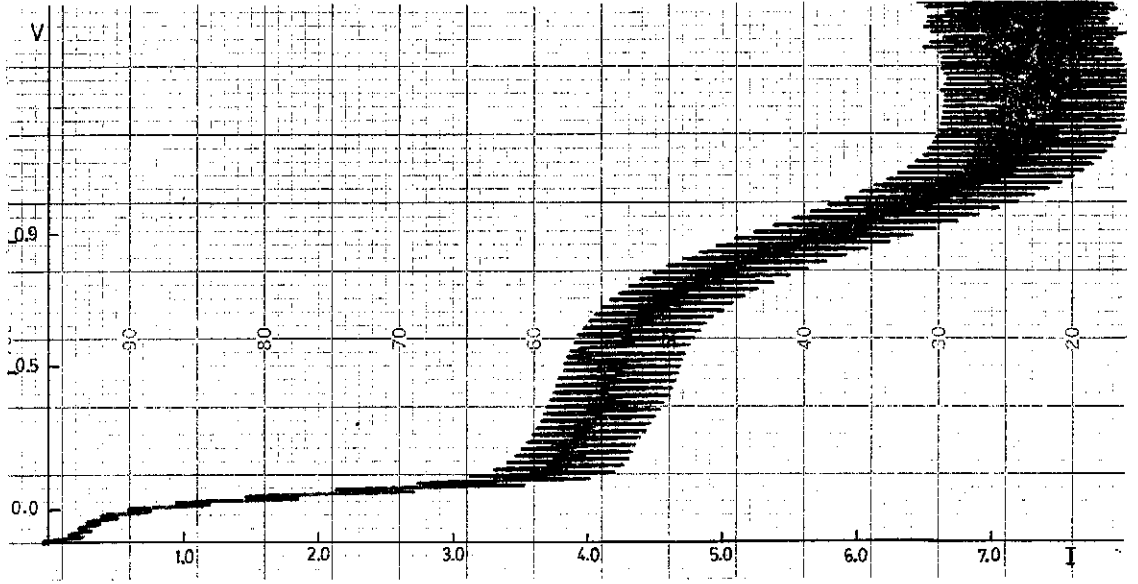
Piyasada bulunan ampuller de göz önünde tutularak 25 mg/ml, 50 mg/ml ve 100 mg/ml konsantrasyonlarda piridoksin hidroklorür içeren ampuller hazırlandı. Kombine ampullerde ise, sodyum novaminsülfonat konsantrasyonu sabit tutuldu (500 mg/ml). Ancak bu konsantrasyonda sodyum novaminsülfonat varlığında, 100 mg/ml konsantrasyonda piridoksin hidroklorürün çözülmesi mümkün olmadı. Bu nedenle kombine ampullerde, piridoksin hidroklorür 25 mg/ml ve 50 mg/ml konsantrasyonlarda alınarak, preparatlar hazırlandı. Koruyucu ihtiva eden ampullerde ise, değişimleri daha kolaylıkla izleyebilmek için, piridoksin hidroklorür 50 mg/ml konsantrasyonda kullanılmıştır. Koruyucu olarak tiyoure, disodyum edetat, sodyum formaldehidsülfoksilat denenmiştir. Literatürde vitamin B₆'nın parçalanmasına mani olabilmek için sodyum bisulfit (Mesami ve diğ., 1968; Nikolov ve diğ., 1966; Komatsu ve diğ., 1970; Sadakichi, 1971) ve diğer sülfid veren maddeler (Sadakichi, 1971), homosistein ve homosistein tiyolaktan

(Shiroishi ve diğ., 1961), valin (Tashiaku, 1971), borik asid (Asahi ve diğ., 1969; Komatsu ve diğ., 1970) ve metiyonin (Toyao ve diğ., 1971) gibi koruyucular denendiği için, çalışmada bu maddeler üzerinde daha fazla durulmadı.

Ampullerin hazırlanmasında, mukayese yapabilmek için, stabilite üzerinde etkin faktörlerden bir kısmı her preparat için sabit tutuldu (atmosferik oksijen, ışık, sterilizasyon ısı-sı vb.), diğerleri değiştirilerek seriler hazırlandı.

Serilerin hazırlanmasında, çözücü olarak (A)- 30 dakika kaynatılıp soğutulduktan sonra, azot gazı ile doyurularak moleküler oksijeni minimuma indirilmiş damıtık su, ve (B)- 30 dakika kaynatılıp soğutulmuş damıtık su kullanıldı.

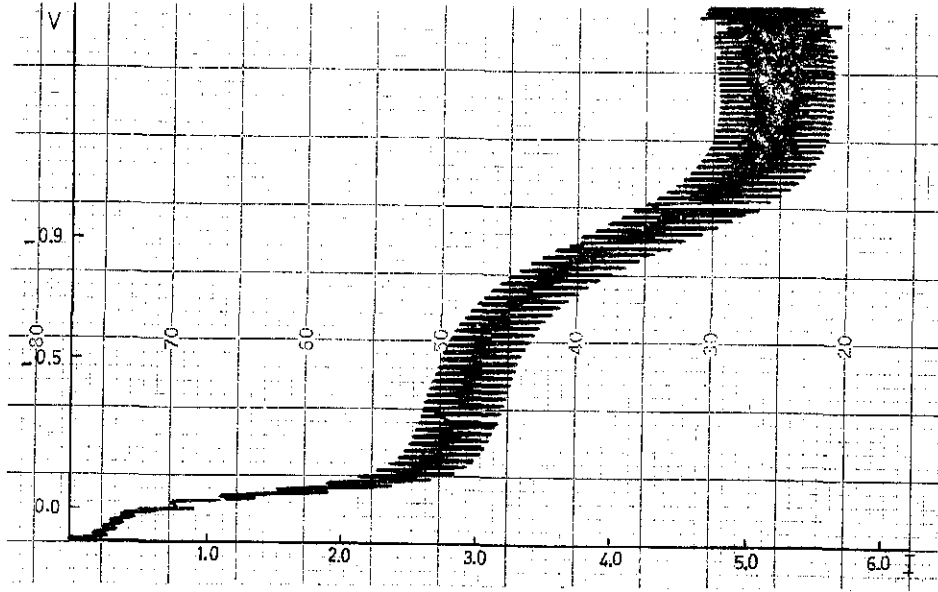
Suyun moleküler oksijeninin minimuma indiği polarografik yöntemle saptandı. Bunun için önce taze distillenmiş su ile 0.1M potasyum klorür çözeltisi hazırlandı ve polarogramı alındı (Polarogram I). 25°C'de su, 10^{-3} mol/ml çözünmüş oksijen içerdiğine göre, polarogram I'in, bu konsantrasyonda oksijen varlığını gösterdiği kabul edildi ve diğer polarogramların değerlendirilmesinde esas olarak alındı. Taze damıtılmış su, nötral camdan yapılmış balon içinde, mümkün olduğu kadar hava ile temasa gelmesine mani olunarak, 30 dakika kaynatılıp soğutuldu. Bu suyun da aynı şekilde polarogramı alındı (Polarogram II). Bu sudaki oksijen miktarı, birinci polarogram yardımı ile 18×10^{-6} mg/lt olarak hesaplandı. Daha sonra bu kaynatılıp soğutulmuş su ile 1 lt 0.1 M potasyum klorür çözeltisi hazırlandı. Gaz dağıtım aygıtı kullanarak eşdeğer basınç altında azot gazı geçirildi. 15'er



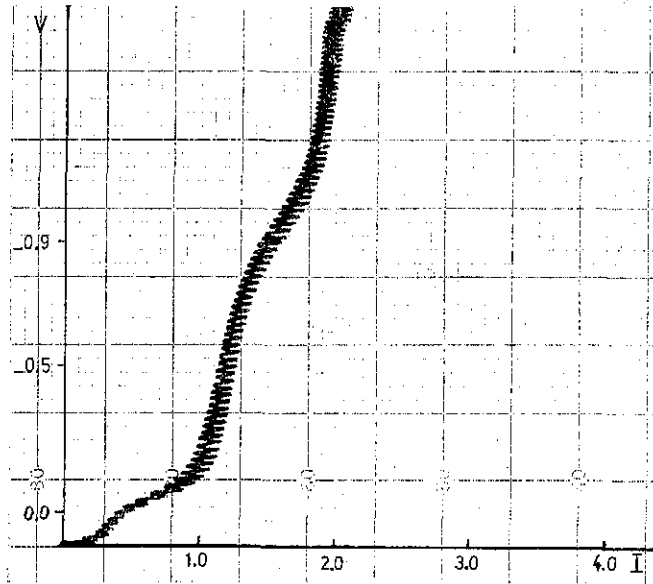
Polarogram I - Taze damıtılmış su ile hazırlanan, 0.1 M potasyum klorür çözeltisinin ihtiva ettiği oksijenin polarogramı

1 dakika ara ile polarogramları alındı. Bu polarogramlarda suyun içerdiği oksijenin, 2 saat süre ile azot geçirilmede minimuma indiği (Polarogram III) ve bundan sonra değişmediği görüldü.

Moleküler oksijeni minimuma indirilmiş su hazırlamak için, 1 lt taze damıtılmış distile su, yukarıda belirtildiği gibi 30 dakika kaynatılıp soğutuldu. Gaz dağıtım aygıtı ile içinden eşdeğer basınç altında, iki saat süreyle azot gazı geçirildi. Ağız sıkıca kapatıldı ve vakit geçirilmeden kullanıldı.



Polarogram II- Taze distillendikten sonra 30 dakika kaynatılıp soğutulmuş suyun polarogramı.



Polarogram III- Taze distillenmiş, 30 dakika kaynatılıp soğutulduktan sonra 2 saat azot geçirilmiş suyun polarogramı.

Daha önce de açıklandığı gibi, ampullerin hazırlanmasında stabilite üzerinde etkin faktörlerden bir kısmı sabit olarak değiştirildi, bir kısmı da değişken tutuldu. Bu faktörleri şu şekilde sınıflandırabiliriz :

DEĞİŞKEN FAKTÖRLER

A- Kaynatılıp soğutulduktan sonra, azot gazı ile doyurularak, moleküler oksijeni minimuma indirilmiş distile su kullanılarak hazırlananlar:

1- Piridoksin hidroklorür	2.5 g
Dist. su k.m.	100.0 ml
2- Piridoksin hidroklorür	5.0 g
Dist. su k.m.	100.0 ml
3- Piridoksin hidroklorür	10.0 g
Dist. su k.m.	100.0 ml
4- Piridoksin hidroklorür	2.5 g
Sodyum novaminsülfonat	50.0 g
Dist. su k.m.	100.0 ml
5- Piridoksin hidroklorür	5.0 g
Sodyum novaminsülfonat	50.0 g
Dist. su k.m.	100.0 ml
6- Piridoksin hidroklorür	5.0 g
Tiyüre	0.005 g
Dist. su k.m.	100.0 ml

7 - Piridoksin hidroklorür	5.0 g
Sodyum novaminsülfonat	50.0 g
Tiyüere	0.005 g
Dist. su k.m.	100.0 ml

8 - Piridoksin hidroklorür	5.0 g
Disodyum edetat	0.075 g
Dist. su k.m.	100.0 ml

9 - Piridoksin hidroklorür	5.0 g
Sodyum novaminsülfonat	50.0 g
Disodyum edetat	0.075 g
Dist. su k.m.	100.0 ml

10- Piridoksin hidroklorür	5.0 g
Sodyum formaldehidsülfoksilat	0.15 g
Dist. su k.m.	100.0 ml

11- Piridoksin hidroklorür	5.0 g
Sodyum novaminsülfonat	50.0 g
Sodyum formaldehidsülfoksilat	0.15 g
Dist. su k.m.	100.0 ml

B- Kaynatılıp soğutulmuş su kullanılarak hazırlananlar :

1- Piridoksin hidroklorür	5.0 g
Dist. su k.m.	100.0 ml

2- Piridoksin hidroklorür	5.0 g
Sodyum novaminsülfonat	50.0 g
Dist. su k.m.	100.0 ml

SABİT FAKTÖRLER

Çözeltilerin hazırlanması için gerekli madde, yukarıda anlatıldığı şekilde, kaynatılıp soğutulmuş distile su veya kaynatılıp soğutulduktan sonra, azot gazı ile doyurularak moleküller oksijeni minimuma indirilmiş distile suda çözüldü ve aynı su ile 100 ml'ye tamamlandı. Bu çözeltiler distile su ile yıkanıp 170°C'de 1 saat sterilize edilmiş, renkli ve renksiz ampullere, enjektör ile 1.1 ml dolduruldu. Renkli ve renksiz ampullerin yarısından azot gazı geçirildi, diğer yarısı ise olduğu gibi tutuldu ve bütün ampullerin ağzı kapatıldı. Bu şekilde hazırlanan her tip ampulün yarısı 100°C'de 30 dakika su banyosunda ve diğer yarısı da 120°C'de 20 dakika otoklavda sterilize edildi. Ampullerin hazırlanmasında sabit değişken faktörler: tablo 2'de şematize edilmiştir.

Tablo 2 - Ampullerin hazırlanmasında sabit değişkenler.

Ampul Cinsi	R E N K L İ				R E N K S İ Z			
	AZOTLU		AZOTSUZ		AZOTLU		AZOTSUZ	
Doldurma şartı								
Sterilizasyon (°C)	120 a	100 b	120 c	100 d	120 e	100 f	120 g	100 h

Hazırlanan ampuller aynı miktar ışık alacak şekilde laboratuvar şartlarında tutuldu. Her tip ampulün hazırlandıktan sonra ve belli zaman aralıklarında fiziksel özellikleri kontrol edildi. Bu kontrollerden bulgular kısmında bahsedilecektir.

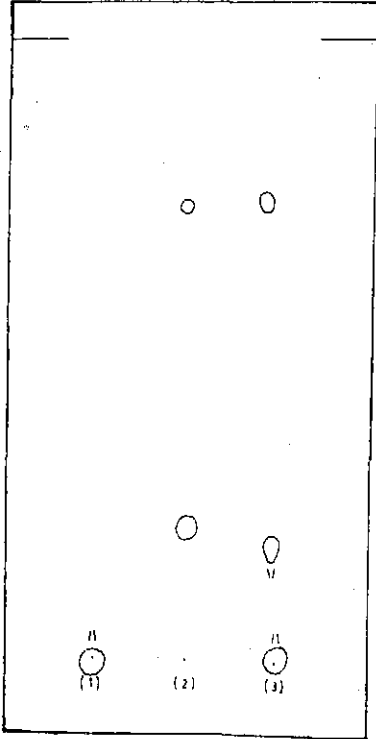
b- PİRİDOKSİN HİDROKLORÜR VE SODYUM NOVAMİNSÜLFONATIN
TEŞHİS METODLARININ SEÇİMİ

1- Kromatografi Sisteminin Seçimi

Piridoksin hidroklorür, sodyum novaminsülfonat ve bunların parçalanma ürünlerinin teşhisini yapabilmek amacı ile, ince tabaka kromatografisi, kağıt kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi denendi. Kağıt kromatografisi ile teşhis, uzun zaman aldığı ve bu süre içinde stabilite üzerinde etkin faktörlerin kontrolü zorluk çıkardığı için; iyon değişim kromatografisi ile de, piridoksin hidroklorürün bazı parçalanma ürünlerinin teşhisi yapılabilmesine rağmen, piridoksin hidroklorür ve sodyum novaminsülfonatın ayrılması denenen iyon değiştirici reçinelerde sağlanamadığı için çalışmada üzerinde durulmadı. Bütün teşhis ve tayinlerde ince tabaka kromatografisinden istifade edildi.

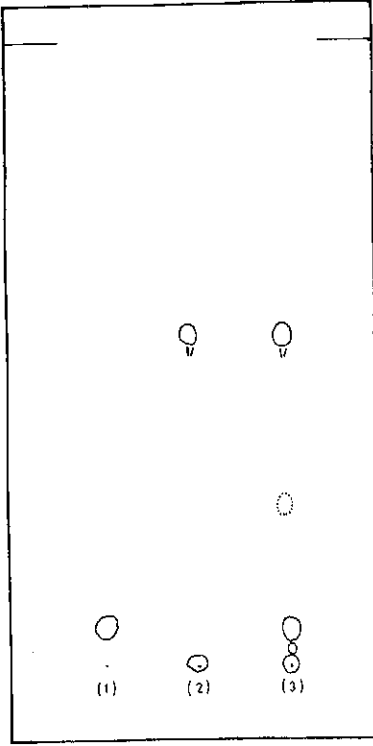
İnce tabaka kromatografisinde kullanılacak, uygun adsorbantı saptayabilmek için silikagel GF₂₅₄, silikagel HF₂₅₄, tamponlanmış silikagel GF₂₅₄, mikrokristalin selüloz ve çeşitli alüminyum oksid adsorbanlar denendi. Bu adsorbanların bir kısmında piridoksin hidroklorür, sodyum novaminsülfonat ve bunların parçalanma ürünlerinin ayırımı arzu edildiği şekilde gerçekleştirilemedi. Bazılarında bu maddelerin ayırımı sağlandı ise de, miktar tayini için gerekli numune tatbikinde, sodyum novaminsülfonat çok yüksek konsantrasyonda bulunduğundan, netice alınamadı. Denenen adsorbanların bir kısmı için, birer örnek aşağıda verilmiştir (Kromatogram 1, 2, 3). Bütün kromatogramlarda numune tatbikinde ~~piridoksin hidroklorür, sodyum novaminsülfon-~~

at ve kombine ampul sırası takip edildi. Bu maddelerden sodyum novaminsülfonat metanolde, diğerleri suda çözülerek, çözeltiler hazırlandı. Teşhis üzerinde konsantrasyonun etkisini ortadan kaldırmak için, piridoksin hidroklorürün miktar tayininde kullanılan konsantrasyon (12.5 mcg), referans olarak seçildi ve 0.5 ml tatbikte, 12.5 mcg madde olacak şekilde çözeltiler hazırlandı.



Adsorban : Alüminyum oksid H bazik
Solvan sistemi : Metanol
Süre : 20 dakika
Reaktif : U.V. ve 2,6_diklorokinon-
klorimid

Kromatogram 1 : Yukarda belirtilen şartlarda çalışarak piridoksin hidroklorür, sodyum novaminsülfonat ve kombinasyonunun ince tabaka kromatografisinde incelenmesi.



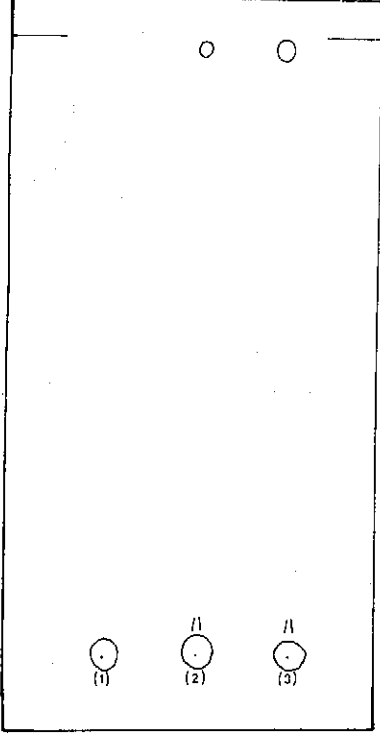
Adsorban : 0.1 N sodyum hidroksid
ile tamponlanmış sili-
kagel GF₂₅₄

Solvan sistemi : Etil asetat-aseton
amonyak-dimetilfor-
manid (80:40:6:7)

Süre : 30 dakika

Reaktif : U.V. ve 2,6 -diklorokinon-
klorimid

Kromatogram 2 : Yukarda belirtilen şartlarda çalışarak
piridoksin hidroklorür, sodyum novamin-
sülfonat ve kombinasyonunun ince tabaka
kromatografisinde incelenmesi.



Adsorban : Selüloz (mikrokristalin)
Solvan : Kloroform-eter (8:2)
Süre : 10 dakika
Reaktif : U.V. ve 2,6- diklorokinon-
klorimid

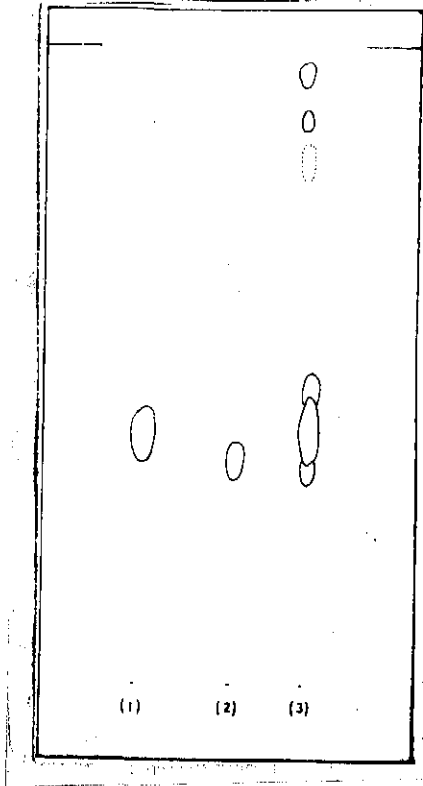
Kromatogram 3 : Yukarıda belirtilen şartlarda çalışarak piridoksin hidroklorür, sodyum novaminsülfonat ve kombinasyonunun ince tabaka kromatografisinde incelenmesi.

Piridoksin hidroklorürün miktar tayininde kullanılan konsantrasyonda (12.5 mcg), numune tatbikinde en iyi sonuç, silikagel HF₂₅₄ ve silikagel GF₂₅₄ adsorbanlarında sağlandı.

Hazırlanan bileşik ampullerde sodyum novaminsülfonat 0.5 g/ml konsantrasyonda bulunduğu için, tabaka kalınlığı da ayırırında etkin bir faktör olarak görüldü. Bu nedenle 0.20,

0.25 ve 0.30 mm kalınlığında tabakalar denendi. En iyi netice 0.30 mm kalınlığında tabakalarda alındı.

Silikagel HF₂₅₄ ve silikagel GF₂₅₄ tabakalarında en uygun solvan sistemini tespit edebilmek amacı ile literatürde piridoksin hidroklorür ve sodyum novaminsülfonat teşhisleri için kayıtlı sistemler denendi. Bunların büyük bir kısmında piridoksin hidroklorür ve sodyum novaminsülfonatin ayırım ve teşhisi mümkün olmadı. Örnek kromatogram 4 (Dement'eva ve diğ., 1968).



Adsorban : Silikagel HF₂₅₄

Solvan sistemi : Etil asetat -

aseton - amonyak

(40:20:45)

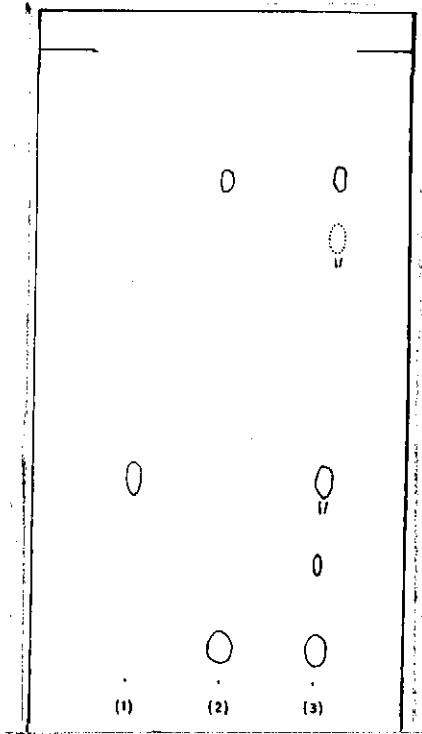
Süre : 60 dakika

Reaktif : U.V. ve 2,6-diklorokinon-

klorimid

Kromatogram 4 : Yukarıda belirtilen şartlarda çalışarak piridoksin hidroklorür, sodyum novaminsülfonat ve kombinasyonunun ince tabaka kromatografisinde incelenmesi (Dement'eva ve diğ., 1968).

mahsüllerinin birbirinden veya bu iki maddeden ayırımı gerçekleştirilemedi. Örnek kromatogram 6 (Nurnberg, 1960; Hüttenrauch, 1966).



Adsorban : Silikagel HF₂₅₄

Solvan : aseton - dioksan - amonyak (45:45:10)

Süre : 105 dakika

Reaktif : U.V. ve 2,6-diklorokinonklorimid

Kromatogram 6 : Yukarda belirtilen şartlarda çalışarak piridoksin hidroklorür sodyum novaminsülfonat ve kombinasyonunun ince tabaka kromatografisinde incelenmesi (Nurnberg, 1960; Hüttenrauch, 1966).

Literatürde kayıtlı solvan sistemleri ile uygun netice alınamadığı için, solvan sistemi araştırması yapıldı. Silikagel HF₂₅₄, silikagel GF₂₅₄, alüminyum oksid H, alüminyum oksid GF₂₅₄, mikrokristalin sellüloz, 0.1 N sodyum hidroksid ile tamponlanmış silikagel GF₂₅₄ vb. adsorban tabakalarında ikiyüz elli kadar solvan sistemi denendi. Bunlardan diğerlerine oranla daha iyi netice alınan bir kaç örnek aşağıya çıkartılmıştır. Kullanılan adsorban silikagel HF₂₅₄' dür.

- 1- Kloroform - etanol (6:4)
- 2- Kloroform - etanol - benzen (6:4:1)
- 3- Kloroform - metanol (5:2)
- 4- Kloroform - metanol - etanol - dimetilformamid
(80:10:10:7)
- 5- Kloroform - etanol - benzen - isopropanol
(6:6:2:1)
- 6- Kloroform - etanol - benzen - dimetilformamid - eter
(50:50:30:1:10)
- 7- Kloroform - etanol - isopropanol - benzen - dietilamin
(60:30:40:30:1)
- 8- Kloroform - etanol - isopropanol - amonyak
(60:10:30:1)
- 9- Toluen - metiletiketone - aseton (30:50:50)
- 10- Toluen - metiletiketone - aseton - dimetilformamid
(30:30:30:10)
- 11- Benzen - etanol - metanol - dietilamin (95:10:5:5)
- 12- Etil asetat - aseton - amonyak (40:20:3)

- 13- Etil asetat - aseton - amonyak - dimetilformamid
(80:40:6:7)
- 14- Aseton - kloroform - dietilamin - isopropanol
(50:50:1:20)
- 15- Aseton - benzen - kloroform (80:50:10)
- 16- Aseton - benzen - kloroform - dietilamin
(80:40:5:1)
- 17- Aseton - benzen - kloroform - dimetilformamid -
dietilamin (70:50:10:10:0.1)

0.3 mm kalınlığında silikagel HF₂₅₄ tabakalarında en uygun solvan sistemi olarak, etil asetat - aseton - dimetilformamid - amonyak - dietilamin (80:40:14:6:0.2) bulundu. Çalışmada bütün teşhis ve tayinlerde bu solvan sistemi kullanıldı. Ancak solvan sistemi uçucu maddeler ihtiva ettiği için, sadece hazırlandığı gün faydalanıldı.

Kullanılan bu adsorban ve solvan sisteminin piridoksin hidroklorürün parçalanmasına etki edebileceği düşünüldü ve incelendi. Bu gaye ile piridoksin hidroklorürün sudaki % 1 lik çözeltisinden, silikagel HF₂₅₄ tabakalarına 1.5 ml tatbik edildi. Sürüklenme sonunda herhangi bir parçalanma görülmedi (Kromatogram 7). Kromatogramda sodyum novaminsülfonat 12.5 mcg/ml ve kombine ampullerde piridoksin hidroklorür konsantrasyonu 12.5 mcg/ml olacak şekilde tatbikler yapılmıştır.

kisimlari yukari gelecek sekilde raflı taşıyıcıya yerlestirildi ve 110°C'de aspirasyonlu etüvde 45 dakika aktive edildi. Hazırlanan plaklar etüv içinde saklandı ve aktive edildikleri gün kullanıldı. Artanlar kullanılacakları gün aynı şekilde tekrar aktive edildi.

Plakların alt ucundan 2 cm kadar yukarsına, yazıcı yardımı ile, çözeltiler Hamilton enjektör kullanılarak tatbik edildi. Tatbik lekeleri kuruyuncaya kadar oda temperaturünde tutuldu. Bu arada solvan sistemi hazırlanıp developman tankına konuldu ve doyması için 1 saat bekletildi. Solvan plakların tepesine 1 cm kalıncaya kadar (17 cm) develope edildi. Çıkartılıp oda temperaturünde kurutulup gerekli teşhis ve tayinler yapıldı.

3- Reaktif Seçimi ve Çeşitli Reaktiflerin Hassasiyetlerinin Tayini

Çalışmada kullanılacak renk reaktifini tayin edebilmek için, vitamin B₆ ve sodyum novaminsülfonat teşhisinde kullanılmış ve kullanılmadığı halde, bu maddelerle reaksiyon vermesi muhtemel olan renk reaktifleri ve şartlarımızda ki hassasiyetleri incelendi. Elde edilen neticeler tablo 3 de gösterilmiştir.

Renk reaktiflerinin hassasiyetlerini incelemek için uygun konsantrasyonlarda piridoksin hidroklorür ve sodyum novaminsülfonat çözeltileri, 0.3 mm kalınlığında silikagel HF 254 tabakalarına tatbik edildi, etil asetat - aseton - dimetil formamid - amonyak - dietil amin (80:40:14:6:0.2) solvan sistemi ile develope edildi. Havada kurutulduktan sonra reaktifler püskürtüldü ve hassasiyetleri gözlemlendi.

Denenen reaktifler aşağıda açıklandığı gibi hazırlanmıştır:

No	Reaktif PİRİDOKSİN HİDROKLORÜR (mcg)						SODYUM NOVAMİNSÜLFONAT (mcg)					
	0.1	0.25	0.5	0.75	1.0	2.0	0.1	0.25	0.5	0.75	1.0	2.0
1	mavi											
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2	oranj-kırmızı											
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3	gri											
	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
4	mavi						siyah					
	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	mavi						mavi					
	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	kırmızı-kahverengi						kırmızı - kahverengi					
	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
7	sarı						sarı					
	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
8	portakal						portakal					
	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
9							siyah					
	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
10							kahverengi					
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
11							sarı					
	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Tablo 3 - 0.3 mm kalınlığında silikagel HF₂₅₄ tabakalarında çeşitli renk reaktiflerinin hassasiyeti. Tabloda reaktifler şu sıra ile kaydedilmiştir : (1) 2,6-diklorokinon-klorimid, (2) diazolanmış nitroanilin, (3) o-toluidin, (4) ultraviyole ışığı, (5) demir(III) klorür-potasyum heksasiyanoferrat(III), (6) demir(III) klorür, (7) potasyum permanganat, (8) Dragendroff (Munier ve Macheboeuf), (9) Gümüş nitrat, (10) iyot-potasyum iyodür, (11) dimetil amino-benzaldehid.

2,6-DİKLOROKİNON-KLORİMİD REAKTİFİ (Gibbs, 1927): Reaktif hazırlamadan, 1 g 2,6-diklorokinon-klorimid 50 ml asetonda çözüldü. Devamlı karıştırırken, madde çökünceye kadar damla damla su ilave edildi, kristaller süzülüp ayrıldı, birkaç defa soğuk su ile yıkandı, havada kurutuldu ve buzdolabında, renkli şişe içinde saklandı.

Rekristalize edilerek saflandırılan bu maddenin, etanoldeki % 1'lik çözeltisi renk reaktifi olarak kullanıldı. Cam kapaklı renkli şişeler içinde buzdolabında saklandı. Pembeleşmeye başlayan çözeltiler kullanılmadı.

Kromatograma reaktif püskürtüldükten sonra, amonyak buharına tutuldu veya seyreltik amonyum hidroksid çözeltisi püskürtüldü. B₆ vitamerler reaktifle mavi-viyole renk verdiler. Dilue borik asid püskürtüldükten sonra, piridoksin hidroklorür reaktifle renk vermedi.

DİAZOLANMIŞ NİTROANİLİN REAKTİFİ (Ahrens ve diğ., 1969): 0.7 g p-nitroanilin 9 ml derişik hidroklorik asidde çözüldü, distile su ile 100 ml'ye tamamlandı (stok çözelti). Bu çözeltiden 4 ml alındı, 5 ml % 1 sodyum nitrit çözeltisi ile buz içinde karıştırıldı, distile su ile 100 ml ye tamamlandı.

Kromatograma reaktif püskürtüldükten sonra amonyak buharında tutuldu veya seyreltik amonyum hidroksid çözeltisi püskürtüldü. Piridoksin hidroklorür reaktifle oranj-kırmızı renk verdi.

DEMİR (III) KLORÜR-POTASYUMHEKSASİYANOFERRAT (III) REAKTİFİ : 0.1 M demir (III) klorür ve 0.1 M potasyumheksasiyanoferrat (III)'ün (1:1) oranındaki karışımı kullanıldı. Karışım

kullanılacağı gün hazırlandı. Bu renk reaktifi ile vitamin B₆ ve sodyum novaminsülfonat mavi leke verdi. Ancak kısa süre sonunda pilağın tamamı mavi renk aldı (Eble ve Brooker, 1962).

GÜMÜŞ NİTRAT REAKTİFİ (Burke, Potter ve Parkhurst, 1960): 1 ml doymuş gümüş nitrat çözeltisi 20 ml aseton ile karıştırıldı. Çöken gümüş nitratın tamamı çözününceye kadar damla damla su ilave edildi ve bu arada devamlı karıştırıldı. Fenollerin teşhisi için geliştirilen bu renk reaktifi, sodyum novaminsülfonatin teşhisi için denendi ve tablo 2 de görüldüğü gibi bu madde için en hassas reaktiflerden biri olarak bulundu. Sodyum novaminsülfonat ile beyaz zemin üzerinde siyah leke verdi. Bu reaktifin sodyum novaminsülfonat teşhisinde kullanılmasına dair literatürde kayıt yoktur.

4-DİMETİLAMİNOBENZALDEHİD (EHRLICH) REAKTİFİ (Heacock ve Mahon, 1965) : 1 g 4-dimetilaminobenzaldehid 25 ml derişik hidroklorik asidde çözüldü, üzerine 75 ml metanol ilave edildi. Novaljin ile beyaz zemin üzerinde sarı renk verdi.

Denenen diğer reaktiflerden o-toluidin ve demir (III) klorür reaktifleri Hashmi ve diğ. (1967 ve 1969) göre; potasyum permanganat, Dragendorff (Munier ve Macheboeuf), iyot-potasyum iyodür reaktifleri Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography (1971)'e göre hazırlanmıştır. Ultra-viole ışığı Camag (29 200) marka ultra-viole lambasından sağlanmıştır.

Denenen reaktifler içinde piridoksin hidroklorür için en hassas olarak 2,6-diklorokinon-klorimid ve diazolanmış p-nitroanilin reaktifleri; sodyum novaminsülfonat için ise, gümüş nitrat

ve 4-dimetilaminobenzaldehid reaktifleri bulundu. Her iki madde ile de oldukça hassas reaksiyon vermesi nedeni ile, iki maddenin birarada tespitinde, demir (III) klorür-potasyum heksasiyanoferrat (III) reaktifi, potasyum permanganat reaktifi ve ultraviole ışığından faydalanıldı.

Piridoksal ve piridoksal hidroklorür tespiti için 2,4-dinitrofenilhidrazinin 2 N hidroklorik asiddeki % 0.4 lük çözeltisi, piridoksik asid için de bromokrezol yeşilinin etanoldeki % 0.05'lik çözeltileri kullanılmıştır. Her iki reaktif de "Dyeing reagents for Thin Layer and Paper Chromatography", 1971'e göre hazırlanmıştır.

c- PİRİDOKSİN HİDROKLORÜR İÇİN TAYİN METODUNUN SEÇİMİ

1- Tayin Metodu

Kullanılan miktar tayini metodu, para durumunda substitüent ihtiva etmeyen fenoller için geliştirilen kolorimetrik metodun (Gibbs, 1927), şartlarımıza göre tadil ettiğimiz şeklidir.

Bu metodu seçmemizin nedeni, hassas olduğu konsantrasyon aralığının gayemize uygun olması (0-20 mcg), diğer kolorimetrik ve spektrofotometrik metodlardan daha hassas netice vermesi (Hochberg ve diğ., 1944 a ve b) ve deney üzerinde diğer maddelerin etkisinin az olmasıdır (Scudi ve diğ., 1940; Roth ve diğ., 1968; Hüttenrauch, 1970).

Metod prensip olarak para durumunda substitüent ihtiva etmeyen fenollerin, 2,6-diklorokinon-klorimid reaktifi ile re-

aksiyonu sonucu meydana gelen indofenolün (mavi pigment), renk şiddetinin ölçülmesine dayanır. Reaksiyon mekanizması Scudi ve diğ. (1940 a ve b; 1941) tarafından açıklanarak B₆ vitaminine uygulanmıştır. Piridoksin ile 2,6-diklorokinon-klorimid anında reaksiyona girerek, renksiz bir kompleks oluşur. Bu kompleksin moleküler düzenlenmesi sonucu piridoksin indofenol meydana gelir. Piridoksin indofenol de parçalanarak piridoksin, parçalanmış piridoksin ve oksim teşekkül eder. Renk teşekkülü ve parçalanma reaksiyonlarını, hidroksil iyonları katalize eder.

Gibbs metodunun Scudi ve diğ. (1940 a ve b) tarafından B₆ vitaminine uygulamasında, piridoksin ve imid reaksiyonu sonucu meydana gelen piridoksin indofenol, iki fazlı butil alkol-su solvan sistemi ile muamele edilip, boyanan butil alkol tabakası santrifüj edilerek su fazından ayrılmakta ve etil alkol içine dökülerek, renk şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmekteydi. Metodun bu yapılaş zorlukları yanında maksimum renk teşekkülü için 40 dakika beklenilmesi ve her ölçüm için reaksiyonun temperatur katsayısının tayininin gerekliliği, metodun Hochberg ve diğ. (1944 a ve b; 1945) tarafından tadil edilmesinin nedeni olmuştur. Bu metodda renk şiddeti su-isopropil alkol fazında, amonyak-amonyum klorür tamponu kullanılarak ölçülmüştür. Bu şekilde Scudi metodunun yapılaş zorlukları önemli ölçüde kolaylaştırıldı. Ancak piridoksin indofenolün renk stabilitesi, ısıya bağlı olarak, çok azalması ve renk şiddetinin ölçülmesi reaktif ilavesinden 60 saniye sonra yapılması, çalışmamızda Iwasa ve diğ. (1959) metodunu tadil ederek kullanmamızın nedeni olmuştur. Bu metodun hassasiyeti, Scudi metodundan 3 defa daha fazla olduğu belirtilmiştir.

Iwasa ve diğ. (1959) pH'nın, renk teşekkülü ve renk şiddetinin stabilitesi üzerindeki etkisini de incelediler. Bu gaye ile pH 3.36, 4.0, 4.8, 6.0, 6.5, 7.0 Macilvain tamponları; pH 7.0, 7.3, 7.5, 7.8 ve 8.3 veronal tamponları; pH 9.12 sodyum karbonat tamponu ve pH 9.28 amonyak - amonyum hidroksid tamponu (Hochberg metodunda kullanılan) denediler. pH 3.36 - 6.0 Macilvain tamponlarında renk teşekkülü görülmediği, pH 6.5 - 7.0 Macilvain tamponlarında renk teşekkülünün ve renk stabilitesinin de zayıf olduğu, pH 9.12 sodyum karbonat tamponunda mavi rengin tonunun değiştiği, pH 9.28 amonyak-amonyum hidroksid tamponunda da meydana gelen rengin çok kısa sürede bozulduğu belirtilerek veronal tamponlarının kullanılmasını önerdiler. pH 7.0 veronal tamponunda 27 dakika, pH 7.8 veronal tamponunda 10 dakika ve pH 8.3 veronal tamponunda da 8 dakika sonunda maksimum renk şiddetinin elde edildiğini belirttiler. Süre ve renk stabilitesi bakımından da, pH 7.8 veronal tamponunun kullanılması tavsiye ettiler. Çalışmada ayrıca isopropil alkol ve pH 7.8 veronal tamponunun renk teşekkülü ve stabilitesi üzerindeki etkisi de incelenmiş, isopropil alkol konsantrasyonunun yüzde 70 den, tampon konsantrasyonunun da yüzde 20'den az olmaması belirtilmiştir.

Diğer fenoller, aminler ve bazı bileşiklerin reaktif ile renk vermesi sonucu meydana gelen potansiyel hata, reaksiyonun fazla miktarda borik asid bulunan ortamda yapılması ile bertaraf edilir (Scudi ve diğ., 1940; Hochberg ve diğ., 1944 a; Roth ve diğ., 1968; Hüttenrauch, 1970). Çalışmada piridoksin hidroklorür diğer maddelerden ince tabaka kromatografisi ile ayrıl-

dığı halde, herhangi bir potansiyel hataya meydan vermemek için, reaksiyon borik asit bulunan ortamda tekrarlanarak deneye başka maddelerin etki edip etmediği de incelendi.

REAKTİFLER VE ÇÖZELTİLER

a) 2,6-Diklorokinon-klorimid reaktifi : Saf, kristalin 2,6-diklorokinon-klorimid hazırlamak için, 1 g madde 50 ml asetonunda çözüldü. Devamlı karıştırırken, çökünceye kadar damla damla su ilave edildi, kristaller süzülüp ayrıldı, birkaç defa buzlu su ile yıkandı, havada kurutuldu ve buzdolabında, renkli şişe içinde saklandı.

100 mg bu kristalize madde 250 ml isopropil alkol içinde çözülerek renk reaktifi hazırlandı. Cam kapaklı renkli şişeler içinde buzdolabında saklandı. Kullanılmadan 650 nm'de ölçüm şartlarında absorpsiyonu kontrol edildi.

b) Piridoksin hidroklorür çözeltileri : 0.1 N hidroklorik asid ile yüzde 0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 (a/h) konsantrasyonda çözeltiler hazırlandı. Renkli şişe içinde buzdolabında saklandı. Vakit geçirilmeden kullanıldı.

c) pH 7.8 Michaelis veronal tamponu : 165.5 ml 0.1 M barbital sodyum 250 ml'lik balon jojeye kondu, 0.1 N hidroklorik asid ile 250 ml'ye tamamlandı, iyici karıştırıldı, pH metrede pH 7.8 kontrol edildi.

d) Borik asid çözeltisi : 5 gram borik asid 100 ml damıtık suda çözüldü.

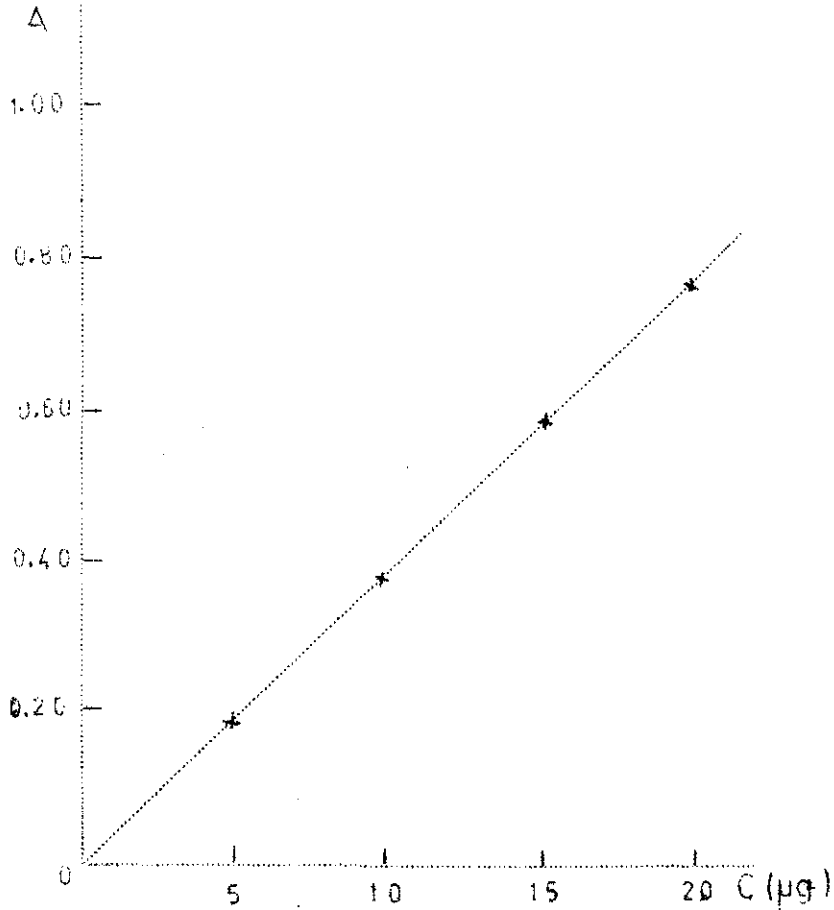
METOD

110°C' de 45 dakika aktive edilmiş 0.3 mm kalınlığında silikagel HF₂₅₄ tabakalarına, Hamilton enjektör kullanılarak 25 mg/ml konsantrasyonda piridoksin hidroklorür içeren ampullerden 0.5 ml, 0.50 mg/ml konsantrasyonda olanlardan da 0.3 ml tatbik edildi. Leke saç kurutucusu ile soğuk hava püskürtülerek kurutuldu. Etil asetat - aseton - dimetilformamid - amonyak - dietil amin (80:40:14:6:0.2) solvan sisteminde karanlıkta 17 cm sürüklendi. Pila kütetten çıkarıldıktan sonra, çalışma şartlarında, karanlıkta kuruyuncaya kadar tutuldu. Piridoksin hidroklorüre tekabül eden saha ultra-viole lambasının kısa dalga boyunda, mümkün olduğu kadar kısa sürede işaretlendi. Bu saha tam ortada olacak şekilde 1.5 x 1.5 cm ebatlarında adsorban tabakası, iyice kazınarak, selofan kağıdı içinde toplandı, 20 ml'lik ağzı kapaklı ve üzeri sayah karton ile kaplanmış test tüpüne aktarıldı. Üzerine 1 ml su, 5 ml isopropil alkol ve 5 ml pH 7.8 Michaelis veronal tamponu ilave edildi, ağzı kapatıldı, 5 dakika kadar çalkalandı ve 5 dakika kendi haline bırakıldı. Bu süre sonunda 2 ml 2,6-diklorokinon-klorimid reaktifi ilave edildi, 1 dakika şiddetle çalkalandı. Karışım santrifüj tüpüne aktarılıp, 5000 RPM de 5 dakika santrifüj edildi. Pipet ile tüp oynatılmadan 3 ml çözelti alınıp, reaktif ilavesinden 10 dakika sonra, 650 nm' de renk şiddeti piridoksin hidroklorür ihtiva etmeyen karışıma karşı tayin edildi.

Ölçümde her hangi bir bileşiğin etkisi olup olmadığını gözlemek için de, su yerine borik asid çözeltisi kullanılarak deney tekrarlandı. Renk şiddetinin sıfır olup olmadığı kontrol edildi. Her tayin için 3 ölçüm ve bir de kontrol yapıldı.

STANDART EĞRİ :

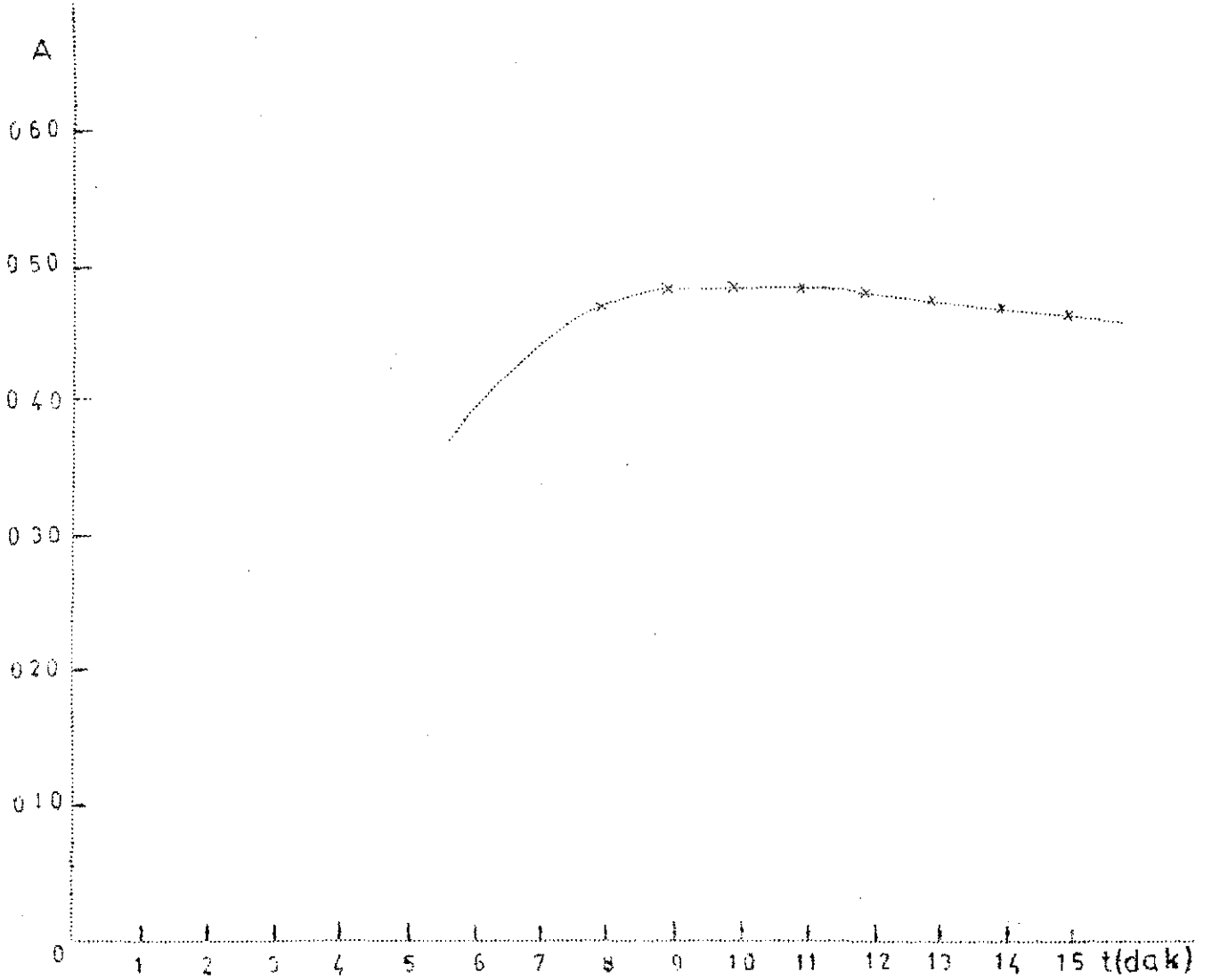
Gerekli konsantrasyonda piridoksin hidroklorür, 0.1 N hidroklorik asid içinde çözüldü. Bu çözeltiden 0,5 ml alınıp, 110°C'de 45 dakika aktive edilmiş 0.3 mm kalınlığında silikagel HF₂₅₄ tabakalarına, Hamilton enjektör ile tatbik edildi. Yukarda anlatıldığı yöntem ile çalışarak elde edilen standart eğri grafik 1' de gösterilmiştir. Grafikte kayıtlı her değer, 10 ölçümün ortalaması alınarak elde edilmiştir.



Grafik 1 : Piridoksin hidroklorürün standart eğrisi
(Dalga boyu 650 nm)

2- Rengin Dayanıklılık Derecesi

Çalışma şartlarında en uygun ölçme zamanını ve meydana gelen rengin dayanıklılığını tayin edebilmek için 12.5 mcg/ml konsantrasyonda piridoksin hidroklorür çözeltisinin renk şiddeti, yukarıda açıklandığı üzere, belirli aralıklarla ölçüldü. Her zaman aralığı için 10 ölçümün ortalaması alınarak bulunan değerler grafik 2' de gösterilmiştir.



Grafik 2 : Piridoksin-indofenolün teşekkül ve parçalanma hızı (piridoksin hidroklorür konsantrasyonu 12.5 mcg/ml)

Grafik 2'de görüldüğü gibi,reaktif ilavesinden sonra 9 ile 11.dakikalar arasında renk şiddeti maksimumdur.Çalışmada bu iki değerin ortalaması 10. dakika kullanıldı.

3- Metodun kesinlik derecesi

Metodun kesinlik derecesini standart sapma cinsinden ifade etmek mutattır.Tablo 4'de metod için standart sapma ve standart hata gösterilmiştir.

Deney sayısı	Madde (mcg)	Aritmetik ortalama	Standart hata \bar{x}	Standart sapma \bar{s}
10	5	4.9875	0.0435	0.1376
10	7.5	7.4725	0.0383	0.1210
10	10	10.0100	0.0674	0.2132
10	12.5	12.3800	0.0554	0.1751
10	15	14.9125	0.0747	0.2361
10	20	19.9325	0.0534	0.1688

Tablo 4 : Piridoksin hidroklorürün 2,6-diklorokinon-klorimid ile tayininde metodun kesinlik derecesi

d-PIRIDOKSİN HİDROKLORÜRÜN TÜREVLERİNİN SENTEZİ

Piridoksin hidroklorür ve sodyum novaminsülfonatin parçalanma mahsüllerini ince tabaka kromatografisinde teşhis edebilmek ve buradan elüe edildikten sonra mukayese edebilmek için,

bazı türevleri sentez edildi. Sentezlerde literatürde kayıtlı metodlar, tadil edilmeden, kullanıldı. Sentez edilen maddeler ve sentez metodları şu şekildedir :

PİRİDOKSİN DİMER : Harris, (1941) metoduna göre sentez edildi : 8.6 g piridoksin hidroklorür az bir suda suspande edildi, 2.5 N sodyum hidroksid çözeltisi ile pH 6' ya ayarlandı. Çözelti damıtık su ile 69 ml'ye tamamlandı ve otoklavda 121°C' de 30 dakika ısıtıldı. Bu süre sonunda otoklavdan çıkartılıp, buz dolabında soğutuldu. Çöken kristalin madde süzülerek ortamdan ayrıldı. Distile su ile 5 defa yıkandı, metanolde çözüldü, damla damla damıtık su ilavesi ile billurlandırıldı (0.4 g piridoksin dimer). Süzüntü 60°C'de alçak basınç altında yoğunlaştırılınca, bir miktar daha piridoksin dimer elde etmek mümkün oldu. Aynı şekilde ortamda süzülerek ayrıldı ve saflandırıldı. Bakiye süzüntü yine otoklavda ısıtılıp işlemler tekrarlanınca tekrar yakın verim ile piridoksin dimer elde etmek mümkün oldu. Madde- nin erime derecesi 205-207°C olarak tespit edildi.

Otoklavda ısıtma daha uzun süre yapılınca, ancak birkaç gün sonra çöken, jelatin görünümünde, bir madde elde edildi. Harris (1941) bu maddenin piridoksin polimer olduğunu ileri sürmüştür.

4-PİRİDOKSİK ASİD : Heyl (1948) metoduna göre sentez edildi : 34.3 g. piridoksin hidroklorür, mekanik karıştırıcı monte edilmiş, 1 lt lik balon içinde 0.5 lt distile suda çözüldü. Bu çözeltide 17.1 g, % 85 lik mangan dioksid suspande edildi ve ayırma hunisi kullanarak, 16.4 g konsantre sülfirik asid damla damla ilave edildi. Karışımındaki bütün mangan dioksid kaybolup,

çözeltinin pH'sı 6.0 oluncaya kadar, su banyosunda 60-70°C' de ısıtıldı ve devamlı karıştırıldı. (Yaklaşık olarak iki buçuk saat). Üzerine 41 g sodyum asetat ve 17.3 g hidroksilamin hidroklorür ilave edince piridoksal oksim çöktü. Karışım on dakika kaynar su banyosunda ısıtıldı ve buzda soğutulup süzüldü. Piridoksal oksim 5 defa distile su ile yıkandı, kaynar etanolde çözüldü, çözeltinin rengi aktif karbon ile kaynar su banyosunda ısıtılarak giderildi ve soğutulduğu zaman piridoksal oksim kristallendi (16.9 g; E.D. 225°C, parçalanarak).

16.6 g piridoksal oksim 166 ml asetik anhidrit ile geri çeviren soğutucu altında iki buçuk saat ısıtıldı. Değişmemiş asetik anhidrit, 50°C ve alçak basınç altında ortandan uzaklaştırıldıktan sonra, bakiye etil alkol ile kaynatıldı, uçucu maddeler aynı şekilde uzaklaştırıldı. Bakiye eter - alkol (1:1) karışımında çözüldü, 5 defa doymuş sodyum bikarbonat çözeltisi ve 5 defa da distile su ile yıkandı, aktif karbon ile su banyosunda ısıtılarak renksizlendirildi ve süzüldü. Süzüntü 50°C ve alçak basınç altında uçuruldu, bakiye eter - petrol eteri (K.D. 30 - 60°C) karışımında (1:1) kristallendirildi. 16.5 g 2-metil - 3-asetoksi - 4 - siyano - 5 - asetoksipiridin elde edildi (E.D. 63.5°C).

8 gram 2- metil -3- asetoksi - 4- siyano - 5- asetoksime-tilpiridin 166 ml 3 N potasyum hidroksid çözeltisi ile geri çeviren soğutucu altında 7 saat ısıtıldı. Bu süre sonunda süzüldü, konsantre hidroklorik asid ile kongo kırmızısına karşı asid yapıldı. Karışım buzda soğutuldu ve çökelti süzülerek ayrıldı, 5' er defa distile su, etanol, eter ve dilüe hidroklorik asid

ile yıkandı. Çöktürme ve yıkama işlemi 2 defa daha tekrarlandı 4,7 g 4-piridoksik asid elde edildi (E.D. 254°C).

3,7 gram 4-piridoksik asid 20 ml doymuş alkolik hidrojen klorür çözeltisi ihtiva eden 100 ml absolu etanol ile geri çeviren soğutucu altında 2.5 saat ısıtıldı. Meydana gelen karışım buzda soğutuldu ve çökelti süzülerek ayrıldı, etil alkol ve eter ile yıkandı, suda çözüldü, sodyum bikarbonat ilavesi ile kristallendirildi. Kristalin 4-piridoksik asid lakton süzülerek ayrıldıktan sonra buzlu su, etanol ve eter ile 5 defa yıkandı (2.9 g; E.D. 273°C, parçalanarak)

4,5 DİPİRİDOKSİDİAL HİDROKLORÜR : Sattsangi ve dig. (1968) metoduna göre sentez edildi : 2 g isopiridoksal dimetilasetal ve 8 g % 85'lik mangan dioksit 1.5 lt kloroform içinde mekanik karıştırıcı ile 5 saat karıştırıldı. Bu süre sonunda suspansiyon süzüldü ve 30 - 35°C' de alçak basınç altında kuruyuncaya kadar uçuruldu. Bakiye petrol eterinde (K.N. 40 - 50°C) çözüldü, aktif karbon ilave edip, ısıtılarak çözeltinin rengi giderildi, 10 ml'ye yoğunlaştırıldı ve buz dolabına konuldu. Çöken kısım süzülerek ayrıldı ve petrol eterinde kristallendirildi (E.D. 58 - 59°C; 1.35 g 5'-(dimetilasetal)-4-formil-3-hidroksi-2-metilpiridin).

1 g 5'-(dimetilasetal)-4-formil-3-hidroksi-2-metilpiridin 50 ml N hidroklorik asid ile 60°C'lik su banyosunda 30 dakika ısıtıldı. Bu süre sonunda bir miktar aktif karbon ilave edildi ve 10 dakika daha ısıtıldı, süzüldü. Süzüntü yaklaşık olarak 1 ml'ye alçak basınç altında yoğunlaştırıldı. Buz dolabında 1 gece tutulunca 0.9 g piridoksidial hidroklorür elde edildi (E.D. 158 - 161°C parçalanarak).

PIRIDOKSAL HİDROKLORÜR - 4 - HİDROKSİ SULFONİK ASİD :

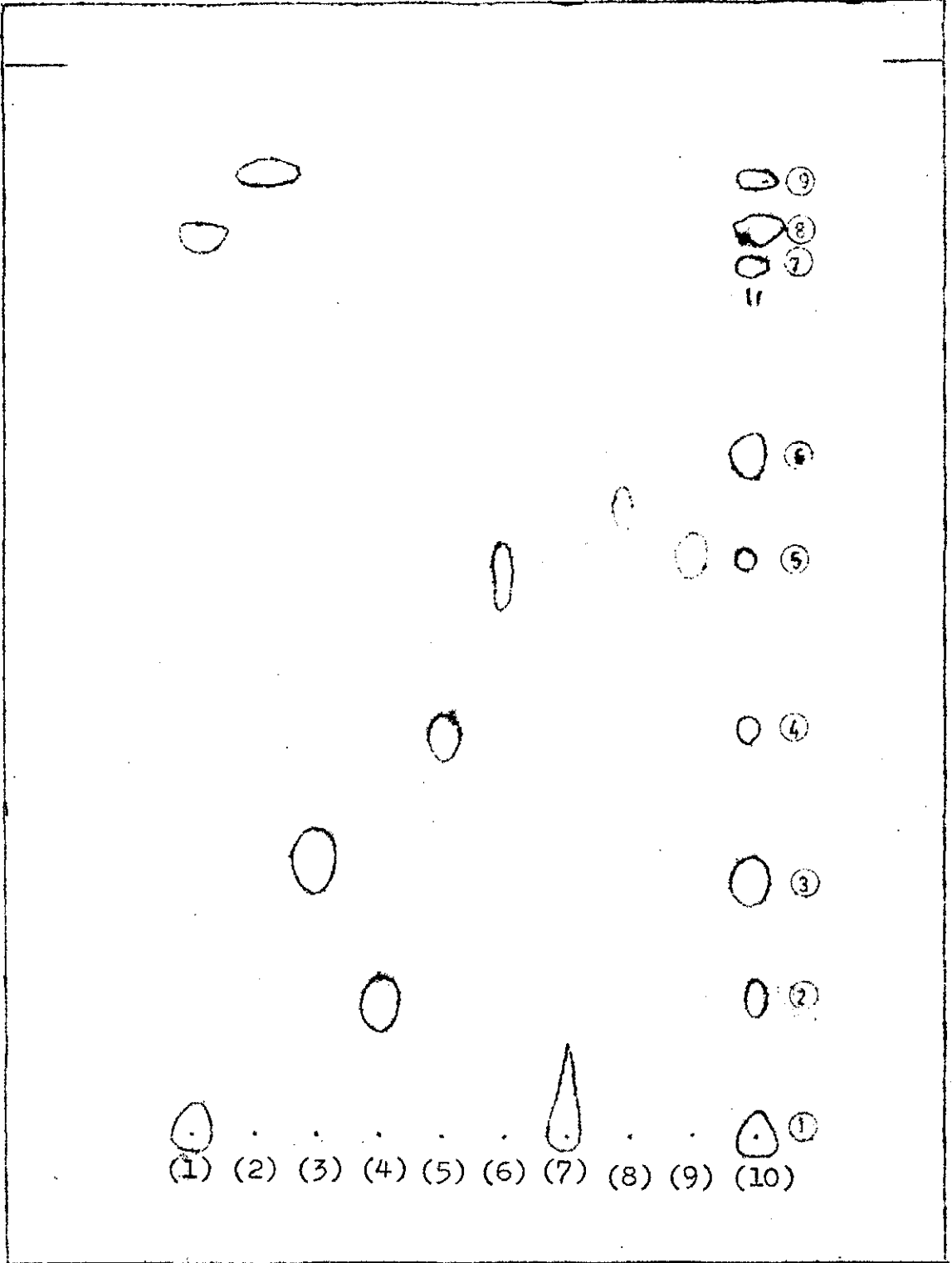
Hata ve diğ. (1966) metoduna göre sentez edildi : 609 mg piri-
doksal hidroklorür ve 582 mg sodyum metabisulfit 45 ml damıtık
suda, bir balon içinde, çözüldü. Balonun ağzı kapatılıp 24 saat
kendi halinde bırakıldı. Bu süre sonunda, çözelti alçak basınç
altında, 55°C'de 5 ml'ye kondense edildi, üzerine bulanıklık olun-
caya kadar mutlak alkol ilave edildi. Buz dolabında 1 gece sak-
lanınca soluk sarı renkte piridoksal hidroklorürün 4-hidroksi-
sulfonik asid çöktü. Kristallendirme işlemi 2 defa daha tekrar-
landı (E.D. 129.5°C parçalanarak; 480 mg).

III- BULGULAR

A- MİKTAR TAYİNİ NETİCELERİ VE AMPULLERİN İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ İLE GÖZLENMESİ

Bütün tip ampuller 10 ve 180 gün bekletme sonunda, kolorimetrik yöntem ile tayin edildi. Her tayin için metodlar kısmında belirtildiği üzere, üç tayin ve bir de kontrol yapıldı. Bulunan neticelerin ortalaması alınıp yüzde kayıp olarak ifade edildi (Tablo 5 - 17).

Diğer taraftan bu serilerdeki parçalanma, 180. gün sonunda ince tabaka kromatografisi ile de gözlemlendi. Her seri için miktar tayini tablosu ve seriye ait kromatogram verildi (Kromatogram 9-21). Ancak bütün parçalanma ürünleri için, kromatogramlarda şahit maddeler verilemediği için, örnek bir kromatogram konulması uygun görüldü (Kromatogram 8). Kromatogramda maddelerin tatbikinde şu sıra takip edilmiştir : 1) Sodyum novaminsulfonatın metanoldeki %1'lik çözeltisi; 2) Dimetilamino antipirinin kloroformdaki %1'lik çözeltisi; 3) Piridoksin hidroklorürün %1'lik çözeltisi; 4) Piridoksin dimerin metanoldeki %1'lik çözeltisi; 5) 4-Piridoksik asidin 0.1N sodyum hidroksidteki %1'lik çözeltisi; 6) Piridoksal hidroklorürün %1'lik çözeltisi; 7) 4,5 Dipiridoksidial hidroklorürün %1'lik çözeltisi; 8) Piridoksal hidroklorür-4-hidroksi-sulfonik asidin %1'lik çözeltisi; 9) Dezoksi-piridoksinin %1'lik çözeltisi; 10) %5 (a/h) konsantrasyonda piridoksin hidroklorür ve %50 (a/h) konsantrasyonda sodyum novaminsulfonat içeren ampulun 180. günkü durumu.



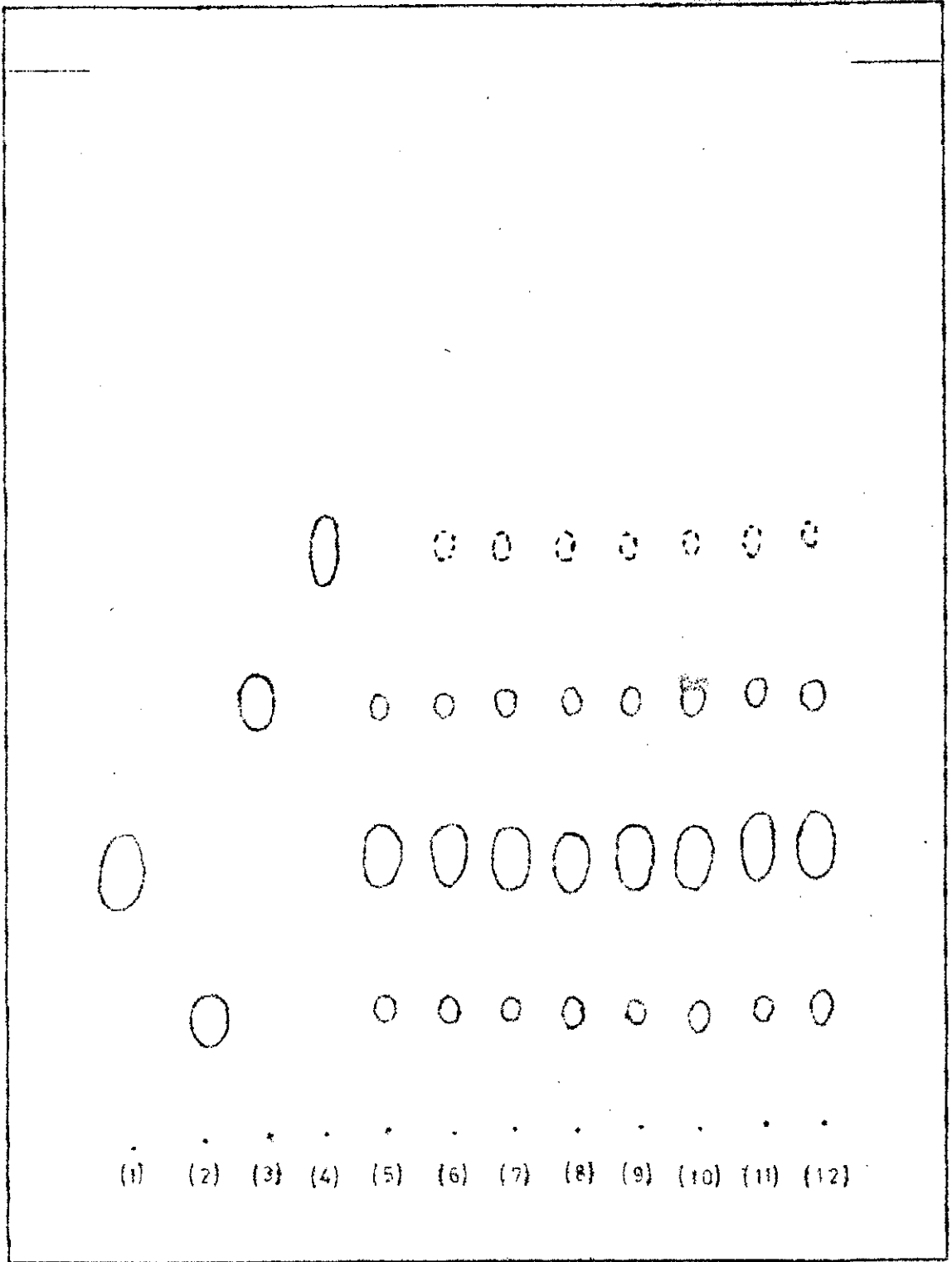
Kromatogram 8 : Şahit maddeler ve sodyum novaminsulfonat-piridoksin hidroklorür **kombine** ampulün, yukarıda belirtilen sıra takip edilerek, silikagel HF₂₅₄ tabakalarında, etil asetat - aseton - dimetilformamid - amonyak - dietilamin (80:40:14:6:0.2) solvan sistemi ile gözlenmesi.

Süre	R E N K L İ				R E N K S İ Z			
	Azotlu		Azotsuz		Azotlu		Azotsuz	
	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C
10.Gün	6.4	8.8	9.6	11.6	11.2	13.6	13.6	14.4
180.Gün	14.4 _a	17.2 _b	18.4 _c	20.0 _d	22.8 _e	24.8 _f	26.4 _g	27.2 _h

Tablo 5 : Kaynatılmış, soğutulmuş, 2 saat azot gazı geçirilerek moleküler oksijeni minimuma indirilmiş distile su ile, % 2.5 (a/h) konsantrasyonda piridoksin hidroklorür içeren ve genel şemaya göre dallandırılarak hazırlanmış (A-1 serisi) enjektabl çözeltilerin, 10 ve 180. gün sonundaki miktar tayini sonuçları (yüzde kayıp olarak).

Aynı seri (A-1) enjektabl çözeltilerdeki durum 180. gün sonunda, kromatografik yöntem ile de gözlemlendi. Kromatografide, miktar tayininde kullanılan kromatografi sistemi ve 50 mcg piridoksin hidroklorüre eşdeğer ampul çözeltisi kullanılmıştır.

Uygulamada şahit maddeler ve ampullerin tatbikinde aşağıda belirtilen sıra takip edilmiştir : 1) Piridoksin hidroklorürün % 1'lik çözeltisi; 2) Piridoksin dimerin metanoldeki % 1'lik çözeltisi; 3) 4-Piridoksik asidin 0.1N sodyum hidroksiddeki % 1'lik çözeltisi; 4) Piridoksal hidroklorürün % 1'lik çözeltisi; 5) A-1 serisi "a" çözeltisi; 6) A-1 serisi "b" çözeltisi; 7) A-1 serisi "c" çözeltisi ; 8) A-1 serisi "d" çözeltisi; 9) A-1 serisi "e" çözeltisi ; 10) A-1 serisi "f" çözeltisi; 11) A-1 serisi "g" çözeltisi; 12) A-1 serisi "h" çözeltisi.



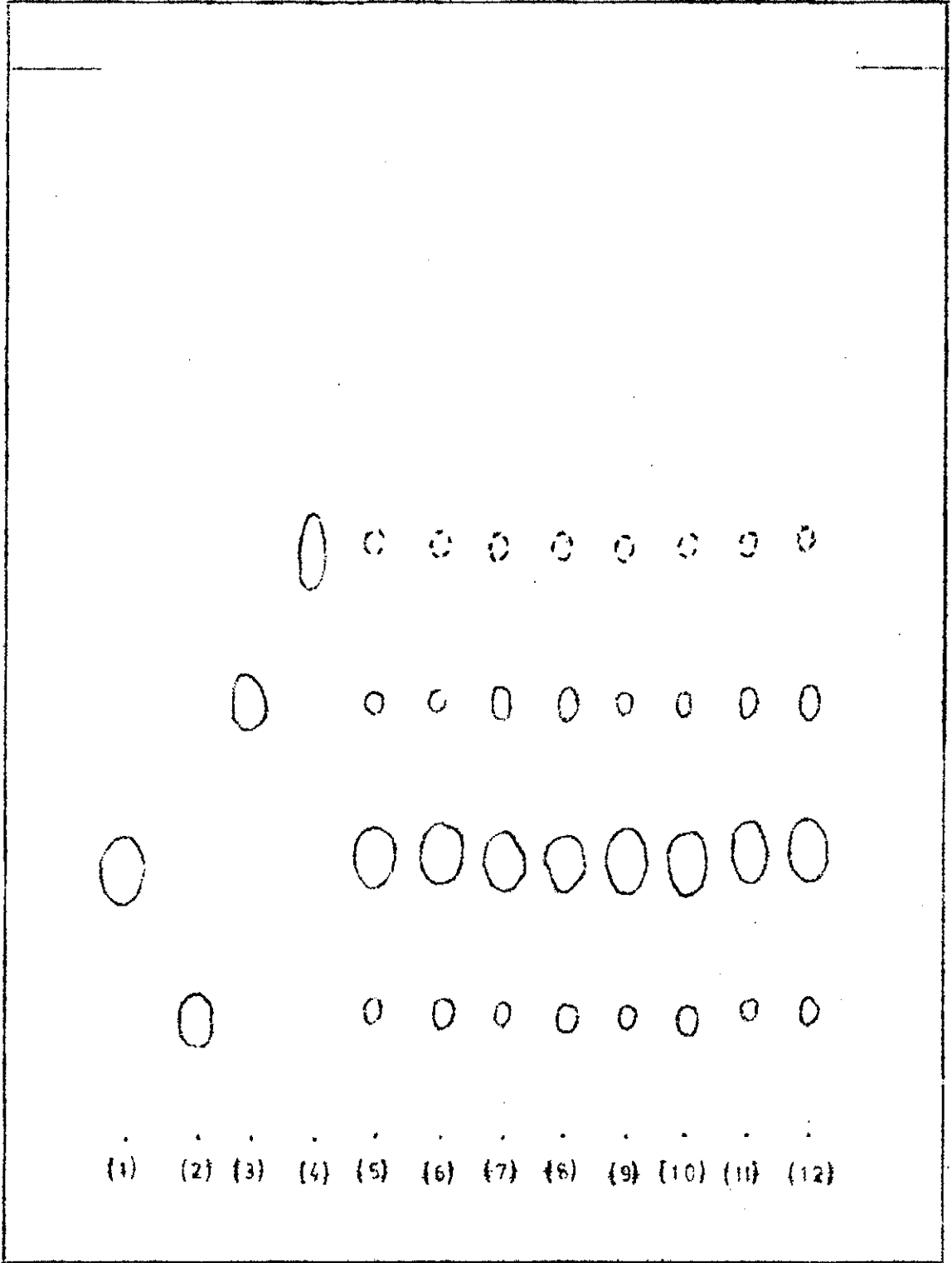
Kromatogram 9 : Şahit maddeler ve ampullerin, yukarda belirtilen sıra takip edilerek, silikagel HF₂₅₄ tabakalarında, etil asetat-aseton-dimetilformamid-amonyak-diethylamin (80:40:14:6:0.2) solvan sistemi ile gözlenmesi.

Süre	R E N K L İ				R E N K S İ Z			
	Azotlu		Azotsuz		Azotlu		Azotsuz	
	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C
10. Gün	6.67	9.33	9.33	10.67	10.67	12.67	13.33	14.67
180. Gün	14.67 _a	16.67 _b	18.00 _c	19.33 _d	22.00 _e	24.00 _f	25.33 _g	27.33 _h

Tablo 6 : Kaynatılmış, soğutulmuş, 2 saat azot gazı geçirilerek moleküler oksijeni minimuma indirilmiş distile su ile, % 5 (a/h) konsantrasyonda piridoksin hidroklorür içeren ve genel şemaya göre dallandırılarak hazırlanmış (A-2 serisi) enjektabl çözeltilerin, 10. ve 180. gün sonundaki miktar tayini sonuçları (yüzde kayıp olarak).

Aynı seri (A-2) enjektabl çözeltilerdeki durum 180. gün sonunda, kromatografik yöntem ile de gözlemlendi. Kromatogramlarda, miktar tayininde kullanılan kromatografi sistemi ve 50 mcg piridoksin hidroklorüre eşdeğer ampul çözeltisi kullanılmıştır.

Uygulamada şahit maddeler ve ampullerin tatbikinde aşağıda belirtilen sıra takip edilmiştir : 1) Piridoksin hidroklorürün % 1'lik çözeltisi; 2) Piridoksin dimerin metanoldeki % 1'lik çözeltisi; 3) 4-Piridoksik asidin 0.1N sodyum hidroksiddeki % 1'lik çözeltisi; 4) Piridoksal hidroklorürün % 1'lik çözeltisi; 5) A-2 serisi "a" çözeltisi; 6) A-2 serisi "b" çözeltisi; 7) A-2 serisi "c" çözeltisi; 8) A-2 serisi "d" çözeltisi; 9) A-2 serisi "e" çözeltisi; 10) A-2 serisi "f" çözeltisi; 11) A-2 serisi "g" çözeltisi; 12) A-2 serisi "h" çözeltisi.



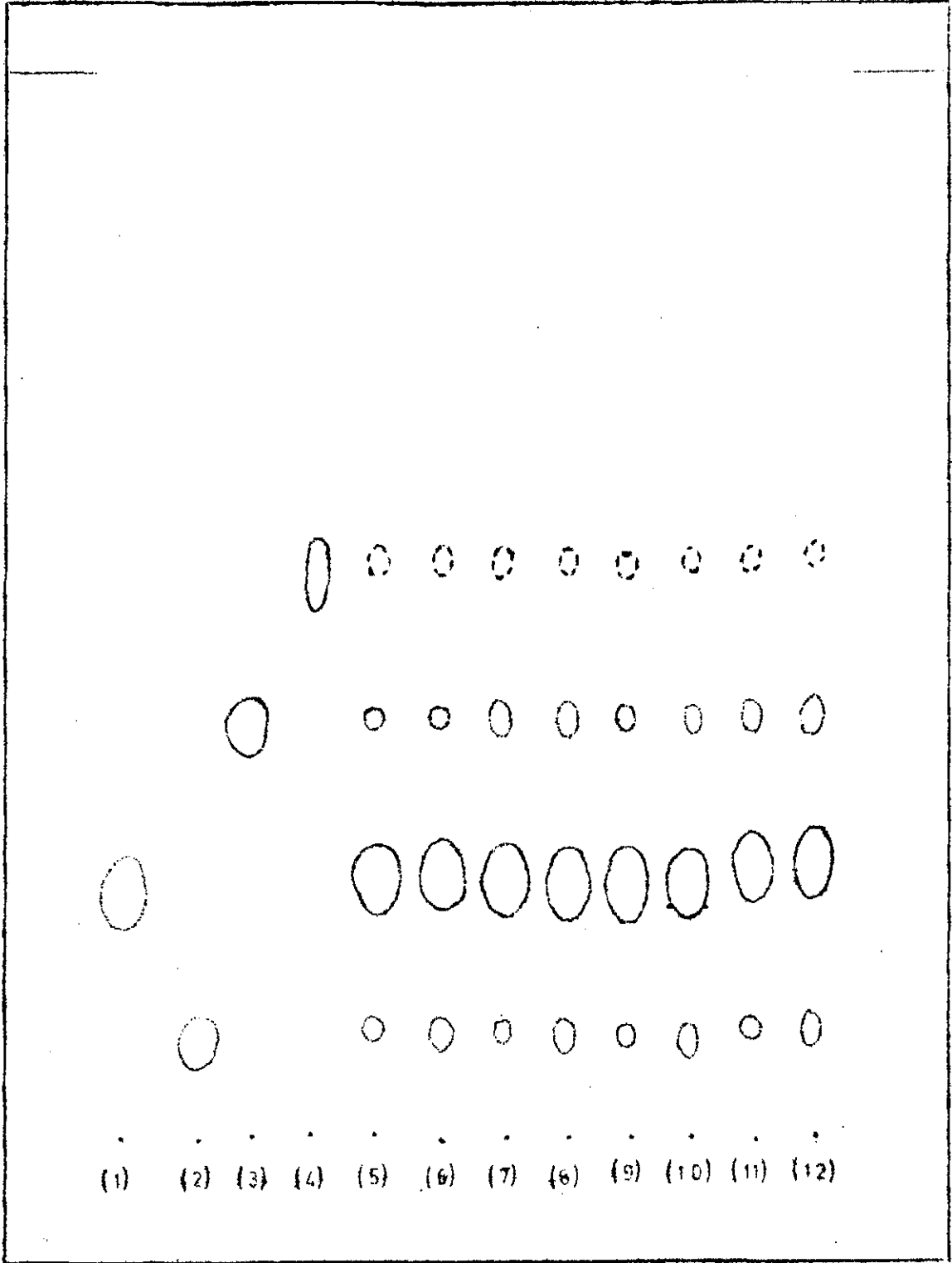
Kromatogram 10 : Şahit maddeler ve ampullerin yukarıda belirtilen sıra takip edilerek, silikagel HF₂₅₄ tabakalarında, etil asetat-aseton-dimetilformamid-amonyak-dietilamin (80:40:14:6:0.2) solvan sistemi ile gözlenmesi.

Süre	R E N K L İ				R E N K S İ Z			
	Azotlu		Azotsuz		Azotlu		Azotsuz	
	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C
10.Gün	7.0	9.0	9.5	11.5	11.5	13.5	14.0	15.0
180.Gün	15.0 _a	17.0 _b	18.0 _c	20.0 _d	23.0 _e	25.0 _f	26.5 _g	27.5 _h

Tablo 7 : Kaynatılmış, soğutulmuş, 2 saat azot gazı geçirilerek moleküler oksijeni minimuma indirilmiş distile su ile, % 10 (a/h) konsantrasyonda piridoksin hidroklorür içeren ve genel şemaya göre dallandırılarak hazırlanmış (A-3 serisi) enjektabl çözeltilerin, 10. ve 180. gün sonundaki miktar tayini sonuçları (yüzde kayıp olarak).

Aynı seri (A-3) enjektabl çözeltideki durum 180. gün sonunda, kromatografik yöntemle de gözlemlendi. Kromatogramda, miktar tayininde kullanılan kromatografi sistemi ve 100 mcg piridoksin hidroklorüre eşdeğer ampul çözeltisi kullanılmıştır.

Uygulamada şahit maddeler ve ampullerin tatbikinde aşağıda belirtilen sıra takip edilmiştir : 1) Piridoksin hidroklorürün % 1'lik çözeltisi; 2) Piridoksin dimerin metanoldeki % 1'lik çözeltisi; 3) 4-Piridoksik asidin 0.1 N sodyum hidroksiddeki % 1'lik çözeltisi; 4) Piridoksal hidroklorür % 1'lik çözeltisi; 5) A-3 serisi "a" çözeltisi; 6) A-3 serisi "b" çözeltisi; 7) A-3 serisi "c" çözeltisi; 8) A-3 serisi "d" çözeltisi; 9) A-3 serisi "e" çözeltisi ; 10) A-3 serisi "f" çözeltisi; 11) A-3 serisi "g" çözeltisi; 12) A-3 serisi "h" çözeltisi.



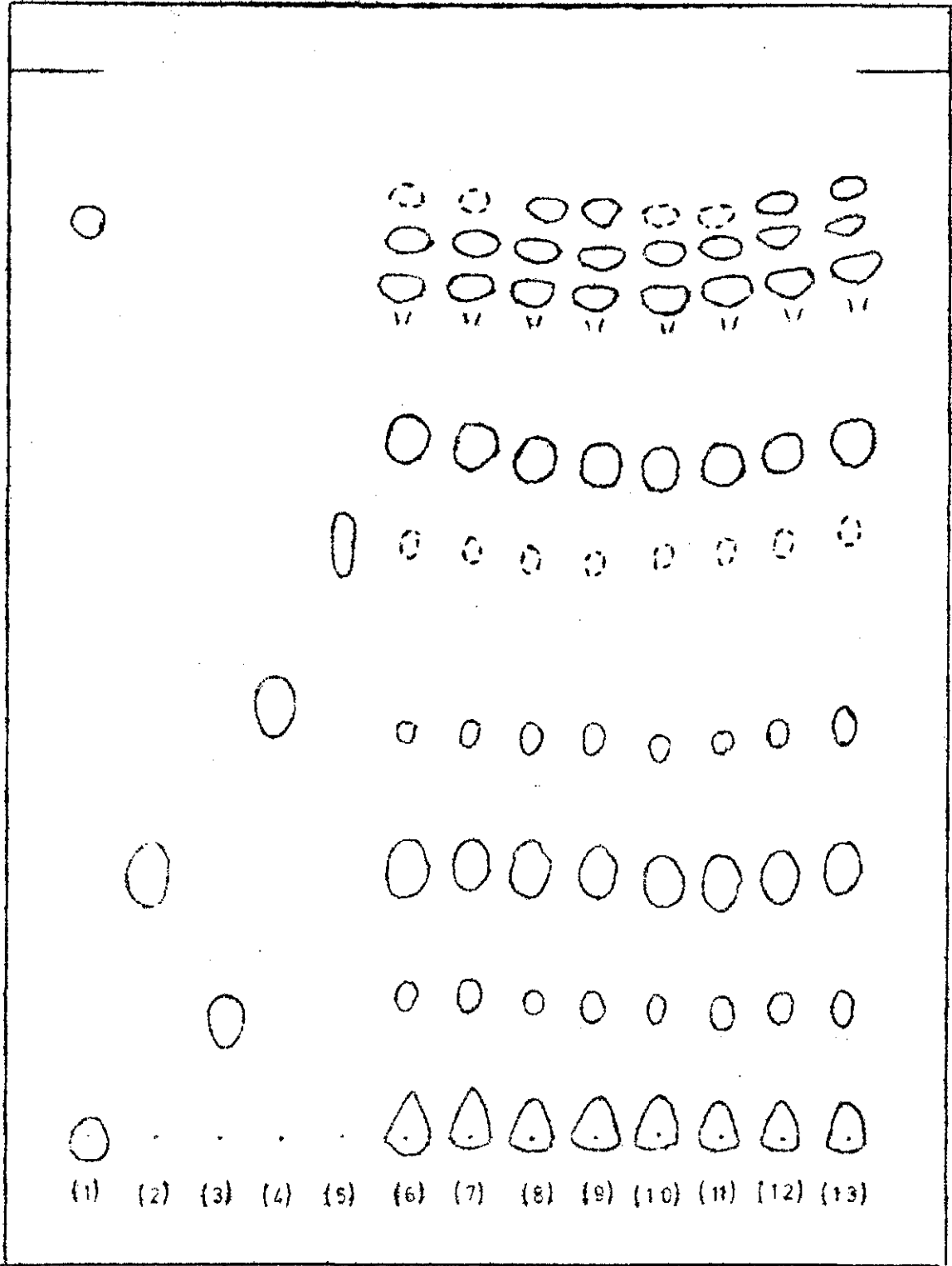
Kromatogram 11 : Şahit maddeler ve ampullerin yukarda belirtilen sıra takip edilerek, silikagel HF₂₅₄ tabakalarında, etil asetat-aseton-dimetilformamid-amonyak-dietilamin (80:40:14:6:0.2) solvan sistemi ile gözlenmesi.

Süre	R E N K L İ				R E N K S İ Z			
	Azotlu		Azotsuz		Azotlu		Azotsuz	
	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C
10.Gün	8.8	10.4	12.0	13.6	14.4	16.0	16.8	18.4
180.Gün	19.6 _a	19.6 _b	21.6 _c	22.8 _d	26.4 _e	28.8 _f	30.4 _g	32.8 _h

Tablo 8 : Kaynatılmış, soğutulmuş, 2 saat azot gazı geçirilerek moleküler oksijeni minimuma indirilmiş distile su ile, % 2.5 (a/h) konsantrasyonda piridoksin hidroklorür ve % 50 (a/h) konsantrasyonda sodyum novaminsulfonat içeren ve genel şemaya göre dallandırılarak hazırlanmış (A-4 serisi) kombine enjektabl çözeltilerin 10. ve 180. gün sonundaki miktar tayini sonuçları (yüzde kayıp olarak).

Aynı seri (A-4) kombine enjektabl çözeltilerde, 180. gün sonundaki durum kromatografik yöntemle de gözlemlenmiştir. Kromatografide, miktar tayininde kullanılan kromatografi sistemi ve 50 mcg piridoksin hidroklorüre eşdeğer ampul çözeltisi kullanılmıştır.

Uygulamada şahit maddeler ve ampullerin tatbikinde aşağıda belirtilen sıra takip edilmiştir : 1) Sodyum novaminsulfonatın metanoldeki %1'lik çözeltisi; 2) Piridoksin hidroklorürün %1'lik çözeltisi; 3) Piridoksin dimerin metanoldeki %1'lik çözeltisi; 4) Piridoksik asidin 0.1N sodyum hidroksiddeki %1'lik çözeltisi; 5) Piridoksal hidroklorürün %1'lik çözeltisi; 6) A-4 serisi "a" çözeltisi; 7) A-4 serisi "b" çözeltisi; 8) A-4 serisi "c" çözeltisi; 9) A-4 serisi "d" çözeltisi; 10) A-4 serisi "e" çözeltisi; 11) A-4 serisi "f" çözeltisi; 12) A-4 serisi "g" çözeltisi; 13) A-4 serisi "h" çözeltisi.



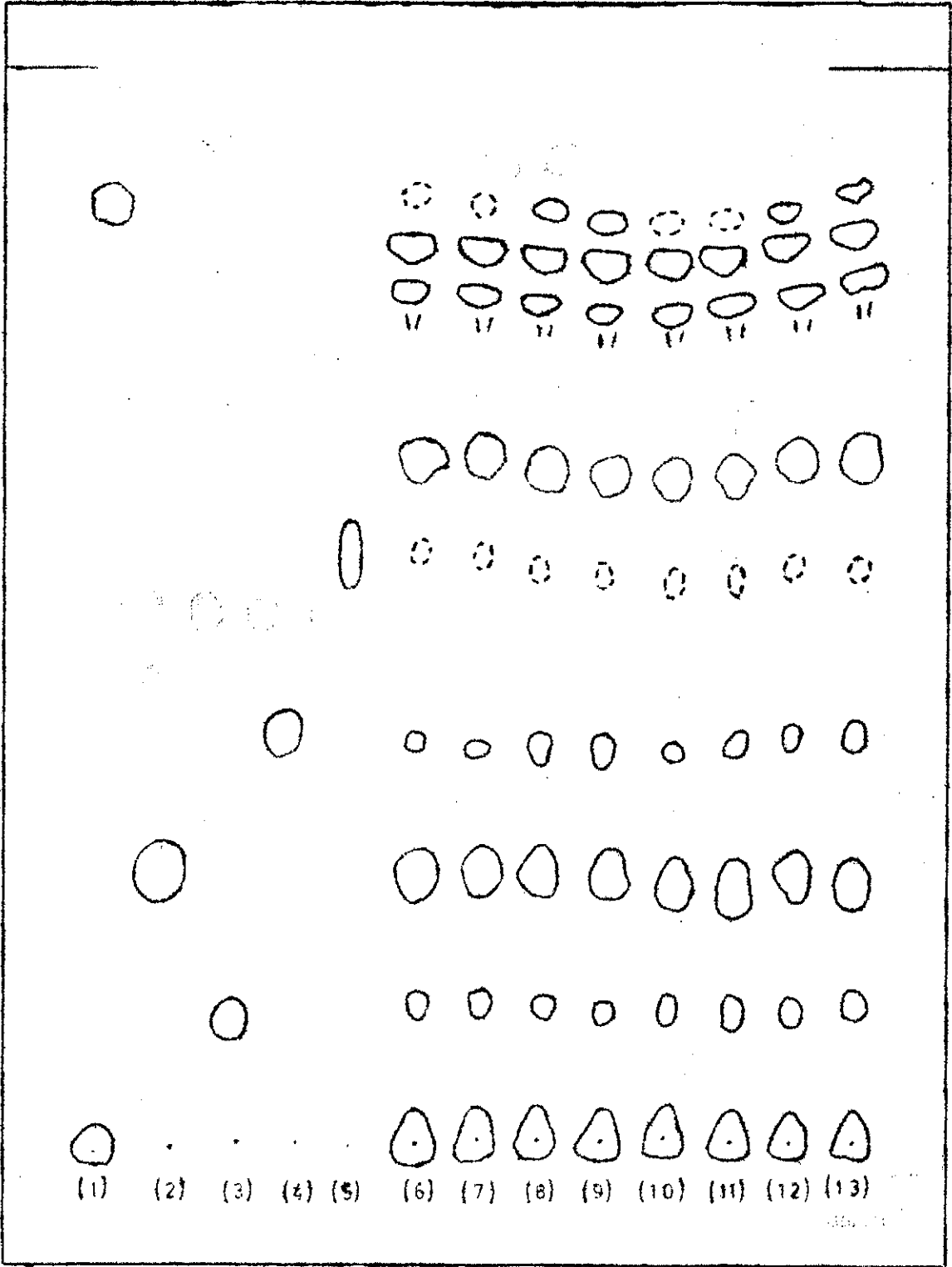
Kromatogram 12 : Şahit maddeler ve ampullerin, yukarda belirtilen sıra takip edilerek, silikagel HF₂₅₄ tabakalarında, etil asetat-aseton-dimetilformamid-amonyak-dietilamin (80:40:14:6:0.2) solvan sistemi ile gözlenmesi.

Süre	R E N K L İ				R E N K S İ Z			
	Azotlu		Azotsuz		Azotlu		Azotlu	
	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C
10.Gün	8.67	10.67	12.00	13.33	14.00	16.00	16.67	18.67
180.Gün	18.00 _a	19.33 _b	21.33 _c	22.67 _d	26.67 _e	28.67 _f	30.00 _g	32.67 _h

Tablo 9 : Kaynatılmış, soğutulmuş, 2 saat azot gazı geçirilerek moleküler oksijeni minimuma indirilmiş distile su ile, %5 (a/h) konsantrasyonda piridoksin hidroklorür ve % 50 (a/h) konsantrasyonda sodyum novaminsülfonat içeren ve genel şemaya göre dallandırılarak hazırlanmış (A-5 serisi) kombine enjektabl çözeltilerin, 10. ve 180. gün sonundaki miktar tayini sonuçları (yüzde kayıp olarak).

Aynı seri (A-5) kombine enjektabl çözeltilerde 180. gün sonundaki durum kromatografik yöntemle gözlenmiştir. Kromatografide, miktar tayininde kullanılan kromatografi sistemi ve 50mcg piridoksin hidroklorüre eşdeğer ampul çözeltisi kullanılmıştır.

Uygulamada şahit maddeler ve ampullerin tatbikinde aşağıda belirtilen sıra takip edilmiştir : 1) Sodyum novaminsülfonatın metanoldeki %1'lik çözeltisi; 2) Piridoksin hidroklorürün %1'lik çözeltisi; 3) Piridoksin dimerin metanoldeki %1'lik çözeltisi; 4) 4-Piridoksik asidin 0.1N sodyum hidroksiddeki % 1'lik çözeltisi; 5) Piridoksal hidroklorürün %1'lik çözeltisi; 6) A-5 serisi "a" çözeltisi; 7) A-5 serisi "b" çözeltisi; 8) A-5 serisi "c" çözeltisi; 9) A-5 serisi "d" çözeltisi; 10) A-5 serisi "e" çözeltisi; 11) A-5 serisi "f" çözeltisi; 12) A-5 serisi "g" çözeltisi; 13) A-5 serisi "h" çözeltisi.



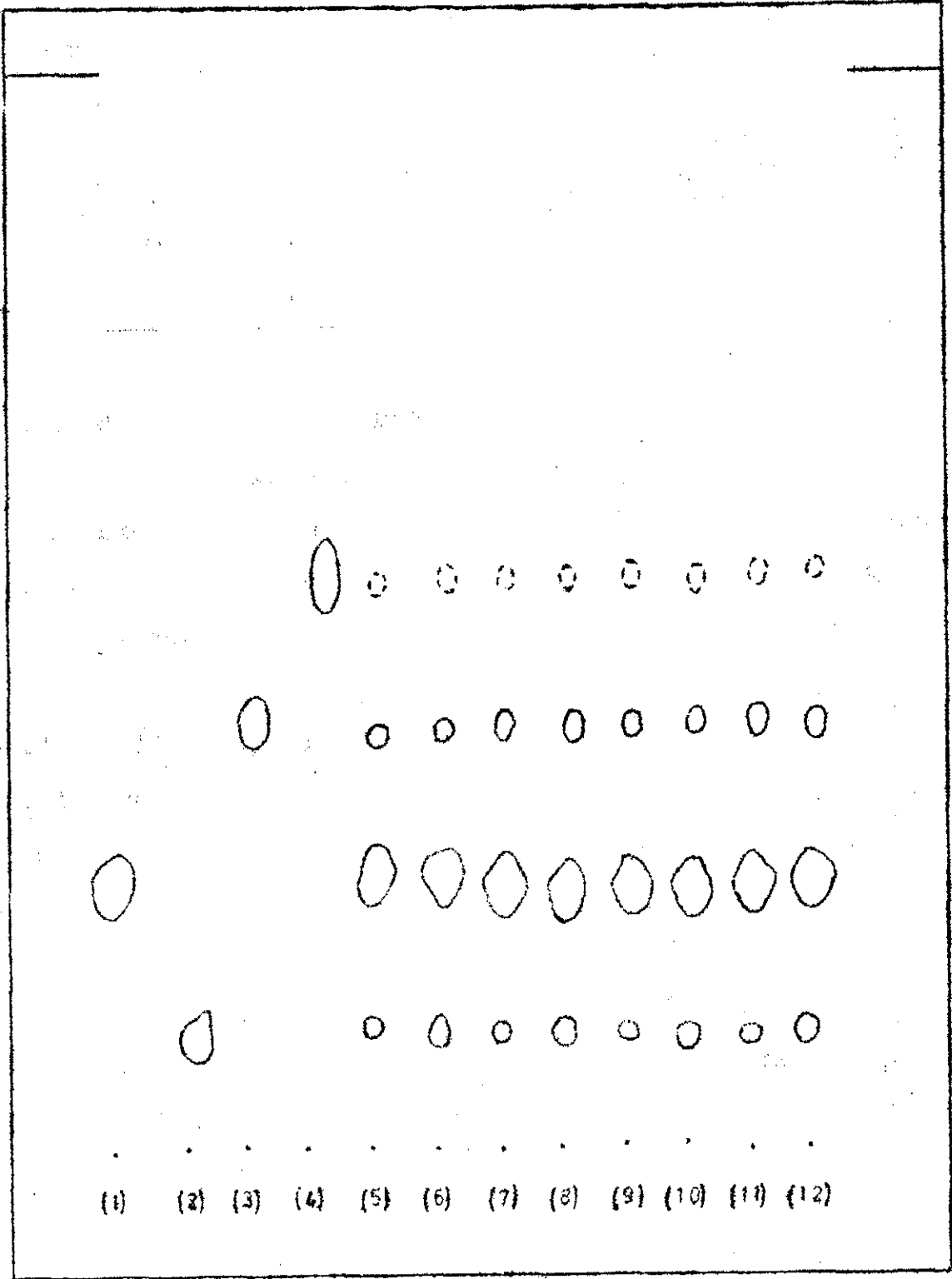
Kromatogram 13 : Şahit maddeler ve ampullerin, yukarda belirtilen sıra takip edilerek, silikagel HF₂₅₄ tabakalarında, etil asetat-aseton-dimetilformamid-amonyak-diethylamin (80:40:14:6:0.2) solvan sistemi ile gözlenmesi.

Süre	R E N K L İ				R E N K S İ Z			
	Azotlu		Azotsuz		Azotlu		Azotsuz	
	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C
10. Gün	9.33	10.00	12.00	12.67	13.33	14.67	16.00	18.00
180. Gün	18.00 a	18.67 b	21.33 c	21.33 d	24.67 e	26.00 f	28.67 g	30.67 h

Tablo 10 : Kaynatılmış, soğutulmuş, 2 saat azot gazı geçirilerek moleküler oksijeni minimuma indirilmiş distile su ile %5 (a/h) konsantrasyonda piridoksin hidroklorür ve koruyucu olarak % 0.005 (a/h) konsantrasyonda tiyoüre içeren ve genel şemaya göre dallandırılarak hazırlanmış (A-6 serisi) enjektabl çözeltilerin, 10. ve 180. gün sonundaki miktar tayini sonuçları (yüzde kayıp olarak).

Aynı seri (A-6) enjektabl çözeltilerde 180. gün sonundaki durum kromatografik yöntemle de gözlemlenmiştir. Kromatografide, miktar tayininde kullanılan kromatografi sistemi ve 50 mcg piridoksin hidroklorüre eşdeğer ampul çözeltisi kullanılmıştır.

Uygulamada şahit maddeler ve ampullerin tatbikinde aşağıda belirtilen sıra takip edilmiştir : 1) Piridoksin hidroklorürün %1'lik çözeltisi; 2) Piridoksin dimerin metanoldeki %1'lik çözeltisi; 3) 4-Piridoksik asidin 0.1N sodyum hidroksiddeki % 1'lik çözeltisi; 4) Piridoksal hidroklorürün %1'lik çözeltisi; 5) A-6 serisi "a" çözeltisi; 6) A-6 serisi "b" çözeltisi; 7) A-6 serisi "c" çözeltisi; 8) A-6 serisi "d" çözeltisi; 9) A-6 serisi "e" çözeltisi; 10) A-6 serisi "f" çözeltisi; 11) A-6 serisi "g" çözeltisi; 12) A-6 serisi "h" çözeltisi.



Kromatogram 14 : Şahit maddeler ve ampullerin, yukarda belirtilen sıra takip edilerek, silikagel HF₂₅₄ tabakalarında, etil asetat-aseton-dimetilformamid-amonyak-diethylamin (80:40:14:6:0.2) solvan sistemi ile gözlenmesi.

Süre	RENKLİ				RENKSİZ			
	Azotlu		Azotsuz		Azotlu		Azotsuz	
	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C
10. Gün	9.33	10.67	12.00	13.33	13.33	16.00	16.00	18.00
180. Gün	18.67 a	19.33 b	21.33 c	22.67 d	26.00 e	28.67 f	29.33 g	32.00 h

Tablo 11: Kaynatılmış, soğutulmuş, 2 saat azot gazı geçirilerek moleküler oksijeni minimuma indirilmiş distile su ile, %5 (a/h) konsantrasyonda piridoksin hidroklorür, % 50 (a/h) konsantrasyonda sodyum novaminsülfonat ve koruyucu olarak %0.005 (a/h) konsantrasyonda tiyoüre içeren ve genel şemaya göre dallandırılarak hazırlanmış (A-7 serisi) kombine enjektabl çözeltilerin 10. ve 180. gün sonundaki miktar tayini sonuçları (yüzde kayıp olarak).

Aynı seri (A-7) kombine enjektabl çözeltilerde 180.gün sonundaki durum kromatografik yöntemle de gözlenmiştir. Kromatografide, miktar tayininde kullanılan kromatografi sistemi ve 50mcg piridoksin hidroklorüre eşdeğer ampul çözeltisi kullanılmıştır.

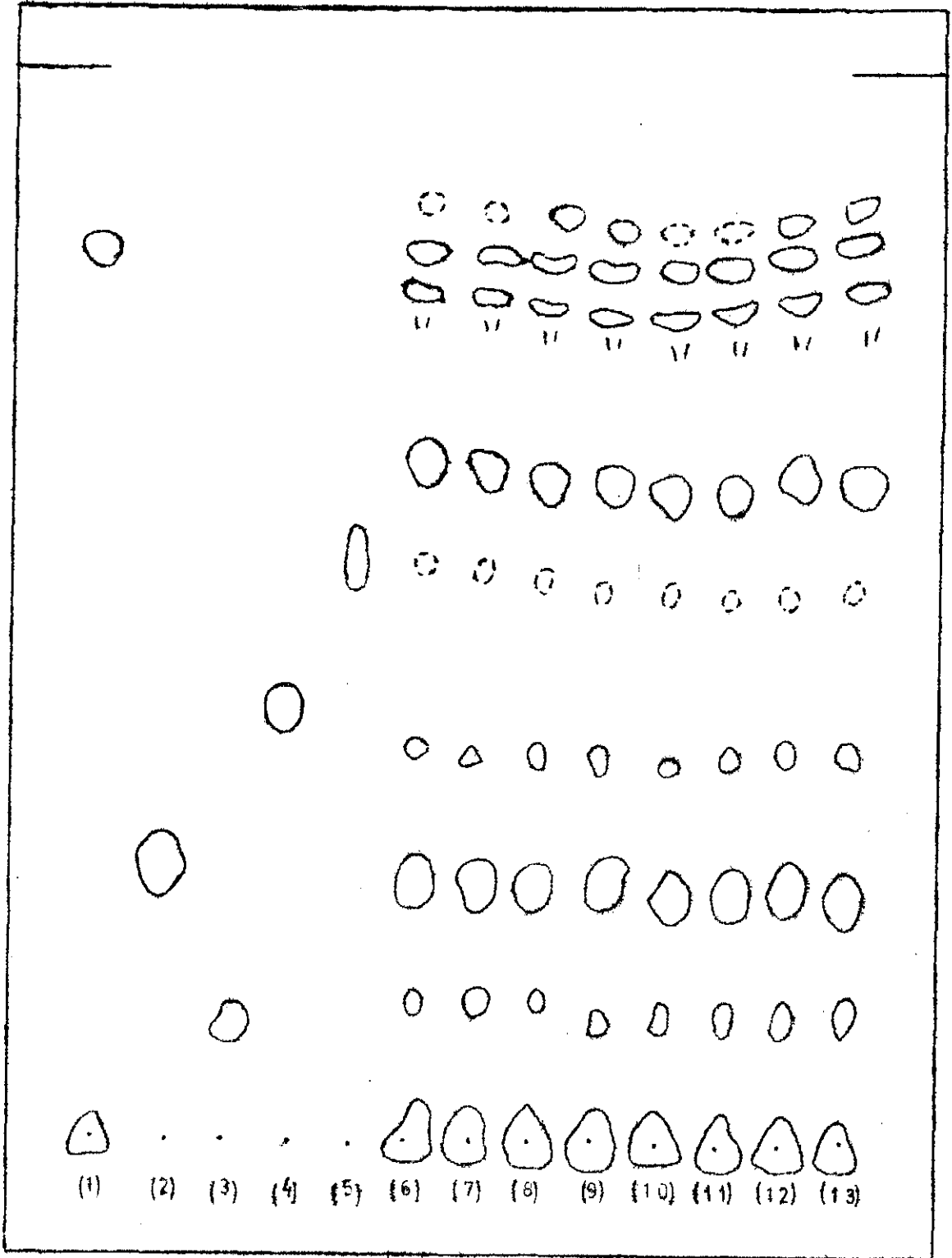
Uygulamada şahit maddeler ve ampullerin tatbikinde aşağıda belirtilen sıra takip edilmiştir: 1) Sodyum novaminsülfonatın metanoldeki %1'lik çözeltisi; 2) Piridoksin hidroklorürün %1'lik çözeltisi; 3) Piridoksin dimerin metanoldeki %1'lik çözeltisi; 4) 4-Piridoksik asidin 0.1N sodyum hidroksiddeki %1'lik çözeltisi; 5) Piridoksal hidroklorürün %1'lik çözeltisi; 6) A-7 serisi "a" çözeltisi; 7) A-7 serisi "b" çözeltisi; 8) A-7 serisi "c" çözeltisi; 9) A-7 serisi "d" çözeltisi; 10) A-7 serisi "e" çözeltisi; 11) A-7 serisi "f" çözeltisi; 12) A-7 serisi "g" çözeltisi; 13) A-7 serisi "h" çözeltisi.

Süre	R E N K L İ				R E N K S İ Z			
	Azotlu		Azotsuz		Azotlu		Azotsuz	
	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C
10.Gün	0.67	1.33	1.33	2.00	4.67	5.33	6.00	7.33
180.Gün	7.33 a	8.67 b	9.33 c	9.33 d	14.67 e	16.00 f	17.33 g	18.67 h

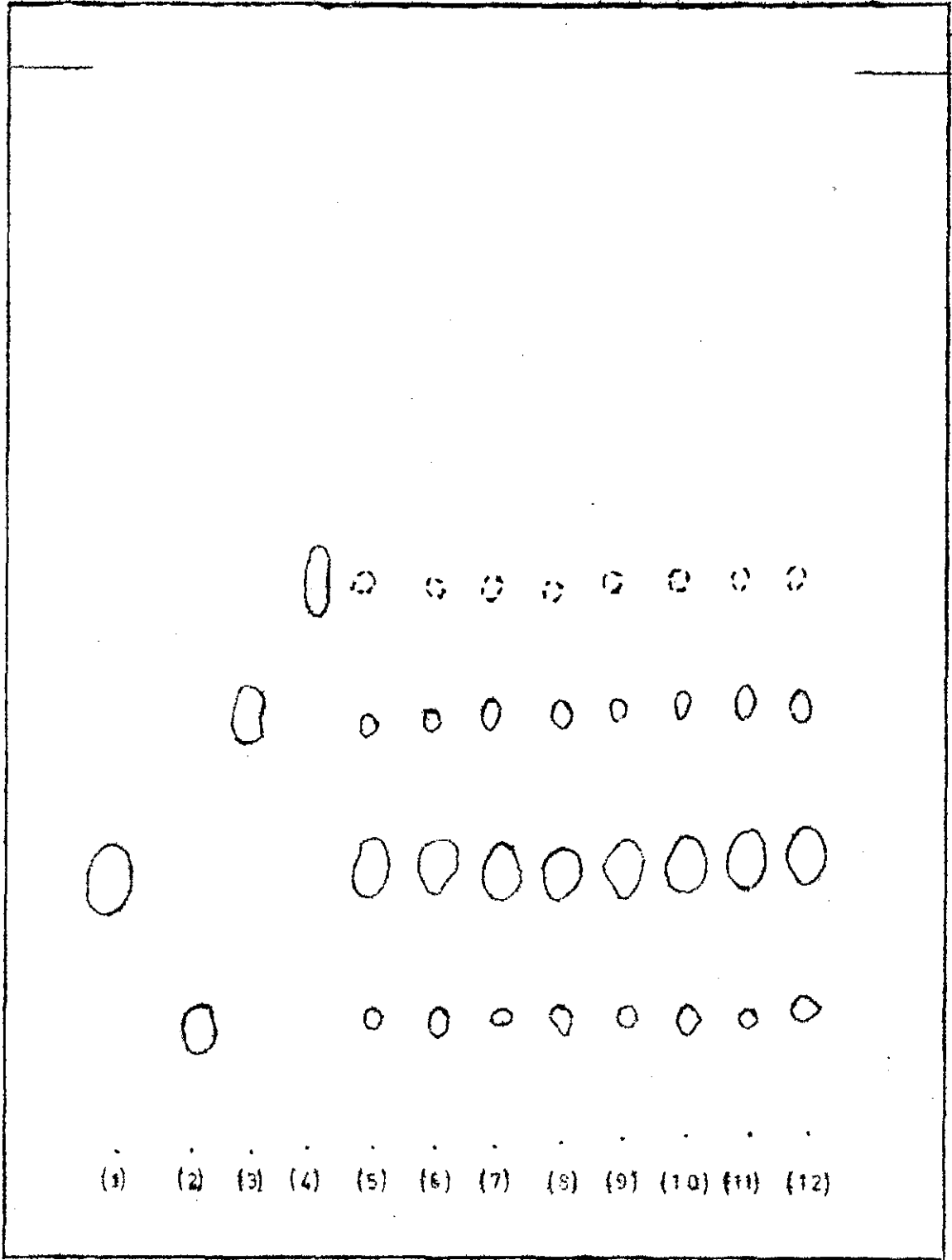
Tablo 12: Kaynatılmış, soğutulmuş, 2 saat azot gazı geçirilerek moleküler oksijeni minimuma indirilmiş distile su ile, %5 (a/h) konsantrasyonda piridoksin hidroklorür ve koruyucu olarak % 0.075 (a/h) konsantrasyonda disodyum edetat içeren ve genel şemaya göre dallandırılarak hazırlanmış (A-8 serisi) enjektabl çözeltilerin, 10. ve 180. gün sonundaki miktar tayini sonuçları (yüzde kayıp olarak).

Aynı seri (A-8) enjektabl çözeltilerde 180. gün sonundaki durum kromatografik yöntemle de gözlenmiştir. Kromatografide, miktar tayininde kullanılan kromatografi sistemi ve 50 mcg piridoksin hidroklorüre eşdeğer ampul çözeltisi kullanılmıştır.

Uygulamada şahit maddeler ve ampullerin tatbikinde aşağıda belirtilen sıra takip edilmiştir: 1) Piridoksin hidroklorürün %1'lik çözeltisi; 2) Piridoksin dimerin metanoldeki %1'lik çözeltisi; 3) 4-Piridoksik asidin 0.1N sodyum hidroksiddeki %1'lik çözeltisi; 4) Piridoksal hidroklorürün %1'lik çözeltisi; 5) A-8 serisi "a" çözeltisi; 6) A-8 serisi "b" çözeltisi; 7) A-8 serisi "c" çözeltisi; 8) A-8 serisi "d" çözeltisi; 9) A-8 serisi "e" çözeltisi; 10) A-8 serisi "f" çözeltisi; 11) A-8 serisi "g" çözeltisi; 12) A-8 serisi "h" çözeltisi.



Kromatogram 15 : Şahit maddeler ve ampullerin, yukaride belirtilen sıra takip edilerek, silikagel HF₂₅₄ tabakalarında, etil asetat-aseton-dimetilformamid-amonyak-diethylamin (80:40:14:6:0.2) solvan sistemi ile gözlenmesi.



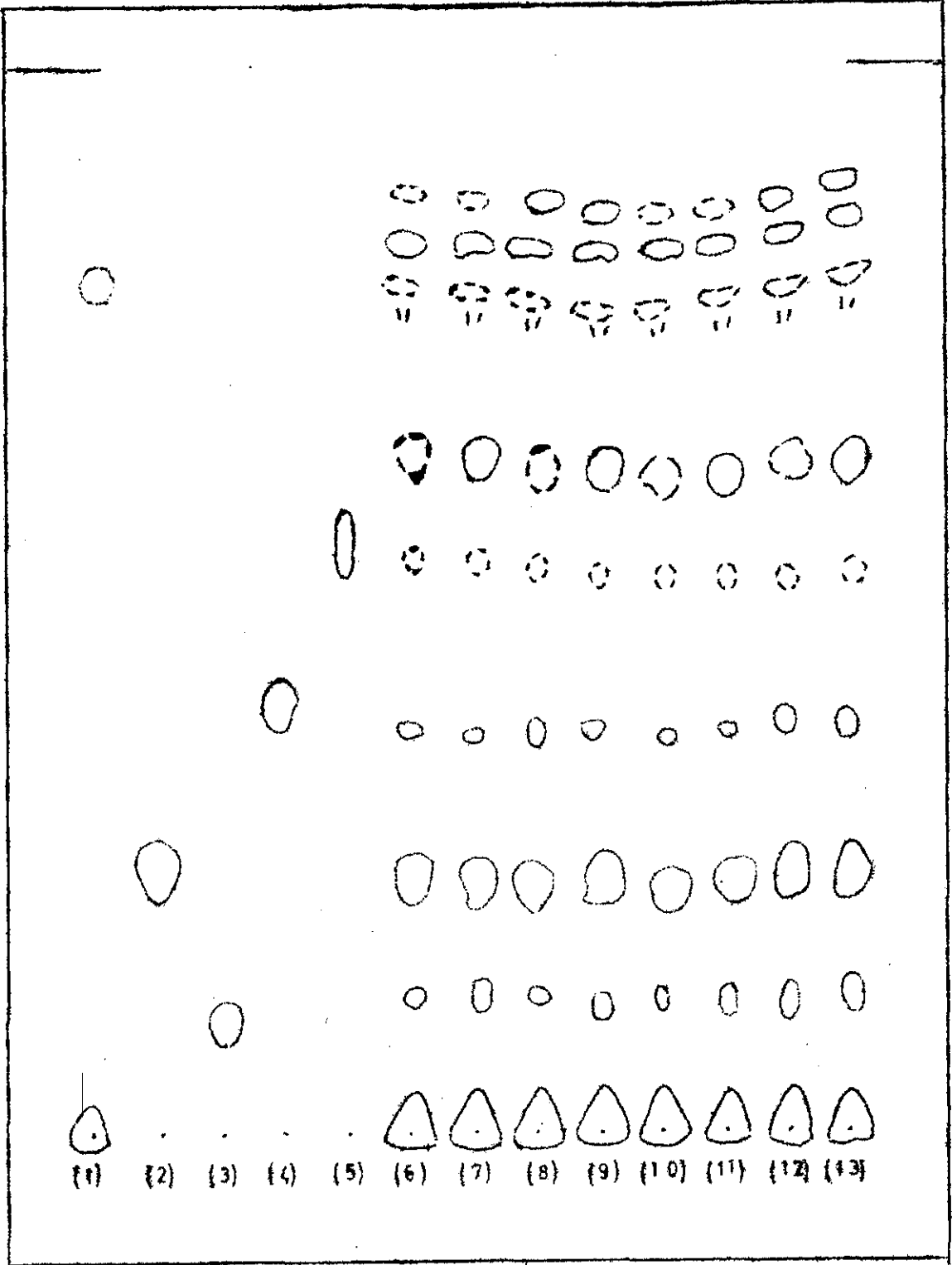
Kromatogram 16 : Şahit maddeler ve ampullerin, yukarıda belirtilen sıra takip edilerek, silikagel HF₂₅₄ tabakalarında, etil asetat-aseton-dimetilformamid-amonyak-dietilamin (80:40:14:6:0.2) solvan sistemi ile gözlenmesi.

Süre	RENKLİ				RENKSİZ			
	Azotlu		Azotsuz		Azotlu		Azotsuz	
	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C
10.Gün	6.00	8.00	8.67	10.00	10.67	12.00	12.67	14.00
180.Gün	14.67 _a	16.67 _b	17.33 _c	19.33 _d	22.67 _e	24.00 _f	25.33 _g	26.67 _h

Tablo 13 : Kaynatılmış, soğutulmuş, 2 saat azot gazı geçirilerek moleküler oksijeni minimuma indirilmiş distile su ile, %5 (a/h) konsantrasyonda piridoksin hidroklorür, %50 (a/h) konsantrasyonda sodyum novaminsülfonat ve koruyucu olarak %0.075 (a/h) konsantrasyonda disodyum edetat içeren ve genel şemaya göre dalandırılarak hazırlanmış (A-9 serisi) kombine enjektabl çözeltilerin 10. ve 180. gün sonundaki miktar tayini sonuçları (yüzde kayıp olarak).

Aynı seri (A-9) kombine enjektabl çözeltilerde, 180.gün sonundaki durum kromatografik yöntemle de gözlenmiştir. Kromatografide, miktar tayininde kullanılan kromatografi sistemi ve 50mcg piridoksin hidroklorüre eşdeğer ampul çözeltisi kullanılmıştır.

Uygulamada şahit maddeler ve ampullerin tatbikinde aşağıda belirtilen sıra takip edilmiştir : 1) Sodyum novaminsülfonatın metanoldeki %1'lik çözeltisi; 2) Piridoksin hidroklorürün %1'lik çözeltisi; 3) Piridoksin dimerin metanoldeki %1'lik çözeltisi; 4) 4-Piridoksik asidin 0.1N sodyum hidroksiddeki %1'lik çözeltisi; 5) Piridoksal hidroklorürün %1'lik çözeltisi; 6) A-9 serisi "a" çözeltisi; 7) A-9 serisi "b" çözeltisi; 8) A-9 serisi "c" çözeltisi; 9) A-9 serisi "d" çözeltisi; 10) A-9 serisi "e" çözeltisi; 11) A-9 serisi "f" çözeltisi; 12) A-9 serisi "g" çözeltisi; 13) A-9 serisi "h" çözeltisi.



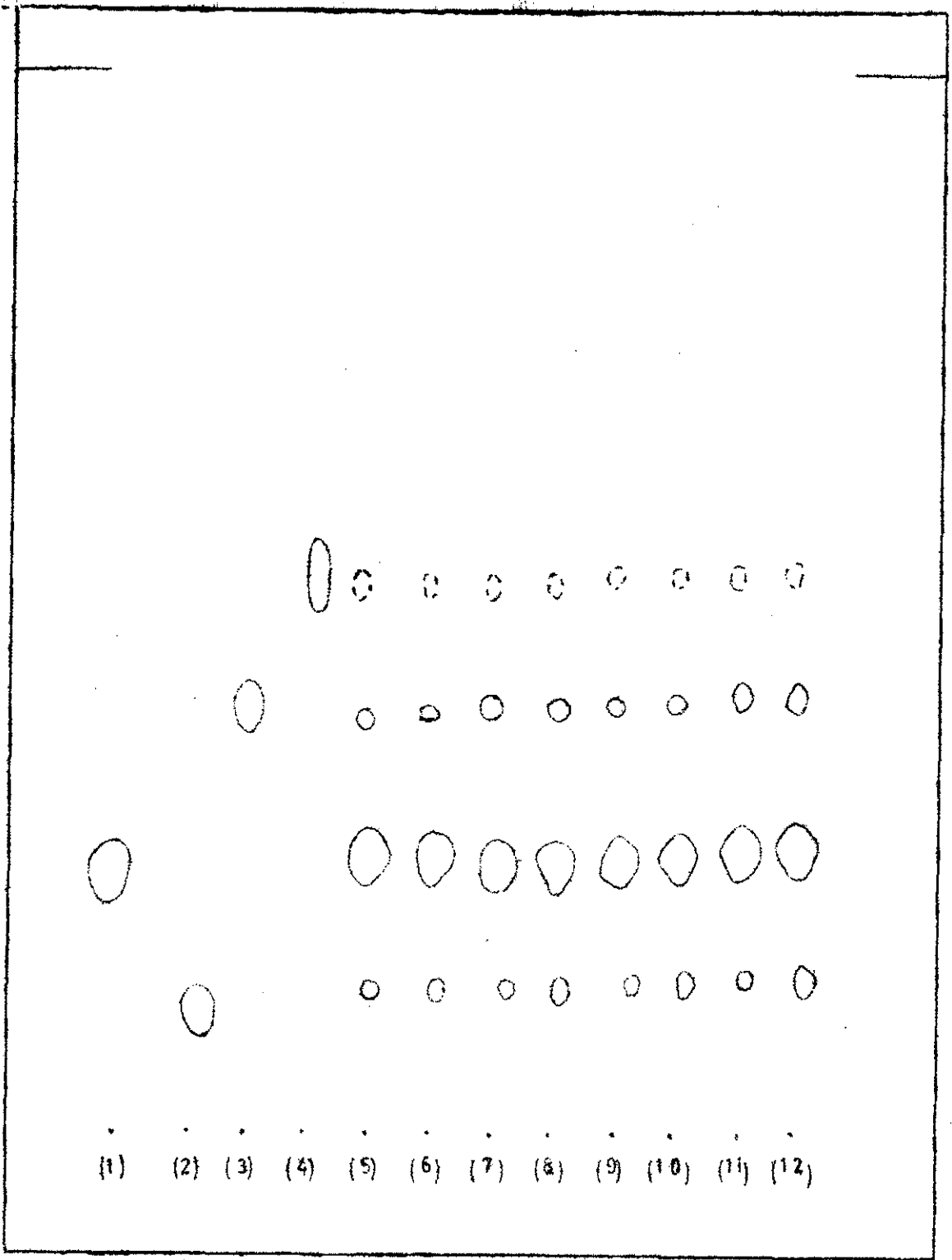
Kromatogram 17 : Şahit maddeler ve ampullerin, yukarıda belirtilen sıra takip edilerek, silikagel HF₂₅₄ tabakalarında, etil asetat - aseton - dimetilformamid - amonyak - dietilamin (80:40:14:6:0.2) solvan sistemi ile gözlenmesi.

Süre	R E N K L İ				R E N K S İ Z			
	Azotlu		Azotsuz		Azotlu		Azotsuz	
	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C
10.Gün	9.33	10.67	12.00	12.67	13.33	15.33	16.00	18.00
180.Gün	17.33 a	18.67 b	20.67 c	20.67 d	24.67 e	26.67 f	28.00 g	30.67 h

Tablo 14: Kaynatılmış, soğutulmuş, 2 saat azot gazı geçirilerek moleküler oksijeni minimuma indirilmiş distile su ile, %5 (a/h) konsantrasyonda piridoksin hidroklorür ve koruyucu olarak %0.15 (a/h) konsantrasyonda sodyum formaldehidsulfoksilat içeren ve genel şemaya göre dallandırılarak hazırlanmış (A-10 serisi) enjektabl çözeltilerin 10. ve 180. gün sonundaki miktar tayini sonuçları (yüzde kayıp olarak).

Aynı seri (A-10) enjektabl çözeltilerde 180. gün sonundaki durum kromatografik yöntemle de gözlenmiştir. Kromatografide, miktar tayininde kullanılan kromatografi sistemi ve 50 mcg piridoksin hidroklorüre eşdeğer ampul çözeltisi kullanılmıştır.

Uygulamada şahit maddeler ve ampullerin tatbikinde aşağıda belirtilen sıra takip edilmiştir : 1) Piridoksin hidroklorürün %1'lik çözeltisi; 2) Piridoksin dimerin metanoldeki %1'lik çözeltisi; 3) 4-Piridoksik asidin 0.1N sodyum hidroksiddeki %1'lik çözeltisi; 4) Piridoksal hidroklorürün %1'lik çözeltisi; 5) A-10 serisi "a" çözeltisi; 6) A-10 serisi "b" çözeltisi; 7) A-10 serisi "c" çözeltisi; 8) A-10 serisi "d" çözeltisi; 9) A-10 serisi "e" çözeltisi; 10) A-10 serisi "f" çözeltisi; 11) A-10 serisi "g" çözeltisi; 12) A-10 serisi "h" çözeltisi.



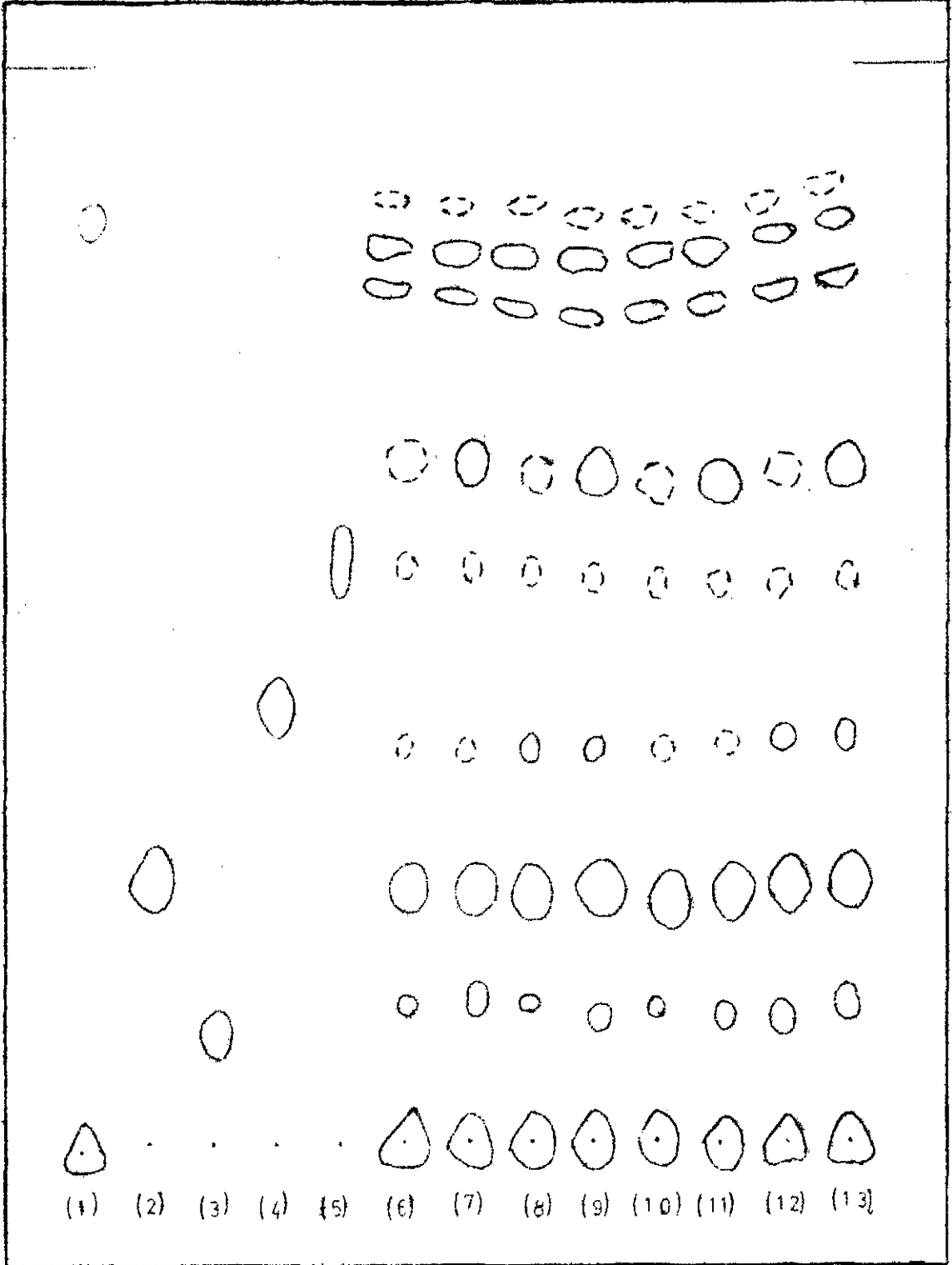
Kromatogram 18 : Şahit maddeler ve ampullerin, yukarıda belirtilen sıra takip edilerek, silikagel HF₂₅₄ tabakalarında, etil asetat - aseton - dimetilformamid - amonyak - dietilamin (80:40:14:6:0.2) solvan sistemi ile gözlenmesi.

Süre	R E N K L İ				R E N K S İ Z			
	Azotlu		Azotsuz		Azotlu		Azotsuz	
	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C
10.Gün	10.67	12.67	14.00	16.00	17.33	18.67	19.33	21.33
180.Gün	20.00 _a	22.00 _b	24.00 _c	26.00 _d	29.33 _e	31.33 _f	32.67 _g	34.67 _h

Tablo 15 : Kaynatılmış, soğutulmuş, 2 saat azot gazı geçirilerek moleküler oksijeni minimuma indirilmiş distile su ile, %5 (a/h) konsantrasyonda piridoksin hidroklorür, %50 (a/h) konsantrasyonda sodyum novaminsülfonat ve koruyucu olarak %0.15 (a/h) konsantrasyonda sodyum formaldehidsulfoksilat içeren ve genel şemaya göre dallandırılarak hazırlanmış (A-11 serisi) kombine enjektabl çözeltilerin 10. ve 180. gün sonundaki miktar tayini sonuçları (yüzde kayıp olarak).

Aynı seri (A-11) kombine enjektabl çözeltilerde, 180. gün sonundaki durum kromatografik yöntemle de gözlenmiştir. Kromatografide miktar tayininde kullanılan kromatografi sistemi ve 50mcg piridoksin hidroklorüre eşdeğer ampul çözeltisi kullanılmıştır.

Uygulamada şahit maddeler ve ampullerin tatbikinde aşağıda belirtilen sıra takip edilmiştir : 1) Sodyum novaminsülfonatın metanoldeki %1'lik çözeltisi; 2) Piridoksin hidroklorürün %1'lik çözeltisi; 3) Piridoksin dimerin metanoldeki %1'lik çözeltisi; 4) 4-Piridoksik asidin 0.1N sodyum hidroksiddeki %1'lik çözeltisi; 5) Piridoksal hidroklorürün %1'lik çözeltisi; 6) A-11 serisi "a" çözeltisi; 7) A-11 serisi "b" çözeltisi; 8) A-11 serisi "c" çözeltisi; 9) A-11 serisi "d" çözeltisi; 10) A-11 serisi "e" çözeltisi; 11) A-11 serisi "f" çözeltisi; 12) A-11 serisi "g" çözeltisi; 13) A-11 serisi "h" çözeltisi.



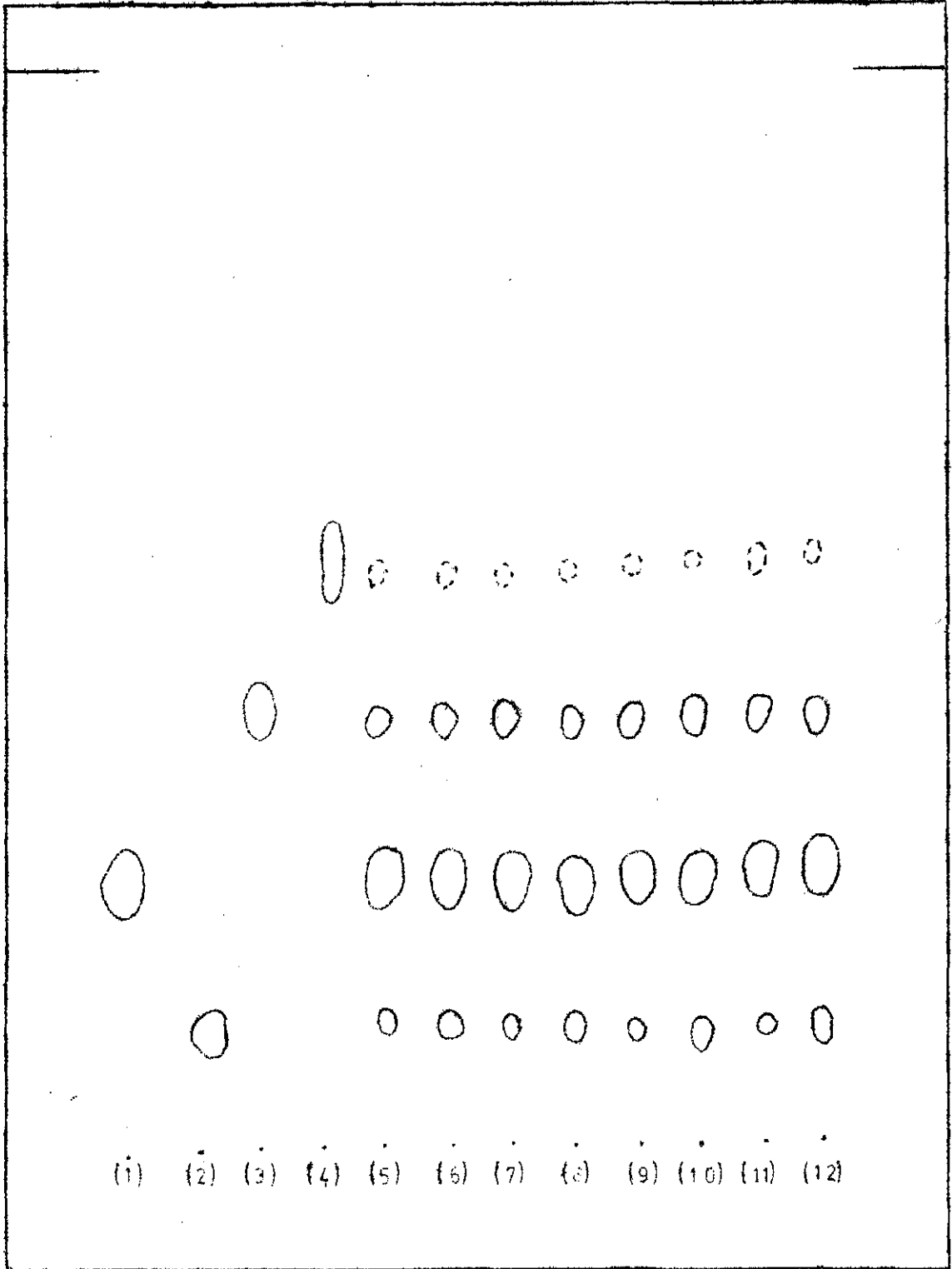
Kromatogram 19 : Şahit maddeler ve ampullerin, yukarıda belirtilen sıra takip edilerek, silikagel HF₂₅₄ tabakalarında, etil asetat - aseton - dimetilformamid - amonyak - dietilamin (80:40::14:6:0.2) solvan sistemi ile gözlenmesi.

Süre	R E N K L İ				R E N K S İ Z			
	Azotlu		Azotsuz		Azotlu		Azotsuz	
	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C
10.Gün	8.67	10.67	11.33	12.67	12.67	14.67	15.33	17.33
180.Gün	17.33 _a	19.33 _b	20.00 _c	22.00 _d	24.67 _e	26.67 _f	28.00 _g	30.00 _h

Tablo 16 : Kaynatılıp soğutulmuş su ile, % 5 (a/h) konsantrasyonda piridoksin hidroklorür içeren ve genel şemaya göre dallandırılarak hazırlanmış (B-1 serisi) enjektabl çözeltilerin, 10. ve 180. gün sonundaki miktar tayini sonuçları (yüzde kayıp olarak).

Aynı seri (B-1) enjektabl çözeltilerdeki durum 180. gün sonunda, kromatografik yöntemle de gözlemlendi. Kromatogramlarda, miktar tayininde kullanılan kromatografi sistemi ve 50 mcg piridoksin hidroklorüre eşdeğer ampul çözeltisi kullanılmıştır.

Uygulamada şahit maddeler ve ampullerin tatbikinde aşağıda belirtilen sıra takip edilmiştir : 1) Piridoksin hidroklorürün % 1'lik çözeltisi; 2) Piridoksin dimerin metanoldeki % 1'lik çözeltisi; 3) 4-Piridoksik asidin 0.1 N sodyum hidroksiddeki % 1'lik çözeltisi; 4) Piridoksal hidroklorürün % 1'lik çözeltisi; 5) B-1 serisi "a" çözeltisi; 6) B-1 serisi "b" çözeltisi; 7) B-1 serisi "c" çözeltisi; 8) B-1 serisi "d" çözeltisi; 9) B-1 serisi "e" çözeltisi; 10) B-1 serisi "f" çözeltisi ; 11) B-1 serisi "g" çözeltisi; 12) B-1 serisi "h" çözeltisi.



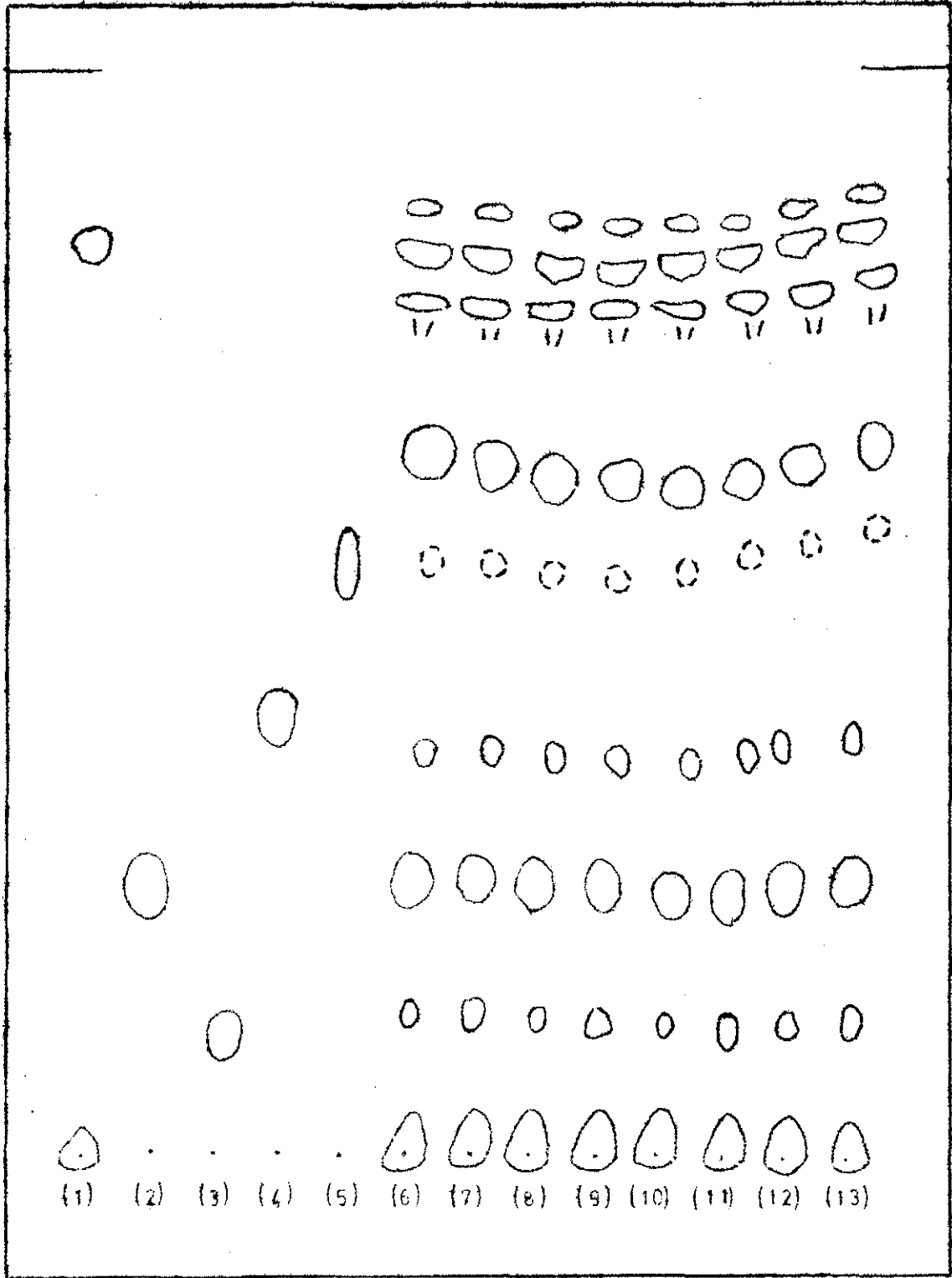
Kromatogram 20 : Şahit maddeler ve ampullerin, yukarıda belirtilen sıra takip edilerek, silikagel HF₂₅₄ tabakalarında, etil asetat - aseton - dimetilformamid - amonyak - dietilamin (80:40:14:6:0.2) solvan sistemi ile gözlenmesi.

Süre	R E N K L İ				R E N K S İ Z			
	Azotlu		Azotsuz		Azotlu		Azotsuz	
	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C	100°C	120°C
10.Gün	11.33	12.67	14.00	16.00	17.33	18.67	18.67	20.67
180.Gün	20.67 _a	22.00 _b	24.00 _c	26.00 _d	29.33 _e	31.33 _f	32.67 _g	34.67 _h

Tablo 17 : Kaynatılıp, soğutulmuş su ile % 5 (a/h) piri-
doksin hidroklorür ve % 50 (a/h) konsantrasyonda sodyum novamin-
sülfonat içeren ve genel şemaya göre dallandırılarak hazırlanmış
(B-2 serisi) bileşik enjektabl çözeltilerin, 10. ve 180. gün so-
nundaki miktar tayini sonuçları (yüzde kayıp olarak).

Aynı seri (B-1) bileşik enjektabl çözeltilerde, 180. gün
sonundaki durum, kromatografik yöntemle de gözlenmiştir. Kromatog-
rafide, miktar tayininde kullanılan kromatografi sistemi ve 50mcg
piridoksin hidroklorüre eşdeğer ampul çözeltisi kullanılmıştır.

Uygulamada şahit maddeler ve ampullerin tatbikinde aşağı-
da belirtilen sıra takip edilmiştir : 1) Sodyum novaminsülfonatin
metanoldeki % 1'lik çözeltisi; 2) Piridoksin hidroklorürün % 1'lik
çözeltisi; 3) Piridoksin dimerin metanoldeki % 1'lik çözeltisi;
4) 4-Piridoksik asidin 0.1 N sodyum hidroksiddeki % 1'lik çözel-
tisi; 5) Piridoksal hidroklorürün % 1'lik çözeltisi ; 6) B-2 se-
risi "a" çözeltisi; 7) B-2 serisi "b" çözeltisi; 8) B-2 serisi
"c" çözeltisi; 9) B-2 serisi "d" çözeltisi; 10) B-2 serisi "e"
çözeltisi; 11) B-2 serisi "f" çözeltisi; 12) B-2 serisi "g" çö-
zeltisi; 13) B-2 serisi "h" çözeltisi.



Kromatogram 21 : Şahit maddeler ve ampullerin, yukarıda belirtilen sıra takip edilerek, silikagel HF₂₅₄ tabakalarında, etil asetat - aseton - dimetilformamid - amonyak - dietilamin (80:40:14:6:0.2) solvan sistemi ile gözlenmesi.

B- MADDELERİN İNCE TABAKA KROMATOGRAMINDAN ELÜSYON
İLE KAZANILMASI

Bu gaye ile %5 (a/h) konsantrasyonda piridoksin hidroklorür ve %50 (a/h) konsantrasyonda sodyum novaminsülfonat içeren ampullerden bir seri hazırlandı. Üç ay laboratuvar şartlarında bekletildi. Silikagel HF₂₅₄ tabakalarına, kantitatif tatbik aleti ile, preparatif olarak tatbik edildi. Daha önce belirtildiği üzere 17 cm sürüklendi. Kromatogramlar karanlıkta, oda hararetinde kurutuldu. Lekeler UV ışık altında, mümkün olduğu kadar kısa sürede işaretlendi. Çalışmada madde 4 ve madde 5 için bu şekilde 150 kromatogram, diğerleri için de 90 kromatogram sürüklendi. Oda hararetinde kurutulmuş kromatogramda, maddelere ait adsorban tabakası kazınarak selofan kağıdı içinde toplandı ve vakumlu desikatörde karanlıkta saklandı. Maddelerin en kısa sürede adsorbandan elüsyon ile kazanılmasına çalışıldı.

Kromatogram 8'de ince tabaka kromatografisinde ayrılan maddeler 1 ila 9 arasında numaralandırılmıştır. Her maddenin adsorbandan elüsyonu için kullanılan yöntem aşağıda açıklanmıştır:

MADDE 2: Kazınan adsorban tabakaları hacminin iki misli metanol ile muamele edildi, iyice karıştırıldı, 40 C°'de su banyosunda 20 dakika ısıtıldı, süzüldü. Berrak kısım üzerine damla damla soğuk su ilave ederek madde kristallendirildi. E.D.: 206-210°C

MADDE 4: Kazınan adsorbanlar mümkün olduğu kadar az, 0.1 N sodyum hidroksid çözeltisi ile karıştırıldı, şiddet ile çalkalandı, süzüldü. Üzerine damla damla derişik hidroklorik asid ilave ederek, madde kristallendirildi. E.D.: 248-249°C

MADDE 5: Kazınan adsorbanlar hacminin iki misli etil alkol ile karıştırıldı, iyice çalkalandı, süzüldü. Bu işlem, adsorban 2,6-diklorokinon-klorimid reaktifi ile renk vermeyinceye kadar tekrarlandı. Süzüntüler birleştirildi, 40°C'de alçak basınç altında 2-3 ml'ye yoğunlaştırıldı. Etanol-eter karışımında (1:1), billurlandırıldı, E.D.: 165°C

MADDE 6: Madde adsorbandan 2,6 diklorokinon-klorimid ile renk vermeyinceye kadar, aseton ile elue edildi. Süzüntüler birleştirilip, 40°C'de alçak basınç altında, 2-3 ml'ye yoğunlaştırıldı. Madde aseton-karbontetraklorür karışımında (1:1), buz dolabında kristallendirildi. E.D.:

MADDE 9: Kazınan adsorban dilüe hidroklorik asid ve suyun eşit hacımdaki karışımı ile muamele edildi, iyice çalkalandı. Seyreltik amonyak ile hafif alkale yapıldı. Beş defa 20 ml kloroform ile, ayırma hunisinde ekstre edildi. Ayrılan kloroform tabakaları, kloroform ile ıslatılmış, süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntü 40°C'de, alçak basınç altında kuruyuncaya kadar uçuruldu. E.D.: 107-109°C

Yukarda açıklandığı üzere elüe edilip kristallendirilen maddeler, vakumlu desikatörde kalsyum oksid ile kurutuldu, erime dereceleri ve ilerde üzerinde durulan diğer teşhisler yapıldı.

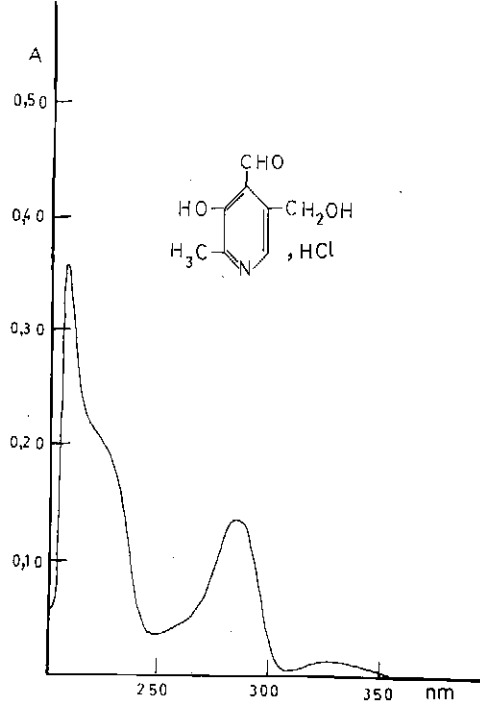
C- TEŞEKKÜL EDEN MADDELERİN SPEKTRAL ANALİZLERİ

Piridoksin hidroklorür ve piridoksin hidroklorür-sodyum novaminsülfonat kombine enjektabl çözeltilerinde parçalanma sonucu oluşan maddelerin yapılarını aydınlatmak amacı ile, bekletilmiş piridoksin hidroklorür ve piridoksin hidroklorür-sodyum novaminsülfonat kombine ampul çözeltilerinden, preparatif ince tabaka kromatografisi ile kazanılan maddelerin spektral analizleri de gerçekleştirilmiştir. Mümkün olan durumlarda şahit maddeler ile, ince tabaka kromatogramlarından elusyon yolu ile kazanılan maddelerin spektrumları mukayese imkanı sağlanabilmesi için birlikte verilmiştir. Parçalanma ürünleri kromatogram 8'de belirtilen numaralar ile ifade edilmiştir.

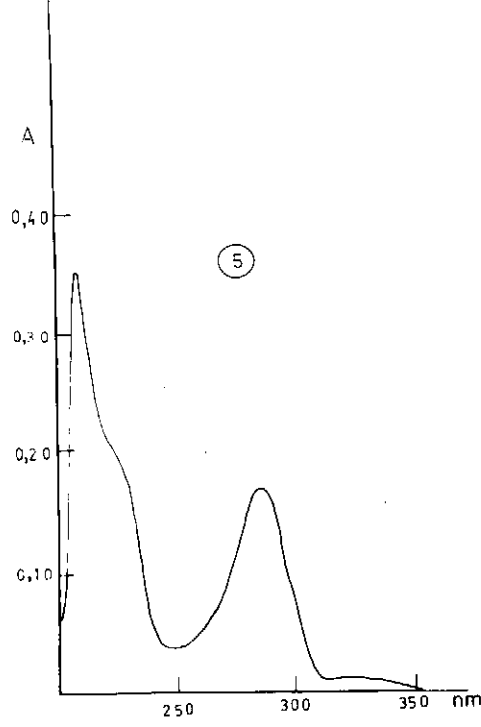
a- PİRİDOKSAL HİDROKLORÜR VE 5 NOLU ŞÜPHELİ MADDENİN SPEKTRAL ANALİZLERİ

1- UV SPEKTRAL ANALİZLERİ

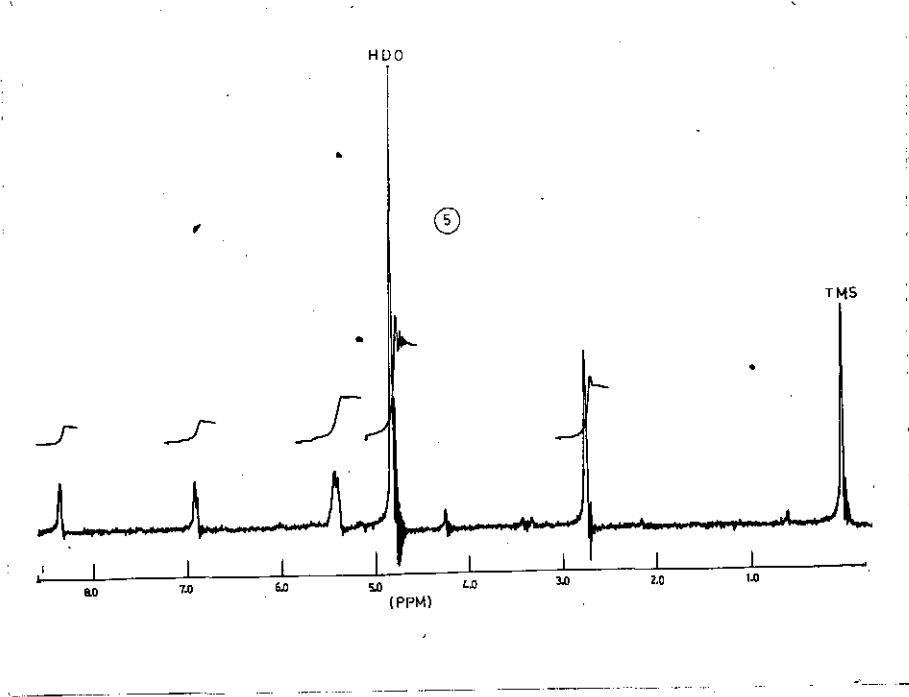
2 mg piridoksal hidroklorür ve ince tabaka kromatogramlarından elusyon yolu ile kazanılan 5 nolu şüpheli madde (kromatogram 8) 100'er ml susuz metanolde çözüldü, dakikada 50 nm tarama hızı ile, şahit olarak metanol kullanılarak UV spektrumları alındı (Spektrum 1 ve 2). Spektrumlarda görüldüğü gibi piridoksal hidroklorür ve şüpheli madde için maksimum absorpsiyonlar 207 nm ve 285 nm'de tespit edilmiştir.



Spektrum 1 : % 2 (a/h) konsantrasyonda piridoksal hidro-
klorürün susuz metanoldeki UV spektrumu
(Tarama hızı 50 nm/dak., kaydetme hızı
1 inc/dak. ve tabaka kalınlığı 1.0 cm)



Spektrum 2 : Bekletilmiş piridoksin hidroklorür ve piridoksin hidroklorür-sodyum novaminsülfonat ampul çözeltilerinden preparatif ince tabaka kromatografisi ile ayrılan 5 nolu şüpheli maddenin susuz metanoldeki, % 2 (a/h) konsantrasyondaki çözeltisinin UV spektrumu (Tarama hızı 50 nm/dak., kaydetme hızı 1 inc/dak. ve tabaka kalınlığı 1.0 cm).



Spektrum 6 : Bekletilmiş piridoksin hidroklorür ve piridoksin hidroklorür-sodyum novaminsülfonat ampul çözeltilerinden preparatif ince tabaka kromatografisi ile ayrılan 5 nolu maddenin dötronlanmış sudaki NMR spektrumu..

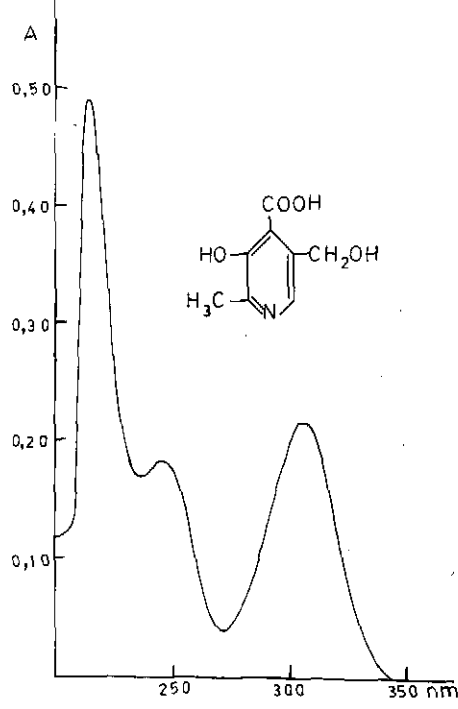
Gözlenen sinyaller ve değerlendirilmeleri şu şekildedir: Piridoksal ve türevlerinde aldehid grubu ile 5-hidroksimetil grubu arasında interaksiyon sonucu, hemiasetal teşekkülü ihtimaline bağlı olarak, durum karışıktır. Piridin aldehidlerin $RCH(OH)_2$ genel formülü ile gösterilen hidrate şekile geçme eğilimlerinin olduğu gösterilmiştir (Korytnyk, W. ve R.P. Singh; J.Am.Chem.Soc.: 85, 2813, 1963). Aldehit protonu çok düşük bölgede, 9.70 ppm civarında görünür. Asidik ve nötral piridoksal çözeltilerinde bu sahada sinyal görünmemesi, maddenin modifiye

olduğunu, muhtemelen hidrate şekle dönüştüğünü gösterir. Ayrıca piridoksal ile piridoksal hemiasetalin NMR spektrumlarının aynı olması, bu pD aralığında piridoksalin hemiasetal şeklinde bulunduğunu gösterir. Spektrumda aldehid sinyali görülmemesi, hidrate şeklin protonunun döteryum ile değiştiği veya HDO sinyali tarafından maskelendiği şeklinde izah edilmektedir (Korytnyk, W. ve diğ., 1964; Korytnyk, W., 1965). 6.92 ile 6.97 ppm arasında görülen bir proton sinyali hemiasetal grubu protonuna aittir. 2.80 ppm'deki üç proton sinyalinin ve 8.40 ppm'deki bir proton sinyalinin metil ve C₆ protonlarına ait olduğu belirgindir. 5.40 ile 5.52 ppm aralığındaki iki proton için geniş sinyal hidroksimetil grubunu belirtmektedir. Yapıda bulunan bir fenolik ve iki alkolik protonlar döteryum ile değişmiştir.

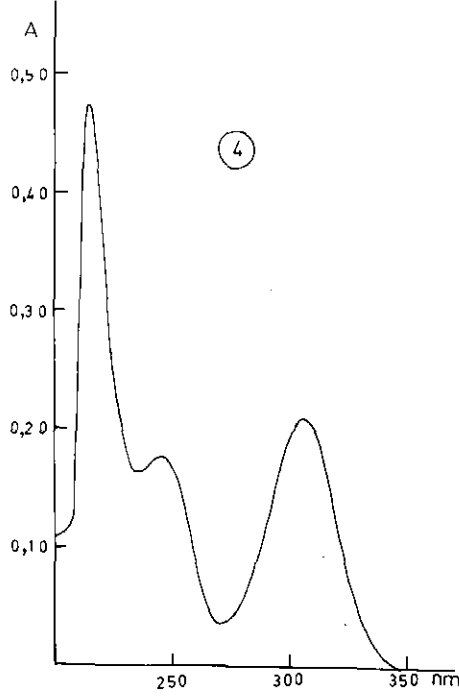
b- 4-PIRIDOKSİK ASİD VE 4 NOLU ŞÜPHELİ MADDENİN SPEKTRAL ANALİZLERİ

1- UV SPEKTRAL ANALİZLERİ

1 mg 4-piridoksik asid ve ince tabaka kromatogramlarından elusyon yolu ile kazanılan 4 nolu şüpheli madde (kromatogram 8) susuz metanolde, gerekli konsantrasyonda çözülemediği için, 100'er ml % 10 (a/h) sodyum hidroksid çözeltisinde çözüldü. Dakikada 50 nm tarama hızı ile, şahit olarak % 10 (a/h) sodyum hidroksid çözeltisi kullanarak UV spektrumları alındı (Spektrum 7 ve 8). Spektrumlarda görüldüğü gibi 4-piridoksik asid ve 4 nolu şüpheli madde için maksimum absorpsiyon 215 nm, 247 nm ve 307 nm dalga boylarında tespit edilmiştir.



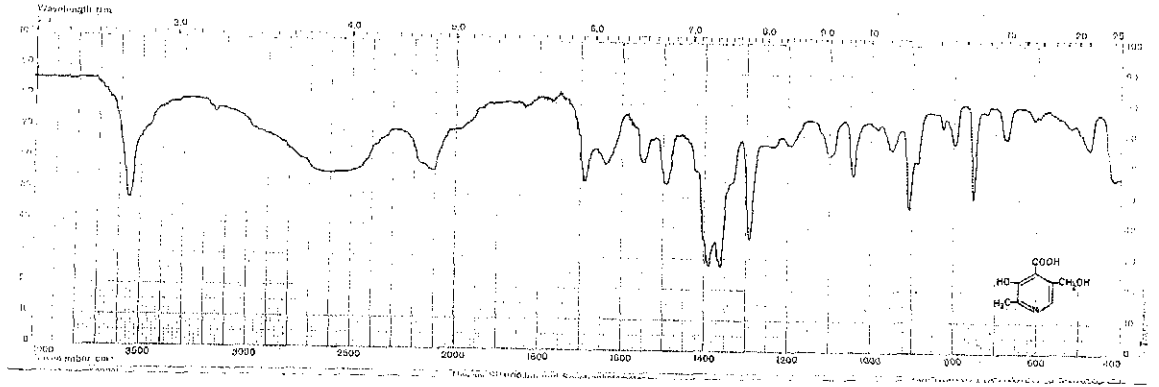
Spektrum 7 : 4-Piridoksik asidin % 10 (a/h) konsantrasyon-
da sodyum hidroksid çözeltilisinde, % 1 (a/h)
konsantrasyondaki çözeltilisinin UV spektrumu
(Tarama hızı 50 nm/dak. ve kaydetme hızı
1 inc/dak, tabaka kalınlığı 1.0 cm).



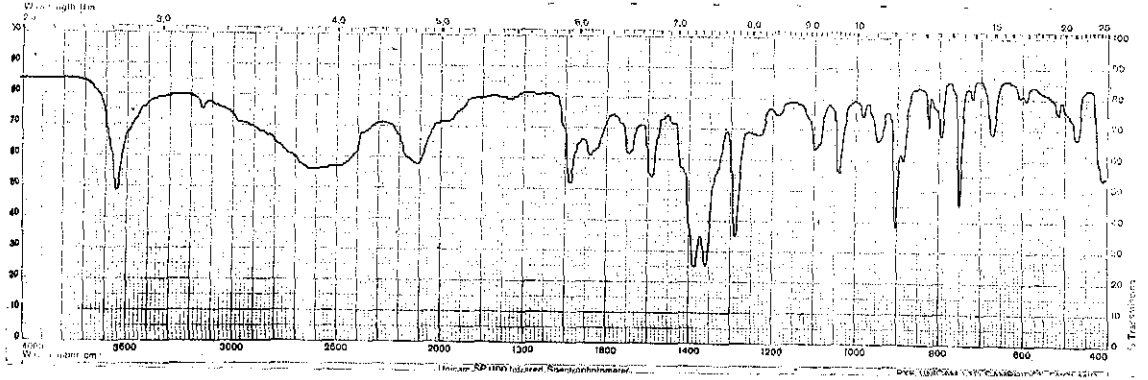
Spektrum 8 : Bekletilmiş piridoksin hidroklorür ve piridoksin hidroklorür-sodyum novaminsülfonat ampul çözeltilerinden preparatif ince tabaka kromatografisi ile kazanılan 4 nolu şüpheli maddenin % 10 (a/h) konsantrasyonda sodyum hidroksid çözeltisinde, % 1 (a/h) konsantrasyondaki çözeltisinin UV spektrumu (Tarama hızı 50 nm/dak., kaydetme hızı 1 inc/dak. ve tabaka kalınlığı 1.0 cm).

2- IR SPEKTRAL ANALİZLERİ

4-Piridoksik asid ve 4 nolu şüpheli maddenin potasyum bromür pelletlerde alınan IR spektrumları aşağıda verilmiştir (Spektrum 9 ve 10).



Spektrum 9 : 4-Piridoksik aside ait IR spektrumu

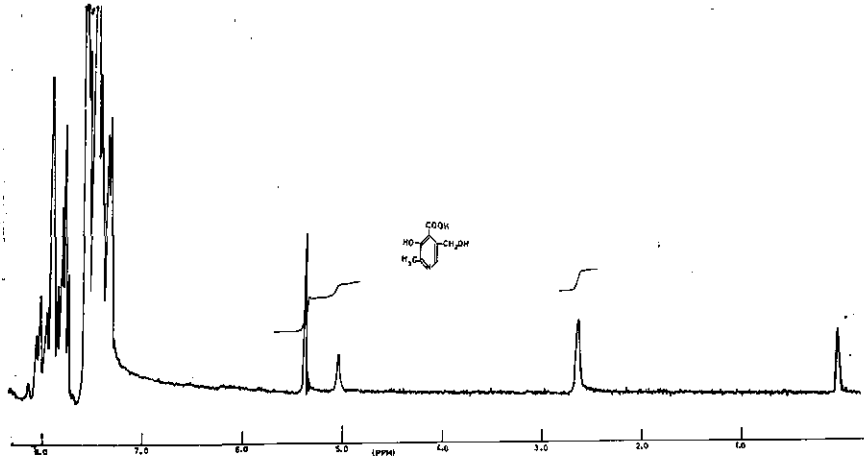


Spektrum 10 : Bekletilmiş piridoksin hidroklorür ve piridoksin hidroklorür-sodyum novaminsülfonat kombine ampul çözeltilerinden preparatif ince tabaka kromatografisi ile ayrılan 4 nolu şüpheli maddenin IR spektrumu.

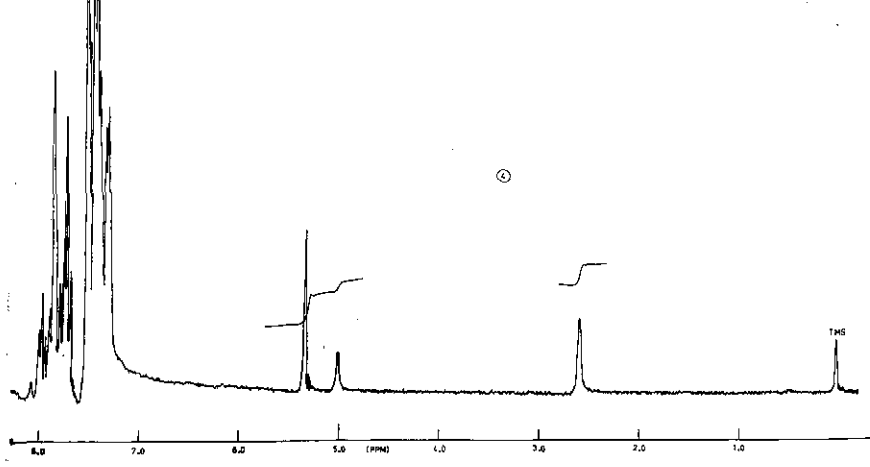
Spektrum 9 ve 10'da karakteristik pikler : 1040 cm^{-1} 'de pirimer alkol (C-O gerilme); 1290 cm^{-1} 'de fenol (C-O gerilme ve O-H deformasyon); 900 cm^{-1} 'de asid (O-H deformasyon); 1360 ve 1385 cm^{-1} 'de simetrik COO^- gerilme bandı; 1490 cm^{-1} 'de asimetrik COO^- gerilme bandı; 1690 cm^{-1} aril asid (C=O gerilme titreşimi); 3550 cm^{-1} 'de O-H gerilme titreşimi (-COOH hidroksili); 2400-2700 cm^{-1} arası O-H gerilme titreşim bandı; 790, 1545 cm^{-1} piridin halkası (C=N ve C=C gerilme)

3- NMR SPEKTRAL ANALİZLERİ

4-Piridoksik asid ve 4 nolu şüpheli maddeye ait NMR spektrumları % 10 (a/h) konsantrasyonda piridin içeren dötronlanmış suda, internal referans olarak TMSO kullanılarak alınmıştır. Madde dötronlanmış suda çözünmediği ve dötronlanmış piridin bulunamadığı için bu çözücü sistemi kullanılmıştır.



Spektrum 11: 4-Piridoksik asidin % 10 (a/h) konsantrasyonda piridin içeren dötronlanmış sudaki NMR spektrumu.



Spektrum 12: Bekletilmiş piridoksin hidroklorür ve piridoksin hidroklorür-sodyum novaminsülfonat ampul çözeltilerinden preparatif ince tabaka kromatografisi ile ayrılan maddenin NMR spektrumu.

Görünen sinyaller ve değerlendirilmeleri şu şekildedir.

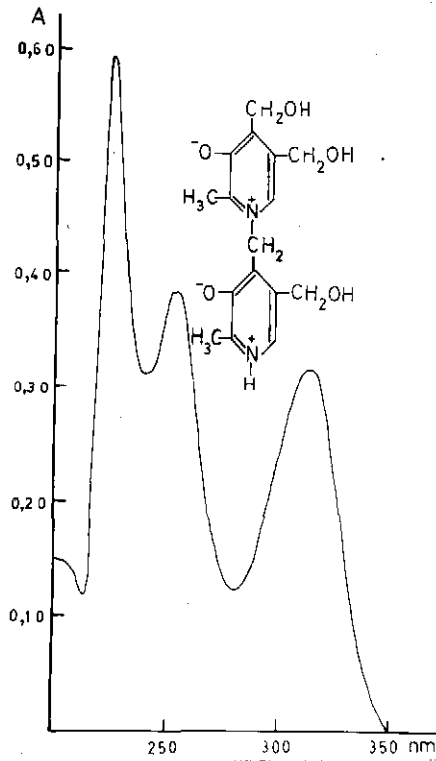
2.64 ppm'de piridin halkasındaki 2 nolu karbona bağlı $-CH_3$ protonlarına ait singlet
(integral değeri : 3 H)

5.40 ppm'de piridin halkasındaki 5 nolu karbona bağlı $-CH_2$ protonlarına ait singlet
(integral değeri : 2 H)

c- PİRİDOKSİN DİMER VE 2 NOLU ŞÜPHELİ MADDENİN SPEKTRAL ANALİZLERİ

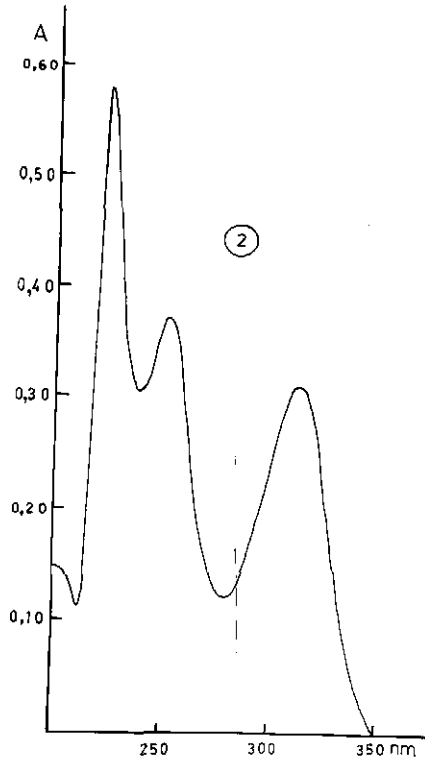
1- UV SPEKTRAL ANALİZLERİ

2 mg piridoksin hidroklorür ve ince tabaka kromatogramlarından elusyon yolu ile kazanılan 2 nolu şüpheli madde (kromatogram 8), susuz metanolde çözünmediği için, 100'er ml % 1 (a/h) konsantrasyonda sodyum hidroksid çözeltisinde çözüldü. Dakikada 50 nm tarama hızı ile, şahit olarak % 0.1 (a/h) sodyum hidroksid çözeltisi kullanılarak, UV spektrumları alındı



Spektrum 13: Piridoksin dimerin % 1 konsantrasyonda sodyum hidroksid çözeltisinde % 2 (a/h) konsantrasyondaki çözeltisinin UV spektrumu (Tarama hızı 50 nm/dak. ve kaydetme hızı 1 inc/dak., tabaka kalınlığı 1.0 cm).

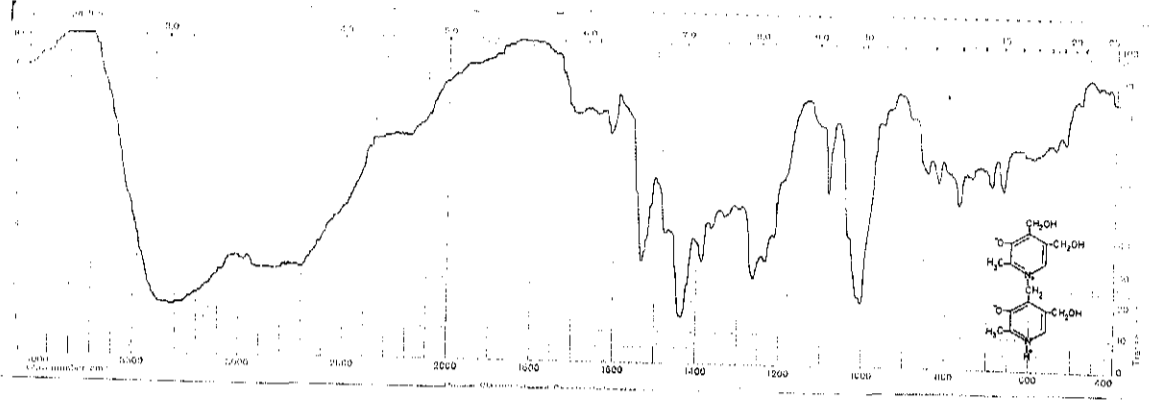
(Spektrum 13 ve 14). Spektrumlarda görüldüğü gibi piridoksin dimer ve 2 nolu şüpheli madde için maksimum absorpsiyon 227 nm, 253 nm ve 315 nm dalga boylarında tespit edilmiştir.



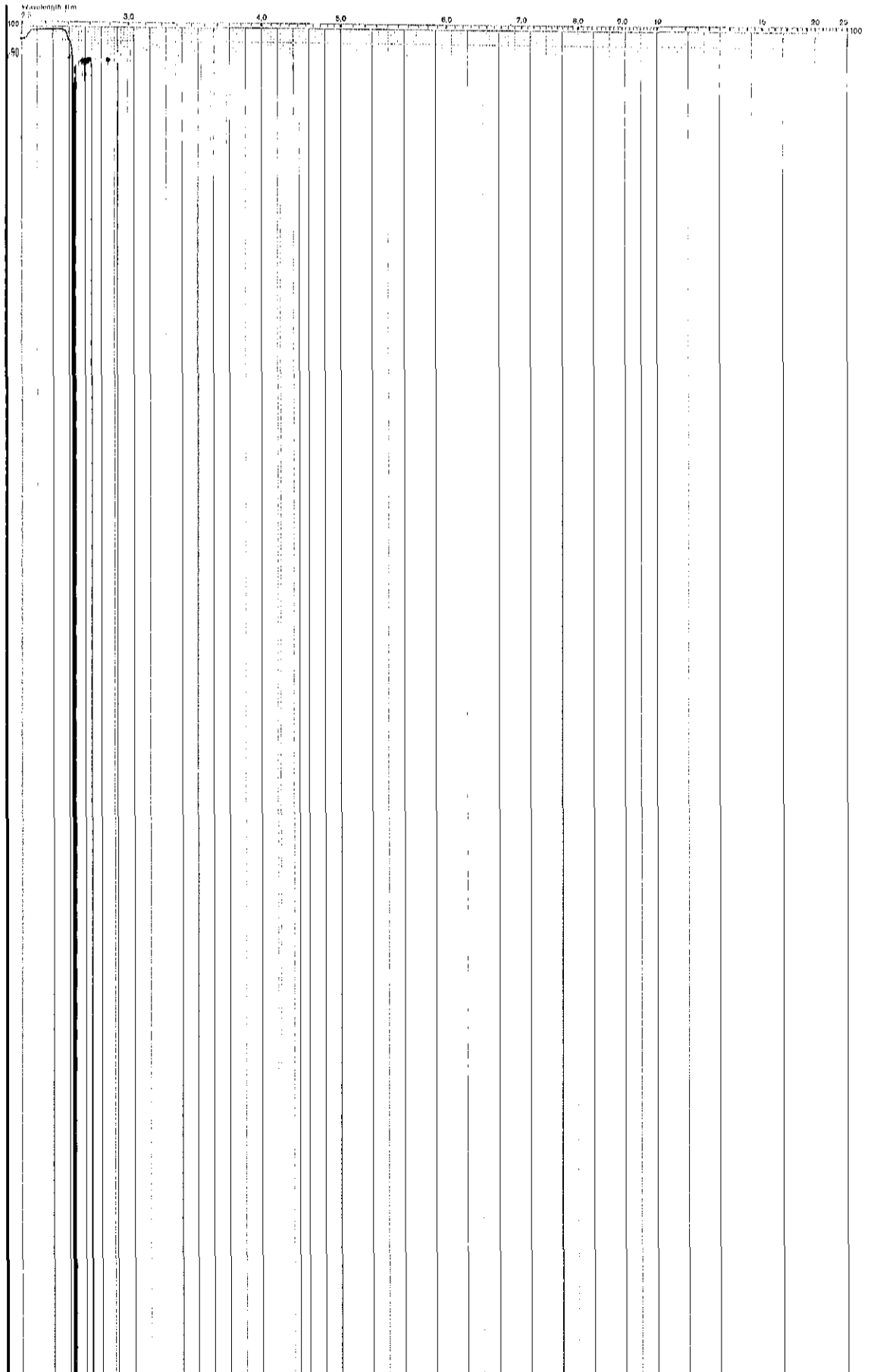
Spektrum 14: Bekletilmiş piridoksin hidroklorür ve piridoksin hidroklorür-sodyum novaminsülfonat ampul çözeltilerinden preparatif ince tabaka kromatografisi ile ayrılan 2 nolu şüpheli maddenin, % 10(a/h) sodyum hidroksid çözeltisinde % 0.1(a/h) çözeltisinin UV spektrumu (Tarama hızı 50 nm/dak., kaydetme hızı 1 inc/dak. ve tabaka kalınlığı 1.0 cm).

2- IR SPEKTRAL ANALİZLERİ

Piridoksin dimer ve 2 nolu şüpheli maddenin, potasyum bromür pelletlerde alınan, IR spektrumları aşağıda verilmiştir (spektrum 15 ve 16).



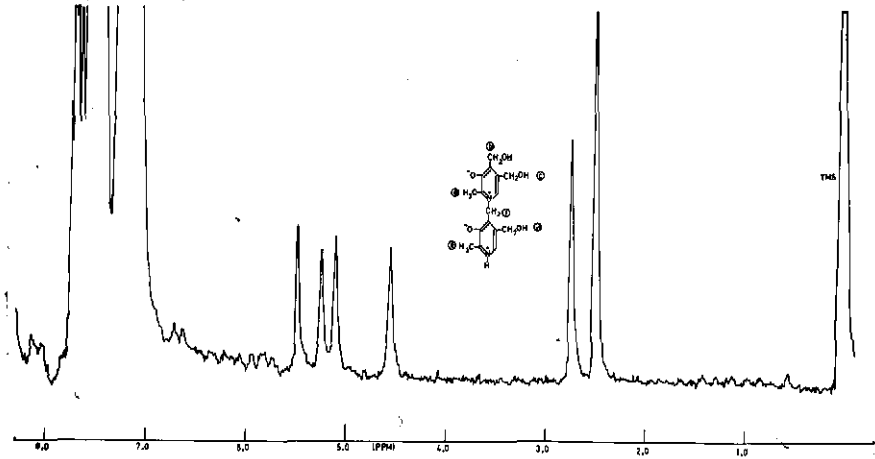
Spektrum 15: Piridoksin dimerin IR spektrumu



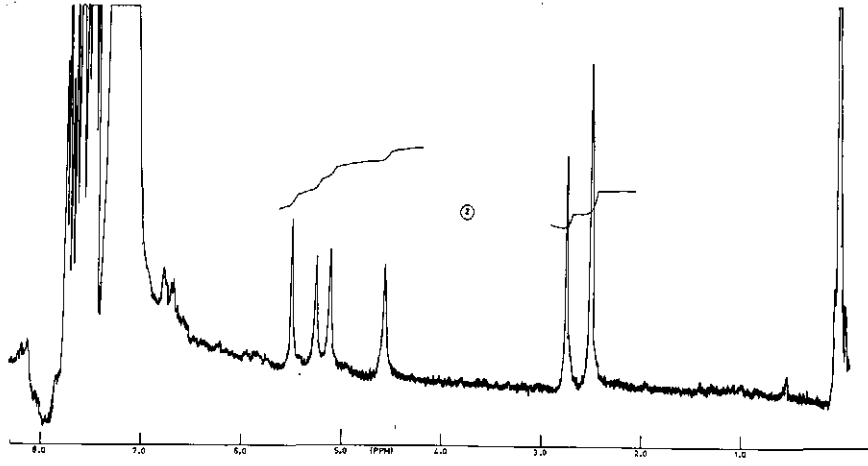
Spektrum 9 ve 10'da maddeyi karakterize eden pikler şunlardır : 1010 cm^{-1} 'de primer alkol (C-O gerilme); 1265 cm^{-1} 'de fenol (C-O gerilme ve O-H deformasyon); 3350 cm^{-1} deki geniş band O-H gerilme titreşimi; 1435, 1610 cm^{-1} 'de piridin halkası (C=N ve C=C gerilme); 1085 ve 1535 cm^{-1} C=N gerilme bandları; 2700 cm^{-1} 'deki geniş band amin tuzu (N^+H).

3- NMR SPEKTRAL ANALİZLERİ

Piridoksin dimer ve 2 nolu şüpheli maddeye ait NMR spektrumları spektroskopik kalitede piridinde, internal referans olarak TMSO kullanılarak alınmıştır (Spektrum 17 ve 18). Madde dötronlanmış suda çözünmediği için, çözücü olarak piridin kullanılmıştır.



Spektrum 17 : Piridoksin dimerin piridindeki NMR spektrumu.



Spektrum 18 : Bekletilmiş piridoksin hidroklorür ve piridoksin hidroklorür-sodyum novaminsülfonat ampul çözeltilerinden preparatif ince tabaka kromatografisi ile kazanılan 2 nolu şüpheli maddenin piridindeki NMR spektrumu.

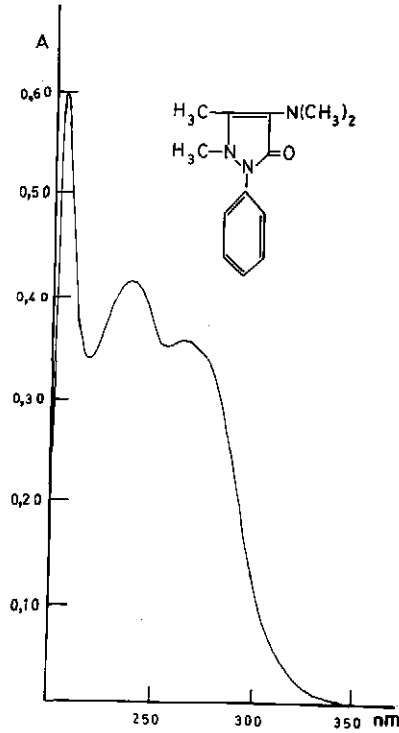
Gözlenen sinyaller ve değerlendirilmeleri şu şekildedir:

- 2.50 ppm'de piridin halkasına bağlı-CH₃(a) protonlarına ait singlet (integral değeri : 3 H)
- 2.76 ppm'de piridin halkasına bağlı -CH₃(e) protonlarına ait singlet (integral değeri : 3 H)
- 4.58 ppm'de azota bağlı (N-CH₂)-CH₂(f) protonlarına ait singlet (integral değeri : 2 H)
- 5.14 ppm'de piridin halkasına bağlı -CH₂(b ve c) protonlarına ait dublet (integral değeri: 4 H)
- 5.52 ppm'de piridin halkasına bağlı -CH₂(d) protonlarına ait singlet (integral değeri : 2 H)

d- 4-DİMETİLAMİNO ANTİPİRİN VE 9 NOLU ŞÜPHELİ MADDENİN
SPEKTRAL ANALİZLERİ

1- UV SPEKTRAL ANALİZLERİ

2 mg 4-dimetilamino antipirin ve ince tabaka kromatogramlarından elusyon yolu ile kazanılan 9 nolu şüpheli madde (Kromatogram 8) 100'er ml susuz metanolde çözüldü, dakikada 50 nm tarama hızı ile şahit olarak metanol kullanılarak UV spektrumları alındı (Spektrum 19 ve 20). Spektrumlarda görüldüğü gibi 4-dimetilamino antipirin ve 9 nolu şüpheli madde

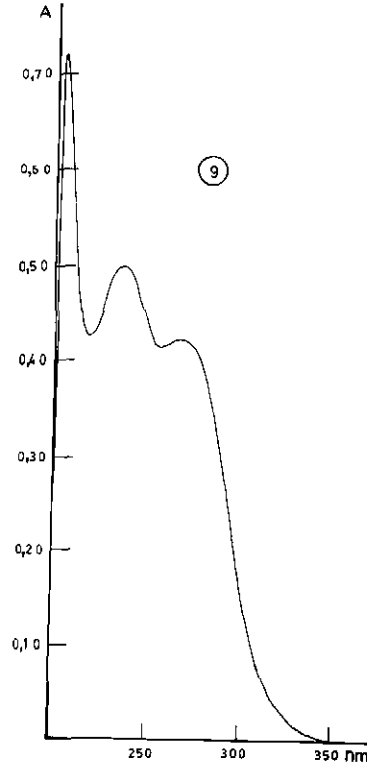


Spektrum 19: % 2 (a/h) 4-dimetilamino antipirin çözeltisinin susuz metanoldeki UV spektrumu.

(Tarama hızı 50 nm/dak, kaydetme hızı

1 inc/dak. ve tabaka kalınlığı 1.0 cm).

için maksimum absorpsiyon 205 nm, 237 nm ve 261 nm dalga boylarında tespit edilmiştir.

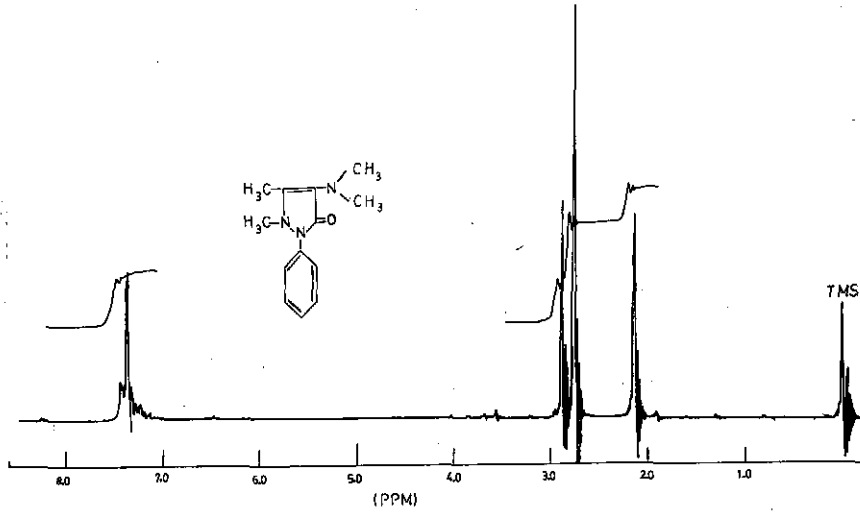


Spektrum 20 : Bekletilmiş piridoksin hidroklorür-sodyum novaminsülfonat ampul çözeltilerinden preparatif ince tabaka kromatografisi ile kazanılan 2 nolu maddenin susuz metanoldeki % 2 (a/h) çözeltisinin UV spektrumu (Tarama hızı 50 nm/dak, kaydetme hızı 1 inc/dak ve tabaka kalınlığı 1.000 cm).

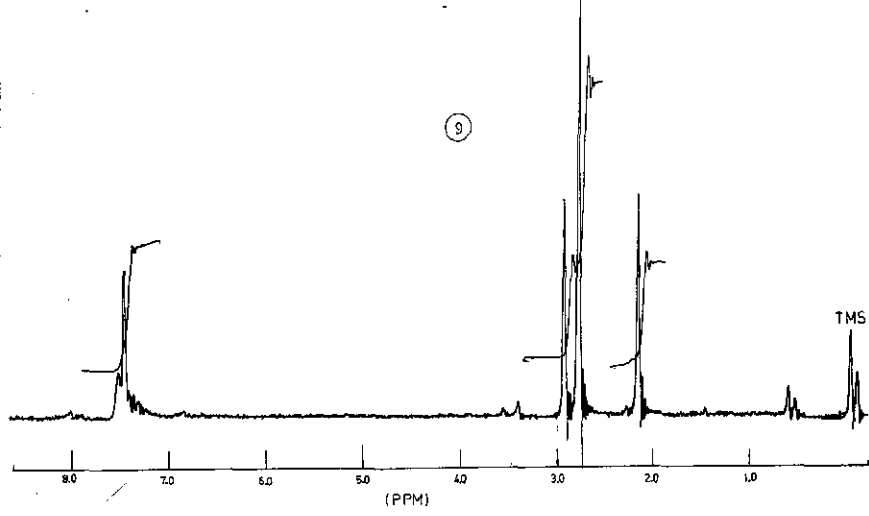
Spektrum 21 ve 22'de maddeyi karakterize eden pikler şunlardır: 7320 cm^{-1} C-N gerilme bandı; 1670 cm^{-1} laktam karbonyli (C=O gerilme); 2800 , 2890 ve 2950 cm^{-1} metil (C-H gerilme); 2995 ve 3050 cm^{-1} aromatik yapı (C-H gerilme); 1455 , 1510 ve 1605 cm^{-1} aromatik halka (C=C gerilme); 705 ve 760 cm^{-1} mono substitüe benzen.

3- NMR SPEKTRAL ANALİZLERİ

4-Dimetilamino antipirin ve 9 nolu şüpheli maddeye ait NMR spektrumları dötronlanmış kloroformda, internal referans olarak MSO kullanılarak alınmıştır (Spektrum 23 ve 24).



Spektrum 23 : 4-Dimetilamino antipirinin dötronlanmış kloroformda NMR spektrumu.



Spektrum 24: Bekletilmiş piridoksin hidroklorür-sodyum novaminsülfonat ampul çözeltilerinden preparatif ince tabaka kromatografisi ile kazanılan 9 nolu şüpheli maddenin dötronlanmış kloroformdaki NMR spektrumu

Gözlenen sinyaller ve değerlendirilmeleri şu şekildedir :

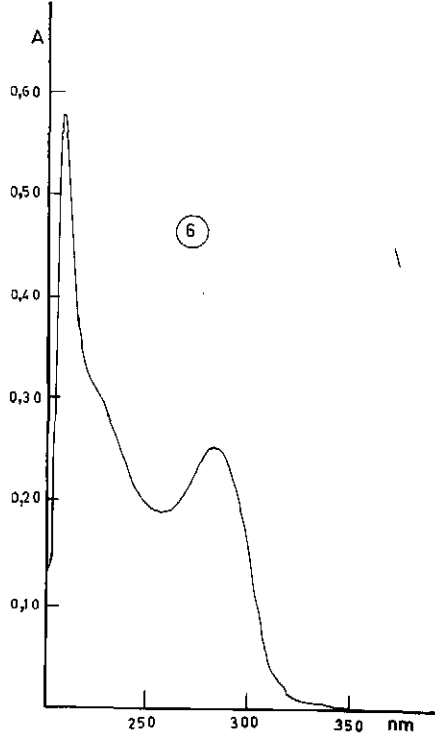
- 2.15 ppm'de pirazolon halkasındaki 3 nolu karbona bağlı $-CH_3$ protonlarına ait singlet (integral değeri : 3 H)
- 2.82 ppm'de pirazolon halkasındaki 4 nolu karbona bağlı $-N(CH_3)_2$ protonlarına ait singlet (integral değeri : 6 H)
- 2.98 ppm'de pirazolon halkasındaki 2 nolu azota bağlı $-CH_3$ protonlarına ait singlet (integral değeri: 3H)
- 4.47 ppm'de pirazolonun içerdiği fenil halkasına ait singlet (integral değeri : 5 H).

e- 6 NOLU ŞÜPHELİ MADDENİN SPEKTRAL ANALİZLERİ

6 Nolu şüpheli madde için, diğer şüpheli maddelerde olduğu gibi, sabit olarak kullanılacak madde bulunamadığından, bu maddenin teşhisine tek başına çalışıldı.

1- U.V. SPEKTRAL ANALİZİ

İnce tabaka kromatogramlarından elüsyon yolu ile kazanılan 2 mg 6 nolu meçhul madde 100 ml susuz metanolde çözüldü.



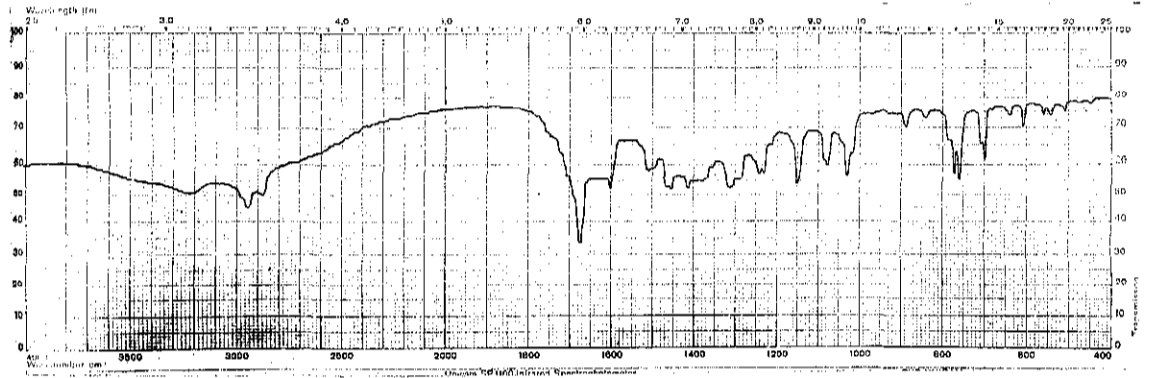
Spektrum 25: Bekletilmiş piridoksin hidroklorür-sodyum novaminsülfonat ampul çözeltilerinin preparatif ince tabaka kromatografisi ile kazanılan 6 nolu şüpheli maddenin susuz metanoldeki %2(a/h) çözeltisinin UV spektrumu. (Tarama hızı 50 nm/dak., kaydetme hızı 1inc/dak ve tabaka kalınlığı 1.0 cm).

dakikada 50 nm tarama hızı ile şahit olarak susuz metanol kullanılarak UV spektrumu alındı (Spektrum 25).

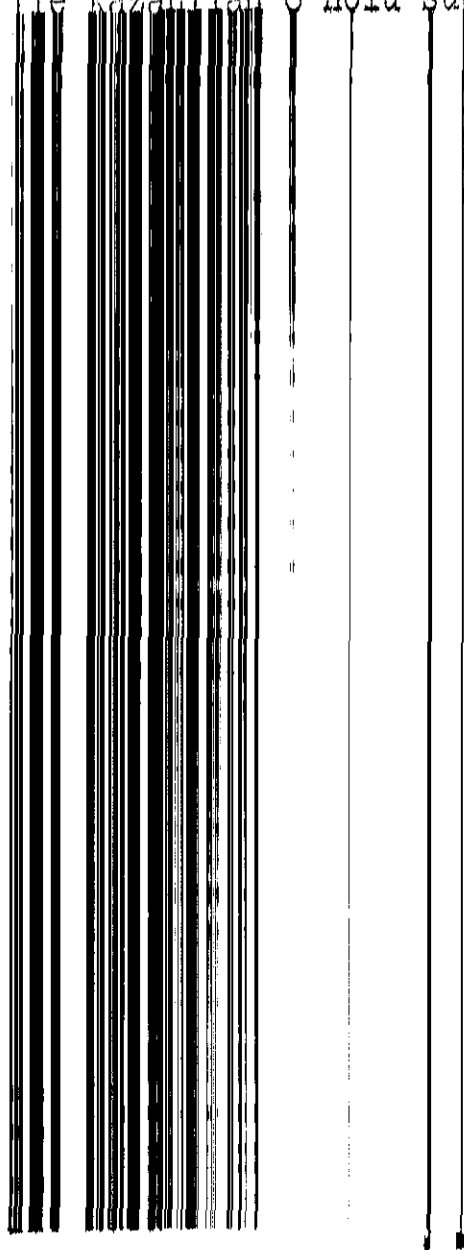
Spektrumda görüldüğü gibi 6 nolu şüpheli madde (kromatogram 8) için maksimum absorpsiyon 208 nm ve 277 nm dalga boylarından tespit edilmiştir.

2- IR SPEKTRAL ANALİZİ

Potasyum bromür pelletlerde alınan IR spektrumu aşağıda verilmiştir.



Spektrum 26: Bekletilmiş piridoksin hidroklorür-sodyum novaminsülfonat kombine ampul çözeltilerinden preparatif ince tabaka kromatografisi ile kazanılan 6 nolu şüpheli maddenin IR

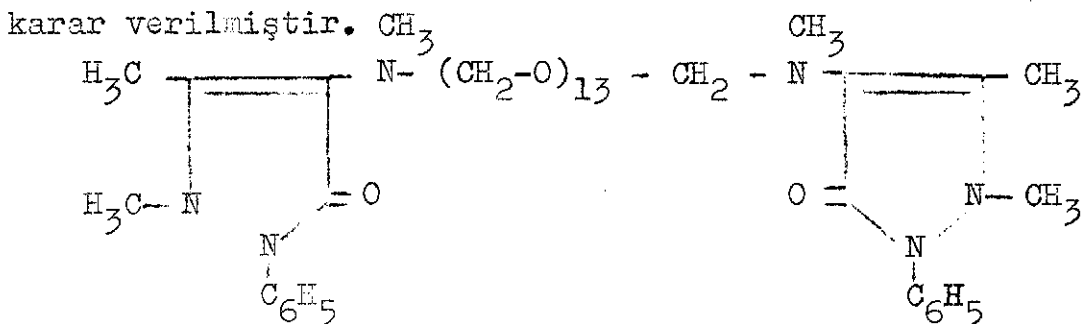


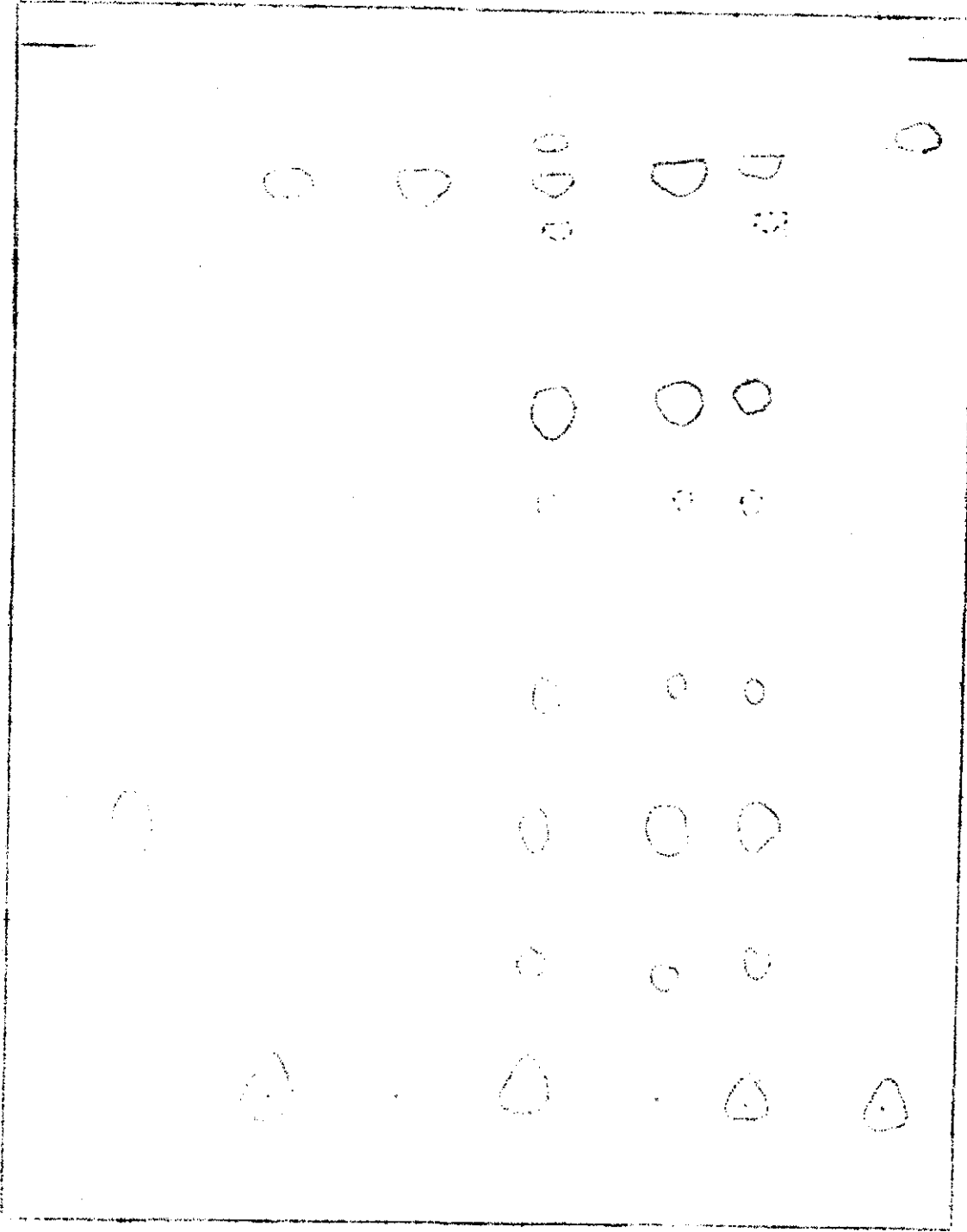
- 0.93 ppm'de pirazolon halkalarındaki 4 nolu karbona bağlı $-N(CH_3)-$ protonlarına ait singlet
- 1.30 ppm'de pirazolon halkaları arasındaki $(CH_2-O-CH_2)_n$ protonlarına ait singlet
(integral değeri : 24 H)
- 2.30 ppm'de pirazolon halkasındaki 3 nolu karbona bağlı $-CH_3$ protonlarına ait singlet
(integral değeri 3 H)
- 2.57 ppm'de pirazolon halkasındaki 3'nolu karbona bağlı $-CH_3$ protonlarına ait singlet
(integral değeri : 3 H)
- 3.00 ppm'de pirazolon halkasındaki 2 nolu azota bağlı $-CH_3$ protonlarına ait singlet
(integral değeri : 3 H)
- 3.15 ppm'de pirazolon halkasındaki 2'nolu azota bağlı $-CH_3$ protonlarına ait singlet
(integral değeri : 3 H)
- 4.77 ppm'de pirazolon halkasındaki 4 ve 4' nolu karbonlara bağlı $-N(CH_2-)-$ protonlarına ait dublet
(integral değeri : 4 H)
- 7.43 ppm'de pirazolonun içerdiği fenil halkasına ait singlet
(integral değeri : 10 H)

6 nolu mechul maddeye ait şahit bulunamadığından, spektral analiz bulgularını kuvvetlendirmek amacı ile maddenin içerdiği $(-CH_2-O-CH_2-)_n$ grubuna ait kimyasal reaksiyonlar yapılmıştır. Bu grubun karakteristik reaksiyon verdiği kromotropik asid ayrıca dütetrazolyum klorür reaktifleri (Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography. 1971) uygulanarak sonucun müspet olduğu gözlenmiştir.

Sentez şartlarında da aynı maddenin oluştuğunun gösterilmesine çalışılmıştır. Bu amaç ile üç seri ampul hazırlanmıştır. Birinci seri 0.1 mol piridoksin hidroklorür, 0.1 mol 4-metilaminofenazon ve 0.1 mol formaldehidin 4 ml distile sudaki çözeltisi, ikinci seri 0.1 mol piridoksin hidroklorür, 0.1 mol sodyum novaminsülfonat, 0.1 mol formaldehid'in 4 ml distile sudaki çözeltisi, üçüncü seri 0.1 mol sodyum novaminsülfonat ve 0.1 mol formaldehid'in 4 ml distile sudaki çözeltisi olarak hazırlandı. Seriler $120^{\circ}C$ 'de 20 dakika ısıtıldı ve ince tabaka kromatografisinde teşhis edildi (Kromatogram 22). Bu teşhiste yukarıda belirtilen reaktiflerden de istifade edildi. Piridoksin hidroklorür bulunan her iki ampulde de bu maddenin oluştuğu, bulunmayan ampulde ise oluşmadığı gösterildi.

Buna göre maddenin muhtemel yapısı aşağıda gösterilmiştir. Formül'de (n) NMR bulgularına dayanarak 13 olduğuna





Kromatogram 22: Piridoksin hidroklorür, sodyum novaminsülfonat, 4-metilaminofenazon çözeltileri ve piridoksin hidroklorür-sodyum novaminsülfonat, 1.seri, 2.seri, 3.seri ampullerin silikagel HF₂₅₄ tabakalarında, etil asetat-aseton-dimetilformamid-anonyak-dietilamin (80:40:14:6:0.2) solvent sistemi ile gözlenmesi.

IV - TARTIŞMA VE HÜKÜM

Mukayese imkanı sağlayabilmek için piridoksin hidroklorür ampuller ve piridoksin hidroklorür-sodyum novaminsülfonat kombine ampuller aynı şartlarda hazırlanmıştır. Sonuçların kesinlik ile gözlenebilmesi için, stabilite üzerinde etkin ısı, ışık, oksijen, konsantrasyon gibi faktörler göz önünde tutularak, gruplandırmada aşağıdaki hususlara dikkat edilmiştir:

1- Piyasada satılmakta olan ampul tipi piridoksin hidroklorür preparatları da göz önünde bulundurularak ve piridoksin hidroklorür konsantrasyonunun parçalanma üzerinde etkisinin olabileceği düşünülerek serilerin hazırlanmasında üç konsantrasyon (25 mg/ml, 50 mg/ml ve 100 mg/ml) tercih edilmiştir. Kombine ampullerde ise sodyum novaminsülfonat konsantrasyonu sabit tutulmuştur (500 mg/ml). Ancak bu konsantrasyonda sodyum novaminsülfonat yanında 100 mg/ml konsantrasyonda piridoksin hidroklorür çözmek mümkün olmadığından kombine ampullerde piridoksin hidroklorür 25 mg/ml ve 50 mg/ml konsantrasyonlarda kullanılmıştır.

2- Oksijenin etkisini araştırmak amacı ile kaynatılmış, soğutulmuş, azot gazı geçirilerek moleküler oksijeni minimuma indirilmiş (polarografik yöntemler ile saptanmış) distile su ve normal distile su kullanılarak seriler hazırlanmış ve serilerden bir grup azot atmosferinde bekletilmiştir.

3- Işığın etkisini gözlemek amacı ile çözeltiler renkli ve renksiz ampullerde bekletilmiştir.

4- Isının etkisini araştırmak amacı ile enjektabl preparatlar 100°C ve 120°C'de sterilize edilmiştir.

5- Parçalanmanın minimuma indirilebilmesi amacı ile çeşitli koruyucular da denenmiştir.

Çalışmada piridoksin hidroklorür ve piridoksin hidroklorür-sodyum novaminsülfonat kombine ampullerde oluşan maddelerin ayrılarak teşhiste ve buradan miktar tayinine geçişte ince tabaka kromatografisi, kağıt kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi yöntemleri denenmiş en uygun sonuç ince tabaka kromatografisi ile alınmıştır. Bu gaye ile her iki maddenin ince tabaka kromatografisi ile teşhisine ait literatürde kayıtlı çeşitli adsorbanlar, solvan sistemleri ve reaktifler incelenmiştir. Ancak, bilhassa kombine çözeltilerde sodyum novaminsülfonatin yüksek konsantrasyonda bulunması nedeni ile, beklenen sonuç elde edilememiştir. Amaca uygun sonuç silikagel HF₂₅₄ tabakalarında, etil asetat-aseton-dimetilformamid-amonyak-dietilamin (80:40:14:6:0.2) solvan sisteminde alınmıştır. Denenen reaktifler içinde piridoksin hidroklorür için en hassas olarak 2,6-diklorokinon-klorimid ve diazolanmış p-nitroanilin reaktifleri, sodyum novaminsülfonat için ise 4-dimetilaminobenzaldehid reaktifi bulunmuştur. Ayrıca literatürde kayıtlı olmayan gümüş nitrat reaktifinin sodyum novaminsülfonat teşhisi için en az 4-dimetilaminobenzaldehid reaktifi kadar hassas olduğu gösterilmiştir. Her iki maddenin bir arada tespitinde demir (III) klorür-potasyum

heksasiyanoferrat (III) reaktifi, potasyum permanganat reaktifi ve UV ışığından faydalanılmıştır.

Miktar tayini metodunun seçiminde literatürde kayıtlı spektrofotometrik ve kolorimetrik metodlar tadil edilerek silikagel HF₂₅₄ tabakalarına uygulanmaya çalışılmıştır. Hassasiyet hududunun hazırladığımız çözeltilere uygun olması, diğer kolorimetrik ve spektrofotometrik metodlara nazaran daha hassas netice vermesi ve adsorbanın boyayı adsorblaması nedenleri ile, para dukumunda substitüent bulunmayan fenoller için geliştirilen kolorimetrik metod (Gibbs, 1927; Scudi ve diğ., 1940 a ve b), şartlarımıza göre değiştirilerek uygulanmıştır. Tayin sonuçları, rengin dayanıklılık derecesi ve metodun kesinlik derecesi tatminkar bulunmuş ve miktar tayininin de kullanılmıştır.

Çalışmada piridoksin hidroklorür ve piridoksin hidroklorür-sodyum novaminsülfonat kombine ampullerde piridoksin hidroklorürün stabilitesi ve bu iki madde arasında etkileşme olup olmadığı incelendiği için, kromatografik, miktar tayini ve spektral analiz bulguları iki ayrı grup altında verilecektir:

A- Piridoksin hidroklorür ampullerin stabilitesi

B- Piridoksin hidroklorür-sodyum novaminsülfonat kombine ampullerde piridoksin hidroklorürün stabilitesi ve bu iki maddenin etkileşmesi

A- PİRİDOKSİN HİDROKLORÜR AMPULLERİN STABİLİTESİ

Piridoksin hidroklorür ampul çözeltilerinin stabilitesinin incelenmesi amacı ile hazırlanan 56 seri piridoksin hidroklorür ampul 3 ay laboratuvar şartlarında bekletilmiş, ince tabaka kromatografisi ile kontrol edilmiştir (Kromatogram 9-21). Rf değerleri şahit maddelerinki ile mukayese edilerek ön teşhisleri yapılmıştır (Kromatogram 8). Tespit edilen parçalanma ürünleri ampul çözeltilerinden preparatif ince tabaka kromatografisi ile ayrılmış, elue edilmiş ve kristallendirilmiştir. Bu maddelerin erime dereceleri ve spektral analizleri (spektrum 1-18) gerçekleştirilip, aynı madde olduğundan şüphe edilen şahit maddelerin erime dereceleri ve spektral analizleri (spektrum 1-18) ile mukayese edilmiştir. Sonuç da piridoksin hidroklorür ampullerde parçalanma ürünü olarak piridoksal, 4-piridoksik asid ve piridoksin dimer teşhis edilmiştir.

Bugüne kadar piridoksin hidroklorür çözeltilerinde parçalanma ürünlerinin teşhisi için, literatürde kayıtlı tek çalışma Ikeda ve diğ. (1968) tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmalar kağıt kromatografisinde maddelerin Rf değerlerini mukayese ederek piridoksin hidroklorürün parçalanma ürünlerinin, aerobik şartlarda piridoksal, 4-piridoksik asid, isopiridoksal, 5-piridoksik asid ve 4,5-dipiridoksik asid, anaerobik şartlarda ise piridoksin dimer olduğunu ileri sürmüşlerdir. Yaptığımız araştırmalar maddenin laboratuvar şartlarında piridoksal hidroklorür, 4-piridoksik asid, piridoksin

dimere parçalandığını ve piridoksin dimerin hem aerobik ve hemde anaerobik şartlarda saklanan ampullerde oluştuğunu (kromatogram 9-21) göstermiştir. Ikeda ve diğ. (1968) çalışmalarında çözeltilerini 2537 A° dalga boyunda irradiye ettiklerinden çok hızlı parçalanmaya neden olmuşlardır. Morrison ve diğ. (1958), Ahrens ve diğ. (1969), Asahi ve diğ. (1969) ve Reiber (1972) piridoksin hidroklorürün parçalanma ürünü olarak gösterdiğimiz piridoksal hidroklorürün çözeltisinde, parçalanma ürünlerinin teşhisi için çalışmışlar ve parçalanma sonucu 4-piridoksik asid ve piridoksin dimer oluştuğunu göstererek bulgularımızın doğruluğunu desteklemişlerdir.

Elde edilen miktar tayini neticeleri, piridoksin hidroklorürün inanıldığı kadar dayanıklı olmadığını göstermiştir. Aynı bulgular Negrore ve diğ. (1959) de ileri sürülmüşler, piridoksin hidroklorürün asid vasatta ve bilhassa pH 5.5 da bekleme sonucu sarardığını göstermişlerdir. Ancak çalışmada parçalanma kantitatif olarak gösterilmemiştir. 3 ay bekleme sonucu % 0.075 (a/h) konsantrasyonda sodyum edetat içeren renkli ampuller haricinde, bütün serilerde Schou (1959) un kabul ettiği parçalanma nispetinin (%10) üzerinde bir parçalanma bulunmuştur.

Piridoksin hidroklorür ampullerin stabilitesi üzerinde etkin bulunan faktörler ışık, oksijen (su ve havada bulunan) ve sterilizasyon ısısıdır.

Piridoksin hidroklorürün parçalanmasında oksijenin etkin bir faktör olduğu bulunmuştur. Halbuki Cunningham ve diğ. (1945) maddenin parçalanması üzerinde oksijenin etkisi olma-

diğını, piridoksal hidroklorürün parçalanmasını arttırdığını belirtmiştir. Normal şartlarda ve azot gazı altında saklanan ampullerin miktar tayini neticeleri arasında fark bulunması, piridoksin hidroklorürün parçalanmasında oksijenin etkin bir faktör olduğunu göstermiştir.

Renkli ve renksiz ampullerden elde edilen miktar tayini neticeleri arasındaki belirgin fark, piridoksin hidroklorür çözeltilerinin parçalanmasında ışığın en önemli faktörlerden biri olduğunu göstermektedir. György (1935), Hochberg ve diğ. (1944 c), Carpenter ve diğ. (1944), Cunningham ve diğ. (1945), Shiroishi ve diğ. (1961) B₆ vitaminlerinin bilhassa kalevi ve nötr vasatta ışığa karşı hassas olduğunu; Negoro ve diğ. (1959)'de piridoksin hidroklorürün asid vasatta dahi ışık etkisi ile parçalanacağını belirterek bu bulgumuzu desteklemektedirler.

Çalışmada 100°C ve 120°C'de sterilize edilen ampullerin parçalanma yüzdeleri arasında fark olması ve 10. günde yapılan ölçümlerde yüzde kayıp miktarının yüksek bulunması, maddenin ısı ile sterilizasyon şartlarına dayanıklı olmadığını göstermektedir. Hochberg ve diğ. (1944 c) piridoksin çözeltilerinin asid hatta kalevi ortamda dahi otoklav ile sterilize edilmesinin aktivite kaybı üzerinde etkisi olmayacağını belirtmiştir. Buna karşılık Feldheim (1971) piridoksin hidroklorür çözeltilerinin parçalanmasını önlemek için sterilizasyonun 100°C'de yapılmasını ancak bu şartlarda dahi bir miktar aktivite kaybı olacağını; Nikolov ve diğ. (1966) ise sterilizasyon ısısının parçalanma üzerindeki etkisini ortadan

kaldırmak için aseptik şartlarda çalışılmasını sağlık vermişlerdir. Diğer taraftan normal depolama ısısının ışıktan korunmuş piridoksin hidroklorür çözeltileri üzerinde etkisi olmadığı birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Wokes ve diğ., 1956, Harding ve diğ., 1959, Yamada ve diğ., 1965). Buda sterilizasyon ısısı etkisi ile parçalanma sonucu, Harris (1941) in piridoksin hidroklorürün nötr ortamda 120°C'de ısıtılması ile sentezini gerçekleştirdiği gibi, piridoksin dimer oluştuğu fikrini uyandırır.

Serilerde her üç konsantrasyonda (25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml) miktar tayini neticelerinin paralel bulunması, parçalanma üzerinde konsantrasyonun etkisi olmadığını göstermektedir. Çözeltilerin pH'sı, bu konsantrasyonlara bağlı olarak 1.9 ila 3 arasında değişmektedir. Bu pH aralığında, pH ile parçalanma hızı arasında belirgin bir bağıntı kurulamamıştır.

Çalışmada parçalanma nispetini minimuma indirebilme gayesi ile koruyucu olarak tiyoüre, disodyum edetat ve sodyum formaldehid-sülfoksilat denenmiştir. Sodyum formaldehid-sülfoksilat içeren ampullerde sterilizasyon şartlarına bağlı olarak bulanıklık veya çökme görülmüştür. Diğer taraftan tiyoüre içeren ampullerin miktar tayini sonuçları bu bileşiğin uygun bir stabilizan olmadığını göstermiştir. Disodyum edetat içeren ampullerde ise piridoksin hidroklorür oldukça dayanıklı bulunmuş ve 3. ay bekleme sonucu bütün renkli ampullerde yüzde kayıp nispetinin Schou (1959)'nun kabul ettiği parçalanma nispetinin (% 10) altında olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak piridoksin hidroklorürün inanıldığı kadar dayanıklı olmadığı, sterilizasyon ısısı, hava oksijeni ve ışık gibi faktörlerin parçalanmayı önemli derecede etkilediği; % 0.075 (a/h) konsantrasyonda disodyum edetat içeren renkli ampullerin 3. ay bekletme sonunda Schou (1959) nun kabul ettiği parçalanma nispetinin altında parçalanma göstereceğini; en ideal şartın renkli, azotlu, 100°C'de sterilize edilerek hazırlanmış, % 0.075 (a/h) konsantrasyonda disodyum edetat içeren ampul çözeltileri olduğunu söyleyebiliriz.

B- PİRİDOKSİN HİDROKLORÜR-SODYUM NOVAMİNSÜLFONAT KOMBİNE AMPULLERİN STABİLİTESİ

Mukayese imkanı sağlayabilmek için piridoksin hidroklorür-sodyum novaminsülfonat kombine seriler, piridoksin hidroklorür içeren seriler ile aynı şartlarda hazırlanmış ve deney şartları da sabit tutulmuştur. Ancak 500 mg/ml konsantrasyonda sodyum novaminsülfonat yanında 100 mg/ml konsantrasyonda piridoksin hidroklorür çözmek mümkün olmadığından kombine ampullerde piridoksin hidroklorür 25 mg/ml ve 50 mg/ml konsantrasyonlarda kullanılmıştır.

Sonuç olarak sodyum novaminsülfonat varlığında piridoksin hidroklorürün stabilitesinin belirgin şekilde etkilendiği bulunmuştur. Bu etki farklı serilerdeki şartlara bağlı olarak, değişik oranlarda bulunmasına rağmen, en ideal şartlarda dahi Schou (1959)'un kabul ettiği parçalanma nispetinin (% 10) üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Hatta bu nispet en

ideal olarak tespit edilen % 0.075 (a/h) konsantrasyonda disodyum edetat içeren, renkli ampuller içine konulmuş seriler haricinde 10. gün dahi yüzde onun üzerinde olduğu görülmüştür. Denenen koruyuculardan sodyum formaldehidsulfoksilat içeren serilerde piridoksin hidroklorür ampullerde olduğu gibi, sterilizasyon şartlarına bağlı olarak bulanıklık veya çökme olduğu ve beklenen koruyucu etkiyi yapmadığı; tiyoüre içeren çözeltilerde (% 0.005 a/h) stabilitenin ters yönde etkilendiği bulunmuştur. En iyi sonuç disodyum edetat içeren serilerde alınmış, ancak piridoksin hidroklorür açısından ilaç olarak kullanılma hududu dışında olduğu görülmüştür.

Kombine çözeltilerde sodyum novaminsülfonatın normal parçalanma ürünleri yanında iki madde daha izole edilmiştir. Bunlardan biri maddenin erime derecesi, UV, IR ve NMR spektrumları, şahit madde ile mukayese edilerek 4-dimetilamino-antipirin olduğu gösterilmiştir (Spektrum 19-24). Ancak diğer madde için şahit madde kullanmak mümkün olmadığından, erime derecesi, UV, IR ve NMR spektral analizleri (Spektrum 25-27) yanında, kimyasal yol ile de teşhisine çalışılmış ve piridoksin hidroklorür bulunan ortamda formaldehidin sodyum novaminsülfonat veya 4-metilaminofenazon üzerine etkitilmesi ile sentez edilebileceği gösterilmiştir. Maddenin muhtemel kimyasal yapısı tridekametilenoksibis N,N'-metilen-N,N-metilaminofenazon olarak saptanmıştır.

Sodyum novaminsülfonat ampullerde normal şartlarda görülmeyen bu iki maddenin mevcudiyeti piridoksin hidroklorür

ile sodyum novaminsülfonat arasında etkileşme olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak bu iki maddenin kombine çözelti halinde, denenen şartların en idealinde dahi piridoksin hidroklorür yönünden ilaç olarak kullanılma hududu dışında olduğu ve bu iki madde arasında etkileşme görüldüğü için iki ayrı ampulde verilmesinin daha doğru olacağı görüşünün benimsendiği söylenebilir.

Ö Z E T

Piridoksin hidroklorür ve piridoksin hidroklorür-sodyum novaminsülfonat kombine enjektabl çözeltilerde piridoksin hidroklorürün stabilitesi ve sodyum novaminsülfonat ile etkileşmesi araştırılmıştır.

Işık, oksijen, ısı ve konsantrasyon gibi faktörler göz önünde tutularak hazırlanan enjektabl preparatlarda piridoksin hidroklorür miktarı ince tabaka kromatografisinde ayırmayı takiben kolorimetrik metod ile yapılmıştır.

Piridoksin hidroklorür ampullerde parçalanma ürünü olarak piridoksin dimer, piridoksal hidroklorür ve 4-piridoksik asid izole ve teşhis edilmiştir. Ampullerin inanıldığı kadar dayanıklı olmadığı, azot gazı geçirilerek moleküler oksijeni minimuma indirilmiş distile su ile hazırlanan, koruyucu olarak disodyum edetat içeren, azot gazı geçirilmiş renkli ampuller haricinde, bütün serilerde üç ayda yüzde ondan fazla kayıp bulunmuştur.

Piridoksin hidroklorür-sodyum novaminsülfonat kombine enjektabl çözeltilerinde elde edilen kolorimetrik ve kromatografik bulgular, aynı şartlarda hazırlanan ve bekletilen piridoksin hidroklorür enjektabl çözeltileri bulguları ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak sodyum novaminsulfonatın piridoksin hidroklorürün stabilitesi üzerinde önemli etkisi olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu iki maddenin etkileşmesi neticesi oluşan maddeler tecrid edilerek spektral analizleri yapılmış, fiziksel ve kimyasal özelliklerinden yararlanılarak yapıları aydınlatılmıştır.

K A Y N A K L A R

- 1 - Abbot, E.H. ve A.E. Martell; J.AM.CHEM.SOC. : 92, 1574 (1970)
- 2- Abramove, M.K.; DAKL.AKAD.NAUK UZB.SSR. : 26(7), 33(1969)
- Ref.: C.A.: 72, 82999 (1970)
- 3 - Adams, E.; ANAL.BIOCHEM. : 31, 118 (1969)
- 4 - Adler, M. ve G. Shwartzman ; ARCH.BIOCHEM. : 28, 405 (1950)
- 5 - Adrian, J; CAHIERS TECH.CENTRE.NATL.COORD.ETUDES.RECH.NUTR.
ALIMENT. : 4, 1 (1959) - Ref.:C.A.:57, 16996. (1962)
- 6 - Adrian, J; BULL.SOC.SCI.HYG.ALIMENT. : 55, 259 (1967)
- Ref.: C.A.: 68, 75585 (1968)
- 7 - Agrawal, D.K. ve V.K.M.Rac ; J.SCI.INDUSTR.RES. : 21, 189 (1962)
- 8 - Ahrens, H. ve W.Korytnyk ; ANAL.BIOCHEM. : 30, 413 (1969)
- 9 - Ahrens, M.L., G.Maas., P.Schuster ve H.Winkler ; FEBS LETTERS. :
5 (5), 327 (1969)
- 10- Aihara, T. ve K.Satoh; J.PHARM.SOC.JAPAN : 74, 990 (1954)
- Ref.: C.A.: 49, 1282 (1955)
- 11- Aihara, T. ve K.Satoh ; VITAMINS (JAPAN): 8, 164 (1955)
- 12- Aksenova, O.V.; LAB.DELO. : 4, 219 (1964)
- 13- Aksenova, E.N.; NAUCH.TR.ASPIR.ORDINATOROV, 1-i, MOSK.MED.INST. :
119 (1967) - Ref.: C.A.: 70, 50497 (1969)

- 14- Aksenova, E.N.; Pr. 1(PERVOGO) MOSK.MED.INST.: 61, 241 (1968)
- Ref.: C.A.: 71, 84583 (1969)
- 15- Aksenova, E.N., A.Z.Knizhnik., P.L.Senov ve S.V.Churyukonova ;
FARMATSIYA (MOSCOW): 17 (2), 51 (1968) - Ref.: C.A.: 69,
5248 (1968)
- 16- Aksenova, E.N., A.Z.Knizhnik., V.M.Pechennikov ve P.L.Senov .
IBID.: 18 (4), 46 (1969) - Ref.: C.A.: 71, 105249 (1969)
- 17- Aliev, A.M.; APTECHN.DELO : 13, 31 (1964)
- 18- Aliev, A.M.; FARMATSIYA (MOSCOW) : 16 (6), 66 (1967)
- Ref.: C.A.: 68, 33211 (1968)
- 19- Aliev, A.M.; FARM.ZH.(KIEV): 23 (6), 40 (1968)
- Ref.: C.A.: 70, 109190 (1969)
- 20- Aliev, A.M. ve A.O.Onov; CHIM.FARM.ZH.: 2 (4), 44 (1968)
- Ref.: C.A.: 69, 46126 (1968)
- 21- Aliev, A.M. ve A.O.Onov; LAB.DELO: 8, 470 (1972)
- Ref.: C.A.: 77, 13701 (1972)
- 22- Amermino, V. ve G.Cavina; ANN.IST.SUPER SANITA: 1, 431 (1965)
- 23- Amermino, V. ve E.Cingolini; IBID: 2 (5), 545 (1966)
- Ref.: C.A.: 67, 8528 (1967)
- 24- Anastasi, A., E.Mecarelli ve M.L.Nebbue; BOLL.CHIM.FARM.: 91.
222 (1952) - Ref.: C.A.: 46, 10259 (1952)
- 25- Anderson, B.B. ve J.D. Cowan; J.CLIN.PATHOL.: 21 (1), 85 (1968)
- 26- Anderson, F.J. ve A.E.Martell; J.AM.CHEM.SOC. : 86, 715 (1964)
- 27- Appleyard, J.G. ve D.A.Stanley; IRCS LIBR.COMPEND.: 1(4), 3.
11.4 (1973) - Ref.: C.A.: 81, 132500 (1974)
- 28- Arima, K.; J.JAPAN CHEM.: 4, 30 (1950) - Ref.: C.A.: 44, 6500
(1950)

- 29- Asahi, Y., T. Terao, M. Fujita ve T. Muramatsu; ANN. REPT. TAKEDA RES. LAB.: 28, 31 (1969)
- 30- Atkin, L., A.S. Schultz, W.L. Williams ve C.N. Frey; IND. ENG. CHEM. (ANAL. ED.): 15 (2), 141 (1943)
- 31- Atsuo, T. ve F. Saburo; HAKKO KOGAKU ZASSHI : 45 (7), 611 (1967)
- 32- Axelrod, A.E. ve C.J. Martin; ANN. REV. BIOCHEM.: 30, 383 (1961)
- 33- Baczyk, S. ve O. Kochel'ska; MICROCHIM. ACTA : 6, 1059 (1966)
-Ref.: A.A.: 15, 428 (1966)
- 34- Baker, H. ve H. Sobotka; ADVAN. CLIN. CHEM.: 5, 197 (1962)
- 35- Baltazar, J.A.A. ve M. Margaride; REV. PORT. FARM. : 3, 53 (1953)
-Ref.: C.A.: 48, 470 (1954)
- 36- Ban, I., A. Rub-Saidac ve V. Ciocanelea; CLUJUL MED. : 42, 479 (1972) - Ref.: C.A.: 80, 19429 (1974)
- 37- Bandi, G.D.; FARMACO. ED. PRAT. : 21 (12), 669 (1966)
-Ref.: C.A.: 66, 58866 (1967)
- 38- Bandurski, R.S. ve B. Axelrod; J. BIOL. CHEM.: 193, 405 (1951)
- 39- Barasanova, L.A., I.S. Azhgikhin ve Z.M. Umanski; MED. ZH. AZB.: 12, 31 (1973) - Ref.: C.A.: 80, 149082 (1974)
- 40- Barbiroli, G.; MINERVA DIET. : 7 (4), 257 (1967)
- Ref.: A.A.: 15, 5576 (1968)
- 41- Bardham, D.K.; J. INSTN. CHEM. INDIA: 32 (2), 86 (1960)
-Ref.: A.A.: 8, 8175 (1961)
- 42- Base, B.K., R.B. Mukherjee, S. Das ve D.N. Dutta; J. PROC. INST. CHEMISTS. (INDIA) : 33, 234 (1961) - Ref.: C.A.: 56, 6300 (1962)

- 43- Base, B.K. ve B.N. Dutta; IBID.: 34, 142 (1962)
-Ref.: C.A.: 58, 4378 (1963)
- 44- Base, B.K., R.B. Mukherjee ve B.N. Dutta; IBID. : 35 (2), 54
(1963) - Ref.: C.A.: 59, 6712 (1963)
- 45- Bayer, E.; RICHTER PHARMCHAUWORKS GYOGYSZERESZET. : 821, 4
(1964) - Ref.: C.A.: 65, 9418 (1966)
- 46- Bazhulina, N.P., A.Ya.Lomakin, Yu.V.Morozov ve Fa.Savin;
MOL.BIOL.: 4 (6), 899 (1970)- Ref.:C.A.:74, 28153 (1971)
- 47- Benhamou, E. ve R.Lacroix; ANNAL.BIOL.CLIN.(PARIS) : 16, 78
(1958)
- 48- Benhamou, E. ve F.Amouch; COMPT.REND.SOC.BIOL.: 153, 307 (1959)
-Ref.: C.A.: 53, 22179 (1959)
- 49- Bendor, L.; CHEMIST-ANALYSIS : 53, 8 (1964)
- 50- Beral, H., L.Murea, C.Russu ve A.Iacob; PHARMACIE (Bucharest):
9, 501 (1961)
- 51- Berg, T.M. ve H.A.Behagel; APPLIED.MICROBIOL. : 23 (3), 531
(1972)
- 52- Bergamini, C.; SPENMENTALE SEZ.CHIM.BIOL.: 4, 38 (1953)
-Ref.: C.A.: 48, 6501 (1954)
- 53- Berndorfer - Kraszner, E.; ELELEMEZ IPAR : 24 (4), 106 (1970)
-Ref.: C.A.: 73, 108281 (1970)
- 54- Bican-Fister, T. ve V.Dražin; J.CHROMATOG.: 77, 389 (1973)
- 55- Bina, A.F., J.M.Thomas ve E.B.Brown; J.BIOL.CHEM .: 148, 111
(1943)
- 56- Block, R.J.; ANAL.CHEM.: 22, 1327 (1950)

- 57- Bogdanova, V.A.; VOPR.PITANIYA: 18 (5), 46 (1959)
- Ref.: C.A.: 57, 11477 (1962)
- 58- Bojarski, A., D.Blitek ve B.Borkowski; DISS.PHARM.PHARMACOL. :
19 (3), 297 (1967) - Ref.: C.A.: 67, 102734 (1967)
- 59- Bonasera, N., R.Guarneri ve V.Bonavita; BOLL.SOC.ITAL.BIOL.SPER. :
40 (24), 1834 (1964) - Ref.: C.A.: 63, 3301 (1965)
- 60- Bonavita, V.; ARCH.BIOCHEM.BIOPHYS. : 88, 366 (1960)
- 61- Bonavita, V. ve V.Scardi; EXPERIENTIA : 14, 7 (1958)
- 62- Bonavita, V. ve V.Scardi; ANAL.CHIM.ACTA : 20, 47 (1959)
- 63- Brin, M.; J.ASSOC.OFFIC.AGR.CHEMISTS : 87, 519 (1970)
- 64- British Pharmacopoeia (B.P.), The Pharmaceutical Press,
London (1968)
- 65- The British Pharmaceutical Codex (B.P.C.), The Pharmaceutical
Press, London (1973)
- 66- Brown, E.B., A.F.Bina ve J.M.Thomas; J.BIOL.CHEM.: 158, 455
(1945)
- 67- Brown, J.A. ve M.M. Marsh; ANAL.CHEM.: 24, 1952 (1952)
- 68- Burger, K.; MAGYAR KÉM.FOLY .: 68 (11), 474 (1962)
-Ref.: A.A.: 10, 3861 (1963)
- 69- Burke, W.J., A.D.Potter ve R.M.Parkhurst; ANAL.CHEM.: 32,
727 (1960)
- 70- Cabaud, P., R.Leeper ve F.Wróblewski; AM.J.CLIN.PATHOL. :
26, 1101 (1956)

- 71- Cadorniga, R., A. Dominguez-Gil ve M. C. Gonzalus; FARMACO ED. PRAT.: 27 (10), 572 (1972) - Ref.: C.A.: 78, 7862 (1973)
- 72- Camagni, A.H.; PROGNALISIS : 1 (2), 73 (1968)
Ref.: C.A.: 74, 108044 (1971)
- 73- Campbell, J.A. ve H.A. Mc. Leon; J. AM. PHARM. ASSOC.: 44, 263 (1955)
- 74- Canbäck, T. ve M.L. Lindholm; FINSKA KEMIST. SAMTUNDETS MEDD.: 54, 134 (1945) - Ref.: C.A.: 44, 9627 (1950)
- 75- Canuti, A. ve A. Frittoli; CHEM. IND. (MILANO) : 51 (5), 483 (1969)
- 76- Carpenter, L.E. ve F.M. Strong; ARCH. BIOCHEM.: 3, 375 (1944)
- 77- Cascioli, D., P. Celletti, B. Petrangeli ve A. Pullo; BOLL. CHIM. FARM.: 110, 480 (1971)
- 78- Castillo, C.M., J.M. Lopez, O. Valls ve S.V. Vilas; IBID.: 113, 267 (1974) - Ref.: C.A.: 81, 140896 (1974)
- 79- Cavill, A. ve L. Magid; U.S. 3, 446, 899 (Cl. 424-280, A61k),
27 May 1969, Appl. 18 May 1965 - 24 Jan. 1968; 4pp
- Ref.: C.A.: 71, 42328 (1969)
- 80- Cavalli, R. ve C. Rurali; BOLL. CHIM. FARM.: 110 (8), 438 (1971)
- 81- Cerna, J.; VEDA UYKUM PRUMYSKI PATROVINARSKEM.: 12, 131 (1963) - Ref.: C.A.: 62, 4305 (1965)
- 82- Cerna, J., J. Pickova ve J. Blottna; PRUM. POTRAVIN : 23 (2), 52 (1972)

- 83- Chakrabarty, M. ve S.K. Dutta; J. PROC. INST. CHEMISTS (INDIA) :
37 (3), 114 (1965) - Ref.: C.A.: 63, 9747 (1965)
- 84- Chiang, H.C. ve Y.C. Wu; J. CHIN. CHEM. SOC. (TAIPEI) : 17 (2),
104 (1970)
- 85- Clegg, K.M. ve J.J.C. Hinton; J. SCI. FOOD AGRIC. : 9, 717 (1958)
- 86- Coates, M.E., J.E. Ford, G.F. Harrison; BRIT. J. NUTRITION : 6,
75 (1952) - Ref.: C.A.: 46, 6689 (1952)
- 87- Cohen, A., J.W. Haworth ve E.G. Hughes; J. CHEM. SOC. : 4374
(1952 a)
- 88- Cohen, A. ve E.G. Hughes; IBID. : 4384 (1952 b)
- 89- Colombini, C.E. ve E.E. McCoy; ANAL. BIOCHEM. : 34, 451 (1970)
- 90- Compaiolivia, L. ve M. Giannini; FARMACO (PAVIA) ED. PRAT. :
11, 229 (1956) - Ref.: C.A.: 53, 6537 (1959)
- 91- Contractor, S.F. ve B. Shane; CLIN. CHIM. ACTA : 21, 71 (1968)
- 92- Contractor, S.F. ve B. Shane; J. CHROMATOGR. : 41 (3-4), 483 (1969)
- 93- Coste, M.J. ve L.J. Chanan; TRAV. SOC. PHARM. MONTPELLIER : 29 (1),
67 (1969)
- 94- Coursin, D.B. ve V.C. Brown; PROC. SOC. EXPTL. BIOL. MED. : 98,
315 (1958) - Ref.: C.A.: 52, 18605 (1958)
- 95- Crockett, R., F. Mesnard, D. Grenie ve R. Dang; BULL. SOC. PHARM.
BORDEAUX : 108 (1), 7 (1969) - Ref.: C.A.: 72, 24712 (1970)
- 96- Cunha, O.R.P.; BOLL. ESCOLA FARM. UNIV. COIMBRA ED. CIENT. : 25,
54 (1965) - Ref.: C.A.: 65, 3671 (1966)

- 97 - Cunningham, E. ve E.E. Snell; J. BIOL. CHEM. : 158, 491 (1945)
- 98- Danilovic, M., B. Lavica ve Z. Savic; ARCH. FARM (BELGRADE) :
16 (1), 13 (1966) - Ref.: C.A.: 66, 68982 (1967)
- 99- Danno, T., Y. Hashiguchi, A. Nakama, K. Masukawa ve K. Okumura;
VITAMINS (JAPAN) : 44 (2), 180 (1971)
- 100- Danyatnin, V.A. ve G.A. Federova; TR. USESS. NAUCHN- ISSLED. :
VITAMIN INST. : 8, 97 (1961) - Ref.: C.A.: 57, 2338 (1962)
- 101- DeJongh, D.C., S.C. Perricone ve W. Korytnyk; J. AM. CHEM. SOC. :
88, 1233 (1966)
- 102- DeJongh, D.C., S.C. Perricone ve M.L. Gay; ORG. MASS SPECTR. :
1, 151 (1968)
- 103- DeJongh, D.C. ve W. Korytnyk; METHODS ENZYMOLOG. : 18, 483 (1970)
- 104- Dement'eva, B.N., N.A. Drobinskaya, L.V. Ionova ve V.L. Florentév;
BIOKHIMIYA : 33 (2), 350 (1968) - Ref.: A.A.: 17, 1092 (1969)
- 105- Deutsches Arzneibuch, Kommentar, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaften MBH, Stuttgart (1968)
- 106- Deyl, Z. ve J. Rosmus; J. CHROMATOGR. : 8, 537 (1962)
- 107- Diding, N.A.; SVENSK. FARM. TIDSKR. : 58, 321 (1955)
-Ref.: C.A.: 49, 11061 (1955)
- 108- Dittmann, J.; DEUT. GESUNDHEITSW. : 22 (26), 1217 (1967)
- 109- Driskell, J.A. ve D.P. Foshee; J. NUTR. : 104 (7), 810 (1974)
- 110- Dubash, D.D. ve W.E. Moore.; J. PHARM. SCI. : 61 (3), 386 (1972)

- 111- "Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography"
E.Merck, Darmstadt, 1971
- 112- Eble, I.N. ve R.M. Brooker; EXPERIENTIA : 18, 524 (1962)
- 113- Elliott, W.H. ve G.R. Waller; BIOCHEM. APPL. MASS. SPECTROM. :
499 (1972); - Ref.: C.A.: 77, 72099 (1972)
- 114- Enriquez, O. ve V. Kubac; REV. FAC. FARM. UNIV. CENTRAL VENEZUELA :
3 (8), 249 (1962) - Ref.: C.A.: 61, 10535 (1964)
- 115- Erbe, S.: GER (EAST) . 41, 306 (Cl. A 61 k), Sept. 5, 1965, Appl.
Dec. 18, 1962; 3pp - Ref.: C.A.: 64, 6418 (1966)
- 116- Esh, G.C., J.M. Som, H. Bhattacharya ve S. Bhattacharya; INDIAN
J. PHARM. : 26, 133 (1964)
- 117- Evangelopoulos, D.E.; EXPERIENTIA : 23 (9), 708 (1967)
- 118- Extra Pharmacopoeia (Martindale), 76 baskı, The Pharmaceu-
tical Press, London (1973)
- 119- Farmacopea Ufficiale Della Repubblica Italiana, Istituto
Poligrafico dello Stato P.V., Rome (1965)
- 120- Fasella, P. ve C. Baglioni; ACTA VITAMINOL. : 10, 27 (1956)
- 121- Feigl, F. ve E. Jungreis; CLIN. CHIM. ACTA : 3, 399 (1958)
- 122- Feldheim, W.; NOR. VET. TIDSSKR. : 83 (12), 107 (1971)
- 123- Fiedlerova, V. ve J. Davidek; Z. LEBENS. M.-UNTERS. FORSCH. :
155 (5), 277 (1974) - Ref.: C.A.: 81, 150410 (1974)
- 124- Filojdic, M., M. Gruner ve K. Urancic; KEM. IND. (ZAGREB) : 10,
311 (1961) - Ref.: C.A.: 57, 2529 (1962)

- 125- Finzi, M. ve A. Mattenzi; MINERVA MED.: 54, 1148 (1963)
-Ref.: C.A.: 59, 9133 (1963)
- 126- Foster, J.S. ve J.W. Murfin; J. PHARM. PHARMACOL.: 13, 126 (1961)
- 127- Pharmacopée Française (Fr.P.), IX. baskı, Les Presses Del'Imprimerie, Maisonneuve 57, Sainte Ruffine (1970)
- 128- Franjo, E. ve M. Olivera; TEHNIKA (BELGRADE) : 26 (1), 144
(1971) - Ref.: C.A.: 74, 146304 (1971)
- 129- Frodyma, M.M. ve V.T. Liev; ANAL. CHEM.: 39(7), 814 (1967)
- 130- Fujita, A., D. Fujita ve K. Fujino; J. VITAMINOL. (OSAKA) :
1, 279 (1955)
- 131- Fujita, A., K. Matsuura ve K. Fujino; IBID.: 1, 267 (1955)
Ref.: C.A.: 50, 2722 (1956)
- 132- Fujita, A., K. Matsuura ve K. Fujino; VITAMINS (JAPAN) :
6, 589 (1956) - Ref.: C.A.: 50, 15672 (1956)
- 133- Fujita, M., K. Aoki, Y. Asahi ve S. Kavajiri; J. TAKEDA RES. LAB.:
31 (4), 516 (1972)
- 134- Fukui, S.; ANAL. CHEM.: 25, 1884 (1953)
- 135- Fukui, S. ve N. Oishi; BITAMIN : 33 (6), 677 (1966)
-Ref.: C.A.: 65, 9331 (1963)
- 136- Fumito, T., T. Matsuura, K. Miyao ve K. Naito; JAPAN 25, 398 (63),
Nov. 28 Appl. July 15, 1961; lpp - Ref.: C.A.: 60, 9108
(1964)
- 137- Gaichira, K.; BITAMIN (KYOTO): 29 (3), 211 (1964)

- 138- Gaichira, K.; IBID.: 29 (2), 147 (1964)
- 139- Gaichira, K.; KAGAKU NO. RYIHI Z. OKAN : 64, 157 (1965)
-Ref.: C.A.: 62, 10800 (1965)
- 140- Ganshirt, H. ve A. Malzacher; NATURWISS.: 47 (12), 279 (1960)
- 141- Galal, E.E., N. Ghoneim ve A.H. Gobba; J. DRUG RES.: 3, 195
(1971) - Ref.: C.A.: 77, 105576 (1972)
- 142- Galatzeanu, I. ve A. Ferenc; INTERN. J. APPL. RADIATION ISO-
TOPES : 17 (7), 369 (1966) - Ref.: C.A.: 65, 5827 (1966)
- 143- Gansden, E.L.; ANAL. CHEM.: 32 (11), 1415 (1960)
- 144- Gansow, O.A. ve R.H. Holm; TETRAHEDRON : 24, 4477 (1968)
- 145- Gaudiano, A. ve M. Polizzi - Sciairone; ANN. IST. SUPER SANITA :
1, 588 (1965) - Ref.: C.A.: 65, 8675 (1966)
- 146- Gerasimov, M.A. ve E.S. Kuleshova; VINO DELIA I-VINOGRADANSTVO
SSSR : 25 (8), 4 (1965) - Ref.: C.A.: 64, 14923 (1966)
- 147- Gibbs, H.D.; J. BIOL. CHEM.: 72, 649 (1927)
- 148- Gill, J.E.; J. CHROMATOGR.: 26 (1), 315 (1967)
- 149- Godsheu, E.L., C.H. Edwards ve G.A. Edwards; ANAL. CHEM.: 32
(11), 1415 (1960)
- 150- Gonnard, P., M. Camier ve N. Boigne; BULL. SOC. CHIM. BIOL.:
46, 407 (1964)
- 151- Görner, F. ve V. Oravcová; BRITISLAV. LEK. LISTY : 53 (1), 61
(1970)

- 152- Gough, G.R. ve H. Silberman; AUSTRALASIAN J. PHARM.: 44 (522),
369 (1963) - Ref.: C.A.: 61, 536 (1964)
- 153- Gunsalus, I.C., W.W. Umbreit, W.D. Bellamy ve C.E. Faust; J.
BIOL. CHEM.: 161, 743 (1945)
- 154- Gupta, V. ve F.V. Laloren; J. AM. PHARM. ASSOC.: 4, 86 (1964)
- 155- Gustavson, W.R., G. Ledin, Jr. ve A. Furst; J. CHROMATOGR.: 24 (1),
288 (1966)
- 156- Güven, K.C. ve Z. Gürkok; ECZACILIK BÜL. : 9 (12), 184 (1967)
- 157- György, P.: NATURE; 31, 498 (1934)
- 158- György, P., R. Kuhn ve T. Wagner-Jauregg; Z. PHYSIOL. CHEM.:
233, 241 (1934)
- 159- György, P.; BIOCHEM. J. : 29, 767 (1935)
- 160- Hackbart, W. ve H. Weiss; GER. (EAST). 49, 491 (Cl. A 61 k).
AUG. 5 1966, APPL. AUG. 14. 1965; 2pp
-Ref.: C.A.: 66, 5762 (1967)
- 161- Hackbart, W. ve H. Weiss; GER. (EAST). 54, 769 (Cl. A 61 k),
MARCH 20, 1967, APPL. FEB. 5, 1966; 2 pp
-Ref.: C.A.: 67, 76289 (1967)
- 162- Haertelt, M.; BOLL. CHIM. FARM.: 103, 140 (1964)
- 163- Hakenson, R.; J. CHROMATOGR.: 13, 263 (1964)
- 164- Hall, W.L.; J. ASSOC. OFFIC. AGR. CHEMISTS : 42, 519 (1959)
- 165- Hall, W.L., C.F. Bruening ve W.P. Parrish; IBID.: 39, 155 (1956)

- 166- Halliday, N. ve H.M.Evans; J.BIOL.CHEM.: 118, 255 (1937)
- 167- Hanes, C.S. ve F.A. Isherwood; NATURE: 164, 1107 (1949)
- 168- Harakova, Z., V.Hoch, J.Secka, H.Smalkova ve Z.Roth;
CESKOSLOV. FARM. : 8, 193 (1959) - Ref.:C.A.:53,18289
(1959)
- 169- Harding, R.S., I.C.Plough ve T.E.Friedemann J.NUTRITION :
68, 323 (1959)
- 170- Harris, S.A.; J.AM.CHEM.SOC.: 62, 3203 (1940)
- 171- Harris, S.A.; IBID.: 63, 3363 (1941)
- 172- Harris, S.A.; J.ORG.CHEM. : 27, 2705 (1962)
- 173- Harris, S.A., E.T. Stiller ve K.Folkers; J.AM.CHEM.SOC. :
61, 1242 (1939 a)
- 174- Harris, S.A. ve K.Folkers; IBID. : 61, 3307 (1939 b)
- 175- Harris, S.A., T.J.Webb ve K.Folkers; IBID. : 62, 3198 (1940)
- 176- Harris, S.A., D.Heyl ve K.Folkers; IBID.: 66, 2088 (1944 a)
- 177- Harris, S., D.Heyl ve K.Folkers; J.BIOL.CHEM.: 154, 315
(1944 b)
- 178- Hashmi, M.H., F.R. Chughtai, A.S.Adil ve T.Qureshi; MICROCHIM.
ACTA (WIEN) : 1118 (1967)
- 179- Hashmi, M.H., N.A.Chughtai ve M.A.Shahid; IBID. : 244 (1969)
- 180- Hashmi, M.H., F.R.Chughtai ve M.I.D.Chughtai; IBID. : 951
(1969)

- 181- Haskell, B.E. ve U. Wallnoefer; ANAL. BIOCHEM.: 19 (3), 569
(1967)
- 182- Hata, S., M. Yamakawa, T. Anraku ve H. Sano; YAKUZAIGAKU : 26
(4), 294 (1966)
- 183- Heacock, R.A. ve M.E. Mahon; J. CHROMATOGR.: 17, 338 (1965)
- 184- Hedin, P.A.; J. AGR. FOOD CHEM.: 11, 343 (1963)
-Ref.: A.A.: 11, 4561 (1964)
- 185- Hennessy, D.J., A.M. Steinberg, G.S. Wilson ve W.P. Keaveney;
J. ASSOC. OFFIC. AGR. CHEMISTS : 43, 765 (1960)
-Ref.: C.A.: 55, 3865 (1961)
- 186- Herbert, V., K.S. Lau ve C.W. Gottlieb; ADVAN. TRACER METHODOL.:
4, 273 (1968)
- 187- Hernänenen, P., V. Mytty, T. Paavola ve H. Vartiainen; FARM.
AIKOKAUSLEHTI : 67, 148 (1958) - Ref.: C.A.: 52, 13186
(1958)
- 188- Heyl, D.; J. AM. CHEM. SOC.: 70, 3434 (1948)
- 189- Heyl, D., E. Luz, S.A. Harris ve K. Folkers; IBID. : 73, 3430
(1951)
- 190- Hideyicki, M., H.Y. Kinzabura ve S. Teruo; YAKUZAIGAKU : 26 (2),
120 (1966) - Ref.: C.A.: 69, 87709 (1968)
- 191- Hideyuku, M. ve E. Shohei; U.S. 3, 626, 065 (Cl. 424) 255;
A 61 k - Ref.: C.A.: 76, 90046 (1972)
- 192- Hill, J.M.; BIOCHEM. J. : 128, 701 (1972)
- 193- Hochberg, M., D. Melnick ve B.L. Oser; J. BIOL. CHEM.: 155, 109
(1944 a)

- 194- Hochberg, M., D. Melnick ve B.L.Oser; IBID.: 155, 119 (1944 b)
- 195- Hochberg, M., D. Melnick ve B.L.Oser; IBID. : 155, 129 (1944 c)
- 196- Hocrett, M.; BOLL. CHIM. FARM. : 103, 146 (1964)
- 197- Holtz, P. ve D. Palm; PHARMACOL. REV. : 16 (2), 113 (1964)
- 198- Holzer, H., U. Gerlach, G. Jacobi ve M. Gnoth; BIOCHEM. Z. :
329, 529 (1958)
- 199- Hardy, O. ve L. Urbanova; CESKOSL. FARM. : 6, 510 (1957)
- 200- Huff, J. J. ve W. A. Perlzweig; J. BIOL. CHEM. : 155, 345 (1944)
- 201- Hung, W.; VITAMIN (KYOTO) : 22 (1), 96 (1961)
- 202- Hungarian Pharmacopea (Hung. Pharm.), VI. baskı, Akademiai
Kiado, Budapest (1970)
- 203- Hussein, A. M., A. A. Kasseem ve W. Darwish; BULL. FAC. PHARM.
CAIRO UNIV. 3(1), 213 (1969)
- 204- Hüttenrauch, R.; PHARMAZIE : 8, 492 (1966)
- 205- Hüttenrauch, R.; IBID.: 23 (3), 150 (1968)
- 206- Hüttenrauch, R.; J. CHROMATOGR.: 51, 330 (1970)
- 207- Hüttenrauch, R. ve L. Klotz; EXPERIENTIA : 19 (2), 95 (1963)
- 208- Hüttenrauch, R. ve U. Zahn; ARCH. PHARM. : 300 (5), 385 (1966)
- 209- Hüttenrauch, R. ve R. Tümmeler; PHARMAZIE : 10, 561 (1967)
- 210- Ichiba, A.; JAPAN MED. J. : 1 (3), 219 (1948)

- 211- Ichiba, A. ve K. Michi; SC.PAP.I.P.C.R. : 35, 73 (1938)
- 212- Ichiba, A. ve K. Michi; IBID. : 36, 1 (1939 a)
- 213- Ichiba, A. ve K. Michi; IBID. : 36, 173 (1939 b)
- 214- Ichiba, A. ve S. Emoto; IBID. : 38, 347 (1941)
- 215- Ikeda, S.; T. Oka, N. Ohishi ve S. Fukui; VITAMINS (JAPAN) :
38 (2), 109 (1968)
- 216- Ikram, M., G. A. Miana ve M. Islam; PAKISTAN J.SCI.IND.RES. :
6, 117 (1963) - Ref.: C.A.: 63, 9747 (1965)
- 217- Igoda, S. A.; SPAN 315, 173, March 1, 1966; Appl. July 9,
1965; 14 pp - Ref.: C.A.: 65, 2076 (1966)
- 218- Imanari, T. ve Z. Tamura; CHEM. PHARM. BULL. : 15 (6), 896 (1967)
- 219- Inazu, K. ve R. Yamamoto; VITAMINS (JAPAN): 34 (3), 328 (1966a)
- 220- Inazu, K. ve R. Yamamoto; IBID. : 34 (3), 334 (1966)
- 221- Icsikova, U. M. ve L. N. Krauchina; TRUDY USESOYUZ. NAUCHISSLE-
DOVATEL VIT. INST. : 6, 131 (1959) - Ref.: C.A.: 55,
14828 (1961)
- 222- Isaac, J.; ENG. QUIM : 20 (5), 4 (1968) - Ref.: C.A.: 70,
56334 (1969)
- 223- Ishikawa, S. ve G. Kutsui; BITAMIN (KYOTO) : 29 (3), 203 (1964)
- 224- Itagaki, T. ve T. Tsukahara; IBID. : 36 (1), 21 (1967)
- Ref.: C.A.: 67, 76340 (1967)
- 225- Ito, A., K. Inami ve A. Ohara; ANN. REPT. TAKAMINE LAB .: 6, 45
(1954)

- 226- IUPAC-IUB Comm. on Biochem.Nomenclature; J.AM.CHEM.SOC. :
82, 5581 (1960)
- 227- IUPAC-IUB Comm. on Biochem.Nomenclature; J.BIOL.CHEM. :
241, 2987 (1966)
- 228- IUPAC-IUB Comm. on Biochem. Nomenclature; BIOCHEM. : 9 (20),
4019 (1970)
- 229- IUPAC-IUB Comm. on Biochem. Nomenclature; MOL.CELL.BIOCHEM. :
3 (1), 75 (1974 a) - Ref.: C.A.: 81, 116304 (1974)
- 230- IUPAC-IUB Comm. on Biochem. Nomenclature; BIOCHEM.J. : 137
(3), 417 (1974 b)
- 231- Iwai, K., O.Okinaku ve H.Yokomizo; BITAMIN (KYOTO) : 35 (5),
387 (1967) - Ref.: C.A.: 67, 8546 (1967)
- 232- Iwasa, Y., Y.Tateuchi ve A.Kawabata; BULL.UNIV. OSAKA PREF.
SER. B. : 9 (20), 139 (1959)
- 233- İzgü, E.; TÜRK MEJLEN TECRUBI BIOL. DERGISI : 27 (1), 14
(1967)
- 234- Jablonowski, W.; FARM.POL. : 23 (1), 51 (1967)
Ref.: C.A.: 67, 57278 (1968)
- 235- Janecke, H. ve H.Voege; NATURWISS. : 55 (9), 4478 (1968)
Ref.: C.A.: 69, 99440 (1968)
- 236- Jindra, A.; CESKOSLOV FARM. : 8, 15 (1959)
- Ref.: C.A.: 53, 15483 (1959)
- 237- Jitka, C., P.Jaroslava ve B.Jarmilo; PRUM.POTAVIN : 23 (2),
52 (1972)

- 238- Johansson, S. ve H.D. Tiselius; SCAND. J. CLIN. LAB. INVEST. :
32 (1), 9 (1973) - Ref.: C.A.: 80, 13023 (1974)
- 239- Jonaitis, G. ve B. Kriscuniene; PRÍKL. SPEKTROSK. MOTER. SOVESHCH
16th : 2, 47 (1969) - Ref.: C.A.: 72, 374062 (1970)
- 240- Jones, A. ve S. Morris ANALYST : 75, 613 (1950)
-Ref.: C.A.: 45, 1639 (1951)
- 241- Jones, A.; IBID. : 79, 586 (1954) - Ref.: C.A.: 49, 1280
(1955)
- 242- Jones, R.G. ve E.C. Kornfeld; J. AM. CHEM. SOC. : 73, 107 (1951)
- 243- Kakac, B. ve Z.J. Vejdélek; ČESKOSLOV. FARM. : 10, 522 (1961)
- 244- Kassem, A.A., N. Rafael, K.A. El. Soud ve A. Montasser; BULL. FAC.
PHARM. CAIRO UNIV. : 8 (1), 223 (1970)
-Ref.: C.A.: 73, 38517 (1970)
- 245- Kassem, A.A. ve W. Darwish; IBID. : 11 (1), 129 (1972)
- 246- Katerbungskii, A.M., L.A. Konstantinuskaya ve S.V. Zemlyanoi;
VOENNO MED. ZH. : 3, 55 (1965) - Ref.: C.A.: 64, 19326
(1966)
- 247- Kawahara, K. ve A. Tanimura; EISEI SHIKENJE HOKOKU: 86, 88
(1968) - Ref.: C.A.: 71, 116573 (1969)
- 248- Kawasaki, C., T. Kishi ve T. Nishihara; BITAMIN (KYOTO): 38 (3),
202 (1968) - Ref.: C.A.: 69, 84387 (1968)
- 249- Kawasaki, C., T. Nishihara, H. Nagano ve M. Kondo; VITAMINS (JAPAN):
38 (2), 116 (1968)
- 250- Kayaalp, S.O.; FARMAKOLOJİ DERS NOTLARI III (1973)

- 251- Kawazu, M.; JAPAN. 6921. 332 (Cl. 16 E 431), 11 SEP. 1969,
APPL. 12 NOV. 1965; 1 pp - Ref.: C.A.: 71, 124244 (1969)
- 252- Kaziol, J.; CHEM. ANAL. (WARSAW) : 6, 251 (1961 a)
-Ref.: C.A.: 55, 21485 (1961)
- 253- Kaziol, J.; IBID.: 6 (2), 251 (1961 b)
- 254- Kaziol, J. ve P. Zokresu; TOWAROZNAWST CHEM. WYZSZA SZKOLA
EKON. POZNAN ZESZYTY NAUK. : 1 (17), 49 (1964)
-Ref.: C.A.: 63, 16130 (1965)
- 255- Keresztesy, J.C. ve J.R. Stevens; J. AM. CHEM. SOC.: 60, 1267
(1938)
- 256- Kishibe, T. ve S. Fukui; J. FERMENT. TECHNOL. (JAPAN): 29, 91
(1951) - Ref.: C.A.: 48, 2805 (1954)
- 257- Kjellman, H.; FARM. REVY.: 59, 825 (1960)
-Ref.: C.A.: 55, 9784 (1961)
- 258- Kleflin, Z. ve K. Šumanovič; CROAT. CHEM. ACTA : 30, 181 (1958)
- 259- Klotz, L. ve R. Hüttenrauch; ARCH. PHARM. : 296 (11), 721 (1963)
- 260- Klotz, L. ve W. Poethke; PHARM. ZH. : 103, 1 (1964 a)
- 261- Klotz, L. ve W. Poethke; IBID. : 103, 169 (1964 b)
- 262- Klotz, L. ve W. Poethke; IBID. : 103, 255 (1964 c)
- 263- Kniewald, J. ve P. Mildner; KEM. U. IND. ZAGREB : 11 (11), 639
(1962) - Ref.: A.A.: 10, 4421 (1963)
- 264- Knobloch, E.; COLL. CZECHOSLOV. CHEM. COMMUN. : 12, 407 (1947)

- 265- Knorr, F.; BRAUWISS. : 86 (1949)- Ref.: C.A.: 44, 3206 (1950)
- 266- Kohen, V. ve N. Russeva; FARMATSIYA (SOFIA) : 18 (1), 3 (1968)
- 267- Komatsu, T., T. Abe ve M. Watanabe; JAPAN. 7025, 917 (Cl. 30 C 41), 27 AUG. 1970, APPL. 26 FEB. 1968; 2pp
Ref.: C.A.: 73, 112976 (1970)
- 268- Korytnyk, W.; J.MED.CHEM.: 8, 112 (1965)
- 269- Korytnyk, W.; ANAL.BIOCHEM. : 17 (1), 66 (1966)
- 270- Korytnyk, W., E.J.Kris ve R.P. Singh; J.ORG.CHEM. : 29, 574 (1964)
- 271- Korytnyk, W. ve E.J.Kris; CHEM.IND. (LONDON) : 1834 (1964)
- 272- Korytnyk, W., G.Fricke ve B.Paul; ANAL.BIOCHEM.: 17 (1), 66 (1966)
- 273- Korytnyk, W. ve R.P.Singh; J.AM.CHEM.SOC. : 89, 1331 (1967)
- 274- Korytnyk, W. ve H. Ahrens; J.HETEROCYCL.CHEM. : 7 (5), 1013 (1970)
- 275- Koziol, J.; CHEM.LISTY : 59 (1), 96 (1965)
- 276- Körner, W.F. ve H.Nowak; INTERN.Z.VITAMINFORSCH. : 36, 264 (1966)
- 277- Kraut, H. ve U.Imhoff; NAHRUNG : 12 (1), 29 (1968)
- 278- Kravchenyuk, L.P. ve S.P. Miskidzhyan ; FARM.ZH.(KIEV) : 22 (6), 81 (1967)- Ref.: C.A.: 68, 107901 (1968)
- 279- Krisciuniene, B. ve H.Jonaitis; SPEKTROSK.TR.SIB.SOVESHCH. 4th: 29, (1969) - Ref.: C.A.: 74, 17575 (1971)

- 280- Krueger, K. ve W. H. Peterson; J. BIOL. CHEM.: 158, 145 (1945)
- 281- Kruchakova, F. A. ve Yu. A. Rudchenko; LAB. DELO : 7, 400 (1964)
Ref.: C. A.: 61, 9764 (1964)
- 282- Kuhn, R. ve I. Low; BER. : 72, 1453 (1939 a)
- 283- Kuhn, R., K. Westphal, G. Wendt ve O. Westphal; NATURWISS.:
27, 469 (1939) - Ref.: C. A.: 33, 8201 (1939 b)
- 284- Kuniko, K. ve A. Tanimura; EISI SHIKENJO KOKOKU : 86, 88
(1968) - Ref.: C. A.: 71, 116573 (1969)
- 285- Kuri, R. P.; KITASATO ARCH. EXPL. MED. : 24 (2), 77 (1951)
Ref.: C. A.: 46, 10269 (1952)
- 286- Kurioka, S. ve K. Makino; JIKEI. MED. J.: 16, 31 (1969)
- 287- Kuroda, T.; BITAMIN (KYOTO) : 28 (1), 21 (1963)
- 288- Kusuo, N.; IRYO : 23 (1), 97 (1969) - Ref.: C. A.: 71, 15986
(1969)
- 289- Lacroix, R.; ANN. BIOL. CLIN. (PARIS) : 15, 712 (1957)
- Ref.: C. A.: 53, 22187 (1959)
- 290- Lacourt, A., N. Delonde ve G. Gupaduwa; ANAL. CHIM. ACTA: 14, 100
(1956) - Ref.: C. A.: 51, 537 (1957)
- 291- Ladner, H. A.; HIPOKRATES : 19, 769 (1966)
- 292- LaDue, J. S., F. Wróblewski ve A. Karmen; SCIENCE : 120, 497
(1954)
- 293- Laszlovszky, J., M. André-Stiglamayer; ACTA PHARM. HUNGARICA:
37, 159 (1967)

- 294- Laubic, H.; BULL. TRAV. SOC. PHARM. BORDEAUX : 87, 119 (1949)
Ref.: C.A.: 46, 2239 (1952)
- 295- Leemans, F.A.J.M. ve J.A. McCloskey; J. AM. OIL CHEM. SOC.:
44, 11 (1967)
- 296- Leitch, I. ve A. Hepburn; NUTRITION ABSR. and REVS. : 31, 389
(1961) - Ref.: C.A.: 55, 16707 (1961)
- 297- Lepkovsky, S.; SCIENCE: 87, 169 (1938)
- 298- Lepkovsky, S., T.H. Jukes ve M.E. Krause; J. BIOL. CHEM.: 115,
557 (1936)
- 299- Lerner, J. ve A.I. Schepartz; J. CHROMATOG.: 39, 132 (1969)
- 300- Leurquin, J.L. ve J.C. Herman; J. PHARM. BELG. : 17, 111 (1962)
- 301- Levine, V.E. ve W.G. Hansen; BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA: 31, 248
(1958)
- 302- Lin, Y.; TAI-WAN YAO HSUEK TSACHIH. : 24 (1), 18 (1972)
Ref.: C.A.: 80, 74297 (1974)
- 303- Lingane, J.J. ve O.L. Davis; J. BIOL. CHEM.: 137, 567 (1941)
- 304- Llopis, A.B.; GALENICA ACTA (MADRID): 8, 115 (1955)
- Ref.: C.A.: 50, 8141 (1956)
- 305- Loo, Y.H. ve L. Badger; J. NEUROCHEM. : 16, 801 (1969)
- 306- Loy, H.W.; J. ASSOC. OFFIC. AGR. CHEMISTS: 41, 587 (1958)
- Ref.: C.A.: 53, 1573 (1959)
- 307- Loy, H.W.; IBID.: 42, 529 (1959) - Ref.: C.A.: 53, 18148 (1959)

- 308-Louis, L.; ANN.N.Y.ACAD.SCI.: 166 (1), 184 (1969) Ref.:C.A.: 71, 122242 (1969)
- 309-Ludwig, E. ve U.Freimuth; NAHRUNG: 9 (1), 41 (1965)
- 310-Luĸ'yanchikova, G.I., V.N.Bernshtein ve S.N.Stepanyuk; FARM.ZH. (KIEV): 24 (5), 66 (1969) - Ref.:C.A.: 72, 15787 (1970)
- 311-Lutz, D.M.; SWISS. 408, 914 (Cl.CO7d), MARCH 15, 1966, APPL.MAY 5, 1962; lpp - Ref.:C.A.: 66, 28667 (1967)
- 312-Lutomsky, J.; HERBA POL.: 15 (4), 392 (1969)
- 313-Lyon, J.B., J.A.Bain ve H.L.Williams; J.BIOL.CHEM.: 237, 1989 (1962)
- 314-MacArthur, M.J. ve J.Lehmans; J.ASSOC.OFFIC.AGR.CHEMISTS: 42, 619 (1959)
- 315-MacCoy, T.A. ve J.Q.Snayder; PROC.OKLO.ACAD.SCI.: 31, 100 (1952) -Ref.:C.A.: 46, 6686 (1952)
- 316-Macek, T.J. ve B.A.Feller; J.AM.PHARM.ASSOC.: 44, 254 (1955) -Ref.:C.A.: 49, 9230 (1955)
- 317-Machek, G. ve F.Lorenz; SCI.PHARM.: 32(3), 185 (1964) -Ref.:C.A.: 62, 1516 (1965)
- 318-Machowski, W.; POLSKI TYGOD.LEKAR, I-WIADOMOŚCI.LEKAR: 14, 1681 (1959) - Ref.:C.A.: 55, 8559 (1961)
- 319-Maekawa, H. ve S.Egawa; U.S. 3,626,065(Cl.424/255;A61k), 07 DEC. 1971, JAPAN.APPL.25 MAY 1967; 4pp - Ref.:C.A.: 76, 90046 (1972)
- 320a-Magid, L.: U.S. 3,646,192(Cl.424-35;A61k), 29 FEB.1972, APPL.830, 870, 05 JUN.1969; 3pp - Ref.:C.A.: 76, 158376 (1972)

- 320-Mahadevan, V.; ANN. BIOL.: 27, 21 (1951)
- 321-Manousek, O. ve P. Kocova; J. ELECTROANALYT. CHEM.: 4, 324 (1960)
- 322-Manousek, O. ve P. Kocová; MICROCHIM. ACTA.: 754 (1961)
- 323-Manousek, O. ve P. Zuman; COLLECTION CZECH. CHEM. COMMUN.: 29(6),
1432 (1964)
- 325-Markis, A. ve S. N. Gershoff; HORM. METAB. RES.: 5 (6), 457 (1973)
- Ref.: C.A.: 80, 46701 (1974)
- 325-Martin, H.; PHYTOCHEM.: 9 (4), 725 (1970)
- 326-Martinez-Marzal, E.; ANN. BROMATOL.: 19 (4), 363 (1967)
- 327-Maruyama, H. ve D. Coursin; ANAL. BIOCHEM.: 26 (3), 420 (1968)
- 328-Massa, V.; TRAV. SOC. PHARM. MONTPELLIER: 29 (1), 35 (1969)
- 329-Masukawa, K., K. Furusaki, T. Ueda, ve K. Okumura; VITAMINS (JAPAN):
37 (2), 182 (1968)
- 330-Masukawa, K., K. Furusaki, H. Monaka, U. Tadashi ve K. Okumura;
BITAMIN (KYOTO): 38 (4), 259 (1968)
- 331-Masukawa, K., M. Furusaki, H. Shigenaka, S. Kamiba ve K. Okumura;
JAPAN. 6922, 116(C1.3004), 20 SEPT. 1969, APPL. 22 APR. 1967;
4pp - Ref.: C.A.: 71, 128716 (1969)
- 332-Mathis, C. ve J. P. Gorel; PROD. PROBL. PHARM.: 20 (9), 408 (1965)
- Ref.: C.A.: 64, 9507 (1966)
- 333-Meisel, M. N. ve N. A. Ponoshchnikova; BIOKHI MYA: 17, 593 (1952)
- Ref.: C.A.: 47, 3927 (1953)
- 334-Melnick, D., M. Hochberg, H. W. Himes ve B. L. Oser; J. BIOL. CHEM.:
160, 1 (1945)

- 335-Mesami, S., N. Toshimitsu ve M. Isao; JAPAN. 61.735(C1.30C41),
29 MAY 1968, APPL.02 MAR.1966; 2pp - Ref.: C.A.: 69, 99398
(1968)
- 336-Metzler, D.E. ve E.E. Snell; J. AM. CHEM. SOC.: 74, 979 (1952)
- 337-Meyer, J., E. Burllet ve J.G. Faudi; BULL. ACAD. NATL. MED. (PARIS):
139, 407 (1955) - Ref.: C.A.: 53, 22244 (1959)
- 338-Michi, K. ve H. Nonaka; J. HOME ECON (JAPAN): 1 (1), 10 (1951)
- Ref.: C.A.: 49, 14212 (1955)
- 339-Miyazawa, S.; TAISHA: 8 (8), 615 (1971) - Ref.: C.A.: 79,
102160 (1970)
- 340-Morita, M.; YAKUGAKUZASSHI: 82, 50 (1966)
- 341-Morrison, A.L. ve R.F. Long; J. CHEM. SOC.: 211 (1958)
- 342-Morozov, Yu.V., N.P. Bazhuline ve L.P. Cherkashina; BIOFIZIKA:
12 (5), 773 (1967)
- 343-Moszczyński, P. ve C. Kubicka; ZESZ. NAUK. POLITECH. LODZ. CHEM.
SPOZYW.: 20, 159 (1972) - Ref.: C.A.: 79, 139668 (1973)
- 344-Mowat, J.H. ve J.S. Webb; U.S. 2, 918, 471, DEC. 22, 1959 - Ref.:
C.A.: 54, 8855 (1960)
- 345-Mukherjee, R.E. ve B.N. Dutta; J. INST. CHEM. INDIA: 34 (6), 281
(1962) - Ref.: A.A.: 10, 3421 (1963)
- 346-Murai, K.; YAKUZAIGAKU: 21, 124 (1961a) - Ref.: C.A.: 56,
7434 (1962)
- 347-Murai, K.; ARCH. PROC. PHARM. JAPAN: 21 (2), 124 (1961b) - Ref.:
A.A.: 10, 3863 (1963)

- 348-Myron, B.; METHODZ ENZMOL.: 18, 519 (1970)
- 349-Myszkowska, K., J. Tautt ve S. Tuszyńska; ACTA POL. PHARM.: 24 (3),
323 (1967)
- 350-Nakay, J.; NIPPON KAGAKU ZASSHI: 81, 1731 (1960) - Ref.: C.A.:
56, 2275 (1962)
- 351-Nakken, K. F.; STRAHLENTHERAPIE: 131 (3), 24 (1966)
- 352-Negoro, H., T. Miki, S. Ueda ve K. Okada; YAKUGAKUZASSHI: 79 (1),
42 (1959)
- 353-Nerlo, H., S. Pawlak ve W. Czarnecki; ACTA POL. PHARM.: 26(2),
177 (1969)
- 354-Nikolov, S. ve L. Nedeleva; FARMATSIYA(SOFIA): 16 (5), 35 (1966)
- 355-Nose, Y. ve T. Kawasaki; TAISHA: 3, 276 (1966) - Ref.: C.A.:
66, 73690 (1967)
- 356-Novak, A. F., V. R. Gana, J. A. Liuzzo ve E. B. Rublöff; J. AM. PHARM.
ASSOC.: 42, :581, (1953)
- 357-Nuns, E. J., T. K. Sunduram, O. Zoch ve E. E. Sneil; ARCH. INTERN.
PHYSIOL. BIOCHIM.: 71 (4), 639 (1963) - Ref.: C.A.: 60,
1991 (1964)
- 358-Nürnberg, E.; DEUT. APOTHEKER-ZTG.: 101, 268 (1960)
- 359-Oberzill, W.; SCI. PHARM.: 36 (1), 30 (1968a) - Ref.: C.A.: 68,
98656 (1968)
- 360-Oberzill, W.; IBID.: 36 (3), 199 (1968b) - Ref.: C.A.: 70, 9249
(1969)

- 361-Ohnishi, Y., Z. Horii ve M. Makita; YAKUGAKUZASSHI: 87 (6), 747
(1967)
- 362-Oike, K., M. Yokoi ve H. Hiruta; BITAMIN(KYOTO): 19 (4), 466
(1960)
- 363-Okumura, K.; IBID.: 23 (4), 244 (1961)
- 364-Okumura, K., K. Kotera, T. Oine ve T. Oda; VITAMINS(JAPAN): 35 (4),
301 (1967)
- 365-Okumura, K., S. Imado ve T. Oda; IBID.: 35 (5), 375 (1967)
- 366-Olszewski, Z., H. Krutel ve U. Tarantowicz; FARM.POL.: 29 (2),
157 (1973) - Ref.: C.A.: 79, 70174 (1973)
- 367-Onada, H.; YAKUZAGAKU: 24, 119 (1964)
- 368-Ono, S., R. Onishi ve K. Kawamura; YAKUGAKUZASSHI: 86 (1), 11
(1966)
- 369-Onov, A.O.; TR.VSES.SEZDA FARM: 1, 832 (1970) - Ref.: C.A.:
76, 6747 (1972)
- 370-Onov, A.O.; UCH.ZAP.AZARB.GOS.MED.INST.: 30, 218 (1969) -
Ref.: C.A.: 74, 34648 (1971)
- 371-Osaka, K.; BITAMIN(KYOTO): 23 (1), 47 (1966) - Ref.: C.A.:
64, 10078 (1966)
- 372-Oshiba, K. ve H. Kawakita; IBID.: 36 (5), 406 (1967) - Ref.:
C.A.: 68, 19458 (1968)
- 373-Ostrowski, W.; ACTA MICROBIOL.POL.: 3, 35 (1954) - Ref.:
C.A.: 49, 410 (1955)
- 374-Pantorin, I. ve B. Secomska; ROCZN.PZH.: 20 (1), 103 (1969)

- 375-Parikh, B.D. ve V. Frederick; LOFGREN DRUG STANDARDS: 26, 51
(1958) - Ref.: C.A.: 52, 14967 (1958)
- 376-Parker, F.S.; APPL. SPECTROSCOPY: 15, 96 (1961) - Ref.: C.A.:
56, 6804 (1962)
- 377-Parrak, V. ve V. Oravcova; FARM. OBZOR.: 38, 49 (1969)
- 378-Parrish, W.P., H.W. Loy ve O.L. Kline; J. ASSOC. OFFIC. AGR. CHEMISTS:
38, 506 (1955) - Ref.: C.A.: 50, 5980 (1956)
- 378-Parrish, W.P. ve H.W. Loy; IBID.: 39, 157 (1956) - Ref.: C.A.:
51, 2141 (1957)
- 379-Pechtold, F.; ARZNEITTEL-FORSCH.: 14 (9), 1056 (1964a)
- 380-Pechtold, F.; IBID.: 14 (12), 1328 (1964b)
- 381-Pellerin, F. ve J.F. Letavernier; ANN. PHARM. FRANC.: 31 (3),
161 (1973)
- 382-Peneva, A.; NAUCHNI TR. NAUCHNOIZSLED INST. DRZHAVEN KONTROL.
LEKARSTU SREDSTVA.: 1, 59 (1963) - Ref.: C.A.: 63, 16131
(1965)
- 383-Peterson, E.A. ve H.A. Sober; J. AM. CHEM. SOC.: 76, 169 (1954)
- 384-Petrangeli, B., G.P. Moretti, P. Celletti ve S. Favilli; FARMACO
ED. PRAT.: 28 (10), 507 (1973) - Ref.: C.A.: 80, 63882 (1974)
- 385-Petrova, I. ve M. Yankova; PHARMAZIE: 24 (7), 391 (1969)
- 386-Petrovic, S.E., B.E. Belina ve D.B. Vukazlovic; ANAL. CHEM.:
40 (6), 1007 (1968)
- 387-Pharmacopea Helvetica (Pharm. Helv.), Vl. baskı, Eidgenössische
Drucksachen und Material 3000, Bern (1971)

- 388-Planta, C.V.; HELV. CHIM. ACTA: 44, 1444 (1961) - Ref.: C.A.:
56, 8113 (1962)
- 389-Pol, G.; VOEDING: 22, 429 (1961)
- 390-Polansky, M.M., R.T. Camarro ve E.W. Toepfer; J. ASSOC. OFFIC. AGR.
CHEMISTS: 47, 827 (1964) - Ref.: C.A.: 61, 15022 (1964)
- 391-Pomoshchnikova, N.A.; VITAMINNYE RESURSY I IKH. ISPOL'ZOVANIE
AKAD. NAUK. S.S.S.R. INST. BIOKHM. A.N. BAKHA SBORNIK: 3, 145
(1956) - Ref.: C.A.: 50, 15686 (1956)
- 392-Princivale, M.; REND. IST. SUPER SANITA: 21, 701 (1958) - Ref.:
C.A.: 53, 7289 (1959)
- 393-Prista, L.N., R. Morgado ve F. Guerra; ANAIS. FAC. FARM. PORTO: 16,
97 (1956)
- 394-Prista, L.N., A.R. Silva ve H.P. Melo; IBID.: 22, 67 (1962)
- 395-Prosser, A.R., A.J. Sheppard ve D.A. Libby; J. ASSOC. OFFIC. ANAL.
CHEM.: 50 (6), 1348 (1967) - Ref.: A.A.: 16, 1510 (1969)
- 396-Puzztai, A.; MAGYAR KEMIAI FOLYÓIAT: 60, 323 (1954) - Ref.:
C.A.: 51, 14871 (1957)
- 397-Rabinowitz, J.C. ve E.E. Snell; J. BIOL. CHEM.: 169, 631 (1947)
- 398-Rabinowitz, J.C., N.I. Mondy ve E.E. Snell; IBID.: 175, 147 (1948)
- 399-Rabinowitz, J.C. ve E.E. Snell; ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS.: 43, 399
(1953a)
- 400-Rabinowitz, J.C. ve E.E. Snell; IBID.: 43, 408 (1953b)
- 401-Radhokrishnamurty, R. ve P.S. Sarma; CURRENT SCI. (IND.): 22,
209 (1953) - Ref.: C.A.: 48, 3431 (1954)

- 402-Ranke, B., E. Ranke ve B. F. Chow; J. NUTR.: 71, 411 (1960) - Ref.:
C.A.: 56, 10658 (1962)
- 403-Ransy, J.; J. PHARM. BELG.: 7, 224 (1952) - Ref.: C.A.: 46, 9258
(1952)
- 404-Rappe, A.; IBID.: 24, 186 (1969) - Ref.: C.A.: 71, 74079 (1969)
- 405-Rasmussen, A. I.; UNIV. DEL. AGR. EXP. STA. BULL.: 408, 14 (1974)
Ref.: C.A.: 81, 134936 (1974)
- 406-Raut, V. S., F. J. Gagrat ve D. Banerjee; INDIAN J. PHARM.: 28 (9),
250 (1966)
- 407-Reiber, H.; BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA: 279, 310 (1972)
- 408-Reisch, J.; TETRAHEDRON LETT.: 2, 4513 (1967)
- 409-Reiser, M., L. Nook ve E. Eidebenz; GER. OFFEN 1, 810, 705 (Cl. A61k),
13 AUG. 1970, APPL. 25 NOV. 1968; 8pp - Ref.: C.A.: 73, 91239 (1970)
- 410-Rennagel, W. R. ve W. Korytnyk; EXPERIENTIA: 24 (3), 304 (1968)
- 411-Richter, H. E.; MICROCHIM. ACTA: 3, 455 (1962)
- 412-Richter, W., M. Vecchi, W. Vetter ve W. Walter; HELVETICA CHIM. ACTA:
50 (2), 364 (1967)
- 413-Rodrigues, L. D. ve J. A. Salvia; REV. PORT. FARM.: 5, 75 (1955)
Ref.: C.A.: 50, 1264 (1956)
- 414-Rodwell, V. W., B. E. Volcani, M. Ikawa ve E. E. Snell; J. BIOL. CHEM.:
233, 1548 (1958)
- 415-Roth, H. R. ve K. H. Surborg; ARCH. PHARM. (WEINHEIM): 301(9), 646
(1968)

- 416-Roushdi, I.M. ve F.T.Husseini; J.PHARM.SCI.U.A.R.: 8, 171 (1967)
-Ref.:C.A.: 72, 24691 (1970)
- 417-Rudchenko, Yu.A. ve F.G.Yanovsky; RES.INST.TUBERCULOSIS KIEV
VOPR.MED.KHIM.: 8, 283 (1962) - Ref.:C.A.: 57, 17316 (1962)
- 418-Rudowske, I.; PRZEGL.DERMATOL.: 54 (5), 597 (1967)
Ref.:C.A.: 68, 98573 (1968)
- 419-Rukui, S. ve N. Ohishi; ARCH.BIOCHEM.BIOPHYS.: 130 (1), 584 (1969)
- 420-Ryu, H.; IGAKUTO SEIBUTSUGAKU (Med. and Biol.): 17, 196 (1950)
Ref.:C.A.: 45, 1189 (1951)
- 421-Sabri, M.I. ve V.K.Rao; INDIAN J.TECHNOL.: 5 (9), 287 (1965)
Ref.:C.A.: 64, 531 (1965)
- 422-Saccani, F. ve C.Neri; BOLL.CHIM.FARM.: 109, 275 (1970a)
- 423-Saccani, F. ve C.Neri; IBID.: 109, 344 (1970b)
- 424-Sadakichi, P.S.; JAPAN.7031, 178 (Cl.C07d), 08 OCT.1970, APPL.28
DEC.1966; 2pp - Ref.:C.A.: 74, 67725 (1971)
- 425-Said, F., M.M.Amer ve K.N.Girgis; BULL.FAC.PHARM.CAIRO UNIV.:
8 (1), 11 (1969)
- 426-Samejima, M. ve I.Sugimoto; YAKUZAIGAKU: 26 (1), 23 (1966a)
- 427-Samejima, M., I.Sugimoto ve I.Utsuni; YAKUGAKU ZASSHI: 86 (10).
900 (1966b)
- 428-Santos, M.S.; BULL.ESCOLA FARM.UNIX(OIMBRA): 18, 103 (1958)
Ref.:C.A.: 53, 8537 (1959)
- 429-Sarma, P.S., E.E.Snell ve C.A.Elvehjem; J.BIOL.CHEM.: 165, 55
(1946)

- 430-Sato,K.; BITAMIN: 16, 561 (1959)
- 431-Sato,A. ve T.Itagaki; IBID.: 34, 19 (1966) - Ref.:C.A.: 65,
9331 (1966)
- 432-Sattsangi,P.D. ve C.J.Argoudelis; J.ORG.CHEM.: 33, 1337 (1968)
- 433-Saxena,O.C.; MICROCHEM.J.15, 281 (1970)
- 434-Saxena,V.A.K.; PHARMASTUDENT: 16, 72 (1972) - Ref.:C.A.: 81,
96358 (1974)
- 435-Scapini,G.,P.Condorelli ve F.Innocenti; BOLL.SEDUTE ACCAD.
GIOENIA SCI.NATUR CATANIA: 8 (8), 626 (1966)
- 436-Schimizu,H. ve H.Shiba; J.CHEM.SOC.JAPAN PURE CHEM.SECT.: 72,
442 (1951) - Ref.:C.A.: 46, 2120 (1952)
- 437-Schoen,G.; ACTA VITAMINOL.: 7, 151 (1953) - Ref.:C.A.: 48,
13851 (1954)
- 437-Schou,S.A.;PHARM.ACTA HELV.: 34, 309 (1959)
- 438-Schulz,E.P. ve M.R.G.Sanchez; REV.SOC.QUIM.MEX.: 11 (4), 117
(1967) - Ref.:C.A.: 68, 33240 (1968)
- 439-Schwartz,R. ve N.O.Kjeldgaard; BIOCHEMICAL J.: 48, 333 (1951)
- 440-Scott,M.L.,G.F.Hauser ve W.F.Bruce; J.AM.CHEM.SOC.: 67, 157
(1945)
- 441-Scudi,J.V.; J.BIOL.CHEM.:139, 707 (1941)
- 442- Scudi,J.V.,H.F.Koones ve J.C.Keresztesy; AM.J.PHYSIOL.: 129,
459 (1940 a)

- 443-Scudi, J.V., H.F. Koones ve J.C. Keresztesy; PROC. SOC. EXP. BIOL. MED.:
43, 118 (1940b)
- 444-Scudi, J.V., W.A. Bastedo ve T.J. Webb; J. BIOL. CHEM.: 136, 399
(1940)
- 445-Sellês, F.E. ve M.A. Camacho; GALANICA ACTA: 21, 59 (1970)
- 446-Sennello, L.T. ve C.J. Argoudelis; ANAL. CHEM.: 41 (1), 171 (1969)
- 447-Serrat, F.B.; ARS. PHARM.: 11, 267 (1970)
- 448-Shah, R.C., P.V. Raman ve M.M. Mehta; J. PHARM. SCI.: 54 (3), 432
(1965)
- 449-Shiroishi, M. ve A. Hayakawa; BITAMIN: 22 (2), 138 (1961)
- 450-Sibi, M., A. Batcu ve C. Trandofar; ACAD. REP. POPULARE ROMINE INST.
BIOCHIM. STUDIICERCETAN BIOCHIM.: 1, 223 (1958)
Ref.: C.A.: 53, 20170 (1959)
- 451-Siegel, F.P. ve M.I. Blake; ANAL. CHEM.: 34 (3), 397 (1962)
- 452-Signal, S.A. ve V.P. Sydentricker; SCIENCE: 78, 545 (1941)
- 453-Simatoepang, P.S.M.; SAURA PHARM. MADJALEH: 4 (3), 67 (1959)
Ref.: C.A.: 58, 13724 (1963)
- 454-Singh, C. ve L.V. Kannan; J. SCI. IND. RESEARCH: 18, 144 (1959)
Ref.: C.A.: 54, 5800 (1960)
- 455-Sina, A., A.A. Kassem, S.A. Ibrahim ve M.A. Attila; INDIAN J. PHARM.
35 (5), 155 (1973)
- 456-Smith, M.A. ve L.S. Dietrich; BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA: 230, 262
(1971)

- 457-Smith, B.K.; AUST. J. MED. TECHNOL.: 4 (4), 133 (1973)
Ref.: C.A.: 81, 74307 (1974)
- 458-Snell, E.E.; J. BIOL. CHEM.: 154, 313 (1944a)
- 459-Snell, E.E.; IBID.: 157, 491 (1944b)
- 460-Snell, E.E.; ANN. REV. BIOCHEM.: 19, 277 (1950)
- 461-Snell, E.E.; PHYSIOL. REV.: 33, 509 (1953)
- 462-Snell, E.E. ve D.E. Metzler; ANN. REV. BIOCHEM.: 25, 435 (1956)
- 463-Soda, K., T. Yorufuji, H. Misano ve M. Moriguchi; CHEM. J.: 114, 629
(1969)
- 464-Stainer, C. ve C. Lapière; J. PHARM. BELG.: 11, 191 (1956)
-Ref.: C.A.: 51, 1358 (1957)
- 465-Starshou, P.D.; MILITARY MED. AKAD. LENINGRAD LAB. DELO: 8 (6),
37 (1962)
- 466-State Pharmacopoeia of the USSR (S.P.), IX. baskı, Moskova, 1961
- 467-Stayle, L.E., P.A. Ouellette ve E.J. Hanus; U.S. 3, 037, 911 JUNE 5,
1962, APPL. SEPT. 4, 1959; 3pp - Ref.: C.A.: 57, 3571 (1962)
- 468-Sterescu, M., S. Arizan, M. Dobrovici ve R. Talmocici; REV. CHIM.
(BUCHAREST): 8, 376 (1957) - Ref.: C.A.: 51, 17091 (1957)
- 469-Stevens, P.G.; U.S. 2, 734, 063, FEB. 7, 1956 - Ref.: C.A.: 50, 13099
(1956)
- 470-Stillier, E.T., J.C. Keresztesy ve J.R. Stevens; J. AM. CHEM. SOC.:
61, 1237 (1939)

- 471-Stokes, J.D., A.Larsen, C.R.Woodward ve J.W.Foster; J.BIOL.CHEM.:
150, 17 (1943)
- 472-Stokstad, E.L.R.; ANN.REV.BIOCHEM.: 31, 451 (1962)
-Ref.:C.A.: 58, 4857 (1963)
- 473-Storvick, C.A., E.Benson, M.A.Edwards ve M.J.Woodring; METHODS
BIOCHEM:ANAL. (David Click, Editor Interscience): 183 (1964)
-Ref.:C.A.: 61, 10892 (1964)
- 474-Sumanović, K. ve Z.Stanković; SCI.PHARM.PROC., 25th.: 2, 97 (1966)
- 475-Sutton, H.E. ve E.Beersiecher; UNIV.TEXAS PUB.: 5109, 109 (1951)
-Ref.:C.A.: 45, 10292 (1951)
- 476-Swaminathan, M.; NATURE: 145, 780 (1940)
- 477-Sweeney, J.P. ve W.L.Hall; J.ASSOC.OFFIC.AGR.CHEMISTS: 35 (2),
479 (1952)
- 478-Sweeney J.P ve W.L.Hall; IBID.: 38, 697 (1955) - Ref.:C.A.:
49, 16338 (1955)
- 479-Szabolcz, L.; MAGYAR KÉM FOLYÓIRAT: 59, 218 (1953)
-Ref.:C.A.: 48, 327 (1954)
- 480-Sweelley, C.C., R.Bentley, M.Makita ve W.W.Wells; J.AM.CHEM.SOC.
85, 2497 (1963)
- 481-Tadera, K., K.Yasumoto, H.Tsuji ve H.Mitsuda; VITAMINS(JAPAN):
48 (2), 69 (1974) - Ref.:C.A.: 80, 142651 (1974)
- 482-Takahashi, K. ve diğ.; JAPAN.2700('51) MAY 26
-Ref.:C.A.: 47, 833 (1953)
- 483-Takako, I. ve T.Tohrü; J.VITAMINOL.: 18 (2), 90 (1972a)
-Ref.:C.A.: 77, 150634 (1972)

- 484-Takako, I. ve T. Tohru; VITAMINS(JAPAN): 45 (4), 209 (1972b)
Ref.:C.A.: 77, 14236 (1972)
- 485-Takanashi, T., J. Okada ve M. Hori; J. PHARM. SOC. JAPAN: 76, 1180
(1956)
- 486-Takanashi, S.; TAISHA: 8 (2), 145 (1971)
-Ref.:C.A.: 79, 102157 (1973)
- 487-Takanashi, S. ve Z. Tamura; J. VITAMINOL.: 16 (2), 129 (1970)
- 488-Takeuchi, Y., A. Kawabata ve Y. Iwasa; NIPPON NOGCI KAGAKU KOISHI:
42 (2), 68 (1968) - Ref.:C.A.: 69, 38763 (1968)
- 489-Tamura, G., T. Tsunoda, S. Miyazawa ve J. Kirimura; JAPAN ANALYST:
1, 37 (1952) -Ref.:C.A.: 47, 1222 (1953)
- 490-Tashiaku, N.; JAPAN.7112,757(Cl.A61kj,C 071),01 APR.1971,APPL.
04 APR.1969;3pp - Ref.:C.A.: 75, 40446 (1971)
- 491-Tatjana, B.F. ve D. Vajislava; J. CHROMATOGR.: 77 (2), 389 (1973)
- 492-Terp, P. ve C. Trolle-Lassen; ARCH. PHARM. CHIMI.: 59, 801 (1952)
- 493-Teruv, F. ve M. Kazuko; BITAMIN(KYOTO): 41 (4), 260 (1970)
-Ref.:C.A.: 73, 32181 (1970)
- 494-Thiele, V.F. ve M. Brin; J. NUTRITION: 90 (4), 347 (1966)
- 495-Thoss, G.; BRAUWISS.: 17 (8), 317 (1964) - Ref.:C.A.: 61, 15025
(1964)
- 496-Toda, T. ve T. Matsuda; VITAMINS(JAPAN): 35 (1), 50 (1967)
- 497-Toepfer, E.W. ve J. Lehman; J. ASSOC. OFFIC. AGR. CHEMISTS: 43,
57 (1960)
- 498-Toepfer, E.W. ve J. Lehman; IBID.: 44, 426 (1961)

- 499-Toepfer, E.W., M.M. Polansky ve E.M. Hewston; ANAL. BIOCHEM.: 2, 463 (1961)
- 500-Toepfer, E.W. ve M.M. Polansky; J. ASSOC. OFFIC. AGR. CHEMISTS: 53, 546 (1970)
- 501-Toyao, K., H. Naoki ve A. Akira; JAPAN. 7038, 347 (Cl. A61kj), 04 DEC. 1970, APPL. 27 MAR. 1968; 2pp - Ref.: C.A.: 74, 79589 (1971)
- 502-Tsuda, T., H. Mizukami ve S. Yarimizu; SANKYO KENKYUSHO NEMPO: 16, 114 (1964) - Ref.: C.A.: 65, 15161 (1966)
- 503-Tsuji, K.; ANN. N.Y. ACAD. SCI.: 153 (2), 446 (1968)
- 504-Tsukida, K.; YAKUGAKU: 22 (9), 575 (1973) - Ref.: C.A.: 80, 23624 (1974)
- 505-Turano, C., P. Fasella, P. Vecchini ve A. Giartosio; J. CHROMATOGR.: 14, 201 (1964)
- 506-Türk Farmakopesi (T.F.), Milli Eğitim Basımevi, İstanbul (1974)
- 507-Umbreit, W.W., W.D. Bellamy ve I.C. Gunsalus; ARCH. BIOCHEM.: 7, 185 (1945)
- 508-Umbreit, W.W., D.E. Okane ve I.C. Gunsalus; J. BACTERIOL.: 576 (1946)
- 509-Uprety, M.C., D.K. Basu ve V.K.M. Rao; INDIAN J. TECHNOL.: 1, 397 (1963)
- 510-Urbányi, T. ve S. Budavari; J. PHARM. SCI.: 57 (8), 1386 (1968)
- 511-United States Pharmacopeia (U.S.P.), XVII. baskı, Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1970)
- 512-Utsumi, I., N. Tanaka, K. Harada ve T. Usuki; ANN. REPT. G. TANABE Co., LTD.: 1, 47 (1956) - Ref.: C.A.: 51, 5364 (1957)

- 513-Utsumi, I., N. Tanaka, K. Harada, T. Usuki ve N. Kuzu; JAPAN.8946('57)
OCT.19 - Ref.:C.A.: 52, 12334 (1958)
- 514-Vaisman, G.A., M.N. Bushkova ve L.I. Repoport; APTECHN.DELO: 12 (4),
68 (1963)
- 515-Vannotti, A.; SCIENIA(ITALY): 85, 11 (1950) - Ref.:C.A.: 44,
3588 (1950)
- 516-Vègh, A., G. Szasz ve P. Kertesy; PHARMAZIE: 16, 512 (1961)
- 517-Verna, S.C. ve G.M. Chauhan; BENGLADESH PHARM.J.: 2 (4), 13 (1973)
Ref.:C.A.: 80, 112576 (1974)
- 518-Volta, A.H.; REV.FAC.FARM.UNIV.CENT.VENEZ.: 8 (20), 188 (1967)
Ref.:C.A.: 68, 107922 (1968)
- 519-Wada, H.T. Morisue, Y. Sakamoto ve K. Ichihara; J.VITAMINOL.(KYOTO):
3, 183 (1957)
- 520-Wada, H. ve E.E. Snell; J.BIOL.CHEM.: 236 (7), 2089 (1961)
- 521-Wagner, G.; ARCH.PHARM.: 289, 121 (1956)
- 522-Wallace, L.H.; J.ASSOC.OFFIC.AGR.CHEMISTS: 42, 519 (1959)
- 523-Watanabe, H.; YAKUGAKU SAIKIN NO SHIMPÔ: 2, 23 (1958)
-Ref.:C.A.: 53, 3602 (1959)
- 524-Watanabe, H.; JAPAN ANALYST: 19, 1658 (1970)
- 525-Watanabe, H. ve M. Harikava; ANN.REPT.TAKEDA RES.LAB.: 8, 103
(1949) - Ref.:C.A.: 47, 3918 (1953)

- 526-Weber, O.W.A., J.R. Urbigit ve B.Z. Senkowski; ANN. N.Y. ACAD. SCI.:
153 (2), 461 (1968)
- 527-Wojenski, S., S. Jaskulski, M. Baryla, J. Florezuk ve L. Krowczyuski;
POLISH. 44, 894, SEPT. 21, 1961, APPL. AUG. 29, 1959; 2pp
Ref.: C.A.: 57, 9667 (1962)
- 528-Wokes, F. ve F.W. Norris; J. PHARM. PHARMACOL.: 8, 895 (1956)
- 529-Wright, E.C.B.; LAB. PRACTICE: 10 (8), 543 (1961)
-Ref.: A.A.: 9, 1691 (1962)
- 530-Wright, E.C.B.; IBID.: 11 (4), 294 (1962)
-Ref.: A.A.: 9, 5462 (1962)
- 531-Wright, E.C.B.; J. ASS. PUBLIC ANAL.: 5 (1), 8 (1967)
-Ref.: C.A.: 67, 42717 (1967)
- 532-Yamada, M. ve Y. Tanaka; BITAMIN (KYOTO): 31 (2), 159 (1965)
- 533-Yamada, M.; IBID.: 39 (3), 162 (1969) - Ref.: C.A.: 70, 80866
(1969)
- 534-Yamada, M., A. Saito ve Z. Tamura; CELEM. PHARM. BULL. TOKYO: 14 (5),
482 (1966) - Ref.: A.A.: 14, 5580 (1967)
- 535-Yamada, M., N. Inakoshi ve T. Tsukahara; BITAMIN (KYOTO): 35 (6),
457 (1967) - Ref.: C.A.: 67, 61521 (1967)
- 536-Yamada, S., H. Kuma ve K. Yamanouchi; INORG. CHIM. ACTA: 10 (2),
151 (1974) - Ref.: C.A.: 81, 114006 (1974)
- 537-Yurtaev, G.I.; TRUDY. VSESOUZ. NAUCH.-ISSLEDOVATEL VITAMIN INST.:
4, 144 (1953) - Ref.: C.A.: 49, 9768 (1955)
- 538-Zehaluk, C.E. ve B.L. Walker; J. NUTR.: 103 (11), 1548 (1973)

539-Zhukova, Z.N. ve E.S.Zhdanovich; ZH.PRIKL.KHIM.: 41 (10), 2324
(1968) - Ref.:C.A.: 70, 68074 (1969)

540-Zoni, G. ve V.Lazzeretti; BULL.OMI .FARM.: 106, 872 (1967)

541-Zuman, P.; EXP.METHODS BIOPHYS.CHEM.: 393, (1973)
-Ref.:C.A.: 81, 165635 (1974)