

284528

T. C.
Hacettepe Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Analitik Toksikoloji Bölümü

ÜLKEMİZDEKİ TETRASİKLİN
PREPARATLARINDA TOKSİK
BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN TESBİTİ

DOKTORA TEZİ

Eczacı
FİLİZ HINCAL

ANKARA 1973

51

T. C.
Hacettepe Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Analitik Toksikoloji Bölümü

**ÜLKEMİZDEKİ TETRASİKLİN
PREPARATLARINDA TOKSİK
BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN TESBİTİ**

DOKTORA TEZİ

Eczacı
FİLİZ HINCAL

ANKARA 1973

Ö N S Ö Z

Bu çalışmada tetrasiklin preparatları toksik bozunma ürünleri yönünden incelenmiştir. Ayrıca bu amaçla kalitatif ve kantitatif bir tayin metodu kurulmuştur.

Konunun tesbiti ve yürütülmesi sırasında yakın ilgi ve desteklerini gördüğüm sayın Prof.Dr.Oğuz Kayaalp'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın her devresinde maddî ve manevî yardımlarıyla beni destekleyen Bölüm Başkanı Sayın Dr.Suna Duru'ya teşekkür ve minnet borçluyum.

Yeni kurulmuş bir bölümün elemanı olarak karşılaştığım tüm güçlükleri, bana verdiği laboratuvar imkanlarıyla yenebilmemi sağlayan sayın Prof.Dr.Altan Günalp'e sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

İ Ç İ N D E K İ L E R

GİRİŞ	5
A) Tetrasiklinin genel toksisitesi	5
B) Tetrasiklin bozunma ürünlerinin toksisitesi	8
C) Tetrasiklin bozunma ürünlerinin kimyasal tayin metodları	12
D) Araştırmanın amacı	14
MATERYEL ve METOD	15
A) Materyel	15
B) İnce tabaka kromatografisi ile kalitatif teşhis metodu	16
C) Spektrofotometrik olarak kantitatif tayin metodu	20
D) Çalışılan tetrasiklin preparatlarına metodun uygulanışı	45
BULGULAR	46
TARTIŞMA	50
ÖZET	56
LİTERATÜR	57

G İ R İ Ő

Günümüzde yaygın ve yoğun bir şekilde kullanılmakta olan tetrasiklinler geniş spektrumlu antibiotiklerin prototipi olarak tanımlanırlar¹.

Bu gurup antibiotiklerin geliştirilmesi, penisilin ve streptomisinin tedavideki önemlerinin teşvik ettiği sistematik bir tarama neticesi olmuştur. Bunlardan ilki olan klortetrasiklin 1948 de Duggar tarafından² Streptomyces aurofaciens'in metabolik ürünlerinden isole edilmiştir. İki yıl sonra oksitetrasiklin Streptomyces rimosus'dan elde edilmiştir. Bu iki maddenin kimyasal yapılarının aydınlatılması bu gurubun diğer üyelerinin geliştirilmesine yol açmış, 1953 de tetrasiklin, 1957 de demetilklortetrasiklin yarı sentetik türevler olarak ortaya çıkmıştır. Bu gün bu dört ana bileşikten başka pirolidinometil tetrasiklin (Rolitettracycline), tetrasiklin-L-metilenlizin (Lymecycline), metasiklin (Randomycine), doksisisiklin, minosiklin tedavi sahasına girmiştir.

Tetrasiklinler arasındaki farklar kalitatif olmaktan ziyade kantitatifdir. Bu yüzden bu antibiotikler bir gurup olarak mütalaa edilirler. Ancak sunulan çalışmaya sadece tetrasiklin konu alınmıştır.

Tetrasiklin bu gurubun diğer bütün üyeleri gibi bir polisiklik naftasen karboksamid türevidir. Sadece spesifik sübstüentleri bakımından diğerlerinden farklılık gösterir (Şekil 1).

Amfotetik karakterlidir, asit ve bazlarla tuz teşkil eder. Tuzları (özellikle hidroklorür tuzu) bazından daha stabl olup daha üstün kemoterapötik özelliklere sahiptir. İyonize olabilen üç gurubu vardır, bunların pK_a değerleri 3.3-7.7-9.5 dur³. İsoelektrik noktası pH 5.0 dir.

Tetrasiklin baz, hidroklorür tuzu veya tetrasiklin fosfat kompleksi kuru halde uygun, ağız kapalı kaplarda saklandığında ışık ve rutubetten korunduğunda oldukça stabldir. Oda ısısında, 1-2 yıl içinde potens kaybı düşüktür. 50°C de 4-6 ay içinde % 5 potens kaybına uğrar.

Tetrasiklin çözeltileri büyük ölçüde pH, ısı ve rutubete bağılı tabiat, hız ve yoğunlukta değişmeye uğrarlar. Çözeltileri ışığa hassastır, fotodegradasyon bozunma olayını büyük ölçüde katalize eder. İlaveten hava oksijeni birden fazla ürünle neticelenen bir oksidasyona sebep olur⁴⁻⁷.

Alkalen hidroliz C halkasının açılması ile (C 11 ve C 11 a arasından) neticelenir. Asit hidroliz A ve B halkaları arasında açılmaya sebep olur⁸.

Tetrasiklin uygun şartlarda reversibl bir izomerizasyona uğrar⁹. Bu izomerizasyon dört no'lu karbondan meydana gelen bir epimerizasyon olup 4-epitetrasiklini (Quatrimicine) verir^{3,10}.

Epimerizasyon pH 2-6 ranjında bir takım solvan sistemlerinde meydana gelir. Bunun hızı fosfat, sitrat veya asetat gibi

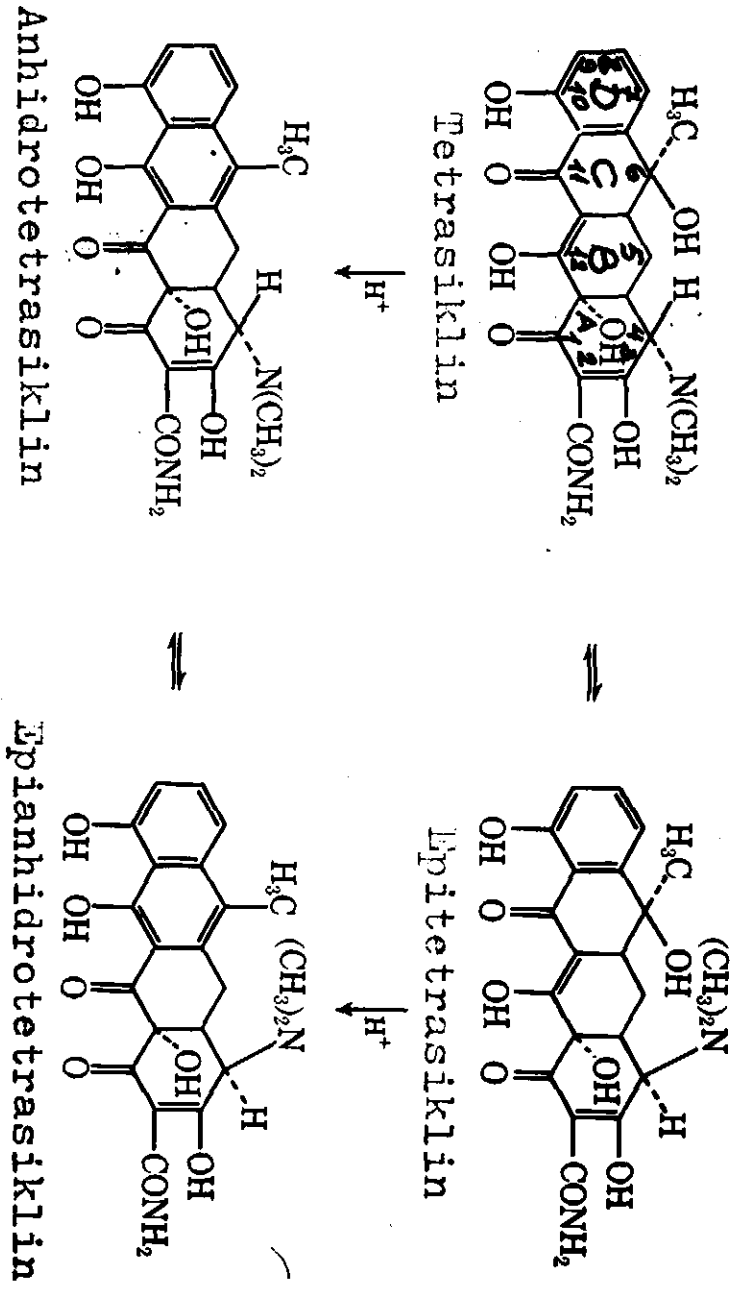
bazı anyonlar mevcudiyetinde artar¹¹. Bu epimerizasyonun 1. derece reversibl reaksiyon kinetiği ile olduğu gösterilmiştir¹². Tetrasiklin ile epitetrasiklin arasındaki dengeye oldukça çabuk ulaşılır. Bir defa bu dengelenme olduğunda epimerik karışımın biyolojik aktivitesi stabilize olur. Dengeye ulaşıldıktan sonra en az 6 aylık bir süre aktivite kaybı tesbit edilmiştir¹³.

pH 2 den daha asidik çözeltilerde epimerizasyon hızı ölçülmeyecek kadar düşüktür. 0.03 N HCl içinde epimerizasyon düşük olduğu gibi anhidrotetrasiklinlere asit katalize dehidrasyonda meydana gelmez. Bu pH da tetrasiklin kimyasal olarak uzun süre stabldir.

Asiditede daha fazla bir artış dehidrasyon ve anhidrotetrasikline aromatisasyonla neticelenir. Epianhidrotetrasiklin anhidrotetrasiklin ile isomerik olup, tetrasiklinin epimerizasyon şartlarında reversibl olarak anhidrotetrasikline dönüşür.

Tetrasiklin ve epimerlerinin pH 9 dan daha bazik şartlarda epimerizasyon hızları ölçülmeyecek kadar düşüktür¹¹.

Epitetrasiklin, anhidrotetrasiklin ve epianhidrotetrasiklinler çeşitli fizikokimyasal özellikleri ile tetrasiklinden farklılıklar gösterirler. Fakat en önemlisi düşük, in vitro antibakteriyel aktiviteleridir. Bunun tetrasiklin aktivitesinin % 5 inden daha düşük olduğu bulunmuştur^{15,16}. Ayrıca bu bozunma ürünlerinin renal disfonksiyona sebep olduğu bildirilmiştir¹⁷⁻³².



ŞEKİL 1

Tetrasyklin ve bozunma ürünlerinin kimyasal formülleri

Tetrasiklin geniş spektrumlu bir antibiotik olup, gram (+) ve gram (-) bakteriler, riketsialar, bazı büyük virüsler, bazı protozoonlar ve bazı aktinomiçeslere etkilidir^{1,33,34}.

Etki mekanizması, protein sentezinin inhibisyonu suretiyledir. Bu ilaç spesifik olarak 30 S ribozomlara bağlanır ve böylece aminoasil t-RNA in girişini önler^{35,36}.

Gastrointestinal kanaldan yeterli, fakat tam olmayan bir absorpsiyon gösterir. Tek bir oral doz ile serum pik seviyelerine 2-6 saatte ulaşır ve bu 6 saat sabit kalır³⁷.

Dağılım hacmi vücut sıvılarına oranla fazladır. Büyük konsantrasyonda böbrek, dalak, karaciğer ve akciğerde toplanır. Plazma proteinlerine % 25-30 bağlanır, karaciğer vasıtasıyla kandan uzaklaştırılır. Beyine, salyaya, sinovial sıvıya, pleural sıvıya, semene, prostatik sıvıya, plasenta, fetal doku ve membranlara difüze olur^{38,39}.

İdrar ve feçesle itrah edilir. Primer yol böbrekler olup glomerular filtrasyon suretiyledir⁴⁰.

Günlük doz 1-2 g olup terapötik kan seviyeleri 1-5 µg/ml civarındadır.

A- TETRASİKLINİN GENEL TOKSİSİTESİ :

Diğer bütün antimikrobiale ajanlar gibi tetrasiklin de bir çok zıt etkiler gösterir. Bunların bazıları hipersensitiviteye bağlıdır, bazıları toksik ve iritan etkilerdir. Diğer bazıları da allerji ve toksisite ile ilgisi olmayan biyolojik etkileridir⁴¹⁻⁴⁴.

Hipersensitivite reaksiyonları ekseriya kızamığa benzer (morbilliform) kızartı, ürtiker, yaygın ekfoliyatif dermatitis gibi cilt reaksiyonları, bazan da anjiyonörotik ödem ve anaf-laksi gibi anafloktoid reaksiyonlar şeklinde görülür. Ayrıca göz yanması, dilin kahverengi-siyahlaşması, atrofik ve hiper-trofik glosit, pruritis ani ve vulvae görülebilir. Bu reaksi-yonlar oral alımlardan sonra da olabildiği gibi ilacın kesilme-sinden haftalar hatta aylar sonrasında da devam edebilir. İlaç ateşi ve eosinofili de görülebilir.

Tetrasiklinin sık görülen toksik reaksiyonları bulantı, kusma, iştahsızlık, epigastrik yanma, abdominal rahatsızlık, diare gibi gastrointestinal bozukluklardır.

Intravenöz tatbiklerde tromboflebit görülebilir. İntramüs-küler enjeksiyonları ağrılıdır, bu da lokal iritan etkilerini gösterir.

Uzun süre tedavi periferal kanda değişiklik yapabilir, lö-kositoz, atipik lenfositler, granülositlerin toksik granülas-yonu, trombositopenik purpurea gözlenmiştir³⁵.

Fotosansibilite reaksiyonları az görülür. Ancak bozunmuş tetrasiklin preparatlarının kullanımı ile sık rastlanır^{25,27}.

2 g/gün veya daha yüksek dozlarda kullanılması ile karaci-ğer harabiyeti gözlenmiştir⁴⁵. Karaciğer mikroskopik inceleme-si vakuoller, stoplazmik değişmeler ve yağda artış ortaya çı-karmıştır⁴⁶.

Hepatotoksisite özellikle hamilelerde önemlidir. Bu konu-da ölüm vakaları bildirilmiştir ve hepatotoksisite hastaların bazılarında pankreatitis ile birlikte dir⁴⁷.

Tetrasiklin renal disfonksiyonlu hastalarda dikkatle kullanılmalıdır⁴⁸. Kunin ve ark.⁴⁹ azalmış renal fonksiyonlular- da tetrasiklin yarılanma süresinin 6 saatten 110 saate çıkabi- leceğini göstermişlerdir. Toksik etkiler azotemi, hiperfosfa- temi, asidoz, ağırlık kaybı, bulantı ve kusma şeklinde ortaya çıkar. Böyle hastalarda özel bir doz cetveli uygulanmalıdır.

Tetrasiklinin kan koagülasyonunu geciktirdiği bulunmuş- tur. Bu olay Ca^{++} şelasyonuna bağlanırsa da plasma lipoprotein- lerinin fizikokimyasal özelliklerini değiştirdiği de ileri sü- rülmektedir³⁵.

Uzun süreli tetrasiklin tedavisi gören çocuklarda dişler- de renklenme görülür⁵⁰⁻⁵³. Bu, ilacın diş ve kemiklerde, şe- lasyonla Tetrasiklin-Ca-orto fosfat kompleksi teşkil ederek birikmesi neticesidir. İlk karakteristik dental pigmentte sarı bir fluoresansdır, zamanla fluoresans kaybolur, ışığın katali- ze ettiği bir oksidasyon neticesi renklenme görülür. Bu etki yönünden hamileliğin orta devresinden postnatal 4-6 aylık dev- re geçici dişler, 6 ay - 5 yaş arası kalıcı dişler için tehli- kelidir.

Tetrasiklin fetus ve küçük çocuk iskeletinde de birikir. Prematüre bebeklerde, fibula ölçümleri ile % 40 kemik geliş- mesi depresyonu gözlenmiştir⁵⁴. Ancak ilaç verilme süresi kısa ise tesir reversibldir.

Tetrasiklin intrakranial basıncı arttırabilir, küçük be- beklerde bingıldağın ileri fırlayıp çıkıntılanmasına sebep o- labilir⁵⁵. Ancak bu etki de ilacın kesilmesi ile reversibldir.

Hamileliğin erken devrelerinde tetrasiklin alımı ile teratogenite bildirilmiştir⁵⁶. Fakat bu konuda delil azdır.

Tetrasiklin derin metabolik etkileri nedeni ile toksik ya da allerjik olmayan biyolojik değişikliklere sebep olur. Yüksek dozda kullanımı kilo kaybı, üriner azotta artış, negatif azot dengesi ve yükselmiş serum nonprotein azot konsantrasyonu ile neticelenir. Üriner riboflavin itrahında artış görülür, Na⁺ itrahi artar^{57,58}. Bütün bunlar tetrasiklinin spesifik antianabolik etkisi, yani protein sentezi inhibisyonuna atfedilir. Renal yetersizlik, dozaj ve tedavi süresi ile orantılı olarak bu etkiler artar.

Tetrasiklin ayrıca rezistan suşların teşekkülü, mantar ve maya üremesi ile ilgili olarak süperinfeksiyonlara sebep olur.

B- TETRASİKLINİN BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN TOKSİSİTESİ :

Tetrasiklin preparatları muhafaza esnasında bozunmaya uğrayabilirler. Burada rol oynayan faktörler özellikle ısı ve rutubet ile hava oksijeni ve pH dır. Bozunma ürünleri olan anhidrotetrasiklin (ATC) ve epianhidrotetrasiklin (EATC) in bulantı, kusma, proteinüri, glikozüri, asidoz ve aminoasitüri ile karakterize "Adult tip Fanconi Sendromu" na benzer, akut bir sendroma sebep olduğu gösterilmiştir. Esas lezyon muhtemelen tübüler bir bozukluktur. Preparattaki bozunma kısmî de olsa, bu toksisite şekli ilacın alındığı 2-3 gün içinde hızla ilerler. İlaç ekseriya kapsüllerde verildiğinden bozunma belirtisi -sarı tozun kahverengi siyah zamksı bir kütleye dönüşmesi- dikkati çekmeyebilir.

Bu konuda ilk rapor Frimpter, Timpanelli, Eisenmenger, Stein, Ehrlich¹⁷ tarafından 1963 de yayınlanmıştır. Sunulan vakaların üçü de; 1-2 g lık bir tetrasiklin (TC) tedavisini takiben 2-3 gün içinde gelişen ve hızla ilerleyen bulantı, kusma, proteinüri, glikozüri ve bütün aminoasitleri içine alan büyük bir aminoasitüri ile karakterize aynı klinik tabloyu göstermişlerdir. Dehidrate ve 4-5 kg lık ağırlık kayıpları olan hastalar mayi ve elektrolit tedavisi görmüşler, ancak 10 hafta sonra tam bir düzelme olmuştur. Yazarlar bu gurup bulguları ile vak'alarını bir Fanconi sendromu şekli olarak tanımlamışlardır.

"Fanconi Sendromu" terimi, glomerular bozukluktan ziyade, renal tübüler bozuklukla ilgili bir renal fonksiyon bozukluğunu tarif için kullanılmaktadır⁵⁹.

Çocuklarda özel bir raşitizm şeklinde görülen bu sendrom basit bir Mendelyen resesif karakter ile intikal eder ve böbrek proksimal tübüllerinde çeşitli maddelerin yetersiz absorpsiyonuna bağlıdır.

Yetişkinlerde ise sendrom ekseriya hem proksimal, hem distal tübüler bozukluk şeklindedir. Temel etiyoloji her zaman aynı değildir. Kazanılmış yetişkin tipi Fanconi sendromu multipl myeloma ve ağır metal zehirlenmelerine atfedilmiştir 60,61.

Frimpter ve diğ. lerinin¹⁷ vak'alarında kullanılan tetrasiklin kapsüllerinin, orijinal şişesinden çıkarılmış, uygun olmayan şartlarda muhafaza edilmiş olduğu tesbit edilmiştir. İncelenen kapsül muhtevalarınının sarı toz değil, kahverengi-siyah, katı-yapışkan kütle halinde olduğu görülmüştür. Kimyasal tayinlerle bunlardan birinin % 23.7 anhidrotetrasiklin ve % 61.7

epianhidrotetrasiklin ihtiva ettiği, bir diğesinde ise 67.2 mg tetrasiklin hidroklorür, 144 mg anhidrotetrasiklin bulunduğu tesbit edilmiştir.

Böylece bu sendromun anhidrotetrasiklin ve epianhidrotetrasiklin tarafından yaratıldığı fikri kuvvetlenmiştir.

Takibeden yıllarda, bozunmuş tetrasiklin preparatlarına atfedilen ve aynı klinik tabloyu tarif eden çeşitli raporlar yayınlanmıştır¹⁸⁻³².

Gross¹⁸, 7 gün süre ile 7 gram tetrasiklin alan hastasında bulantı, kusma, iştahsızlık ve takatsızlıkla başlayan, glikozüri, poliüri, polidipsi, aminoasitüri, hiperfosfatüri, hiperkalsüri, hipofosfatemi, hipopotasemi, hipourisemi, asidoz ve komaya doğru ilerleyen bir letarji gelişmesi gözlemiştir. Sodyum laktat, glikoz ve bol su verilerek tedavi edilen hasta 49. günde iyice düzelmiş, ancak glikozürünün kaybolmasına mukabil bir miktar proteinüri kalmıştır.

Fellers ve Lindquist²² bir çocukta nefropati husule getirdiğini bildirdikleri eski bir tetrasiklin preparatını sıçanlarda incelemişler, 25-100 mg/kg i.p. dozu takiben gözledikleri fonksiyonel ve histokimyasal değişikliklerin, hücre içinde oksidatif metabolizmada generalize bir defekt neticesi olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Wegienka ve Weller²⁴ aynı sendromu tarif ederken, ağır metabolik asidozu olan hastalarında akut devreden iki ay sonrasında bile gözlenen H^+ itrahında bozukluktan söz etmişlerdir. Yazarlar tetrasiklin bozunma ürünlerinin adult tip renal tübüller asidozunkine benzer şekilde H^+ tübüler prodüksiyonunda ve/veya transportunda bozulmaya sebep olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Sulkowski ve Haserick²⁵ aynı tabloya ilaveten başlangıçta sistemik lupus eritematosus'u taklid eden bir fotosensitivite durumunu bildirmişlerdir. İncelenen kapsül muhtevası % 3.5 anhidrotetrasiklin, % 6.5 epianhidrotetrasiklin mevcudiyetini göstermiştir. Normalde kapsül muhtevasının E.N. 212°C iken 140°C bulunmuştur.

Benitz ve Diermier²⁶ bozunma ürünlerinden sadece epianhidrotetrasiklinin bu sendroma sebep olduğunu hayvan deneyleri ile göstermişlerdir. Morfolojik bulgular, renal kortekste tübüler nekroz mevcudiyetini göstermektedir.

Mavromatis²⁸ renal biopsi ile ağır tübüler değişiklik olduğunu göstermiştir. Glomerulusun da etkilendiği görülmüştür, fakat bu düşük derecededir ve yoğun proteinüride rolü vardır.

Fulop ve Drapkin²⁹ hastalarında primer bir adale hastalığı ihtimalini düşündürecek derecede takatsızlıkla birlikte K⁺ depleasyonu gözlemişlerdir. Vak'alarında asidozun olmayışı, yüksek K⁺ tüketiminin renal tübüler asidoza karşı denge temin ettiğini göstermektedir. Ayrıca üriner asidifiye edici kapasitede de bozukluk vardır ve bu aynı zamanda distal tübüler bozukluğu da yansıtmaktadır.

Law³⁰ sıçan deneyleriyle 3 mg/100 g ve üzerindeki epianhidrotetrasiklin dozlarının kuvvetli nefrotoksin olduğunu göstermiştir.

1966 da Linguist ve Feller³¹ tetrasiklin bozunma ürünlerinin nefropatisini bir seri sıçan çalışmaları ile incelemişlerdir. Morfolojik ve histokimyasal bulgularına dayanarak fonksiyonel ve morfolojik değişmelerin sebebini oksidatif enzim sistemlerinin redüksiyonu olarak izah etmişlerdir. Bozunmuş

tetrasiklin verilmesinden 24 saat sonra serumnonprotein azot ve kreatinin tutulmasıyla azotemi gelişmiştir. Bu esnada normal görülen morfoloji 3 gün sonra bozulmuş, mitokondrilerde azalma ile birlikte tübüllerde ağır değişmeler meydana gelmiştir. 24 saat sonraki ışık mikroskopik morfolojinin normal olmasına mukabil oksidatif enzim histokimyasında değişmeler mevcut olduğu gösterilmiştir.

Tetrasiklinin in vivo ve in vitro mitokondrial fonksiyonu etkilediği gösterilmiştir⁶². Tetrasiklin büyük ölçüde canlı hepatik ve renal hücrelerin mitokondrilerinde birikir⁶³. Tetrasiklin verilmesi sırasında mitokondrial elektron transfer edici enzim flavoprotein'in, prostetik gurubu olan riboflavin yoğun şekilde itrah olunur. Bu in vitro oksidatif fosforilasyonu inhibe eder. Mitokondrial solunumun bu şekilde inhibisyonu tetrasiklinin bir şelasyon yapıcı ajan olarak hareket etmesi ile ilişkilidir ve bu inhibisyon Mg^{++} ile reversibldir. Bozunmuş tetrasiklinin bütün böbrek homojenatlarında saf tetrasiklinden daha potent bir solunum inhibitörü olduğu gösterilmiştir. Bununla beraber bütün solunum inhibitörleri Fanconi sendromu yapmaz. Bozunmuş tetrasiklinlerin direkt olarak tübüler reabsorbsiyon bölgelerini bloke etmesi de düşünülebilir.

C- TETRASİKLİN BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN KİMYASAL TAYİN METODLARI :

Bozunmuş tetrasiklin preparatlarının renal toksisitesinin anlaşılmasından bu yana bozunma ürünlerinin kimyasal tayini konusunda bir çok çalışma yapılmıştır. Kullanılan metodların çoğu kromatografik (ince tabaka, kağıt, ve kolon), bazıları da spektrofotometriktir^{13,15,64-93}.

Ancak yayınlanan çok sayıdaki çalışmadan bir kaç tanesi tetrasiklin ve üç bozunma ürününü birlikte ayırıp tayin edebilmektedir.

Fernandez ve ark.⁸⁴ asitle yıkama suretiyle saflaştırılmış ve pH 7.5 ve 9 EDTA ile tamponlanmış kieselguhr ince tabakaları ile çalışmışlardır. pH 7.5 da etilasetat-aseton-su (10:20:3) sistemi ile anhidrotetrasiklin 0.88, tetrasiklin 0.71, epianhidrotetrasiklin 0.46, epitetrasiklin 0.38 R_f değerleri elde edilmiş, pH 9 da su-aseton (1:10) ile çalışmada ise anhidrotetrasiklin 0.84, tetrasiklin 0.69, epianhidrotetrasiklin 0.55, epitetrasiklin 0.22 R_f değerleri elde edilmiştir. Kantitatif tayinler spektrofotometrik olarak anhidrotetrasiklin ve epianhidrotetrasiklin üzerinden yapılmıştır.

Gyanchandani⁸⁷ 0.1 M EDTA, polietilenglikol ve gliserin karışımı ile hazırlanan kieselguhr G ince tabakalarında önce metiletiketone (Mc Ilvain pH 4.7 ile doyurulmuş) emprenye edip sonra dikloroetan-etilformat-etanol (9:9:2) (Mc Ilvain Buffer pH 4.7 ile doyurulmuş) sistemi ile 4 maddenin ayırımını yapmıştır. Verilen R_f değerleri anhidrotetrasiklin 0.83, epianhidrotetrasiklin 0.50, tetrasiklin 0.36, epitetrasiklin 0.12 dir.

Ascione⁹⁰ asitle yıkanmış ve EDTA pH 7.0 ile tamponlanıp gliserin ve polietilen glikol ile muamele edilmiş diatome toprağı kolonunda çalışmıştır. Kantitatif tayinler spektrofotometrik olarak yapılmıştır.

Fike⁹¹, Ascione⁹⁰ 'un metodunu modifiye ederek kullanmıştır.

Van Hoeck ve diğ. 1972 de yayınlanan iki çalışmalarında^{92,93} tetrasiklin ve bozunma ürünlerinin ince tabaka kromatografisi ile ayrılmasına etkili dahili (plağa ve solvana ait) ve harici

(rutubet ısı) faktörleri detaylı olarak incelemişlerdir. Isı ve rutubeti kontrollü etüv şartlarında, 4 ayrı solvan sistemi ile kieselguhr G tabakaları kullanmak suretiyle 4 maddeyi, anhidrotetrasiklin 0.83, epianhidrotetrasiklin 0.22, tetrasiklin 0.16, epitetrasiklin 0.04 R_f değerlerinde ayırmışlardır. Kantitatif tayinler plak üzerinde direkt fluorometrik metotla yapılmıştır.

D- ARAŞTIRMANIN AMACI :

Sunulan çalışma yukarıda bahsi geçen toksik bozunma ürünlerinin ülkemizde yaygın olarak kullanılmakta olan tetrasiklin preparatlarında tesbiti amacıyla başlatılmıştır. Bir tarayma mahiyetindeki bu araştırmayı yürütebilmek için de şartlarımıza uygun kalitatif ve kantitatif bir metot geliştirilmeye çalışılmıştır.

MATERYEL ve METOD

A- Materyel

a) Kimyasal maddeler :

Kiselgur (ince tabaka kromatografisi için) (BDH)

Etilendiamintetraasetik asit disodyum (EDTA disodyum)
(Merck)

Aseton (Merck)

Etilenglikol (Fisher)

Diklorometan (Merck)

Etilformat (Merck)

Absolu etanol (Merck)

Hidroklorik asit (Merck)

Sitrik asit (Merck)

Disodyum hidrojen fosfat (Riedel)

Tetrasiklin hidroklorür (Lepetit, batch 12/71)

Epi-tetrasiklin (Lepetit, batch 8/71)

Anhidrotetrasiklin hidroklorür (Lepetit, batch 8/71)

Epianhidrotetrasiklin hidroklorür (Lepetit, batch 8/71)

b) Kullanılan aletler :

Plak çekme apareyi (Shandon UNOPLAN)

Kromatografi küvetleri (Camag)

Kromatografi plakları (10X20 cm ve 20X20 cm ebadlı)

Mikroenjektör 10 µl-100 µl (Hamilton)
Ultraviöle lambası (Camag U.V. lampe 29.200)
Santrifüj (International Clinical 2509-A05)
pH-metre (Corning Model 7)
Spektrofotometre (Beckman DU-2)

B- İnce tabaka kromatografisi ile kalitatif teşhis metodu:

a) Tampon çözeltinin (Mc Ilvain Buffer, pH 4.7) hazırlanışı :

0.2 M disodyum hidrojen fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) sulu çözeltisi hazırlanır. pH-metrede 0.1 M sitrik asit ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) sulu çözeltisi ilavesiyle pH 4.7 ye ayarlanır⁹⁴.

b) Kromatografi plaklarının hazırlanışı :

38.5 g Kiselgur, 70 ml 0.1 M EDTA disodyum sulu çözeltisi ile karıştırılır, homojen bir bulamaç haline getirilir. Bu karışım plak yayma apareyi vasıtası ile 20X20 cm eb'adlı 5 plağa veya 10X20 cm eb'adlı 10 plağa 0.3 mm kalınlıkta yayılır. Bir gece oda temperaturünde bırakılır. Sonra 105°C de bir saat aktive edilir.

Hazırlanan bu plaklar ısı ve rutubeti sabit kapalı bir kaptaki muhafaza edilirler. Plakların bir hafta beklemeye dahi kullanımları mümkündür.

c) Kromatografik solvan sistemleri ve hazırlanışı :

I. sistem : Aseton-etilen glikol-su (120:10:8.2)

Verilen oranlarda solvan karışımı hazırlanır. Kromatografi küvetine konur, bir gece doyurulmayı takiben kullanılır.

II.sistem : Diklorometan-etilformat-etanol (54:54:12)

Verilen oranlarda solvan karışımı hazırlanır. Bir ayırma hunisine alınır. 30 ml Mc Ilvain Buffer pH 4.7 ilave edilir, bir saat süre ile doyurulur. Ayrılan organik faz alınır. Üzerine 3 ml etilen-glikol ilave edilir. Kromatografi küvetine konur, bir gece bırakılıp küvetin solvanla doyması temin edilir.

d) Laboratuvar şartları : Bütün kromatografi çalışmaları esnasında laboratuvar temperaturünün 22° - 24° C ve relatif rutubetin % 50-52 olmasına dikkat edilmiştir.

e) Test çözeltilerinin hazırlanışı :

TC-HCl, ETC, ATC-HCl ve EATC-HCl 'ün metanollü çözeltileri kullanılır. Yapılan ön deneylerle test maddelerinin herbirinin teşhis edilebilecekleri en düşük konsantrasyonlar tesbit edilmiştir (Tablo I). Buradan hareketle TC-HCl 0.5 mg/ml, ETC 0.3 mg/ml, ATC-HCl 0.25 mg/ml, EATC-HCl 0.25 mg/ml konsantrasyonda metanollü çözeltileri hazırlanır. 10 µl'lik bir mikropipetle 1 µl miktarda plaklara tatbik edilir.

f) Kromatografi işlemi :

Hazırlanan plaklar önce boş olarak I. solvan sisteminde developpe edilirler. Solvanın bir plakta yükselişi için geçen süre 25-35 dakikadır. Takiben plaklar 10 dakika süreyle açıkta kurutulurlar (tercihan

soğuk hava akımında 5 dakika). Bundan sonra plaklara test maddeleri bir mikroenjektörle tatbik edilir. Tatbik noktalarının kurumasını takiben plaklar II. solvan sistemi ile develope edilirler. Solvanın 16 cm'lik yükselmesi için developman süresi 25-30 dakikadır. Bu sürenin sonunda küvetten çıkarılan plaklar oda temperaturünde kurutulurlar. U.V. lambası altında 366 nm'de floresan lekeler incelenip yerleri tesbit edilir.

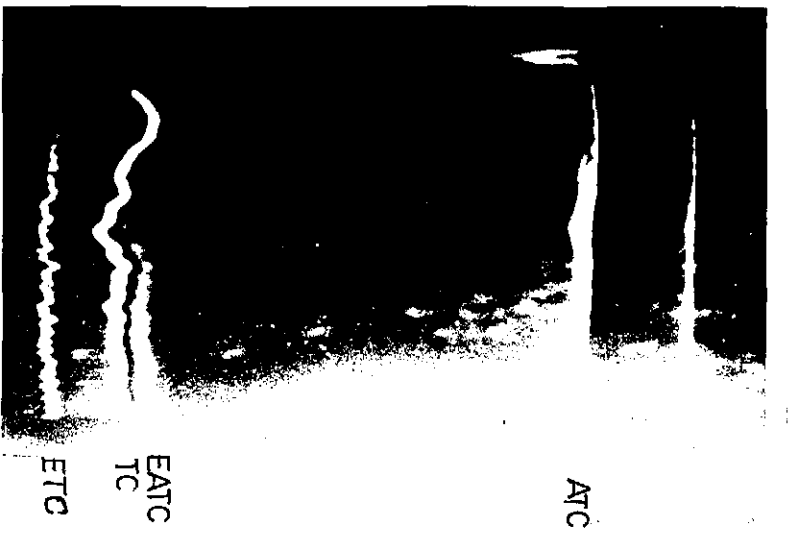
Tablo I

Tetrasiklin ve derivelerinin R_f değerleri

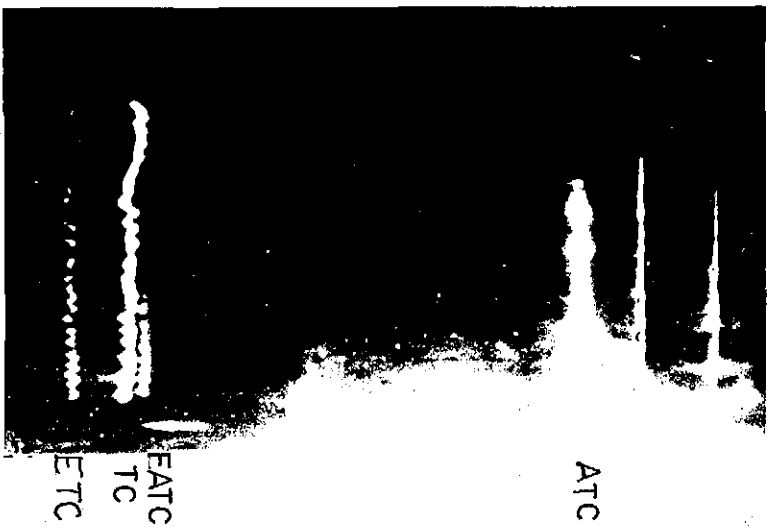
	Kons. (μ g/ml)	R_f
Tetrasiklin hidroklorür	0.50	0.15
Epitetrasiklin	0.30	0.05
Epianhidrotetrasiklin hidroklorür	0.25	0.20
Anhidrotetrasiklin hidroklorür	0.25	0.92

Bu dalga boyundaki U.V. ışığı altında TC ve ATC sarı-yeşil, ETC sarı, EATC ise sarı-turuncu floresanslarıyla kolaylıkla teşhis edilebilirler.

Bu metodla elde edilen R_f değerleri Tablo I de yukarıda verilmiştir. Kromatoplakların U.V. ışığı altındaki fotoğrafları da Şekil 2 ve 3 de görülmektedir.



ŞEKİL 2



ŞEKİL 3

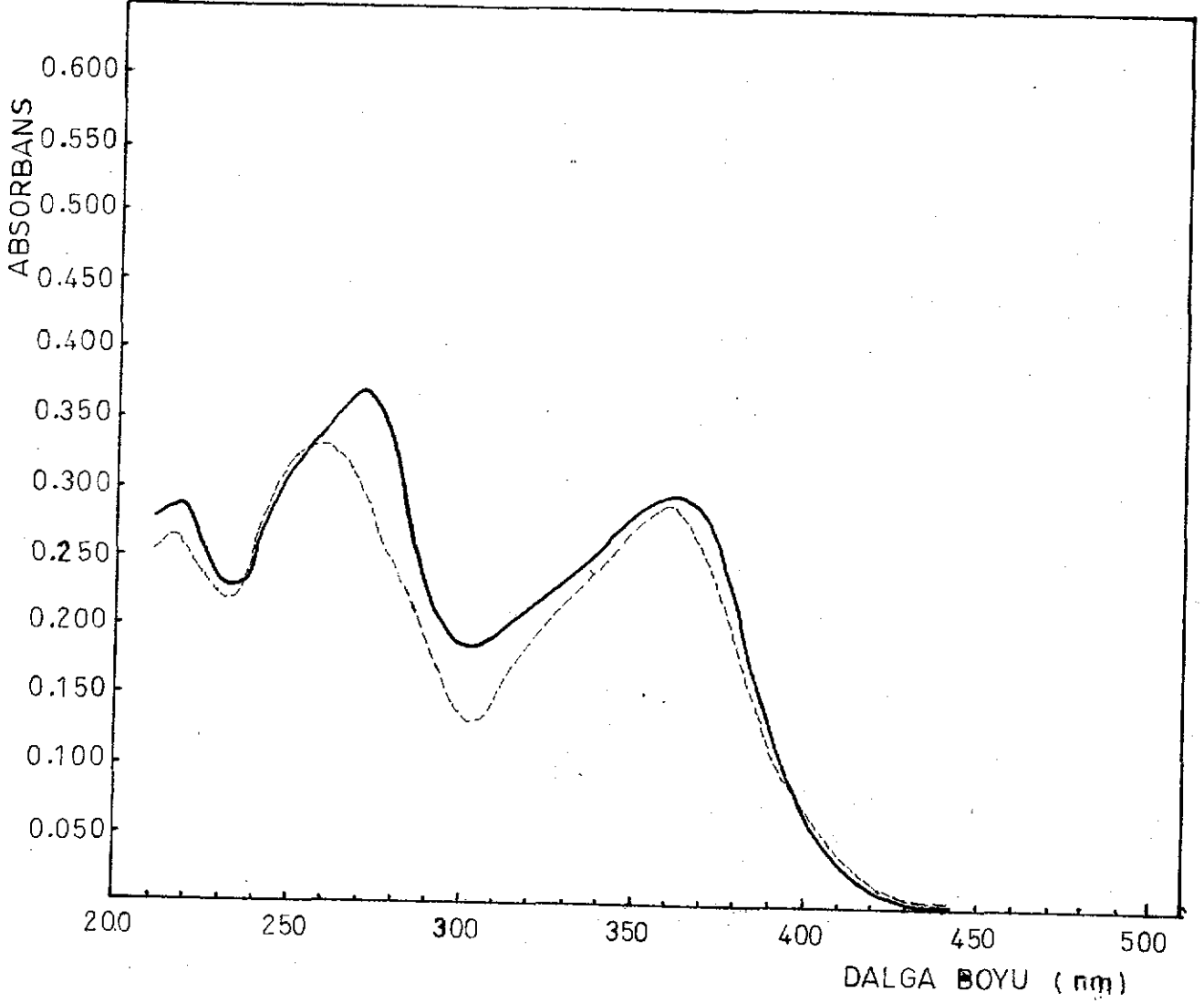
C- Spektrofotometrik olarak kantitatif tayin metodu :

TC ve ETC'nin 0.1 N HCl içinde 10 mcg/ml konsantrasyonda 0.1 N HCl körüne karşı alınan absorpsiyon spektrumları şekil 4 'de verilmiştir. Görüleceği üzere TC-HCl'in λ_{max} değerleri 270 nm ve 360 nm, ETC'nin λ_{max} değerleri 256 nm ve 358 nm 'dir. Maksimum absorpsiyon olduğu bu dalga boylarında spektrofotometrik ölçümler yaparak TC ve ETC'nin tayini mümkündür. Ancak TC ve ETC çözeltilerinin sebatsızlığı ve epimerizasyon ihtimali gözönüne alınarak 5 N HCl'de çalışılması uygun görülmüştür. Bu asidik şartlarda TC, ATC'ye, ETC, EATC'ye kantitatif olarak dönüşmektedir ve bu çözeltiler oldukça stabldir⁷⁴.

Şekil 5 de ATC-HCl'in 10 mcg/ml konsantrasyonda, 5 N HCl içindeki spektrumu ile TC-HCl'in 10 mcg/ml konsantrasyonda 5 N HCl içindeki (ATC'ye dönüşmüş olarak absorpsiyon spektrumu görülmektedir.

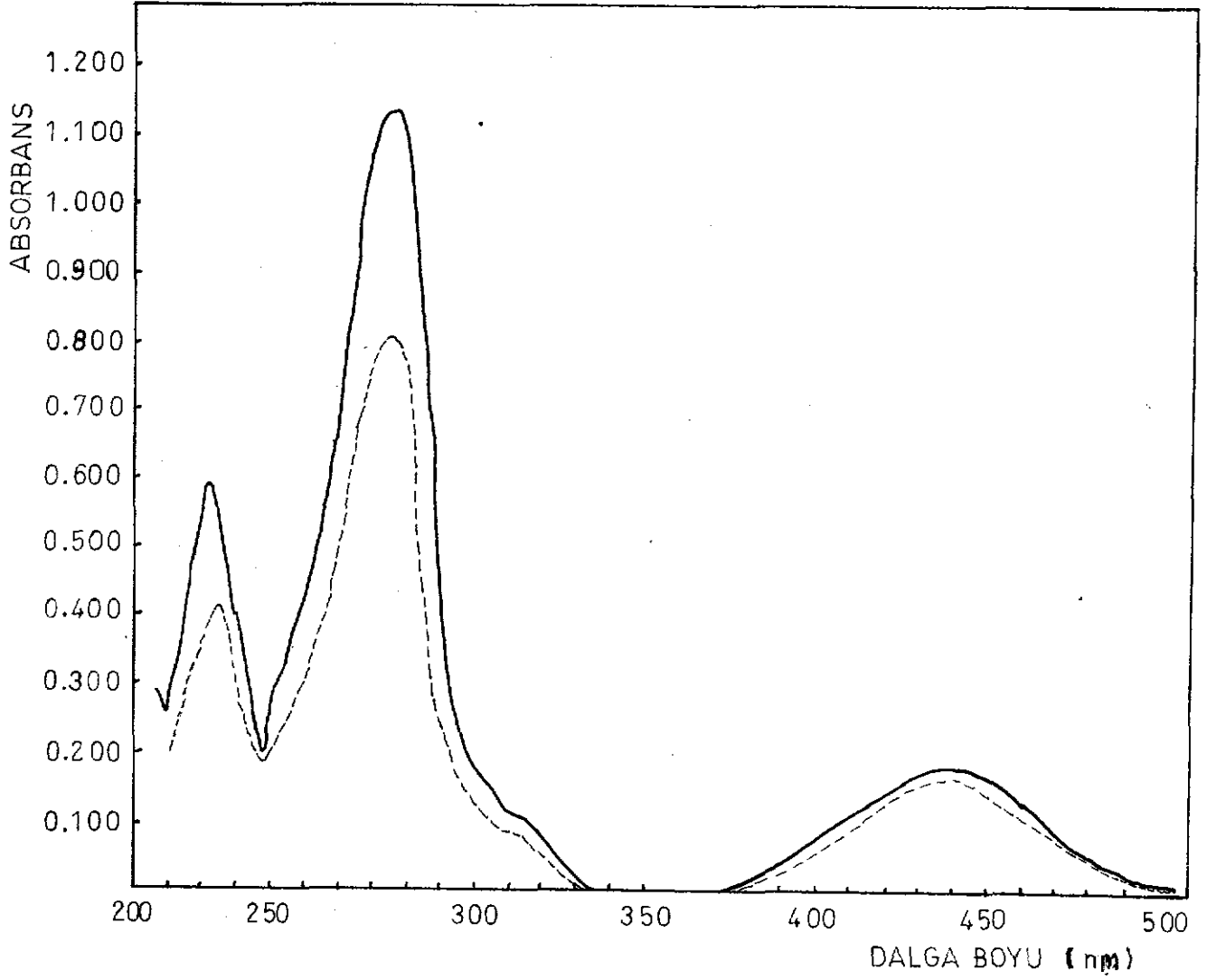
Şekil 6 da ise EATC-HCl'in 10 mcg/ml konsantrasyonda, 5 N HCl içindeki absorpsiyon spektrumu ile ETC'nin 10 mcg/ml konsantrasyonda 5 N HCl içindeki (EATC'ye dönüşmüş olarak) absorpsiyon spektrumu görülmektedir.

Şekil 5 ve 6 dan ortaya çıkan netice şudur ki bu dört maddenin de spektrofotometrik tayini için en uygun dalga boyu 438 nm'dir.



ŞEKİL 4

- (—) TC-HCl 'in 10 mcg/ml konsantrasyonda
0.01 N HCl deki spektrumu
 λ_{max} : 270,360 nm ; λ_{min} : 235,300 nm
- (---) EPC 'nin 10 mcg/ml konsantrasyonda
0.01 N HCl deki spektrumu
 λ_{max} : 256,360 nm ; λ_{min} : 232,302 nm

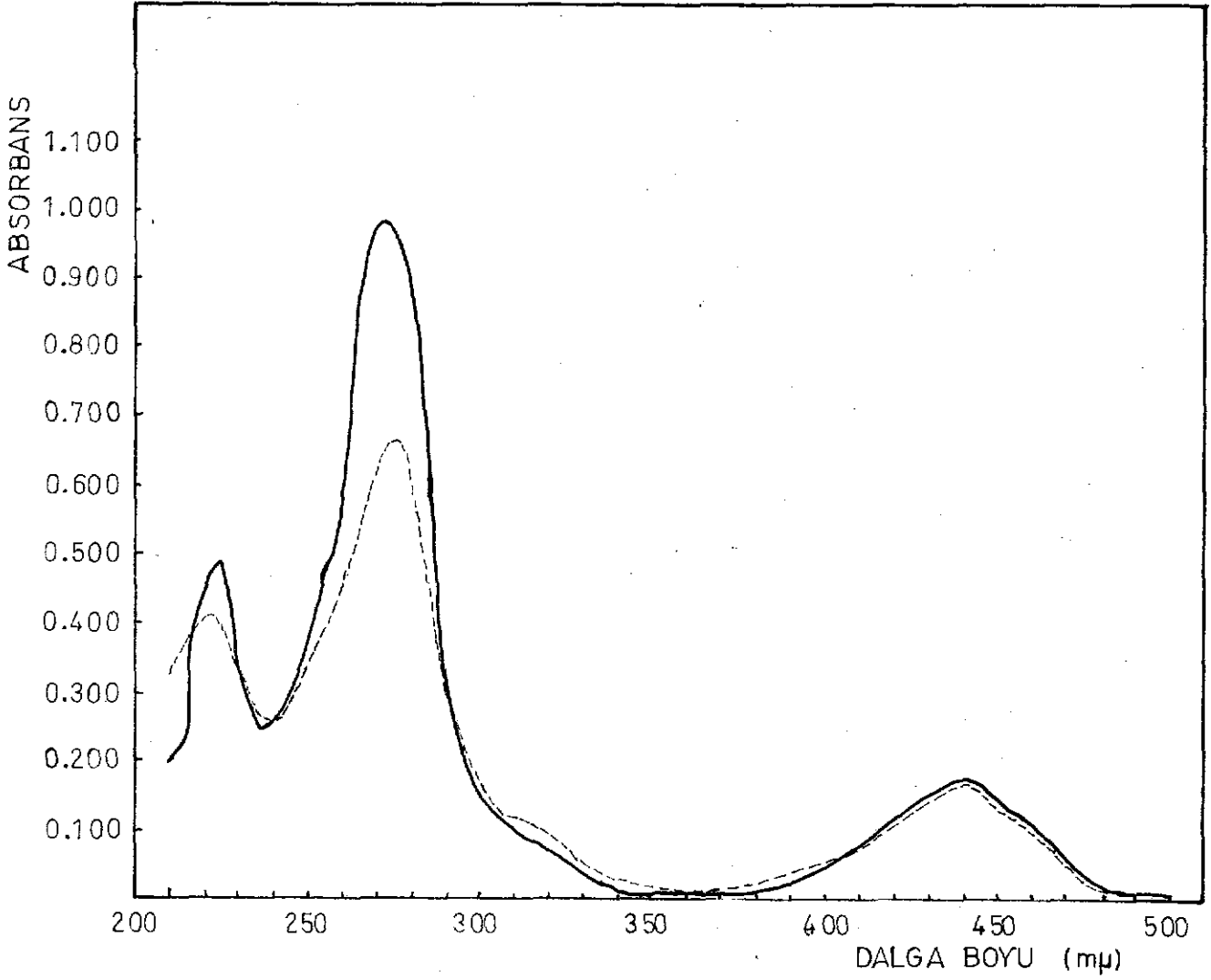


ŞEKİL 5

(—) ATC-HCl 'in , 10 mcg/ml konsantrasyonda
5 N HCl içindeki spektrumu.

(---) TC-HCl 'in 10 mcg/ml konsantrasyonda 5 N HCl
içindeki spektrumu.

λ_{max} : 222 , 277 , 438 nm; λ_{min} (210) , 238, 340nm



ŞEKİL 6

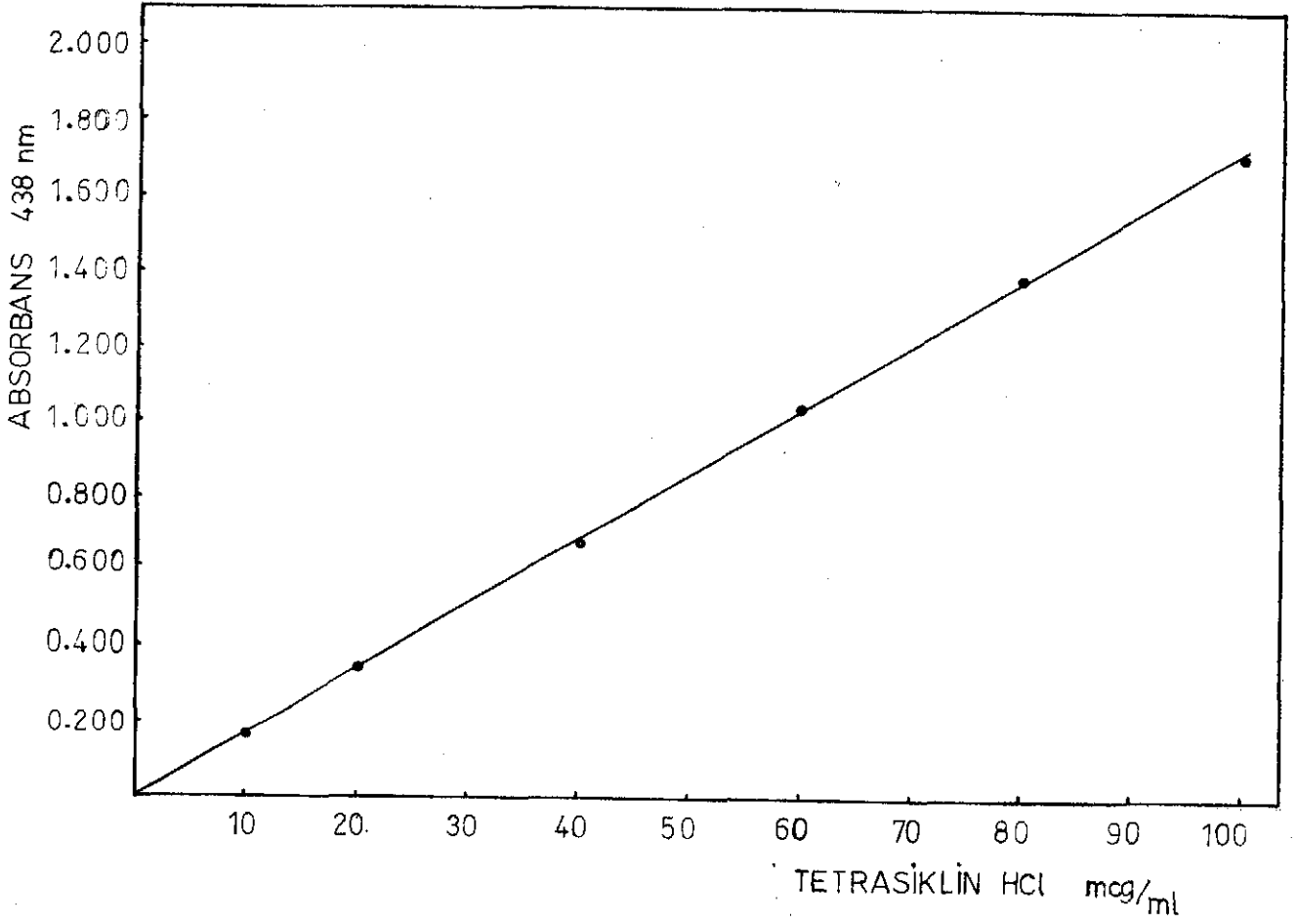
- (—) EATC-HCl 'in 10 mcg/ml konsantrasyonda
5 N HCl içindeki spektrumu.
(---) ETC 'nin 10 mcg/ml konsantrasyonda 5 N HCl
içindeki spektrumu.

I- T e t r a s i k l i n H i d r o k l o r ü r
t a y i n m e t o d u :

- a) Standart TC-HCl çözeltisinin hazırlanışı ve standart eğrinin çizimi : 5 mg TC-HCl tam olarak tartılır, 50 ml.lik bir balon jöjeye alınır. 5 N HCl ilavesiyle 50 ml'ye tamamlanır. Elde edilen 100 mcg/ml konsantrasyondaki bu stok çözeltiden uygun dilüsyonlarla; 80, 60, 40, 20, 10, 8, 6, 5, 4, 2, 1 mcg/ml konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanır.

Bu çözeltilerin absorbanları (optik dansite) spektrofotometrede, hidrojen lambası ışığında, 438 nm de 0.08 mm yarı genişliğinde ölçülür.

TC konsantrasyonlarına (absiste gösterilmiştir) karşı okunan absorbanlarla (ordinatta gösterilmiştir) standart eğri çizilir (Şekil 7). Görüldüğü gibi TC-HCl çalışılan 1-100 mcg/ml konsantrasyonlarda Lambert-Beer kanununa uyarak lineer bir eğri vermektedir. Standart eğrinin çiziminde her konsantrasyon için (6) okuma yapıp ortalama alınmıştır. Bu değerler bir tablo halinde gösterilmiştir (Tablo II).



ŞEKİL 7

Tetrasiklin HCl'in standart eğrisi (5 N HCl de)

TABLO II

TC-HCl standart eğrisi çizimi için maddenin bilinen konsantrasyonlarına karşı absorbans okumaları

TC-HCl mcg/ml	Absorbans (n=6)
1	0.017±0,006 (a)
2	0.034±0.006 (a)
4	0.068±0.005 (a)
5	0.086±0.004 (a)
8	0.138±0.004 (a)
10	0.173±0.001 (a)
20	0.340±0.001 (a)
40	0.680±0.001 (a)
60	1.050±0.006 (a)
80	1.390±0.005 (a)
100	1.730±0.005 (a)
ABSORBTIVITE (%1 , 1cm)	1.73 X 10 ⁻²

a) Ortalama ± standart hata

n) Her konsantrasyon için yapılan ölçüm sayısı

b) Kromatografik yolla TC-HCl tayini :

10 mg/ml konsantrasyonda TC-HCl metanollü çözeltilisi hazırlanır. I. solvan sisteminde develope edilip kurutulmuş plaklara mikroenjektör yardımı ile 1,2,4,5, 6,8,10,20,40,60,80,100 µl'lik tatbikler, 4 cm uzunlukta bantlar halinde yapılır.

Tatbik sahalarının kurummasını takiben plaklar, II. solvan sisteminde develope edilir. Kurutulur, U.V. lambasında 366 nm'de leke sahaları (ince, kromatografik iğnesiyle) işaretlenir.

Ancak burada bir güçlük ortaya çıkmaktadır. Kullanılan test maddeleri saf olmadığından birden fazla leke elde edilmektedir. Örneğin TC test numunesinin içinde ETC, ATC ve EATC'nin de bulunduğu tespit edilmiştir. Bu özellikle yüksek konsantrasyonların tatbikinde ortaya çıkmaktadır. Bu safsızlıkların kantitatif olarak tayini elimizdeki numunelerin hiçbirinin saf olmaması nedeni ile mümkün olmamaktadır. Esasen bu durumun TC miktar tayinlerinde karşılaşılan en büyük güçlük olduğu literatürde de bildirilmiştir⁷⁴. TC-HCl U.S.P. referans standardının saflığının dahi % 97.8 olduğu bilinmektedir.

Direkt dilüsyonla standart eğrinin çiziminde ana maddenin ihtiva ettiği safsızlıklarda dahil edilmiş olduğundan, kromatografik çalışmada adsorbandan geriye alma işleminin yüzdesini (dolayısıyla kromatografik metodun verimini) hesaplamada safsızlıklara ait lekelerin de birlikte alınması uygun görülmüştür.

Bu nedenle TC leke sahası bir ince spatül vasıtasıyla dikkatle kazınır, 15 ml'lik bir santrifüj tüpüne alınır. Kromatoplakta görülen diğer (ETC, EATC ve ATC) lekelerde aynı şekilde kazınıp alınır ve içinde TC leke sahasının bulunduğu aynı tüpe aktarılır.

Kazınan adsorban yüzeylerinin her konsantrasyon için eşit olmasına dikkat edilmiştir.

Kazınmış leke sahalarına havi santrifüj tüplerine, 5 ml 5 N HCl, bir bullü pipet vasıtasıyla konur. Tüpler 5 dakika süre ile kuvvetle çalkalanıp, ekstraksiyon yapılır. Bu sürenin sonunda tüplere, cidarı yukamak suretiyle 5 ml 5 N HCl ilave edilir. Bunu takiben tüpler 3500 r.p.m.'de 20 dakika süreyle santrifüje edilirler. Süpernatantlar alınır, spektrofotometrede 438 nm'de köre karşı absorbanları tesbit edilir.

Körün hazırlanışı : Boş bir plak önce I. solvan sisteminde, takiben II. solvan sisteminde develope edilir. Kurutulduktan sonra TC için kazınana eşit bir sahası kazınarak alınır. 5 ml 5 N HCl ile 5 dakika ekstraksiyona tabi tutulur. Üzerine 5 ml 5 N HCl daha ilave edilip 3500 r.p.m.'de 20 dakika santrifüje edilir. Süpernatant alınır ve kör olarak kullanılır.

Yukarıda bildirilen her konsantrasyon için (10) deney yapılmış olup neticeler % geri elde etme olarak Tablo III 'de verilmiştir. Bu yolla elde edilen ortalamalar TC deney sonuçlarını değerlendirmede düzeltme faktörü olarak kullanılmıştır.

TABLO III

TC-HCl' in bilinen miktarlarda kromatoplağa tatbikinden sonra kullanılan miktar tayini metodu ile geri elde etme oranı

Kromatoplağa tatbik edilen TC-HCl mcg/ml	Bu metod ile tayin edilebilen TC-HCl miktarı mcg/ml (n=12)	Geri elde etme % olarak
1	0.982±0.081 (a)	98.20
2	1.965±0.070 (a)	98.25
4	3.815±0.050 (a)	95.37
5	5.086±0.028 (a)	101.72
8	7.803±0.026 (a)	97.53
10	9.826±0.015 (a)	98.26
20	20.231±0.021 (a)	101.15
40	39.595±0.015 (a)	98.98
60	60.693±0.062 (a)	101.55
80	78.323±0.095 (a)	97.90
100	98.265±0.070 (a)	98.26
		98.83±0.581 (a)

a) Ortalama ± standart hata

n) Her konsantrasyon için yapılan deney sayısı

Bu sonuca göre (98.83) TC-HCl ' in kromatografik tayinleri için düzeltme faktörü: $\frac{100}{98.83} = 1.01$ dir.

II. E p i t e t r a s i k l i n t a y i n m e t o d u :

- a) Standart ETC çözeltisinin hazırlanışı ve standart eğrinin çizimi : 5 mg ETC tam olarak tartılır, 50 ml'lik bir balon jojeye alınır. 5 N HCl ilavesiyle 50 ml'ye tamamlanır. Elde edilen 100 mcg/ml konsantrasyondaki bu stok çözeltiden uygun dilüsyonlarla, 80,60,40,20,10,8,6,5,4,2,1 mcg/ml konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanır.

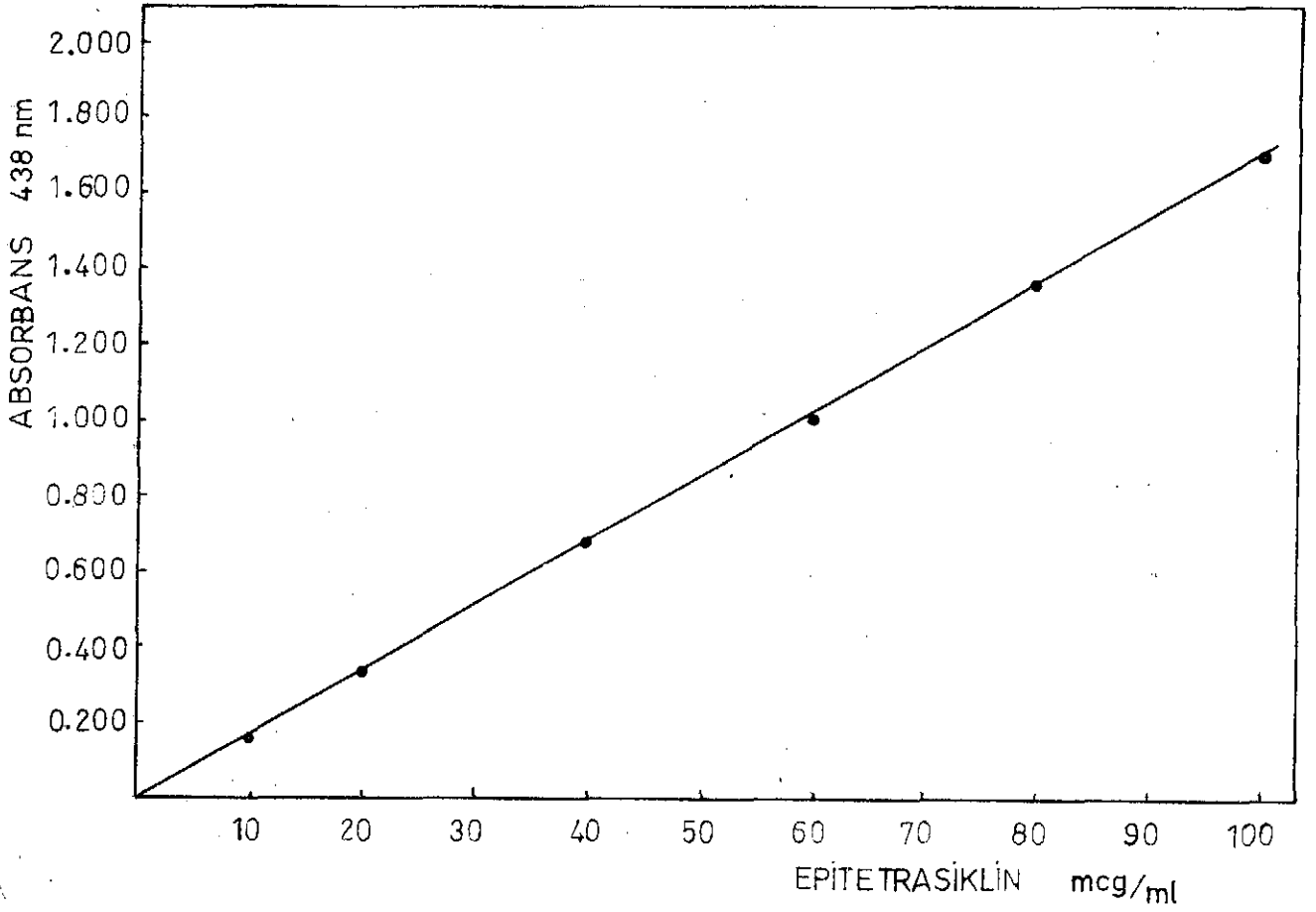
Bu çözeltilerin absorbanları (optik dansite) spektrofotometrede hidrojen lambası ışığında, 438 nm'de 0.08 mm yarı genişliğinde ölçülür.

ETC konsantrasyonlarına (absiste gösterilmiştir) karşı okunan absorbanlarla (ordinatta gösterilmiştir) standart eğri çizilir (Şekil 8). Görüldüğü gibi ETC çalışılan 1-100 mcg/ml konsantrasyonlarda Lambert-Beer kanununa uyarak lineer bir eğri vermektedir. Standart eğrinin çiziminde her konsantrasyon için (6) okuma yapıp ortalama alınmıştır. Bu değerler bir tablo halinde gösterilmiştir (Tablo IV).

- b) Kromatografik yolla ETC tayini :

10 mg/ml konsantrasyonda ETC metanollü çözeltisi hazırlanır. I. solvan sisteminde develope edilip kurutulmuş plaklara mikroenjektör yardımıyla 1,2, 4,6,8,10,20,40,60,80,100 µl'lik tatbikler, 4 cm uzunlukta bantlar halinde yapılır.

Tatbik sahalarının kurummasını takiben plaklar, II. solvan sisteminde develope edilir. Kurutulur, U.V. lambasında 366 nm'de leke sahaları (ince kromatografi iğnesiyle) işaretlenir.



ŞEKİL 8
Epitetrasiklin'in standart eğrisi (5 N HCl içinde)

TABLO IV

ETC standart eğrisi çizimi için maddenin bilinen konsantrasyonlarına karşı absorbans okumaları

ETC mcg/ml	Absorbans (n=6)
1	0.017±0.004 (a)
2	0.034±0.003 (a)
4	0.066±0.004 (a)
5	0.084±0.003 (a)
8	0.134±0.003 (a)
10	0.170±0.002 (a)
20	0.340±0.001 (a)
40	0.680±0.001 (a)
60	1.015±0.003 (a)
80	1.360±0.005 (a)
100	1.700±0.005 (a)
ABSORBTİVİTE (%1 , 1 cm)	1.70 X 10 ⁻²

a) Ortalama ± standart hata

n) Her konsantrasyon için yapılan ölçüm sayısı

ETC leke sahası bir ince spatül vasıtasıyla dikkatle kazınır, 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınır. Kromatoplakta görülen diğer (TC, EATC ve ATC) lekeleride aynı şekilde kazınıp alınır ve içinde ETC leke sahasının bulunduğu aynı tüpe aktarılır.

Kazınan adsorban yüzeylerinin her konsantrasyon için eşit olmasına dikkat edilmiştir.

Kazınmış leke sahalarını havi santrifüj tüplerine, 5 ml 5 N HCl bir bullü pipet vasıtası ile konur. Tüpler 5 dakika süre ile kuvvetle çalkalanıp ekstraksiyon yapılır. Bu sürenin sonunda tüplere cidarı yıkamak suretiyle 5 ml 5 N HCl ilave edilir. Bunu takiben tüpler 3500 r.p.m.'de 20 dakika süreyle santrifüje edilir. Supernatanlar alınır, hazırlanan köre karşı 438 nm'de absorbanları tesbit edilir.

Yukarıda bildirilen her konsantrasyon için (10) deney yapılmış olup neticeler % geri elde etme olarak Tablo V de verilmiştir. Bu yolla elde edilen ortalamalar ETC deney sonuçlarını değerlendirmede düzeltme faktörü olarak kullanılmıştır.

TABLO V

ETC ' nin bilinen miktarlarda kromatoplaga tatbikinden sonra kullanılan miktar tayini metodu ile geri elde etme oranı

Kromatoplaga tatbik edilen ETC mcg/ml	Bu metod ile tayin edilebilen ETC miktarı mcg/ml (n=12)	Geri elde etme % olarak
1	0.882±0.126 (a)	88.20
2	1.823±0.085 (a)	91.15
4	3.764±0.025 (a)	94.10
5	4.705±0.032 (a)	94.10
8	7.647±0.018 (a)	95.58
10	9.588±0.015 (a)	95.88
20	19.235±0.010 (a)	96.15
40	37.941±0.012 (a)	94.85
60	56.764±0.020 (a)	94.60
80	76.470±0.050 (a)	95.58
100	94.117±0.095 (a)	94.11
		94.02±0.712 (a)

a) Ortalama ± standart hata

n) Her konsantrasyon için yapılan deney sayısı

Bu sonuca göre (94.02) ETC ' nin kromatografik

tayinleri için düzeltme faktörü : $\frac{100}{94.02} = 1.06$ dir.

III- Anhidrotetrasiklin hidro-
klorür tayin metodu :

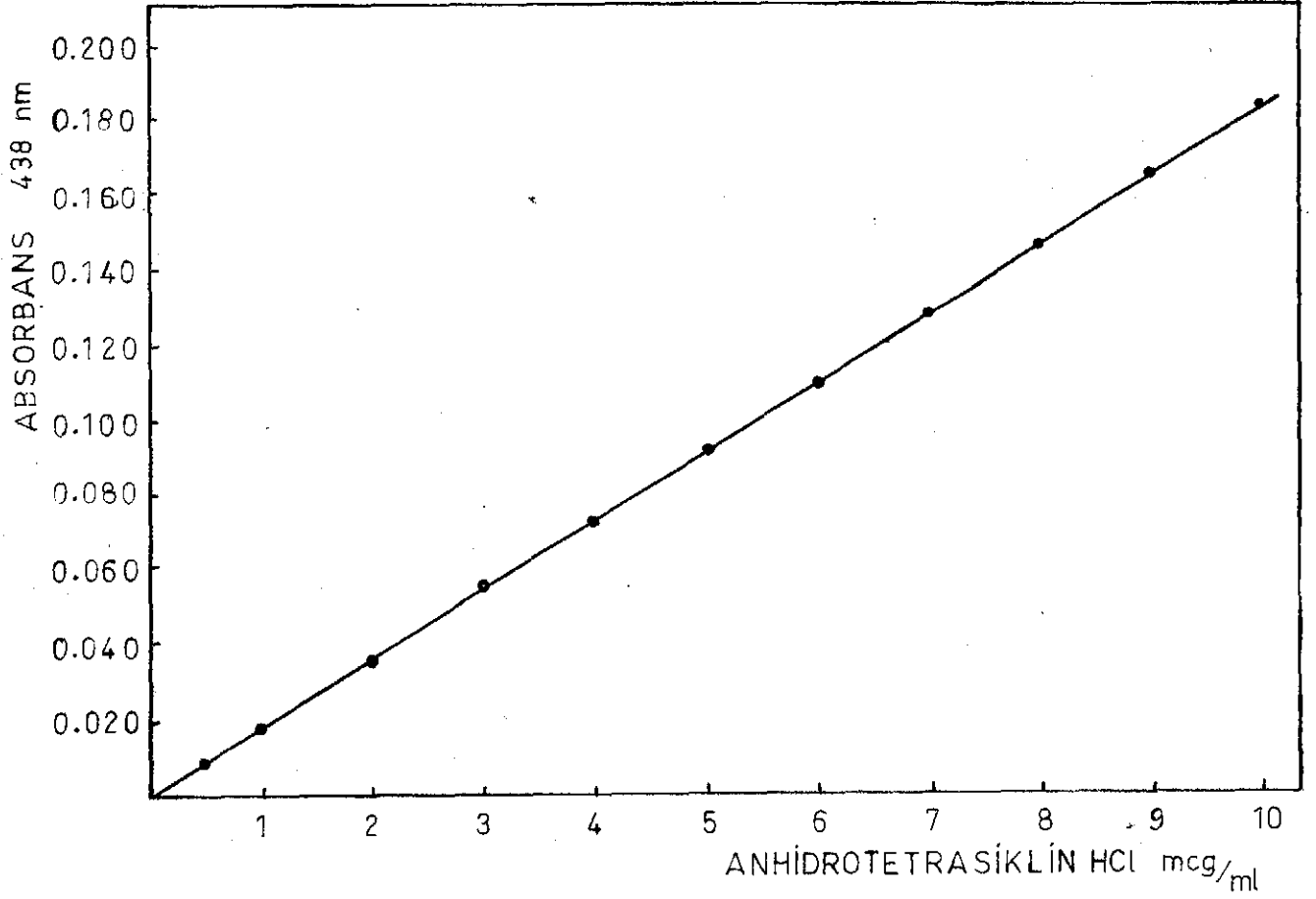
- a) Standart ATC çözeltisinin hazırlanışı ve standart eğrinin çizimi : 1 mg ATC-HCl tam olarak tartılır, 50 ml'lik bir balonjojeye alınır. 5 N HCl ilavesiyle 50 ml'ye tamamlanır. Elde edilen 200 mcg/ml konsantrasyondaki bu stok çözeltiden uygun dilüsyonlarla; 10,8,7,6,5,4,3,2,1 mcg/ml ve 0.5 mcg/ml konsantrasyonda çözeltiler hazırlanır.

Bu çözeltilerin absorbanları (optik dansite) spektrofotometrede hidrojen lambası ışığında, 438 nm'de 0.08 mm yarı genişliğinde ölçülür.

ATC-HCl konsantrasyonlarına karşı (absiste gösterilmiştir) okunan absorbanlarla (ordinatta gösterilmiştir) standart eğri çizilir (Şekil 9). Görüldüğü gibi ATC-HCl, çalışılan 0.5-10 mcg/ml konsantrasyonlarda Lambert-Beer kanununa uyarak lineer bir eğri vermektedir. Standart eğrinin çiziminde her konsantrasyon için (6) okuma yapıp ortalama alınmıştır. Bu değerler bir tablo halinde gösterilmiştir (Tablo VI).

- b) Kromatografik yolla ATC tayini :

10 mg/ml konsantrasyonda ATC-HCl metanollü çözeltisi hazırlanır. I. solvan sisteminde develope edilip kurutulmuş plaklara mikroenjektör yardımı ile 0.5,1,2,3,4,5,6,7,8,10 µl'lik tatbikler 4 cm uzunlukta bantlar halinde yapılır.



ŞEKİL 9
Anhidrotetrasiklin HCl in 5 N HCl'deki standart eğrisi

TABLO VI

ATC-HCl standart eğrisi çizimi için maddenin bilinen konsantrasyonlarına karşı absorbanz ölçmeleri

ATC-HCl mcg/ml	Absorbans	(n=6)
0.5	0.009±0.005	(a)
1	0.018±0.005	(a)
2	0.036±0.004	(a)
3	0.056±0.003	(a)
4	0.072±0.003	(a)
5	0.092±0.001	(a)
6	0.110±0.002	(a)
7	0.129±0.001	(a)
8	0.146±0.001	(a)
10	0.183±0.001	(a)
ABSORBTİVİTE (%1 ,1 cm)	1.83 X 10 ⁻²	

a) Ortalama ± standart hata

n) Her konsantrasyon için yapılan ölçüm sayısı

Tatbik sahalalarının kurumasını takiben plaklar II. solvan sisteminde develope edilir. Kurutulur, U.V. lambasında 366 nm'de leke sahaları (ince kromatografi iğnesiyle) işaretlenir.

ATC leke sahası bir ince spatül vasıtasıyla dikkatle kazınır, 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınır. Kromatoplakta görülen EATC lekesi de aynı şekilde kazınıp alınır ve içinde ATC leke sahasının bulunduğu aynı tüpe aktarılır.

Kazınan adsorban yüzeylerinin her konsantrasyon için eşit olmasına dikkat edilmiştir.

Kazınmış leke sahalalarını havi santrifüj tüplerine 5 ml 5 N HCl bir bullü pipet vasıtası ile konur. Tüpler 5 dakika süreyle kuvvetle çalkalanıp ekstraksiyon yapılır. Bu sürenin sonunda tüplere cidarı yıkamak suretiyle 5 ml 5 N HCl ilave edilir. Bunu takiben tüpler 3500 r.p.m.'de 20 dakika süreyle santrifüje edilir. Süpernatantlar alınır, hazırlanan köre karşı 438 nm'de absorbansları tesbit edilir.

Yukarıda bildirilen her konsantrasyon için (10) deney yapılmış olup neticeler % geri elde etme olarak Tablo VII de verilmiştir. Bu yolla elde edilen ortalamalar ATC deney sonuçlarını değerlendirmede düzeltme faktörü olarak kullanılmıştır.

TABLO VII

ATC-HCl'in bilinen miktarlarda kromatoplaga tatbikinden sonra kullanılan miktar tayini metodu ile geri elde etme oranı

Kromatoplaga tatbik edilen ATC-HCl mcg/ml	Bu metod ile tayin edilebilen ATC-HCl miktarı mcg/ml (n=10)	Geri elde etme % olarak
0.5	0.491±0.115 (a)	98.20
1	0.984±0.098 (a)	98.40
2	1.967±0.070 (a)	98.35
3	2.950±0.076 (a)	98.33
4	3.825±0.080 (a)	95.62
5	4.800±0.072 (a)	96.00
6	5.847±0.064 (a)	97.45
7	6.944±0.026 (a)	99.20
8	7.858±0.017 (a)	98.35
10	9.836±0.010 (a)	98.36
		97.82±0.405 (a)

a) Ortalama ± standart hata

n) Her konsantrasyon için yapılan deney sayısı

Bu sonuca göre (97.82) ATC-HCl'in kromatografik tayinleri için düzeltme faktörü : $\frac{100}{97.82} = 1.02$ dir

IV. E p i a n h i d r o t e t r a s i k l i n h i d r o -
k l o r ü r t a y i n m e t o d u :

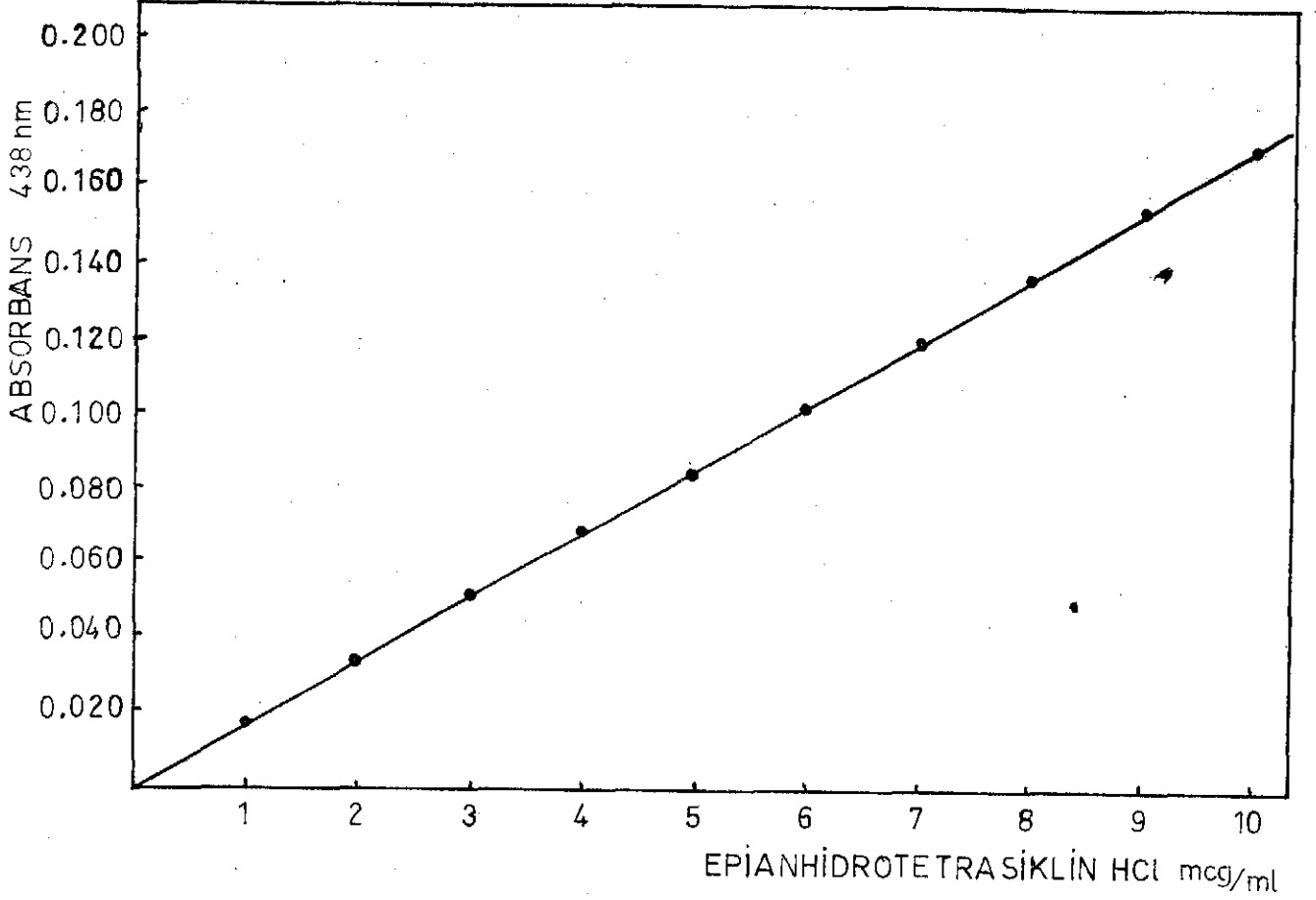
a) Standart EATC çözeltisinin hazırlanışı ve standart eğrinin çizimi : 1 mg EATC-HCl tam olarak tartılır, 50 ml'ye tamamlanır. Elde edilen 200 mcg/ml konsantrasyondaki bu stok çözeltiden uygun dilüsyonlarla; 10,8,7,6,5,4,3,2,1,0.5 mcg/ml konsantrasyonda çözeltiler hazırlanır.

Bu çözeltilerin absorbanları (optik dansite) spektrofotometrede hidrojen lambası ışığında, 438 nm'de 0.08 mm yarı genişliğinde ölçülür.

EATC-HCl konsantrasyonlarına karşı (absiste gösterilmiştir) okunan absorbanlarla (ordinatta gösterilmiştir) standart eğri çizilir (Şekil 10). Görüldüğü gibi EATC-HCl, çalışılan 0.5-10 mcg/ml konsantrasyonlarda Lambert-Beer kanununa uyarak lineer bir eğri vermektedir. Standart eğrinin çiziminde her konsantrasyon için (6) okuma yapıp ortalama alınmıştır. Bu değerler bir tablo halinde gösterilmiştir (Tablo VIII).

b) Kromatografik yolla EATC tayini :

10 mg/ml konsantrasyonda EATC-HCl metanollü çözeltisi hazırlanır. I. solvan sisteminde developpe edilip kurutulmuş plaklara mikroenjektör yardımıyla 0.5,1,2,3,4,5,6,7,8,10 µl'lik tatbikler 4 cm uzunlukta bantlar halinde yapılır.



ŞEKİL 10

Epianhidrotetrasiklin HCl 'in 5 N HCl'deki standart eğrisi

TABLO VIII

EATC-HCl standart eğri çizimi için maddenin bilinen konsantrasyonlarına karşı absorban ölçmeleri

EATC-HCl mcg/ml	Absorbans	(n=6)
0.5	0.008 \pm 0.005	(a)
1	0.0175 \pm 0.005	(a)
2	0.034 \pm 0.004	(a)
3	0.051 \pm 0.004	(a)
4	0.069 \pm 0.004	(a)
5	0.084 \pm 0.003	(a)
6	0.102 \pm 0.002	(a)
7	0.120 \pm 0.003	(a)
8	0.137 \pm 0.001	(a)
10	0.175 \pm 0.001	(a)
ABSORBTİVİTE (%1 , 1 cm)	1.75 X 10 ⁻²	(a)

a) Ortalama \pm standart hata

n) Her konsantrasyon için yapılan ölçüm sayısı

Tatbik sahalalarının kurumasını takiben plaklar II. solvan sisteminde develope edilir. Kurutulur, U.V. lambasında 366 nm'de leke sahaları (ince kromatografi iğnesiyle) işaretlenir.

EATC leke sahası bir ince spatül vasıtasıyla dikkatle kazınır, 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınır. Kromatoplakta görülen ATC lekesi de aynı şekilde kazınıp alınır ve içinde EATC leke sahasının bulunduğu aynı tüpe aktarılır.

Kazınan leke sahaları havi santrifüj tüplerine 5 ml 5 N HCl, bir bullü pipet vasıtasıyla konur. Tüpler 5 dakika süreyle kuvvetle çalkalanıp ekstraksiyon yapılır. Bu sürenin sonunda tüplere cidarı yıkamak suretiyle 5 ml 5 N HCl ilave edilir. Bunu takiben tüpler 3500 r.p.m.'de 20 dakika süreyle santrifüje edilir. Süpernatantlar alınır, hazırlanan köre karşı 438 nm'de absorpsiyonları tesbit edilir.

Yukarıda bildirilen her konsantrasyon için (10) deney yapılmış olup neticeler % geri elde etme olarak Tablo IX da verilmiştir. Bu yolla elde edilen ortalamalar EATC deney sonuçlarını değerlendirmede düzeltme faktörü olarak kullanılmıştır.

TABLO IX

EATC-HCl ' in bilinen miktarlarda kromatoplağa tatbikinden sonra kullanılan miktar tayini metodu ile geri elde etme oranı

Kromatoplağa tatbik edilen EATC-HCl mcg/ml	Bu metod ile tayin edilebilen EATC-HCl miktarı mcg/ml (n=12)	Geri elde etme % olarak
0.5	0.457±0.205 (a)	91.40
1	0.457±0.096 (a)	94.20
2	1.942±0.085 (a)	97.10
3	2.742±0.160 (a)	91.40
4	3.771±0.020 (a)	94.27
5	4.685±0.105 (a)	93.70
6	5.600±0.050 (a)	93.33
7	6.628±0.015 (a)	94.68
8	7.415±0.082 (a)	92.68
10	9.428±0.026 (a)	94.28
		93.70±0.553 (a)

a) Ortalama ± standart hata

n) Her konsantrasyon için yapılan deney sayısı

Bu sonuca göre (93.70) EATC-HCl ' in kromatografik tayinleri için düzeltme faktörü : $\frac{100}{93.70} = 1.06$ dir.

D- Çalışılan tetrasiklin preparatlarına metodun uygulanışı:

Kapsül tipi preparatlarla çalışmada 3 kapsül muhtevası alınır, iyice karıştırılır, tartılır. 100 mg TC-HCl'e eş değer miktarı hesaplanıp, tam olarak tartılarak alınır. 5 ml metanol ilave edilir, 5 dakika süreyle çalkalanır. Çözünmeyen kısım varsa (dolgu maddesi) uzaklaştırmak üzere kantitatif süzgeç kağıdından süzülür. Süzüntü 10 ml'lik bir kapaklı mezüre alınır, metanol ilavesiyle 10 ml'ye tamamlanır. Böylece hazırlanan 10 mg/ml konsantrasyondaki çözeltilerden 25-50 µl'lik miktarlar, 4 cm'lik bantlar halinde plaklara tatbik edilir.

Şurup tipi preparatlarla çalışmada 5 mg/ml konsantrasyonu temin edecek şekilde dilüsyon yapılır. Çözünmeyen kısmın ve şeker muhtevasının uzaklaştırılması ise 3500 r.p.m.'de santrifügasyon suretiyle sağlanır.

B U L G U L A R

Materyal ve metod kısmında anlatılan kalitatif ve kantitatif tayin metodları, herbiri değişik eczanelerden temin edilen, 7 ayrı firma'ya ait değişik seri numaralı 39 tetrasiklin preparatına uygulanmıştır.

Tayini yapılan 39 preparatın, 26'sı kapsül, 13'ü şurup tipindedir.

Ayrıca toplam 13 çeşit preparatın 4 tanesi TC-HCl, 3 tanesi TC-Baz, 6 tanesi ise TC-Fosfat kompleksi havidir.

Bütün neticeler TC-HCl üzerinden hesaplanmıştır. Şöyleki, 250 mg TC-HCl'in 231.04 mg TC-Baz'a eşdeğer olduğu kimyasal yapıları ve formül ağırlıklarından hesaplanmıştır. TC-Fosfat kompleksinin kesin yapısal formülünün bilinmediği bildirilmekte olduğundan⁹⁵ hesaplar asgari potens üzerinden yapılmıştır. N.F. XII ve F.D.A.⁹⁶'e göre TC-Fosfat kompleksinin en az 750 mcg/mg TC-HCl aktivitesine sahip olması gerekmektedir. TC-HCl aktivitesi ise asgari potensi 900 mcg/mg'dir⁹⁷. Buradan 1 mg TC-HCl'in 1.2 mg TC-Fosfat kompleksine eşdeğer olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle TC-Fosfat havi nümunelere ait neticeler 1.2 faktörü ile çarpılmak suretiyle verilmiştir.

Tablo X 'da kapsül tipi preparatlara ait kantitatif neticeler görülmektedir.

Tablo XI 'de ise şurup tipi preparatlara ait kantitatif neticeler verilmiştir.

Her nümune için (10) deney yapılmış olup neticelerin ortalamaları \pm standart hata'ları ile birlikte verilmiştir.

TABLO X KAPSÜL TİPİ PREPARATLARA AİT NETİCELER

Nümrü No	TC Tipi	Firma	% TC-HCl (n)	% ETC-HCl (n)	% ATC-HCl (n)	% EATC-HCl(n)	Toplam
1	HCl	A	79.398 ± 3 ^(a) 115	7.480 ± 0 ^(a) 991	1.336 ± 0 ^(a) 221	— ^(a)	88.214
2	"	A	86.980 ± 1.825	6.850 ± 0.765	2.226 ± 0.117	0.362 ± 0.095	96.418
3	"	A	93.403 ± 1.258	2.242 ± 0.525	1.448 ± 0.055	0.181 ± 0.162	97.280
4	"	A	96.328 ± 0.925	4.488 ± 0.614	1.226 ± 0.097	—	102.042
5	PO ₄	B	79.388 ± 2.387	15.852 ± 0.308	2.160 ± 0.115	0.941 ± 0.321	98.341
6	"	B	89.985 ± 1.659	8.338 ± 0.579	1.805 ± 0.028	0.195 ± 0.217	100.323
7	"	B	93.194 ± 1.121	5.883 ± 0.216	1.990 ± 0.067	0.060 ± 0.011	101.127
8	"	B	92.963 ± 1.415	7.861 ± 0.921	2.316 ± 0.059	1.887 ± 0.051	105.027
9	"	B	83.483 ± 2.001	14.911 ± 1.008	2.099 ± 0.114	0.785 ± 0.017	101.278
10	"	B	92.096 ± 1.712	6.982 ± 0.522	1.129 ± 0.218	0.235 ± 0.012	103.142
11	HCl	C	88.155 ± 1.565	7.480 ± 0.189	1.448 ± 0.417	—	97.083
12	"	C	91.740 ± 0.972	4.261 ± 0.226	2.085 ± 0.027	0.181 ± 0.011	98.267
13	"	C	88.739 ± 1.315	10.911 ± 0.527	0.556 ± 0.175	—	100.206
14	PO ₄	D	84.839 ± 1.671	11.119 ± 0.619	1.446 ± 0.211	1.021 ± 0.026	98.425
15	"	D	86.138 ± 1.582	11.833 ± 0.717	1.158 ± 0.518	0.482 ± 0.129	99.611
16	"	D	88.036 ± 2.411	12.150 ± 0.828	3.187 ± 0.079	0.156 ± 0.031	103.529
17	"	E	90.759 ± 1.385	10.436 ± 0.511	2.316 ± 0.181	1.022 ± 0.089	104.533
18	"	E	87.679 ± 1.421	6.643 ± 0.332	1.158 ± 0.084	0.312 ± 0.110	95.792
19	"	E	89.711 ± 1.204	9.724 ± 0.418	1.519 ± 0.156	—	100.954
20	"	E	82.950 ± 2.059	11.690 ± 0.201	3.714 ± 0.221	0.392 ± 0.025	98.746
21	HCl	F	96.328 ± 1.517	4.664 ± 0.059	0.427 ± 0.032	0.120 ± 0.009	101.539
22	"	F	91.650 ± 0.995	8.720 ± 0.310	0.410 ± 0.506	—	100.480
23	"	F	87.572 ± 1.271	8.729 ± 0.405	0.780 ± 0.127	0.482 ± 0.125	97.563
24	"	G	54.060 ± 0.565	2.804 ± 0.095	1.604 ± 0.027	—	58.468
25	"	G	51.140 ± 0.611	3.240 ± 0.131	0.724 ± 0.131	—	55.104

TABLO XI ŞURUP TİPİ PREPARATLARA A

TC Tipi	Firma	mg/100 ml TC - HCl (n)	mg/100 ml ETC-HCl (n)	mg/100 ml ATC HCl (n)
Baz	A	91.774 ± 0.605 ^(a)	2.867 ± 0.605 ^(a)	5.290 ± 0.331 ^(a)
"	A	88.730 ± 1.257	6.370 ± 0.812	1.112 ± 0.128
"	A	90.558 ± 1.125	4.364 ± 0.310	0.723 ± 0.061
PO ₄	B	82.202 ± 2.003	17.181 ± 0.415	1.651 ± 0.037
"	B	93.472 ± 2.150	14.858 ± 0.915	6.127 ± 0.122
"	B	103.508 ± 2.459	8.722 ± 0.823	1.998 ± 0.085
"	B	98.818 ± 1.810	20.955 ± 0.971	0.566 ± 0.039
Baz	Ç	90.334 ± 1.021	7.356 ± 0.212	0.352 ± 0.176
"	C	91.072 ± 1.326	5.734 ± 0.189	1.254 ± 0.221
"	C	94.800 ± 1.054	5.236 ± 0.621	0.525 ± 0.052
"	D	92.560 ± 0.951	7.734 ± 0.827	2.004 ± 0.185
"	D	93.157 ± 0.767	6.885 ± 0.724	1.336 ± 0.123
"	D	91.677 ± 1.361	11.047 ± 0.322	1.504 ± 0.095

(a) Ortalama ± standart hata

(n) Her konsantrasyon için yapılan ölçüm sayısı

T A R T I Ő M A

Farmasötik preparatlarda tetrasiklin muhtevasının gerek mikrobiyolojik, gerekse kimyasal metodlarla total olarak tayini⁹⁸, tetrasiklin bozunma ürünlerinin tesbiti için hassas bir yol değildir. Tetrasiklinin, epitetrasikline ve anhidro türevlerine dönüşmesi preparatın in vitro mikrobiyolojik aktivitesinde bir azalma ile ortaya çıkabilir^{9,15,16}. Ancak tetrasiklin miktarına nazaran düşük oranda bulunan bozunma ürünlerinin meydana getireceği aktivite azalmasının, ticari preparatlara ilave edilen müessir madde fazlası dolayısıyla tesbiti güçtür.

Literatürde, farmasötik preparatlarda tetrasiklin tayini için bir çok analitik metod mevcuttur. Ancak çoğu spesifiteden uzaktır. U.S.P. XVII ve B.P. (1968) mikrobiyolojik tayin metodları verirler, ancak bu yol, yukarıda bildirilen nedenler ve bozunma ürünlerinin de bir miktar antimikrobiyal aktivite göstermesi nedeniyle güvenilir değildir.

Bazı araştırmacılar konuyu sadece anhidrotetrasiklin ve epianhidrotetrasiklin yönünden ele almışlardır. Dijkhuis⁷⁸ tarafından tarif edilen, direkt spektrofotometrik ölçmeye dayanan basit ve hızlı bir metod F.D.A.⁹⁹ tarafından da resmi metod olarak kabul edilmiştir. Ancak bu metodla total anhidro-tetrasiklin ve epianhidro tetrasiklin tayini yapılabilmektedir.

Aynı raporda epianhidrotetrasiklin için limit değerleri bildirilmiştir. Bu değerler hammadde için % 2, injektabl preparatlar, oral tozlar, tabletler ve kapsüller için % 3, oral süspansiyonlar için % 5 dir. Eğer direkt spektrofotometrik yolla tayin edilen total anhidrotetrasiklin muhtevası bu limitleri aşıyorsa, o takdirde anhidrotetrasiklin ve epianhidrotetrasiklinin ayrı ayrı tayini için kolon kromatografik bir tayin metodu tavsiye edilmektedir. Bu metod Ascione ve diğ.⁷⁶ 'nin metodunun bir modifikasyonudur.

B.P. (1969 Addendum) tetrasiklin ve üç bozunma ürününün tayin edilebileceği bir ince tabaka kromatografik metod vermektedir. Bu metod Ascione ve diğ.⁷⁵ 'nin tarif ettiği diğer bir metod olup, adsorbanın (kiselgur) saflaştırılması ameliyesinin yoruculuğu, neticelerinin değişkenliği ve özellikle tayin limitlerinin iyimserliği yönünden eleştirilmektedir⁸⁵.

Van Hoeck⁹² tetrasiklin ve diğer üç bozunma ürününün birlikte tayin edebilen metodların bir kritiğini vermekte, bunlardan en iyi sonuç verenin Fernandez ve diğ.'nin⁸⁴ metodu olduğunu bildirmektedir. Ancak metodun, kiselgur'un temizlenmesi için geçen süre ve bununla kaplanan plaklarda adsorban yüzeyinin çatlaması gibi mahzurları olduğunu bildirmektedir.

Van Hoeck⁹² özellikle tetrasiklin ve epianhidrotetrasiklinin R_f'lerinin ayrılmasında en önemli etkenin ısı ve rutubet gibi harici faktörler olduğunu belirtirken en uygun çalışma şartlarınının 29°C de % 51 relatif rutubet olduğunu bildirmektedir. Araştırmacı bunu temin için de kromatografi işlemlerini özel bir etüv içinde yapmıştır.

Sunulan çalışmada da bu husus önemli bir faktör olarak

ortaya çıkmıştır. Ancak sabit bir rutubet ve temperaturü temin edecek bir etüv yerine (bulunamadığından), çalışılan laboratuvar temperaturü ve rutubeti belirli limitlerde sabit tutulmaya çalışılmıştır. 20-22°C temperaturde ve % 50-52 relatif rutubet şartlarında en iyi ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmiştir.

Literatürde kromatografik metodlarla tetrasiklin tayininde silikajel, kiselgur, mikrokristalen sellüloz, alüminyum hidroksit adsorban olarak kullanılmıştır. Ancak silikajel kullanıldığında tetrasiklinlerin kuvvetle adsorbe edildiği ve yeterli derecede elüe edilemediği bildirilmektedir⁷⁵. En iyi neticenin, bu araştırmada da kullanıldığı şekilde, temizlenmemiş kiselgur olduğu bildirilmiştir⁹³.

Plakların kaplandığı adsorban yüzeyinin EDTA çözeltisi ile hazırlanışının nedeni şelasyon suretiyle, adsorbanda mevcut metal iyonlarının interferansının ortadan kaldırılmasıdır.

II. solvan sistemini doyurmada kullanılan tampon çözeltinin fonksiyonu tamponlanmaktan başka polivalan katyonların uzaklaştırılmasıdır⁶⁶. Ayrıca tayini yapılan dört maddenin kromatografik olarak en iyi ayırımlarının pH 4.7 de olduğu bildirilmiştir⁹³.

Tetrasiklin ve bozunma ürünlerinin daha iyi ayırımları için kromatoplakın optimum miktarda su ihtiva etmesi gerekmektedir. Bunu temin için çeşitli araştırmacılar tarafından adsorbanlara değişik su tutucu ajanlar ilave edilmiştir. Gliserin, polietilen glikoz 400, polietilen glikol, etilenglikol, formamid, trietanolamin bu maksatla kullanılmışlardır. Çalışmalarımızda en iyi neticeler etilenglikol ile alınmıştır. Plakların I. solvan sistemi ile ön developmanı adsorban yüzeyine optimum su muhtevası temini için yapılmaktadır.

Çalışmalarımızda adsorban kalınlığı da önemli bir faktör olarak ortaya çıkmıştır. En iyi neticeler 0.3 mm kalınlıkta alınmıştır.

Bu araştırmada karşılaşılan en büyük güçlük, analitik olarak saf tetrasiklin ve derivelerinin temini olmuştur ki bu husus literatürde de bildirilmektedir^{68,78,81,82,85,88,89,91}. Tetrasiklin U.S.P. referans standart numunesinin saflığının % 97.8 olduğu, ticari preparatların % 2-6 oranında epitetrasiklin ihtiva ettiği, düşük oranlarda anhidrotetrasiklin ve epianhidrotetrasiklinin bulunabildiği bildirilmiştir.

Tetrasiklinlerle çalışmada diğer bir güçlük de maddelerin ve özellikle çözeltilerinin sebatsızlığıdır^{73,81,82,84,90}. Organik çözücülerle veya dilüe asitlerle hazırlanan çözeltilerin spektrofotometrik olarak absorbans ölçmelerinde zamana bağlı olarak büyük değişmeler gözlenmiştir. Bu nedenle kromatografik işlemi takiben organik çözücüler veya dilüe asitler için de spektrofotometrik ölçmeler yerine tetrasiklin ve epitetrasiklinin 5 N HCl ile muamelesini takiben anhidrotetrasiklin ve epianhidrotetrasiklin üzerinden ölçme yönüne gidilmiştir.

Geliştirilen metod, literatürde mevcut metodların yorumlanması ve çalışma şartlarımıza ve laboratuvar imkanlarımıza en uygun yönlerinin tesbitini takiben bir modifikasyonla ortaya çıkarılmıştır^{82,87,92}. Metod tetrasiklin, epitetrasiklin, anhidrotetrasiklin ve epianhidrotetrasiklinin birlikte teşhis ve tayin edilebilmesi, hassasiyeti, basitliği ve tekrarlanabilirliği yönünden rutin bir metod olarak uygulanabilir görünmektedir.

Preparat çalışmalarında dolgu maddeleri boya maddeleri bir problem çıkarmamıştır. Büyük miktar tetrasiklin yanında,

düşük oranda anhidrotetrasiklin ve epianhidrotetrasiklinin ayrılması ve tayini mümkün olmaktadır. Çok düşük oranların tesbiti, fazla miktarda nümune çözeltisinin büyük plaklara (20X20), büyük bandlar halinde tatbiki ile yapılabilmiştir.

Çalışan tetrasiklin preparat nünuneleri vitamin veya başka bir etken madde havi olmayan saf tetrasiklin preparatlarıdır.

Tablo X ve XI de görülmekte olan neticeler şöyle özetlenip, yorumlanabilir : Kapsül tipi preparatlarda, (24,25,26 nolu preparatlar hariç) total tetrasiklin muhtevası % 88.214- % 105.027 oranında değişmektedir. % 100 'ün üzerindeki neticeler preparata fazla madde ilavesini göstermektedir. Ancak U.S.P. XVII tetrasiklin kapsülleri için en az % 85 TC-HCl veya TC-PO₄ muhtevası gerektiğini bildirmektedir. Preparatların mikrobiyolojik kontrolleri (burada verilmemiştir) bir araştırma enstitüsünde yaptırılmıştır. Bu neticeler bizim kimyasal bulgularımız ile \pm % 5 uyum göstermektedir.

Kapsül tipi preparatlarda tetrasiklin ve bozunma ürünlerinin neticeleri ise (24,25,26 no'lu preparatlar hariç); tetrasiklin için % 79.388 - % 96.328, epitetrasiklin için % 2.242 - % 15.852, anhidrotetrasiklin için % 0.110 - % 3.714, epianhidrotetrasiklin için % 0.060 - % 1.887 dir. Bu durumda epianhidrotetrasiklin için bulunan değerler F.D.A.⁹⁹'nın verdiği sınırlar içindedir.

24,25 ve 26 no'lu preparatlarda önemli ölçüde düşük tetrasiklin muhtevası tesbit edilmiştir. İlk ikisi için bulunan % 54.060 ve % 5 1.140 neticeleri mikrobiyolojik olarak da

aynen tekrarlanmıştır. 26 no'lu preparat'ın kimyasal tayin sonucu tetrasiklin için % 10.041 'dir. Mikrobiyolojik metod % 28 aktivite göstermiştir. Ancak bunun, bizim kromatoplakta tesbit ettiğimiz oksitetrasiklin lekesine ait olduğu anlaşılmaktadır.

Tablo XI den de görüleceği üzere şuruplarda bozunma ürünü daha fazladır. Total tetrasiklin muhtevası % 95.645 - % 119.051 bulunmuştur. Saf tetrasiklin oranı % 82.202 - % 103.503, epitetrasiklin oranı % 2.867 - % 20.955, anhidrotetrasiklin % 0.566 - % 6.127 ve epianhidrotetrasiklin % 0.330 - % 2.174 dir.

Şurupların epianhidrotetrasiklin muhtevasının da F.D.A.⁹⁹ limitleri içinde olduğu görülmektedir.

Bu neticelerden anlaşılacağı üzere ülkemizdeki tetrasiklin preparatlarında bozunma ürünleri olan epitetrasiklin, anhidrotetrasiklin ve epianhidrotetrasiklin değişik oranlarda mevcuttur. Ancak renal toksisiteye sebep olduğu bildirilen epianhidrotetrasiklin miktarı emniyet limitleri içinde kalmaktadır.

Ö Z E T

Bu araştırmada, ÷lkemizdeki tetrasiklin preparatlarında toksik bozunma ürünlerinin tesbitine çalışılmıştır. Bu amaçla şartlarımıza uygun bir metod geliştirilmiş, kalitatif tayinler ince tabaka kromatografisi ile kantitatif tayinler spektrofotometrik olarak yapılmıştır.

İncelenen tetrasiklin preparatlarında değişik oranlarda bozunma ürünü mevcuttur. Ancak akut renal toksisiteye sebep olan epianhidrotetrasiklin miktarları F.D.A.'nın tanıdığı emniyet sınırlarını aşmamaktadır.

L I T E R A T Ü R

1. Lasken, A.I. : Tetracyclines, "Antibiotics" te, Gottlieb, D., Shaw, P., edit., Vol I, S.331, Springer-Verlag Berlin, 1967.
2. Duggar, B.M. : Aumomycine, A product of the containing search for new antibiotics.
3. Stepens, C.R., Conover, L.H., Gordon, P.N., Pennington, F.C., Wagner, R.L., Brunings, K.J., Pilgrim, F.J. : Epitetracycline-the chemical relationship between tetracycline and "quatrimycine". J.Am.Chem.Soc. 78, 1515, 1956.
4. Leeson, L.J., Weindenheimer, J.F. : Stability of tetracycline and riboflavin. J.Pharm.Sci. 58, 355, 1969.
5. Novelli, G., Monacelli, F., Cattaneo, L. : Stability and epimerization of tetracycline. Farmaco.Ed.Prat. 16, 181 , 1961.
6. Blackwood, R.K., Stephens, C.R. : Novel C-4 modified tetracycline derivatives. Farmaco. Ed. Prat. 86, 2736, 1964.
7. Schwarz, J.S.P., Applegate, H.E., Bouchard, J.L., Wersenborn, F.L. : Chemistry of tetracyclines. I.Mercury acetate oxidation of tetracycline. J.Org.Chem. 32, 1238, 1967.
8. Schumacher, G.E. : A tetracycline tableau. J.Am.Hosp. Pharm. 20, 580, 1963.

9. Doerschuk, A.P., Bitler, B.A., McCormick, J.R.D. :
Reversible isomerizations in the tetracycline
family. *J.Am.Chem.Soc.* 77, 4687, 1955.
10. McCormick, J.D.R., Fox, S.M., Smith, L.L., Bitler, B.A.,
Reichenthal, J., Origoni, V.E., Muller, W.H.,
Winterbottom, R., Doerschuk, A.P. : On the nature
of the reversible isomerizations occurring in the
tetracycline family. *J.Am.Chem.Soc.* 78, 3547, 1956.
11. McCormick, J.R.D., Fox, S.M., Smith, L.L., Bitler, B.A.,
Reichenthal, J., Origoni, V.E., Muller, W.H.,
Winterbottom, R., Doerschuk, A.P. : Studies of the
reversible epimerization occurring in the tetracycline
family. The preparation properties and proofs of
structure of some 4-epi-tetracyclines. *J.Am.Chem.
Soc.* 79, 2489, 1957.
12. Remmers, E.G., Sieger, G.M., Doerschuk, A.P. : Some
observations on the kinetics of the C-4 epimerization
of tetracycline. *J.Pharm.Sci.* 52, 752, 1963.
13. Kaplan, M.A., Granatek, A.P., Buckwalter, F.H. : Quatri-
mycin; Preparation and properties. *Antibiot. &
Chemot.* 7, 569, 1957.
14. Hussar, D.A., Niebergall, P.J., Sugita, E.T., Doluisio,
J.T. : Aspect of the epimerization of certain
tetracycline derivatives. *J.Pharm.Pharmacol.* 20,
539, 1968.
15. Kaplan, M.A., Buckwalter, F.H. : Anhydroquatrmycin, an
epimer of anhydrotetracycline. *Antibiot. Ann.* 1957-
1958, Medical Encyclopedia, Inc. Newyork, N.Y.
16. Smith, C.P. : De tetracyclines. *Pharm.Weekblad*, 99, 49,
1964.

17. Frimpter, G.W., Timpanelli, A.E., Eisenmenger, W.J., Stein, H.S., Ehrlich, L.I. : Reversible "Fanconi Syndrome" caused by degraded tetracycline. J.Am. Med.Assoc. 184, 111, 1963.
18. Gross, J.M. : Fanconi syndrome (Adult type) Developing secondary to the ingestion of outdate tetracycline. Ann.Intern.Med. 58, 523, 1963.
19. Frimpter, G.W.: Observation on degraded tetracycline. J.Am. Med.Assoc. 185, 414, 1963.
20. Ehrlich, L.I. : Abnormal urinary findings following administration of achromycin V. Pediatrics 31, 339, 1963.
21. Rosenthal, S.M. : Abnormal urinary findings and achromycine V. Pediatrics 31, 697, 1963.
22. Fellers, F.X., Lindquist, R. : Mechanism of the induced nephropathy by old tetracyclines. Fed. Proced. 23, 573, 1964.
23. Zimmerman, M.J., Werther, J.L. : Renal glycosuria, asidosis and ~~dehydration~~ dehydration following administration of outdated tetracycline. J.Mt.Sinai Hosp., 31, 38, 1964.
24. Wegienka, L.C., Weller, J.H. : Renal tubular acidosis caused by degraded tetracycline. Arch.Intern.Med. 114, 232, 1964.
25. Sulkowski, S.R., Haserick, J.R. : Simulated systemic lupus erythematosus from degraded tetracycline. J.Am.Med. Assoc. 180, 152, 1964.
26. Benitz, K.F., Diermier, H.F. : Renal toxicity of tetracycline degradation products. Proc.Soc.Exp.Biol. Med. 115, 930, 1964.

27. Cleveland, W.W., Adams, W.C., Mann, J.B., Nyyan, W.L. :
Acquired Fanconi syndrome following degraded tetracycline. J.Pediatrics 66, 333, 1965.
28. Mavromatis, F. : Tetracycline nephropathy, J.Am.Med. Assoc. 193, 191, 1965.
29. Fulop, M., Drapkin, A. : Potassium-Depletion syndrome secondary to nephropathy apparently caused by "outdated tetracyclines", New Engl.J.Med. 272, 986, 1965.
30. Lowe, M.B. : Renal damage caused by anhydro 4-epi-tetracycline. Arch.Path. 81, 382, 1966.
31. Lindquist, R.R., Fellers, F.X. : Degraded tetracycline nephropathy. Lab. Invest. 15, 864, 1966.
32. Thandhanand, S. : Polyuria and hypokalemia secondary to nephropathy caused by degraded tetracycline. J.Med. Assoc.Thai. 55, 179, 1972.
33. Barber, M. : The tetracyclines "Experimental Chemotherapy". de. Schnitzer, R.J., Hawking, F., edit., Vol III, S.71, Academic Press, Newyork, 1964.
34. Kunin, C.M. : The tetracyclines. "Antimicrobiol therapy" de. Kagan, B.M., edit., S.45, Saunders Corp. Philadelphia, 1970.
35. Weinstein, I. : "The tetracyclines." The pharmacological basis of therapeutics"te, Goodman, L.S., Gilman, A., edit., 4.Ed. S.1253, Mac Millan Co., Newyork, 1970.
36. Gale, E.F. : Mechanism of antibiotic action. Pharm. Rev. 15, 481, 1963.
37. Kunin, C.M., Finland, M. : Clinical pharmacology of the tetracycline antibiotics. Clin.Pharm.Therap. 2, 51, 1961.

38. André, T. : Studies on the distribution of tritium-labelled dihydrostreptomycin and tetracycline in the body. *Acta radiol.* 142, Suppl. 1, 1956.
39. Kelly, R.G., Buyske, D.A. : Metabolism of tetracycline in the rat and the dog. *J.Pharmacol. Exp. Therap.* 130, 144, 1960.
40. Engelund, A., Terp, P., Trolle-Lassen, C. : Studies on renal excretion of tetracycline. *Acta Pharmacol. et Toxicol.* 12, 227, 1956.
41. Olson, C.A., Riley, H.D., Jr. : Complications of tetracycline therapy. *J.Pediat.* 68, 783, 1966.
42. Moser, R.H. : Reaction to tetracycline. *Clin.Pharmac. Ther.*, 7, 117, 1966.
43. Garrod, L.P. : The toxicity of antibiotics. *Med.J.Aust.* 2, 947, 1964.
44. Manning, R.E. : Toxicity with tetracycline therapy. *Ohio St. Med.J.* 60, 1130, 1964.
45. Lepper, M.H. : Metabolic effects of tetracycline. *Ann. Intern. Med.* 58, 553, 1963.
46. Breitenbulher, R.B., Crowley, L.V. : Hepatorenal toxicity of tetracycline. *Minn. Medicine* 53, 945, 1970.
47. Whalley, P.J., Adams, R.H., Combes, B. : Tetracycline toxicity in pregnancy. *J. Am. Med. Assoc.* 189, 357, 1964.
48. Shils, M.E. : Renal disease and the metabolic effects of tetracycline. *Ann. Intern. Med.* 58, 389, 1963.

49. Kunin, C.M., Rees, S.B., Merrill, J.P., Finland, M. : Persistence of antibiotics in blood of patients with acute renal failure. I. Tetracycline and Chlorotetracycline. J. Clin. Invest. 38, 1487, 1959.
50. Wailman, I.S., Hilton, H.B. : Teeth pigmented by tetracycline. Lancet I, 827, 1962.
51. Davies, P.A. : Tetracyclines and yellow teeth. Lancet II, 743, 1962.
52. Adler, D.K. : Tetracycline and yellow teeth. J. Am. Med. Assoc. 184, 600, 1963.
53. Kutscher, A.H. : Discoloration of teeth induced by tetracycline. J. Am. Med. Assoc. 184, 586, 1963.
54. Cohan, S.Q., Bevelander, G., Triamsic, T. : Growth inhibition of prematures receiving tetracycline, a clinical and laboratory investigation. Am. J. Dis. Child. 105, 453, 1963.
55. Fields, J.P. : Bulging fontanel : a complication of tetracycline therapy in infants. J. Pediat. 58, 74, 1961.
56. Carter, M.P., Wilson, F. : Tetracycline and congenital limb abnormalities. Brit. Med. J. II, 407, 1962.
57. Faloon, W.W., Downs, J.J., Duggar, K., Prior, J.T. : Nitrogen and electrolyte metabolism and hepatic function and histology in patients receiving tetracycline. Am. J. Med. Sci. 223, 562, 1957.
58. Shils, M.E. : Some metabolic aspects of tetracyclines. Clin. Pharmacol. Therap. 3, 321, 1962.
59. Fanconi, G. : Der frühin fantile nephrotisch-glykosurische Zwergwuchs mit hypophosphatämischer Rashitis. Jahrb. f. Kindern. 147, 299, 1936. : Engle, R.L., Wallis, L.A. : Am. J. Med. 22, 5 (1957)'de zikredilmiştir.

60. Engle, R.L., Wallis, L.A. : Multiple myeloma and the adult Fanconi Syndrome. Am.J.Med. 22, 5, 1957.
61. Wallis, L.A., Engle, R.L. : The adult Fanconi Syndrome. Am.J.Med. 22, 13, 1957.
62. Brody, T.M., Hurwitz, R., Bain, J.A. : Magnesium and the effect of the tetracycline antibiotics on oxidative process in mitochondria. Antibiot. & Chemot. 4, 884, 1954.
63. Dubuy, H.G., Showacre, J.L. : Selective localization of tetracycline in mitochondria of living cells. Science 133, 196, 1961.
64. Selzer, G.B., Wright, W.W. : Paper chromatography of the tetracycline antibiotics and their epimers. Antibiot & Chemother. 10, 604, 1960.
65. Novelli, G., Superti, E., Cattaneo, C. : Determination of tetracycline products with radial chromatography. Farmaco. Ed. Prat. 15, 483, 1960.
66. Kelly, R.G., Buyske, D.A. : Paper chromatography of the tetracyclines. Antibiot. & Chemother. 10, 604, 1960.
67. Addison, E. : The determination of epitetracycline and tetracycline by ion-exchange paper chromatography and its application to human urine and serum. J. Pharm. Pharmacol. 15, 268, 1963.
68. Kelly, R.G. : Determination of anhydrotetracycline and 4-epi-tetracycline in a tetracycline mixture. J. Pharm. Sci. 53, 1551, 1964.
69. Sonanini, V.D., Anker, L. : Beitrag zur Dünnschicht-chromatographie der of fizinellen tetracycline. Pharm. Acta Helv. 39, 518, 1964.

70. Rustici, L., Ferappi, M. : Separazione cromatografica circolare su strato sottile degli anhidro-derivati della tetraciclina. Boll. Chim. Farm. 104, 305, 1965.
71. Keiner, J., Huettenrauch, Poethke, W. : Chromatographic separation of conversion and degradation products of tetracycline antibiotics. Pharm. Zentralhalle 105, 705, 1966.
72. Simmons, D.L., Koorengevel, C.K., Kubelka, R., Seers, P. : Quantitative analysis of anhydrotetracycline on microcrystalline cellulose. J.Pharm.Sci. 55, 219, 1966.
73. Griffiths, B.W. : Separation and analysis of degradation products of tetracycline by gel filtration on Sephadex G-25. J.Pharm.Sci. 55, 353, 1966.
74. Simmons, D.L., Woo, H.S.L., Koorengevel, C.M., Seers, P.: Quantitative determination by thin-layer chromatography of anhydrotetracyclines in degraded tetracycline tablets. J.Pharm. Sci. 55, 1313, 1966.
75. Ascione, P.P., Zagar, J.B., Chreikan, G.P. : Tetracyclines I. Separation and examination by thin-layer chromatography. J.Pharm. Sci. 56, 1393, 1967.
76. Ascione, P.P., Zagar, J.B., Chreikan, G.P. : Tetracyclines II. Separation and examination by column chromatography. J. Pharm. Sci. 56, 1396, 1967.
77. Dijkhuis, I.C. : Een onderzoek van tetracyclinehydrochloride als exponent der tetracyclines in het algemeen. Pharm. Weekblad. 102, 907, 1967.
78. Dijkhuis, I.C. : Rapid determination of anhydrotetracyclines in tetracycline hydrochloride. Pharm. Weekblad. 102, 1308, 1967.

79. Griffiths, B.W. : Gel chromatography of tetracycline and derivatives of tetracycline. *J.Chromatog.* 38, 41, 1968.
80. Hirtz, J., Hatchadourian, A., Vassort, Ph. : Methode pratique pour le dosage des produits de dégradation de la tétracycline dans le principe actif et les préparations pharmaceutiques. *Ann. Pharm. Franc.* 26, 717, 1968.
81. Fernarowski, M., Searl, R.O., Naylor, J. : Application of absorbance ratios to analyses of pharmaceuticals V : Analysis of tetracycline and epianhydrotetracycline. *J.Pharm.Sci.* 58, 470, 1969.
82. Simmons, D.L., Ranz, R.J., Woo, H.S.L., Picotte, P. : Quantitative determination of tetracycline hydrochloride by thin-layer chromatography. *J.Chromatog.* 43, 141, 1969.
83. Lodi, I., Meinardi, G., Rossi, E. : Chromatographic methods for the determination of tetracycline by products. *Farmaco Ed. Prat.* 24, 759, 1969.
84. Fernandez, A.A., Noceda, V.T., Carrera, E.S. : Simultaneous separation and quantitative determination of tetracycline, anhydrotetracycline, 4-epitetracycline and 4-epianhydrotetracycline in degraded tetracyclines by thin-layer chromatography. *J.Pharm. Sci.* 58, 443, 1969.
85. Lloyd, P.B., Cornford, C.C. : A thin-layer chromatographic limit test for detection of anhydrotetracycline and 4-epianhydrotetracycline in tetracycline. *J. Chromatog.* 53, 403, 1970.
86. Griffiths, B.W., Brunet, R., Greenberg, I. : Quantitative evaluation of 4-epi-anhydrotetracycline in commercial tetracycline products *Cnad.J.Pharm.Sci.* 5, 101, 1970.

87. Gyanchandani, N.D., McGilvery, I.J., Hughes, D.W. :
Improved thin-layer chromatography of tetracycline
and their degradation products. Application to an
epimerization study. J. Pharm. Sci. 59, 224, 1970.
88. Dijkhuis, I.C., Brommet, M.R. : Determination of epitetra-
cycline and chlortetracycline in tetracycline by
quantitatif thin-layer chromatography. J.Pharm.Sci.
59, 558, 1970.
89. Walton, V.C., Howlet, M.R., Selzer, G.B. : Anhydrotetra-
cycline and 4-epi-anhydrotetracycline marked tetra-
cyclines and aged tetracycline products. J.Pharm.Sci.
59, 1160, 1970.
90. Ascione, P.P., Chrekian, G.P. : Separation and determina-
tion of anhydrotetracycline, 4-epianhydrotetracycline,
tetracycline mixture. J.Pharm.Sci. 59, 1480, 1970.
91. Fike, W.W., Brake, N.W. : Modified methode for determining
tetracycline, 4-epitetracycline and anhydrotetra-
cycline in tetracycline base or hydrochloride. J.
Pharm.Sci. 61, 615, 1972.
92. Van Hoeck, G., Kapetanidis, I., Mirimanof, A. : Séparation
par chromatographie sur couche mince de la tétra-
cycline, de l'anhydrotetracycline et de leurs épimers.
Dosage fluorimétrique direct sur chromatoplaque. Pharm.
Acta. Helv. 47, 316, 1972.
93. Van Hoeck, G. : Séparation du chlorure de tetracyclinum,
du chlorure d'anhydrotetracyclinum et de leurs
épimères par chromatographie sur couche mince. J.
Pharm.Belg. 27, 609, 1972.
94. Lange, N.A., Forker, G.M. : Handbook of chemistry. S.972,
McGraw Hillbook Comp., Newyork, 1967.

95. Dale, J.K., Booth, R.E. : Physical and chemical incompatibilities. "Dispensing of Medication" de. Martin, E.W., edit. 7. Ed. S.312. Mack Publishing Comp. Newyork, 1970.
96. Federal Register, 12.1.1972, 37 F.R.440, 146 C. 232.
Tetracycline phosphate complex. Food and Drug. Admn.
U.S.A.
97. Federal Register, 1.7.1969, 34 F.R. 11090, 146 C. 218.
Tetracycline hydrochloride. Food and Drug. Admn.
U.S.A.
98. Grove, D.C., Randall, W.A. : Assay methods of antibiotics.
S.54. Medical Encyclopedia, Newyork, 1955.
99. Federal Register, 25.7.1969, 34 F.R., 12286, 141.580.
Tests and methods of assay of antibiotic and
antibiotic containing drugs. Food and Drug Admn.
U.S.A.