

## Brüsinin Spektrofotometrik Tayini için Yeni Bir Usul

### Une Nouvelle Méthode Spectrophotométrique pour le Dosage de Brucine

Semiha TULUS \*

#### G İ R İ Ş

Brüsinin kolorimetrik veya spektrofotometrik tayininde kullanılan usullerin bir kısmı aynı zamanda striknin tayinine de yaramaktadır, diğer bir kısımda ise strikninin zararlı tesiri olmaktadır. 1 inci kategorideki usullere misal olarak Reinecke tuzu (1) ile veya potasium heksatiosiyanatokromat (2) ile çöktürülüp, çökeltiyi asetonda gözerek veya sodium pikratla (3) yapılan tayinler gösterilebilir. 2 inci tipten olanlardan en çok tanınanı potasium klorat muvacehesinde derişik nitrik asid ile (4, 5, 6) tayin usulüdür. Brüsinin kolorimetrik veya visibl spektrofotometrik tayini için özel bir usulün mevcut olmamasından dolayı striknin yanında Brüsin tayini için kâğıt kromatografisile ayırdıktan sonra ultraviole spektrofotometrik (7) veya radiometrik (8), veyahut sütun kromatografisile ayrıldıktan sonra titrimetrik (9), veya ultraviole spektrofotometrik (10) tayin usullerine baş vurulmakta idi. Zarnack ve Pfeifer'in (11) 1960 da bildirdikleri fotometrik usul 2 mg striknin yanında 0.2 mg Brüsinin hatasız olarak tayinini mümkün kılması bakımından önemlidir. Bu usulde oksidasyon maddesi olarak fosforik asid muvacehesinde  $Ce(SO_4)_2$  kullanılmaktadır.

Yaptığım tetkiklere göre Brüsin hidroklorik asidli vasatta ferri klorür çözeltilisile ısıtıldığında kırmızımtrak kahverengi bir renk husule gelmektedir. Rengin şiddeti vasatın asidlik derecesine bağlıdır. Ölçmeler 475 m $\mu$  da yapılmalıdır. En uygun konsantrasyon alanı 100-500  $\mu g$  dır. Aynı şartlarda tek başına 10 mg striknin ile gözle fark edilebilecek bir renk husule gelmemektedir. 10 mg strikninle çalışıldığında spektrofotometrede okunan absorbans kıymeti usulün hata hudutları içinde kalacak kadar az olmaktadır (= 0.03). 14 mişli striknin yanında 500  $\mu g$  Brüsin bu usule göre doğru olarak tayin edilebilmektedir.

\* Farmasötik Kimya Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, Üniversite Istanbul.

## D E N E L K I S I M

**Alet**

Absorbans ölçmeleri Beckmann B modeli spektrofotometre ile yapıldı. 1 cm lik küvet kullanıldı, mavi foto - tüple ve hassaslık derecesi (sensitivity) 2 ile çalışıldı.

**Miyarlar**

A) Brüsin çözeltileri: 1 - Brüsin çözeltisi (I): Baz Brüsinin (1 ml sinde 1 mg baz Brüsin ihtiva eden) 0.01 N HCl deki çözeltisi. 2 - Aynı tarzda hazırlanan, fakat konsantrasyonları çözelti (I) inkinden farklı olan diğer Brüsin çözeltileri.

B) Ferri klorür çözeltileri: 1 - Ferri klorür çözeltisi (I):  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  nun N HCl deki % 1 lik çözeltisi. 2 - Hidroklorik asid ve ferri klorür konsantrasyonları çözelti (I) inkinden farklı olan diğer ferri klorür çözeltileri.

C) Hidroklorik asid çözeltileri (muhtelif normalitede).

**Tayin şartlarının tetkiki ve neticeler***En uygun dalga boyu*

Belli bir konsantrasyonda en fazla absorbans kıymetinin elde edildiği dalga boyunu bulmak için şu şekilde çalışıldı:

Bir tüpte 0.2 ml Brüsin çözeltisine (0.01 N HCl deki, 250 $\mu$ g) 1.8 ml 0.01 N HCl ve 3 ml % 10 luk  $FeCl_3$  çözeltisi (N HCl deki) ilâve edildi. Diğer bir tüpte 2 ml 0.01 N HCl çözeltisine 3 ml % 10 luk  $FeCl_3$  çözeltisi (N HCl deki) koymak suretile bir de mukayese çözeltisi hazırlandı. Her iki tüp kaynar su banyosunda 45 dakika ısıtıldı, sonra içinde su bulunan bir beherglas içinde 20 dakika bekletilerek oda sühnetine getirildi. Brüsin ihtiva eden ve kırmızımtrak kahverengi olan çözeltinin absorbansı spektrofotometrede, 1 cm lik küvetle muhtelif dalga boylarında, sarı renkli olan mukayese çözeltisine karşı ölçüldü.

a) Mavi foto - tüple

$\lambda$ (m $\mu$ )	650	600	550	500	475	450
A	(*)	0.05	0.165	0.232	0.255	(*)

(\*) alet ayarlanamıyor.

## b) Kırmızı foto - tüple

$\lambda$ (m $\mu$ )	900	850	800	750	700	650	600	550	500	475
A	0.01	0.005	0.01	0.005	0.005	0.015	0.06	0.175	0.245	(*)

Netice: Yukarıdaki ölçü kıymetlerinden anlaşıldığına göre kırmızı foto - tüp bu renge karşı hassas değildir; ölçmeler mavi foto - tüple ve 475 m $\mu$  de yapılmalıdır, zira en yüksek absorbands bu dalga boyunda elde edilmektedir.

Miktar tayinine tesir eden diğer faktörlerin tetkikinde, çalışma tarzının anlatılmasında tekrarları önlemek için «kaynar su banyosunda 45 dakika ısıtma, oda suhnetindeki suda 20 dakika bekletme, sonra spektrofotometrede 1 cm lik kuvetle ve mavi foto - tüple 475 m $\mu$  da absorbandsını mukayese çözeltisine karşı ölçme ameliyesi» yerine «diğer tecrübe şartları esas usuldekinin aynıdır» cümlesi kullanılacaktır.

*Isıtma müddeti*

Renk ancak ısıtma neticesinde teşekkül ettiğinden ısıtma müddetinin renk şiddetine tesir derecesi şu şekilde tetkik edildi: 7 tüpten müteşekkil bir serideki tüplerden her birine 0.5 ml brüsin çözeltisi (I), 1.5 ml 0.01 N HCl ve 3 ml FeCl<sub>3</sub> (N HCl deki, % 10 luk) kondu. Ayrıca 7 adet de mukayese çözeltisi hazırlandı, bu tüplere ise brüsin çözeltisi yerine 0.5 ml 0.01 N HCl kondu, diğer miyarlardan aynı miktarlar ilâve edildi. Her iki seri beraberce kaynar su banyosuna kondu ve 5, 10, 15 vs. dakika sonra bir brüsinli ve bir mukayese çözeltisi banyodan çıkarılıp içinde su bulunan bir beherde 20 dakika bekletilerek oda suhnetine getirildi, sonra brüsinli olanı aynı müddet ısıtılmış olan mukayese çözeltisine karşı ölçüldü. Diğer tecrübe şartları esas usuldekinin aynıdır.

Tüp No	1	2	3	4	5	6	7
Dakika	5	10	15	20	30	45	60
A	0.29	0.38	0.44	0.56	0.61	0.82	0.81

Netice: Kaynar su banyosunda 45 dakika ısıtıldığı takdirde absorbands azami kıymetini almaktadır.

(\*) alet ayarlanamıyor.

*Rengin dayanıklılık derecesi*

Sıcakta teşekkül eden rengin ne kadar bir zaman dayanıklı kaldığını tesbit için şu şekilde çalışıldı: 2 tüpten birine 0.2 ml brüsin çözeltisi (0.01 N HCl deki, 200 µg brüsin) diğerine aynı miktar 0.01 N HCl konu; her iki tübe 1.8 er ml 0.01 N HCl ve 3 ml % 10 luk FeCl<sub>3</sub> çözeltisi (N HCl deki) ilâve edildi, diğer tecrübe şartları esas usuldekinin aynıdır, yalnız ölçmeler, tüpler kaynar sudan çıkarıldıktan 5 ilâ 90 dakika sonra yapıldı. Fazla bilgi için cetvele bakınız.

Dakika	5	10	15	20	30	45	60	90
A	0.29	0.30	0.29	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28

Netice: Absorbans çözelti kaynar su banyosundan çıkarıldıktan 20 dakika sonra ölçülmelidir, zira başlangıçtan itibaren az da olsa bir renk açılması oluyor. Renk başlangıçtan 20 dakika sonra sabitleşiyor.

*Lüzumlu miyar miktarı*

Çalışma tarzı: 8 tüpten müteşekkil bir serideki tüplerden herbirine 0.5 ml brüsin çözeltisi (I), 1.5 ml 0.01 N HCl, 0.1-3 ml % 0.5 lik FeCl<sub>3</sub> çözeltisi (N HCl deki) ve nihaî hacmi 5 ml ye tamamlamak için lüzumlu miktar N HCl konu. Ayrıca 8 adet mukayese çözeltisi hazırlandı, bu takdirde brüsin çözeltisi yerine 0.5 ml 0.01 N HCl alındı, diğer miyarlar aynı miktarlarda ilâve edildi. Diğer tecrübe şartları esas usuldekinin aynıdır; yalnız brüsinli çözeltilerin herbiri kendisine ait mukayese çözeltisine karşı ölçüldü.

Tüp No.	1	2	3	4	5	6	7	8
FeCl <sub>3</sub> (ml)	0.1	0.3	0.5	1	1.5	2	2.5	3
A	0.245	0.495	0.60	0.62	0.64	0.68	0.68	0.68

Netice: Görüldüğü üzere % 0.5 lik FeCl<sub>3</sub> çözeltisinin 2 ml si kâfi gelmektedir; aynı tesiri daha az hacim miyarla elde etmek için 1 ml % 1 lik FeCl<sub>3</sub> çözeltisi alınabilir.

*Asid miktarının tesiri*

Yapılan ön tecrübelerde çözeltideki asid miktarının rengin koyuluk derecesine tesir ettiği görüldüğünden bu hususu tam olarak tesbit

etmek için HCl miktarı önce geniş aralıklı sonra daha dar aralıklı olarak değiştirilmek suretile iki seri tecrübe yapıldı. 1 inci serideki 7 tüpten her birine 0.5 ml brüsin çözeltisi (I), 1 ml FeCl<sub>3</sub> çözeltisi (I) ve 3.5 ml su veya değişen normalitelerde HCl çözeltisi kondu. Ayrıca 7 adet mukayese çözeltisi hazırlandı, bunlarda brüsin çözeltisi yerine 0.5 ml 0.01 N HCl alındı, diğer miyarlar aynı miktarlarda kondu. Diğer tecrübe şartları esas usuldekinin aynıdır, yalnız brüsinli çözeltilerin herbiri kendine ait mukayese çözeltisine karşı ölçüldü.

Tüp No.	1	2	3	4	5	6	7
HCl	su	N	2 N	4 N	6 N	10 N	12 N
A	0.370	0.525	0.500	0.420	0.360	0.360	0.280

Görüldüğü üzere N HCl li çözeltinin absorbanı diğerlerinininkinden daha fazladır ve bu seride absorban önce artmakta sonra azalmaktadır. İkinci bir seri tecrübeye saf su ile 4 N HCl arasındaki konsantrasyonlar aynı esasa göre tetkik edildi; yalnız miyar olarak FeCl<sub>3</sub> ün 0.1 N HCl deki % 1 lik çözeltisi kullanıldı.

Tüp No.	1	2	3	4	5	6	7	8
HCl	su	0.01 N	0.1 N	0.2 N	0.5 N	N	2 N	4 N
A	(*)	(*)	0.245	0.375	0.520	0.580	0.545	0.425

Netice: Absorbans asid miktarına göre değişmekte olup en yüksek kıymetini N HCl de kazanmakta, asid konsantrasyonu arttıkça tekrar azalmaktadır.

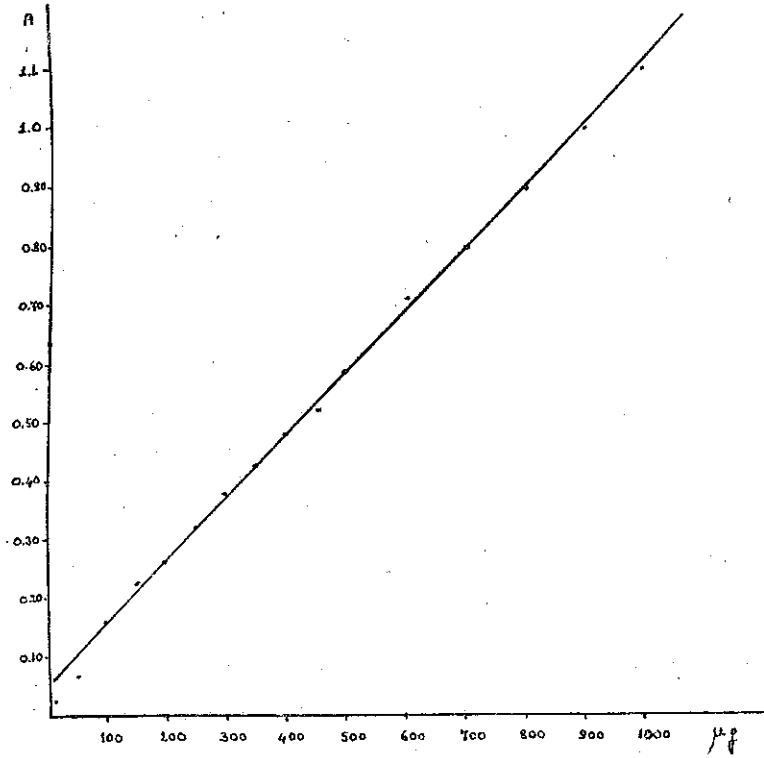
#### *Konsantrasyonla absorban arasındaki münasebet*

Çalışma tarzı: 1 ml sinde aşağıdaki cetvelde gösterilen miktarlarda brüsin ihtiva eden ve HCl e nazaran 0.01 N olan çözeltilere nihaî usuldeki gibi 3 ml N HCl ve 1 ml FeCl<sub>3</sub> çözeltisi (I) ilâve edildi. Mukayese çözeltisi ve diğer şartlar nihaî usuldekinin aynıdır. 3 seri tayinin ortalama kıymetleri aşağıdaki cetvelde gösterilmiştir.

(\*) Çözelti bulanıktır.

Brüsin ( $\mu\text{g}$ )	Absorbans	Brüsin ( $\mu\text{g}$ )	Absorbans
10	0.03	400	0.48
50	0.07	450	0.52
100	0.16	500	0.58
150	0.23	600	0.71
200	0.26	700	0.80
250	0.32	800	0.90
300	0.38	900	1
350	0.43	1000	1.1

Ölçme neticeleri yardımı ile çizilen grafik (ölçü eğrisi) şekil 1 de görülmektedir.



Şekil 1. Brüsin konsantrasyonu ile absorbans arasındaki münasebet.

Ölçme neticelerinin çoğu, 100  $\mu\text{g}$  dan küçük kıymetlerin absorbansları hariç, bir doğru üzerindedir; diğerleri ise bu doğrudan çok uzakta değildir; fakat bu doğru koordinat sisteminin sıfır noktasından geçmemektedir. Bu müşahadelerden çıkan neticeler şunlardır:

1 - Sistem Beer kanununa uymamakla beraber absorbands 100 ile 800  $\mu\text{g}$  brüsin arasındaki alanda konsantrasyonla oranlı olarak değişmektedir. 2 - Diğer taraftan en az ölçme hatası yapılan absorbands alanı 0.155 - 0.770 kıymetleri arasındadır; brüsinin bu usulle tayininde bu absorbands alanı içinde kıymetler gösteren brüsin konsantrasyonları 100 ile 500  $\mu\text{g}$  arasındadır. O halde ölçme neticelerinin konsantrasyonla oranlı olarak değiştiği en uygun konsantrasyon alanı 100 - 500  $\mu\text{g}$  arasındadır.

### Nihaî usul

Bundan önceki kısımlarda bildirilen hususlar göz önüne alınarak brüsinin spektrofotometrik tayini için aşağıdaki usul geliştirildi:

Bir tübe, HCl e nazaran 0.01 N olan ve 1 ml sinde 100 - 500  $\mu\text{g}$  brüsin ihtiva eden çözeltiden 1 ml, diğer bir tübe 1 ml 0.01 N HCl konur, her iki tübe de 3 er ml N HCl ve 1 er ml % 1 lik  $\text{FeCl}_3$  çözeltisi (N HCl deki) ilâve edilir. Tüpler iyice çalkalandıktan sonra kaynamakta olan su banyosunda 45 dakika ısıtılır, su banyosundan çıkarılıp içinde oda suhnetinde su bulunan bir beherglasa konur, burada 20 dakika bekletilerek tüp muhteviyatının oda suhnetine gelmesi sağlanır. Sonra brüsinli çözeltinin absorbandsı bir spektrofotometrede 1 cm lik kuvetle ve 475  $\text{m}\mu$  de brüsiniz olana (mukayese çözeltisine) karşı ölçülür (mavi foto - tüp). Bulunan absorbands kıymetinden, daha önce hazırlanan ölçü eğrisi yardımı ile brüsin miktarına geçilir.

Not: Absorbans, çözeltideki asid miktarı ile değiştiğinden brüsinli meçhul numune çözeltisinin pH ı kaç ise ölçü eğrisinin hazırlanmasında kullanılacak standard brüsin çözeltisinin de aynı pH da olması lâzımdır.

### Usulün kat'ilik derecesinin tespiti

Usulün, tekrarlandığında birbine yakın neticeler verip vermediğini tetkik etmek üzere şu şekilde çalışıldı.

HCl e nazaran 0.01 N olan brüsin çözeltisinin 1 ml sine (300  $\mu\text{g}$  brüsin) 3 ml N HCl, 1 ml  $\text{FeCl}_3$  çözeltisi (I) ilâve edildi. Bu şekilde 11 numune hazırlandı, ayrıca diğer bir tüpte, 1 ml 0.01 N HCl çözeltisine 3 ml N HCl ve 1 ml  $\text{FeCl}_3$  çözeltisi (I) ilâve edilmek suretile bir mukayese çözeltisi hazırlandı. Diğer tecrübe şartları esas usuldekinin aynıdır.

Tüp No.	A	Tüp No.	A
1	0.380	7	0.385
2	0.390	8	0.410
3	0.375	9	0.395
4	0.395	10	0.380
5	0.375	11	0.385
6	0.375		

Bu ölçme neticelerinin aritmetik ortalaması ve ayrıca ortalama sapması hesaplandı.

Aritmetik ortalama ( $m$ ), absorbans kıymetlerinin toplamı ( $\Sigma X$ ) ve tayinlerin adedi ( $n$ ) ile gösterilirse

$$m = \frac{\Sigma X}{n} = 0.3859 \text{ olur.}$$

Ortalama sapma ( $O_s$ ), ölçme kıymetlerinden herbirinin aritmetik ortalamadan farkının toplamını  $\Sigma(X-m)$ , tayinlerin adedine ( $n$ ) bölmek suretile bulunur:

$$O_s = \frac{\Sigma(X-m)}{n} = \frac{92.7 \times 10^{-3}}{11} = 8.42 \times 10^{-3} = 0.00842$$

Yüzde ortalama sapma (kat'ilik derecesi):

$$\frac{O_s \times 100}{m} = \frac{0.00842 \times 100}{0.3859} \sim 2.18 \text{ dir.}$$

### Striknin miktarının rolü

Ekseriyetle striknin yanında brüsin tayini icap ettiğinden, strikninin bu renk reaksiyonuna zarar olup olmadığının tetkik edilmesi lâzım gelmektedir. Aynı usule göre yalnızca striknin ile alışıldığında 10 mg striknin ile bile gözle fark edebilecek bir renk husule gelmemektedir. Bu maksatla şu şekilde çalışıldı: 12 tüpten herbirine aşağıdaki cetvelde bildirilen miktarlarda striknin ihtiva eden striknin çözeltisi (3 mg/ml, N HCl deki), 0.5 ml 0.01 N HCl, 1 ml FeCl<sub>3</sub> çözeltisi (I) ve nihai hacmi 5 ml ye tamamlayacak kadar N HCl kondu. Mukayese çözeltisi: 0.5 ml 0.01 N HCl + 3.5 ml N HCl + 1 ml FeCl<sub>3</sub> çözeltisi (I) dir. Diğer şartlar nihai



usuldekinin aynıdır. Spektrofotometrede okunan absorpsanlar aşağıdaki cetvelde gösterilmiştir:

Striknin (mg)	0.45	0.60	0.75	0.90	1.2	2.1	3.0	4.2	5.1	6.0	8.1	10.2
A	0.0	0.01	0.01	0.01	0.01	0.015	0.015	0.015	0.025	0.030	0.030	0.032

Cetvelin tetkikinden anlaşılacağı gibi 10.2 mg, yani 0.5 mg. brüsin nazaran 20 misli miktardaki striknin ile dahi alette okunan absorpsan usulün hata hudutları içinde bulunmaktadır.

İkinci bir seri tecrübelerde strikninin brüsinle beraber bulunduğu takdirde renk reaksiyonuna herhangi bir tesiri olup olmadığı tetkik edildi. Bu maksatla 500 µg brüsin (0.5 ml çözelti I) ihtiva eden tüplere artan nisbetlerde striknin (1 ml sinde 2 mg striknin ihtiva eden ve HCl e nazaran N olan striknin çözeltisi) kondu ve bu karışımlara 1 ml FeCl<sub>3</sub> çözeltisi (I) ve nihai hacmi 5 ml ye tamamlayacak kadar N HCl ilâvesinden sonra müted şekilde çalışıldı. Ayrıca bir tane strikninsiz fakat brüsinli, bir de brüsiniz fakat strikninli tecrübe yapıldı.

Ölçmelerde kullanılan mukayese çözeltisi 0.5 ml 0.01 N HCl + 3.5 ml N HCl + 1 ml FeCl<sub>3</sub> çözeltisi (I) karışımıdır. Ölçme neticeleri aşağıdaki cetvelde gösterilmiştir.

Tüp No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Brüsin (mg)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	—
Striknin (misli)	—	1	2	3	4	5	8	10	14	(7 mg)
A	0.60	0.61	0.58	0.59	0.60	0.60	0.62	0.63	0.62	0.03

Cetvelin tetkikinden anlaşılacağı üzere 14 misli striknin brüsinin bu usule göre spektrofotometrik tayininde zararlı bir tesir yapmamaktadır.

#### Ö Z E T

Brüsinin hidroklorik asidli vasatta ferri klorür ile ısıtılması neticesinde teşekkül eden kırmızımtrak kahverengi çözeltinin 475 mµ da absorpsanını ölçmek suretile, bu maddenin spektrofotometrik tayini için yeni bir usul geliştirildi.

Yalnız başına strikninle çalışıldığında 500 µg brüsinine nazaran 20 misli miktardaki strikninle bile, alette okunan absorpsiyon, usulün kat'ilik derecesine tesir etmeyecek kadar az ( $A=0.03$ ) olmaktadır. Ayrıca 14 misline kadar striknin muvacehesinde brüsin (500 µg) bu usule göre doğru olarak tayin edilebilmektedir.

## R É S U M É

Nous avons élaboré une nouvelle méthode pour le dosage de la brucine. Elle est basée sur la coloration brun rougeâtre obtenue par chauffage de la brucine avec une solution de perchlorure de fer en présence d'acide chlorhydrique. L'extinction doit être mesurée à 475 mµ.

Cette méthode permet de doser de 100 à 500 µg de brucine.

Lorsqu'on soumet la strychnine seule, à la même opération avec une quantité 20 fois supérieure à celle de 500 µg de brucine, l'extinction est si minime ( $E=0.03$ ) que la présence d'une telle quantité de strychnine n'exerce aucune influence sur la précision de la méthode.

En outre, cette méthode nous permet de doser correctement 500 µg de brucine en présence d'une quantité de strychnine 14 fois supérieure.

## L I T E R A T Ü R

1. Karmazin, M., Böswart, J., *Pharm. Zentralhalle*, **95**, 10 (1956).
2. Spacu, P., Jancu, C., *Z. analyt. Chem.*, **174**, 87 (1960).
3. Cross, A. H., Mc Claren, D. ve Stevens, S. G. E., *J. Pharm. Pharmacol.*, **11**, 103 T. (1959).
4. Dowzard, E., *Proc. Chem. Soc. London*, **18**, 220 (1902); — Ref. Snell, F. D., Snell, C. T., *Colorimetric methods of analysis*, 3 ed., vol. IV, 431, D. von Nostrand Co., Newyork (1954).
5. Wöber, A., *Z. angew. Chem.*, **31**, 114 (118); — Ref. Snell, F. D., Snell, C. T., *Colorimetric methods of analysis*, 3 ed., vol. IV, 431, D. von Nostrand Co., Newyork (1954).
6. Denoel, A., *J. pharmac. Belgique* **5**, 59 (1950); — Ref. Kakac, B. Vejdelek, Z. J., *Handbuch der Kolorimetrie*, vol. I, 280, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena (1962).
7. Asado, T., Okamoto A., *Arch. Pharm. Japan* **19**, 130 (1959). — Ref. *Anal. Abstr.*, **8**, 3001 (1961).
8. Sarsunová M., Tögyessy, J. ve Majer, J., *Pharm. Acta Helv.*, **35**, 271 (1960).
9. Fischer, R. Gharbo, S., *Pharm. Zentralhalle*, **97**, 101 (1959).
10. Scott, M., Taub, A. ve Piantadosi, C., *Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, **45**, 232 (1956).
11. Zarnack, J., Preifer, S., *Pharmazie* **15**, 410 (1960).

(Redaksiyona verildiği tarih: 10 Aralık 1965)