

YILDIZ TEKNİK UNIVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTUSU

TUREV SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM İLE  
ASKORBİK ASİT TAYINI

Kim. Yük. Müh. Mahmure USTUN ÖZGÜR

F.B.E. Kimya Anabilim Dalı Anorganik Kimya Programında  
Hazırlanan

DOKTORA TEZİ

Tez Savunma Tarihi : 17 Ağustos 1992

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Sıdıka Sungur (Y.T.U)

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Mine Enginün (M.U)

Doç. Dr. Resat Apak (İ.U)

İSTANBUL, Ağustos 1992

Çalışmalarımı büyük bir dikkat ve titizlikle yöneten,karşılaştığım her sorunda bilgisi ve ileri görüşü ile bana daima yardımcı olan değerli hocam sayın Prof. Dr. Sıdika SUNGUR'a tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

**İÇİNDEKİLER**

**Sayfa No**

**ÖZET**

**SUMMARY**

**1. GİRİŞ**

**2. GENEL BÖLÜM**

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1. Askorbik Asit .....                                                  | 1  |
| 2.1.1. Tarihçesi ve Özellikleri .....                                     | 1  |
| 2.1.2. Farmakolojik Etkisi .....                                          | 4  |
| 2.1.3. Kaynakları ve Kullanım Alanları .....                              | 6  |
| 2.1.4. Tanınma Yöntemleri .....                                           | 11 |
| 2.1.5. Miktar Tayini Yöntemleri .....                                     | 13 |
| 2.2. Asetilsalisilik Asidin Karışımlardaki Miktar Tayini Yöntemleri ..... | 27 |
| 2.3. Rutinin Karışımlardaki Miktar Tayini Yöntemleri ..                   | 28 |

**3. DENEYSEL BÖLÜM**

|                                              |    |
|----------------------------------------------|----|
| 3.1. Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler ..... | 31 |
| 3.1.1. İlaç Maddeleri .....                  | 31 |
| 3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler .....  | 31 |
| 3.1.3. Çözeltiler .....                      | 31 |
| 3.2. Aletler ve Diğer Gereçler .....         | 33 |
| 3.3. Yöntemler .....                         | 34 |

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| 3.3.1. Spektrumların Çizilmesi .....                   | 34 |
| 3.3.2. Askorbik Asit - Asetilsalisilik Asit            |    |
| Karışımının Analizi .....                              | 35 |
| 3.3.2.1. Türev Spektrofotometrik Yöntem .....          | 35 |
| 3.3.2.1.1. Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması .....         | 35 |
| 3.3.2.1.2. Farmasötik Preperatlara Uygulanması .....   | 36 |
| 3.3.2.2. Kıyas Yöntemleri .....                        | 37 |
| 3.3.3. Askorbik Asit - Rutin Karışımının Analizi ..... | 37 |
| 3.3.3.1. Türev Spektrofotometrik Yöntem .....          | 37 |
| 3.3.3.1.1. Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması .....         | 37 |
| 3.3.3.1.2. Farmasötik Preperatlara Uygulanması .....   | 38 |
| 3.3.3.2. Kıyas Yöntemleri .....                        | 39 |
| 3.3.4. Meyve ve Sebzelerde Askorbik Asit Tayini .....  | 40 |
| 3.3.4.1. Türev Spektrofotometrik Yöntem .....          | 40 |
| 3.3.4.1.1. Ekstraksiyon .....                          | 40 |
| 3.3.4.1.2. Ölçüm Koşullarının Saptanması .....         | 41 |
| 3.3.4.1.3. Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması .....         | 41 |
| 3.3.4.1.4. Ölçüm .....                                 | 42 |
| 3.3.4.2. Kıyas Yöntemi .....                           | 43 |
| <b>4. SONUÇLAR</b>                                     |    |
| 4.1. Askorbik Asit - Asetilsalisilik Asit              |    |
| Karışımının Analizi .....                              | 44 |
| 4.1.1. Uygun Koşulların Saptanması .....               | 44 |
| 4.1.2. Ölçü Eğrileri .....                             | 47 |

|                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1.3. Yöntemin Farmasötik Preperatlara Uygulanması<br>ve Sonuçların Kıyas Yöntemleriyle Elde Edilen<br>Sonuçlarla Karşılaştırılması ..... | 47 |
| 4.2. Askorbik Asit - Rutin Karışımının Analizi .....                                                                                       | 55 |
| 4.2.1. Uygun Koşulların Saptanması .....                                                                                                   | 55 |
| 4.2.2. Ölçü Egrileri .....                                                                                                                 | 58 |
| 4.2.3. Yöntemin Farmasötik Preperatlara Uygulanması<br>ve Sonuçların Kıyas Yöntemleriyle Elde Edilen<br>Sonuçlarla Karşılaştırılması ..... | 58 |
| 4.3. Meyve ve Sebzelerde Askorbik Asit Tayini .....                                                                                        | 66 |
| 4.3.1. Ekstraksiyon .....                                                                                                                  | 66 |
| 4.3.2. Portakalda Askorbik Asit Tayini .....                                                                                               | 67 |
| 4.3.2.1. Ölçüm .....                                                                                                                       | 67 |
| 4.3.2.2. Ölçü Egrisi .....                                                                                                                 | 70 |
| 4.3.2.3. Yöntemin Portakal Örneğine Uygulanması<br>ve Sonuçların Kıyas Yöntemiyle Elde<br>Edilen Sonuçlarla Karşılaştırılması .....        | 70 |
| 4.3.3. Kivide Askorbik Asit Tayini .....                                                                                                   | 75 |
| 4.3.3.1. Ölçüm .....                                                                                                                       | 75 |
| 4.3.3.2. Ölçü Egrisi .....                                                                                                                 | 75 |
| 4.3.3.3. Yöntemin Kivi Örneğine Uygulanması<br>ve Sonuçların Kıyas Yöntemiyle Elde<br>Edilen Sonuçlarla Karşılaştırılması .....            | 80 |
| 4.3.4. Karnabaharda Askorbik Asit Tayini .....                                                                                             | 82 |
| 4.3.4.1. Ölçüm .....                                                                                                                       | 82 |
| 4.3.4.2. Ölçü Egrisi .....                                                                                                                 | 82 |

|                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3.4.3. Yöntemin Karnabahar Örneğine Uygulanması<br>ve Sonuçların Kıyas Yöntemiyle Elde Edilen<br>Sonuçlarla Karşılaştırılması ..... | 82 |
| 4.3.5. Maydanozda Askorbik Asit Tayini .....                                                                                          | 87 |
| 4.3.5.1. Ölçüm .....                                                                                                                  | 87 |
| 4.3.5.2. Ölçü Eğrisi .....                                                                                                            | 87 |
| 4.3.5.3. Yöntemin Maydanoz Örneğine Uygulanması<br>ve Sonuçların Kıyas Yöntemiyle Elde Edilen<br>Sonuçlarla Karşılaştırılması .....   | 92 |
| 5. TARTIŞMA                                                                                                                           | 94 |
| 6. KAYNAKLAR                                                                                                                          | 96 |
| ÖZGEÇMİŞ                                                                                                                              |    |



## ÖZGEÇMİŞ

1959'da Silivri'de doğdum. İlk ve orta öğrenimimi burada tamamladım. 1981'de İ.U. Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nden mezun oldum. Bir yıl Silivri Lisesi'nde öğretmenlik yaptım. 1982'de Cerrahpaşa Tıp Fak. Toplum Hekimliği Merkezi'nde göreve başladım. Burada Biyokimya ve Gıda Laboratuvarında görev aldım. Görevim esnasında Hıfzı-sıhha Enstitüsünde gıda analizleri üzerine 6 ay kurs gördüm. Master öğrenimimi 1983-1986 yılları arasında İ.T.U. Nükleer Enerji Enstitüsü'de yaptım. 1985'de Y.U. Fen-Edebiyat Fak. Kimya Bölümü Anorganik Kimya Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak göreve başladım. Halen bu görevime devam ediyorum. 1987'de aynı anabilim dalında doktora öğrenimime başladım.

## SUMMARY

Ascorbic acid was determined by derivative spectroscopy in some two-component pharmaceutical formulations and fruits and vegetables without using any separation techniques and reagents.

The assay procedure for ascorbic acid and acetylsalicylic acid in Aspirin Plus C tablets involves extraction of the drugs from tablets with 0.1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , filtration, appropriate dilution and measurement of the first derivative absorbance values at 258.2 and 243.4 nm for ascorbic acid and acetylsalicylic acid respectively.

The assay of Rutinal-C tablets containing ascorbic acid and rutin is based on the extraction with methanol, filtration, appropriate dilution and measurement of the first derivative absorbance values at 248.8 and 337.4 nm for ascorbic acid and rutin respectively.

For the comparison of the assay results, ascorbic acid and acetylsalicylic acid were analyzed by the official methods described in USP XXI for ascorbic acid and acetylsalicylic tablets. Rutin was analyzed spectrophotometrically by measuring its absorbance at 358.4 nm. Since a pharmacopoeial method is not available. The obtained results by these methods were statistically compared at 95% confidence level using



t and F tests, and there was no significant difference between the mean values and precisions.

Ascorbic acid determination in fruits and vegetables is based on the measurement of the distances between two extremum values (peak-to-peak values) in the derivative spectra of the extracts. Metaphosphoric acid-acetic acid ( 3% - 8% ) mixture was found to be the most suitable extraction solvent. The method was applied to orange, kiwi, cauliflower and parsley samples. For orange and cauliflower the extrema at 236 and 259 nm in the first derivative spectrum, for kiwi 259.4 and 276.2 nm in the third derivative spectrum and for parsley 227 and 237 nm in the third derivative spectrum were used. Calibration curves were constructed in 2-10  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  concentration range. Standard deviations and confidence limits at 95% confidence level were calculated for five determinations. The obtained results were statistically compared with those of the official method of AOAC using t and F tests and there was no significant difference between the mean values and precisions at 95% confidence level.

## ÖZET

Askorbik asit içeren iki komponentli farmasötik prepe-ratlarda ilaç etken maddeleri ile meyve ve sebzelerde bulu-nan askorbik asit, türev spektrofotometrisi ile hiçbir be-lirteç kullanılmadan ve herhangi bir ayırma işlemi uygulan-madan tayin edildi.

Asetilsalisilik asit ile birlikte bulunduğu Aspirin Plus C tabletlerinde askorbik asit ve asetilsalisilik asit tayini, tabletlerden 0.1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile ekstraksiyon, süzme, uygun seyreltme ve sırasıyla 258.2 nm ve 243.4 nm'deki bi-rinci türev absorbans değerlerinin ölçülmesine dayanmaktadır.

Askorbik asit ve rutin içeren Rutinal-C tabletlerde ise askorbik asit ve rutin metanol ile ekstraksiyon, süzme, uy-gun seyreltme ve sırasıyla 248.8 nm ve 337.4 nm'deki birinci türev absorbans değerlerinin ölçülmesiyle tayin edildi.

Türev spektrofotometrisi ile bulunan sonuçların kıyas-lanması amacıyla aynı tabletler, USP XXI 'de askorbik asit ve asetilsalisilik asit tabletler için önerilen yöntemlerle analiz edildi. Rutin miktar tayini için farmakopelerde bir yöntem önerilmediği için tabletlerdeki rutin miktarı 358.4 nm'deki absorbans değeri ölçülerek spektrofotometrik olarak saptandı. Elde edilen bulgular doğruluk ve presizyon yönün-den t ve F testleri yardımıyla % 95 güvenilirlik düzeyinde

istatistiksel olarak karşılaştırıldı, ortalamalar ve presizyonlar arasında anlamlı fark olmadığı görüldü.

Meyve ve sebzelerdeki askorbik asit tayini, ekstrelerin türev spektrumlarındaki iki ekstremum değeri (pik-pik değeri) arasındaki uzaklığın ölçümüne dayanmaktadır. Metafosforik asit-asetik asit (%3-%8) karışımı en uygun ekstraksiyon çözücüsü olarak saptandı. Yöntem portakal, kivi, karnabahar ve maydanoz örneklerine uygulandı. Portakal ve karnabahar için birinci derece türev spektrumunda 236 ve 259 nm' deki, kivi için üçüncü derece türev spektrumunda 259.4 ve 276.2 nm'deki, maydanoz için üçüncü derece türev spektrumunda 227 ve 237 nm' deki ekstremumlar kullanıldı. Ölçü eğrileri  $2-10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  konsantrasyon alanında hazırlandı. Standart sapmalar ve %95 güven düzeyinde güven aralıkları 5 deneme üzerinden hesaplandı. Elde edilen sonuçlar AOAC yöntemi ile elde edilenlerle t ve F testleri yardımıyla istatistiksel olarak karşılaştırıldı ve %95 güvenilirlik düzeyinde ortalamalar ve presizyonlar arasında anlamlı fark olmadığı görüldü.

## 1. GİRİŞ

Bütün canlı dokularda bulunan askorbik asit(C vitamini) vücutta bir çok kimyasal tepkimenin normal olarak yürütmesi için gereklidir. Doğada yaygın olarak bulunan bu vitaminin en zengin kaynakları taze meyve ve sebzelerdir. Dış etkenlerin bu vitaminin dokulardaki durumunu etkilemesi bireyin gereksinimini arttırmaktadır. Bu bakımdan çeşitli farmasötik preparatları halinde kullanılmaktadır.

Kullanım sahası oldukça geniş olan bu vitamin oksijen tutma özelliğine sahip olması özelliğinden dolayı yirmi yıldan beri antioksidan olarak yeglenerek kullanılmaktadır. Bundan başka besin ve içeceklere vitamince zenginleştirmek amacıyla da katılmaktadır.

Beslenme ve sağlık açısından yaşamımızda önemli bir vitamin kaynağımız olan askorbik asidin besinlerde UV-spektrofotometrik yöntem ile miktar tayininde termal bozundurma, katalitik dönüşüm, UV ısı ile bozundurma ve alkali ile muamele gibi zemin düzeltmeleri yapılmaktadır.

UV ve görünür bölge spektrofotometrisinde karışımların analizi ve zemin etkilerinin giderilmesinde karşılaşılan bazı problemler türev absorpsiyon spektrumlarından yararlanılmasına dayanan türev spektrofotometrik yöntem ile çözümlenmektedir.

Bu çalışmanın amacı türev spektrofotometrisinin askorbik asit içeren ikili ilaç karışımlarında ve ayrıca meyve ve sebzelerde askorbik asit tayinine uygulanabilirliğinin incelenmesidir.

Çalışmamızda meyve olarak en zengin askorbik asit kaynağı olan turuncgillerden portakal ve iyi bir askorbik asit deposu olduğu için ülkemizde tüketimi artmakta olan kivi, sebze olarak ise askorbik asit içeriği en fazla olan sebzeler içinde yer alan, çiğ olarak yenebilmesi nedeniyle askorbik asit kaybı olmadan tüketebileceğimiz, her yerde ve günlük olarak sağlama olanağı olan maydanoz ile gerek çiğ olarak yenebilen gerekse doğru yöntemle pişirildiğinde askorbik asit kaybının az olduğu karnabahar seçilmiştir. ilaç karışımı olarak ise ülkemizde tüketilen preparatların incelenmesi uygun görülmüştür.



## 2. GENEL BÖLÜM

### 2.1. Askorbik Asit

#### 2.1.1 Tarihçesi ve Özellikleri

Askorbik asit kimyasal olarak tanınmadan önce hastalıklarla ilişkisi bilinmekteydi. Askorbik asidin yetersizliğine bağlı skorbüt hastalığını Hipokrates M.Ö. 450 yıllarında dış etlerinin kangreni, dış kaybı ve askerlerin ayaklarında şiddetli ağrılar gibi belirtilerle tanımlamıştır. İskocyalı bir doktor olan James Lind 1753'de portakal ve limonla askerdeki skorbüt hastalığının önlediğine dair deneme ve gözlemlerini yayınlamıştır (1).

Askorbik asit üzerinde ilk bilimsel araştırmalar 1907'de Holst ve Frolich tarafından yapılan deneylerle başladı. Araştırmalarını sürdüren Holst ve Frolich birçok besin maddelerinin ve bu arada özellikle yeşil sebze ve meyvelerin skorbüt hastalığını önleyici etkileri olduğunu bulmuşlardır. C. Funk 1912'de skorbüt hastalığının besinlerde bulunan bir faktörün eksikliği sonucu olduğu düşüncesini ortaya koymuş ve bu maddeye "antiskorbutik vitamin" adını vermiştir. Daha sonra Drummond 1920'de antiskorbutik vitamin için "Vitamin C" adını kullanmıştır. Zilva ve çalışma arkadaşları (1918-29) limondan antiskorbutik faktörü yoğunlaştırma üzerinde çalışmışlar ve hemen hemen saf askorbik asit bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri belirlenerek izole edilmiş-

tir. Zilva bu çalışmaları esnasında 2,6-diklorofenol indofenolün (2,6-DCPIP) vitamin çözeltisi tarafından indirgendigini de bulmuştur (2).

Zilva deneylerini sürdürürken Szent-Gyorki 1928 yılında portakal, lahana ve hayvanların adrenal bezlerinden askorbik asidi ayırmış fakat 1932 yılına dek bu maddenin antiskorbüt vitamini olduğunu anlayamamıştır. Buluşunu yayınlamadan King (3) bu araştırmadan habersiz "heksuronik asit" ile aynı olduğunu kabul ettikleri kristal maddenin limon suyundan izolasyonunu bildirmiştir. Bundan sonra birçok bağımsız araştırmacılar özellikle Tillmans, Vedder, Nelson, Harris ve Von Vargha vitaminin kimliğini saptamışlar ve glikozdan sentezini gerçekleştirmişlerdir. "Askorbik asit" ismi Szent-Gyorki'e izafeten verilmiştir (2).

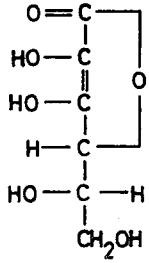
Askorbik asit ve vitamin C, L-ksiloaskorbik asidin günümüzde yaygın olarak kullanılan iki ismidir. Bununla beraber tarihsel gelişimi sırasında cevitamik asit, antiskorbutik vitamin, heksuronik asit, skorbutamin ve redoxon olarak adlandırılmıştır. Diğer kimyasal isimleri: L-askorbik asit, 3-Oxo-L-gluofuranolaktonel (enol form), L-3-ketotreoheksuronikasitlakton'dur.

Askorbik asit bir monosakkarit türevi olup yapıca glikoza ve diğer altı karbonlu monosakkaritlere benzer.

Kapalı formül:  $C_6H_8O_6$

Molekül ağırlığı:  $176.12 \text{ g.mol}^{-1}$

Açık formül:



Renksiz, beyaz, dikdörtgen kristallerdir. Çok hafif özel bir kokusu vardır. Eksi tatta ve asit reaksiyondadır.

Erime noktası: 189-192°C. 192°C'de bozunmaya uğrar.

Optikçe aktiftir. Polarize ışığı sağa çevirir.

$[\alpha]^{20}_D$  ,+23° (suda)

$[\alpha]^{25}_D$  ,+48° (metanol'de) dir.

Sudaki çözünürlüğü 33 g/100 g; etanoldeki 2 g/100 g; gliserindeki 1 g/ 100 g'dır. Asetonda çok zor çözünür. Eter, petrol eteri, benzen, kloroform ve yağlarda çözünmez (4).

UV spektrumu: Ultraviyole absorpsiyonu pH ve çözücüye bağlıdır. Asidik çözeltilerde 245 nm'de ( $\epsilon$  =11000), nötral çözeltilerde 265 nm'de ( $\epsilon$  =17000) maksimum gösterir. Metanolde 244, etanolde 245 nm'de maksimum absorpsiyon gösterir (5,6).

IR spektrumu (KBr disk ile): 3510, 3405, 3306  $\text{cm}^{-1}$  OH bandı; 1755, 1670  $\text{cm}^{-1}$ 'de C=O; 110, 1025  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-O-C bandları görülür (6,7).



### 2.1.2. Farmakolojik Etkisi

Besinlerdeki askorbik asit vücuda alındıktan birkaç saat sonra ince bağırsaktan kana emilir. 100 mg ve daha az vitamin alındığında bunun %80-90 ının emildiği belirtilmiştir. Bu esnada kandaki düzeyi kısa süre için yükselir. Kan dolaşımı ile dokulara taşınır ve fazlası böbreklerden idrarla dışarı atılır. Gereğinden fazla alınan askorbik asidin bir bölümü de monosakkaritlerde olduğu gibi karbondioksit ve suya okside olur (1).

Askorbik asidin kandaki ve idrardaki düzeyleri alınanla orantılıdır. Günlük 60-75 mg askorbik asit alanlarda serum askorbik asit düzeyi 0.75 mg/dl olarak bulunmuştur. Vitamin yetersiz alındığında kan ve idrardaki miktarlar azalır. Kan ve idrardaki vitamin miktarının azlığı dokularda yeterli miktarda askorbik asidin bulunmadığının işareti sayılır. Bu nedenle kanda ve idrardaki vitaminin düzeyi bireyin askorbik asit yönünden yeterli beslenip beslenmediğinin saptanmasında gösterge olarak alınır (8).

Askorbik asidin vücut çalışmasında birçok işlevi vardır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, askorbik asidin bağ dokularından olan kollojen sentezinde görev aldığını ortaya koymuştur (1).

Askorbik asidin kan damarlarının kuvvetli olmasında da görev yaptığı sanılmaktadır. Vitamin yetersizliğinde kan damarları zayıflamakta ve ufak darbelerle kanamalar görülebilmektedir.

Askorbik asidin vücudu enfeksiyonlardan ve bakteri toksinlerinden koruduğu yolundaki gözlemler tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Enfeksiyonlar vücut doku ve sıvılarındaki askorbik asit miktarını azaltmaktadır. Enfeksiyonlarda beyaz kan hücrelerinde askorbik asit düzeyi düştüğünden bağışıklığın zayıfladığı sanılmaktadır. Normal askorbik asit gereksiniminin karşılanması ile dokulardaki miktarın yeterli düzeyde tutulabildiği rapor edilmiştir. Bununla birlikte şiddetli enfeksiyon ve bakteri zehirlenmelerinde alınan askorbik asit miktarının arttırılması gerektiği görüşünde olanlar da vardır (9,10).

Askorbik asidin steroid hormonlarının sentezinde de görev aldığı bildirilmiştir. Askorbik asit yetersizliğinde, adrenalini bezi %270 oranında büyüme göstermektedir. Askorbik asidin efinefrin ile yara ve iltihaplanmaya karşı etkinlik gösteren steroidlerin sentezinde rolü olduğu bildirilmiştir (1).

Askorbik asit diğer bazı besin öğelerinin vücutta kullanılması için de yardımcıdır. Askorbik asidin demir, kalsiyum, B vitaminlerinden tiamin, riboflavin, folik asit, pantotenik asit, A ve E vitaminlerinin vücutta daha elverişli olarak kullanılmalarında gerekli olduğu rapor edilmiştir. Bunun yanında aşırı askorbik asit alımının bağırsaklarda asiditeyi arttırarak B<sub>12</sub> vitamininin emilimini azalttığı da bildirilmiştir (11). Askorbik asidin bu alandaki görevi oksidasyon redüksiyon olaylarındaki etkinliğindendir. Folik asidin et-

kin şekli olan tetrahidrofolik aside dönüşmesi askorbik asidin yardımı ile olmaktadır. Diğer B vitaminlerinin kullanılmasıdaki etkinliği ise bağırsak florasının olumlu yönde değişmesini ve dolayısı ile daha çok B vitamini sentezlenmesini sağlamasındandır (1).

Askorbik asit bazı toksik ögelerin etkisini azaltmaktadır. Örneğin vücuda alınan nitritlerin kanser yapıcı nitrozoma dönüşümünü önlemektedir (12).

Askorbik asidin hücre çalışmasında rolü olan birçok öge ile ilişkisi olmasına karşın bu ilişkilerden birçoğunun gerçek mekanizması henüz yeterince açıklanamamıştır. Bununla birlikte askorbik asidin vücut çalışmasında çok yönlü ve önemli görevleri olduğu kesin olarak bilinmektedir.

Askorbik asit yan etkileri oldukça az olan bir ilaç maddesidir. Fazla miktarda alındığında diyare ve karın ağrısı yapabilir. Yüksek dozda askorbik asit ile tedavi gören gebelerden doğan bebeklerde skorbüt oluşmasının kolaylaştığı saptanmıştır (13).

#### 2.1.3. Kaynakları ve Kullanım Alanları

Askorbik asit bütün canlı dokularda bulunur. Doğada çok yaygın şekilde bulunan bu vitaminin en zengin kaynaklarını taze meyve ve sebzeler oluşturur. Meyveler arasında en çok askorbik asit içerenler; limon, portakal, greyfurt, kivi, ananas, çilek ve frenk üzümüdür. Elma, armut ve erik ise bun-

lara göre daha az miktarda askorbik asit içerir. Bu meyvelerden özellikle citrus meyveleri (limon, portakal, greyfurt), kivi ve domatesin dış kısımları (kabuk) askorbik asit bakımından zengindirler.

Sebzeler, özellikle kışburnu, karnabahar, lahana, ıspanak, kurusoğan, biber, turp, tere, maydanoz ve yer elması askorbik asit bakımından en zengin kaynaklardandır(8,14,15). Tablo 1'de çeşitli sebze ve meyvelerin askorbik asit değerleri görülmektedir.

Sebze ve meyvelerin askorbik asit değeri türüne, yetiştiği toprağa, iklime ve olgunluk derecesine göre değişir. Genellikle ham meyve ve sebze iyice olgunlaşmışından daha çok askorbik asit içerir. Yine güneş ışığından çok yararlanan bitkilerin askorbik asit değerleri az olanlardan daha yüksektir.

Dokularda askorbik asidi üst düzeyde tutmak için günlük alınması gereken miktarı The National Research Council 75-100 mg, The League of Nations Technical Commission on Nutrition (1938) ve The British Medical Research Council (1948) 30 mg, Food and Nutrition Board U.S.A 60 mg (16) olarak bildirmişlerdir.

Pauling 1970 yılında yayınladığı araştırmasında günlük miktarın 2-3 g olması gerektiğini ileri sürmektedir (17). İngiltere'de yapılan çalışmalar yetişkinler için günlük alınması gereken miktarın 30 mg, USSR'de yapılan çalışmalar ise

Tablo 1: Çeşitli sebze ve meyvelerde askorbik asit miktarları (1,18).

| Sebze - Meyve     | Askorbik asit<br>(g/100 g) |
|-------------------|----------------------------|
| Maydanoz          | 0.18                       |
| Salgam yaprağı    | 0.13                       |
| Asma yaprağı      | 0.12                       |
| Yeşil sivri biber | 0.10                       |
| Kara lahana       | 0.094                      |
| Karnabahar        | 0.080                      |
| Ispanak           | 0.050                      |
| Çilek             | 0.070                      |
| Portakal          | 0.050                      |
| Limon             | 0.050                      |
| Lahana            | 0.043                      |
| Greyfurt          | 0.043                      |
| Mandalina         | 0.030                      |
| Seftali           | 0.028                      |
| Domates           | 0.023                      |
| Taze fasulye      | 0.020                      |
| Patates           | 0.016                      |
| Böğürtlen         | 0.020                      |
| Ahududu           | 0.022                      |
| Kızılcık          | 0.055                      |
| Kuşburnu          | 0.45                       |
| Kivi              | 0.090                      |

[\*] Verilen rakamlar çeşitli türlerin ortalamasıdır.

bu miktarın 70-100 mg olduğunu göstermiştir (16). Günlük askorbik asit gereksinimi olarak çeşitli kaynaklar tarafından önerilen miktarlar arasında farklılıklar vardır. Bunun sebebi askorbik asit ihtiyacımızın ampirik esaslara dayandığıdır. Günlük askorbik asit gereksinimi yaş ve cinse bağlı olarak da değişmektedir (Tablo 2).

Askorbik asidin vücutta birçok kimyasal tepkimenin normal olarak yürümesi için gerekli oluşu, dış etkenlerin bu vitaminin dokulardaki durumunu etkilemesi bireyin gereksini-

Tablo 2: Yaşa ve cinse göre günlük askorbik asit ihtiyaçları (16) (National Research Council)

| Cins        | Yaş                  | Günlük ihtiyaç (mg) |
|-------------|----------------------|---------------------|
| Çocuk       | 1 yaşın altında      | 30                  |
|             | 1 - 3                | 35                  |
|             | 4 - 6                | 50                  |
|             | 7 - 9                | 60                  |
|             | 10 - 12              | 75                  |
| Kız çocuk   | 13 - 20              | 80                  |
| Erkek çocuk | 13 - 15              | 90                  |
|             | 16 - 20              | 100                 |
| Erkek       |                      | 75                  |
| Kadın       | Orta derecede aktif  | 70                  |
|             | Hamile, ikinci dönem | 100                 |
|             | Laktasyon dönemi     | 150                 |

mini arttırmaktadır. Askorbik asidin dokularda doymuş düzeyde bulunması gebelik, emziklilik, zehirlenme, bakteri toksinleri veya enfeksiyonları, soğuk, yaralanma, hırpalanmalar gibi streslere karşı konulması için önemlidir. Ayrıca sporcuların normalden daha fazla askorbik aside ihtiyaçları olduğu bildirilmiştir (19). Aynı şekilde yanık ve ameliyatlarda günlük gereksinimin arttırılması gerekir. Ağızdan doğum kontrol hapları alınması, hamilelik, sigara içilmesi gibi durumlarda da gereksinim artabilmektedir (16).

Askorbik asidin yetersizliği başladığında idrar ve kandaki askorbik asit miktarı azalmaktadır. Radyoizotopla yetişkinler üzerinde yapılan denemelerde, normal askorbik asit alımında vücut dokularında ortalama 1500 mg kadar askorbik asit bulunmaktadır (20). Askorbik asitsiz bir diyet alınmaya başlandıktan sonra bu miktar günlük %2.6'lık bir hızla azalarak 84-97 gün sonra 300 mg'a kadar inmektedir. Bu düzeyde idrarda askorbik asit görülmemekte, kan plazmasındaki miktar 0.3 mg/100 ml'ye inmektedir. Bu durumda askorbik asit eksikliğine bağlı klinik belirtiler görülmeye başlamaktadır. Klinik belirtilerin hafif şekilleri yorgunluk, iştah azalması, yaraların iyileşmesindeki gecikme ve isteksizliktir. Yetersizlik arttıkça klinik belirtiler ağırlaşmakta ve sırası ile büyümede duraklama, anemi, enfeksiyonlara karşı dirençin azalması, diş etlerinin şişmesi ve kanaması, diş kaybı, eklemlerde şişmeler, ateş, kanamalar ve kemiklerde kırılmalarla, belirlenen skorbüt hastalığı görülmektedir (8,21).

Ülkemizde özellikle kırsal bölgelerde kış aylarında askorbik asit kaynaklarından yeterince yararlanamayanlarda skorbütün hafif ve orta derecedeki belirtileri görülür. Bu belirtilere askerlerde ve yatılı okullardaki çocuklarda da rastlanmaktadır (1,22).

Askorbik asit birçok preperatlarında, besin ve içeceklerin vitamince zenginleştirilmesinde kullanılır.

Askorbik asit oksijen tutma özelliğine sahip olması özelliğinden dolayı antioksidan olarak kullanılır. Yağların ve yağlı besinlerin uzun süre saklanabilmesi, beyaz renkteki sebze ve meyvelerin kararmasının önlenmesi için kullanılır (23). Ayrıca çabuk soğutulmuş dondurulmuş meyveler erime sırasında doğal renk ve kokularını yitirirler. Bunlara dondurmadan önce saf askorbik asit katmakla bu sakıncalar önlenmektedir (16,24). Oksijen hoşa gitmeyen değişiklikleri yapmadan önce askorbik asit tarafından tutulur. Bu şekilde dondurulmuş kayısı, şeftali, elma, üzüm, muz, armut, ananas gibi meyvelerde 20 yıldan beri askorbik asit antioksidan olarak yeğlenerek kullanılmaktadır.

#### 2.1.4. Tanınma Yöntemleri

Askorbik asidin tanınması ilk olarak 1927'de Tillmans tarafından 2,6-DCPIP ile yapılmıştır (25). Sonraki çalışmalarda çeşitli belirteçlerle renkli türevler oluşturduğu saptanmıştır. Bunlardan bazıları Tablo 3'de toplu halde verilmiştir (6,26,27). Askorbik asidin tanınması için USP XIX (28).



Tablo 3: Askorbik asidin tanınmasında kullanılan belirteçler

| Belirtec | Tillmans | Emmerie<br>-Engel | Benedict | Nessler | Palladyum<br>klorür | Fosfo<br>molibdik<br>asit |
|----------|----------|-------------------|----------|---------|---------------------|---------------------------|
| Renk     | Pembe    | Kırmızı<br>-kahve | Kırmızı  | Siyah   | Siyah               | Mavi<br>-gri              |
| KaynakNo | 25       | 26                | 6        | 6       | 6                   | 27                        |

USP XX (29) ve USP XXI 'de (30) tablet ve enjektabl çözelti-  
lerde alkali bakır tartarat, pirol ve metilen mavisi ile  
BP 1973'de(31) Tillmans belirteci ve gümüş nitrat ile reak-  
siyonu, BP 1980'de (32) ultraviyole spektrumu ve gümüş nit-  
rat ile reaksiyonu BP 1988'de (33) infrared ve ultraviyole  
spektrumları ile ve gümüş nitrat ile reaksiyonu önerilmiştir.

Askorbik asidin tanınma ve miktar tayini yöntemleri  
çoklukla yüksek indirgeme yeteneğine dayanır. Bu yöntemlerde  
bir metal iyonunun redüksiyonu ile kararlı bir renkli çözeli-  
ti oluşumu [potasyum ferrisiyanür (34), ferri trikloroasetat  
(35)] veya metal iyonunun askorbik asit tarafından redüksiy-  
yonu ve kelat yapıcı bir bileşik ilavesiyle renkli bir komp-  
leks oluşumu söz konusudur.En çok kullanılan metal iyonu  $Fe^{3+}$   
olup,  $Fe^{3+}$  'ün askorbik asit tarafından  $Fe^{2+}$  'ye indirgenme-

si,  $Fe^{2+}$  'nın  $\alpha,\alpha'$ -dipiridin (36), ferrozin (37), dimetilglioksim (38) ve 1,10-fenantrolin (39) ile renkli kompleks oluşturmasından yararlanılmıştır. Aynı amaçla kullanılan bir başka metal iyonu  $Cu^{2+}$  'dır ve bunun indirgenmesiyle oluşan  $Cu^{1+}$  neokuproin (40) ve 2,2'-biskinoln (41) ile renkli ke-lat kompleksleri vermektedir.

Tanınma iwin turevleendirme reaksiyonları da kullanılmıştır. Bu alanda ilk çalışmalar Schmall ve arkadaşları (42,43) tarafından askorbik asidin diazolanmış 4-metoksi-2-nitroanilin ile oluşturduğu mavi renkli urunden yararlanarak yapılmıştır. Sonraları diazolanmış p-aminobenzoik asit (44), diazolanmış p-nitroanilin (45) redoks turev belirtici olarak kullanılmıştır.

Askorbik asidin tanınmasında ince tabaka kromatografisi (45) ve gaz kromatografi-kutle spektrometrisi (46) yöntemleri de kullanılmıştır.

#### 2.1.5. Miktar Tayini Yöntemleri

Askorbik asit analizinde ilk kez kullanılan ve standart redoks belirtici olan 2,6-DCPIP ile askorbik asit arasındaki reaksiyonun stokiometrisi ilk olarak Tillmans(25) tarafından verilmiş ve 1932 de Tillmans ve çalışma grubu (47) askorbik asidin kantitatif analizini aynı belirtici kullanarak gerçekleştirmiştir. Çeşitli materyalde askorbik asit tayininde bu belirteç birçok araştırmacı tarafından kullanılmıştır. Andryushchenko ve arkadaşları (48) domates suyunda, Röhle

ve Voight (49) sitrus konsantre ve meyve sularında direkt titrasyon yöntemiyle askorbik asit tayininde 2,6-DCPIP'ü kullanmıştır. Chatterjee ve çalışma grubu (50) yöntemi modifiye ederek farmasötik preparatlara uygulamışlardır. Titrimetrik analizlerde kullanılan diğer bir belirteç kloramin-T olup askorbik asit tayini nişasta-potasyum iyodür veya metilkırmızısı-potasyum bromür varlığında yapılmıştır (51). Yöntem Silva (52) tarafından farmasötik preparatlara, meyve sularına ve bitkilere uygulanmıştır. Lazaro ve grubu (53) aynı belirteç ile simultane askorbik asit ve sülfite tayinini gerçekleştirmişler. Vitamin preparatlarında askorbik asit tayini ferroin, tiyazin veya trifenilmetan boyaları indikatörlüğünde potasyum ferrisiyanür ile titre edilerek yapılmıştır (54). Yöntem modifiye edilerek meyve suları ve konsantrelerine uygulanmıştır (55).

Literatürde seryum amonyum sülfat (56), seryum sülfat (57), N-klorosüksinimid (58), iyot monoklorür (59,60) ile titrasyonlarına da rastlanmıştır.

Farmasötik preparatlarda askorbik asit tayini için USP XIX (28), USP XX (29) ve USP XXI (30)'de 2,6-DCPIP ile, BP 1973 (31), BP 1980 (32) ve BP 1988 (33)'de iyot ile, meyve ve sebzelerdeki tayini için ise AOAC (61)'de 2,6-DCPIP ile titrasyon önerilmektedir.

Askorbik asidin gerek ultraviyole gerekse görünür bölgedeki spektrofotometrik tayinleri aşağıdaki şekilde özetle-

nebilir: Baczyk ve Swidzinska (62) farmasötik preperatlarda 265 nm'deki absorbans değerinin doğrudan ölçümü ile askorbik asit miktar tayinini yapmışlardır. Fung ve Luk (63) alkolsüz içeceklerde ve meyve sularında direkt ultraviyole spektrofotometrik ölçümleri termal bozundurma, katalitik dönüşüm, ultraviyole ışın ile bozundurma ve alkali ile muamele gibi zemin düzeltmeleri yaptıktan sonra yapmışlardır. Yapılan çalışmalarda alkali ile muamelenin en iyi yöntem olduğunu saptayarak bu ortamda askorbik asidin direkt ölçümünü gerçekleştirmişlerdir. A ve E vitaminleri ile birlikte bulunduğu preperatlarda askorbik asit su ile ekstre edilerek 265 nm'deki absorbansı ölçülmüştür (64). Lau ve çalışma grubu (65) farmasötik preperatlarda askorbik asit tayininde askorbik asidin  $Cu^{2+}$  ile oda temperaturünde ve pH=6'da katalitik oksidasyonu ve 267 nm'de absorbansının ölçümünden faydalanmışlardır. Peng ve Shi (66) üzüm sularında askorbik asit tayininde örnekleri pH=6'da  $Cu^{2+}$  ve EDTA çözeltisi ile reaksiyona sokarak elde ettikleri çözeltinin 267 nm'deki absorbans değerini ölçmüşlerdir.

Türev spektrofotometrisi ile yapılan miktar tayini çalışmalarında El Sadek ve çalışma grubu (67) askorbik asit-analgin içeren karışım preperatlarda her iki ilaç maddesinin kantitatif tayinini 1.derece türev spektrumlarından faydalananarak gerçekleştirmişlerdir. Lage ve çalışma arkadaşları (68) ise 2.derece türev spektrofotometrisi ile limon ve ıspanakta askorbik asit tayininde ekstraksiyonu oksalik asit

cözeltilisi ile yapmışlar ve zemin etkisini gidermek amacıyla bu örneklerin oksalik asit ile maserasyonundan elde ettikleri cözeltiliyi bir saat süreyle UV ışına tutarak askorbik asidi bozundurup, ölçü egrisinin oluşturulması sırasında standart askorbik asit cözeltililerini bu cözeltili içinde hazırlamışlardır. Ayrıca metallerin girişim etkisini önlemek için cözeltiliye potasyum siyanür ilave etmişlerdir.

Görünür bölgedeki spektrofotometrik tayinlerin çoğu Tillmans tarafından 2,6-DCPIP'ün bulunmasından sonra bu belirtec ile yapılmıştır. Yöntemler 2,6-DCPIP'ün askorbik asit ile verdiği pembe renkli kompleksin 520-540 nm'deki absorbansının ölçümüne dayanmaktadır (69). Çeşitli modifikasyonlarla geliştirilmiş olan yöntem günümüzde hâlâ kullanılmaktadır. Hoffman (70) modifiye ettiği yöntemi portakal ve meyve sularına, Egberg ve arkadaşları (71) bekletilmiş hububat ve mesrubatlara, Rosenfeld (72) ise yöntemi renkli bileşenler içeren bitkilere, bitkilerin amil asetat ile ekstraksiyonundan sonra uygulamıştır. Andrews (73) üzüm suyunda askorbik asit tayininde pH=4 asetat tamponlu cözeltide 2,6-DCPIP ile oluşan pembe renkli kompleksin kloroform fazına ekstraksiyonundan sonra bu cözeltilinin 500 nm' deki absorbansının ölçülmesinden faydalanmıştır.

Görünür bölgede yapılan birçok çalışmada askorbik asidin yüksek indirgeme özelliğinden yararlanılmıştır. Çalışmalar askorbik asidin bir metal iyonu tarafından yükseltgenmesine ve indirgenen metal iyonuna kelat yapıcı bir bileşik

ilavesiyle oluşan renkli komplekslerinin absorbans değerinin ölçülmesine dayanmaktadır. En çok kullanılan metal iyonu  $Fe^{3+}$  'dır. Jaselskis ve Nelapaty (37) askorbik asidin  $Fe^{3+}$  'ü indirgemesinde oluşan  $Fe^{2+}$  iyonunun ferrozin ile oluşturduğu kelatın 562 nm'de absorbansının ölçülmesine dayanan yöntemi sitrus meyvelerine uygulamıştır. Yöntem modifiye edilerek Butts ve Mulvihill (74) tarafından serum ve idrara uygulanmıştır. Al-Zamil ve çalışma grubu (38) da aynı prensibe dayanarak  $Fe^{2+}$  'nin dimetilglioksim ile verdiği kararlı  $Fe^{2+}$ -bisdimetilglioksim kompleksinin kantitatif tayini ile askorbik asidin miktar tayinini gerçekleştirmişlerdir.  $Fe^{2+}$  ile metal-kelat kompleksi oluşturan bir diğer kompleks bileşik olan 1,10-fenantrolin, kuru meyve suları ve alkolsüz içeceklerde askorbik asit tayininde kullanılmıştır (75). Besada (76) farmasötik preparatlarda askorbik asidin tayinini  $Fe^{3+}$  ve 1,10-fenantrolin karışımı ile reaksiyonu sonucu oluşan kelat kompleksinin 510 nm'deki absorbansının ölçülmesiyle gerçekleştirmiştir. Buhl ve Mikula (77) askorbik asidi  $Fe^{3+}$  ile oksitleyerek oluşan  $Fe^{2+}$  'nın 1,10-fenantrolin, 2,2-dipiridin veya bathofenantrolin ile oluşturduğu kompleksi sulfoftalein boyası ile birleştirerek kloroform fazına ekstre ettikten sonra 620 nm'deki absorbansını ölçmüşler, yöntemi meyve sularına uygulamışlardır. Anvar ve arkadaşları (78) çeşitli materyaldeki düşük miktarda askorbik asit tayininde 1,10-fenantrolini kullanmışlardır.

Oksitleyici olarak çok kullanılan diğer bir metal iyonu

$\text{Cu}^{2+}$  'dir. Shieh ve Sweet (41),  $\text{Cu(II)-2,2'}$ -biskinolin çözeltisiyle askorbik asit arasındaki redoks reaksiyonu sonucu oluşan menekşe renkli  $\text{Cu(I)-2,2'}$ -biskinolin kompleksinin 540 nm'deki absorbansını ölçerek farmasötik preparatlarda askorbik asit tayinini yapmışlardır. Baker ve Lowe (40) farmasötik preparatlarda ve meyve sularında askorbik asit tayini için geliştirdikleri yöntemde  $\text{Cu}^{2+}$  'nin askorbik asit tarafından  $\text{Cu}^{+}$  'e indirgenmesi ve  $\text{Cu}^{+}$  'in neokuproin ile reaksiyonu sonucu oluşan ürünün 450 nm'deki absorbansını ölçmüşlerdir.

Barbas Pardillo ve çalışma grubu (79) ise farmasötik preparatlarda askorbik asit tayininde propilenglikol-su'lu ortamda oluşturdıkları kararlı  $\text{Cu(II)-nioksim-askorbik}$  asit üçlü kompleksinin absorbansını ölçmüşlerdir.

Amonyum molibdat, askorbik asidin kalitatif(80) ve kantitatif tayinlerinde kullanılan kompleks teşkil edici bir bileşiktir. Elnenaey ve Soliman (81) farmasötik preparatlarda ve plazmada askorbik asit tayinini amonyum molibdat ile verdiği mavi renkli kompleksin 760 nm'deki absorbansının ölçülmesiyle gerçekleştirmiştir. Bajaj ve Kaur (82) girişimleri minimuma indirecek şekilde yöntemi modifiye ederek sebze ve meyvelere uygulamışlardır. Thind ve Kumar (83) sitrus meyve suları, tablet ve toniklerde askorbik asidin amonyum molibdat ile oluşturduğu kompleksin kaynar suda beş dakika beklendikten sonra 730 nm'deki absorbansını ölçerek 4-60  $\mu\text{g}$  askorbik asidin kantitatif tayinini yapmışlardır. Emel'yanenko

(84) askorbik asit-riboflavin içeren göz damlalarında, Homann ve çalışma grubu (85) fenilbütazon ve askorbik asit içeren supozituarlarda askorbik asit tayininde aynı belirteçden yararlanmışlardır. Li ve çalışma grubu (86) ise meşrubat ve pastada askorbik asidi sitrat içeren EDTA çözeltisi ile ekstre ederek molibdik asit ile oluşturduğu mavi renkli kompleksin 760 nm'deki absorbandsının ölçülmesiyle tayin etmişlerdir.

Askorbik asidin kalitatif ve kantitatif tayininde kullanılan diğer bir belirteç metilen mavisidir. White ve Fitzgerald (87) tabletlerde ve meyve sularında askorbik asit tayininde metilen mavisini kullanmışlardır. Modifiye edilerek Frigola Canoves ve Bosch Serrat (88) tarafından portakal, limon ve sebzelere uygulanan yöntem; askorbik asidin metilen mavisini indirgemesi, boyanın renksiz şeklinin kloroforma ekstraksiyonu ve dihidro türevinin metilen mavisine geri oksidasyonu ile oluşan ürünün 653 nm'deki absorbandsının ölçümüne dayanmaktadır.

Al-Tamrah (89) askorbik asidi potasyum hekzasiyanoferrat veya potasyum periyodat ile okside etmiş ve oksidanın fazlasını alkali ortamda ftalofenonun fenolftaleine oksidasyonu ile oluşan renkli ürünün 553 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle saptamıştır. Yöntem ile farmasötik preparatlarda 0-7  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  askorbik asit miktarı ölçülebilmektedir.

Çeşitli materyalde askorbik asidin kantitatif tayini için dimetoksidikinon (90,91), diazolanmış p-aminobenzoik



asit (44), diazolanmış 4-metoksi-2-nitroanilin (42,43), diazolanmış p-nitroanilin (45), 3-metil-2-benzotiyazolon hidrazon (92,93), fosfovanadotungstik asit (94), 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (95) gibi kenetleyici, kompleks ve kelat teşkil edici bileşikler kullanılarak birçok yöntem geliştirilmiştir.

Sweeley ve çalışma grubu (96) askorbik asidin ilk gaz kromatografik analizini trimetilsilileter ile türevlendirerek gerçekleştirmişlerdir. Askorbik asidin türevlendirilmesi reaksiyonu geliştirilerek yöntem çeşitli materyale uygulanmıştır (97,98). Schlack (99) yiyecek ve farmasötik preperatlarda askorbik asidi kurşun tuzu halinde çöktürdükten sonra türevlendirip alev iyonizasyon dedektörü kullanarak ölçmüştür. Vecchi ve Kaiser (100) askorbik asidin silil türevlerini gaz kromatografisi ile karakterize edip oluşan tetrametil-silileter türevlerini kütle spektrometresi ile ölçmüştür. Gerstl ve Ranfft (101) yiyeceklerde askorbik asidi, metafosforik asit ile ekstre ederek, yapılarındaki selülozu kolon kromatografisi ile temizlemişler ve askorbik asit içeren fraksiyonları buharlaştırdıktan sonra bis-trimetilsililasetamid ile sililleyerek gaz kromatografisi ile kantitatif tayinini yapmışlardır.

Literatürde askorbik asidin dansitometrik miktar tayini çalışmalarına da rastlanmıştır. Papadoyannis ve Kouimtzis (102) farmasötik preperatlarda, silikajel G plaklarda solvent olarak aseton-metanol-benzen (1:2:8) kullanarak ayrılan

fluoresans lekelerin 439 nm'de direkt dansitometrik ölçümüyle askorbik asit tayinini yapmışlardır. Hoppe ve arkadaşları (103) sütte, askorbik asidin silikajel plaklarda ayrıldıktan sonra 470 nm' de dansitometrik ölçümünü yapmışlardır. Jarzebinski ve Lugowska (104) çok komponentli farmasötik preperatlarda, Kieselgel 60 plaklarda mobil faz olarak kloroform-%95 lik etanol-eter (1:1:2) kullanarak ayrılan askorbik asidi dansitometrik olarak ölçmüşlerdir. Ni ve çalışma grubu (105) multivitamin preperatlarda suda çözünen vitaminleri silikajel HF<sub>254</sub> plaklarda kloroform - etanol - asetik asit-su (54:27:9:4) ile ayırmış ve 250 nm'de reflaktans dansitometre ile ölçerek askorbik asit tayinini gerçekleştirmiştir. El-Sadek ve çalışma grubu (106) analjezik karışımlarında askorbik asit tayininde ayırmayı yüksek işlevli ince tabaka kromatografisi (HPTLC) ile gerçekleştirdikten sonra dansitometrik ölçmeler yapmışlardır. Mandrou ve grubu (107) ise şarap ve meyve sularında askorbik asit ve dehidroaskorbik asit tayini için bu maddeleri 2,4-dinitrofenil hidrazin ile ozason türevlerine dönüştürdükten sonra ince tabakada ayırıp 494 nm'de dansitometrik ölçümler yapmışlardır.

Sıvı kromatografisi yöntemi askorbik asit analizlerinde geniş ölçüde kullanılmıştır. Multivitamin preperatlarda, meyve sularında, süt ürünlerinde (108) serum ve plazmada (109) yapılan askorbik asit tayinlerinde amperometrik dedektör kullanılmıştır. Portakal suyu, plazma, idrar, karaciger ve beyin dokularında askorbik asit tayinini Tsao ve Salimi

(110) iyon çifti sıvı kromatografisi (elektrokimyasal dedektör) ile yapmışlardır. Askorbik asidin iyon değiştirme kromatografisi ile ayrıldıktan sonra kantitatif tayini ultraviyole dedektörle de yapılmıştır. Sood ve arkadaşları (111) ilk olarak iyon çifti sıvı kromatografisi yöntemini yiyecek ve multivitamin preparatlarında askorbik asit tayininde kullanmışlar ve kantitatif ölçümleri 254 nm'de yapmışlardır. Daha sonra yöntem vitamin mineral içeren farmasötik preparatlara uygulanmış ve rutin analizlerde kullanılmıştır (112). Ashoor ve çalışma grubunun (113) geliştirdikleri yöntemde yiyeceklerde ve biyolojik sıvılarda EDTA'nın sülfürik asitteki çözeltisi ile ekstraksiyondan ve süzme işleminden sonra süzüntüden küçük bir porsiyon Aminex HPX-87 LC kolon içeren sıvı kromatografa enjekte edilmiş ve 245 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. Maeda ve arkadaşları (114) sekerleme ve alkolsüz içeceklerde örnekleri Sek-Pak C<sub>18</sub> kartus ile temizledikten sonra ODS kolonda mobil faz olarak fosforik asit kullanarak ve ters faz ayrılma tekniği ile ayırarak askorbik asidin 245 nm'deki absorbansını ölçmek suretiyle miktar tayinini yapmışlardır. Carnevale (115) sitrus meyve sularında askorbik asit tayini için  $\mu$ -Bondapak/CN kolon ve asetik asit-metanol (9:1) mobil faz kullanarak 245 nm'de ölçüm yapmıştır. Augustin ve arkadaşları (116) patates ve patates ürünlerinde ters faz iyon çifti sıvı kromatografisinde  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> kolon, tridesil amonyum format ve metanol-su içeren mobil faz kullanarak askorbik asit tayinini gerçekleştirmişlerdir. Lookhart ve grubu (117) un, hamur ve tab-

letlerde askorbik asit tayinini  $\mu$ -Bondapak karbohidrat kolonda sodyum dihidrojenfosfat ve metanol ile elue ederek ve 254 nm'deki absorbensini ölçerek yapmışlardır. Lloyd ve grubu (118) portakal, limon ve greyfurt sularında PLRP-S kolonda sodyum dihidrojenfosfat ile elue ederek ve 220 nm'de ölçüm yaparak HPLC yöntem ile askorbik asidin kantitatif tayinini yapmışlardır. Bushway ve grubu (119) ise askorbik asit analizini örnekleri pH=2 fosfat tamponu ile homojenize edip %3 lük metafosforik asit ile ekstre ederek mobil faz olarak tetrahidrofuran ve metafosforik asit kullanarak (RLRP-S) C<sub>18</sub> polimer kolonda ayırmış ve 244 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapmışlardır. Yöntemi çeşitli meyve, sebze ve meyve sularına uygulamışlardır. Amin ve Reusch (120) UV dedektör kullandıkları çalışmalarında multivitamin preperatlardan askorbik asidi metanol-su (80:20), plazmadan aseton-metanol (1:1) ile ekstre ederek ayırmayı Li Chrosorb RP 18 kolonda yapmışlardır. Huang ve Kissinger (121) biyolojik sıvılarda ve yiyeceklerde aynı anda askorbik asit ve dehidroaskorbik asidin tayinini ultraviyole ve elektrokimyasal dedektör kullanarak sıvı kromatografisi ile gerçekleştirmişlerdir. Thomas ve çalışma grubu (122) askorbik asit-asetaminofen-asetilsalisilik asit içeren karışım farmasötiklerde C<sub>8</sub> ters faz kolonda mobil faz olarak metanol-fosfat tampon (pH=3.5)-su (20:10:70) kullanarak HPLC yöntem ile askorbik asidi tayin etmişlerdir.

Literatürde elektrometrik yöntemlerle askorbik asidin

kantitatif tayini çalışmalarına bakılırsa; yiyeceklerde askorbik asit analizinde bulanık ve renkli çözeltilerde 2,6-DCPIP ile titrasyon yöntemi kullanılamadığından Navarini ve Zucker (123) titrasyonu potansiyometrik olarak yapmışlardır. Song ve Han (124) lahanası, marul, havuç, yeşil biber, portakal ve elmada askorbik asit tayinini 2,6-DCPIP ile titre ederek potansiyometrik olarak yapmışlardır. Skuridin (125) ise deniz kestanesinde askorbik asidi potasyum ferro-siyanür ile oksitleyerek ekivalent noktayı platin ve gümüş klorür elektrod ile potansiyometrik olarak saptamışlardır. Parczewski (126) askorbik asit-asetilsalisilik asit içeren farmasötik preparatlarda askorbik asit tayininde tabletlere  $Fe^{3+}$  tuzu ilave ederek indirgenmemiş  $Fe^{3+}$  iyonlarının EDTA çözeltisi ile potansiyometrik titrasyonundan yararlanmıştır. Askorbik asit-analgin-penisilamin içeren karışımların potansiyometrik titrasyonunda Rizk ve Zakhari (127) yeni bir oksidimetrik titrant olan 2,3-dikloro-5,6-disiyano-1,4-benzokinon'u kullanmışlardır.

İyon seçici elektrod kullanılarak yapılan direkt potansiyometrik ölçümlerde, Calokerinos ve Hadjiioannou (128) tabletlere askorbik asidi iyodür seçici elektrod kullanarak ve potasyum iyodat ile titre ederek tayin etmişlerdir. Zaki ve Abdel Rehiem (129) farmasötik preparatlarda askorbik asidi kloroformdaki iyod çözeltisi ile oksitleyerek sulu fazda oluşan iyodür iyonlarını iyon seçici elektrod kullanarak ölçmüşlerdir. Halvatzis ve Timotheou-Potamia (130) ise far-

masötik preperatlarda askorbik asidin N-bromosüksinimid ile reaksiyonu sonucu oluşan bromür iyonlarının bromür seçici elektrod ile ölçülmesiyle gerçekleştirmişlerdir.

Farmasötik preperatlar ve besinlerde askorbik asit tayininde amperometrik titrasyon yönteminden yararlanılmıştır. Bu çalışmalarda potasyum iyodat (131), 2,6-DCPIP (132), dikloramin-T (133), potasyum peroksimonosülfat (134),  $I_2Cl$  (135) gibi çeşitli titrantlar kullanılmıştır.

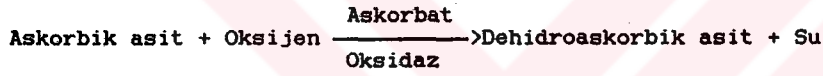
Literatürde elma ve ıspanakta elektrolitik olarak üretilen talyum(III) (136), yiyecek ve farmasötiklerde oktasianomolibdat (137), farmasötiklerde L-askorbat oksidaz (138) ile kulometrik ve çeşitli materyalde iyodometrik-kulometrik titrasyon (139-142) yöntemi ile askorbik asit tayini çalışmalarına rastlanmıştır.

Meyve suları ve kinin içeren içeceklerde (143), sebze ve meyvelerde (144) farmasötik preperatlar ve meyve sularında (145) sitrus meyve suları, çilek, kuşüzümü ve ahudududa (146) diferansiyel puls polarografi yöntemi ile askorbik asit tayini yapılmıştır.

Lindquist (147), Soderhjelm ve Lindquist (148) taze meyve, sebze, multivitamin preperatlar ve içeceklerde askorbik asit tayininde doğrusal tarama voltametrik yöntemi kullanmışlardır. Ballantine ve Woolfson (149) multivitamin preperatlarda, Lau ve çalışma grubu (150) askorbik asit-kafeinasetaminofen içeren preperatlarda diferansiyel puls vol-

tametrik, Falat ve Cheng (151) askorbik asit-dopamin içeren tabletlerde voltametrik yöntem ile askorbik asit tayinini gerçekleştirmişlerdir.

Enzimatik yöntemlerle yapılan askorbik asit tayinlerinde ölçümler spektrofotometrik ve elektrokimyasal yöntemlerle yapılmıştır. Tono ve Fujita (152) portakal ve domates sularında askorbik asit tayinini askorbik asidin absorbansının 243 nm'de askorbat oksidaz ile oksidasyonundan önce ve sonra ölçülmesiyle gerçekleştirmişlerdir. Liu ve çalışma grubu (153) yöntemi modifiye ederek serum ve plazma, Park ve arkadaşları (154) ise salatalık örneklerine uygulamışlardır. Casella ve çalışma grubu (155) meyve ve sebzelerde hidrojen peroksit varlığında pH=5.3'de peroksidaz ve 1,4-diaminobenzen kullanarak oluşan renkli ürünün 320 nm'de absorbansını ölçerek askorbik asit tayinini gerçekleştirmiştir. Birçok araştırmacı,



reaksiyonu sırasında oksijen tüketimini kontrol etmek için elektrokimyasal yöntemler kullanmışlardır. Marchesini ve çalışma grubu (156) bu reaksiyondaki oksijen tüketiminin kontrol edilmesi amacıyla Clarke elektrodu kullanmışlardır. Schindler ve Schael (157) oksijen tüketim hızını oksijene duyarlı elektrod ile ölçerek biyolojik sıvılarda askorbik asit tayinini yapmışlardır. Posadka ve Macholan (158) Clarke elek-

trodu çözünmeyen askorbat oksidaz ile ince tabaka halinde kaplayarak yöntemi geliştirmişlerdir. Daha sonraki çalışmalarda askorbat oksidaz bir kolaj üzerinde sabitleştirip Clarke elektroda monte edilmiştir (159). Yiyeceklerde askorbik asit tayininde Esaka ve arkadaşları (160) mobilize edilmiş askorbat oksidazdan faydalanarak reaksiyon için optimum şartları saptamışlardır. Yöntem daha sonra Lin ve Kuo (161) tarafından geliştirilmiştir. Morisaka ve çalışma grubu (162) yiyecek ve içeceklerde askorbik asit tayinini askorbat oksidaz kullanarak HPLC yöntemiyle yapmışlardır.

## **2.2. Asetilsalisilik Asidin Karışımlardaki Miktar Tayini**

### **Yöntemleri**

Karışım preperatlarda asetilsalisilik asidin miktar tayini değişik metodlarla yapılmıştır. Bu metodlar arasında yüksek basınçlı sıvı kromatografik (HPLC) (163-166), spektrofotometrik (167-172), titrimetrik (173,174), dansitometrik (175-178) ve türev spektrofotometrik (179,180) yöntemler bulunmaktadır. Son yıllarda bilgisayarların popüler olması nedeniyle asetilsalisilik asit içeren üçlü ve çok maddeli karışım preperatlarda asetilsalisilik asit ve diğer komponentlerin kantitatif tayini için çok dalga boylu spektrofotometrik yöntemler ve kompüter programları geliştirilmiştir (181-185).

Askorbik asit-asetilsalisilik asit içeren karışım preperatlarda yapılan kantitatif tayinler özetlenirse: Nikolova



ve grubu (186) askorbik asit içeren efervesan tabletlerde, asetilsalisilik asit tayini için tablet tozunu eter ile ekstre ederek elde ettikleri organik fazı buharlaştırmışlar ve geriye kalan çökeltiyi etanol ile çözerek 225 nm'deki absorbans değerini ölçmüşlerdir.

Peterdi Nagy ve çalışma grubu (187) ise ortamın pH değerini ayarlayarak ve uygun seyreltmeler yaparak askorbik asit yanında asetilsalisilik asit ve kinin tayini için spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir.

Jarzebinski ve arkadaşları (188) askorbik asit-asetilsalisilik asit ve asetilsalisilik asit-glisin ikili karışımları içeren farmasötik preparatlarda aktif maddelerin tayini için karışım preparatları silikajel plaklarda ayırdıktan sonra ölçümleri dansitometrik olarak gerçekleştirmişlerdir.

Boudeville ve grubu (189) askorbik asit-asetilsalisilik asit karışım preparatların analizini kulometrik titrasyon ile yapmışlardır.

### **2.3. Rutinin Karışımlardaki Miktar Tayini Yöntemleri**

Karışım preparatlarda rutinin miktar tayini için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bunlar arasında kolorimetrik (190,191), spektrofotometrik (192), fluorimetrik (193-195), dansitometrik (196,104), kromatografik (197,198) ve polarografik (199,200) yöntemler yer almaktadır.

Askorbik asit-rutin içeren karışım preperatlarda; askorbik asit ve rutin için gerek ultraviyole gerekse görünür bölgede yapılan spektrofotometrik çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Ogura ve çalışma grubu (201) askorbik asit-rutin içeren farmasötik preperatlarda rutin kantitatif tayinini asetik asit-sodyum asetat tamponlu ortamda zirkonyum klorür ile oluşturdugu renkli kompleksin 402 nm'de, difenilborik asit- $\beta$ -aminoetilester ile oluşan renkli ürünün ise 404 nm'deki absorbansını ölçerek yapmışlar ve analize askorbik asidin etkisinin olmadığını saptamışlardır.

Svitskaya ve arkadaşlarının (202) geliştirdiği yöntemde ise 1:1 oranında askorbik asit-rutin içeren tabletlerde rutin, tabletlerin %96'lık etanoldeki çözeltisinin sodyum hidroksit ile reaksiyonundan oluşan renkli çözeltinin 415 nm'deki absorbansının ölçülmesiyle tayin edilmiştir.

Reddy ve çalışma grubunun (203) rutin-askorbik asit içeren ikili ve daha çok maddeli karışımlarda rutin kantitatif tayini için geliştirdiği yöntem, 4-kloro-2-nitroanilin diazoniyum tuzunun rutin ile kenetlenmesi sonucu oluşan portakal renkli ürünün 450 nm'deki absorbansının ölçülmesine dayanmaktadır.

Seif-El-din'in (204) rutin-kuersetin-askorbik asit içeren tabletlerde birinci derece türev spektrofotometrisi ile rutin ve kuersetinin simultane tayini için geliştirdiği yön-

tem, rutin hidroklorik asitli ortamda alüminyum klorür ile verdiği sarı renkli kompleksin 418 nm'deki birinci türev absorbans değerinin ölçülmesine dayanmaktadır.

Feng ve Peng (205) askorbik asit-rutin içeren tabletleri %60'lık etanolde çözerek ortogonal fonksiyon spektrofotometrisi ile sırasıyla 231,261 ve 359 nm'deki absorbans değerlerinin ölçümü ile gerçekleştirmişlerdir.

Askorbik asit-rutin içeren karışım preparatların analizi için son yıllarda çift dalga boylu spektrofotometre ile çalışmalar yapılmıştır. Chen ve Xie (206) toz haline getirilmiş tableti sodyum pirofosfat ile karıştırıp etanolde çözmüşler ve sülfürik asit ile karıştırdıktan sonra 351 nm'de rutin, 242.5 ve 270.5 nm'de ise askorbik asidin absorbans değerini ölçmüşlerdir. Ge ve çalışma arkadaşları (207) askorbik asit-rutin-kuersetin içeren preparatlarda, tabletleri su ile ekstre ederek askorbik asidi uzaklaştırmışlar ve solid fazı %95'lik etanol ile çözdükten sonra süzmüşlerdir. Rutinin kantitatif tayini için süzütünün 312.5 ve 386 nm'deki absorbansını ölçmüşlerdir. Hu ve Wang (208) rutin ve askorbik asit içeren tabletleri %60'lık etanol ve 0.55 M sodyum klorürde çözerek sırasıyla 359, 225 ve 263.6 nm'deki absorbans değerlerini ölçerek analizi gerçekleştirmişlerdir. Ruan (209) askorbik asit-prokain. HCl-rutin içeren supozituarların analizinde çift dalga boylu spektrofotometriden yararlanmıştır.

### 3. DENEYSEL BÖLÜM

#### 3.1. Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

##### 3.1.1. İlaç Maddeleri

Farmasötik saflıkta askorbik asit<sup>1</sup>, asetilsalisilik asit<sup>2</sup> ve rutin<sup>3</sup> temin edildiği şekilde kullanıldı.

##### 3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Metafosforik asit, sodyum bikarbonat, glasiyal asetik asit, 2,6-DCPIP, sülfürik asit, metanol, potasyum permanganat, kloroform, formik asit, asetonitril, sodyum-1-heptan-sülfonat.

Sulu çözeltilerin hazırlanmasında potasyum permanganat üzerinden yeni distillenmiş deiyonize su kullanıldı.

Kullanılan tüm kimyasal maddeler ve çözücüler analitik saflıkta E.Merck, Darmstadt firmasının ürünüdür.

##### 3.1.3. Çözeltiler

Ekstraksiyon çözeltisi [%3 Metafosforik asit-%8 asetik asit (ag/h)]: 15 g metafosforik asit çubukları toz haline getirildi, 40 ml asetik asit ve 200 ml suda karıştırılarak çözüldü, hacim 500 ml'ye tamamlandı. Hemen siyah band kıvrımlı

---

[1:Sandoz A.Ş.; 2: Hoechst A.Ş.; 3: Dilmen Lab.]

süzgeç kağıdından süzöldü. Metafosforik asit suda hidroliz olarak fosforik aside dönuştüğü için her gün yeni hazırlandı.

**2,6-DCPIP çözeltisi (%0.025):** 50 mg 2,6-DCPIP 150 ml sıcak suda çözöldü.İçine 42 mg sodyum bikarbonat ilave edildi, soğutuldu ve hacmi 200 ml'ye su ile tamamlandı. Koyu renkli bir şişeye siyah band kıvrımlı süzgeç kağıdından süzöldü. Çözelti buzdolabında en fazla bir hafta muhafaza edildi ve kullanılmadan önce ayarlandı (61).

**Askorbik asit stok çözeltileri:**

**Askorbik asit stok 1:** Askorbik asidin ekstraksiyon çözeltisinde  $1 \text{ mg.ml}^{-1}$  konsantrasyondaki çözeltisi hazırlandı.

**Askorbik asit stok 2:** Askorbik asidin 0.1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 'de  $1 \text{ mg.ml}^{-1}$  konsantrasyondaki çözeltisi hazırlandı.

**Askorbik asit stok 3:** Askorbik asidin metanolde  $1 \text{ mg.ml}^{-1}$  konsantrasyondaki çözeltisi hazırlandı.

**Askorbik asit standart çözeltileri:** Askorbik asidin ekstraksiyon çözeltisinde  $100 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$ , metanolde ve 0.1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 'de  $40 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$  konsantrasyondaki çözeltileri deney şartlarının saptanması ve standart eğrilerin çizimi için hazırlandı.

**Asetilsalisilik asit stok çözeltisi:** Asetilsalisilik asidin 0.1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 'de  $1 \text{ mg.ml}^{-1}$  konsantrasyondaki çözeltisi hazırlandı.

**Asetilsalisilik asit standart çözeltileri:** Asetilsalisilik asidin 0.1 N  $H_2SO_4$ 'de  $40 \mu g.ml^{-1}$  konsantrasyondaki çözeltileri deney şartlarının saptanması ve standart eğrilerin çizimi için hazırlandı.

**Rutin stok çözeltisi:** Rutinin metanolde  $1 mg.ml^{-1}$  konsantrasyondaki çözeltisi hazırlandı.

**Rutin standart çözeltisi:** Rutinin metanolde  $40 \mu g.ml^{-1}$  konsantrasyondaki çözeltisi deney şartlarının saptanması ve standart eğrilerin çizimi için hazırlandı.

### 3.2. Aletler ve Diğer Gereçler

Spektrofotometre (Philips PU 8700 UV-Visible), 10.10.45 mm kuvars küvetler (Hellma, 100-QS), analitik terazi (August Sauter GmbH D-7470, 0.1 mg'a kadar duyarlı), çalkalayıcı (Nüve SL50), santrifüj (Janetzki T 30), vakum pompası (Vakuum-pumpe DS 8), mekanik karıştırıcı (Drehzahlregulierung), 300  $\mu m$  3.9  $\mu m$  çapında 10  $\mu m$  Bondapak  $C_{18}$  ters faz kolon, 510 model yüksek basınç pompası, 481 model değişken dalga boylu spektrofotometreden oluşan yüksek işlevli likid kromatograf (Waters), Linear 1200 model kaydedici, Ultrasonik banyo (Bransonic 221), 10  $\mu l$  Hamilton enjektör.

### 3.3. Yöntemler

#### 3.3.1. Spektrumların Çizilmesi

Askorbik asit-asetilsalisilik asit karışımının analizinde absorpsiyon (A), birinci türev (<sup>1</sup>D), ikinci türev (<sup>2</sup>D), üçüncü türev (<sup>3</sup>D), dördüncü türev (<sup>4</sup>D) absorpsiyon spektrumları 0.1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'e karşı 190-350 nm dalga boyu aralığında, 2 nm band genişliği ve 500 nm.dak<sup>-1</sup> tarama hızı ile alındı.

Askorbik asit-rutin karışımının analizinde A, <sup>1</sup>D, <sup>2</sup>D, <sup>3</sup>D, <sup>4</sup>D spektrumları metanole karşı 190-425 nm aralığında 2 nm band genişliği ve 500 nm.dak<sup>-1</sup> tarama hızı ile alındı.

Meyve ve sebzelerde geliştirilen yöntem ile askorbik asit tayininde A, <sup>1</sup>D, <sup>2</sup>D, <sup>3</sup>D, <sup>4</sup>D spektrumlarının alınması portakal ve karnabahar örnekleri için 190-350 nm'ler arasında 2 nm band genişliği ve 125 nm.dak<sup>-1</sup> tarama hızı ile yapıldı.

Kivi örneğinde bu ölçümler 190-350 nm dalga boyu aralığında, 2 nm band genişliği ve 250 nm.dak<sup>-1</sup> tarama hızı ile maydanoz örneğinde ise 190-300 nm'ler arasında 2 nm band genişliği ve 125 nm.dak<sup>-1</sup> tarama hızı ile alındı.

### 3.3.2. Askorbik Asit-Asetilsalisilik Asit Karışımının Analizi

#### 3.3.2.1. Türev Spektrofotometrik Yöntem

##### 3.3.2.1.1. Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması

Asetilsalisilik aside ait ölçü eğrisinin hazırlanması için  $40 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  konsantrasyondaki standart askorbik asit çözeltisinden 3'er ml 5 ayrı 10 ml'lik balonjojeye kondu. Bunların üzerine sırasıyla 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 ve 5.0 ml aynı konsantrasyondaki standart asetilsalisilik asit çözeltisi ilave edildi. Karışımlar 0.1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ile hacme tamamlandı ve iyice karıştırıldıktan sonra Bölüm 3.3.1'de verilen koşullarda 1.derece türev spektrumları alındı. Daha sonra 243.4 nm'deki birinci derece türev absorbanı değerleri ( $^1D_{243.4}$ ) saptandı. Bu değerler ile karşılık gelen asetilsalisilik asit konsantrasyonları arasında bir grafik çizilerek ölçü eğrisi oluşturuldu. Ölçü eğrisine ait doğru denklemi en küçük kareler yöntemine göre hesaplandı.

Askorbik aside ait ölçü eğrisinin hazırlanması için 10 ml'lik balonjojelere  $40 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  konsantrasyondaki standart asetilsalisilik asit çözeltisinden 3'er ml kondu. Bunların üzerine sırasıyla 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 ve 5.0 ml aynı konsantrasyondaki standart askorbik asit çözeltisi ilave edildi ve çözeltiler hacmine tamamlandıktan sonra Bölüm 3.3.1'de verilen koşullarda birinci derece türev spektrumları alındı. Daha sonra 258.2 nm'deki  $^1D_{258.2}$  değerleri saptandı. Bu değerler ile konsantrasyonlar arasında bir grafik çizilerek askorbik



asidin ölçü eğrisi oluşturuldu ve ölçü eğrisine ait doğru denklemi en küçük kareler yöntemine göre hesaplandı.

#### 3.3.2.1.2. Farmasötik preperatlara Uygulanması

Askorbik asit - asetilsalisilik asidi birarada içeren tabletlerin analizi için 10 adet tablet ayrı ayrı tartılıp ortalama tablet ağırlığı bulundu. Tabletler birarada toz edildi ve bu karışımdan 50 mg askorbik aside eşdeğer miktar hassas olarak tartılıp 50 ml'lik balonjojeye kondu. 20-30 ml kadar 0.1 N  $H_2SO_4$  ilave edilerek çalkalayıcıda 15-20 dakika çalkalandıktan sonra balonjoje 0.1 N  $H_2SO_4$  ile hacmine tamamlandı. Çözelti iyice karıştırıldıktan sonra mavi bantlı süzgeç kagıdından süzüldü. Süzüntünün ilk 15 ml'si atıldı. Sonraki süzüntüden 5 ml alınarak 50 ml'lik balonjojeye kondu ve 0.1 N  $H_2SO_4$  ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden 1 ml alınarak 10 ml'lik balonjojeye aktarıldı ve 0.1 N  $H_2SO_4$  ile hacme tamamlandı. Hazırlanan bu çözeltinin Bölüm 3.3.1'deki koşullarda 1. derece türev spektrumu alındı. Bu spektrumda askorbik asit için 258.2 nm, asetilsalisilik asit için 243.4 nm'deki  $^1D$  değerleri okundu. Bu değerlerin ölçü eğrisindeki karşılıkları bulunarak tabletteki madde miktarları tayin edildi.

### 3.3.2.2. Kıyas Yöntemleri

#### Tabletlerde Askorbik Asit Miktar Tayini

Toz edilmiş tablet karışımından yaklaşık olarak 0.05 g askorbik aside eşdeğer miktar hassas olarak tartıldı ve USP XXI (30)'de tabletlerde askorbik asit tayini için önerilen titrasyon yöntemi ile analiz edildi.

#### Tabletlerde Asetilsalisilik Asit Miktar Tayini

100 mg asetilsalisilik aside eşdeğer tablet tozu tam olarak tartıldı ve USP XXI (30)'de tabletlerde asetilsalisilik asit tayini için önerilen HPLC yöntemi ile analiz edildi.

### 3.3.3. Askorbik Asit - Rutin Karışımının Analizi

#### 3.3.3.1. Türev Spektrofotometrik Yöntem

##### 3.3.3.1.1. Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması

Ölçü eğrilerinin çizilmesi için her iki maddenin metanolde hazırlanmış  $40 \mu\text{g.ml}^{-1}$  konsantrasyondaki standart çözeltileri kullanıldı. İki ayrı ölçü eğrisi hazırlandı.

Rutine ait ölçü eğrisinin hazırlanması için standart askorbik asit çözeltisinden 3'er ml 5 ayrı 10ml'lik balonjojeye kondu. Bunların üzerine sırasıyla 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 ve 5.0 ml standart rutin çözeltisi ilave edildi. Karışımlar metanol ile hacmine tamamlandı ve iyice karıştırıldıktan sonra Bölüm 3.3.1'de verilen ölçüm koşullarında 1. derece türev

spektrumları alındı. Daha sonra 337.4 nm'deki birinci derece türev absorptans değerleri ( $D_{337.4}$ ) saptandı. Bu değerler ile karşılık gelen rutin konsantrasyonları arasında bir grafik çizilerek ölçü eğrisi oluşturuldu. Ölçü eğrisine ait doğru denklemi en küçük kareler yöntemine göre hesaplandı.

Askorbik aside ait ölçü eğrisinin hazırlanması için 10 ml'lik balonjojelere standart rutin çözeltisinden 3'er ml kondu. Bunların üzerine sırasıyla 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 ve 5.0 ml standart askorbik asit çözeltisi ilave edildi ve çözeltiler hacmine tamamlandıktan sonra Bölüm 3.3.1'de verilen koşullarda birinci derece türev spektrumları alındı. Daha sonra 258.8 nm'deki  $D_{258.8}$  değerleri saptandı. Bu değerler ile konsantrasyonlar arasında bir grafik çizilerek askorbik asidin ölçü eğrisi oluşturuldu ve ölçü eğrisine ait doğru denklemi en küçük kareler yöntemine göre hesaplandı.

#### 3.3.3.1.2 Farmasötik Preparatlara Uygulanması

20 adet tablet tek tek tartıldı. Ortalama tablet ağırlığı saptandı. Tabletler cam havanda iyice ezilerek toz haline getirildi. Bu toz karışımından ortalama tablet ağırlığına eşdeğer miktarda örnek tartılıp 100 ml'lik balonjojeye kondu. 60-70 ml metanol ilave edilerek çalkalayıcıda 15-20 dakika çalkalandıktan sonra metanol ile hacmine tamamlandı. Çözelti iyice karıştırıldıktan sonra mavi bant süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntünün ilk 15-20 ml'si atıldı. Sonraki süzüntüden 50 ml'lik balonjojeye 5 ml aktarıldı ve metanol

ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden 1 ml örnek 10 ml'lik balonjojeye kondu ve metanol ile hacme tamamlandı. Hazırlanan bu çözeltinin Bölüm 3.3.1'deki koşullarda 1. derece türev spektrumu alındı. Bu spektrumda askorbik asit için 258.8 nm, rutin için 337.4 nm'deki  $^1D$  değerleri okundu. Bu değerlerin ölçü egrisindeki karşılıkları bulunarak tabletteki madde miktarları tayin edildi.

### 3.3.3.2. Kıyas Yöntemleri

#### Tabletlerde Askorbik Asit Miktar Tayini

Bölüm 3.3.2.2'de anlatıldığı şekilde çalışıldı.

#### Tabletlerde Rutin Miktar Tayini

Bölüm 3.3.3.1.1'de hazırlanan 4.8,12,16,20  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  konsantrasyondaki standart rutin çözeltilerinin 358.4 nm'deki absorbens değerleri kaydedildi. Bu değerler ile karşılık gelen rutin konsantrasyonları arasında grafik çizilerek ölçü egrisi oluşturuldu. Ölçü egrisine ait doğru denklemi en küçük kareler yöntemine göre hesaplandı.

Tabletlerde rutin tayini için Bölüm 3.3.3.1.2'de hazırlanan örnek çözeltilerinin 358.4 nm'deki absorbens değerleri ölçüldü. Bu değerlere karşılık olan konsantrasyonlar ölçü egrisine ait doğru denkleminde bulunarak bir tabletteki ortalama rutin miktarı hesaplandı.

### 3.3.4. Meyve ve Sebzelerde Askorbik Asit Tayini

#### 3.3.4.1. Türev Spektrofotometrik Yöntem

##### 3.3.4.1.1. Ekstraksiyon

Ekstraksiyon işlemi iki farklı şekilde uygulandı.

#### A. Maydanoz, kivi, karnabahar

Yaklaşık 5 g maydanoz, 30 g karnabahar, 10 g kivi örneği tam olarak tartıldı. Maydanoz örneği yaprak, karnabahar örneği ise çiçek kısmından alınarak çalışıldı. Mevsimi geçtiği için ancak derin dondurulmuş karnabahar ile çalışıldı. Kivi örneği enine kesilmiş kesitten alınarak hazırlandı.

Tartılan örnekler çok küçük parçalara kesilerek bir behere kondu. Üzerine 100 ml ekstraksiyon çözeltisinden ilave edildi ve mekanik karıştırıcıda 500 dev/dak hızda cam çubuk karıştırıcı kullanılarak 45 dakika karıştırıldı. Beher içindeki süspansiyon santrifüj tüplerine aktarılarak 2000 dev/dak hızda 5 dakika santrifüj edildi ve siyah bant süzgeç kağıdından vakum pompası yardımıyla hızla süzüldü.

Elde edilen süzüntüler türev spektrofotometrik yöntem ve titrasyon yöntemi ile askorbik asit tayini için kullanıldı.

#### B. Portakal

Portakal cam sıkacakta sıkılarak suyu alındı. 50 ml portakal suyu eşit hacimde ekstraksiyon çözeltisi ile meka-

nik karıştırıcıda 500 dev/dak hızda 5 dakika karıştırıldı. Elde edilen homojen karışım 2000 dev/dak hızla 5 dakika santrifüj edildi ve siyah bant süzgeç kağıdından vakum pompası yardımıyla süzüldü.

Elde edilen berrak süzüntü türev spektrofotometrik yöntem ve titrasyon yöntemi ile askorbik asit tayini için kullanıldı. Örnekler deneylerin yapıldığı süre içinde oda sıcaklığında (20-22°C) tutuldu.

#### 3.3.4.1.2. Ölçüm Koşullarının Saptanması

Bölüm 3.3.4.1.1'de anlatıldığı şekilde yapılan ekstraksiyon ile elde edilen berrak süzüntülerden 60 µg askorbik asit içeren hacimde örnek alınarak 10 ml'lik balonjojeye aktarıldı ve ekstraksiyon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Diğer yandan askorbik asidin ekstraksiyon çözeltisindeki 100 µg.ml<sup>-1</sup> konsantrasyonda standart çözeltisinin seyreltilmesiyle 6 µg.ml<sup>-1</sup> askorbik asit içeren çözelti hazırlandı. Bu iki çözeltinin Bölüm 3.3.1'de verilen şartlarda absorpsiyon ve 1., 2., 3. ve 4. derece türev spektrumları üst üste alındı ve her iki çözeltinin çıkışan pikleri kantitatif tayin için uygun pik olarak saptandı.

#### 3.3.4.1.3. Ölçü Egrilerinin Hazırlanması

Ölçü egrileri portakal, karnabahar ve kivi için askorbik asit nihai konsantrasyonunun 2-10 µg.ml<sup>-1</sup>, maydanoz için 2-8 µg.ml<sup>-1</sup> olduğu aralıkta hazırlandı.

Askorbik asidin ekstraksiyon çözeltisindeki  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$  konsantrasyonda standart çözeltisinden 10 ml'lik balonjojelere 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 ml aktarıldı ve ekstraksiyon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltilerin Bölüm 3.3.1 de verilen şartlarda 1. ve 3. derece türev spektrumları alındı. Daha sonra portakal ve karnabahar için 1. derece türev spektrumlarında 236 nm'deki maksimum ve 259 nm'deki minimuma ait  $^1D$  mutlak değerlerinin toplamı, maydanoz için 3. derece türev spektrumlarında 227 nm'deki maksimum ve 237 nm'deki minimuma ait  $^3D$  mutlak değerlerinin toplamı, kivi için bu spektrumda 259.4 nm'deki maksimum ile 276.2 nm'deki minimuma ait  $^3D$  mutlak değerlerinin toplamı ile bu değerlerin karşılığı olan standart çözelti konsantrasyonları arasında ölçü eğrileri oluşturuldu ve ölçü eğrilerine ait doğru denklemleri regresyon analizi ile hesaplandı.

#### 3.3.4.1.4. Ölçüm

Bölüm 3.3.4.1.1'de anlatıldığı şekilde yapılan ekstraksiyon ile elde edilen berrak süzüntülerden alınan 0.2-1.0 ml örnekler 10 ml'lik balonjojeye aktarıldı ve ekstraksiyon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltilerde askorbik asit tayini aşağıda anlatıldığı gibi yapıldı.

Portakal, Karnabahar: Hazırlanan örnek çözeltilerinin 1. derece türev absorpsiyon spektrumları alındı. Bu spektrumlarda 236 nm'deki maksimum ve 259 nm'deki minimuma ait 1. türev absorbans değerleri ölçülerek mutlak değerlerinin toplamı ( $^1D_{236-259}$ ) kaydedildi.

**Kivi:** Hazırlanan örnek çözeltilerinin alınan 3. derece türev spektrumlarında 259.4 nm'deki maksimum ve 276.2 nm'deki minimuma ait 3. türev absorbens değerleri ölçülerek mutlak değerlerinin toplamı ( $\Sigma D_{259.4-276.2}$ ) kaydedildi.

**Maydanoz:** Hazırlanan örnek çözeltilerinin 3. derece türev spektrumları alındı. Bu spektrumlarda 227 nm'deki maksimum ve 237 nm'deki minimuma ait 3. türev absorbens değerleri ölçülerek mutlak değerlerinin toplamı ( $\Sigma D_{227-237}$ ) kaydedildi.

Saptanan D değerlerinin karşılığı olan askorbik asit konsantrasyonu ilgili ölçü eğrilerinden bulundu ve analiz örneğindeki askorbik asit miktarı hesaplandı.

#### 3.3.4.2. Kıyas Yöntemi

Örneklerden Bölüm 3.3.4.1.1'de anlatılan ekstraksiyon işlemiyle elde edilen süzüntülerin 10 ml'si 50 ml'lik erlenlere aktarıldı. Yeni ayarlanmış olan 2,6-DCPIP çözeltisi ile gülpembe renk görülene kadar titre edildi.

Bos deneme için 50 ml'lik erlenlere 10 ml ekstraksiyon çözeltisi aktarıldı ve üzerine yukarıdaki titrasyonda harcanan 2,6-DCPIP çözeltisi hacmi kadar distile su ilave edildi. Gülpembe renk görülene kadar titre edildi. Aynı işlem üç kez tekrarlandı ve sarfiyat ortalaması örneğin titrasyonundaki harcamadan çıkarıldı.



#### 4. SONUÇLAR

##### 4.1. Askorbik Asit-Asetilsalisilik Asit Karışımının

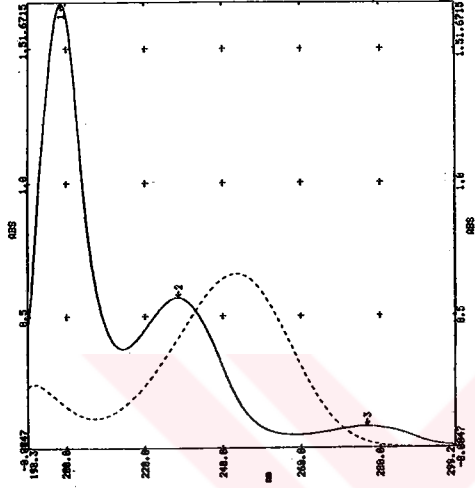
###### Analizi

##### 4.1.1. Uygun Koşulların Saptanması

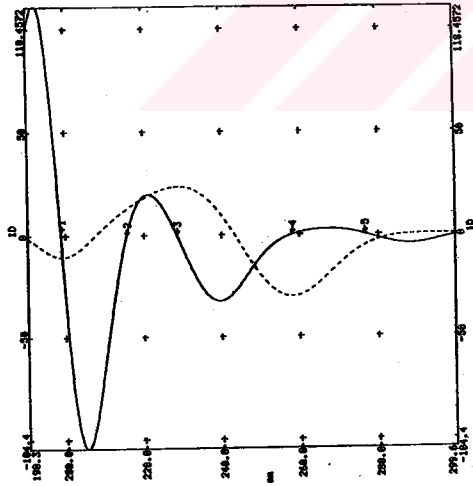
Askorbik asit ve asetilsalisilik asidin 0.1 N asit. distile su ve alkoldeki  $12 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  konsantrasyonda çözelti-leri hazırlandı. Bölüm 3.3.1'de verilen ölçüm koşullarında absorpsiyon ve 1.,2.,3.derece türev absorpsiyon spektrumları alındı. Bunlar arasında 0.1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 'deki 1. derece türev absorpsiyon spektrumunun askorbik asit-asetilsalisilik asit karışımlarının kantitatif analizi için en uygun olduğu saptandı.

Askorbik asit ve asetilsalisilik asidin 0.1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 'deki  $12 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  konsantrasyonundaki çözeltilerinin absorpsiyon ve 1.,2.,3. derece türev spektrumları sırasıyla Şekil 1-4'de görülmektedir.

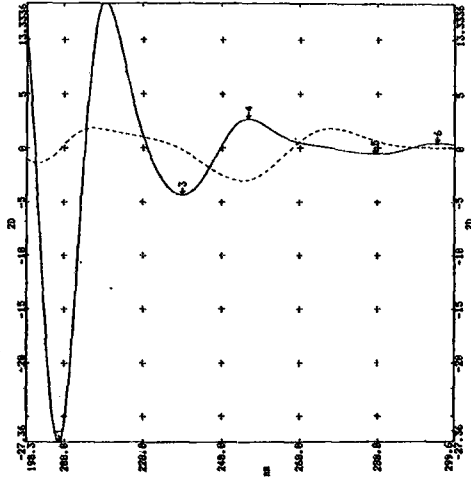
Şekil 1'de görüldüğü gibi askorbik asit ve asetilsalisilik asidin absorpsiyon spektrumundaki pikler üst üste çakışmaktadır. Bu yüzden bu iki maddenin birarada tayini absorpsiyon spektrofotometrisi ile mümkün değildir. Şekil 2'de üst üste çizilmiş olan 1.derece türev spektrumlarında 258.2 nm'de asetilsalisilik asidin türev absorbansı, 243.4 nm'de ise askorbik asidin türev absorbansı sıfırdır. Bu bakımdan karışımın 1. derece türev spektrumunda bu dalga boyundaki türev



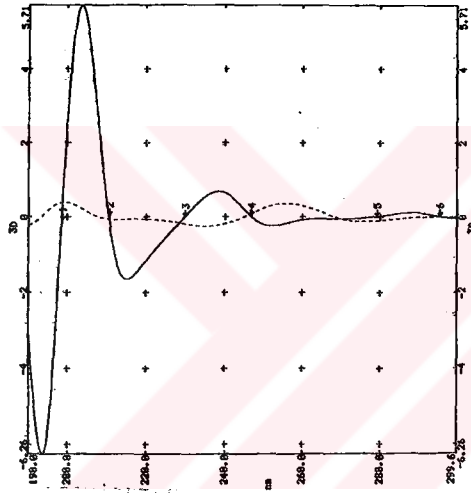
Şekil 1 : Askorbik asit(---) ve asetilsalisilik asidin (—) 0.1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 'deki çözeltilerinin (12 µg.ml<sup>-1</sup>) absorpsiyon spektrumları



Şekil 2 : Askorbik asit(---) ve asetilsalisilik asidin (—) 0.1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 'deki çözeltilerinin (12 µg.ml<sup>-1</sup>) 1. derece türev spektrumları



Sekil 3 : Askorbik asit(---) ve asetilsalisilik asidin (—)  
0.1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 'deki çözeltilerinin (12 µg.ml<sup>-1</sup>)  
2. derece türev spektrumları

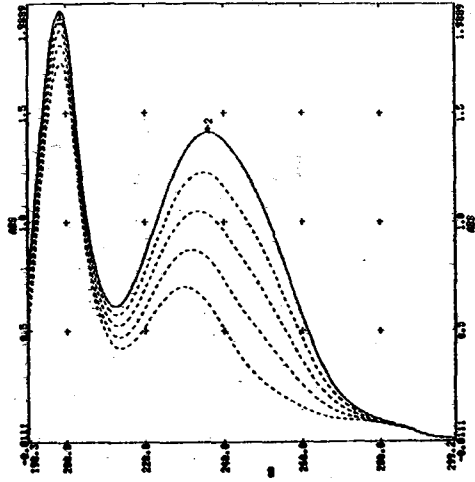


Sekil 4 : Askorbik asit(---) ve asetilsalisilik asidin (—)  
0.1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 'deki çözeltilerinin (12 µg.ml<sup>-1</sup>)  
3. derece türev spektrumları

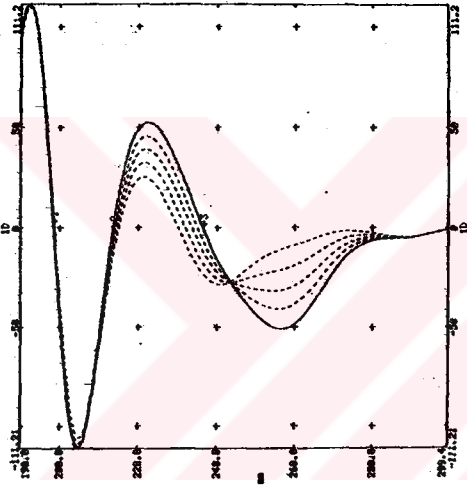
absorbans değerleri ölçölerek karışımıdaki askorbik asit ve asetilsalisilik asit konsantrasyonları diğerinin etkisi olmaksızın tayin edilebilir.

#### 4.1.2. Ölçü Egrileri

4-20  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  konsantrasyon aralığında çeşitli konsantrasyonlardaki askorbik asit ve asetilsalisilik asit çözeltilerinin Bölüm 3.3.2.1.1'de anlatıldığı gibi çalışılarak alınan absorpsiyon ve 1. derece türev spektrumları askorbik asit için Şekil 5 ve 6'da asetilsalisilik asit için ise Şekil 7 ve 8'de görölmektedir. Çözeltilerdeki askorbik asit ve asetilsalisilik asit konsantrasyonları ile 1. derece türev spektrumlarında askorbik asit için 258.2 nm, asetilsalisilik asit için 243.4 nm'deki türev absorbans ( $^{\circ}\text{D}$ ) değerleri Tablo 4 ve 6'da, bu değerler yardımıyla oluşturulan ölçü egrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler Tablo 5 ve 7'de verilmiştir. Ortalama  $^{\circ}\text{D}$  değerleri ile oluşturulan ölçü egrileri (Şekil 9 ve 10) ve bu ölçü egrilerine ait regresyon denklemleri askorbik asit ve asetilsalisilik asit içeren tabletlerin analizinde kullanılmıştır.



Sekil 5 : Askorbik aside ait ölçü egrisinin hazırlanması için hazırlanan çözeltilerin ( $4,8,12,16,20 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) absorpsiyon spektrumları



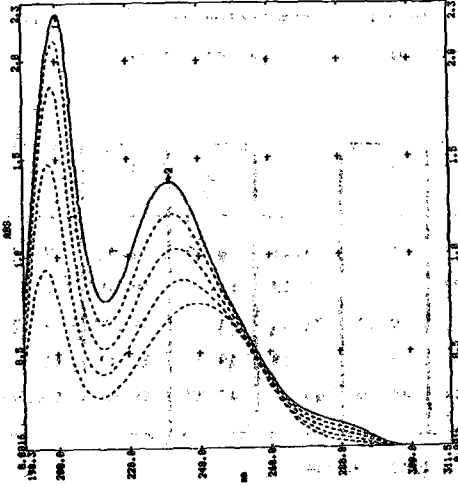
Sekil 6 : Askorbik aside ait ölçü egrisinin hazırlanması için hazırlanan çözeltilerin ( $4,8,12,16,20 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) 1. derece türev spektrumları

Tablo 4: Askorbik asidin türev spektrofotometrik yöntem ile hazırlanan ölçü eğrilerinin 1.türev absorbans değerleri ( $^1D$ ) ve regresyon analizleri

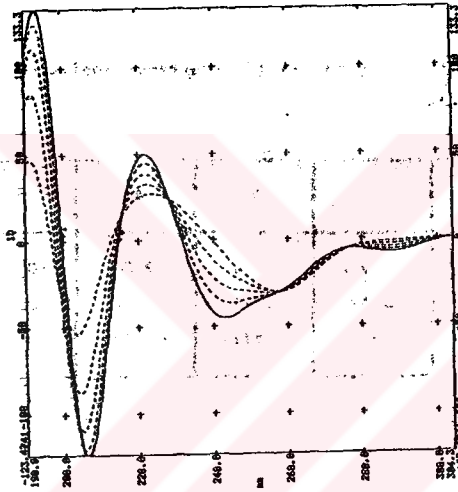
| No                                                      | C<br>$\mu\text{g.ml}^{-1}$ | $^1D_1$ | $^1D_2$ | $^1D_3$ | $^1D_4$ | $^1D_5$ | $^1\bar{D}$ | S    | %S   |
|---------------------------------------------------------|----------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|-------------|------|------|
| 1                                                       | 4                          | 9.73    | 9.37    | 9.69    | 9.55    | 9.81    | 9.63        | 0.17 | 1.76 |
| 2                                                       | 8                          | 20.23   | 19.28   | 19.13   | 19.80   | 19.61   | 19.61       | 0.44 | 2.24 |
| 3                                                       | 12                         | 30.23   | 29.14   | 29.34   | 29.17   | 29.75   | 29.53       | 0.46 | 1.56 |
| 4                                                       | 16                         | 40.27   | 39.26   | 39.54   | 39.27   | 39.88   | 39.65       | 0.43 | 1.08 |
| 5                                                       | 20                         | 50.44   | 49.19   | 49.25   | 49.37   | 49.54   | 49.56       | 0.51 | 1.03 |
| $^1D_{\text{gözetim}} = 2.497C - 0.374$<br>$r = 0.9999$ |                            |         |         |         |         |         |             |      |      |

Tablo 5: Tablo 4'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

|   | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | Ortalama |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|----------|
| a | -0.162 | -0.638 | -0.469 | -0.301 | -0.201 | -0.374   |
| b | 2.537  | 2.491  | 2.488  | 2.478  | 2.493  | 2.497    |
| r | 0.9998 | 0.9999 | 0.9999 | 0.9999 | 0.9999 | 0.9999   |



Sekil 7 : Asetilsalisilik aside ait ölçü egrisinin hazırlanması için hazırlanan çözeltilerin (4,8,12,16,20 µg.ml<sup>-1</sup>) absorpsiyon spektrumları



Sekil 8 : Asetilsalisilik aside ait ölçü egrisinin hazırlanması için hazırlanan çözeltilerin (4,8,12,16,20 µg.ml<sup>-1</sup>) 1.derece türev spektrumları

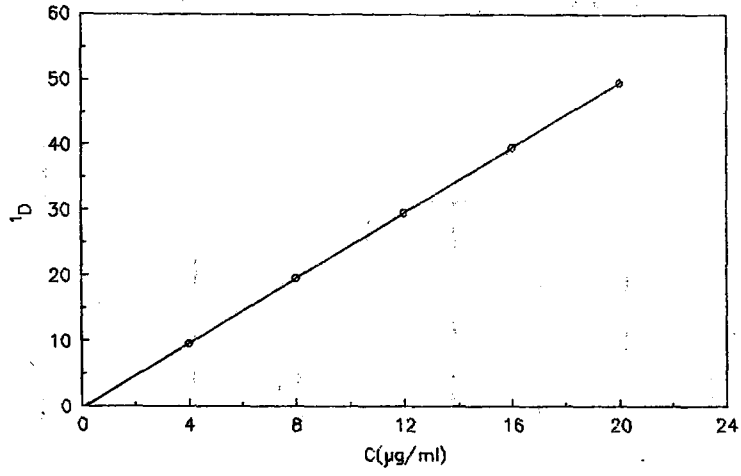
Tablo 6: Asetilsalisilik asidin türev spektrofotometrik yöntem ile  
hazırlanan ölçü eğrilerinin 1.türev absorbans değerleri (<sup>1</sup>D)  
ve regresyon analizleri

| No                                                  | C<br>µg.ml <sup>-1</sup> | <sup>1</sup> D <sub>1</sub> | <sup>1</sup> D <sub>2</sub> | <sup>1</sup> D <sub>3</sub> | <sup>1</sup> D <sub>4</sub> | <sup>1</sup> D <sub>5</sub> | <sup>1</sup> D̄ | S    | %S   |
|-----------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|------|------|
| 1                                                   | 4                        | 9.40                        | 9.46                        | 9.27                        | 9.38                        | 9.15                        | 9.33            | 0.12 | 1.32 |
| 2                                                   | 8                        | 18.32                       | 18.56                       | 18.63                       | 18.33                       | 18.42                       | 18.45           | 0.14 | 0.75 |
| 3                                                   | 12                       | 27.46                       | 27.67                       | 27.62                       | 27.40                       | 27.30                       | 27.49           | 0.15 | 0.56 |
| 4                                                   | 16                       | 36.78                       | 36.57                       | 36.63                       | 36.53                       | 36.45                       | 36.59           | 0.13 | 0.34 |
| 5                                                   | 20                       | 45.56                       | 45.65                       | 45.90                       | 45.22                       | 45.28                       | 45.52           | 0.28 | 0.61 |
| $\text{D}_{243.4} = 2.263C + 0.320$<br>$r = 0.9999$ |                          |                             |                             |                             |                             |                             |                 |      |      |

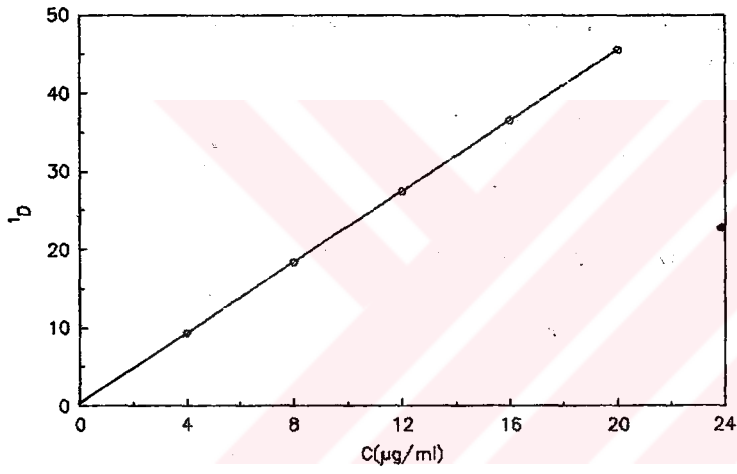
Tablo 7: Tablo 6'daki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait  
parametreler

|   | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | Ortalama |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|----------|
| a | 0.270  | 0.465  | 0.232  | 0.408  | 0.233  | 0.320    |
| b | 2.270  | 2.260  | 2.282  | 2.247  | 2.257  | 2.263    |
| r | 0.9999 | 0.9999 | 0.9999 | 0.9999 | 0.9999 | 0.9999   |





Şekil 9: Askorbik aside ait ölçü eğrisi  
( $D_{258.2} = 2.497C - 0.374$ )



Şekil 10: Asetilsalisilik aside ait ölçü eğrisi  
( $D_{243.4} = 2.263C + 0.320$ )

Tablo 8: Aspirin - Plus C Tabletlerinin<sup>[\*]</sup> Analizi

| İstatistik parametre-ler                    |   | ASKORBİK ASİT                 |       |             |       | ASETİLSALİSİLİK ASİT          |       |             |       |
|---------------------------------------------|---|-------------------------------|-------|-------------|-------|-------------------------------|-------|-------------|-------|
|                                             |   | Türev spektro-fotometrik yön. |       | USP Yöntemi |       | Türev spektro-fotometrik yön. |       | USP Yöntemi |       |
|                                             |   | mg/tablet                     | %     | mg/tablet   | %     | mg/tablet                     | %     | mg/tablet   | %     |
| n                                           | 1 | 240.9                         | 100.4 | 238.5       | 99.4  | 399.6                         | 99.9  | 396.7       | 99.2  |
|                                             | 2 | 244.2                         | 101.8 | 241.5       | 100.6 | 400.3                         | 100.1 | 398.7       | 99.7  |
|                                             | 3 | 245.6                         | 102.3 | 242.6       | 101.1 | 402.2                         | 100.6 | 403.2       | 100.8 |
|                                             | 4 | 240.3                         | 100.1 | 237.1       | 98.8  | 400.6                         | 100.1 | 401.4       | 100.4 |
|                                             | 5 | 241.9                         | 100.8 | 239.9       | 100.0 | 406.3                         | 101.6 | 405.5       | 101.4 |
| $\bar{X}$                                   |   | 242.6                         | 101.1 | 239.9       | 100.0 | 401.8                         | 100.5 | 401.1       | 100.3 |
| S                                           |   | 2.25                          |       | 2.22        |       | 2.69                          |       | 3.50        |       |
| % S                                         |   | 0.93                          |       | 0.93        |       | 0.67                          |       | 0.87        |       |
| $\bar{X} \pm t.s/\sqrt{n}$                  |   | 240.0-245.2                   |       | 237.3-242.2 |       | 398.7-404.9                   |       | 397.1-405.1 |       |
| t testi                                     |   | 1.71                          |       |             |       | 0.32                          |       |             |       |
| F testi                                     |   | 1.03                          |       |             |       | 1.69                          |       |             |       |
| n <sub>1</sub> =n <sub>2</sub> =5<br>P=0.05 |   |                               |       |             |       |                               |       |             |       |
| t <sub>tablo</sub> : 2.31                   |   |                               |       |             |       |                               |       |             |       |
| F <sub>tablo</sub> : 6.39                   |   |                               |       |             |       |                               |       |             |       |

[\*] Bir tablet 240 mg askorbik asit. 400 mg asetilsalisilik asit içermektedir.

rev spektrofotometrik yöntem ile tayin edildi. Elde edilen sonuçların kıyaslanması amacıyla aynı tabletler USP XXI (30) de askorbik asit ve asetilsalisilik asit tabletler için önerilen yöntemlerle de analiz edildi. Her iki yöntemle elde edilen sonuçlar Tablo 8 'de toplu olarak verilmiştir. Aynı tabloda beş adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama ( $\bar{X}$ ), standart sapma (S), bağıl standart sapma (%S) ve % 95 güvenirlilik düzeyinde güven aralığı ( $\bar{X} \pm t.s/\sqrt{n}$ ) değerleri verilmiştir.

Geliştirilen yöntem ve kıyas yöntemleriyle elde edilen sonuçlar Student (t) Testi ile ortalamalar, Fisher (F) Testi ile presizyonlar yönünden % 95 güven düzeyinde karşılaştırıldı. Tablo 8 'de görüldüğü gibi hesaplanan t ve F değerleri, ilgili güven düzeyi ve beş deneme için verilen tablo değerlerinden (210) küçüktür. Buna göre bu ilaç maddelerinin analizinde geliştirilen yöntem ile USP yöntemleri arasında gerek doğruluk gerek presizyon yönünden anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

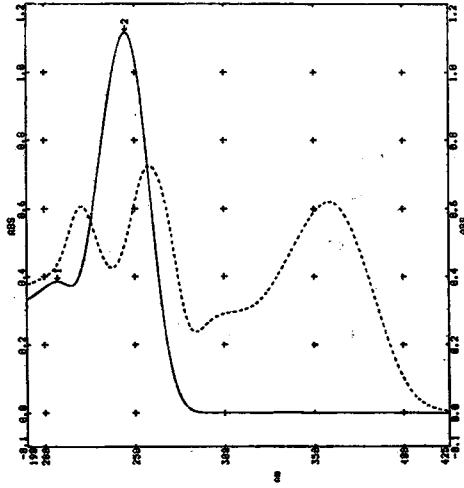
#### 4.2. Askorbik Asit-Rutin Karışımının Analizi

##### 4.2.1. Uygun Koşulların Saptanması

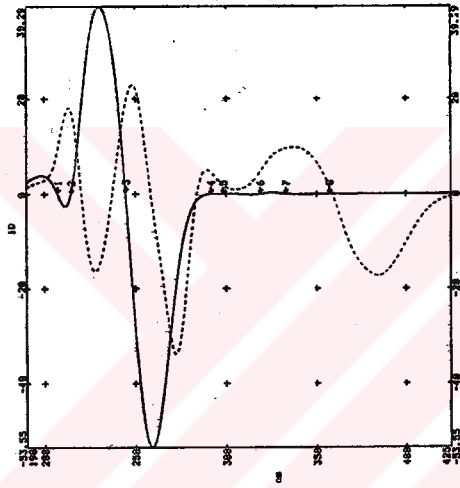
Askorbik asit ve rutinin metanol ve etanoldeki 20  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  konsantrasyonda çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin 3.3.1'de verilen ölçüm koşullarında absorpsiyon ve 1.,2.,3. derece türev spektrumları alındı. Bunlar arasında metanoldeki 1.derece türev absorpsiyon spektrumunun askorbik asit-rutin karışımlarının kantitatif tayini için en uygun olduğu saptandı.

Askorbik asit ve rutinin metanoldeki 20  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  konsantrasyondaki çözeltilerinin absorpsiyon ve 1.,2.,3. derece türev spektrumları sırasıyla Şekil 11-14'de görülmektedir.

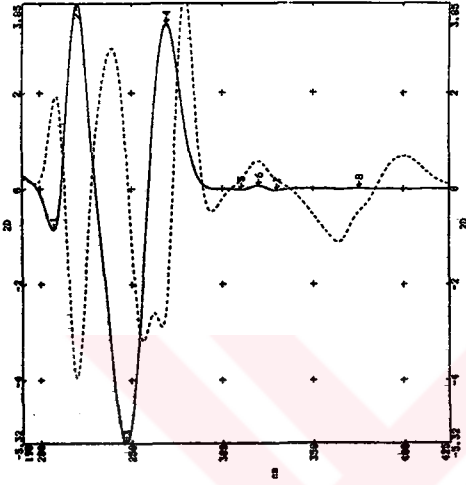
Şekil 11'de görüldüğü gibi rutinin 358.4 nm'deki absorpsiyon piki, bu maddenin askorbik asit ile birarada bulunduğu karışımda absorpsiyon spektrofotometrisi ile askorbik asidin etkisi olmaksızın tayinine olanak sağlamaktadır. Buna karşın aynı karışımda askorbik asidin aynı yöntemle tayini rutinin absorpsiyon pikinin etkisi sebebiyle mümkün de-



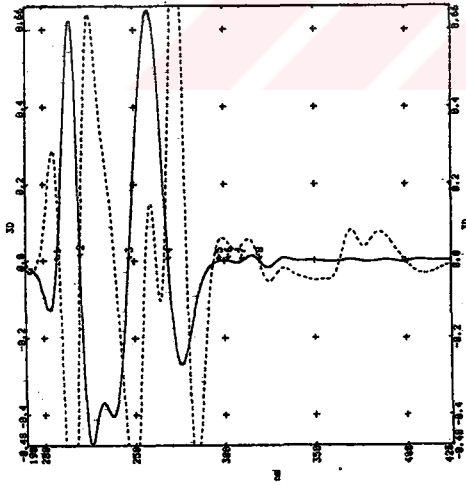
Şekil 11: Askorbik asit (—) ve rutin (---) metanoldeki çözeltilerinin ( $20 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ) absorpsiyon spektrumları



Şekil 12: Askorbik asit (—) ve rutin (---) metanoldeki çözeltilerinin ( $20 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ) 1. derece türev spektrumları



Sekil 13: Askorbik asit (—) ve rutin (---)  
metanoldeki çözeltilerinin ( $20 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ )  
2. derece türev spektrumları



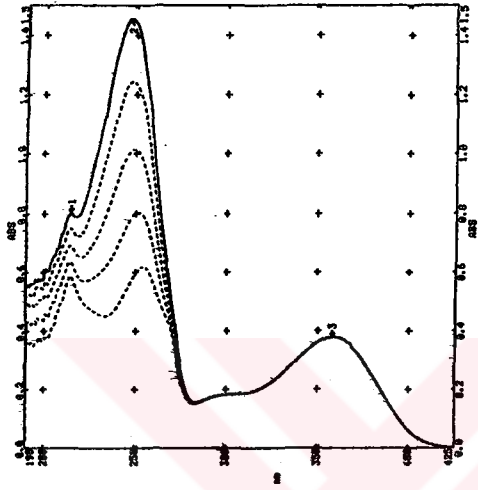
Sekil 14: Askorbik asit (—) ve rutin (---)  
metanoldeki çözeltilerinin ( $20 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ )  
3. derece türev spektrumları

#### 4.2.2. Ölçü Eğrileri

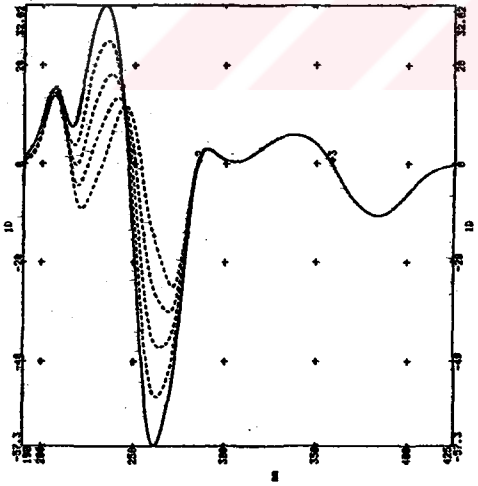
4-20  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  konsantrasyon aralığında çeşitli konsantrasyonlardaki askorbik asit ve rutin çözeltilerinin Bölüm 3.3.3.1.1'de anlatıldığı gibi çalışılarak alınan absorpsiyon ve 1. derece türev spektrumları askorbik asit için Şekil 15 ve 16'da rutin için ise Şekil 17 ve 18'de görülmektedir. Çözeltilerdeki askorbik asit ve rutin konsantrasyonları ile 1. derece türev spektrumlarında askorbik asit için 258.8 nm, rutin için 337.4 nm'deki türev absorbans ( $^1D$ ) değerleri Tablo 9 ve 11'de, bu değerler yardımıyla oluşturulan ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler Tablo 10 ve 12'de verilmiştir. Ortalama  $^1D$  değerleri ile oluşturulan ölçü eğrileri (Şekil 19 ve 20) ve bu ölçü eğrilerine ait regresyon denklemleri askorbik asit ve rutin içeren tabletlerin analizinde kullanılmıştır.

#### 4.2.3. Yöntemin Farmasötik Preperatlara Uygulanması ve Sonuçların Kıyas Yöntemleriyle Elde Edilen Sonuçlarla Karşılaştırılması

İncelenen ilaç maddelerini birarada içeren tabletlerde bu ilaç maddelerinin miktarı Bölüm 3.3.3.1.2'de anlatıldığı gibi çalışılarak türev spektrofotometrik yöntem ile yapıldı. Alınan sonuçların kıyaslanması amacıyla aynı tabletler USP XXI(30)'de askorbik asit tabletleri için önerilen yöntem ile de analiz edildi. Rutin miktar tayini için farmakope yöntemi bulunamadığı için Bölüm 3.3.3.2.2'de anlatıldığı gibi



Sekil 15: Askorbik aside ait ölçü egrisinin hazırlanması için hazırlanan çözeltilerin (4,8,12,16,20 µg.ml<sup>-1</sup>) absorpsiyon spektrumları



Sekil 16: Askorbik aside ait ölçü egrisinin hazırlanması için hazırlanan çözeltilerin (4,8,12,16,20 µg.ml<sup>-1</sup>) 1. derece türev spektrumları

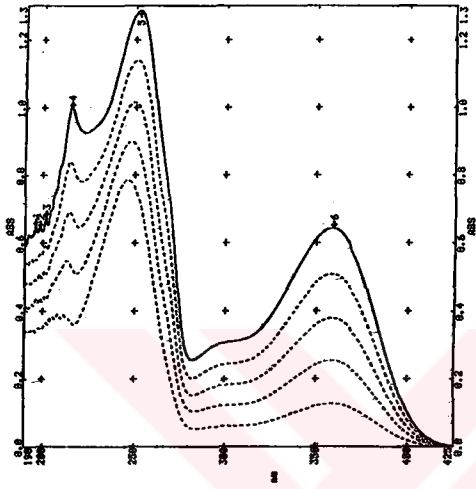


Tablo 9: Askorbik asidin türev spektrofotometrik yöntem ile hazırlanan ölçü eğrilerinin 1.türev absorban değerleri ( $^1D$ ) ve regresyon analizleri

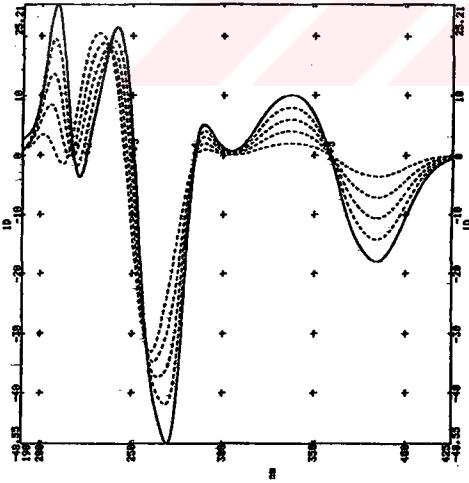
| No                                                   | C<br>$\mu\text{g.ml}^{-1}$ | $^1D_1$ | $^1D_2$ | $^1D_3$ | $^1D_4$ | $^1D_5$ | $^1\bar{D}$ | S    | %S   |
|------------------------------------------------------|----------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|-------------|------|------|
| 1                                                    | 4                          | 10.23   | 10.09   | 10.72   | 10.52   | 10.35   | 10.38       | 0.25 | 2.37 |
| 2                                                    | 8                          | 20.51   | 20.53   | 21.13   | 20.75   | 20.56   | 20.70       | 0.26 | 1.26 |
| 3                                                    | 12                         | 30.78   | 30.97   | 31.53   | 30.98   | 30.78   | 31.01       | 0.31 | 0.99 |
| 4                                                    | 16                         | 41.06   | 41.44   | 41.93   | 41.20   | 40.99   | 41.32       | 0.38 | 0.92 |
| 5                                                    | 20                         | 51.34   | 51.85   | 52.34   | 51.43   | 51.21   | 51.63       | 0.46 | 0.89 |
| $^1D_{\text{avg.}} = 2.578C - 0.072$<br>$r = 0.9999$ |                            |         |         |         |         |         |             |      |      |

Tablo 10: Tablo 9'daki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

|   | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | Ortalama |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|----------|
| a | -0.047 | -0.353 | 0.318  | 0.295  | 0.133  | 0.072    |
| b | 2.569  | 2.611  | 2.601  | 2.557  | 2.554  | 2.578    |
| r | 0.9999 | 0.9999 | 0.9999 | 0.9999 | 0.9999 | 0.9999   |



Sekil 17: Rutinin ölçü eğrisinin hazırlanması için hazırlanan çözeltilerin (4,8,12,16,20 µg.ml<sup>-1</sup>) absorpsiyon spektrumları



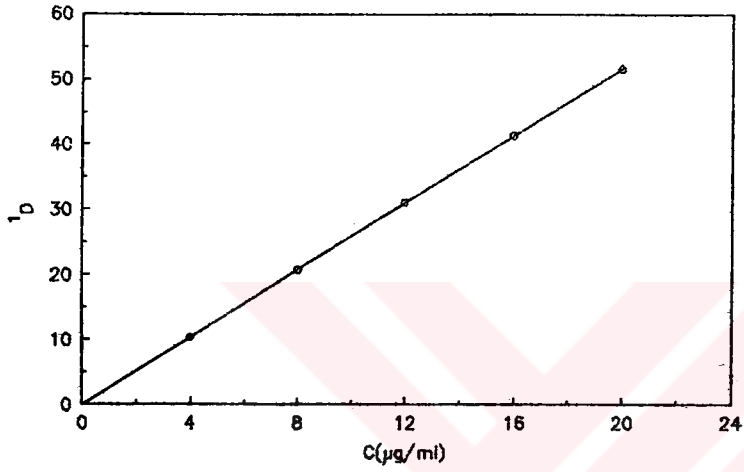
Sekil 18: Rutinin ölçü eğrisinin hazırlanması için hazırlanan çözeltilerin (4,8,12,16,20 µg.ml<sup>-1</sup>) 1. derece türev spektrumları

Tablo 11: Rutinin türev spektrofotometrik yöntem ile hazırlanan ölçü eğrilerinin 1.türev absorbens değerleri ( $^1D$ ) ve regresyon analizleri

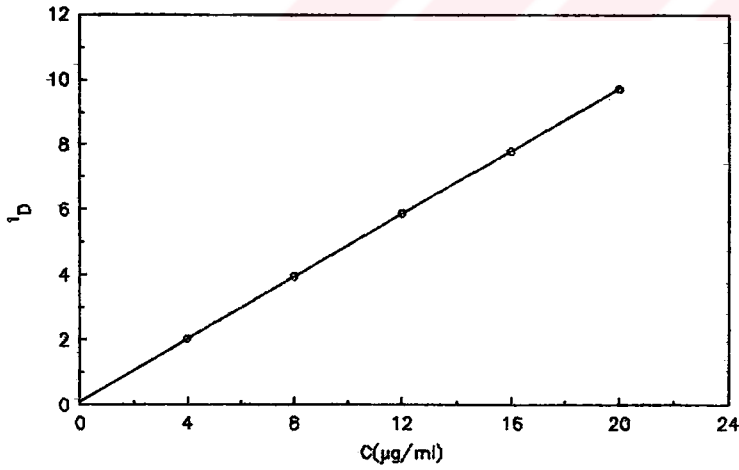
| No                                                     | C<br>$\mu\text{g.ml}^{-1}$ | $^1D_1$ | $^1D_2$ | $^1D_3$ | $^1D_4$ | $^1D_5$ | $^1\bar{D}$ | S     | %S   |
|--------------------------------------------------------|----------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|-------------|-------|------|
| 1                                                      | 4                          | 2.01    | 1.94    | 1.98    | 2.06    | 1.99    | 2.00        | 0.044 | 2.20 |
| 2                                                      | 8                          | 3.99    | 3.92    | 4.02    | 3.89    | 4.02    | 3.97        | 0.060 | 1.51 |
| 3                                                      | 12                         | 5.94    | 5.83    | 5.89    | 5.90    | 5.97    | 5.91        | 0.005 | 0.08 |
| 4                                                      | 16                         | 7.92    | 7.74    | 7.73    | 7.84    | 7.80    | 7.81        | 0.078 | 0.01 |
| 5                                                      | 20                         | 9.83    | 9.62    | 9.66    | 9.72    | 9.67    | 9.70        | 0.081 | 0.84 |
| $^1D_{\text{teorik}} = 0.481C + 0.106$<br>$r = 0.9999$ |                            |         |         |         |         |         |             |       |      |

Tablo 12: Tablo 11'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

|   | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | Ortalama |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|----------|
| a | 0.067  | 0.056  | 0.135  | 0.101  | 0.148  | 0.106    |
| b | 0.489  | 0.479  | 0.477  | 0.482  | 0.478  | 0.481    |
| r | 0.9999 | 0.9999 | 0.9998 | 0.9999 | 0.9998 | 0.9999   |



Şekil 19: Askorbik aside ait 1.türev ölçü eğrisi  
( $D_{258.8} = 2.578C - 0.072$ )



Şekil 20: Rutine ait 1.türev ölçü eğrisi  
( $D_{337.4} = 0.481C + 0.106$ )

çalışılarak tabletlerdeki rutin miktarı spektrofotometrik yöntem ile tayin edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 13'de toplu olarak verilmiştir.

Aynı tabloda beş adet tayin üzerinden hesaplanan  $\bar{X}$ , S, %S ve % 95 güvenirlilik düzeyinde güven aralığı ( $\bar{X} \pm t.s/\sqrt{n}$ ) değerleri verilmiştir.

Geliştirilen yöntem ve kıyas yöntemleriyle elde edilen sonuçlar t testi ile ortalamalar ve F testi ile presizyonlar yönünden % 95 güven düzeyinde karşılaştırıldı. Tablo 13 'de görüldüğü gibi hesaplanan t ve F değerleri, ilgili güven düzeyi ve beş deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür. Buna göre askorbik asit-rutin tabletlerinin analizinde geliştirilen yöntem ve kıyas yöntemleri arasında gerek doğruluk gerek presizyon yönünden anlamlı bir fark olmadığı ortaya çıkmıştır.

Tablo 13: Rutinal - C Tabletlerinin<sup>\*\*\*</sup> Analizi

| İstatistik parametre-ler                    |   | ASKORBİK ASİT                     |      |             |      | RUTİN                               |       |                               |       |
|---------------------------------------------|---|-----------------------------------|------|-------------|------|-------------------------------------|-------|-------------------------------|-------|
|                                             |   | Türev spektro-<br>fotometrik yön. |      | USP Yöntemi |      | Türev spektro-<br>fotometrik yöntem |       | Spektrofoto-<br>metrik yöntem |       |
|                                             |   |                                   |      |             |      |                                     |       |                               |       |
|                                             |   | mg/tablet                         | %    | mg/tablet   | %    | mg/tablet                           | %     | mg/tablet                     | %     |
| n                                           | 1 | 98.6                              | 98.6 | 99.8        | 99.8 | 102.6                               | 102.6 | 101.8                         | 101.8 |
|                                             | 2 | 97.3                              | 97.3 | 97.6        | 97.6 | 101.2                               | 101.2 | 99.9                          | 99.9  |
|                                             | 3 | 96.9                              | 96.9 | 97.0        | 97.0 | 101.9                               | 101.9 | 100.5                         | 100.5 |
|                                             | 4 | 97.4                              | 97.4 | 98.2        | 98.2 | 103.5                               | 103.5 | 102.7                         | 102.7 |
|                                             | 5 | 96.3                              | 96.3 | 95.8        | 95.8 | 101.4                               | 101.4 | 100.5                         | 100.5 |
| $\bar{X}$                                   |   | 97.4                              | 97.4 | 97.7        | 97.7 | 102.1                               | 102.1 | 101.1                         | 101.1 |
| S                                           |   | 0.85                              |      | 1.48        |      | 0.94                                |       | 1.14                          |       |
| % S                                         |   | 0.87                              |      | 1.52        |      | 0.92                                |       | 1.13                          |       |
| $\bar{X} \pm t.s/\sqrt{n}$                  |   | 96.4-98.4                         |      | 96.0-99.4   |      | 101.0-103.2                         |       | 99.8-102.4                    |       |
| t testi                                     |   | 0.35                              |      |             |      | 1.35                                |       |                               |       |
| F testi                                     |   | 3.03                              |      |             |      | 1.47                                |       |                               |       |
| n <sub>1</sub> =n <sub>2</sub> =5<br>P=0.05 |   |                                   |      |             |      |                                     |       |                               |       |
| t <sub>tablo</sub> : 2.31                   |   |                                   |      |             |      |                                     |       |                               |       |
| F <sub>tablo</sub> : 6.39                   |   |                                   |      |             |      |                                     |       |                               |       |

[\*] Bir tablet 100 mg askorbik asit, 100 mg rutin içermektedir.

#### 4.3. Meyve ve Sebzelerde Askorbik Asit Tayini

##### 4.3.1. Ekstraksiyon

Meyve ve sebzelerde askorbik asit analizlerinde en önemli basamak uygun örnek ekstresinin hazırlanmasıdır. Meyve ve sebzelerden askorbik asidin kantitatif ekstraksiyonu için hava oksijeni, enzim ve diğer oksitleyiciler (Fe, Cu... gibi diğer metal iyonları) tarafından oksitlenmesinin önlenmesi, ölçme kademesi için uygun asitliğin sağlanması ve yüksek pH'daki bozunmanın önlenmesi amacıyla çeşitli asitler ve asit karışımları kullanılmıştır. Bunlar arasında metafosforik asit (61,212-215), asetik asit (61,216), trikloroasetik asit (217-219), oksalik asit (68,217,220,221), sitrik asit (222,223), asetik asit-metafosforik asit (40,82,224,225) çözeltileri en çok kullanılanlardır.

Meyve ve sebzelerde türev spektrofotometrisi ile askorbik asit tayini için uygun ekstraksiyon çözeltisinin saptanmasında: oksalik asit (% 5), trikloroasetik asit (% 5), metafosforik asit (% 6), asetik asit (% 8), sitrik asit (% 5), metafosforik asit-asetik asit (% 3-8 ve % 1.5-4) çözeltilerinin herbiri ile şu işlem yapıldı: Meyve yada sebze örneğinin asitle Bölüm 3.3.4.1.1'de anlatıldığı şekilde yapılan ekstraksiyonu ile elde edilen berrak süzütünün Bölüm 3.3.1'de verilen şartlarda alınan absorpsiyon ve 1.,2.,3. derece türev spektrumları yaklaşık aynı konsantrasyonda askorbik asit içerecek şekilde saf askorbik asitten aynı asit çözeltisi

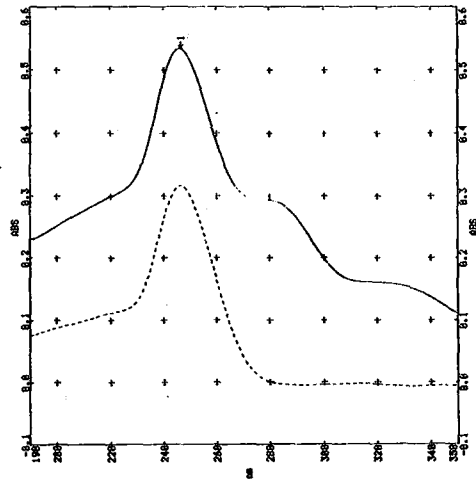
tisi ile hazırlanan çözeltinin spektrumları üst üste kaydedildi. Bu işlem her asit çözeltisi ile incelenen bütün sebze ve meyve örnekleri için tekrarlandı. İncelenen asit çözeltileri arasında metafosforik asit-asetik asit (% 3-8) çözeltisi ile elde edilen meyve ve sebze ekstralelerinin spektrumlarının saf askorbik asidinkine en yakın olması nedeniyle bu karışım uygun ekstraksiyon çözeltisi olarak saptandı. Bu çözeltinin diğer çözeltilere bir üstünlüğü de iyi bir protein çöktürücüsü olması ve bu nedenle berrak çözeltilerin elde edilmesini sağlamasıdır (226). Ayrıca metafosforik asit uygun asitliği sağladığından askorbik asidin oksidatif bozunma hızını azaltmaktadır (24).

#### 4.3.2. Portakalda Askorbik Asit Tayini

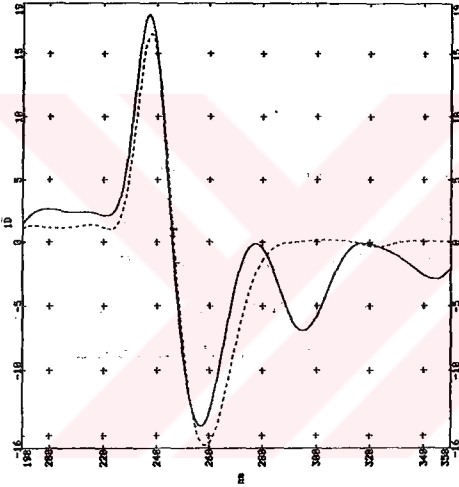
##### 4.3.2.1. Ölçüm

Bölüm 3.3.4.1.2'de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen absorpsiyon ve 1..2..3. derece türev spektrumları Şekil 21-24'de görülmektedir. Bu spektrumların karşılaştırılması sonucu portakalda askorbik asit tayini için 1. derece

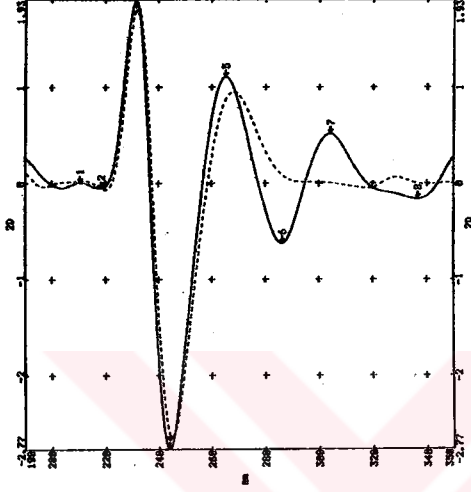




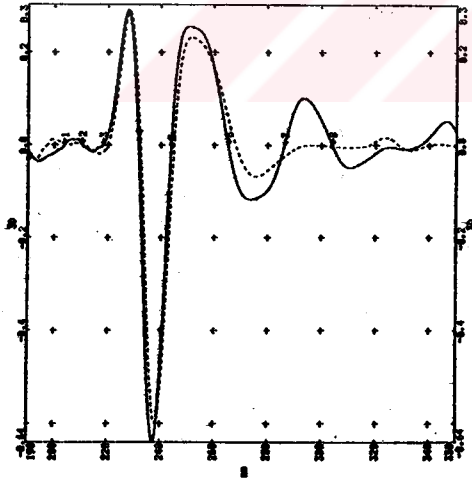
Sekil 21: Portakal ekstresinin (—) ve askorbik asit (---) çözeltisinin absorpsiyon spektrumları



Sekil 22: Portakal ekstresinin (—) ve askorbik asit (---) çözeltisinin 1. derece türev spektrumları



Sekil 23: Portakal ekstresinin (—) ve askorbik asit (---) çözeltisinin 2. derece türev spektrumları



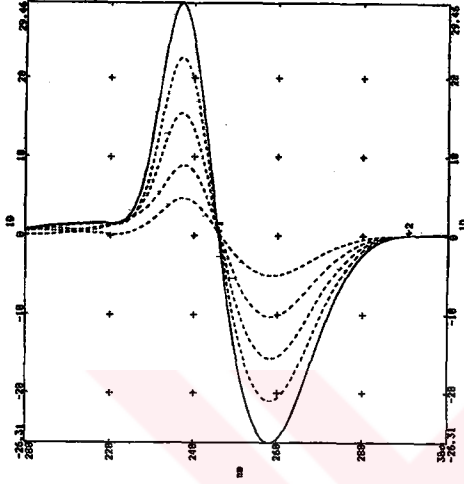
Sekil 24: Portakal ekstresinin (—) ve askorbik asit (---) çözeltisinin 3. derece türev spektrumları

#### 4.3.2.2. Ölçü Eğrisi

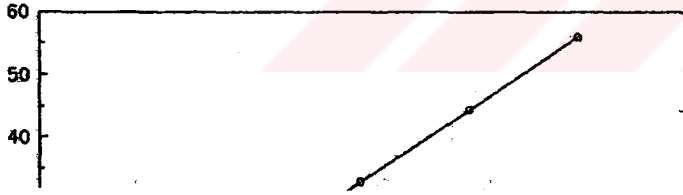
Ölçü eğrisinin hazırlanması için  $2-10 \mu\text{g.ml}^{-1}$  konsantrasyon aralığında hazırlanan askorbik asit çözeltilerinin 1. derece türev spektrumları Şekil 25'de görülmektedir. Ölçü eğrisine ait konsantrasyon ve karşılığı olan birinci derece türev absorbanans ( $^1D$ ) değerleri Tablo 14'de verilmiştir. Bu değerlerle oluşturulan ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler Tablo 15'de verilmiştir. Ortalama  $^1D$  değerlerinden çizilen ölçü eğrisi (Şekil 26) ve bu eğriye ait doğru denklemi portakalda askorbik asit miktarını tayin etmede kullanılmıştır.

#### 4.3.2.3. Yöntemin Portakal Örneğine Uygulanması ve Sonuçların Kıyas Yöntemiyle Elde Edilen Sonuçlarla Karşılaştırılması

Portakal örneğinde askorbik asit tayini Bölüm 3.3.4.1.4'de anlatıldığı gibi yapıldı. Beş paralel tayin yapılarak ve ilgili ölçü eğrisinden (Şekil 26) yararlanarak askorbik asit miktarı hesaplandı. Aynı portakal örneğinde AOAC (61)'de bildirilen yönteme göre askorbik asit tayini yapıldı. Portakal örneğinin geliştirilen yöntem ve kıyas yöntemi ile analizi sonunda elde edilen sonuçlar Tablo 16'da toplu halde verilmiştir. Aynı tabloda beş adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama ( $\bar{X}$ ), standart sapma (S), bağıl standart sapma (%S) ve % 95 güvenirlilik düzeyinde güven aralığı ( $\bar{X} \pm t.s/\sqrt{n}$ ) değerleri verilmiştir.



Sekil 25: Portakal ve karnabaharda askorbik asit tayininde kullanılan ölçü eğrisinin hazırlanması için alınan 1. derece türev spektrumları



Tablo 14: Portakal ve karnabaharda askorbik asit tayininde kullanılan ölçü eğrilerinin 1.türev absorbans değerleri ( $^1D$ ) ve regresyon analizleri

| No                                               | C<br>$\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ | $^1D_1$ | $^1D_2$ | $^1D_3$ | $^1D_4$ | $^1D_5$ | $^1\bar{D}$ | S    | %S   |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|-------------|------|------|
| 1                                                | 2                                 | 9.72    | 9.81    | 10.21   | 11.23   | 10.47   | 10.29       | 0.61 | 5.93 |
| 2                                                | 4                                 | 19.63   | 19.21   | 21.99   | 21.04   | 21.21   | 20.62       | 1.16 | 5.62 |
| 3                                                | 6                                 | 30.59   | 31.07   | 33.63   | 32.15   | 32.60   | 32.01       | 1.21 | 3.79 |
| 4                                                | 8                                 | 41.91   | 43.57   | 44.67   | 44.39   | 44.83   | 43.67       | 1.22 | 2.80 |
| 5                                                | 10                                | 53.99   | 55.76   | 59.81   | 56.89   | 57.96   | 56.88       | 2.20 | 3.87 |
| $^1D_{234-259} = 5.811C - 2.175$<br>$r = 0.9990$ |                                   |         |         |         |         |         |             |      |      |

Tablo 15: Tablo 14'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

|   | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | Ortalama |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|----------|
| a | -2.078 | -3.172 | -2.502 | -1.261 | -2.166 | -2.175   |
| b | 5.541  | 5.902  | 6.094  | 5.734  | 5.930  | 5.811    |
| r | 0.9994 | 0.9979 | 0.9984 | 0.9988 | 0.9992 | 0.9990   |

Tablo 16: Portakalda askorbik asit tayini

| Istatistik parametre-ler                                            | Türev Spektrofoto-metrik Yöntem | AOAC Yöntemi         |
|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| n                                                                   | mg AA/100 g portakal            | mg AA/100 g portakal |
| 1                                                                   | 35.4                            | 35.0                 |
| 2                                                                   | 34.8                            | 34.8                 |
| 3                                                                   | 34.5                            | 34.5                 |
| 4                                                                   | 34.7                            | 34.5                 |
| 5                                                                   | 34.8                            | 34.8                 |
| $\bar{X}$                                                           | 34.8                            | 34.7                 |
| S                                                                   | 0.34                            | 0.22                 |
| % S                                                                 | 0.98                            | 0.63                 |
| $\bar{X} \pm t.s/\sqrt{n}$                                          | 34.4 - 35.2                     | 34.4 - 35.0          |
| t testi                                                             | 0.50                            |                      |
| F testi                                                             | 2.34                            |                      |
| $n_1=n_2=5$<br>$P=0.05$<br>$t_{tablo} = 2.31$<br>$F_{tablo} = 6.39$ |                                 |                      |

Gelistirilen yöntem ve AOAC yöntemiyle elde edilen sonuçlar t testi ile ortalamalar, F testi ile presizyonlar yönünden % 95 güven düzeyinde karşılaştırıldı. Tablo 16' da görüldüğü gibi hesaplanan t ve F değerleri, ilgili güven düzeyi ve beş deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür. Buna göre portakal örneginin analizinde geliştirilen yöntem ve AOAC yöntemi arasında gerek doğruluk gerek presizyon yönünden anlamlı bir fark yoktur.



#### 4.3.3. Kivide Askorbik Asit Tayini

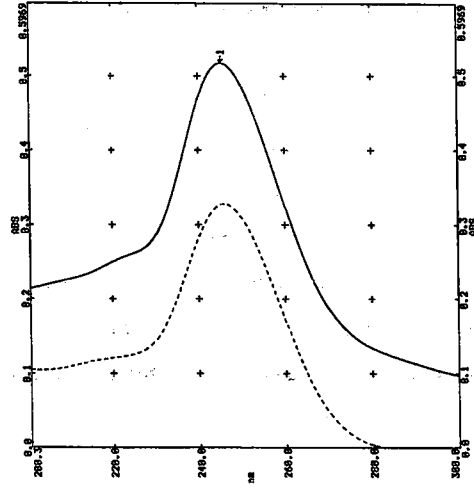
##### 4.3.3.1. Ölçüm

Bölüm 3.3.4.1.2'de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen absorpsiyon ve 1..2. ve 3. derece türev spektrumları Şekil 27-30'da görülmektedir. Bu spektrumların karşılaştırılması sonucu kivide askorbik asit tayini için 3. derece türev spektrumunda 259.4 nm'deki maksimum ile 276.2 nm'deki minimum arasında pik-pik uzunluğunun kivide askorbik asit tayini için uygun olduğu saptandı.

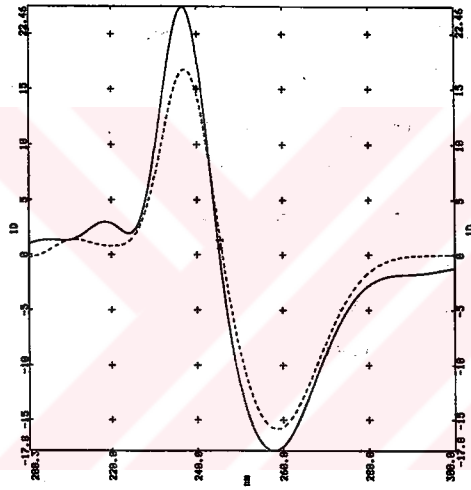
##### 4.3.3.2. Ölçü Eğrisi

Ölçü eğrisinin hazırlanması için 2-10  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  konsantrasyon aralığında hazırlanan askorbik asit çözeltilerinin 3. derece türev spektrumları Şekil 31'de görülmektedir. Ölçü eğrisine ait konsantrasyon ve karşılığı olan üçüncü derece türev absorbans ( $\text{=D}$ ) değerleri Tablo 17' de verilmiştir. Bu değerlerle oluşturulan ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler Tablo 18' de verilmiştir. Ortalama  $\text{=D}$  değerlerinden çizilen ölçü eğrisi (Şekil 32) ve bu eğriye ait doğru denklemini kivide askorbik asit miktarını tayin etmede kullanılmıştır.

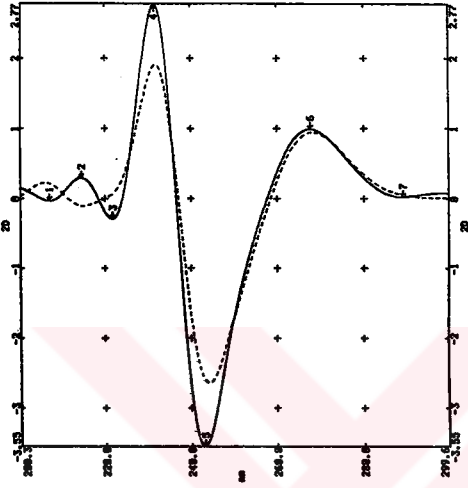




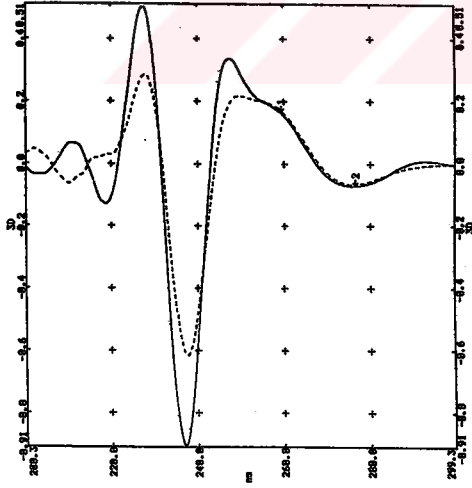
Şekil 27: Kivi ekstresinin (—) ve askorbik asit (---) çözeltisinin absorpsiyon spektrumları



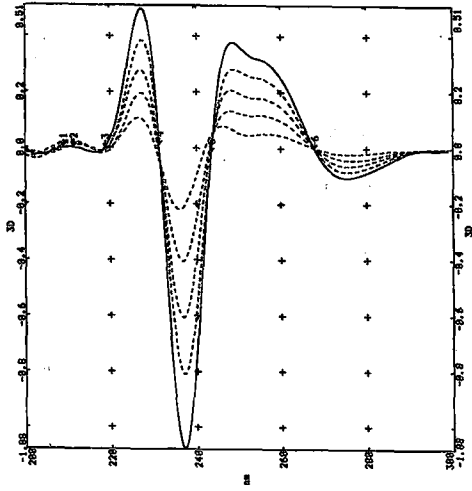
Şekil 28: Kivi ekstresinin (—) ve askorbik asit (---) çözeltisinin 1. derece türev spektrumları



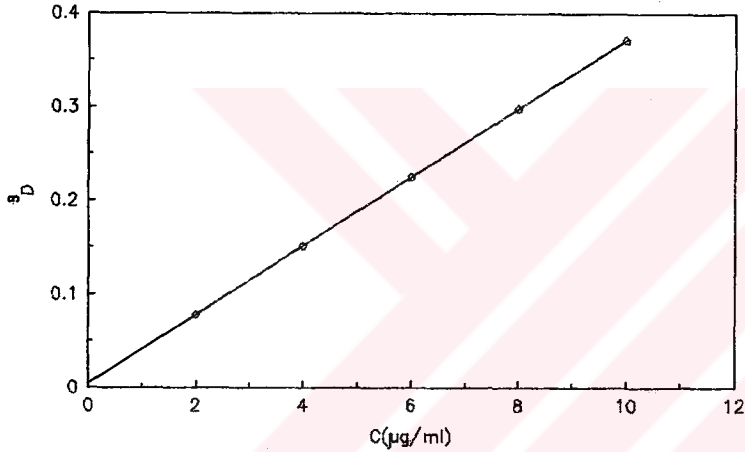
Şekil 29: Kivi ekstresinin (—) ve askorbik asit (---) çözeltisinin 2. derece türev spektrumları



Şekil 30: Kivi ekstresinin (—) ve askorbik asit (---) çözeltisinin 3. derece türev spektrumları



Şekil 31: Kivi ve maydanozda askorbik asit tayininde kullanılan ölçü eğrisinin hazırlanması için alınan 3. derece türev spektrumları



Şekil 32: Kivide askorbik asit tayininde kullanılan ölçü eğrisi  
( $(^3D)_{259.4-276.2} = 0.0367C + 0.0046$ )

Tablo 17: Kivide askorbik asit tayininde kullanılan ölçü eğrilerinin  
3.türev absorbans değerleri ( $^3D$ ) ve regresyon analizleri

| No                                                     | C<br>$\mu\text{g.ml}^{-1}$ | $^3D_1$ | $^3D_2$ | $^3D_3$ | $^3D_4$ | $^3D_5$ | $^3\bar{D}$ | S      | %S   |
|--------------------------------------------------------|----------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|-------------|--------|------|
| 1                                                      | 2                          | 0.0762  | 0.0729  | 0.0790  | 0.0776  | 0.0811  | 0.0774      | 0.0031 | 3.98 |
| 2                                                      | 4                          | 0.1502  | 0.1472  | 0.1527  | 0.1484  | 0.1530  | 0.1503      | 0.0012 | 0.76 |
| 3                                                      | 6                          | 0.2236  | 0.2241  | 0.2263  | 0.2274  | 0.2370  | 0.2277      | 0.0055 | 2.39 |
| 4                                                      | 8                          | 0.2910  | 0.2862  | 0.3017  | 0.2959  | 0.3110  | 0.2972      | 0.0096 | 3.24 |
| 5                                                      | 10                         | 0.3609  | 0.3624  | 0.3748  | 0.3671  | 0.3884  | 0.3707      | 0.0110 | 3.04 |
| $^3D_{295.4-276.2} = 0.0367C + 0.0046$<br>$r = 0.9998$ |                            |         |         |         |         |         |             |        |      |

Tablo 18: Tablo 17'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait  
parametreler

|   | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | Ortalama |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|----------|
| a | 0.0073 | 0.0032 | 0.0047 | 0.0053 | 0.0023 | 0.0046   |
| b | 0.0355 | 0.0359 | 0.0370 | 0.0363 | 0.0386 | 0.0367   |
| r | 0.9998 | 0.9995 | 0.9999 | 0.9998 | 0.9998 | 0.9998   |

#### 4.3.3.3. Yöntemin Kivi Örneğine Uygulanması ve Sonuç- ların Kıyas Yöntemiyle Elde Edilen Sonuçlarla Karşılaştırılması

Kivi örneğinde askorbik asit tayini Bölüm 3.3.4.1.4' de anlatıldığı gibi yapıldı. Beş paralel tayin yapılarak ve ilgili ölçü eğrisinden (Şekil 32) yararlanarak askorbik asit miktarı hesaplandı. Aynı kivi örneğinde AOAC (61)'de bildirilen yönteme göre askorbik asit tayini yapıldı.

Kivi örneğinin geliştirilen yöntem ve kıyas yöntemi ile analizi sonunda elde edilen sonuçlar Tablo 19' da verilmiştir. Aynı tabloda beş adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama ( $\bar{X}$ ), standart sapma (S), bağıl standart sapma (%S) ve % 95 güvenirlilik düzeyinde güven aralığı ( $\bar{X} \pm t.s/\sqrt{n}$ ) değerleri verilmiştir.

Geliştirilen yöntem ve AOAC yöntemiyle elde edilen sonuçlar t testi ile ortalamalar, F testi ile presizyonlar yönünden % 95 güven düzeyinde karşılaştırıldı. Tablo 19' da görüldüğü gibi hesaplanan t ve F değerleri, ilgili güven düzeyi ve beş deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür. Buna göre kivi örneğinin analizinde geliştirilen yöntem ve AOAC yöntem arasında gerek doğruluk gerek presizyon yönünden anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür.

Tablo 19: Kivide askorbik asit tayini

| İstatistik parametre-ler | Türev Spektrofotometrik Yöntem | AOAC Yöntemi     |
|--------------------------|--------------------------------|------------------|
| n                        | mg AA/100 g kivi               | mg AA/100 g kivi |
| 1                        | 74.6                           | 74.9             |
| 2                        | 73.7                           | 74.3             |
| 3                        | 74.0                           | 73.7             |
| 4                        | 75.0                           | 73.7             |
| 5                        | 74.0                           | 74.3             |
| $\bar{X}$                | 74.3                           | 74.2             |
| s                        | 0.53                           | 0.50             |

#### 4.3.4. Karnabaharda Askorbik Asit Tayini

##### 4.3.4.1. Ölçüm

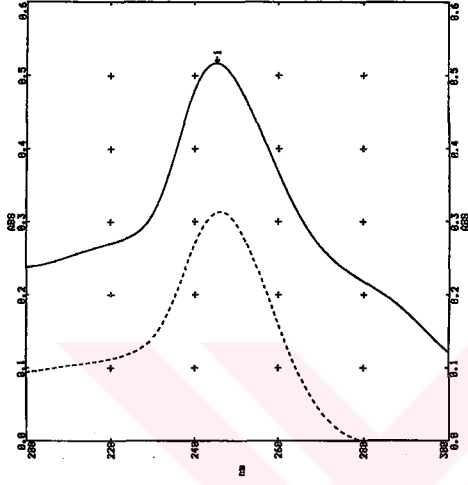
Bölüm 3.3.4.1.2'de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen absorpsiyon ve 1.,2.,3. derece türev spektrumları Şekil 33-36'da görülmektedir. Bu spektrumların karşılaştırılması sonucu karnabaharda askorbik asit tayini için 1. derece türev spektrumunda 236 nm'deki maksimum ile 259 nm'deki minimum arasındaki pik-pik uzunluğunun karnabaharda askorbik asit tayini için uygun olduğu saptandı.

##### 4.3.4.2 Ölçü Eğrisi

Bölüm 4.3.2.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanan ölçü eğrisi (Şekil 26) karnabaharda askorbik asit miktarını tayin etmede kullanıldı.

##### 4.3.4.3. Yöntemin Karnabahar Örneğine Uygulanması ve Sonuçların Kıyas Yöntemiyle Elde Edilen Sonuçlarla Karşılaştırılması

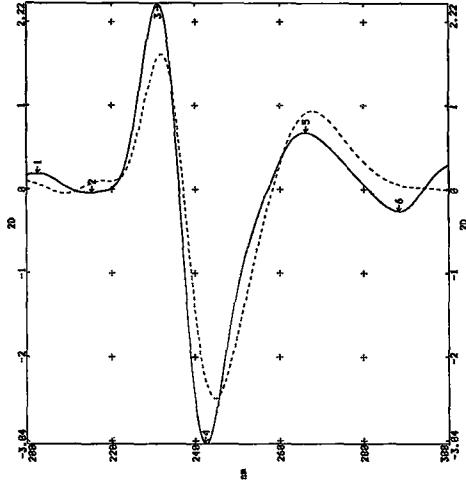
Karnabahar örneğinde askorbik asit tayini Bölüm 3.3.4.1.4'de anlatıldığı gibi yapıldı. Beş paralel tayin yapılarak ve ilgili ölçü eğrisinden (Şekil 26) yararlanarak askorbik asit miktarı hesaplandı. Aynı karnabahar örneğinde AOAC (61)'de bildirilen yönteme göre askorbik asit tayini yapıldı.



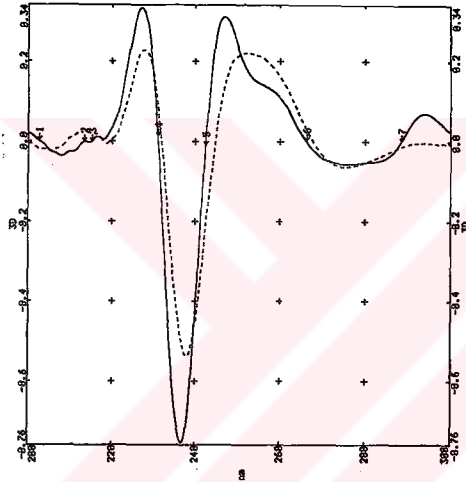
Şekil 33: Karnabahar ekstresinin (—) ve askorbik asit (---) çözeltisinin absorpsiyon spektrumları

280 260 240 220 200





Şekil 35: Karnabahar ekstresinin (—) ve askorbik asit (---) çözeltisinin 2. derece türev spektrumları



Şekil 36: Karnabahar ekstresinin (—) ve askorbik asit (---) çözeltisinin 3. derece türev spektrumları

Bu iki yöntemle elde edilen sonuçlar, bunların istatistik değeriendirilmesi, t ve F testleri sonuçları Tablo 20' de toplu halde verilmiştir. Tablo 20' den anlaşılacağı gibi, geliştirilen yöntem AOAC yöntemi ile kıyaslandığında t değeri % 95 olasılık için verilen tablo değeriinden küçüktür. Yani ortalamalar birbirinden anlamlı derecede farklı değildir. Yöntemlerin presizyon yönünden karşılaştırılması için uygulanan F testi sonucuna bakıldığında % 95 olasılık ve  $n_1=n_2=5$  için ilgili cetvelde F için verilen sınır değeriinden küçük olduğu görülr. Buna göre her iki yöntem ile elde edilen presizyonlar arasındaki fark anlamlı değildir.

Tablo 20: Karnabaharda askorbik asit tayini

| Istatistik parametre-ler   | Türev Spektrofotometrik Yöntem | AOAC Yöntemi          |
|----------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| n                          | mg AA/100g karnabahar          | mg AA/100g karnabahar |
| 1                          | 29.4                           | 29.6                  |
| 2                          | 29.8                           | 29.9                  |
| 3                          | 30.0                           | 29.3                  |
| 4                          | 29.7                           | 29.6                  |
| 5                          | 29.6                           | 29.6                  |
| $\bar{X}$                  | 29.7                           | 29.6                  |
| S                          | 0.22                           | 0.21                  |
| % S                        | 0.74                           | 0.71                  |
| $\bar{X} \pm t.s/\sqrt{n}$ | 29.4 - 30.0                    | 29.4 - 29.8           |
| t testi                    | 0.66                           |                       |
| F testi                    | 1.10                           |                       |
| $n_1=n_2=5$<br>P=0.05      | $t_{tablo} = 2.31$             | $F_{tablo} = 6.39$    |

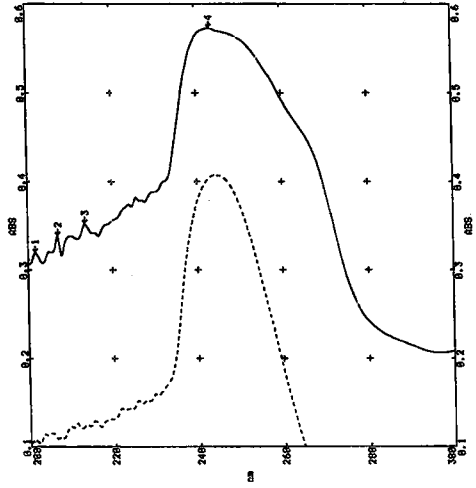
#### 4.3.5. Maydanozda Askorbik Asit Tayini

##### 4.3.5.1. Ölçüm

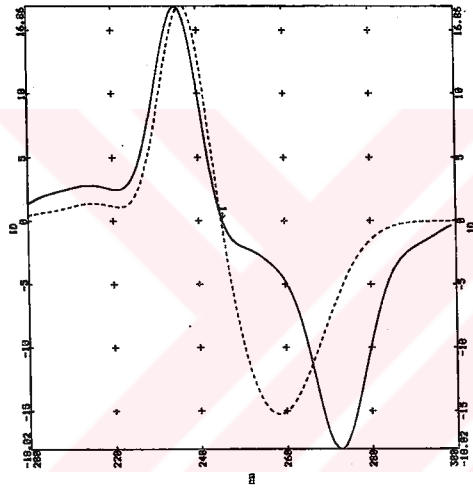
Bölüm 3.3.4.1.2'de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen absorpsiyon ve 1.,2.,3. derece türev spektrumları Şekil 37-40'de görülmektedir. Bu spektrumların karşılaştırılması sonucu maydanozda askorbik asit tayini için 3. derece türev spektrumunda 227 nm'deki maksimum ile 237 nm'deki minimum arasındaki pik-pik uzunluğunun maydanozda askorbik asit tayini için uygun olduğu saptandı.

##### 4.3.5.2. Ölçü Eğrisi

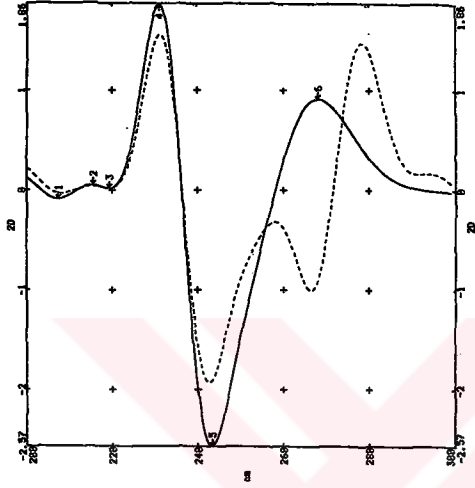
Ölçü eğrisinin hazırlanması için  $2-8 \mu\text{g.ml}^{-1}$  konsantrasyon aralığında hazırlanan askorbik asit çözeltilerinin 3. derece türev spektrumları Şekil 31'de görülmektedir. Ölçü eğrisine ait konsantrasyon ve karşılığı olan üçüncü derece türev absorbans ( $\Sigma D$ ) değerleri Tablo 21' de verilmiştir. Bu değerlerle oluşturulan ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler Tablo 22' de verilmiştir. Ortalama  $\Sigma D$  değerlerinden çizilen ölçü eğrisi (Şekil 41) ve bu eğriye ait doğru denklemi maydanozda askorbik asit miktarını tayin etmede kullanılmıştır.



Şekil 37: Maydanoz ekstresinin (—) ve askorbik asit (---) çözeltisinin absorpsiyon spektrumları



Şekil 38: Maydanoz ekstresinin (—) ve askorbik asit (---) çözeltisinin 1. derece türev spektrumları



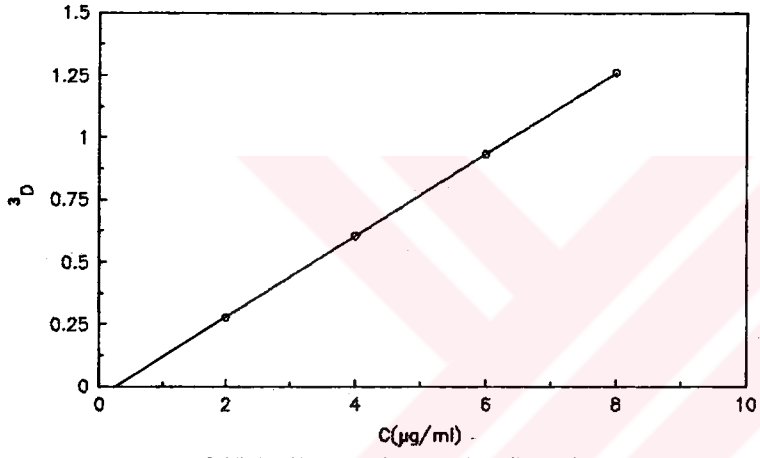
Sekil 39: Maydanoz ekstresinin (—) ve askorbik asit (---) çözeltilisinin 2. derece türev spektrumları

Tablo 21: Maydanozda askorbik asit tayininde kullanılan ölçü eğrileri-  
nin 3.türev absorbens değerleri ( $^3D$ ) ve regresyon analizleri

| No                                                 | C<br>µg.ml | $^3D_1$ | $^3D_2$ | $^3D_3$ | $^3D_4$ | $^3D_5$ | $^3\bar{D}$ | S     | %S    |
|----------------------------------------------------|------------|---------|---------|---------|---------|---------|-------------|-------|-------|
| 1                                                  | 2          | 0.3294  | 0.2523  | 0.3271  | 0.2646  | 0.3032  | 0.2953      | 0.035 | 12.00 |
| 2                                                  | 4          | 0.6040  | 0.5769  | 0.5527  | 0.5663  | 0.6196  | 0.5839      | 0.027 | 4.70  |
| 3                                                  | 6          | 0.8878  | 0.8840  | 0.9190  | 0.9597  | 0.9657  | 0.9232      | 0.039 | 4.18  |
| 4                                                  | 8          | 1.1967  | 1.2508  | 1.2484  | 1.3438  | 1.3267  | 1.2733      | 0.061 | 4.78  |
| $^3D_{227-237} = 0.1637C - 0.0494$<br>$r = 0.9990$ |            |         |         |         |         |         |             |       |       |

Tablo 22: Tablo 21'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait  
parametreler

|   | 1      | 2       | 3       | 4       | 5       | Ortalama |
|---|--------|---------|---------|---------|---------|----------|
| a | 0.0330 | -0.0847 | -0.0208 | -0.1242 | -0.0504 | -0.0494  |
| b | 0.1443 | 0.1651  | 0.1565  | 0.1816  | 0.1708  | 0.1637   |
| r | 0.9996 | 0.9993  | 0.9957  | 0.9983  | 0.9996  | 0.9990   |



Şekil 41: Maydanozda askorbik asit tayininde  
kullanılan ölçü eğrisi  
( $^3D_{227-237} = 0.1637C - 0.0494$ )



#### 4.3.5.3. Yöntemin Maydanoz Örneğine Uygulanması ve Sonuçların Kıyas Yöntemiyle Elde Edilen Sonuçlarla Karşılaştırılması

Maydanoz örneğinde askorbik asit tayini Bölüm 3.3.4.1.4 'de anlatıldığı gibi yapıldı. Beş paralel tayin yapılarak ve ilgili ölçü eğrisinden (Şekil 41) yararlanarak askorbik asit miktarı hesaplandı. Aynı maydanoz örneğinde AOAC (61)' de verilen yöntemle göre askorbik asit tayini yapıldı.

Bu iki yöntemle elde edilen sonuçlar, bunların istatistik değerlendirilmesi, t ve F testleri sonuçları Tablo 23' de toplu halde verilmiştir. Tablo 23' den anlaşılabacağı gibi, geliştirilen yöntem AOAC yöntemi ile kıyaslandığında t değeri % 95 olasılık için verilen tablo değerinden küçüktür. Yani ortalamalar birbirinden anlamlı derecede farklı değildir. Yöntemlerin presizyon yönünden karşılaştırılması için uygulanan F testi sonucuna bakıldığında % 95 olasılık ve  $n_1=n_2=5$  için ilgili tabloda F için verilen sınır değerinden küçük olduğu görülür. Buna göre her iki yöntem ile elde edilen presizyonlar arasındaki fark anlamlı değildir.

Tablo 23: Maydanozda askorbik asit tayini

| İstatistik parametre-ler | Türev Spektrofotometrik Yöntem | AOAC Yöntemi         |
|--------------------------|--------------------------------|----------------------|
| n                        | mg AA/100 g maydanoz           | mg AA/100 g maydanoz |
| 1                        | 175.1                          | 173.9                |
| 2                        | 172.1                          | 171.4                |
| 3                        | 173.9                          | 171.4                |
| 4                        | 170.7                          | 173.9                |
| 5                        | 172.8                          | 171.4                |
| $\bar{X}$                | 172.9                          | 172.4                |

## 5. TARTIŞMA

Farmasötik preperatlarda ve doğal ürünlerde askorbik asit tayini oldukça önemlidir. Literatürde tabletlerde ve meyve, sebze örneklerinde askorbik asidin kantitatif tayini için verilen yöntemlerin çoğu (102, 107, 186, 207) İTK veya solvent ekstraksiyonu ile ayırma işleminden sonra spektrofotometrik, dansitometrik, kromatografik ölçümler ile kantitatif tayin olarak iki aşamalıdır. Ayırma işlemi zaman gerektirmekte, solvent ekstraksiyonu ile yapılan ayırmalarda ise hem zaman hem madde kaybı olmaktadır.

Direkt ultraviyole spektrofotometrik tayinlerde (63) ise termal bozundurma, katalitik dönüşüm, ultraviyole ışın ile bozundurma ve alkali ile muamele gibi zemin düzeltmeleri yaptıktan sonra ölçümler yapılmıştır.

Çalışmalarımız türev spektrofotometrik yöntemin uygulanmasıyla bu ortamlarda ayırma ve zemin düzeltme işlemlerine gerek kalmadan askorbik asit tayininin mümkün olduğunu göstermiştir. Herhangi bir belirteç kullanılmaksızın askorbik asit-asetilsalisilik asit içeren tabletlerden 0.1 N  $H_2SO_4$  ile, askorbik asit-rutin içeren tabletlerden metanol ile, meyve ve sebze örneklerinden ise metafosforik asit-asetik asit çözeltisi ile hazırlanan ekstrelerin türev spektrumları alınmıştır. Bu durumda yapılan işlemler basitleşmekte ve analiz süresi kısalmaktadır.

Çalışmalarımızda ekstraksiyon çözeltisi olarak litera-

türde bildirilen çözeltiler arasından metafosforik asit-asetik asit (%3-%8)'in seçilmesi ile proteinlerin tam olarak çöktürülmesi sağlanmıştır.

Askorbik asidin ilaç preperatlarında tayini için USP'de meyve ve sebzelerdeki tayini için AOAC'de önerilen; 2,6-DCPIP 'ün titrant olarak kullanıldığı titrimetrik yöntem çabuk olmasına rağmen gerek titrantın dayanıksızlığı gerekse renkli çözeltilerde indofenolün renk değişimini görmek zor olduğu için titrasyon sırasında indirgenen boyanın organik çözücü ile ekstre edilerek renk dönüşümünün organik fazda görülmesi zorunluluğu bu yöntemin dezavantajlarıdır. Ayrıca bu yöntemin tayin sınırı ( $2 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) türev spektrofotometrik yöntemle oranla hayli yüksektir.

Türev spektrofotometrisi ile bulunan sonuçların kıyaslanması amacıyla tabletler USP XXI'de, her bir meyve ve sebze örneği AOAC'de önerilen yöntemlerle analiz edilmiştir. Her iki yöntemle elde edilen sonuçların 5 deneme üzerinden standart sapma, bağıl standart sapma ve %95 olasılık düzeyinde güven sınırları hesaplanarak yapılan istatistik değerlendirmeler geliştirilen yöntem ile kıyas yöntemleri arasında gerek ortalamalar ve gerekse standart sapmalar yönünden anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir. Bu bakımdan geliştirilen türev spektrofotometrik yöntem basit, hızlı, duyarlı, ekonomik ve tekrarlanabilirliği yüksek bir yöntem olarak laboratuvar da askorbik asit-asetilsalisilik asit veya askorbik asit-rutin içeren tabletlerin analizlerinde ve meyve ve sebzelerde askorbik asit tayininde tercihan kullanılabilir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Baysal. A., Beslenme. Hacettepe Univ. Yayını A/13. Ankara. 228 (1984)
2. Othmer, K., Othmer, D.F., Encyclopedia of Chemical Technology, Edited by Raymond, E., Ing-New York, Vol.2, 151 (1955)
3. King, C.G. ve Waugh, W.A., Science, 75, 357 (1932)
4. Budavari, S., Editor Maryodele, J.O'Neil., Merck Index Merck Co., Inc. RAHWAY, N.J., U.S.A., 130 (1989)
5. Lewin, S., Vitamin C. Its Molecular Biology and Medical Potential, A Subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich Publishers, Academic Press, London, New York, San Francisco, 6 (1970)
6. Clarke, E.G.C., Clarke's Isolation and Identification of Drugs, The Pharmaceutical Press, London, 360 (1975)
7. Analytical Profiles of Drug Substances, Academic Press, edited by Klaus Florey, Vol.11, 51 (1982)
8. Aras, K., Tıbbi Biokimya Vitaminler, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1, 96, 126 (1976)
9. Pauling, L., Funkts.Biokhim.Kl'etochnykh Strukt., (7-32), 427 (1970). -Ref., C.A., 75, 74523x (1971)
10. Pauling, L., Proc.Nat.Acad.Sci.U.S., 68(11), 2678 (1971). -Ref., C.A., 75, 80938u (1971)
11. Hogenkamp, H.P.C., Amer.J.Clin.Nutr., 33, 1 (1980). -Ref., C.A., 92, 127278b (1980)
12. Lykko, H.C. ve Hartmann, J.X., J.theor.Biol., 83, 675 (1980) -Ref., C.A., 93, 69132g (1980)

13. Kayaalp, O., Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Garanti Basımevi, Ankara, Cilt 2, 1500 (1978)
14. Mc Graw-Hill, Encyclopedia of Science ve Technology, Mc Graw-Hill Inc-United States of America, 14, 339 (1960-1966)
15. Kaya, S., İstanbul'da Satılan Çeşitli Meyvelerdeki C Vitamini Miktarları, İhtisas tezi, 23 (1973)
16. Counsell, J.N. ve Horning, D.H., Vitamin C, Applied Science Publishers London and New Jersey, 501 (1981)
17. Pauling, L., Proc.Nat.Acad.Sci..Washington, 67,1643 (1970) -Ref..C.A., 74, 5101u (1971)
18. Tekeli, S.T., A.U. Ziraat Fakültesi Yıllığı,3, 525(1968)
19. Namyslowski, L., Roczniki Panstwowego Zakladu Hig., 7,97 (1956).-Ref..C.A., 51, 4518 (1957)
20. Baker, M.E., Hodges, R.E. ve Ganham, E.J., Amer. J. Clin. Nutr., 24, 444 (1971).-Ref..C.A., 74, 2052r (1971)
21. Hodges, E.R. ve Baker, M.E., Amer. J. Clin. Nutr., 24, 431 (1971).-Ref..C.A., 74, 137310y (1971)
22. Özgür, T., Okul Çocuklarında A Vitaminozlar ve Önlenme

27. Kovatscheva, E., Popova, J., Kratschanova, M., Ivanova, V.,  
Nahrung, 27, 9 (1983).-Ref., C.A., 98, 196468z (1983)
28. The Pharmacopoeia of the United States of America XIX,  
Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1975)
29. The Pharmacopoeia of the United States of America XX,  
Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1980)
30. The United States Pharmacopoeia XXI, United States  
Pharmacopoeial Convention, Inc. Rockville, (1985)
31. The British Pharmacopoeia, Her Majesty's Stationary Office,  
Cambridge, (1973)
32. The British Pharmacopoeia, Her Majesty's Stationary Office,  
Cambridge, (1980)
33. The British Pharmacopoeia, Her Majesty's Stationary Office,  
Cambridge, (1988)
34. Burger, N. ve Kara-Gasperec, V., Talanta, 20, 782 (1973)
35. Aly, M.M., Anal.Chim.Acta, 106, 379 (1979)
36. Okamura, M., Clin.Chim.Acta 103(3), 259 (1980).-Ref., C.A.,  
93, 65155u (1980)
37. Jaselskis, B. ve Nelapaty, J., Anal.Chem., 44, 379 (1972)
38. Al-Zamil, I.Z., Al-Hajjaji, M.A., Al-Tamrah, S.A., Aziz-  
Alrahman, A.M., Sultan, S.M., Orient.J.Chem., 2(1),  
6 (1986).-Ref., C.A., 104, 147277v (1986)
39. Thompsen, J.C. ve Mottola, H.A., Anal.Chem., 56, 755 (1984)
40. Baker, W.L. ve Lowe, T., Analyst, 110(10) 1189 (1985)
41. Shieh, H. ve Sweet, T.R., Anal.Biochem., 96, 1 (1979).  
-Ref., C.A., 91, 78968v (1979)
42. Schmall, M., Pifer, C.W. ve Wollish, E.G., Anal.Chem.,  
25, 1486 (1953)

43. Schmall, M., Pifer, C.W., Wollish, E.G., Buschinsky, R.  
ve Gainer, H., Anal.Chem., 26, 1520 (1954)
44. Hashmi, M.H., Shahid, M.A., Akhtar, M.A. ve Chughtai, N.  
A., Microchim.Acta, 901 (1973)
45. Pachla, L.A., Reynolds, D.L. ve Kissinger, P.T., J.Assoc.Off.  
Anal.Chem., 68, 1 (1985)
46. Ping, H., Yin, G., Sepu, 5(3), 166 (1987).-Ref., C.A.,  
107, 121187c (1987)
47. Tillmans, J., Hirsch, P. ve Jackish, J., Z. Untersuch  
Lebensm., 63, 241 (1932).-Ref., C.A., 26, 5619 (1932)
48. Andryushchenko, V.K., Zhuchenko, A.A., Syrovatskaya, A.P.  
, Butkevich, S.T., Didenko, I.V., Konservn. Ovoshchesush.  
Prom-st., (9), 38 (1974).-Ref., C.A., 82, 2707c (1975)
49. Röhle, J., Voight, F., Nahrung, 28(5), 579 (1984)
50. Chatterjee, P.K., Sethi, P.D., Sharma, S.C., Indian J.  
Pharm. Sci., 47(2), 40 (1985)
51. Verma, K.K., Gulati, A.K., Anal.Chem., 52(15), 2336 (1980)
52. Silva, A.B., Martins Neto, J.P., Silva, E.M., Rev.Quim.  
Ind. (Rio de Janeiro), 54(641), 11 (1985).-Ref., C.A.,  
104, 18701e (1986)
53. Lazaro, F., Luque de Castro, M.D., Valcarcel, M., Analisis,  
15(4), 183 (1987).-Ref., C.A., 107, 132756p (1987)
54. Rukmini, N., Kavitha, V.S.N.P., Vijaya, K., Devendra.  
Talanta, 28(5), 332 (1981)
55. Aminuddin, M., Asma, R.N., Siddiq, M., Pak.J.Sci.Ind.  
Res., 28(5), 364 (1985).-Ref., C.A., 104, 184955k (1986)



56. Baveja, S.K., Gupta, A.K.. *Pharmacos*, 18, 40 (1973).  
-Ref.,C.A., 81, 82441d (1974)
57. Puzanowska-Tarasiewicz, H., *Acta Pol.Pharm.*, 30(1),  
67 (1973).-Ref.,C.A., 79, 15394m (1973)
58. Mostafa, M.A.F., El-Aassar, S.T., *Arch.Exp.Veterinaarmed*,  
31(4), 567 (1977).-Ref.,C.A., 88, 132800n (1978)
59. Wang, J., Su, H., *Yaowu Fenxi Zazhi*, 2(5), 306 (1982).  
-Ref.,C.A., 98, 113807k (1983)
60. Rao, S.N., Ramamoorthy, M.M., Chandra, N.R., Dar, R.N..  
*Indian J.Pharm.*, 37(4), 98 (1975)
61. Horwitz, W., *Official Methods of Analysis* (1980).  
AOAC, Arlington, VA, secs 43.056-43.057
62. Baczyk, S., Swidzinska, K., *Farm.Pol.*, 31(5), 399 (1975).  
-Ref.,C.A., 82, 197881f (1975)
63. Fung, Y.S., Luk, S.F.. *Analyst*, 110(2), 201 (1985).
64. Mit'kina, L.I., Renkova, Z.S., Zhilina, O.D., *Farmatsiya*,  
34(1), 42 (1985).-Ref.,C.A., 102, 137900n (1985)
65. Lau, O.W., Luk, S.F., Wong, K.S., *Analyst*, 112(7), 1023 (1987)
66. Peng, Y., Shi, Y., *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli*  
*Jinzhan*, 16(3), 230 (1989).-Ref.,C.A., 112, 34506r (1990)
67. El Sadek, M., Salem, H., Aboul, K., *A.Spectrosc.Lett.*,  
23(1), 77 (1990).-Ref.,C.A., 112, 240602x (1990)
68. Lage, A., Simal, J., Toca, M.J., *An.Bromatol.*, 32(4),  
353 (1980)
69. Hernandez, R., Bosch, F., *Ars Pharm.*, 15, 39 (1974).  
-Ref.,C.A., 83, 120931q (1975)
70. Hoffman, M., Bar-Akiva, A., Tenhum, L. ve Berkenstadt, Y.,

- Anal Biochem., 38, 35 (1970).-Ref., C.A., 73, 129619v (1970)
71. Egberg, D.C., Larson, P.A. ve Honold, G.R., J.Sci.Food Agric., 24, 789 (1973)
72. Rosenfeld, H., J.Meld.Nor.Landbrukshoegsk., 56(12), 22 (1977).-Ref., C.A., 89, 103035g (1978)
73. Andrews, G.R., Euphytica, 28(3), 751 (1979).-Ref., C.A., 92, 145090p (1980)
74. Butts, W.C. ve Mulvihill, H.J., Clin.Chem., 21, 1493 (1975).-Ref., C.A., 83, 189990a (1975)
75. Lau, O.W., Luk, S.F., J.Assoc.Off.Anal.Chem., 70(3), 518 (1987).-Ref., C.A., 107, 57553q (1987)
76. Besada, A., Talanta, 34(8), 731 (1987)
77. Buhl, F., Mikula, B., Chem.Anal., 33(1), 103 (1988).-Ref., C.A., 110, 230237b (1989)
78. Anvar, J., Farooqi, M.I., Nagra, S.A., Khan, A.M., J.Chem. Soc.Pak., 12(1), 75 (1990).-Ref., C.A., 113, 138628u (1991)
79. Barbas Pardillo, M., Peris Martinez, V., Gimeno Adelantado, J.V., Bosch Reig, F., Microchem.J., 40(1), 109 (1989).-Ref., C.A., 111, 160366n (1989)
80. Herrmann, J., Zobel, M., Z.Lebensm.Unters.Forsch., 166, 477 (1962).-Ref., C.A., 57, 3730f (1962)
81. Elnenaey, E.S., Soliman, R., Talanta, 26(12), 1164 (1979)
82. Bajaj, K.L., Kaur, G., Analyst, 106(1258), 117 (1981)
83. Thind, P.S., Kumar, S., Indian Drugs, 21(4), 153 (1984).-Ref., C.A., 101, 43664r (1984)
84. Emel'yanenko, K.V., Farm.Zh.(Kiev), 2, 73 (1986).-Ref., C.A., 105, 49135y (1986)

85. Homann, T., Engel, W., Fickweiler, E., Zentralbl.Pharm.  
.Pharmakother Laboratoriumsdiagn., 121(11), 1091 (1982).  
-Ref..C.A., 98, 78213q (1983)
86. Li, C., Wei, L., Chen, J., Shipin Kexue, 90, 57 (1987).  
-Ref..C.A., 107, 234990c (1987)
87. White, V.R., Fitzgerald, J.M., Anal.Chem., 44, 1267 (1972)
88. Frigola Canoves, A.M., Bosch Serrat, F., An.Bromatol.,  
40(1), 79 (1988).-Ref..C.A., 110, 73933f (1989)
89. Al-Tamrah, S.A., Anal.Chim.Acta, 209(1-2), 309 (1988)
90. Eldeway, M.A., Tawfik, A.S. ve Elshabouri, S.R.,  
Anal.Chem., 47, 461 (1975)
91. Kamangar, T., Fawzi, A.B. ve Manghssoudi, R.H., J.Assoc.Off.  
Anal.Chem., 60, 528 (1977).-Ref..C.A., 87, 37463a (1977)
92. Wilson, S. ve Guillan, R.A., Clin.Chem., 15, 282 (1969).  
-Ref..C.A., 71, 666n (1969)
93. Reddy, M.N., Mohan, G.K., Singh, N.R.P., Sankar, D.G.,  
Indian Drugs, 25(5), 204 (1988).-Ref..C.A., 108, 173630g (1988)
94. Muralikrishna, U., Murty, J.A., Analyst, 114(3), 407 (1989)
95. Qureshi, S.Z., Saeed, A., Haque, S., Bahman, N., Anal.  
Lett., 23(6), 995 (1990).-Ref..C.A., 113, 186624q (1991)
96. Sweeley, C.C., Bentley, R., Makita, M. ve Wells, W.W.,  
J.Am.Chem.Soc., 85, 2497 (1963)
97. Dalglish, C.E., Horning, E.C., Horning, M.G., Knox, K.L.  
ve Yarger, K., Biochem.J., 101, 792 (1966).-Ref..C.A.,  
65, 20488b (1966)
98. Allison, J.H., Stewart, M.A., Anal.Biochem., 43, 401 (1971).  
-Ref..C.A., 75, 126372q (1971)

99. Schlack, J.E., J.Assoc.Off.Agric.Chem., 57(6), 1346 (1974).  
-Ref., C.A., 82, 71674b (1975)
100. Vecchi, M. ve Kaiser, K., J.Chromatogr., 26, 22 (1967)
101. Gerstl, R., Ranfft, K., Z.Lebensm-Unters.Forsch.,  
154(1), 12 (1974).-Ref., C.A., 80, 131709n (1974)
102. Kouimtzis, A., Papadoyannis, I.N., Microchim.Acta,  
1(1-2), 145 (1979).-Ref., C.A., 90, 99480z (1979)
103. Hoppe, A., Reimerdes, E.H., Reuter, H., Milchwissenschaft,  
34(5), 263 (1979).-Ref., C.A., 91, 54677y (1979)
104. Jarzebinski, J., Lugowska, E., Acta Pol.Pharm., 46(2),  
160 (1989).-Ref., C.A., 112, 25799m (1990)
105. Ni, Q., Song, X., Yu, X., Chen, Y., Yu, R., Nanjing Yaoxueyuan  
Xuebao, 16(2), 27 (1985).-Ref., C.A., 104, 24241v (1986)
106. El Sadek, M., El Shanaway, A., Aboul Khier, A., Ruecker, G.,  
Analyst, 115(9), 1181 (1990)
107. Mandrou, B., Charlet, C., Tsobze, A.D., Ann.Falsif.Expert.Chim.  
Toxicol., 81(870), 323 (1988).-Ref., C.A., 112, 25799m (1990)
108. Pachla, L.A. ve Kissinger, P.T., Anal.Chem., 48, 364 (1976)
109. Tsao, C.S., Salimi, S.L., J.Chromatogr., 224, 477 (1981)
110. Tsao, C.S. ve Salimi, S.L., J.Chromatogr., 245, 355 (1982)
111. Sood, S.P., Sartori, L.E., Wittmer, D.P. ve Haney, W.G.,  
Anal.Chem., 48, 796 (1976)
112. Jenkins, C., Pharm.Technol.March., 53 (1982).-Ref., C.A.,  
96, 168804w (1982)
113. Ashoor, S.H., Monte, W.C., Welty, J., J.Assoc.Off.Anal.  
Chem., 67(1), 78 (1984).-Ref., C.A., 100, 173258b (1984)

114. Maeda, Y., Ochi, S., Masui, T., Matubara, S., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 71(3), 502 (1988). -Ref., C.A., 109, 36705s (1988)
115. Carnevale, J., Food Technol. Aust., 32(6), 302 (1980). -Ref., C.A., 93, 148240u (1980)
116. Augustin, J., Beck, C., Mauroesek, G.I., J. Food Sci., 46, 312 (1981). -Ref., C.A., 94, 82298f (1981)
117. Lockhart, G.L., Hall, S.B., Finney, K.F., Cereal Chem., 59(1), 69 (1982). -Ref., C.A., 96, 120999m (1982)
118. Lloyd, L.L., Warner, F.P., Kennedy, J.F., White, C.A., J. Chromatogr., 437(2), 447 (1988)
119. Bushway, R.J., King, J.M., Perkins, B., Krishnan, M., J. Liq. Chromatogr., 11(16), 3415 (1988). -Ref., C.A., 110, 211114t (1989)
120. Amin, M., Reusch, J., Pharm. Ind., 50(11), 1307 (1988). -Ref., C.A., 110, 63823f (1989)
121. Huang, T., Kissinger, P.T., Curr. Sep., 9(1-2), 19 (1989). -Ref., C.A., 111, 3494k (1989)
122. Thomis, R., Roets, E., Hoogmartens, J., J. Pharm. Sci., 73(12), 1830 (1984)
123. Navarini, I., Zucker, H., Landwirt Forsch., Sonderh 28(2), 153 (1973). -Ref., C.A., 80, 94298e (1974)
124. Song, X., Han, Y., Shipin Kexue, 105, 44 (1988). -Ref., C.A., 110, 56120w (1989)
125. Skuridin, G.M., Izv. Sib. Otd. Akad. Nauk SSSR, Ser. Biol. Nauk., (3), 122 (1980). -Ref., C.A., 94, 155080r (1981)
126. Parczewski, A., Acta Pol. Pharm., 44(5), 442 (1987). -Ref., C.A., 109, 11824s (1988)

127. Rizk.M.S.,Zakhari.N.A.,Farmaco.Ed.Prat.,41(2).75(1986).  
-Ref..C.A., 105. 136129x (1986)
128. Calokerinos, A.C., Hadjiioannou, T.P., Microchem.J.,  
28(4), 464 (1983).-Ref..C.A., 99, 200590y (1983)
129. Zaki, M.T.M., Abdel-Rehiem, A.G., Microchim.Acta,  
3(5-6), 329 (1986).-Ref..C.A., 108, 62545p (1988)
130. Halvatzis, S.A., Timotheou-Potamia, M., Anal.Chim.Acta,  
227(2), 405 (1989)
131. Khrenova,D.Kh.,Tsukanov,Y.V.,Brutko,L.I.,Gallai,Z.A.,  
Sheina,N.M., Svediene,N., Farmatsiya, 32(2), 51 (1983).  
-Ref..C.A., 99, 10910e (1983)
132. Pfeilsticker, K., Marx, F., Getreide. Mehl Brot,  
30(10), 282 (1976).-Ref..C.A., 86, 41899u (1977)
133. Prasad, B.B., Singh, T.B., Acta Pol.Pharm., 36(6),  
729 (1979).-Ref..C.A., 93, 225680s (1980)
134. Riyazuddin,P.,Mansoor,S.A.,Vasanthi,R.,Bull.Electrochem.  
. 4(3), 295 (1988).-Ref..C.A., 109, 11811k (1988)
135. Shukla, U., Prasad, B.B., Chem.Anal.,33(4), 639 (1988).  
-Ref..C.A., 111, 121009d (1989)
136. Li, H., Chen, M., Huaxue Shijie, 24(11), 331 (1983).  
-Ref..C.A., 101, 5600j (1984)
137. Cardova-Drellana, R. ve Lucena-Conde, X., Talanta,  
24, 124 (1977)
138. Uchiyama,S.,Yamaguchi,T.,Hamamoto,O.,Suzuki,S., Bunseki  
Kagaku, 38(6),286 (1989).-Ref..C.A., 111, 45389k (1989)
139. Marsh, D.G., Jacobs, D.L. ve Deening, H., J.Chem.Ed.,  
50, 626 (1973).-Ref..C.A., 79, 114572z (1973)

140. Moros, S.A., Hamilton, C.M., Heveran, J.E., Donaheu, J.J.  
ve Oiveri-Vigh, S., J.Pharm.Sci., 64, 1229 (1975)
141. Edholm, L.E., Talanta, 23, 709 (1976)
142. Karlsson, R., Talanta, 22, 989 (1975)
143. Sontag, G., Kainz, G., Microchim.Acta, 1(1-2), 175 (1978).  
-Ref., C.A., 88, 134933g (1978)
144. Lau, O.W., Shiu, K.K., Chang, S.T., J.Sci.Food Agric.,  
36(8), 733 (1985). -Ref., C.A., 103, 213491t (1985)
145. Amin, D., Microchem.J., 28(2), 174 (1983). -Ref., C.A.,  
98, 204496z (1983)
146. Kozar, S., Bujak, A., Eder-Trifunovic, J., Kniewald, G.  
, Fresenius' Z. Anal. Chem., 329(7), 760 (1988). -Ref., C.A.,  
108, 130159t (1988)
147. Lindquist, J., Analyst, 100, 339 (1975)
148. Soderhjelm, P. ve Lindquist, J., Acta Pharm.Scuc.,  
13, 201 (1976). -Ref., C.A., 85, 99252y (1976)
149. Ballantine, J., Woolfson, A.D., J.Pharm.Pharmacol.,  
32(5), 353 (1980). -Ref., C.A., 93, 120462u (1980)
150. Lau, O.W., Luk, S.F., Cheung, Y.M., Analyst, 114, 1047 (1989)
151. Falat, L., Cheng, H.Y., Anal.Chem., 54(12), 2108 (1982)
152. Tono, T. ve Fujita, S., Agric.Biol.Chem., 45, 2947 (1981).  
-Ref., C.A., 96, 67327n (1982)
153. Liu, T.Z., Chin, N., Kiser, M.D., ve Bigler, W.N.,  
Clin.Chem., 28, 2225 (1982). -Ref., C.A., 109, 91337y (1988)
154. Park, K.H., Kim, J.H., Hyun, K.H., Kim, D.Y., Hanguk Nonghwa  
Hakhoechi, 31(1), 52 (1988). -Ref., C.A., 109, 228907f (1988)

155. Casella, L., Gullotti, M., Marchesini, A., Petrarulo, M.,  
J. Food Sci., 54(2), 374 (1989). -Ref., C.A., 111, 22265c (1989)
156. Marchesini, A., Montuori, F., Muffato, D. ve Maestri, D.,  
J. Food Sci., 39, 568 (1974)
157. Schindler, J.G., Schael, W., Ger. Offen., 2, 824, 694  
(Cl.G01N31/14) (1979). -Ref., C.A., 92, 193994h (1980)
158. Posadka, P. ve Macholan, L., Collection Czechoslov Chem.  
Commun., 44, 3395 (1979). -Ref., C.A., 92, 74491g (1980)
159. Matsumoto, K., Yamada, K. ve Osajima, Y., Anal. Chem.,  
53, 1974 (1981)
160. Esaka, M., Suzuki, K., Kuboto, K., Agric. Biol. Chem.,  
49(10), 2955 (1985). -Ref., C.A., 103, 215510y (1985)
161. Lin, C.K., Kuo, H.M., Tung-Hai Hsueh Pao, 28, 915 (1987).  
-Ref., C.A., 108, 93183y (1989)
162. Morisaka, U., Miyakoshi, S., Shirazaki, K., Ohkubo, K.,  
Kensho, H., Hasegawa, T., Hokuriku Koshu Eisei Gakkaishi,  
15(2), 18 (1988). -Ref., C.A., 110, 133790u (1989)
163. Wouters, I., Roets, E., Hoogmartens, J., J. Pharm. Biomed.  
Anal., 2(3-4), 481 (1984)
164. Mamolo, M.G., Vio, L., Maurich, V., Farmaco, Ed. Prat.,  
40(4), 111 (1985). -Ref., C.A., 102, 209533v (1985)
165. Yang, S.L., Wilken, L.O., Clark, C.R., Drug Dev. Ind. Pharm.,  
11(4), 799 (1985). -Ref., C.A., 103, 59398j (1985)
166. Abuirjeie, M.A., Abdel-Hamid, M.E., Ibrahim, S.A.,  
Anal. Lett., 22(2), 365 (1989). -Ref., C.A., 111, 28655b (1989)
167. Gu, Y., Yaouxue Tongbao, 17(11), 684 (1982). -Ref., C.A.,  
98, 78215s (1983)



168. Groszkowski, S., Ochocki, Z., Krzemieniewska, G., Farm. Pol., 40(6), 341 (1984).-Ref..C.A., 102, 51009s (1985)
169. Cha, J., Wang, Y., Liu, Y., Yiyao Gongye 16(2), 73 (1985).-Ref..C.A., 102, 191253s (1985)
170. Salah, M.S., Analyst, 112, 1331 (1987)
171. Geeta, N., Baggi, T.R., Microchem. J., 38(2), 232 (1988).
172. Sharma, Su. C., Sharma, Sa. C., Saxena, R. C., Talwar, S. K., Indian J. Pharm. Sci., 52(2), 103 (1990)
173. Lin, S. L., Blake, M. I., J. Pharm. Sci., 56, 43 (1967)
174. Rhodes, H. J., De Nardo, J. J., Bode, D. W., Blake, M. I., J. Pharm. Sci., 64, 1386 (1975)
175. Jarzebinski, J., Ciszewska-Jedrasik, M., Acta Pol. Pharm., 45(2), 141 (1988).-Ref..C.A., 110, 121556j (1989)
176. Vasatova, M., Tomankova, H., Cesk. Farm., 37(6), 255 (1988).-Ref..C.A., 109, 176430y (1988)
177. Tomankova, H., Vasatova, M., Pharmazie, 44(3), 197 (1989)
178. Zhan, Q., Wu, L., Liu, A., Sepu, 8(3), 193 (1990).-Ref..C.A., 113, 178367q (1990)
179. Onur, F., Acar, N., Ankara Univ. Eczacılık Fak. Derg., 19(1-2), 11 (1989)
180. Lu, R. G., Yaoxue Xuebao, 26(3), 219 (1991).-Ref..C.A., 114, 235140g (1991)
181. Tajima, T., Maeda, T., Shimudzu Hyoron, 40(2/3), 139 (1983).-Ref..C.A., 100, 95865f (1984)
182. Yin, L., Liu, Y., Huadong Huagong Xueyuan Xuebao, (2), 204 (1984).-Ref..C.A., 101, 198295v (1984)

183. Luo.G., Luo.Z., Wang.Y., Yaoxue Xuebao. 21(7). 521 (1986).  
-Ref..C.A.. 105. 158942e (1986)
184. Sala.G., Maspoch.S., Iturriaga.H., Blanco.M., Cerda.V.,  
J.Pharm.Biomed.Anal.. 6(6-8). 765 (1988)
185. Wang.Y., Luo.G., Wang.Z., Zhou.G., Gaodeng Xuexiao Huaxue  
Xuebao. 10(10). 990 (1989). -Ref..C.A.. 112. 125341z (1990)
186. Nikoleva. N., Taneva. N., Nin'jo. N., Tr.Nauchnoizsied.  
Khim.-Farm.Inst.. 12. 239 (1982). -Ref..C.A.. 98. 95737z (1983)
187. Peterdi Nagy.A., Sperlagh.J., Vegh.M., Acta Pharm.Hung..  
56(3), 115 (1986). -Ref..C.A.. 105. 49173j (1986)
188. Jarzebinski.J., Zakrezewski.Z., Suchocki.P., Dobosz.G., Acta  
Pol.Pharm.. 37(3). 309 (1980). -Ref..C.A.. 94. 127416m (1981)
189. Boudeville. P., Burgot. J.L., Chauvel. Y., Analusis.  
11(8). 406 (1983). -Ref..C.A.. 100. 12751s (1984)
190. Sakamoto.M., Takamuro.K., Microchem.J.. 23(3). 374 (1978)  
-Ref..A.A.. 36. 5D172 (1979)
191. Kolos. E., Acta Pharm.Hung.. 35(5). 225 (1965). -Ref..A.A..  
14. 361 (1967)
192. Schbiczewska.M., Mucharska.A., Acta Pol.Pharm.. 40. 193 (1983)  
-Ref..C.A.. 100. 91459d (1984)
193. Schmid. P., J.Chromatog.. 157. 217 (1978)
194. Volkova.A., Vasilchuk.T., Maksyutina.N., Gritsenko.E.,  
Farm.Zh (Kiev). 4. 44 (1984). -Ref..A.A.. 47. 4E9 (1985)
195. Lutomski, J., Malek. B., Stachowiak, Z., Herba Pol..  
18(2). 162 (1972). -Ref..A.A.. 24. 1810 (1973)
196. Cine. M., Rodboj. T., Lomovsek, K. ve Kozjek. F.,  
Farm.Vestn. 28(1). 23 (1972). -Ref..C.A.. 87. 2065t (1977)

197. Katagi.T., Horu.A., Oomura.Y., Miyakawa.H., Kyu.T.,  
Ikeda,Y., Isoi.K., Makita.M., J.Chromatog., 79,45(1973)
198. Charpentier,B., Cowles,J., J.Chromatog., 208,132 (1981)
199. Fahrat,F., Kallel,M., Caiola,A., Cantin,D., Alary,J.,  
Talanta. 31. 615 (1984)
200. Davidek,J., Manousek.O., Ceskosl.Farm., 7(2). 73 (1958)  
-Ref..A.A., 5. 3883 (1958)
201. Ogura. H., Shikiba. Y., Yamazaki. Y., J.Pharm.Sci.,  
57. 705 (1968)
202. Sivitskaya, O.K., Rubinskaya. V.G., Kuleshova. M.I.,  
Guseva. L.N., Farmatsiya, 26(2). 81 (1977).-Ref..C.A.,  
86. 177381b (1977)
203. Reddy. M.N., Sastry, C.S.P., Sankar.D.G., Singh,N.R.P.,  
Indian J.Pharm.Sci., 49(6). 231 (1987)
204. Seif El-Din,A.A., Alex.J.Pharm.Sci., 3(1). 16 (1989)
205. Feng,D., Peng,W., Yauwu Fenxi Zazhi, 10(1). 29 (1990).  
-Ref..C.A., 112. 165075x (1990)
206. Chen,W., Xie.R., Yauwu Fenxi Zazhi, 4(4). 234 (1984).  
-Ref..C.A., 101. 198263h (1984)
207. Ge, J., Yang. G., Yu. R., Yang. Q., Nanjing Yaoxueyuan  
Xuebao. 16(1), 42 (1985).-Ref..C.A., 103. 11555f (1985)
208. Hu, K., Wang. S., Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi, 21(2).61  
(1990).-Ref..C.A., 113. 158766r (1990)
209. Ruan, J., Yaowu Fenxi Zazhi, 9(4),237(1989).-Ref..C.A.,  
112. 11988k (1990)
210. Chalmers. R.A., Errors. Measurement and Results in Che-  
mical Analysis. London. 1972

211. Kelly, G.J., Latzko, E., J.Agric.Food Chem., 28, 1320  
(1980).-Ref.,C.A., 93, 202746d (1980)
212. Kirksey,A.,Udipi,S.A.,Human Lactation, 153 (1985)
213. Kacem, B., Marshall, R., Matthews, R., Gregory, J.,  
J.Agric. Food Chem., 34(2), 271 (1986)
214. Ziegler, S.J., Meier, B., Sticher, O., J.Chromatogr.  
391, 419 (1987)
215. Masuda, R., Hayakawa, A., Kakiuchi, N., Iwamoto, M.,  
Rep.Natl. Food Res.Inst., 52, 30 (1988)
216. Huang, D., Shipin Kexue (Beijing), 74, 45 (1986).  
-Ref.,C.A., 104, 25627x (1986)
217. Carr, S.R., Bally, M.B., Thomas, P., Neff, J.M.,  
Anal.Chem., 55, 1229 (1983)
218. Visser,F.R., J.Assoc.Off.Anal.Chem., 67(5), 1020 (1984)
219. Speek, A.J., Schrijver, J., Schreurs, W.H.P., J.Agric.  
Food Chem., 32(2), 352 (1984)
220. Karayannis,M.I.,Farasoglou,D.I., Analyst,112,767 (1987)
221. Simal Lozano,J., Lopez Hernandez,J., Vazquez Oderiz,M.,  
L.Tec.Lab., 10(132), 456 (1986)