

FARMAKOGNOZİ UYGULAMA-III

2017

**Cortex Chinae'de UV-Spektrofotometresi ile
Total Alkaloit Miktar Tayini
(Avrupa Farmakopesi)**

Giriş

➤ Alkaloitler,

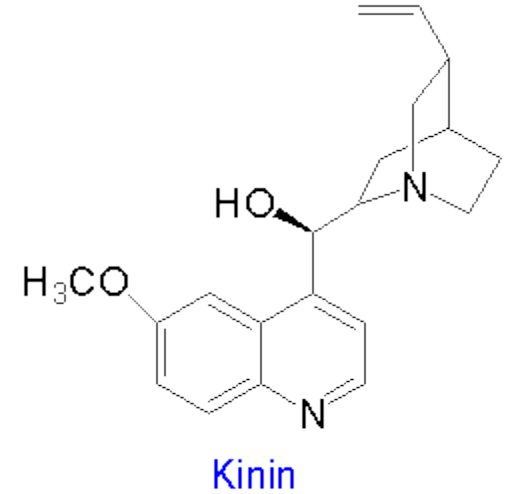
Çoğunlukla bitkisel kaynaklı, bazik karakterde, biri genellikle heterozit yapıda olmak üzere bir veya birden fazla 'N' atomu içeren (halka içinde veya dışında), insan veya hayvan organizmasında fizyolojik etkiye sahip bileşiklerdir.

➤ Kinolein türevi alkaloitler olarak da bilinen; Cortex Chinae'nin major alkaloitleri(kınakına alkaloitleri) **kinin/kinidin, kinkonidin/kinkonin**'dir.

Drog: Cortex Chinae

Giriş

- Alkaloitlerin miktar tayini için kullanılan başlıca yöntemler:
 - Gravimetrik yöntem
 - Volümetrik yöntem
 - Titrimetrik yöntem
 - Kromatografik yöntem
 - Biyolojik yöntem
 - **Spektroskopik yöntemler***



Spektroskopik yöntemler

➤ Spektroskopik yöntemler;

Işının madde tarafından **absorbsiyonuna** (emilim) ve **emisyonuna** (yayıma) dayalı ölçüm yöntemleri olup enerji düzeyleri arasındaki geçişler sonucu ortaya çıkan spektrumun ölçülmesi esasına dayalı yöntemlerdir.

➤ En çok kullanılan spektroskopik yöntemler:

- Spektrofotometri (UV-Visible, IR, X ışını)
- Kolorimetri
- Kütle Spektroskopisi
- NMR Spektroskopisi

➤ Doğal maddelerin;

teşhisi, yapı aydınlatılması, miktar tayinleri açısından oldukça önemli olan spektroskopik yöntemlerin başında spektrofotometri gelir.

Spektrofotometri

➤ Spektrofotometri,

Işık kaynağı ile prizma arasına yerleştirilen renkli maddenin ışık spektrumunun bazı renklerini absorblaması ve konsantrasyona göre spektrumda zayıf veya kuvvetli bant göstermesi özelliğine dayanan miktar tayin yöntemidir.

- **Yöntem:** Spektrofotometri
(Oldukça duyarlı ve basit bir yöntem)
- **Cihaz:** Spektrofotometre

- Spektrofotometri ışığın absorblanmasına dayalı bir yöntemdir. Işık ise elektromanyetik bir radyasyon olup; **frekans (ν)** veya **dalga boyu (λ)** ile karakterize edilir. Ve ışınların birbirinden farklı bu değerleri sıralandığında **elektromanyetik spektrum** elde edilir.
- **Dalga boyu;**
 - **200-400nm** arasındaki ışınları içeren bölge Ultraviyole(UV/Mor ötesi)
 - **400-800nm** arasındaki ışınları içeren bölge ise Görünür bölgedir.

Spektrofotometre

- Lamba tarafından yayılan ışın demeti monokromatör (prizma) yardımıyla tek bir dalga boyundaki ışına (monokromatik ışına) dönüştürülür.
- Bu ışın örneğin içinde bulunduğu odaya girer. Ölçümü yapılacak örnek, küvet içine konulur.
- Çift ışınlı spektrofotometrelerde ışın hem örnekten hem de kör çözeltilisinden (referans) geçirilir.
- UV spektrofotometresinde kullanılan prizma, cam ve mercekler; adi cam bu bölgedeki ışınları absorbladığı için, **kuvartz** camdan yapılmıştır.
- Örnekten geçen ışığın şiddeti detektör tarafından algılanır ve kaydedici ya da yazıcıya elektrik sinyali şeklinde gönderilir.

Absorsiyon

- Madde; kendisine gönderilen ışık enerjisinin büyüklüğüne göre **(dalga boyu)** ışıklardan bazılarını **absorblar**. bazılarıyla ise hiç ilişkiye girmez.
- Maddenin ışını absorblaması ile;
 - Molekülde bir elektron yörüngesinden daha yüksek enerjili bir yörüngeye çıkar.
 - Bu geçişe ait enerji, yörüngelerin durumuna bağlıdır.
 - Basit bir fonksiyonlu grup daima aynı bölgede absorbsiyon yapar.

Lambert-Beer Yasası

- Monokromatik ve I_0 şiddetinde bir ışık demeti;
 - Kalınlığı b cm olan tüpte bulunan çözelti içindeki herhangi bir molekül tarafından absorblanır ve tüpü I şiddetinde terkeder.
- Yansımalar ve saçılmalardan bağımsız olarak ışığın şiddetindeki molekül tarafından absorblanmasıyla oluşan azalma; *Lambert-Beer* eşitliği ile açıklanır.

Bu eşitliğe göre; örnek kabına giren ve kabı terk eden ışık şiddetlerinin logaritmalarının farkı, ışıkla etkileşen moleküllerin birim hacimdeki sayısı yani konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

$$\log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot b \cdot C = A \Rightarrow \text{Absorbsiyon}$$

örnek kabının kalınlığı (cm)

molar
absorbsiyon
katsayısı
(lt/mol.cm)

mol/lt

Absorbsiyon Spektrumu

- **Spektrofotometrik ölçümler iki farklı şekilde yapılabilir**
 - Belli bir dalga boyunda absorbans ölçülür. Konsantrasyon veya absorpsiyon katsayısının belirlenmesine yarar.
 - Belli bir dalga boyu aralığında absorbans taraması yapılır. Böylece absorpsiyon spektrumu elde edilir. Maddenin kimyasal karakteri hakkında bilgi sağlar.
- Işığın dalga boyu veya frekansına karşı, absorpsiyon miktarının ya da diğer bir deyişle absorbans (A) ve transmittans (T) arasındaki ilişkinin grafiğe geçirilmesine **absorpsiyon spektrumu** denir.

Transmittans (T): Analiz küvetinden çıkan ışının giren ışına oranının % ifadesidir.

Eğer numune hiç ışık absorbe etmiyorsa $I=I_0 \Rightarrow T=\%100$

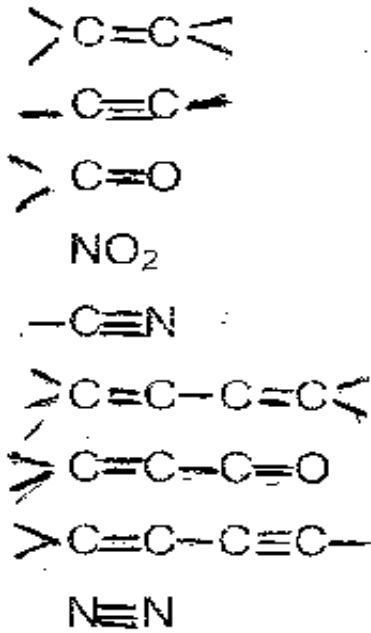
Eğer numune tüm ışığı absorbe ediyorsa $I=0 \Rightarrow T=\%0$

Absorbans (A): Analiz küvetinde tutulan ışının giren ışına oranının % ifadesidir.

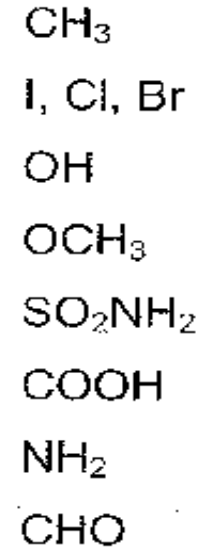
Özetlersek;

Herhangi bir molekülde, belli bir dalga boyu aralığındaki ışığın absorpsiyonundan sorumlu olan fonksiyonel gruba **kromofor grup**; ışığı absorblamadığı halde grupların absorbladığı ışığın dalga boyunu daha büyük değerlere kaydıran ve absorpsiyon katsayısını arttıran gruplara ise **oksokrom grup** adı verilir.

Kromofor grup



Oksokrom grup



- ▶ Bir molekülün absorpsiyon bandının; bir oksokrom grup etkisiyle daha uzun dalga boyuna kaymasına **batokromik kayma**, daha kısa dalga boyuna kaymasına ise **hipsokromik kayma** denir.
- ▶ Absorpsiyon bandının şiddetinin azalmasına **hipokromik etki**, artmasına ise **hiperkromik etki** denir.

Çözücü özellikleri

- Bir spektrofotometrik çalışmada kullanılan çözücü;
 - spektrumu alınacak maddeyi çözmeli.
 - spektrumu alınacak maddeyle aynı alanda absorpsiyon yapmamalı.
 - polar olmamalı.
 - çözdüğü madde ile reaksiyona girmemeli.

UV Spektrofotometresinin Kullanım Alanlar

- Kalitatif analiz
- Kantitatif analiz
- Saflık tayini
- Yapı tayini

DENEYİN YAPILIŞI

Alkaloit kinotannik asite bağlı iken serbest hale geçer

0,2 g drog (C. Chinae)
+
2 ml su + 1,4 ml dil HCl

15 dk su banyosunda ısıtılır,
sonra soğutulur

5 ml CHCl_3
+
10 ml eter
+
1 ml % 20'lik NaOH

Emülsiyonu önler, ortamdaki suyu bünyesine alır

20 dk hızla çalkalanır

0,6 g kitre zamkı

Berrak olana kadar çalkalanır,
pamuktan süzülerek alınır

Süzüntü+4 ml
(1K Kloroform+2K Eter
karışımı)

Kuruğuğa kadar su banyosunda uçurulur

Artık
+
2 ml etanol

Çözülür

Çözültiden 0,25 ml alınır

Su banyosunda
kuruğuğa kadar uçurulur

Artık 0,1 M HCl'de çözülüp, 0,1 M HCl ile 50 ml'ye tamamlanır



Referans (Kör) Çözeltilerin Hazırlanışı

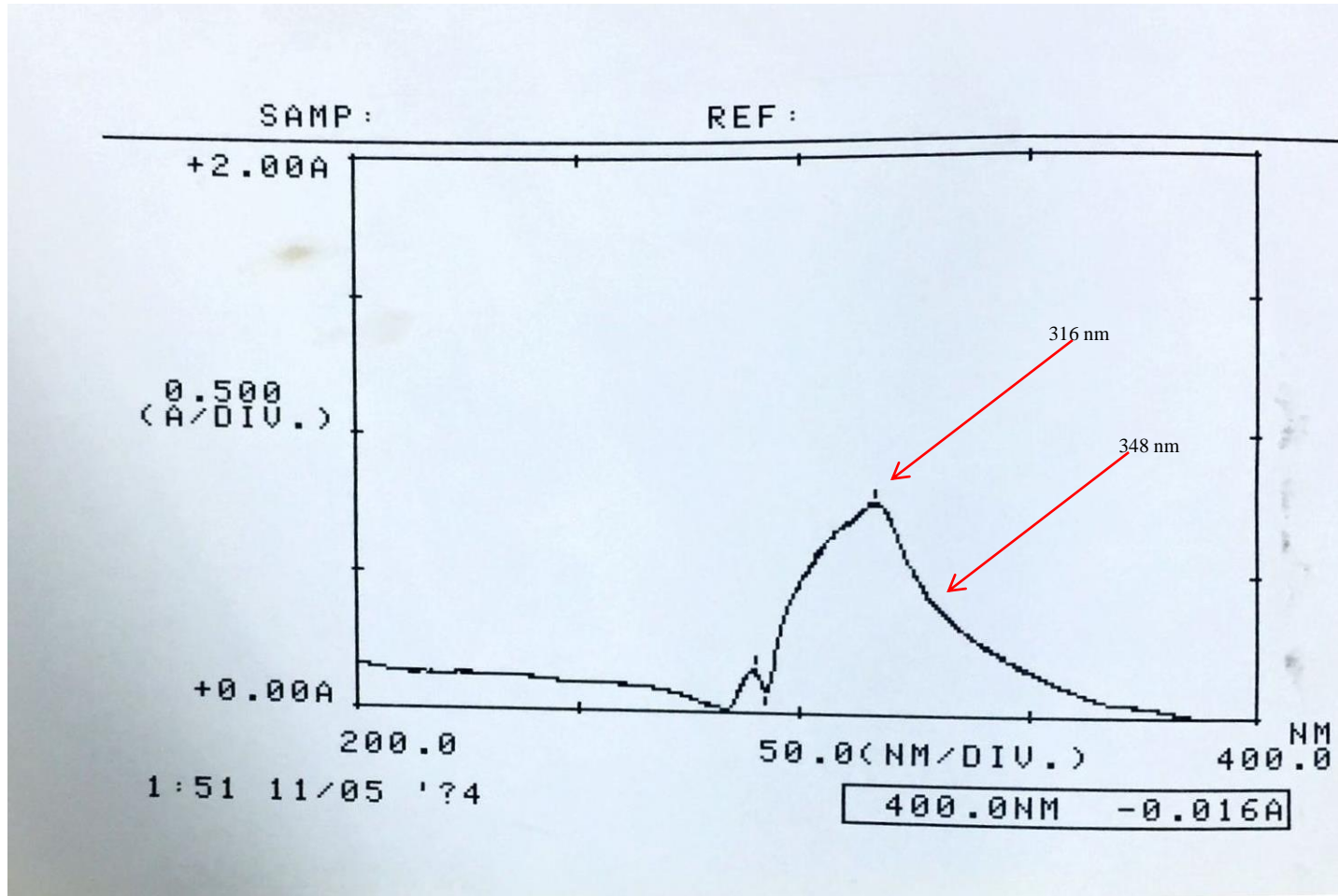
15 mg kinin 0,1 M HCl'de çözülür, 0,1 M HCl ile 50 ml'ye tamamlanır.

15 mg kinkonin 0,1 M HCl'de çözülür, 0,1 M HCl ile 50 ml'ye tamamlanır.

UV Spektrofotometresi Kullanım

- ▶ Kör çözeltisi ve numune analiz tüplerine konur.
- ▶ Etrafı temiz bir peçete ile silinir.
- ▶ Kör çözeltisi cihazın arka kısmına; numune ön kısmına dikkatlice yerleştirilir.
- ▶ Analiz başlatılır.

UV Spektrumu



$$x = \frac{[A316 \times A348c] - [A316c \times A348]}{[A316q \times A348c] - [A316c \times A348q]} \times \frac{100}{M} \times \frac{2}{1000}$$

$$y = \frac{[A316 \times A348q] - [A316q \times A348]}{[A316c \times A348q] - [A316q \times A348c]} \times \frac{100}{M} \times \frac{2}{1000}$$

c= kinkonin (cinchonine)

q= kinin (quinine)

- M = droğun ağırlığı (g)
x = kinin tipi alkaloid yüzdesi
y = kinkonin tipi alkaloid yüzdesi
A316 = test çözeltisinin 316 nm'deki absorbansı
A348 = test çözeltisinin 348 nm'deki absorbansı
A316c = kinkonin içeren referans çözeltisinin 316 nm'deki absorbansı
A348q = kinin içeren referans çözeltisinin 348 nm'deki absorbansı
A316q = kinin içeren referans çözeltisinin 316 nm'deki absorbansı
A348c = kinkonin içeren referans çözeltisinin 348 nm'deki absorbansı

$$\frac{100x}{x + y} \quad (\text{Kinin tipi alkaloidlerin bağıl yüzdesi})$$

KINAKINA KABUĞU
CINCHONA BARK
Cinchonae cortex

TANIM

Cinchona pubescens Vahl (*Cinchona succirubra* Pav.), *Cinchona calisaya* Wedd., *Cinchona ledgeriana* Moens ex Trimen ile bunların varyeteleri veya hibritlerinin kesilmiş veya bütün, kurutulmuş kabuklarıdır.

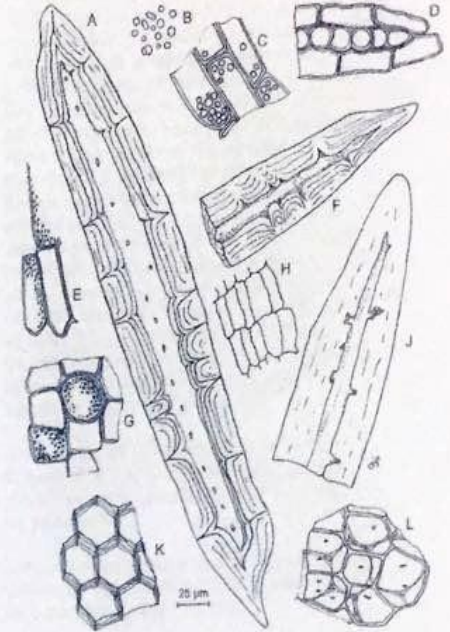
İçerik: %30 ile %60 arası kinin yapısında alkaloidlerden en az % 6.5 toplam alkaloid (kuru drog) içerir.

ÖZELLİKLER

Çok acı, biraz buruk tattadır.

TANIMA

- A. Kalınlığı 2-6 mm olan boru veya oluk şeklinde kıvrık parçalardan elde edilen gövde ve dal kabuklarıdır. Dış yüzeyi soluk kahverengimsi-gri veya gri ve sıklıkla liken taşır; genellikle pürüzlü, enine çatlaklar bulunur ve boyuna oluklu veya kıvrımlıdır; bazı varyetelerin dış yüzeyinde pul pul dökülme görülür. İç yüzey çizgili ve koyu kırmızimsı-kahverengi; kırıldığında dış yüzey kısa ve iç yüzey liflidir.
- B. Toz haline getirilir (355) (2.9.12). Toz kırmızimsı-kahverengidir. *Kloral hidrat çözeltisi R* kullanarak mikroskop altında incelenir. Toz aşağıdaki karakteristik elementleri gösterir (Şekil 0174.-1): yüzeyden görünümde [K] ve enine kesitinde [H], kırmızı-kahverengi içerikle dolu ince duvarlı mantar hücreleri; bütün [A] veya parçalanmış [F, J] çok kalın duvarlı tırtıklı lümenli ve bariz huni şeklinde geçitli, 90 µm'ye varan çap ve 1300 µm'ye varan uzunlukta sarı, iç şeklinde çizgili floem lifleri; kalsiyum okzalat mikroprizmaları ile dolu parenkimatik idioblastlar [E, G]; teğetsel kesitteki öz kollarının [D] eşlik ettiği, ince duvarlı floem parenkima hücre kümeleri [L]. *Gliserol R*'nin %50'lik h/h çözeltisi kullanarak mikroskop altında incelenir: Serbest [B] veya parenkima hücreleri [C] içinde, çoğunlukla basit fakat bazen 2 veya 3 parçalı, çapı 6-10 µm olan birkaç nişasta tanesi görülür.



Şekil 0174.-1. – Kinakina kabuğu toz bitkisel droğunun tanıma testi B için çizim.

C. İnce Tabaka Kromatografisi (2.2.27).

Test çözeltisi. Bir deney tüpünde 0.10 g toz edilmiş bitkisel droğa (180) (2.9.12) 0.1 mL *derişik amonyak R* ve 5 mL *metilen klorür R* ilave edilir. 30 dk süresinde ara sıra kuvvetlice çalkalanır ve süzülür. Süzüntü bir su banyosunda kuruyana kadar uçurulur ve kalıntı 1 mL *etanol R*'de çözülür.

Şahit çözelti. 17.5 mg *kinin R*, 2.5 mg *kinidin R*, 10 mg *kinkonin R* ve 10 mg *kinkonidin R*, 5 mL *etanol R* içerisinde çözülür.

Plak: İTK *silika jel plak R*.

Hareketli faz: *Dietilamin R*, *etil asetat R*, *toluen R* (10:20:70 h/h/h).

Uygulama: 10 µL, bantlar şeklinde.

Sürüklenme: 15 cm'nin üzerinde iki kere ilerleme.

Monografiler
K-L

YORUM:

**Farmakope'ye
Uygun mu???**



%30-%60 arası kinin yapısında en az %6.5 toplam alkaloid içerir!!!