

T. C.  
Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı  
Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha  
Enstitüsü

T Ü R K  
**HİJYEN ve DENEYSEL**  
**BİYOLOJİ DERGİSİ**

Cilt : 40 — Sayı : 3  
(1 9 8 3)

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY  
□  
REVUE TURQUE D'HYGIENE ET DE BIOLOGIE EXPERIMENTALE  
□  
TÜRKISCHE ZEITSCHRIFT FÜR HYGIENE UND EXPERIMENTELLE  
BIOLOGIE

**TÜRK HİJ. DEN. BİYOL. DERG.**  
Vol : 40 — No. : 3

Nuriş Basım ve Ciltevi, 12 57 84 - ANKARA

# T ü r k

## Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi

Sorumlu Yayın Yönetmeni : Prof. Dr. Sedat ARITÜRK

Yayın Kurulu  
(Editorial Board)

Bes. Kim. Uz. Mehmet BOZKURT

Bak. Çiğdem ARTUK

Doç. Dr. Orhan YALÇINDAĞ

Kim. Yük. Müh. Serpil ŞENELT

Halk Sağ. Uz. Abdullah İLERİ

ISSUED BY

PUBLIÉ PAR

HERAUSGEBEN VOM

REFİK SAYDAM HIFZISSIHHA ENSTİTÜSÜ (ANKARA)

Senede üç defa çıkar.

The Bulletin is issued three times a year.

Revue paraissent trois fois par an

Die Zeitschrift erscheint dreimal Jearlich

## SAYIN YAZARLARA : YAYIN KURALLARI

1 -- Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, hijyen, epidemiyoloji, kimya, mikrobiyoloji, immünoloji, farmakoloji, entomoloji, parazitoloji, patoloji, fizyopatoloji ve benzeri bilim dalları ile halk sağlığını ilgilendiren çeşitli konular üzerinde yapılmış orijinal laboratuvar çalışmalarını ve bu konularla ilgili görüş ve gözlemleri yayımlar.

Klinik araştırma ve gözlemler derginin çerçevesi dışındadır.

2 — Yukarıdaki bilim dalları ile ilgili toplantıların gündem ve tutanakları tarih, isim ve yer belirlemek koşulu ile özet olarak yayımlanabilir.

3 — Güncel bir konu üzerinde çeşitli görüşleri yansıtan derleme yazılar, kaynak göstermek koşulu ile kabul edilir. Tek makalede yapılmış çeviri yazılar kabul edilmez. Başka yerlerde yayımlanmış yazılar dergiye alınmaz.

4 — Dergiye, yazıların makine ile yazılmış aslı ile okunaklı bir sureti gönderilmelidir. Yazılar beyaz kâğıda ve sahifenin bir yüzüne iki makine satırı açıklık bırakılarak daktilo edilmesi sol tarafa 3, sağ tarafa 2 cm, altta 3 cm. boşluk bırakılmalıdır. Paragraflar arasında üç makine satırı aralık olmalı, satır başları üç harf yeri kadar içerden başlamalıdır. Yazılar temiz bir Türkçe ile yazılmalı, yazı ve gramer hataları bulunmamalı, silintili ve üzerinden düzeltilmeli olmamalıdır. Tüm olarak 15 sahifeyi (bir sahife ortalama 200 kelime) geçen yazılar kabul edilmez.

5 -- Dergide yayımlanan yazılar için 30 adet ücretsiz ayrı baskı verilir.

6 — Fotoğraflar parlak kontrast kâğıda basılmış ve arkaları numaralanmış olmalıdır. Şekil ve grafikler, siyah çini mürekkebi ile aydınlar kâğıdına veya beyaz kâğıda şablonda çizilenele ve aynı şekilde numaralanmalıdır. Şekil, grafik ve fotoğraflar «Şekil 1, 2, ...» olarak sıraya konmalı, metin içinde yeri gelince

bu sraya göre belirlenmeli ve her Őeklin altında, Şekil numarası ve Şekli açıklayan bir yazı bulunmalıdır. Metindeki tablolara da sıra numarası verilmeli ve hepsinin ũstünde tabloyu açıklayan kısa bir baŐlık bulunmalıdır.

7 — Dergiye verilecek orijinal yazılar Şu sıra gözönünde tutularak düzenlenmelidir :

zet (ortalama 120 kelime), Giriş (ortalama bir sayfa), materyal ve metodlar, bulgular, tartiŐma ve sonuç, yabancı dilde yazılmış bir zet, teŐekkür, kaynaklar (ortalama 15 adet).

8 — Yabancı dil olarak, İngilizce, Almanca veya Fransızca'dan birini veya birkaçını seçmekte yazar serbesttir. Bütün makale 15 daktilo sahfesinin içinde kalmak Őartı ile, Türkçe metnin tamamı bir yabancı dilde tekrarlanabilir.

9 — Makale baŐlıkları metne uygun, kısa ve açık ifadeli olmalıdır. Yazarın titri, ismi ve soyadı (soyadı büyük harflerle yazılacak) baŐlıĖın alt ve ortasına konur. Çalışmanın yapıldığı yer ismin altında belirlenir. Yazarlar birden fazla ise, isimleri yan yana yazılır. Çalışma yerleri farklı olduğu hallerde birinci sahfenin altında ayrı ayrı gösterilir.

10 — Kaynaklar metnin içinde numaralanmalı ve bu sıra ile yazılmalıdır. Sıralama aŐaėıda olduğu gibidir :

Flexner, S. Nouguchi, H., Snake venom in relation to haemolysis, bacteriolysis and toxicity. J. Exper. Med., 6 : 277 - 301, 1901.

Metinde konusundan söz edilmeyen yazarlar kaynak bölümüne konulmaz.

11 — Dergide yayımlanması istenen yazılar bir dilekçe ile Enstitü Mdrlğine gönderilir.

Enstitü yayım komisyonu gönderilen yazıların yayımlanıp yayımlanmaması konusundaki kararında serbesttir. Yayımlanmayan yazılar geri verilmez.

Yayım komisyonu Şekle ait gerekli değişiklikler yapmaya yetkilidir.

Yazıların fikir ve kapsam sorumluluğu yazara aittir.

**YAYIN KOMİSYONU**

## İ Ç İ N D E K İ L E R

Sayfa

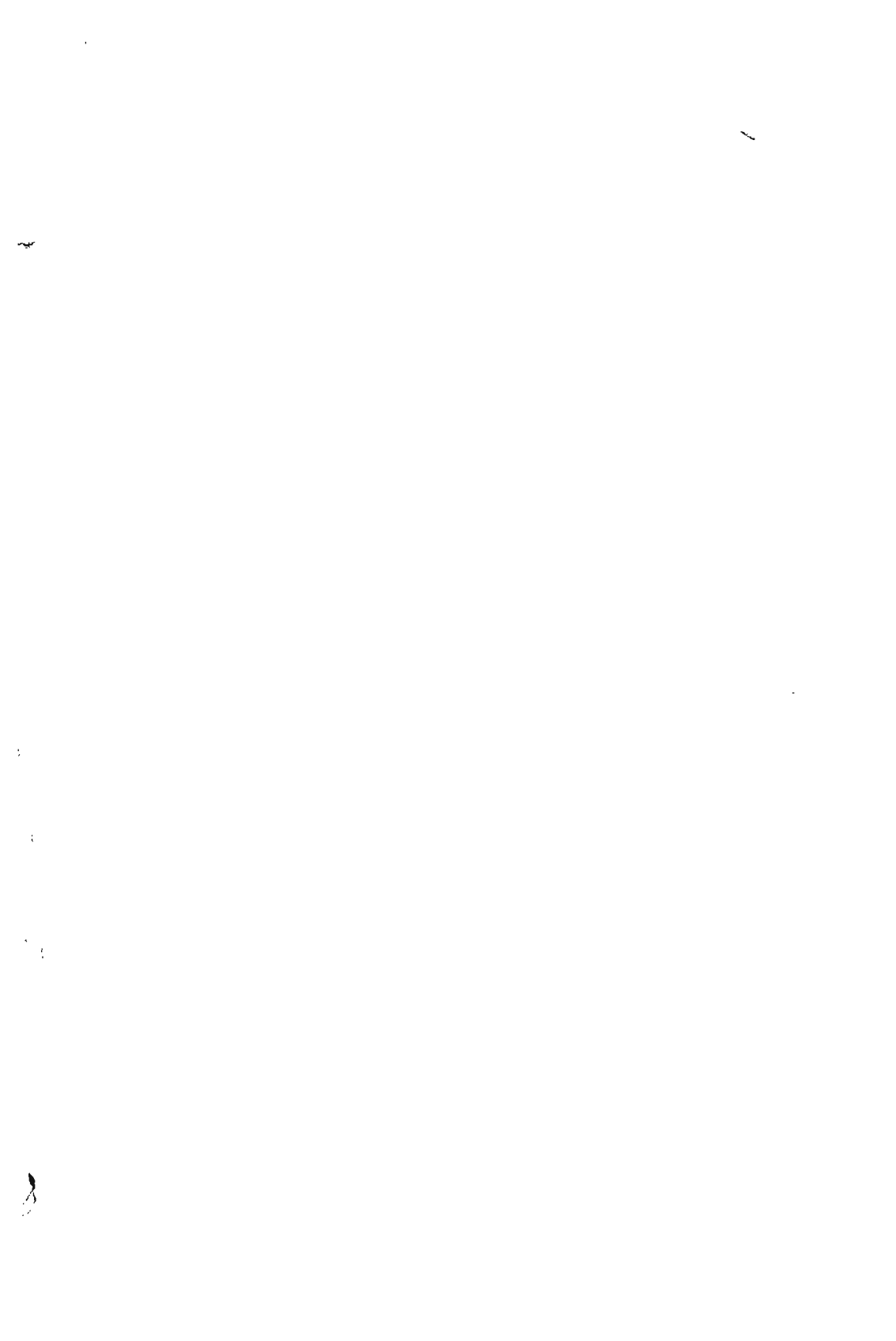
1. Mehmet BOZKURT., Aynur POLAT., Neriman ÖZÇETİN.  
Ankara'da Üç Fırından Alınan Ekmek ve İki Fırından Alınan  
Un Örneklerinin Mikrobiyolojik Metotla Sınırlayıcı (Limiting)  
Amino Asitlerini Tayin Ederek Protein Kaliteleri Üzerinde B.r  
Araştırma ... .. 235
2. Serpil ŞENELT.  
Yemelik Yağlarda Düşük Konsantrasyonlardaki Mineral Ya-  
ğın İnce Tabaka Kromatografisi ile Saptanması. ... .. 250
3. Edip GÜMRÜKÇÜ., Mehmet SAĞLAM., Sabri GÜNGÖR., Günan  
AŞAR.  
Sperm Analizi ve Elde Edilen Sonuçların Değerlendirilmesi. ... 259
4. Erdoğan BERKMAN.  
Yeni Ümitler, Yeni Antibiyotikler 2: Aminoglukozidler İnaktive  
Eden Enzimlerin Türleri ve Yaygınlıkları Üzerinde Bir Çalışma 267
5. Yüksel TATKAN., Avni TARTAN., Yusuf YAZICI., Mehmet  
KAYA., Hasan BAŞARIR., Mahmut BÜLBÜL.  
Kortikosteroidlerin Septik Şoktaki Etkileri. ... .. 279
6. Sabahaddin PAYZIN.  
Yeni Endüstrileşen Türkiye'nin Çevre Sorunları ve Patolojide Rol  
Oynuyacak Olanlar. ... .. 297
7. Mülkiye KASAP., Mihri MİMOĞLU.  
Leishmaniasis ve Tatarcıklar. ... .. 307
8. Orhan N. YALÇINDAĞ.  
 $\beta$ -Cyclodextrin İnclosion Bileşiklerinin Farmasi Tekniğinde Kulla-  
nılışı. ... .. 320
9. Erten ONUR.  
Doğal ve Yarı Sentetik Antioksidanlar İçin Uygulanmış Bulunan  
Nitel ve Nicel Ayırma Yöntemleri. ... .. 332

## C O N T E N T S

	<u>Page</u>
1. Mehmet BOZKURT., Aynur POLAT., Neriman ÖZÇETİN. A Study of the Quality of the Proteins of Bread Samples Taken From Three Bakeries and Flour Samples Taken Two Bakeries in Ankara by Determining the Limiting Amino Acid Values With Microbiological Metod. ....	235
2. Serpil ŞENELT. Detection of Mineral Oil in Edible oils by Thin Layer Chro- matography. ....	250
3. Edip GÜMRÜKÇÜ., Mehmet SAĞLAM., Sabri GÜNGÖR., Günan AŞAR., Ekrem YILMAZ. Semen Analysis and Evaluation of Obtained Results. ....	259
4. Erdoğan BERKMAN. Enzymes That Inactive Aminoglucoşides. ....	267
5. Yüksel TATKAN., Avni TARTAN., Yusuf YAZICI., Mehmet KAYA., Hasan BAŞARIR, Mahmut BÜLBÜL. Effets des Corticosteroides au Choc Séptique. ....	279
6. Sabahaddin PAYZIN. Environmental Problems in Turkey, An Industrially Developing Country and Problems That Will Effect Pathology. ....	297
7. Mülkiye KASAP., Mihri MİMOĞLU. Leismaniasis and Sandflies. ....	307
8. Orhan N. YALÇINDAĞ. $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complexes and Their Uses in The Phar- maceutical Technology. ....	320
9. Erten ONUR. Quantitative and Qualitative Separation Methods for Natural and Semi-Synthetic Antioxidants. ....	332

Ayrı Baskı Halinde Yayımlanan Diğer Çalışmalar :

1. Dr. Avni TARTAN., Dr. Yüksel TATKAN., Dr. Derviş ŞEN., Dr. Turgut TUFAN.  
Transvers Kolostomi ve Endikasyonları.
2. Dr. Yüksel TATKAN., Dr. Mehmet KAYA., Dr. Sabri DEVECİ-OĞLU., Dr. M. Kemal SAVAŞAN.  
Ekstrahepatik Safra Yolları Kanserleri ve Tedavileri.
3. Dr. Mehmet KAYA., Dr. Yüksel TATKAN.  
Karaciğer Dışı Safra Yolları Benign Striktürleri.
4. Dr. Mehmet KAYA., Dr. Yüksel TATKAN., Dr. Sabri DEVECİ-OĞLU., Dr. Avni TARTAN.  
Postoperatif Safra Yolları Striktürleri.
5. Dr. Melimet KAYA.  
Peptik Ülser ve Hormonlar.
6. Dr. Avni TARTAN., Dr. Mehmet KAYA., Dr. Yüksel TATKAN.  
Boyun Fibromatozisi (Bir olgu nedeniyle).
7. Dr. Avni TARTAN., Dr. Yüksel TATKAN., Dr. Turgut TUFAN., Dr. Ali AKDENİZ., Dr. Derviş ŞEN., Dr. Nureddin GÜN.  
Cerrahi Tedavi Görmüş 10 Yıllık Toksik Guatr Olgularımızın Analizi.
8. Dr. Yüksel TATKAN., Dr. Mehmet KAYA., Dr. Avni TARTAN., Dr. Sabri DEVECİOĞLU.  
Familya Mediterranean Fever (Üç olgu nedeniyle).
9. Dr. Mehmet KAYA.  
Karaciğer Apseleri.
10. Dr. Avni TARTAN., Dr. Yüksel TATKAN., Dr. Derviş ŞEN., Dr. Ali AKDENİZ., Dr. Turgut TUFAN., Dr. Nureddin GÜN., Dr. Mahmut BÜLBÜL.  
Non Toxic Goitre - Tanı Yöntemleri Uygulanan Tedavi Şekilleri.
11. Dr. Avni TARTAN., Dr. Yüksel TATKAN., Dr. Melimet KAYA., Dr. Alparslan YÜKSEL., Dr. Ali AKDENİZ., Dr. Mahmut BÜLBÜL.  
Intra bdominal Abseler (150 olgunun klinik analizi)  
(Intra - abdominal abscesses (Clinical Analysis of 150 cases)





# ANKARA'DA ÜÇ FIRINDAN ALINAN EKMEK VE İKİ FIRINDAN ALINAN UN ÖRNEKLERİNİN MİKROBİYOLOJİK METODLA SINIRLAYICI (LİMITİNG) AMİNO ASİTLERİNİ TAYİN EDEREK PROTEİN KALİTELERİ ÜZERİNDE BİR ARAŞTIRMA

Mehmet BOZKURT (\*) Aynur POLAT (\*\*) Neriman ÖZÇETİN (\*\*\*)

Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Müessesesi

## Ö Z E T

1. Halk tipi ekmek ve bunların yapıldığı un örnekleri üzerinde mikrobiyolojik yöntemle lysine, isoleucine ve threonine miktarları saptandı. Bulgular 3.1, 3.2, 3.3 bölümlerinde görülmektedir.

2. Ekmek ve un örneklerinin içerdikleri lysine, isoleucin ve threonin miktarlarının, FAO/OMS amino asit örüntüsüne (pattern) ve bütün yumurta proteini amino asit kompozisyonuna göre yüzde sapmaları ve sınırlayıcı (limiting) amino asitleri saptandı (Bak: Tablo 2 ve 3).

3. Ekmek ve un örneklerinin referans protein miktarları ile enerji bazı üzerinden net diyet protein değerleri bulundu. (Bak: Tablo 5).

4. Ekmeğin referans protein ve enerji bazı üzerinden net diyet protein değerlerinin ununkinden daha az olduğu belirtildi ve bu durumun, ekmeğin imali esnasında, unun maruz kaldığı ısı neticesi lysine'in tahrip olması sonucuna varıldı.

## 1. G İ R İ Ő

Türkiyede fert başına düşen yıllık buğday tüketim miktarı 195 kilogramdır (1). Ekmek ise buğdaydan imal edilen gıda mad-

---

(\*) Besin Kim. Uz. Ref. Say. Merk. Hıfz. Mues. Kim. An. Gr. Baş. B.yo-  
lojik Analizler Lab. Şefi.

(\*\*) Uzman Biyolog

(\*\*\*) Kimya Mühendisi

deleri içerisinde geniş bir alanı kapsamaktadır. Bir ferdin günde ortalama 500 gram ekmek tükettiği varsayılırsa, ekmek; gıda maddelerimizin ana temelini teşkil etmektedir. Kırsal bölgelerde ise tüketim sınırı günde bir kilogramı bulmaktadır.

Halkımızın büyük bir kesimi halk tipi ekmek tükettiğinden, bu ekmek tipinin ve yapıldığı unun beslenmede ne derece yararlı olabileceği ve protein kalitesinin değerlendirilmesi amacımız olmuştur.

Gıdaların besleyici değerleri içerdikleri esansiyel amino asit miktarları ile amino asit örüntüsüne (pattern'ine) bağlıdır. Gıda proteinlerinin içerdikleri amino asit örüntü ile referans olarak alınan bir proteinin içerdikleri amino asit örüntüsünü mukayese ederek, besleyici değerleri hakkında bir kararın yapılabilir. Referans protein; belirli bir amino asit örüntüsünü içeren yüksek biyolojik değerli bir protein olarak tarif edilmiştir (2, 3). Ve çoğu zaman net diyet proteinine eşdeğerdir ve FAO tarafından protein ihtiyacını göstermek için kullanılır. Böyle karşılaştırmaları yapmak için süt (3) ve yumurta proteinlerini (8) referans alan yöntemler ortaya atılmıştır. Ama, bu proteinlerin esansiyel amino asitleri, miktar olarak, yetişkinler için fazlasını, bebeler için de daha azını sağlaması, böylece bütün fizyolojik durumlar için en uygun amino asit örüntüsünü temsil etmemesi mümkündür (3). Bütün fizyolojik durumlar için en uygun amino asit örüntüsü, diyet protein yerine, serbest amino asitlerin kullanılması daha uygun bulunmaktadır (2, 7).

Biz, bu çalışmamızda ekmek ve un numunelerinin içeriğinde bulunan ve sınırlayıcı (limiting) oldukları tesbit edilen (6) lysine, isoleucine ve threonine miktarlarını tayin ettik ve referans olarak alınan yumurta proteini ve FAO, OMS'nun (7) amino asit örüntüleri ile karşılaştırarak ekmek ve un numunelerinin protein kalitelerini değerlendirdik.

## **2. MATERYAL VE METOD :**

### **2.1 MATERYAL**

Ankara Belediyesine ait ekmek fabrikasının satış bayilerinden ve iki ayrı semtinde bulunan firmalardan on gün müddetle bir-

birini takip eden günlerde ekmek ve un numuneleri alarak analize tabi tutuldu. Ankara Belediyesi ekmek fabrikasının ekmek imalinde kullandığı un numuneleri fabrikanın uzakta bulunması nedeniyle temin edilemedi.

## 2.2 METOD

a) İsoleucine, lysine ve threonin miktarları A.O.A.C. (5)'de gösterilen mikrobiyolojik metod ile tayin edildi. Organizm olarak streptococcus faecalis (ATCC No. 9790) kullanıldı.

b) Örneklerin hazırlanması: Un ve ekmek örnekleri 100°C'de sabit tartıma kadar kurutuldu. Ekmek örnekleri 6 No.'lu elekten (1 cm<sup>2</sup>'de 900 delik bulunan) geçecek şekilde toz haline getirildi. İşlemler toz haline gelmiş bu ekmek örnekleri ile sabit tartıma kadar kurutulmuş unlar üzerinde yapıldı. Örneklerden ikişer ayrı tartım yapılarak işlemler paralel olarak yürütüldü ve bulunan rakamsal değerlerin ortalamaları alındı.

c) Azot miktarı tayini : Kjeldahl tekniği (5) kullanılarak yapıldı ve 5.7 katsayısı ile çarpılarak ham protein miktarları saptandı.

d) Amino asitlerin tayini için örneklerin hidrolizi : Spies ve arkadaşlarının metodu kullanıldı (12). Ancak bir gram protein ihtiva eden örnek üzerinden değil de hesaplarda kolaylık olması bakımından 100 mg azot ihtiva eden miktarlarda örnekler erlenlere kondu ve örneğin beher gramı için 20 ml 3 N HCl erlenlere ilâve edildi, 15 libre basınç altında sekiz saat müddetle otoklavize tabi tutuldu. Bilâhare hidrolizatların pH'ları 6.8'ze NaOH solusyonu ile ayarlandı ve su ile 250 ml'ye tamamlandı. Süzüldü, filt-rattan 25 ml alınarak distile su ile 100 ml'ye sulandırıldı. Bu, numune solusyonu olarak kullanıldı.

e) Net diyet protein değerleri (ND<sub>p</sub> calş %) tayini: Miller ve Payne'nin (9, 10) tekniği ile kalori değeri üzerinden hesaplandı.

### 3. BULGULAR

#### 3.1 Ankara Belediyesi fabrikasında imal edilen ekme

Örnek No.	Azot Miktarı %	Isoleucine miktarı mg/gm N	Lysine miktarı mg/gm N	Threonine miktarı mg/gm N
1	1.960	252.428	161.764	208.514
2	1.909	246.001	161.766	208.021
3	1.934	239.485	172.156	208.996
4	1.960	255.883	172.154	214.422
5	1.934	239.226	171.367	208.600
6	1.934	235.000	176.553	206.420
7	1.940	236.412	174.600	205.240
8	1.924	235.206	172.254	207.400
9	1.938	236.000	172.452	206.822
10	1.936	236.620	172.812	206.514
Ar.O. :	1.9379	241.2262	170.7878	207.9549
S.S. :	0.0137	7.1892	4.7295	2.425
S.H. :	0.0043	2.2730	1.4956	0.7668

#### 3.2 Ankara Topraklık Semti A fırını ekme örnekleri

Örnek No.	Azot Miktarları %	Isoleucine miktarı mg/gm N	Lysine miktarı mg/gm N	Threonine miktarı mg/gm N
1	1.985	231.187	184.276	205.285
2	1.985	235.093	181.744	206.462
3	1.906	232.215	179.057	211.628
4	2.112	219.934	171.057	209.339
5	1.905	220.249	181.193	210.062
8	1.934	236.186	186.214	212.000
7	1.934	236.244	186.348	210.000
8	1.938	236.422	184.172	208.400
9	1.986	232.088	182.600	208.245
10	1.986	233.072	182.560	206.287
Ar.O. :	1.9871	231.569	181.9506	208.5708
S.S. :	0.0574	4.512	4.180	2.2772
S.H. :	0.0181	1.4288	1.3218	0.7200

### Ankara Topraklık Semti A fırını un örnekleri

1	1.8317	251.493	205.648	207.488
2	2.007	252.411	200.142	208.097
3	1.9571	267.188	202.744	214.718
4	1.7768	267.188	199.017	213.718
5	1.9824	257.113	202.744	212.510
6	1.9422	250.988	204.188	208.567
7	1.9432	252.012	203.984	210.600
8	1.9342	252.214	203.893	210.423
9	1.9399	251.400	204.023	209.983
10	1.9321	253.643	201.898	208.065
Ar.O. :	1.93466	255.565	202.9181	210.4392
S.S. :	0.0575	0.041	1.7374	2.4270
S.H. :	0.0181	1.910	0.5494	0.7674

### 3.3 Ankara Ulus Semti E fırını ekmek örnekleri

Örnek No.	Azot Miktarları %	Isoleucine miktarı mg/gm N	Lysine miktarı mg/gm N	Threonine miktarı mg/gm N
1	1.982	229.187	181.274	206.412
2	1.934	235.086	188.207	208.110
3	1.939	232.988	185.121	207.517
4	1.906	236.200	186.890	208.961
5	1.934	234.312	184.761	205.012
6	1.984	229.068	179.653	203.131
7	1.984	230.971	181.107	204.097
8	1.938	235.012	183.209	206.835
9	1.938	234.412	184.027	207.082
10	1.985	233.679	180.069	203.890
Ar.O. :	1.9524	233.0915	183.2318	206.0847
S.S. :	0.0271	2.3842	2.4460	1.8560
S.H. :	0.0085	0.7539	0.7740	0.5870

#### Ankara Ulus Semti B fırını un örnekleri

1	1.932	252.017	205.499	207.071
2	1.982	251.105	202.531	209.873
3	1.985	253.013	201.403	210.900
4	1.957	252.115	204.317	213.317
5	1.979	252.009	201.899	212.019
6	1.983	257.015	200.188	214.190
7	1.942	261.135	203.973	211.027
8	1.939	254.077	201.899	208.899
9	1.945	259.337	202.701	210.087
10	1.942	258.117	203.097	211.027
Ar.O. :	1.9586	254.994	202.7471	210.841
S.S. :	0.0202	3.411	1.4635	1.957
S.H. :	0.0064	1.076	0.4627	0.618

#### 4. TARTIŞMA

##### 4.1 Unların amino asit kompozisyonları

Tablo 1'de çeşitli randımandaki unların esansiyel amino asit miktarlarını göstermektedir. Analiz neticelerimiz de bu tabloda gösterilmektedir.

Türkiyede halk tipi ekme (80 - 90) randımanlı unlardan imal edilmektedir. 80 - 90 randımanlı unlarda sınırlayıcı (limiting) amino asit'in birinci derecede olanı lysine, ikincisi ise isoleucine'dir (6). (70-80) ve (60-70) randımanlı unlarda ise birinci limiting amino asit lysine, ikincisi threonindir (6). Bu nedenle bu çalışmamızda sınırlayıcı olarak saptanan isoleucine, lysine ve threonine miktarlarını tayin ettik. Bulduğumuz neticeler tablo 1'de (mg/gm N) belirtilmiştir. Ekme örneklerinde lysine miktarı 170.787 - 183.23 arasında unlarda ise 202.74 - 202.918 arasında; isoleucine miktarı ekmelede 231.569 - 241.226 arasında unlarda 254.99 ile 255.565 arasında; threonine miktarı ekmelede 206.08 - 208.57 arasında unlarda ise 210.439 - 210.84 arasında değişmektedir.

##### 4.2 Sınırlayıcı amino asitler

Tablo 2 ve 3'de ekme ve un örneklerinin içerdikleri isoleucin, lysine ve threonine miktarlarının referans FAO, OMS amino asit örüntüsüne ve yumurta proteini amino asit kompozisyonuna göre yüzde sapma miktarları verilmektedir.

Tablo I. Çeşitli randımandaki un örneklerinin esansiyel amino asit miktarları (6) ve analiz bulguları (mg/gm N içinde)

Amino Asitler	80-90 R. un	70-80 R. un	60-70 R. un	Bel. F. Ekineği	A fırın ekmeği	A fırın unu	B fırın ekmeği	B fırın unu
Isoleucine	232	223	217	241.226	231.569	255.565	233.00	254.99
Leucine	379	440	400					
Lysine	159	130	113	170.787	181.950	202.918	183.23	202.74
Methionine	97	91	87					
Cystine	127	159	142					
Total S. am. as.	224	250	229					
Phenylalanine	276	304	291					
Tyrosine	186	145	132					
Total aro. am. as	462	449	423					
Threonine	192	168	153	207.955	208.370	210.439	206.08	210.84
Tryptophane	68	67	58					
Valine	270	258	240					
Arginine	259	221	193					
Histidine	121	130	121					

Tablo 2. Ekmek ve un örneklerinin içerdikleri lysine, isoleucine ve threonine miktarlarının referans FAO/OMS'un amino asit örneğine göre yüzde sapmaları

Amino Asitlere	FAO/OMS* Amino asit örneği	Belediye ekmeği sapma %	A fırın ekmeği sapması %	A fırını Unu sapması %	B fırın ekmeği sapması %	B fırını Unu sapması %
Isoleucine	250	— 3.5	— 7.737	— 2.24	— 6.76	— 2.0
Leucine	440					
Lysine	340	— 49.77	— 48.40	— 40.32	— 46.10	— 40.37
Methi - Cys.	220					
Phenyl - Tyrosine	380					
Threonine	250	— 18.02	— 16.57	— 15.02	— 17.50	— 15.99
Tryptophane	60					
Valine	310					
Birinci limiting amino asit	:	Lysine	Lysine	Lysine	Lysine	Lysine
İkinci limiting amino asit	:	Threonine	Threonine	Threonine	Threonine	Threonine

(x) FAO/OMS (7)



Tablo 3. Ekinek ve un örneklerinin içerdikleri lysine, isoleucine ve threonine miktarlarının referans yumurta proteini amino asit oranlarına göre yüzde sapmaları

		Yumurta				
Amino Asitler	Protein amino asitleri (x)	Belediye ekmeği sapması	A fırını ekmeği sapması	A fırını Unu sapması	B fırını ekmeği sapması	B fırını Unu sapması
	mg/gm N	%	%	%	%	%
Isoleucine	423	— 42.9	— 45.25	— 39.53	— 44.89	— 39.71
Leucine	490					
Lysine	448	— 61.87	— 59.38	— 54.70	— 59.10	— 54.71
Methionine	214					
Cysteine	132					
Total S. am. as.	346					
Phenyl alanine	362					
Tyrosine	247					
Total aro. am. as.	609					
Threonine	325	— 36.01	— 35.02	— 35.24	— 36.59	— 35.37
Birinci limiting amino asidi		Lysine	Lysine	Lysine	Lysine	Lysine
İkinci limiting amino asidi		Isoleucine	Isoleuc.	Isoleuc.	Isoleuc.	Isoleuc.

(x) FAO (6)

En büyük sapma lysine miktarlarında görülmektedir ve FAO/OMS amino asit örüntüsüne göre Ankara Belediyesi ekmeğinde % 49.77, A firmı ekmeğinde % 46.48, A firmı ununda % 40.32, B firmı ekmeğinde % 46.10, B firmı ununda % 40.37 daha az miktarda lysine bulunmaktadır. Referans olarak yumurta proteini ele alındığında Ankara Belediyesi ekmeğinde % 61.87 daha az, A firmı ekmeğinde % 59.33, A firmı ununda % 54.70, B firmı ekmeğinde % 59.10, B firmı ununda % 54.74 yumurta proteinine göre daha az lysine miktarları saptanmıştır. Gerek FAO/OMS amino asit örüntüsü ve gerekse yumurta proteini amino asit kompozisyonuna göre birinci derecede sınırlayıcı (limiting) amino asit lysindir.

İkinci büyük sapma FAO OMS örüntüsüne göre hesaplandığında threonine miktarlarında; yumurta proteini referans alındığında isoleucine miktarlarında görülmektedir. FAO/OMS amino asit örüntüsüne göre ekme ve un örneklerinde % 15.82 - % 16.82 daha az threonin miktarı; yumurta proteini referans alındığında % 35.2 - % 36.59 daha az isoleucine miktarları bulunmuştur. Ve FAO/OMS amino asit örüntüsüne göre ikinci limiting amino asit threonin; yumurta proteini referans alındığında isoleucin olmaktadır.

#### 4.3 Kimyasal skor ve protein kaliteleri

Block ve Mitchell (8) kimyasal skor kavramını ortaya attıklarında uzun süreli ve zor olan hayvan besleme yöntemleri yerine kimyasal skor kullanarak proteinlerin besleyici değerlerini bulma aşamasına ulaşıldı. Test proteini içeriğindeki sınırlayıcı amino asidin referans alınan yumurta proteininin aynı amino aside oranını kimyasal skor olarak tarif ettiler. FAO/OMS raporlarında (7) esansiyel amino asitler ile cystine ve tyrosine içeren bir amino asit örüntüsünü (tablo 2, birinci sütunda görülmektedir) kimyasal skor hesaplanmasında kullanılmak üzere rapor ettiler. Ve test proteininin içerdiği sınırlayıcı amino asit miktarını pattern'in içerdiği amino asit miktarına bölmek suretiyle kimyasal skoru hesaplamayı önerdiler.

Tablo 4 analize aldığımız ekme ve un örnekleri ile (80-90), (70-80), (60-70) randımanlı unlarda saptanan kimyasal skorları göstermektedir.

Günümüzde protein kaliteleri net diyet protein değeri olarak ifade edilmektedir (3,11). Ve  $(N.D._p \cdot v = NPU_{of} \times \text{Protein konsantrasyonu})$  formülü ile bulunmaktadır.

**Tablo 4. Ekmek ve un örnekleri ile (80-90), (70-80) ve (60-70) randımanlı unların kimyasal skorları**

Örnekler	FAO/OMS Amino asit örüntüsüne göre hesaplama	Yumurta proteini Amino asit kompozisyonuna göre hesaplama
Ankara Belediyesi ekmeği	50.2	38.1
A fırını ekmeği	53.5	40.6
B fırını ekmeği	53.9	40.8
A fırını unu	59.6	45.2
B fırını unu	59.6	45.2
(80 - 90) randımanlı un	46.7 (**)	39 (*)
(70 - 80) randımanlı un	38.2 (**)	32 (*)
(60 - 70) randımanlı un	33.2 (**)	28 (*)

(\*) FAO (6)'dan alınmıştır.

(\*\*) FAO/OMS'a göre tablo 1'deki rakamlarla hesap edilmiştir.

Miller ve Payne (9, 10) net diyet protein değerini enerji bazı üzerinden karakterize ettiler; FAO, OMS'da net diyet protein değerini enerji bazı üzerinden verilmesini rapor etmektedirler ve Gıda Maddeleri Tüzüğü'müz de (4) mamalarda net protein değerlerinin enerji bazı üzerinden verilmesine amirdir. Ve Miller ve Payne (9, 10) net diyet protein değerinin bulunmasında kimyasal skor kullandılar ve bu yöntemle elde ettikleri sonuçları hayvan deneyleriyle elde ettikleriyle karşılaştırarak birbirleriyle mutabık bulduklarını açıkladılar (9). Tablo 5 ekmeğin ve un örneklerinin net diyet protein değerlerini göstermektedir.

Un örneklerinin kimyasal skorları aynıdır; referans protein ve net diyet protein değerleri arasında da hemen hemen yok denecek kadar bir fark bulunmaktadır. Ekmek örneklerine gelince: Ankara Belediyesi ekmeğinin kimyasal skor, referans protein ve net diyet protein değerleri A ve B fırını ekmeğinin değerlerinden daha düşüktür. A ve B fırını ekmeği değerleri ise hemen hemen birbirleriyle intibak etmektedirler.

Tablo 5. Ekmek ve un örnekleri ile (80-90), (70-80) ve (60-70) randımanlı unların ham protein, referans protein ve net diyet protein değerleri

Örnekler	Ham Protein %	Kim. Skor FAO/OMS	Referans N.D. protein gm/100 cal.	$p-v^{(**)} = \frac{ND_p}{ND_n} \times 100$ %
Ankara Bel. ek.	11.04	50.2	1.385	5.54
A fırını ekmeği	11.21	53.5	1.499	5.99
B fırını ekmeği	11.12	53.0	1.498	5.99
A fırını unu	11.02	53.6	1.640	6.56
B fırını unu	11.16	55.6	1.660	6.65
80-90 rand. un	11.7(*)	46.7	1.360	5.45
70-80 rand. un	10.9(*)	38.2	1.150	4.62
60-70 rand. un	9.2(*)	33.2	0.95	3.78

(\*) FAO'nun (6) datalarından alınmıştır.

$$54 - P$$

$$(**) N.D._{p-v} = \text{Klinikal Skor} \times P \times \left( \frac{54 - P}{400} \right)$$

$$54 - P_m$$

$$400 \times$$

$$P_m = \frac{54 - P_m}{\text{Skor} \times \text{Lori y\u00fcdesi}} \quad (\text{Hayatın idamesi i\u00e7in gerekli protein kar-})$$

$$P = \text{Protein kalori y\u00fcdesi.}$$

FAO'nun (6) datalarından yararlanılarak elde edilen 80-90, 70-80 ve 60-70 randımanlı unların klinikal skor, referans protein ve net diyet protein değerleri ise: unların randımanını \u00f6\u013ft\u00fck\u00e7e, bunların de\u011ferleri de d\u00fc\u015fmektedir: klinikal skorlar 46.7, 38.2, 33.2; referans protein miktarları 1.36, 1.15, 0.95 (gm/100 cal); net diyet protein de\u011ferleri 5.45, 4.62, 3.78 (%). soyun\u0131 takip etmektedir.

#### 4.5 Sonu\u00e7lar

1) Lysine ve isoleucine miktarları bakımından ekmek ile ekme\u011fin imal edildi\u011fleri unların aras\u0131nda a\u00e7\u0131k farklara bulundu\u011fu; A fırını ekme\u011finde, ununa g\u00f6re (% 10), B fırını ekme\u011finde, ununa g\u00f6re (% 9.62) lysine miktarının daha d\u00fc\u015f\u00fck oldu\u011fu; isoleucine miktarlarının ise A fırını ekme\u011finde ununa g\u00f6re (% 7.92), B fırını ekme\u011finde ununa g\u00f6re (% 8.59) daha az oldu\u011fu; threonin miktarlarında kayda de\u011fer bir farkın bulunmad\u0131\u011f\u0131.

2) Ekmek ve un \u00f6rneklerinde klinikal limiting amino asidin

lysine olduğu; ikinci limiting asidin ise: FAO/OMS amino asit örüntüsüne göre hesaplandığında threonin, yumurta proteini referans alındığında ise isoleucinin olduğu,

3) Referans protein miktar bakımından A fırını ekmeğinde ununa göre % 8.59, B fırını ekmeğinde ise ununa göre % 9.75 bir noksanlık bulunduğu,

4) Keza, net diyet protein değerlerinde de A fırını ekmeğinin ununa göre % 8.63, B fırını ekmeğinin ununa göre % 9.92 oranında bir düşüklük olduğu,

5) Bu düşüklüklerin; ekmeğin imali esnasında ve fırında ısı etkisi altında unun lysine miktarının kısmen tahrip olması neticesi ileri geldiği,

6) Tablo 5'de görüldüğü gibi unların randımanları azaldıkça referans protein miktarları ve net diyet protein değerlerinin de azalmakta olduğu ve kepekleriyle birlikte besleyici değerlerinin sürüklenip gittiği,

Sonucuna varılmıştır.

## A STUDY OF THE QUALITY OF THE PROTEINS OF BREAD SAMPLES TAKEN FROM THREE BAKERIES AND FLOUR SAMPLES TAKEN TWO BAKERIES IN ANKARA BY DETERMINING THE LIMITING AMINO ACID VALUES WITH MICROBIOLOGICAL METHOD

Mehmet BOZKURT (\*)

Aynur POLAT (\*\*)

Neriman ÖZÇETİN (\*\*\*)

### SUMMARY

1) Bread and flour samples isoleucine, lysine and threonine quantities are determined by microbiological method. Quantities that are found are shown 3.1, 3.2 and 3.3.

2) Lysine, isoleucine and threonine quantities that are found in bread and flour, according to FAO/OMS amino acid patterns and whole egg protein amino acid composition, the percentage deviations and limiting amino acid are determined. (See table 2 and 3)

3) With reference protein quantities of bread and flour samples on the basis of energy, the net dietary protein values are determined. (See table 5)

4) The quantities of bread referance protein and the net dietary protein values were less than flour. We conclude that the lysine was destroyed by the effecting of heat.

#### KAYNAKLAR

- 1) ANONYMOUS 1979 Yeni Strateji ve Kalkınma Planı, Üçüncü Beş Yıl. Başbakanlık Devlet Planlama Teşkilatı Yayın No. 1664 ss. Tablo: 164
- 2) ANONYMOUS 1957 Rapport du Comité sur les Besoins en Proteines Etudes de Nutrition de la FAO, Rome, No. 16
- 3) ANONYMOUS 1963 Evaluation of Protein Quality. Publication 1100, National Academy of Sciences, National Research Council. ss. 23-37
- 4) ANONYMOUS 1968 Gıda Maddelerinin ve Umumi Sağlığı İlgilendiren Eşya ve Levazımın Hususi Vasıflarını Gösteren Tüzüğün Bazı Maddelerinin Değiştirilmesi Hakkında Tüzük. T.C. Sağlık ve Sosyal Bakanlığı. Yayın No. 59. ss. 1, T.C. Resmî Gazete, Sayı: 12835
- 5) ANONYMOUS 1980 Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. (A.O.A.C.) 13th Washington D.C. 200-44. ss.
- 6) ANONYMOUS 1970 FAO. Teneur des Aliments en Acides aminés et Données Biologiques sur les Protéines. Etudes de Nutrition de la FAO, Rome, No. 24 ss. 44-45.
- 7) ANONYMOUS 1973 Besoins énergétique et besoins on proteines Rapport d'un comité spécial mix FAO/OMS d'experts Organisation Mondiale de la Santé. Serie de Rapports Techniques No. 522. ss. 63-70
- 8) BLOCK, R.J. and MITCHELL, H.H. 1946 The Correlation of the Amino - Acid Composition of Proteins with Their Values. Nutr. Abstr. Rev., 16: 249-278
- 9) MILLER, D.S. and PAYNE R.P. 1961 Problems in the Prediction of Protein Values of Diets The Influence of Protein Concentration. Brit. J. Nutr. 15: 11-19.
- 10) MILLER, D.S. and PAYNE, P.R. 1961 Problem in the Prediction of Protein Values of Diets: The Use of Food Composition Tables. J. Nutr. 74: 249-278.
- 11) PLATT, B.S. and MILLER, D.S. 1959 Proc. Nutr. Soc. 18, vii. Cited by: Miller, D.S. and Payne, P.R. 1961 Problems in the prediction of protein values of diets: The influence of protein concentration. Brit. J. Nutr. 15: 11-19.
- 12) SPIES, P., COULSON, E.J. et al. 1951 J. Am. Chem. Soc., 73. 3995. Cited by: Schaffino, S.S., McGuire, J.J. and Loy, H.W. The use turbidity measurement is the microbiological determinations of amino acid, Part I. JAOAC. 41: 420.

# YEMEKLIK YAĞLARDA DÜŞÜK KONSANTRASYONLARDAKI MINERAL YAĞIN İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ İLE SAPTANMASI

Kimya Yük. Müh. Serpil ŞENELT (\*)

Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Müessesesi

## Ö Z E T

Yemeklik yağlara ve yağlı gıdalara çeşitli yollardan bulaşan çok az miktarlardaki mineral yağın tayin edilebilmesi için ince tabaka kromatografisi yöntemi geliştirilmiş ve bu yöntem kullanılarak değişik kaynaklı 30 adet yemeklik bitkisel yağda mineral yağ araştırılması yapılmıştır.

% 0,1 ve daha fazla miktarlardaki mineral yağın semikantitatif olarak tayin edilebildiği bu yöntemin uygulandığı yağlardan 9 udedinde % 0,5 in altındaki miktarlarda mineral yağ tesbit edilmiştir.

## GİRİŞ :

Yemeklik yağlara karışan mineral yağın tanınmasında kullanılan en genel metod, mineral yağın sabunlaşmama özelliğine dayanan kalitatif testdir (1). Ancak bu yöntemle % 0,5 in üzerindeki miktarlarda bulunan mineral yağ saptanabilmektedir. Yağa herhangi bir şekilde bulaşan çok daha az miktarlardaki mineral yağın tesbiti ve miktar tayininin yapılabilmesi için daha hassas bir analiz yöntemi gereklidir. Polisiklik aromatik hidrokarbon grupları ihtiva etmesi nedeniyle kanserojen olduğu bilinen mineral yağlar insan sağlığı açısından önem taşıdıklarından, gıdalarda tayin edilmeleri önemlidir (2).

\* Bu çalışmanın yürütülmesindeki katkılarından dolayı Gıda Kontrol Uzmanı Mehmet Bozkurt'a teşekkürlerimi sunarım.

İngiltere'de makinelerin yağlanması için kullanılan mineral yağların fırınlanmış yiyeceklere ağırlıkça % 0.2 ye kadar bulaşma toleransı tanınmış, ancak kullanılacak yağın en az likit parafin B.P. kadar iyi rafine edilmiş olması koşulu konmuştur (3). Amerika Birleşik Devletlerinde ise «Food Drug and Cosmetic Act» in Gıda Katkıları Tüzüğünde yine fırınlanmış yiyeceklere bulaşma oranı en fazla % 0,15 olarak verilmiş ve teknik beyaz mineral yağ spesifikasyonları belirlenmiştir (4).

Mumlu (waxed) kâğıda sarılan yiyeceklere ve ekmeğe bulaşan mineral yağın tesbitinde Phillips ve Biuestein (5) kolon kromatografisi yöntemini denemişler, benzen ile ekstre edilen yağı Alumina kolondan geçirerek mineral yağı ayırmışlardır.

İnce tabaka kromatografisi ile ayırma çalışmalarında ise Hindistan'da Silicagel G plaklar üzerine % 5 gümüş nitrat, alkol püskürtüldükten sonra yağ örneklerinin kloroformdaki çözeltileri damlatılıp, benzende yürütülerek % 3 den fazla miktarlardaki mineral yağ tesbit edilebilmiştir (6).

Kullanılan diğer metodlarda yağ örneklerinin petrol eterindeki çözeltileri plağa damlatılarak n-heptanda yürütülmekte, fosfomolibdik asitin etil alkoldeki çözeltisi ile renklendirilmekte, ya da yağ örnekleri kloroformda çözüldükten sonra plağa damlatılıp, petrol eterinde (kn 60-80) yürütülmekte ve plak kromik asit ile renklendirilmektedir (7).

Bu çalışmada insan sağlığı açısından önemi taşıyan mineral yağların çok az miktarlarda dahi tesbiti ve semi-kantitatif olarak tayin edilebilmeleri için ince tabaka kromatografisi yöntemi uygulanmıştır.

## **MATERYEL VE METOD :**

### **1. Materyel :**

Çalışmada diğer analiz yöntemleriyle saflığı belirlenen zeytin yağı, ayçiçek yağı, pamuk yağı, soya yağı ve mineral yağ örnekleri ile belirli oranlarda mineral yağ içeren bitkisel yağ karışımları standard olarak kullanılmış, ayrıca laboratuvar kontrolleri için Müessesemize gönderilen sıvı yağ örnekleri üzerinde çalışılmıştır.



## 2. Metod :

İnce tabaka kromatografisi metodu uygulanmıştır.

### Reaktifler :

- a) n-heptan - Merck No 4365
- b) Petrol eteri - kaynama noktası 40 - 60°C
- c) Fosfomolibdik asit çözeltisi - fosfomolibdik asitin etanoldeki % 10 luk çözeltisi hazırlanır (w/v).
- d) Kieselgel 60 DC-Alufolien, 0,2 mm - Merck Art 5553

### Aletler :

- a) İnce tabaka kromatografisi cihazı
- b) Etüv
- c) Desikatör
- d) Mikroşırınga

### İşlem :

#### a) Standard çözeltilerin hazırlanması :

Mineral yağın bitkisel yağ içerisindeki % 0,1 : % 0,2 : % 0,3 : % 0,5 : % 1,0 : % 2,0 ve % 5,0 (w/w) lik karışımları hazırlanır ve bu karışımlar % 10 oranında petrol eterinde çözülür (w/v). Ayrıca saf bitkisel yağlar ile mineral yağ % 10 oranında petrol eterinde çözülerek (w/v), saf yağ standartları hazırlanır.

#### b) Yağ örneklerinin hazırlanması :

Yağ örnekleri % 10 oranında (w/v) petrol eterinde çözülerek hazırlanır.

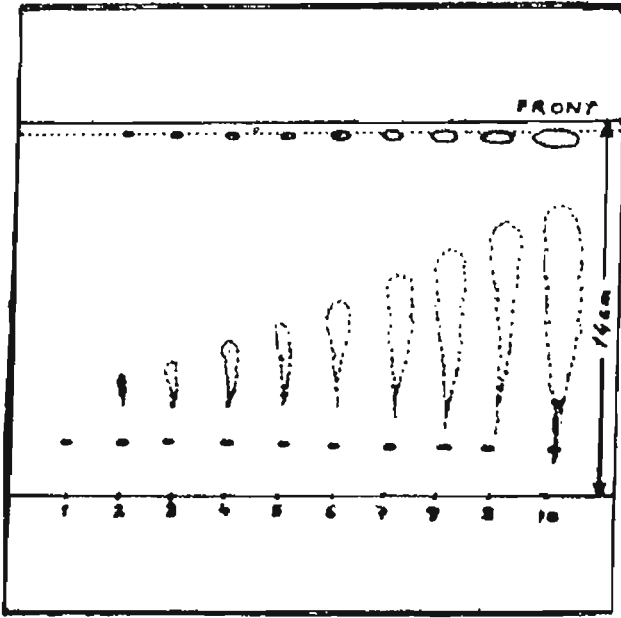
### c) Kromatografik çalışma :

Hazırlanan standard ve örnekler mikropipetle ve eşit miktarlarda olmak üzere plağın alt kenarından 3 cm uzaklığa ve uygun aralıklarla damlatılır. Damla çapı 1 cm yi geçmemelidir. Çözücünün uçmasından sonra plak n-heptan buharı ile doyurulmuş tanka konur. Front mesafesi 14 cm dir. Çözücü plak üzerinde 14 cm ye yükseldiğinde plak tanktan alınır, etüvde 140°C de 30 dakika kurutulur. Desikatörde soğutulan plak üzerine fosfomolibdik asitin alkoldeki % 10 luk çözeltisinden püskürtülerek spotlar renklendirilir, 10 dakika daha 140°C de bekletilir. Meydana gelen standard ve örnek spotları karşılaştırılarak semi - kantitatif bir değerlendirme yapılır.

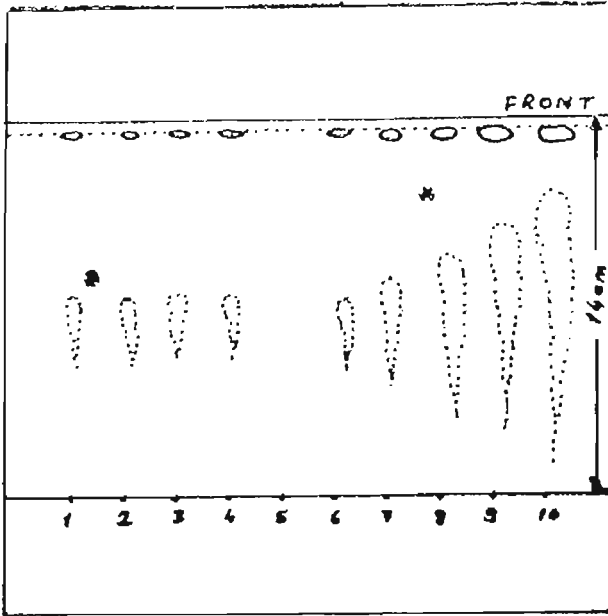
### SONUÇ VE TARTIŞMA :

Çalışmada önce Kieselguhr G ile kaplanmış plaklar kullanılarak trigliseridlerin ayrılmasında kullanılan yöntem (8) uygulanmış, ancak mineral yağın düşük konsantrasyonlarında iyi sonuç alınmamıştır. Bundan sonra değişik kalınlıklarda hazırlanmış Kieselguhr G, Kieselgel 60, Kieselgel G + CaSO<sub>4</sub> . 1/2 H<sub>2</sub>O plaklar ve farklı yürütme solvanları kullanılmış, standardlar ile örneklerin benzeri, petrol eteri gibi çözücülerdeki farklı konsantrasyonları ve sprey çözeltisini alkoldeki % 5, % 10 luk çözeltileri ile çalışılmıştır.

Yapılan denemeler en iyi sonucun Kieselgel 60 DC Merck Art 5553 plaklar üzerinde alındığını göstermiştir. Uygulanan koşullar ile bitkisel yağ içerisindeki % 0,1 oranındaki mineral yağ semi - kantitatif olarak tayin edilebilmiştir. (Şekil - 1) de saf ayçiçek yağı ve mineral yağ ile ayçiçek yağının farklı oranlardaki standard karışımlarının plak üzerinde verdiği spotlar görülmektedir. Bunlar sırasıyla saf ayçiçek yağı, % 0,1 : % 0,2 : % 0,3 : % 0,4 : % 0,5 : % 1,0 : % 2,0 : % 5,0 : % 10,0 oranında mineral yağ içeren ayçiçek yağı standardlarıdır. Saf ayçiçek yağı front yakınında spot vermemekte, karışımlarda ise artan mineral yağ miktarı ile orantılı olarak alanı büyüyen bir spot gözlenmektedir.



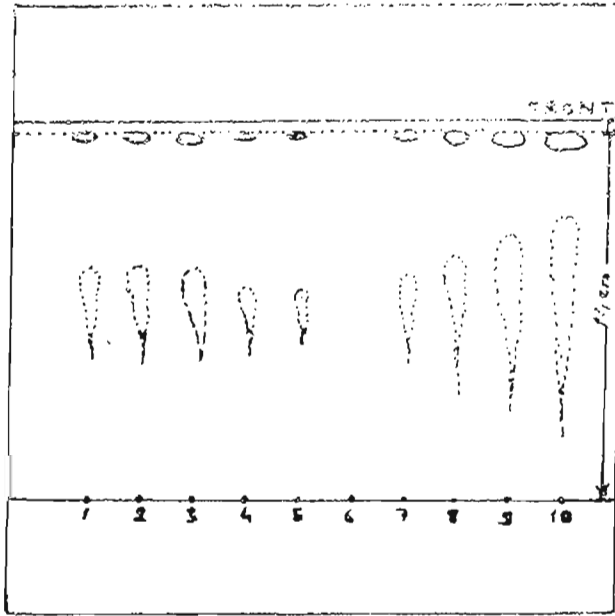
Şekil 1. Saf ayçiçek yağı ile mineral yağ-ayçiçek yağı standard karışımlarının plak üzerindeki spotları.



Şekil 2. Pamuk yağı örnekleri ve mineral yağ-pamuk yağı standard karışımlarının plak üzerindeki spotları.

(Şekil - 2) de çeşitli pamuk yağı örnekleri ile standard mineral yağ - pamuk yağı karışımları yer almaktadır. Burada 1, 2, 3, 4 pamuk yağı örnekleridir. 5 saf pamuk yağı, 6, 7, 8, 9, 10 ise sırasıyla % 0,5 : % 1,0 : % 2,0 : % 5,0 ve % 10,0 mineral yağ içeren pamuk yağı standartlarıdır. Buradaki mineral yağ spotlarının alanları karşılaştırıldığında pamuk yağı örneklerinin % 0,5 kadar mineral yağ ile karışık olduğu görülmektedir.

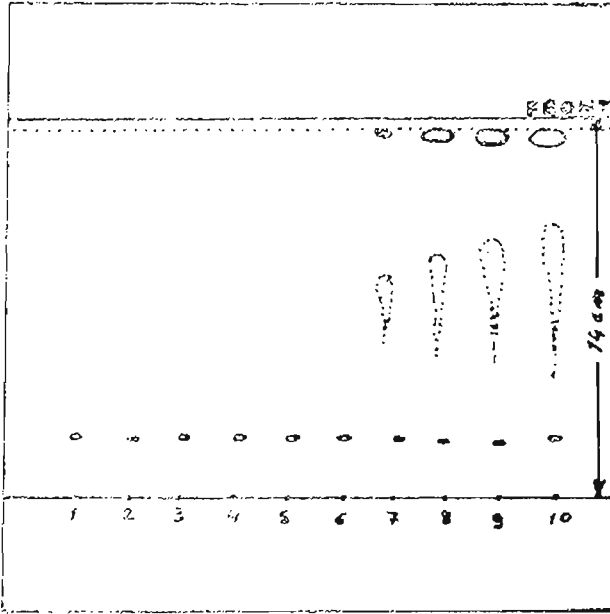
(Şekil - 3) de soya yağı örnekleri ile standard mineral yağ - soya yağı karışımları bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla 1, 2, 3, 4, 5 nolu soya örnekleri, saf soya yağı ve % 0,5 : % 1,0 : % 2,0 : % 5,0 oranında mineral yağ içeren soya yağı standartlarıdır. Burada soya yağı örneklerinde farklı miktarlarda mineral yağ bulunduğu görülmektedir.



Şekil 3. Soya yağı örnekleri ve mineral yağ-soya yağı karışımlarının plak üzerindeki spotları

(Şekil - 4) de zeytin yağı örnekleri ile standard mineral yağ - zeytin yağı karışımlarının spotları görülmektedir. Burada 1, 2, 3, 4, 5 zeytin yağı örnekleri, 6 saf zeytin yağı ve 7, 8, 9, 10 sırasıyla

% 0,2 : % 0,5 : % 1,0 : % 2,0 mineral yağ içeren zeytin yağı örnekleridir. Şekilde görüldüğü gibi zeytin yağı örneklerinde mineral yağ yoktur.



Şekil 4. Zeytin yağı örnekleri ve mineral yağ-zeytin yağı karışımlarının plak üzerindeki spotları.

Laboratuvarımızda değişik kaynaklı 30 adet yemeklik bitkisel yağ örneğinde bu yöntemle mineral yağ tayini yapılmış, bunlardan 9'unda % 0,5 in altındaki miktarlarda mineral yağ bulunduğu, diğerlerinin mineral yağ içermediği saptanmıştır.

## DETECTION OF MINERAL OIL IN EDIBLE OILS BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY

### SUMMARY

Serpil ŞENELT

Thin layer chromatographic method described in this paper was worked on to determine small amounts of mineral oil in edible

oils contaminated with this type of oil. Kieselgel 60 DC - Alufolien, 0,2 mm - Merck Art 5553 plates were used, developing solvent being n - heptane. Standard mixtures of mineral oil - edible oil were prepared containing 0.1 % : 0.2 % : 0.3 % : 0.5 % : 1.0 % and 5.0 % (w/w) mineral oil. Then both the standards and samples were dissolved in petroleum ether (b.p. 40 - 60), the solution containing 10 % (w/v) of oil. The prepared samples were then applied on the chromatographic plate in equal quantities with a microsyringe and the plate developed in n - heptane. The plate was taken out of the tank when the solvent reached 14 cm from the point of application and dried in an oven at 140°C. The spots were visualized by spraying with a 10% solution of phosphomolybdic acid in alcohol and the plate was kept at 140°C for ten more minutes. The spots were then observed. By comparing the sample spots with the standards, a semi - quantitative determination of the amount of mineral oil in edible oils was possible at a level of 0.1 %.

#### KAYNAKLAR

1. Horwitz, W., Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 13th Ed. p. 458 (1980) Washington.
2. Martin, P.G., Manual of Food Quality Control, Vol. 1, p. 49 FAO Food and Nutrition Paper 14/1, Food and Agriculture Organization of the United Nations - Rome (1979).
3. Silverberg, H.D., Mineral Oil in Foods, J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 45, (2), 241 (1962).
4. Silverberg, H.D., Marchin, J., Morgenstern, W.W., Mineral Oil in Foods, J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 49, (4), 820 (1966).
5. Phillips, J., Bluestein, C.K., Determination of Petroleum Products in Certain Foods - A Preliminary Study, J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 45, (2), 226 (1962).
6. Chand, S., Srinivasulu, C., Mahapatra, S.N. Detection of Mineral Oils in Edible Oil by Thin Layer Chromatography, J. of Chromatog. 108, 475 (1975).
7. Martin, P.G., Manuals of Food Quality Control, Vol. 3, p. 278 FAO Food and Nutrition Paper 14/3, Food and Agriculture Organization of the United Nations - Rome (1970).
8. Bozkurt, M., Şenelt, S., Akşehirli, M., Kolza Yağının İnce Tabaka Kromatografisi ve Gaz Kromatografik Analiz Metodu ile Tanınması, Türk Hij. Den. Biyol. Derg. 39, (1), 56 (1982).

## SPERM ANALİZİ VE ELDE EDİLEN SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Edip GÜMRÜKÇÜ (\*)

Dr. Mehmet SAĞLAM (\*\*)

Dr. Sabri GÜNGÖR (\*\*\*)

Günan AŞAR (\*\*\*\*)

Uzm. Ekrem YILMAZ (\*\*\*\*\*)

### Ö Z E T

Laboratuvarımıza infertilite şüphesi, genital yol infeksiyonu ve varikozel tanısı ile gönderilen spermlerin incelenmesi ile elde ettiğimiz sonuçları göz önüne alarak çeşitli sperm fonksiyonları ile bu hastalıkların ilişkisini saptamaya çalıştık. Genital yol infeksiyonu ve varikozel'in sperm sayısını azaltıcı etkisi olduğunu kesin olarak değerlendiremediğimiz halde sperm hareketlerini önemli ölçüde azalttığını saptadık. İFAT ile yaptığımız antikor araştırmasında sperm otoantikörlerinin oluşmasında infeksiyon ve varikozelin etkili faktörlerden olabileceği kanısına vardık. Ayrıca yaptığımız fruktoz tayinlerinde fruktoz miktarının % 200 mg. altına düşmesinin de sperm hareketlerini önemli ölçüde azalttığını gördük. Fakat fruktoz miktarının azalmasında infeksiyonun rolü olduğunu saptayamadık.

### GİRİŞ :

Bilindiği gibi spermler üzerine çeşitli faktörler etkili olmaktadır. Bu faktörleri şöyle sayabiliriz. Skrotal hipertermi testiküler

(\*) GATA Tıp Fak. Mikrobiyoloji Enst. Prof. Tıp. Kdb. Alb.

(\*\*) GATA Tıp Fak. Mikrobiyoloji Enst. Drkt. Prof. Tıp. Kdb. Alb.

(\*\*\*) GATA Tıp Fak. Mikrobiyoloji Enst. Doç. Tıp. Yb.

(\*\*\*\*) GATA Tıp Fak. Mikrobiyoloji Enst. Biyolog

(\*\*\*\*\*) GATA Tıp Fak. Mikrobiyoloji Enst. Uzm. Kd. Bnb.

fonksiyonu kötü etkileyerek sperm olgunlaşmasını engeller (10). Aşırı stres spermatogenezini azaltır. Aşırı nikotini impotansa ve fertilitede azalmaya neden olabilir (8). Marijuananın testosteron seviyesini düşürdüğü ve sperm sayısını azalttığı bildirilmiştir (5). Çeşitli hastalıklar ve enfeksiyonlarda bu konuda etkili birer faktördür. Örneğin diyabet, hipertansiyon, multipl skleroz, kistik fibrozis, varikozel, prostatit ve epididimit kabakulak çeşitli enfeksiyöz mononükleoz ve hepatitin impotansa neden olmak, ejakülasyonu engellemek, testiküller atrofiye neden olmak ve spermatogenezini baskılamak gibi değişik yollardan etkili olabileceği bildirilmektedir (12). Son zamanlarda mikoplazma (özellikle V. Urealytimun) ve klamidya enfeksiyonlarının infertilite nedeni olabileceği görüşleri artmaktadır.

Semen analizinde viskozite ve likefiyeye olup olmama, spermilerin hareket ve canlılığı, morfolojik anormallikler, lökosit, makrofaj ve fazla epitel hücresi bulunması, sperm sayısı, fruktoz düzeyi ve enfeksiyon varlığı gibi hususlar incelenmektedir.

Bunlara ilâveten infertilite yönünden çeşitli immunolojik testler de uygulanmaktadır. Halen sperm aglütinasyonu, jelatin aglütinasyonu, sperm immobilizasyonu, indirekt liresan antikor ve radyo immün testler gibi immunolojik testler ve servikal muküs penetrasyonu ve hamster yumurtası ile yapılan sperm penetrasyonu yöntemleri kullanılmaktadır.

Biz de 1983 yılı ilk 6 ayında laboratuvarımıza infertilite, varikozel ve enfeksiyon nedeni ile gelen 200 sperm tetkikinden elde ettiğimiz sonuçları, çeşitli parametreleri göz önüne alarak, değerlendirmeye çalıştık.

## **GEREÇ VE YÖNTEM :**

Laboratuvarımıza infertilite, enfeksiyon ve varikozel nedenleri ile gönderilen 200 sperm rutin olarak viskozite, niktar, pH, sperm sayısı, canlılık, hareket ve morfolojileri yönünden incelenmiştir. Ayrıca mikroskopta lökosit görülen olgularda kültür yapılmış, ha-



reketi % 50 nin altında bulunanlarda canlılık muayenesi yapılmıştır. 54 olguda sperm fruktoz miktarları tayin edilmiş ve olguların hepsinde mikroskopik aglütinasyon ve İFAT ile serumda antikor aranmıştır. Fruktoz miktarı kuvvetli asit ortamda rezorsinol'un ısıtılması ile oluşan kırmızı rengin spektrofotometrede okunması ile tayin edilmiştir (1). Hareketsiz spermlerin canlılığı eczin - nigrozin ile boyanarak ve mikroskopta incelenerek saptanmıştır (1,4). Sperm otoantikorlarının aranmasında lamda mikroskopik aglütinasyon testi (2) ve O, Rh (negatif) kişiden sağlanan spermle hazırladığımız antijen ile yapılan indirekt Floresan Antikor Tekniği (İFAT) kullanılmıştır.

### BULGULAR :

Tetkik edilen 200 sperm 79 tanesinde kültürde değişik bakteri üredi. Üreyen bakteri türlerinin, stafilokok, anterokok, E. coli, enterobakter grubu bakteriler ve nadir olarak proteus olduğu saptandı. İnfeksiyonlu 79 hastada sperm hareketleri, sperm canlılığı, sperm sayısı ve sperm otoantikorları değerleri Tablo 1 de gösterilmiştir.

Varikoselli 60 hastadaki bulgular ise Tablo 2 de özetlenmiştir. 54 olguda yapılan sperm fruktoz miktarı ile sperm hareketlerine ait bulgular Tablo 3 de gösterilmiştir.

**TABLO 1 — İnfeksiyenli Hastalarda Bulunan Sperm Sayısı, Hareketi, Canlılığı ve Otoantikor Değerleri.**

Hareket	Sperm sayısı			Canlılık	Otoantikor		No.
	No:	(Milyon/ml)	No:		No:	(İFAT)	
% 50	28	70	14	% 50	54	+	24
% 50	51	30—70	38	% 50	25	—	55
		30	29				
<b>Toplam</b>	<b>79</b>		<b>79</b>		<b>79</b>		<b>79</b>

**TABLO II — Varikoselli Hastalarda Bulunan Sperm Sayısı, Hareketi ve Otoantikör Değerleri.**

Sperm Sayısı (Milyon/ml)	Otoantikör (IFAT ile)	No:	Hareket	No:
70	7	1/10	% 50	27
30—70	30	1/20	% 50	31
30	21	1/40	Azospermi	2
Azospermi	2	Menfi		
<b>Toplam</b>	<b>60</b>	<b>60</b>		<b>60</b>

**TABLO III — Sperm Fruktöz Miktarı ile Sperm Hareketleri İlişkisi.**

Fruktöz (% mg)	Hareket	No:	Fruktöz (% mg)	İnfeksiyonlu Sayısı
280	% 50	21	200	21
280	% 30	7	200	6
200—280	% 30—50	4		
200	% 30	22		
<b>Toplam</b>		<b>54</b>		<b>27</b>

### TARTIŞMA VE SONUÇ :

Çoğunluğunu infertilite, genital yol infeksiyonu ve varikosel tanısı ile gönderilenlerin oluşturduğu toplam 200 spermogramın sonuçlarını çeşitli parametreleri göz önüne alarak değerlendirmeye çalıştık.

Yaptığımız sperm kültürlerinden 79 unda sıklık sırasına göre

stafilokok, enterokok, E. koli, enterobakter grubu bakteriler ve proteus üredii.

Sperm sayısının enfeksiyonlu hastalardan 29 unda (% 36), varikoselli hastalarında 21 inde (% 35) 30 milyon/ml. altında olduğunu gördük. Bu hastaların daha önceki sperm sayılarını bilmediğimizden enfeksiyon ve varikosel ile sperm sayısının azalışı arasında sağlıklı bir ilişki kuramadık. Enfeksiyonlu olgulardan 51 inde (% 64,5) sperm hareketlerinin % 50 nin altında, 28 inde (% 35) % 50 nin üstünde olduğunu gördük. Bazı araştırmacılar bazı bakteri endotoksinlerinin sperm hareketlerini azalttığını bildirmişlerdir (11). Bizde enfeksiyonların % 64,5 unda sperm hareketliliğinin % 50 nin altına düşecek kadar azaldığını gördük. Fakat üreyen bakterilerden herhangi birini hareket azalmasından sorumlu tutamadık. Varikoselli hastalarda ise sperm hareketlerini 27 olguda (% 45) % 50 altında, 31 olguda (% 51,6) % 50 nin üstünde bulduk. Daha önceki araştırmalar varikoselin de sperm hareketlerini önemli derecede azalttığını göstermiştir (6). Bizim bulgumuz da diğer araştırmalarla uyum sağlamaktadır.

Hareketin enfeksiyonlularda azalmasına karşın canlı sperm miktarı 25 olguda (% 31) % 50 nin altında, 54 olguda (% 68) % 50 nin üstünde bulunmuştur.

Enfeksiyonlu ve infertil olan olgulardan 24 ünde (% 30) İFAT ile otoantikör saptandı. Bu hastalardan takip edebildiğimiz bir hastada enfeksiyonun geçmesi ve kortizon tedavisinden sonra antikorun menfileştiğini gördük. Bir olgu ile kesin karar vermek mümkün olmamasına rağmen tedaviden sonra antikorun kaybolması, birçok araştırmacının kabul ettiği gibi (3,9), sperm otoantikörlerinin oluşmasında enfeksiyonun rolü olduğu düşüncesini kuvvetlendirmektedir.

Varikoselli hastalarda yaptığımız antikor araştırmasında 2 si azospermili olan 14 olguda (% 23) 1,40 titreye kadar otoantikör saptandı. Sperm antikorlarının oluşmasından sorumlu tutulan nedenler arasında epididim, vas deferens veya ejakülatör kanalların geçici ve devamlı tıkanıklığı, varikosel ve varikoselektomi bildirilmiştir (7). Bizim varikoselli olgularımızda da % 23 oranında antikor saptanması diğer araştırma sonuçlarına uymaktadır.

Sperm antikorlarının saptanmasında çeşitli yöntemler bildirilmiştir. Biz bunlardan başlangıçta mikroskopik aglütinasyon ve İFAT ni uyguladık. Fakat mikroskopik aglütinasyon ile sonuçların okunması, yorumlanması ve değerlendirilmesinin çok güç olduğunu göreyerek sonra yalnız İFAT ile devam ettik.

Sperm hareketleri üzerinde semen'in fruktoz miktarının etkili olduğu bilinmektedir. Semen'in normal fruktoz düzeyi % 150-450 mg. arasında kabul edilmektedir. Bizim 54 kişide yaptığımız fruktoz tayininde 21 kişide (% 38,8) fruktoz % 280 mg. ve üzerinde bulunmuş ve bunlarda sperm hareketliliğinin % 50 üzerinde olduğu görülmüştür. Fruktozu % 280 mg. ve daha fazla olan yalnız 7 kişide (% 12,9) hareketlilik % 30 un altında bulunmuştur. Buna karşı fruktoz % 200 - 280 mg. arasında bulunan 4 kişide (% 7,4) hareketlilik % 30 - 50 arasında, % 200 mg. altında olan 22 kişi de (% 40) ise hareketlilik % 30 un altında bulunmuştur. Buna göre, bizim bulgularımız da fruktozun sperm hareketlerinde etkili faktörlerden biri olduğunu doğrulamaktadır. Ayrıca infeksiyonlu ve sperm hareketliliği % 50 nin altında olan 21 hastada ise (% 77) fruktoz % 200 mg. üstünde bulundu. Bu bulgu bu hastalarda sperm hareketlerinin azalmasından doğrudan doğruya infeksiyonun sorumlu olduğunu düşündürmektedir.

İncelediğimiz bütün olgularda şekil anomalisini % 3 - 4 gibi çok düşük oranda gördük ve bunu herhangi bir nedene bağlı bulamadık.

## SEMEN ANALYSIS AND EVALUATION OF OBTAINED RESULTS

### SUMMARY

**Edip GÜMRÜKÇÜ**

**Mehmet SAĞLAM**

**Sabri GÜNGÖR**

**Günan AŞAR**

**Ekrem YILMAZ**

We tried to evaluate the findings that we obtained by exa-

mination of sperm sent to our laboratory with varicocele, genital tract infection and infertility diagnosis. We have not seen a reducing influence of genital tract infection and varicocele on sperm count. But we have found that these illnesses cause the decrease of sperm motility in an important degree. In autoantibody investigation that we carried out by IFAT we believed that in development of sperm antibody infection and varicocele may be effective. In addition, in fructose assay we have found that when fructose amount is under 200 % mg. the sperm motility has been decreasing. But we could not establish that ingestion has a role in decreasing of fructose.

#### KAYNAKLAR

1. Bauer JD, Ackermann PG, Torc G. Clinical Lab. Methods. Eight ed. ed. Mosby Comp. Saint Louis, 1974.
2. Fjallbrant B. Sperm agglutinins in sterile and fertile men. Acta. Obstet Gynecol Scand. 47: 89-101, 1968.
3. Fjallbrant B, Nilson S. Decrease of Sperm Antibody titer in males, and Conception After Treatment of Chronic Prostatitis. Int J Fertil 22: 255-258, 1977.
4. Fredricsson B, Waxegard G, Brege S, Lundberg I. On the Morphology of Live Spermatozoa of Human Semen. Fertil Steril 28: 168, 1977.
5. Kolodny RC, Masters WH, Kolodner RM, Toro G. Depression of Plasma Testosterone Levels After Chronic Marijuana Use. N. Engl. J Med. 290: 872-874, 1974.
6. Ludwik W. Varicocele and Fertility. Aktual Vrol. 1: 84-81, 1970.
7. Mann T, Lutwak-Man C. Male Reproductive Function and Semen, Springer-Verlag, Berlin Newyork, 1981.
8. Mendelson JH, Mello NK. Biologic Concomitants of Alcoholism. N. Engl J Med. 301: 912-913, 1979.

9. Quesada Em, Dukes CD, Deen GH, Franklin RR. Genital Infection and Sperm Agglutinating Antibodies in Fertile Men. *J. Vrol.* 99: 100-108, 1968.
10. Robinson D, Rock J, Menkin MF. Control of Human Spermatogenesis by induced changes in intrascrotal Temperature. *JAMA* 204: 290-291, 1968.
11. Teague NS, Bovarsky S, Glenn IF, Interference of Human Spermatozoa Motility by *E. Coli*. *Fertil Steril* 1: 84-86, 1970.
12. Wolnistry C. Orchitis as a Complication of Injections Mononucleosis. *N. Engl J Med.* 266: 88-89, 1962.

**YENİ ÜMİTLER, YENİ ANTİBİYOTİKLER**  
**2 : AMİNOGLUKOZİDLERİ İNAKTİVE EDEN ENZİMLERİN**  
**TÜRLERİ ve YAYGINLIKLARI ÜZERİNDE BİR ÇALIŞMA**

Erdoğan BERKMAN

Ö Z E T

Gram (—) basil suşlarında aminoglukozidler inaktive eden enzim türlerini ve yaygınlıklarını saptıyabilmek için bir çalışma düzenlendi. Birinci bölümde 110 *Escherichia coli*, 55 *Klebsiella - Enterobacter*, 51 tanımlanmamış gram (—) basil, 27 *Proteus*, 19 *Pseudomonas*, 2 *Shigella flexneri*, 1 *Salmonella typhimurium*, 1 *Shigella boydii* ve 1 *Providencia* suşunun streptomycin, kanamycin, gentamicin ve tobramycin'e duyarlılıkları araştırıldı. İkinci bölümde tanımlamaya yardımcı olabilmesi için substratlar içine netilmicin'de ilave edildi ve 143 *Escherichia coli*, 83 tanımlanmamış gram (—) basil, 60 *Klebsiella - Enterobacter*, 42 *Proteus*, 29 *Pseudomonas*, 10 *Salmonella typhimurium*, 2 *Citrobacter*, 2 *Shigella flexneri* ve 1 *Shigella dysenteriae* suşunun dirençlilikleri çalışıldı. Bu kısıtlı sayıdaki substratların kullanımı ile elde edilmiş olan dirençlilik profillerine göre bakteri suşlarında streptomycin'i inaktive eden enzimlerden başka APH (3') - I, II, III, APH (2''), AAC (3) - I, III, AAC (3) - Ia, AAC (6') - II, ANT (2'') ve ANT (4') enzimleri saptandı.

**GİRİŞ :**

Aminoglukozidler, ciddi gram (—) bakteri enfeksiyonlarının tedavilerinde kullanılan en değerli ilaçlar arasındadırlar. Kimyasal yapıları yönünden 4 gruba ayrılırlar (1). Şekil 1 moleküler yapılarını genel çizgileriyle göstermektedir. Hidroksil ve amino

Doçent Dr. Hacettepe Üniversitesi Çocuk Sağlığı Enstitüsü.

grupları antibakteriyel etkinlikleri bakımından çok önemli olup bu da bakteri robozomuna tutunabilmeleriyle alakalı olmalıdır (2). İşte aminoglukozidler etkisiz hale dönüştüren enzimlerin etkinlikleri bu gruplar üzerinedir. Bir aminoglukozid değişik enzimler tarafından etkisiz hale dönüştürülebileceği gibi belli bir enzim de değişik aminoglukozidlere etkin olabilir. Yeni türleri ya tabii yollardan yahutta semisentetik olarak elde edilmekte olup bu iş için de ya duyarlı grupların başkalarıyla değiştirilmeleri yahutta enzimin bunlara ulaşabilmesini önlemek için «sterik engelleme» yöntemleri gibi yollar kullanılmaktadır. Ancak bazı duyarlı grupların bu şekilde değişikliğe uğratılması maddenin anti bakteriyel etkinliğini azaltmakta hatta tamamiyle ortadan kaldırmaktadır. Bu gruptan yeni bir maddenin bulunması bakterilerin ona duyarlı olabilecekleri kadar dirençli de olabileceklerini düşündürmelidir. Yeni madde de duyarlı gruplarından tamamiyle arındırılmış olamayacağı için onlara etkin bir enzim veya daha doğru ifadesiyle o enzimin yapımını kodlayan R faktörü bakteri topluluğunda mevcutsa, yaygınlığı ölçüsünde, bu yeni madde de etkisiz kalacaktır. İşte bu çalışmamızla bu nitelikteki enzimlerin bakteri cinslerindeki bulunuş ve yaygınlık derecelerini saptamaya çalıştık. Araştırmamıza son aylarda piyasaya çıkartılmış olan tobramycin ve daha henüz müsaadesi alınmamış olan netilmicin adlı yeni aminoglukozid türevlerini aldık. Tobramycin'e dirençli suşlar 13 Escherichia coli, 15 tanımlanmamış gram (---) basil, 8 Klebsiella-Enterobacter, 5 Proteus, 3 Pseudomonas ve 4 Salmonella typhimurium olmak üzere % 8.1 oranında bulundular. Netilmicin'e dirençli olanlarsa 1 Escherichia coli, 2 tanımlanmamış gram (—) basil, 4 Pseudomonas ve 2 Proteus olarak % 3.7 düzeyinde bulundular. Çalışmaların dikkati çekici noktalarından biri suşlarda ANT (4') enziminin varlığının saptanmış olmasıdır. Bu madde amikacin'e de dirençlilik meydana getirir. O halde henüz ülkemize girmemiş olan bu yeni aminoglukozid türevine de dirençlilik durumu varlığı önyargısı ortaya çıkmaktadır.

## MATERYAL VE METOT

Çalışmanın birinci bölümünde izole edilmiş olan 267 bakteri suşu klinik ve polikliniklerden gönderilmiş olan 164 idrar, 63 muhtelif, 7 dışkı ve 6 boğaz numunesinden, ikinci döneminde bulun-



muş olan 372 suş ise 213 idrar, 113 muhtelif, 21 dışkı ve 20 boğaz numunesinden elde edilmişlerdir. Eosin methylene mavisi besiyerinde üreyen koloniden alınan ve üç şekerli demirli besiyerinde (TSI), üreaz, indol, simmond sitratlı, lysine'li demirli besiyeri (LIA), phenylalanine deaminase, acetate, malonate, sellers ve cetrimide agarı besiyerlerinde incelenen, Salmonella ve Shigella şüphelenilen hallerde agglutinasyon deneyleri ile serolojik tanıları konulan suşlar antibiyotik duyarlılık deneyine alındılar. Ancak, Klebsiellae obasındaki Klebsiella ve Enterobacter türleri ve EMB besiyerinde laktöz negatif koloni yapmış olup yukarıda belirtilmiş olan çalışmalarla kesin tanıları konulamayan suşlar «Klebsiella-Enterobacter grubu mikroorganizma» ve «tanımlanmamış gram (—) basiller» diye bildirilmişlerdir. Numuneler rutin olarak kanlı agara ve thioglycollateli anaerob besiyerine de ekilmiş oldukları halde bu besiyerlerinden sağlanmış olan sonuçlar konu dışı kaldıkları için bu metne alınmamışlardır. Antibiyotik duyarlılık deneyleri Mueller Hinton agarı besiyeri kullanılarak «Agarda disk difüzyonu» yöntemi ile yapıldılar. Kullanılmış olan diskler Oxoid, Difco ve BBL firmalarının ticari diskleri olup :

Streptomycin	10 mcg
Kanamycin	30 mcg
Gentamicin	10 mcg
Tobramycin	30 mcg
Netilmicin	30 mcg

Disklerinden oluşmuştu. Sonuçların değerlendirilmesi Kirby-Bauer yöntemi ile yapıldı (3).

### **TARTIŞMA VE SONUÇ :**

Çalışmanın birinci bölümünde izole edilmiş olan bütün gram (—) bakteri suşlarının streptomycin, (kanamycin, gentamicin ve tobramicin aminoglukozid antibiyotiklerine dirençlilikleri araştırıldı. Saptanmış olan sonuçlar Tablo I de gösterilmiştir :



**Tablo III. 22.1.1983 - 2.3.1983 Döneminde İzole Edilmiş Olan 372 Gram (—) Basilin Streptomycin (S), Kanamycin (K), Gentamicin (G), Tobramycin (T) ve Netilmicin (N) Aminoglikozitlerine Dirençlilikleri.**

Bakteri Türü	Suş Sayı		Saptanmış olan dirençlilikler																		
	S—	Saf.	KS—	GKS—	GKST—	GK—	G—	KST—	GS—	K—	GKT—	GKSN—	GKSTN—	GKTN+	GN+	GN+	KTN+	GSTN+	SN+	T+	
Escherichia coli	143	38	32	28	21	9	5	3	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Tanımlanmamış Gram (—) basil	83	9	16	13	23	11	2	0	0	0	5	0	1	2	0	1	2	1	2	1	1
Klebsiella	60	10	9	7	17	5	6	1	0	4	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Enterobacter																					
Proteus	42	0	6	2	20	5	1	1	1	1	1	0	1	2	0	1	2	1	2	2	2
Pseudomonas	29	0	3	2	14	3	1	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	4	2
Salmonella typhimurium	10	0	0	1	5	4	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Citrobacter	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Shigella flexneri	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Shigella dysenteriae	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Toplamı</b>	<b>372</b>	<b>59</b>	<b>68</b>	<b>53</b>	<b>100</b>	<b>37</b>	<b>15</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>

— Antibiyotik'e/lere dirençliliği

+ Antibiyotik'e/lere duyarlılığı işaret etmektedir.

Streptomycin'i inaktive eden enzimlerin diğ er aminoglukozidleri etkilemediğ i ve bunun aksinin de doç ru olduğ u bilindiğ i için Tablo I deki sonuçlar streptomycin'inkiler çıkartılarak basitleştirildi :

**Tablo II. Tablo I de Bildürülmüş Olan Dirençlilik Pattern'lerinin Streptomycin'inkiler çıkartılarak Basitleştirilmiş ve Birleştirilmiş Şekli.**

Dirençlilik Pattern'i	GK— T+	K— GT+	G— KT+	GKT+	GKT—	Toplam
Suş Sayısı	111	48	22	77	9	= 267

İkinci bölümde idantifikasyona yardımcı olacağı kanısıyla deneylere netilmicin aminoglukozidi de ilâve edildi.

Tablo III deki sonuçları da Tablo I deki sonuçlar gibi streptomycin'inkileri çıkartarak kısaltacak olursak :

**Tablo IV. Tablo III de Bildirilmiş Olan Dirençlilik Pattern'lerinin Streptomycin'inkiler Çıkartılarak Basitleştirilmiş ve Birleştirilmiş Şekli.**

Dirençlilik Pattern'i	GK— TN+	K— GTN+	GKT— N+	G— KTN+T+	GKN— T+	KT— GN+	GKTN— GKTN+	Toplam
Suş Sayısı	115	56	40	17	9	3	127	5 = 372

### TARTIŞMA VE SONUÇ :

Klinikte kullanılmakta olan aminoglukozid antibiyotiklerinin hepsi dirençli bakterilerin ürettikleri enzimler tarafından modifi-



Aminoglukozidlerin moleküler yapıları. İki amino şeker merkezi durumdaki bir 2-deoxystreptamine molekülüne bağlıdır. Karbon atomları streptamine halkasında saat yönünün tersine 1-6 olarak, amino şekerlerde saat yönünde sırasıyla 1'-6' ve 1''-6'' olarak işaretlenmişlerdir. Oklar muhtelif inaktive edici bakteri enzimlerinin etki gösterdikleri grupları göstermektedirler.

Hernekadar bilinen mekanizmalar yalnız bu üçü isede bunları katalize edebilecek 20 kadar enzim saptanmıştır. Substrat özgülüklerine göre 3 gruba ayrılabilirler :

1. Streptomycin ve spectinomycin'i inaktive eden enzimler. Başka herhangi bir aminoglukozide etki yapmazlar. (Bunun tersi de doğru olup diğer aminoglukozidleri inaktive eden enzimler de streptomycin ve spectinomycin'i inaktive edemezler).
2. Streptomycin ve spectinomycin'i inaktive edenler hariç olmak üzere, diğerleri birkaç aminoglukozid üzerine etkilidirler.
3. Bir aminoglukozid birden fazla enzim tarafından inaktive edilir.

Bu muhtelif enzimler bir uygulamaya göre meydana getirdikleri reaksiyonun tipi yeri ve üzerine etki yaptıkları aminoglukozidin adı ile belirtilirler; Gentamicin 2' acetyltransferase gibi. Ancak yukarıda da 2 ci maddede belirtilmiş olduğu gibi genellikle bir enzim birçok maddeyi substrat olarak kullanabilir.

Tablo V'deki bilgilerle Tablo II'deki sonuçlar değerlendirilecek olursa 111 suş adedi ile en büyük kümeyi oluşturan gentamicin ve kanamycin'e dirençli buna karşılık tobramycin'e duyarlı mikroorganizmalardaki dirençlilik pattern'ini tek bir enzim bulunuşu ile açıklayamayız. Kanamycin-neomycin inaktive eden enzimler diye bilinen ve bakterilerde yaygınlıkla buldukları bildirilmiş olan (2) APH (3') enzimleri bunlardan biri ikincisi de tobramycin'e tesir etmeyen ancak gentamicin'i inaktive eden AAC (3) —1 olabilir. Bu şekilde, ikinci büyük küme olan kanamycin'e

Tablo V. Aminoglukozid İnaktive Eden Enzimlerin Etkinlikleri

Enzimler	Aminoglukozidler									
		Kana	Gen	Sis	Tob	Net	Amk	But	Neo	
Phosphorylation	APH (3') - I	+	-	-	-	-	-	-	-	+
	APH (3') - II	+	-	-	-	-	-	+	+	+
	APH (3') - III	+	-	-	-	-	(+)	+	+	+
	APH (2'')	+	+	+	+	-	-			
Adenylylation	ANT (4')	+	-	-	+	-	+	+	+	+
	ANT (2'')	+	+	+	+	-	-			
Acetylation	AAC (2')	-	+	+	+	+	-			
	AAC (6') - I	-	+	+	+	+	+			+
	AAC (6') - II	+	+	+	+	+	-			+
	AAC (3) - I	-	+	+	-	-	-			
	AAC (3) - III	+	+	+	+	+	-			+

+ Dirençliğe sebep olan modifikasyonun varlığını gösterir.

(+) Staphylococcus aureus'un ürettiği enzim dirençliğe sebep olmadan amikacin'i modifiye eder.

Kana A	Kanamycin A	Tob	Tobramycin	But	Butirosin
Gen	Gentamicin	Net	Netilmicin	Neo	Neomycin
Sis	Sisomicin	Amk	Amikacin		

dirençli buna karşılık gentamicin ve tobramycin'e duyarlı 48 suşta saptanmış olan pattern, bu suşlarda yalnız APH (3') enziminin bulunuşu ile açıklanabilir. 22 vak'alık 3. kümede AAC (3) —1 enziminin varlığı sonucu açıklamaya yeterlidir. Bu enzim gentamicin ve sisomicin'in 3 no lu karbon atomuna bağlı olan amino grubunu asetile eder. Aynı noktada amino grubu bulunan başka aminoglukozid'ler de bulunmasına rağmen onlar bu enzim için

iyi substrat değildirler. Dirençli suşların MIC leri normallere göre 45-60 katı yükselmiştir (gentamicin ve tobramycin için). Bu enzimin çoğunlukla *Pseudomonas* suşlarında bulunduğu bildirilmiştir, ancak başka bakteri türlerinde de varlığı saptanmıştır (2). Bizim 22 vak'alık serimizin özelliği ise 8 *Escherichia coli*, 9 tanımlanmamış gram (—) basil, 4 *Klebsiella-Enterobacter* ve 1 *Proteus* suşunda saptanmış olmasına rağmen *Pseudomonas* suşlarında bulunmamış oluşudur. 181 suшта saptanmış olan dirençlilik patternleri iki enzimin birlikte veya tek tek bulunuşları ile izah edilebilmektedir. Gentamicin, kanamycin ve tobramycin aminoglikozidlerine dirençli olan 9 suшта 2 nolu halkanın 2. karbon atomunu bağlı olan OH grubunu modifiye eden APH (2") veya ANT (2") enzimlerinden birinin bulunması gerekir. ANT (2") enziminin en ziyade *Klebsiella* suşlarında bulunduğu ve gentamicin, kanamycin ve tobramycin müşterek dirençliliğinin en yaygın sebebi olduğu iddia edilmiştir (2). Çalışmanın bu bölümünde sonuçlar değerlendirildikte n sonra netilmicin'in de substratlara ilâvesinin idantifikasyona yardım edebileceği düşünülmüştür. Bundan sonra elde edilmiş olan sonuçlar Tablo III de bildirilmiştir. Daha önce de yapılmış olduğu gibi bu sonuçlar da streptomycin'e ait olanlar hariç tutularak ve birleştirmeler yapılarak kısaltılmış ve Tablo IV deki şekle getirilmiştir. Birinci ve ikinci kolondaki sonuçlar için Tablo II'nin aynı kolonları için düşünülenler geçerlidir. (APH (3') enzimleri ve AAC (3) —1 enzimi netilmicin'e etkisizdir. Bu da, bu kolonlardaki suşların netilmicin'e duyarlılığını açıklar. Aynı şekilde 3. kolondaki 40 suşun sahip olduğu enzimin ANT (2") veya APH (2") enzimlerinden biri olduğu düşüncesi geçerli kalmıştır. Keza 4. küme içindeki 17 suşun AAC (3) —1 enzimini yapmakta oldukları tanısı doğrulanmıştır. 5. kolondaki gentamicin, kanamycin ve netilmicin'e dirençli buna karşılık tobramycin'e duyarlı 9 suş için şimdiye kadar konulmuş olan tanımlardan farklı bir yaklaşım düşünülmelidir. Miller (5) bu pattern'i de kapsıyan suşların taşıdıkları enzimi AAC (3) —1a diye tanımlamış ve bunların AAC (3) —1 suşlarına ilâve olarak netilmicin'i de inaktive edebildikle-



rini buna karşılık tobramycin MIC'lerinin normalin 5 katı olmasına rağmen gene de duyarlılık düzeyinde olduğunu bildirmiştir. 6. gruptaki kanamycin, tobramycin'e dirençli buna karşılık gentamicin ve netilmicin'e duyarlı 3 suşun ürettikleri enzim de 2. halkanın 4. karbonuna bağlı olan —OH grubunu adenile eden ANT (4') olmalıdır. Bu da enzim listemize bir ilâve demektir. Son grupta ise kullanılmış 4 aminoglukozide de dirençli bulunmuş olan 5 suş bulunmaktadır. İki enzim, AAC (6') —II ve AAC (3) —III bunu yapabilirler.

Bu kısith çalışmada elde edilmiş olan sonuçlara göre, hepside hastalardan elde edilmiş bakteri suşlarında, henüz ülkemizde kullanılmaya başlanmamış olanlar dahil olmak üzere, klinikte önemli uygulama sahaları olan bütün aminoglukozid antibiyotiklerini etkisiz kılabilecek enzim türleri bulunmaktadır.

## ENZYMES THAT INACTIVE AMINOGLUCOSIDES

### SUMMARY

This study was made to find out the types and the prevalence of the aminoglycoide modifying enzymes. In the first part of the study the sensitivities of 110 *Escherichia coli*, 55 *Klebsiella - Enterobacter*, 51 unidentified gram (—) bacilli, 27 *Proteus*, 19 *Pseudomonas*, 2 *Shigella flexneri*, 1 *Salmonella typhimurium*, 1 *Shigella boydii* and 1 *Providencia* strains were tested against streptomycin, kanamycin, gentamicin and tobramycin aminoglycoside antibiotics. In the second part of the study netilmicin was added to the tested material to extend the substrate profile and 143 *Escherichia coli*, 83 unidentified gram (—) bacilli, 60 *Klebsiella-Enterobacter*, 42 *Proteus*, 29 *Pseudomonas*, 10 *Salmonella typhimurium*, 2 *Citrobacter*, 2 *Shigella flexneri* and 1 *Shigella dysenteriae* strains were tested accordingly. In addition to the streptomycin inactivating enzymes, we predicted the presence of APH (3') - I, II, III, APH (2''), AAC (3) - I, III, AAC (3) - Ia, AAC (6') - II, ANT (2'') and ANT (4') enzymes according to the results

## KAYNAKLAR

1. Davies, J., Smith, D.I.: Plasmid - Determined Resistance to Antimicrobial Agents. *Ann. Rev. Microbiol.* 32: 469, 1978.
2. Kallings, L.O.: Resistance Factors: Influence on Netilmicin Activity. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 23: 54, 1980
3. Bauer, A.W., Kirby, W.W.M., Sherris, J.C., ve ark.: Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. Clin. Path.* 45: 493, 1966.
4. Murray, B.E., Moellering Jr., R.C.: Patterns and Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Medical Clinics of North America. Symposium on Infectious Diseases.* 62: 809, 1978.
5. Miller, G.H. Sabatelli, F.J., Hare, R.S. ve ark.: Survey of aminoglycoside resistance patterns. *Developments of Industrial Microbiology.* 21: 91. 1980

## KORTİKOSTEROİDLERİN SEPTİK ŞOKTAKİ ETKİLERİ

Dr. Yüksel TATKAN (\*)

Dr. Avni TARTAN (\*\*)

Dr. Yusuf YAZICI (\*\*\*)

Dr. Mehmet KAYA (\*\*\*\*)

Dr. Hasan BAŞARIR (\*\*\*\*\*)

Dr. Mahmut BÜLBÜL (\*\*\*\*\*)

### Ö Z E T

Septik şokta yüksek doz kortikosteroidin etkisini araştırmak amacıyla, yedişerli üç grup oluşturan köpekler üzerinde çalışılmıştır. I. gruba sadece 30 mg/kg. metil prednizolon (MP), II. gruba sadece 0,5 ml/kg endo(ksin ve III. gruba önce aynı miktar endotoksin ve TA. 65 mm/Hg'nin altına düşüncü I. gruptaki kadar MP verilmiş ve enjeksiyondan önce ve şok oluşmasını izleyen 30, 60, 120 ve 240. dakikalarda, TA, nabız, CVP, kanda üre, kreatinin, alkali fosfataz, asit fosfataz, SGOT, SGPT, fibrinojen ve trombosit düzeyleriyle, protrombin ve parsiyel tromboplastin zamanları tayinleri yapılmıştır.

Elde edilen bulguların karşılaştırılması sonucunda; MP'un alkali ve asit fosfataz, SGOT, fibrinojen ve trombosit değerlerine olumlu etkilerde bulunduğu, izlenen diğer parametrelerde II. ve III. grup denekler arasında anlamlı bir değişiklik bulunmadığı saptanmış ve septik şok tedavisinde yüksek doz kortikosteroid kullanılmasının yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

### GİRİŞ :

Şok için halen tüm yazarlarca kabul edilmiş bir tarif bulunmamakla birlikte, bugün için septik şoku; «gram pozitif ve gram

---

(\*) GATA. As. Tıp. Fak., 2. Genel Cerrahi Kliniği Doçenti.

(\*\*) GATA. As. Tıp. Fak., 2. Genel Cerrahi Kliniği Doçenti.

(\*\*\*) GATA. As. Tıp. Fak., 2. Genel Cerrahi Kliniği Direktörü.

(\*\*\*\*) GATA. As. Tıp. Fak., 2. Genel Cerrahi Kliniği Başasistanı.

(\*\*\*\*\*) GATA. As. Tıp. Fak., 2. Genel Cerrahi Kliniği Asistanı.

(\*\*\*\*\*\*) GATA. As. Tıp. Fak. 2. Genel Cerrahi Kliniği Asistanı.

negatif mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlar, ya da bu mikroorganizmalar veya bazı ürünlerinin oluşturduğu septisemiler sonucu meydana gelen ve yaşamsal organlara kan akımının yetersiz olması veya vücut hücrelerinin besinleri gerektiği gibi kullanamaması durumudur. Çeşitli tanımlamak mümkündür (10, 14).

Esşerşia koli, klebsiella türleri, proteuslar, bakteroidesler, psödomonas, piyosiyaneus, salmonella, herellea ve koliform basiller gibi gram negatifler, pnömokok, streptokok ve stafilokok gibi gram pozitifler septik şoka neden olan bakteriyemilerde en sık raslanan mikroorganizmalardır (2, 5, 7, 12, 15, 18, 21). Bu bakteriyemiler genellikle üriner, genital ve hepatobiliyer sistemler ile kolonlardaki enfeksiyonlardan kaynaklanır. Büyük yanıklar, genito-üriner sistemin aletle muayenesi, intravenöz kateterizasyonlar, trakeostomi, neoplazik hastalıklar, malnütrisyon, diyabet, steroid veya immünesüpressif tedavi, şimiyoterapi ya da radyoterapi, septik şok oluşmasında hazırlayıcı faktörlerdir (4, 9, 12, 14, 20).

Septik şok eksikliği hakkında kesin rakamlar vermek oldukça zordur. Ancak son yıllarda, büyük travmalardan sonra hayatta kalma şansının artmasını sağlayan tıbbi olanaklar, sentetik materyellerin tedavide kullanılması, transplantasyon cerrahisinde kaydedilen aşamalar, uzun süreli enfüzyon ve ventilasyon uygulamaları, septik şokla daha sık karşılaşılmasına neden olmaktadır (10, 21). Bugünün koşullarında bile septik şok son derecede ciddi bir durum olup mortalitesi oldukça yüksek bulunmaktadır. Mortalite oranı primer hastalıkla yakından ilişkili olup, FREID ve VOSST, % 34 ünde çok gelişen 270 sepsisli hastada bu oranı, bakteriyel endokardit, akut lösemi, postnekrotik siroz gibi hızla ölüme götüren hastalıklar grubunda % 86, lenfoma, gastrointestinal tümör, kronik lösemi gibi sonunda ölüme götüren hastalıklar grubunda % 46 ve malign olmayan hastalıklar grubundaysa % 16 olarak bildirilmiştir (14).

Mikroorganizmalar toksik şok tablosunu endo veya ekzotoksinleriyle oluşturmaktadır. Gram negatif olanlar bir lipopolisakkarit olan endotoksinleri, gram pozitiflerse bir protein olan ekzotoksinleriyle etkili olmaktadır. Şoka neden olan faktör ne olursa olsun sonuç doku perfüzyonunun bozulmasıdır. HARDAWAY ve ark. bu bozulmanın katekolamin deşarjı sonucu meydana gelen vazokons-

triksiyon ve mikrosirkülasyondaki arterio-venöz şantların açılmasıyla oluştuğunu bildirmektedir (9). Ancak septik şokta bunun dışında ortaya çıkan primer bir bozukluktan da söz edilmektedir (1, 4, 6, 14). Bu, hücrelerin oksijen kullanımında görülen bir bozukluktur. Doku perfüzyonunun bozulması asit metabolitlerin birikmesine, asidozun artması da postkapiller sfinkterlerin kapalı kalmasına karşın prekapiller sfinkterlerin açılarak kapiller yatakta göllenmeye ve şokun ilerlemesine neden olmaktadır.

Endotoksin hipotalamustaki termoregülasyon merkezine direkt etkiyle ateşin yükselmesine sebep olur. Ateş yükselmesinde ayrıca, lökosit ve RES hücrelerinde oluşan ve hipotalamusta prostoglandin ve monoaminlerle reaksiyona girerek etkili olan endojen-pirojen adlı, protein yapısında bir maddenin de rolü bulunduğu bildirilmiştir (7).

Gene endotoksin, kan dolaşımındaki XII. faktörü (Hageman faktörü) aktive edebilmektedir. Bu duruma koagülasyonu başlatır ve olay fibrin oluşumuyla tamamlanır. Klinik sonuç dissemine intravasküler koagülasyon (DIC) olup laboratuvar olarak hiperplazminojenemi, trombositopeni, fibrin parçalanma ürünlerinde artış ve DIC dan sonra sekonder fibrinoliz saptanır. Ayrıca Hageman faktörü bradikinini aktif hale getirir ve bu kinin hipotansiyonun nedeni olabilir (7).

Son yıllardaki bazı gözlemler beta endorfin prekürsörü olan beta lipotropin'in de şokun erken safhasındaki vazodilatasyondan sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Beta endorfin hipofizden ACTH ile birlikte salgılanmakta ve yapısı ona benzemektedir. Beyinde opium alkaloidlerinin bağlandığı reseptörlere bağlanan beta endorfinin bu alkaloidlere benzer etkileri de vardır. Bu nedenle şoktaki vazodilatasyonu önlemek için ACTH yı baskılayan yüksek doz steroidlerden veya opium antagonisti olan naloxan gibi maddelerden yararlanılarak beta endorfinlerin salınışı azaltılmaktadır (11, 18).

Septik şok tedavisinin esası; şoku oluşturan enfeksiyonun ortadan kaldırılması ve bozulan doku perfüzyonunun yeniden düzeltilmesidir. Septik odağın ortadan kaldırılması; venöz kateter veya idrar sondasının çıkartılarak çok titiz asepsi şartlarında yeniden takılması, mevcut absenin drene edilmesi, gastrointestinal fistül-

lerin tamiri ve antibiyotiklerin kullanılmasıyla sağlanmaya çalışılır. Bozulan doku perfüzyonunun düzeltilmesi için de; i.v. sıvı tedavisi, solunumun desteklenmesi, dijitalizasyon, vazoaaktif ilaçlar, asit-baz ve elektrolit denge bozukluklarının giderilmesi ve farmakolojik dozda kortikosteroidlerin kullanılmasından yararlanılır.

Kortizon ve derivelere; bağ dokusu reaksiyonlarını frenlemek, iltihabi endürasyonu ve proliferasyonu durdurmak ve doku toksik etkilerden korunak gibi nonspesifik özelliklerinden yararlanmak amacıyla kullanılmasına «farmakolojik tedavi» adı verilir. Bu nonspesifik etkinin steroidlerin; toksinleri nötralize etmeleri, doku direncini arttırmaları veya hücre ve lizozom membranının stabilize edilmeleriyle ilgili olduğu ileri sürülmüştür (1, 8, 10, 13, 16). Lizozomlar intrasellüler proteinleri sindirmeye elverişli enzimleri içermekte ve düşük pH da bunlar parçalanınca serbestleşen enzimleri hücrenin ölümüne neden olmaktadır. Her ne kadar bazı yazarlarca yararları şüpheli karşılanmakta ve immün sistemi bozarak stafilokok süperenfeksiyonuna, yaygın doku abselerine ve üst gastrointestinal sistem kanamalarına neden oldukları ileri sürülmekte (3, 7, 18) ise de, kortikosteroidlerin; kapiller duvarının, hücre ve lizozom membranının stabilitesini sağlaması yanında, trombosit agregasyonunu azaltması, vazodilatasyon oluşturması ve kalbe pozitif inotrop etki göstermesi gibi olumlu etkileri gözönünde tutularak şokta kullanılmaları bugün için birçok yazarca kabul edilmektedir (3, 9, 10, 18).

Klinik deneyimler kortikosteroidlerin yüksek dozlarının kısa süreli uygulanmasındaki riskin, küçük dozların uzun süreli uygulanmasındakine oranla daha az olduğunu ve 35 mg/kg. metilprednizolon veya eşdeğer bir kortizon derivativesinin i.v. verilerek, gerekirse bunun dört saatte bir tekrarlanmasıyla tedavinin yapılmasının yerinde olacağını göstermişlerdir. (9).

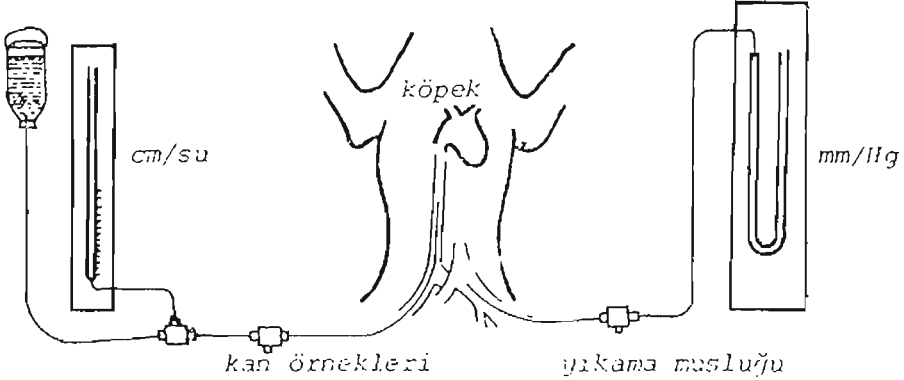
İşte, septik şok tedavisinde uygulanan bu yüksek doz kortikosteroidin, rutin laboratuvar tetkikleri ve hemodinamik ölçümleri ne yönde etkilediği araştırılmak amaçlanmış ve bu amaca ulaşmak için de deneysel bir çalışma planlanmıştır.

#### **GEREÇ VE YÖNTEM :**

Çalışmada denek olarak, ağırlıkları 13 - 21 kg. arasında değişen

21 sokak köpeği kullanılmış ve yedilerli üç grup oluşturulmuştur.

Denekler 25 mg/kg. i.v. nambutalle uyutulduktan sonra, femoral arter ve ven kanüle edilerek hem nabız, arteriyel kan basıncı (TA) ve santral venöz basınç (CVP) ölçümlerinin yapılabilirdiği, hem de venöz kan örnekleri alınarak serum enfüzyonunun mümkün olduğu bir sistem meydana getirilmiştir. (Şekil. 1).



Şekil 1. Araştırmada oluşturulan model.

I. grup denekleresadece 30 mg/kg metilprednizolon (MP) i.v.

II. grup deneklere sadece 0,5 ml/kg endotoksin. (1 ml. de  $10^9$  koli içeren solüsyon sonik vibratörde parçalandıktan sonra filtre edilerek elde edilmiştir) i.v. verilmiştir. Bu miktar endotoksin genellikle 10 dakika içerisinde TA. i 65 mm/Hg. nin altına indirilmiştir (Septik şok). Bu durumun oluşmadığı iki deneğe 5 dakika arayla birer ml. endotoksin iki kez verilerek TA aynı düzeye indirilmiştir.

III. grup deneklere önce II. gruptaki gibi endotoksin verilmiş, TA 65 mm/Hg. nin altına inince 30 mg/kg MP i.v. enjekte edilmiştir. Venöz kan örnekleri tüm deneklerde kateter yerleştirildikten hemen sonra ve I. grupta MP verilmesinden, diğer gruplarda septik şok oluşmasından sonraki 30, 60, 120 ve 240. dakikalarda alınmıştır. Bu kan örneklerinde; üre kreatinin, alkali fosfataz, asit fosfataz, serum glutamik oksalasetik transaminaz (SGOT) ve serum glutamik piruvik transaminaz (SGPT), ayrıca başlangıç ve 120. dakika örneklerinde protrombin zamanı (PT),

parsiyel tromboplastin zamanı (PTT), fibrinojen düzeyi ve trombosit sayısı tayinleri yapılmıştır.

II. ve III. gruptaki deneklerden; akciğer, böbrek, karaciğer ve sürrenal bezden parçalar alınarak ışık mikroskopisinde histopatolojik incelemeleri yapılmıştır.

İzlenen parametrelerden; TA: civalı manometre, (mm/Hg), CVP: su manometresi (cm su), nabız: prekordiyal bölgeye konan steteskopla kalp sesleri sayılarak ( /dk), üre: Urease-Nesslerisation (mg/100 ml), kreatinin: Folin-Mayer (mg/100 ml), alkali fosfataz: King and King (mÜ/ml), asit fosfataz: Bessey-Lowry Brock (BLÜ), SGOT ve SGPT: Frankel-Reitman otomasyon (Ü), protonibin zamanı: Quick (saniye), PTT: Nye and Graham (saniye), fibrinojen: kroniatografik (mg/100 ml), trombosit sayısı: faz kontrastta direkt sayma ( $mm^3$ ), yöntemleriyle tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçların istatistiksel incelenmesi; grupların kendi içlerindeki fark, Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek, gruplar arası fark ise Mann Whitney testleriyle değerlendirilmiştir.

## BULGULAR

İzlenen parametre değerlerinin ortalamaları (X) bulunarak, deney süresince oluşan değişiklikler ortaya konulmaya çalışılmış, daha sonra gruplar birbirleriyle karşılaştırılmıştır.

I. grupta; tüm parametrelerde ilk değerlerle deney süresinde elde edilenler arasında ufak farklılıklar izlenmiş, ancak bunlar istatistiksel anlamsız bulunmuştur.

Nabız, TA ve CVP değerlerinde, II. ve III. gruplarda izlenen periyotlarda anlamlı bir azalma meydana gelmiş, ancak bu iki grup arasındaki fark önemsiz olmuştur. Hemodinamik parametrelerin değerleri ve gruplar arası karşılaştırmaların istatistiksel sonuçları Tablo. I de gösterilmiştir.

Üre, kreatinin, alkali fosfataz ve asit fosfataz değerlerinde benzer değişiklikler izlenmiştir. II. ve III. grupta, özellikle birinci saatten sonra değerlerde önemli artışlar olmuştur. Bu iki grubun değerleri I. gruba karşılaştırıldığında artışlar anlamlı an-



**TABLO — 1: Hemodinamik bulguların değerleri ve gruplar arası karşılaştırmaların istatistiksel sonuçları.**

Saatler	Gruplar	TA			CVP			NABIZ			Karşılaştırmalar			TA		CVP		NABIZ	
		X	SX	X	X	SX	X	SX	X	SX	X	SX	U	P	U	P	U	P	
0	I	135,0	2,7	4,9	0,5	110,0	4,6	I-II	20,5	—	32,5	—	26	—					
	II	137,1	3,3	6,0	0,9	112,6	5,3	I-III	31	—	25,5	—	34	—					
	III	137,9	2,8	4,8	0,5	116,3	3,4	II-III	25,5	—	31,5	—	26,5	—					
1/2	I	132,1	3,3	5,0	0,5	110,2	5,0	I-II	49	+	49	+	43	+					
	II	66,4	2,1	0,57	0,5	160,6	12,8	I-III	49	+	49	+	48	+					
	III	64,3	1,7	0,82	0,4	168,0	5,4	II-III	30	+	37	+	28	+					
1	I	135,7	3,0	4,9	0,5	108,0	3,3	I-II	48	+	49	+	48	+					
	II	52,1	2,9	-2,07	0,4	167,4	13,2	I-III	49	+	49	+	48	+					
	III	52,8	2,9	-1,7	0,3	174,0	3,6	II-III	25	±	26,5	+	31	+					
2	I	132,1	2,9	5,2	0,5	108,0	2,1	I-II	49	+	49	+	49	+					
	II	45,0	2,2	-2,8	0,4	176,8	8,9	I-III	49	+	49	+	49	+					
	III	43,6	2,8	-2,4	0,3	183,4	1,5	II-III	28	+	28,5	+	28,5	+					
4	I	132,9	2,4	5,1	0,5	109,5	4,9	I-II	48	+	48	+	42	+					
	II	28,0	1,9	-4,5	0,5	189,0	3,9	I-III	48	+	48	+	42	+					
	III	30,0	1,6	-3,2	0,4	190,0	1,9	II-III	14,8	+	21	+	17	+					

X: Ortalama değer  
 SX: Ortalamanın standart hatası  
 U: Mann Whitney testi sonucu  
 P (-): P 0,05  
 P (+): P 0,05



**TABLO — 3: SGOT ve SGPT değerleri ve gruplar oranı karşılaştırmalarının istatistiksel sonuçları**

Saatler	Gruplar	SGOT		SGTP		Karşılaştırılan Gruplar	SGOT		SGPT	
		X	SX	X	SX		U	P	U	P
0	I	21.9	2.0	23.5	1.2	I-II	25.5	—	34.5	—
	II	20.0	2.1	22.6	1.6	I-III	28	—	27.5	—
	III	22.0	2.5	22.7	1.9	II-III	25.5	—	25.5	—
1/2	I	23.7	1.7	21.5	2.3	I-II	39	+	30	+
	II	36.7	3.5	30.1	2.8	I-III	43.5	+	39	+
	III	27.9	1.7	28.9	2.8	II-III	37	—	28	—
1	I	22.4	1.7	19.8	1.7	I-II	49	+	49	+
	II	49.3	2.5	80.4	3.0	I-III	49	+	49	+
	III	52.6	2.4	83.0	4.1	II-III	48	+	29	—
2	I	25.0	2.7	21.9	2.8	I-II	49	+	49	+
	II	102.9	4.9	109.9	5.0	I-III	49	+	49	+
	III	77.9	1.9	104.0	5.4	II-III	49	+	29	—
4	I	22.5	2.8	21.7	2.2	I-II	39	+	30	+
	II	120.0	3.0	116.6	2.5	I-III	39	+	32	+
	III	89.6	4.2	119.4	3.9	II-III	40	+	21	—

cak II. grubun III. grupla karşılaştırılması üre ve kreatinin için anlamsız, fosfatazlar içinse anlamlı olarak bulunmuştur. (Tablo. 2).

SGOT değerleri II. ve III. gruplarda devamlı olarak yükselmiştir. Bu yükselme II. grupta 30., III. gruptaysa 60. dakikada anlamlılık kazanmıştır. Bu iki gruptaki 30. dakika değerleri de I. gruba nazaran belirgin derecede fazla bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Bu anlamlılık deney süresince devam etmiştir. Ayrıca III. gruptaki değerler de 30. dakikadan itibaren II. gruptan anlamlı farklı bulunmuştur. (Tablo. 3).

SGPT değerleri de II. ve III. gruplarda devamlı artışlar göstermiştir. Artış II. grupta 1. saatten itibaren anlamlıdır. Birinci gruba göre diğer gruplardaki artış 30. dakikadan itibaren anlamlı olmuş, II. ve III. grupların birbirleriyle olan karşılaştırmalarında fark anlamsız bulunmuştur.

PZ ve PTT değerlerinde benzer değişiklikler izlenmiş ve II. ve III. grupta 2. saat değerleri başlangıç değerlerine göre anlamlı olarak artmıştır. (Tablo. 4).

**Tablo. 4 — Protrombin zamanı (PZ) ve Parsiyel Tromboplastin Zamanı (PTT) Ortalama Değerleri (saniye).**

Gruplar	Parametreler	Saatler		p
		0	2	
I	PZ	13,0 ± 0,5	13,1 ± 0,7	> 0,05
	PTT	45,7 ± 3,2	48,6 ± 3,4	> 0,05
II	PZ	12,4 ± 0,6	17,0 ± 0,8	< 0,05
	PTT	41,4 ± 2,4	82,1 ± 2,7	< 0,05
III	PZ	13,1 ± 0,7	16,4 ± 0,8	< 0,05
	PTT	44,4 ± 2,5	72,9 ± 5,1	< 0,05

II. ve III. grupların 2. saat değerleri kendi aralarında önemli bir farklılık göstermezken, I. gruba göre bu artışlar çok anlamlı bulunmuştur. (Tablo. 5).

**Tablo. 5 — Hematolojik Bulguların Gruplar Arası Karşılaştırmaları İstatistiksel Sonuçları.**

Saatler	Karşılaştırılan Gruplar	PTT		PZ		Trombosit +		Fibrinojen	
		U	p	U	p	U	p	U	p
0.	I-II	32,0	—	32,0	—	31,0	—	25,0	—
	I-III	28,5	—	25,0	—	29,0	—	28,0	—
	II-III	32,0	—	30,0	—	38,0	—	28,5	—
2.	I-II	49,0	+	45,5	+	46,0	+	49,0	+
	I-III	45,5	+	44,0	+	42,5	+	40,0	+
	II-III	38,0	—	28,5	—	41,0	+	45,5	+

Fibrinojen ve trombosit değerlerinde ise; II. ve III. grupta 2. saat değerlerinde anlamlı bir azalma, bu grupların 2. saat değerlerinin I. grubun aynı zamandaki değerine göre önemli bir farklılık ve II. grubun III. gruba göre anlamlı bir azalma gösterdiği izlenmiştir. (Tablo. 5 ve 6).

**Tablo. 6 — Deneklerin Fibrinojen ve Trombosit Ortalama Değerleri.**

Gruplar	Parametreler	Saatler		p
		0	2	
	Fibrinojen	537,1 ± 36,4	561,4 ± 22,4	> 0,05
I	Trombosit	332,5 ± 23,6	308,5 ± 25,7	> 0,05
	Fibrinojen	541,1 ± 31,9	237,1 ± 32,5	< 0,05
II	Trombosit	358,8 ± 22,2	118,6 ± 11,8	< 0,05
	Fibrinojen	515,7 ± 41,1	337,7 ± 20,9	< 0,05
III	Trombosit	348,4 ± 29,4	197,1 ± 26,9	< 0,05

Deney sonunda II. ve III. grup deneklerden alınan doku parçalarının ışık mikroskopunda incelenmesiyle şu değişiklikler saptanmıştır.

Akciğer kesitlerinde;

II. grupta: Damarlarda konjesyon, bronşiol ve alveollerde yer yer eritrosit ve fibrin birikimleri (Şekil. 2)

III. Grupta: Hafif konjesyon (Şekil. 3)

Böbrek kesitlerinde;

II. grupta: Glomeruler yumakta ve interstisyum damarlarında belirgin konjesyon, interstisyumda eritrosit kümeleri, yerel minimal lenfosit infiltrasyonu (Şekil. 4)

III. grupta: Hafif konjesyon (Şekil. 5)

Karaciğer kesitlerinde :

II. grupta: Yerel parankimal nekroz, sinuzoidlerde polimorf nüveli nötrofil ve lenfosit birikimi, Kuppfer hücrelerinde hiperplazi (Şekil. 6)

III. grupta: Hafif derecede konjesyon (Şekil. 7)  
Sürrenal bez kesitlerinde :

II. grupta: Özellikle medulla olmak üzere belirgin konjesyon (Şekil. 8)

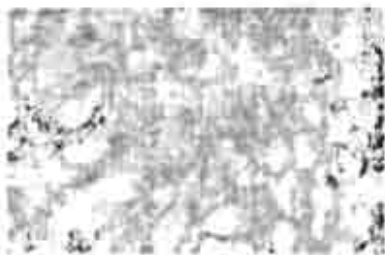
III. grupta: Belirgin bir patolojinin bulunmadığı (Şekil. 9)

## TARTIŞMA VE SONUÇ

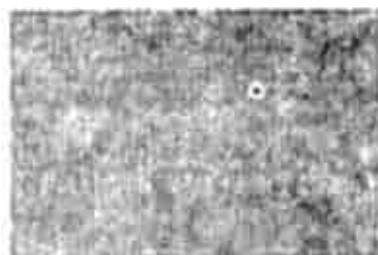
Tıp alanındaki birçok başdöndürücü ilerlemelere rağmen septik şok, halen sahip olduğu yüksek mortalitesiyle çözümlenmemiş bir sorun olarak durmaktadır. Bakteriyemi veya virus enfeksiyonu sonucu ortaya çıkan septik şok tedavisinde ilk adım, şüphesiz nedenin olanaklar içerisinde ortadan kaldırılmasıdır. Ancak antibiyotikler toksinlere etkili olamadıklarından genellikle tedavi yetersiz kalmaktadır. İ.v. sıvı verilmesi ve vazcaktif ajanlar da pek etkili olamazlar. Bu durumda yüksek doz kortikosteroid tedavisi endikasyonu doğar (8, 9).

Kortikosteroid tedavisinin etkili olmasında ilk koşul çok yüksek dozlarının kullanılmasıdır. Bir defalık yüksek dozun, endokrin sistemi frenleyici etkisinin küçük dozlarındakinden genellikle fazla olmaması ilgi çekicidir. Bu nedenle kritik durum atlatılınca kadar yapılacak bir iki günlük yüksek doz kortikoterapinin, önemli bir tehlikesinin bulunmadığı konusunda fikir birliği mevcuttur. Böyle bir tedaviyle survinin arttığı bildirildiği gibi, şok gidişinde olumlu bir etkinin alınmadığı da iddia edilmektedir (3, 9, 10, 18).

Endotoksik şokta kortikosteroidlerin etkilerini araştırmak amacıyla yapılan bu çalışmada, verilen MP un hemodinamiği yansıtan TV, CVP, ve nabız gibi parametrelerde herhangi bir değişiklik oluşturmadığı görülmüştür. Şoku takiben MP verilen III. grupta da ilaç, endotoksine bağlı değişiklikleri etkileyememiştir. Bu bulgular LILLEHEI (13) ve HARDAWAY (9) gibi araştırmacıların işaret ettikleri «kortikosteroidlerin alfa adrenerjik reseptör blokajına bağlı vazodilatasyon yapıcı ve pozitif kronotropik etkileri» ne uymaktadır.



Şekil 2. II. gruba ait köpekte akciğer. Işık Mik. H.E. X75



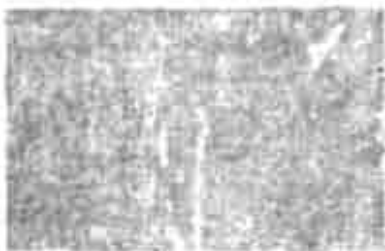
Şekil 3. III. gruba ait köpekte akciğer. Işık Mik. H.E. X30



Şekil 4. II. gruba ait köpekte böbrek. Işık Mik. H.E. X200



Şekil 5. III. gruba ait köpekte böbrek. Işık Mik. H.E. X75



Şekil 6. II. gruba ait köpekte karaciğer. Işık Mik. H.E. X200



Şekil 7. III. gruba ait köpekte karaciğer. Işık Mik. H.E. X30



Şekil 8. II. gruba ait köpekte sürrenal. Işık Mik. H.E. X75



Şekil 9. III. gruba ait köpekte sürrenal. Işık Mik. H.E. X75

Kortikosteroidler protein metabolizmasına etkiyle üre sentezini yavaşlatır. I. grupta kan üre değerlerinin değişmemesi, verilen MP ile üre metabolizmasının etkilenmediğini düşündürmektedir.

Şokta görülen en önemli olay akut böbrek yetmezliğidir. Bu durum, endotoksinin nefrotoksik etkisi yanında, oluşan böbrek kanlanması azalması ve doku perfüzyonunun bozulmasıyla ilgilidir. Böbrek kan akımının şokta, katekolaminlerin böbrek arterlerinde oluşturduğu vazokonstriksiyon neticesi, normalin % 25 ine indiğini POWERS ve ark. göstermişlerdir. Ayrıca TRUETA ve ark., CARRIERA ve ark. ve BELL ve ark. nın gösterdiği gibi kortiko-medüller şantların açılması sonucu kan akımı büyük ölçüde medüllaya yönelmekte ve korteks doku perfüzyonu ileri derecede bozulmaktadır. Alfa adrenerjik blokörler ve kortikosteroid katekolaminlerin oluşturduğu vazokonstriksiyonu ortadan kaldırarak şok böbreği üzerine olumlu etkiler yapmaktadır. Araştırmada MP un böbrek fonksiyonlarına olan etkileri kan üresi ve kreatininemi düzeyleri izlenerek değerlendirilmeye çalışılmıştır. Kan üre ve kreatinin düzeyleri II. grupta anlamlı artışlar göstermiştir. Bu durum şokta böbrek fonksiyonlarının bozulmasıyla ilgili görünmektedir. III. grupta kreatininemi değerleri II. gruptan daha düşük bulunmuştur. Ancak aradaki fark istatistiksel açıdan önemsizdir. Buna rağmen MP un kreatininemi düzeyini azaltıcı bir etkisi bulunduğu kabul edilebilir. Kan üre düzeylerinin ise II. ve III. gruplarda benzer durumlar göstermeleri, verilen MP'un üre metabolizmasına etkili olmadığını düşündürmektedir.

Hücre membranı yapısına giren ve hücre ölümü demek olan membran harabiyetinde seruma karışan alkali fosfataz ile, aynı şekilde bir membran enzimi olan asit fosfataz; araştırmanın 30. dakikasından itibaren II. ve III. gruplarda artmış olarak saptanmış, ancak III. gruptaki artış daha düşük düzeyde kalmıştır. Bu iki grup arasındaki farkın anlamlı oluşu, MP'un tedavideki olumlu etkisine bağlanabilir.

Doku, özellikle kalp kası hasarını gösteren SGOT değerlerinde de fosfatazlardakine benzer sonuçların elde edilmiş olması, MP'un şoka bağlı doku ve kalp harabiyetini kısmen önleyebildiğini düşündürmektedir. Bunun yanında daha ziyade bir karaciğer hasarı-



nın kanıtı olan SGPT değerlerinin II. ve III. gruplarda, gruplar arası anlamlı bir farklılık göstermeden yükselmiş olması, MP'un, şokta en fazla etkilenen organlardan biri olan karaciğeri yeterli miktarda koruyamadığını göstermektedir.

II. ve III. grupta fibrinojen ve trombosit değerleri 2. saatte düşmüş, PZ ve PTT in ise uzamış olarak saptanması bir saf koagülopatisinin bulunabileceğini düşündürmektedir. Hatırlanacağı gibi endotoksin Hageman Faktörünü aktive edebilmekte, bunun sonucunda ise DIC gelişmektedir. III. grupta trombosit sayısı ve fibrinojen değerlerinin II. gruba göre anlamlı derecede fazla bulunması, MP'un endotoksinin bu etkisini önemli derecede zayıflatmış olduğunu düşündürmektedir. Kortikosteroid, PZ ve PTT üzerine belirgin bir etki göstermemiştir.

II. ve III. grup deneklerini incelenen iç organlarındaki mikroskopik değişiklikler, tedavisiz grupta tedavi grubu göre normale daha yakın bulunmuştur. SHEAGREN, endotoksinle aktive olan polimorf nüveli lökositlerin damar endoteline yapışarak buradan arachidonic acid salgıladığını, bu asit ve derivelerinin de (prostoglandinler) toksik etkiyle kapiller endotelinden sızıntılara neden olduğunu bildirmiştir (18). Komplemanla aktive lökosit agregasyonu ve bunu izleyen endotelial hücrelere olan toksik etkiler yüksek kortikosteroid konsantrasyonlarında inhibe edilebilmektedir. Nitekim SIBROID ve ark. ile WEKSIER ve GOLDSTEIN sepsisli hastalarda yüksek doz kortikosteroid vermekle pulmoner kapillerlerden oluşan sızıntının büyük oranda azaltıldığını bildirmişlerdir.

Sonuç olarak; MP'un TA, CVP, nabız, kan üre, kreatinin ve SGPT değerleriyle PTT ve PZ'nin anlamlı derecede etkilemediği, ancak alkali fosfataz, asit fosfataz, SGOT, fibrinojen ve trombosit değerleri üzerine olumlu etkilerinin görüldüğü, bu araştırma verilerine dayanılarak söylenebilir. MP; karaciğer, akciğer, böbrek ve sürrenal bezde şoka bağlı harabıkları büyük ölçüde azaltmıştır. Bu nedenle, septik şokta, diğer tedavilerin yanında yüksek doz kortikosteroid kullanılmasının yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

## EFFETS DES CORTICOSTÉROÏDES AU CHOC SÉPTIQUE

### RESUME

Un travail a été fait chez les chiens en trois groupes dont chacun a sept chiens, pour but de rechercher des effets des corticostéroïdes en hautes doses à la période d'un choc séptique, Méthyle prédnisolone (MP) à la dose de 30 mg/kg au premier groupe, l'endotoxine à la dose de 0,5 ml/kg. au second et d'abord l'endotoxine, après avoir été la pression artérielle au dessous de 65 mm/Hg., MP à la même dose de celle de deuxième groupe, au troisième groupe ont été administrés par voie intraveineuse.

Tension artérielle, pression veineuse centrale, pouls, azotémie, créatinémie, phosphatase alcaline, phosphatase acide, SGOT, SGPT, fibrinogénémie, numération thrombocytaire, temps de prothrombine et de thromboplastine partielle ont été mesurées avant et après de 30, 60, 120 et 240 ° minutes de l'injection.

A la fin de la comparaison des données obtenues, on a constaté que les effets du MP sur les phosphatases, les transaminases, la fibrinogénémie et la numération thrombocytaire sont positives et il n'a pas un effet significative sur les autres éléments de nos paramètres. Alors, il est utile d'administrer les corticostéroïdes en hautes doses pour le traitement d'un choc séptique.

## KAYNAKLAR

1. BROADIF, TA., HOMER, L., HERMAN, CM.: Effect of Endotoxin on Oxygen Consumption by a Flow-controlled Canine Hind - Limb Preparation. Surg. 88: 566, 574, 1980.
2. CHERRY, JW.: Endotoxin Shock. Surg. Clin. North. Ame. 50: 403-408. 1970.
3. CONNORS, RH., CORAN, AG., WESLEY, JR., DRONGOWSKI, RA., WEINTRAUB, W.H.: Corticosteroid Therapy in Hemorrhagic and Septic Shock in Puppies. J. Ped. Surg. 15: 790-796, 1980.
4. DIETZMAN, R.H., MOTSAÏ, G., LILLEHEI, R.C.: The Use of Corticosteroids in the Treatment of Septic Shock (Eds). Hershey, SG., Del Guercis, LRM., Mc. Conn, R., Little, Brown and Company. Boston 1971 pp. 79-93.
5. DOĞRU M.: Ameliyat Öncesi, Ameliyat, Ameliyat Sonrası Cilt. 1 2. Bas. Üni. Kitabevi İstanbul 1976. Say. 45-47.
6. FREUND, H., EBFIT, ATT, FISCHER, JE.: An Increase in Vasoactive Intestinal Peptide Levels in Canine Endotoxin Shock. Surg. Gynec. Obstet. 152: 604-606, 1981.
7. GLECKMAN, R., ESPOSITO, A.: Gram-negative Bacteriemic Shock. Sout. Med. J. 74: 335-341, 1981.
8. HANNS, K.: Derives Cortisone in Treatment 6 th., Edi. George Thieme Verlag. Stuttgart. 1973 pp. 119-131.
9. HARDAWAY, RM.: Endotoxemic Shock. Dis. Col. Rect. 23: 597-604, 1980
10. İLİÇİN, G., BOZER, Y.: Şok Patogenez ve Tedavisi 2. Bas. Hacettepe Üni. Yayın/B2 Ankara. 1977 Sayı: 8-56.
11. KAYAALP, O.: Tıbbi Farmakoloji Cilt. II. Ayyıldız Mat. Ankara. 1979 Sayı: 1468-1471.
12. KÖLAN, N.: Şok ve Tedavisi Hıv. Bas. Neş. Md. Ankara. 1973. Sayı: 19-37.
13. LILLEHEI, R.C., LONGERBEAYI, JK., BLOCH, JH., MANAX, W.G.: The Nature of Innevensible Shock. Ann. Surg. 160: 682-687, 1964.
14. MCLEAN, LD.: Shock Davis-Christopher Textetbook of Surgery, 11 th Edi. Sabiston, DC. W.B. Saunders Company. Philadelphia/London/Toronto, 1976, pp. 65-84.

15. ONUL. B., ONUL. M.: Toksik Şok ve Tedavisi A.Ü. Tıp F. Mec. XXIII, (III) : 881 - 891, 1970.
16. PERBELLINI, A., SHATNEY, CH, MCCARTER, DJ, LILLEHEI RC: A New Model for the Study of Septic Shock Surg. Gne Obstet. 147: 68-74, 1978.
17. ROTHE. CF., MURRAY, RH., BENNETT. TD.: Actively Circulation Blood Volume in Endotoxin Shock Measured by Indicator Dillution J. Phyriol 11: 291 - 300, 1978.
18. SHEAGREN, JN.: Septic Schock and Corticosteroids. New Egn. J. Med. 305: 456 - 458, 1981.
19. SPINK, W.W.: Endotoxin Schock. Ann Int. Med: 57: 538-541, 1982.
20. YAZICI, Y.: GATA. As. Tıp Fak. II. Gen. Cerr. Kl. Ders Notları, 1980.
21. ZEYBEK. R.: Deneysel Endotoksik Şokun Erken Döneminde Gluko-kortikoidlerin Karaciğerdeki Etkisinin Ultrastrüktürel Düzeyde İnce- lonmesi, Ege Üni. Tıp Fak. Genel Cer. Uzmanlık Tezi, 1980.

# YENİ ENDÜSTRİLEŞEN TÜRKİYE'NİN ÇEVRE SORUNLARI VE PATOLOJİDE ROL OYNAYACAK OLANLAR

## II

Prof. Dr. Sababaddin PAYZIN

Türkiye yeni endüstrileşen ve Birleşmiş Milletler normlarına göre gelişmekte olan ülkelerden ortagalirli: middle income (850 - 2500 dolar/adam-başına) olan ülkelerin üst düzeyindeki bir ülkedir. (1250 dolar ile). Son yıllarda endüstrileşme hızlanarak ilk olarak 1981 de dışsatım % 51 ile endüstri ürünleri tarım ürünlerinin önüne geçmiştir. Bundan başka nüfus yapısı da hızla değişerek kırsal bölge/kent halkı oranı, kırsal nüfus aleyhine dönmeğe başlamıştır; 1980 sayımına göre köy/kent nüfus orantısı = 1 e yaklaşmıştır.

Henüz 1980 sayımı sonuçları yayınlanamadığından, 1974 de 12 + yaş çalışabilecek nüfus gurubunun çalıştığı iş kolları tablo (4) de gösterilmiştir. Bu rakamlar bize çalışanlarımızın çevre koşullarından ne derecede etkilenebileceği hakkında fikir verebilir.

Tablo DİE nin 1981 İstatistik Yıllığı'nın tablı 152 sinden derlenmiştir. Kişisel olarak kadın işgücü rakamlarının ne derece doğru olduğuna-öncelikle en alttaki sıra rakamlarına göre, pek güvenemiyoruz. (S. P.)

İş Kanunu'na göre sigortalı olan işçilerimizin 1973 ve 1980 yıllarında işkollarına göre dağılımı ve bu iki yılda oluşan farklar ile yüzde oranları da tablo (5) de gösterilmiştir. Sigortalı işçilerin sayısının hakikî miktarların altında olduğu da herkesçe bilinen bir gerçektir. Ama gene de bu resmî rakamlar duruma az çok ışık tutar. DİE nin 1981 yıllığındaki tablodan özetlediğimiz bu verilere göre 1973 yılında 1.649.079 sigortalı işçi sayımız 1980 yılında % 81.5 artarak 2.204.807 ye ulaşmıştır. Bu durum bizdeki endüstrileşme durumuna ışık tutabilir. Tablo incelenince görülür ki: (1) madencilik, (3), dokuma, kundura, (5 ve 6) matbaa ve kimya sanayiinin yeterince ilerlemediği, kullanılan insan gücünün % 10 altında

Tablo 4: 1974 yılı Ekim ayında istihdam edilenerin iş kollarına dağılımı :

İŞ ALANLARI	Toplam Çalışabilecek		Nüfus		Çalışan nüfus (+)	
	Toplam	Erkek	Kadın	Toplam	Erkek	Kadın
Toplam	8 768 207	4 454 921	4 311 486	8 749 819	4 449 189	4 849 639
Tarım, orman ve benzeri işler	7 885 584	3 679 789	4 185 795	7 849 506	3 885 387	4 183 939
Madencilik	42 592	41 819	773	42 592	41 819	773
İmalât sanayi	279 707	181 577	97 630	279 707	181 577	97 630
Elektrik, gaz, su iş.	696	619	77	896	819	77
İnşaat, bayındırlık iş.	144 319	142 000	2 319	144 242	141 923	2 319
Ticaret, lokanta v.b.	130 328	127 545	2 783	130 328	127 545	2 783
Ulaştırma, haberleşme	98 867	97 321	1 546	98 834	97 088	1 548
Maliye, sigorta, benze.	8 648	8 261	387	8 648	8 281	397

(+) Orjinal tablodaki iş arayanlar ve işsizler buraya alınmadı ve bazı işkolları bir araya toplandı. rak gösterildi.

kaldığını göstermektedir. Yani bu önemli endüstri kollarında **tehlikeye maruz: under risk** işçi sayısı ve dolayısı ile de çevre ile ilgili olarak oluşacak işçi sayısı şimdilik azdır. Bu alanda da endüstrileşim arttıkça sorunlarımız da artacaktır.

Türkiye'nin çevre sorunları ile ilgili kongreler (22,23), simpozyumlar yapılmış, bir çok yayın ve gazete makaleleri (35, 36) ve televizyon konuşmaları yapılmış ve yapılmaktadır. Sorunlara yönetimce çözüm getirmek için ÇEVRE MÜSTEŞARLIĞI da kurulmuştur. Halk bu konuda aydınlatılmağa çalışılmaktadır, fakat henüz bilinçsizdir. Frankfurt hava alanına yeni bir pist eklenmesi ne çevreciler ses ve gürültü hastalıkları ile hava kirliliği hastalıklarının artacağı bilinci ile karşı koymalarına ait olayları halkımız biraz da hayretle izlemektedir. Biz bu olaylardan uğramakta olabileceğimiz zararları henüz tasavvur edemiyoruz.

Bu konularda yapılan yayınları inceleyerek gelişmekte olan ülkelerin sorunları için hazırladığımız bir raporu 1979 da Avusturya, Laksenburg'ta IIASA konferansına ve sonra bir özetini de TÜBİTAK 1980 Çevre Kongresi'ne (22, 36) sunmuştuk. Fakat atıklar yüzünden oluşan hastalıklar yönünden Türkiye'de ki durumu da burada özetleyeceğiz.

### **KÖYDEN KENTE GÖÇ :**

Başlangıçta bu göç hızı küçümsenmiş, hatta teşvik bile edilmiştir. Köye traktörlerin yüzbinler ile girmesi ile de çok hızlanmıştır. Böylece **gecekondu sorunu** büyümüştür. Bu konuda yapılan uyarılara (II ve III. Beş Yıllık Plân Şehirleşme Sorunları Özel İhtisas K. raporları ve Payzın (23 - 24) ve diğerleri pek te önemsenmemiş, hatta hoş görülmemiştir de denilebilir. Kent plânlamaları **kentleşim hızı'nın** hesaplanmaması nedeni ile - böyle diyelim - gerçek nüfus sayısının altında kalmıştır. Yarattılan arsa darlığı ve yeşil alan tahripleri ile çevre sorunları oluşturulmuştur. a) Sahte kentleşim, daha doğrusu kent çevrelerinin köyleşimi ortaya çıkmıştır. b) Eski kentlerimizin çevreleri bağlar, bahçeler ve hatta ormanlar ile çevrili iken bu yeşil alanlar yok edilmiştir. Örneğin Ankara'nın Cebeci, Çankaya, Esat, Seyran, Ayvah, Etlik ve Keçiören bağları, Hatip çayı çevresi bostan ve sebze bahçeleri yok edilip yerleri apartmanlar ile doldurulmuştur; tek katlı evleri çok katlı apartman blokları ile değiştirilmiştir. İstanbul'un Bey-

oğlu'nda 0.25 m<sup>2</sup>/adam başına olan yeşil alanı oranı 1975 de 0.10 M<sup>2</sup> ye inmiştir. Ankarada ocuk bahçesine ortalama yürüme mesafesinin 1556 metre (mimari ifade ile (r) = 0.66 olduğu hesaplanmıştır ( ) ıkan. Yeşil alanlar kentlerin solunum aygıtı olup, klorofilleri O<sub>2</sub> retip kent havasına katarlar, CO<sub>2</sub> yi dengelerler. Oysa ki bu aygıtlar gitgide, bilinçsizce küçültülmektedir.

c) Köyden kente genlerin tinsel (psikiyatrik) ve terrrizm ile ilgili sorunları vardır, Payzın (15). Kentleşmenin su oluşumuna etkileri ile ilgili bir simpozyumunda bu sorunlar 1973 de (13) tartişılmıştır. Ama bu konuya da gereği gibi önem verilmemiştir. Sonuçta lm, yaralanmalar, tinsel hastalıklar, **foremen syndrome** aranıp tanımlanmadan yalın terrr olayları göz önüne alınmıştır. Başka devletlerin bu ihmallerimizden yararlanmadıklarını nasıl ileri sürebiliriz?

Bu şartlanmaların ekonomi ile ilintisi kadar insan patolojisindeki değişiklikleri ile olan ilintisine de gereği kadar önem verilmesi idi.

## 2 — SULARIN KİRLENİŐİ

### 2.1 Denizlerimiz :

Çevreyi kirletmeyecek donatımdan yoksun olarak kurulmuş, yerleri iyi seçilmemiş olan endüstrimiz, Haliç, İzmit, İzmir, Gemlik, İskenderun krfezlerini, Marmara Denizini kirletmiştir ve halen de kirletmektedir. Seka fabrikalarının günde ortalama 24 ton H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  atık sular ile İzmit Körfezine döktüğü saptanmıştır. Gemlik Körfezi'nde 59 mgr/lt çinko düzeyi bulunmuştur. Bir fabrikanın atık-su kanalında bu dozun 2284 mgr/lt olduğu saptanmıştır. Bu körfezde tutulan balıklarda 4 mgr/kg cıva bulunmuştur, zyurt 1979 (21).

İzmit, İzmir, İskenderun körfezlerinin durumu artık TV konusu olduğundan üzerinde fazla durulmayacaktır.

### 2.2 Irmak ve derelerimiz :

a) Deterjanlar: Bu bakımdan fazla yayın bulunmamakla birlikte, Ankara ve İstanbul içme su kaynakları için araştırmalar yapılmıştır. DSÖ nün standardı 0.2 mg/lt olduğu halde Gray ve



ark. (9) İstanbul'un içme suyu kaynakları olan dere sularında 0.227 mgr/lt, kente su veren göl ve dere sularında ise 4.344-9.20 mgr/lt miktarlarında deterjan saptamışlardır. Karapars (15) Ankara dere sularında 0.123 mgr/lt ve Ankara Çayı sularında ise 10.21-17.8 mgr/lt arasında bulmuştur. Durum fazla yorumu gerektirmeyecek şekilde açıktır. Ankara çayında yaz günü kıyılara toplanıp kar gibi görüntü veren köpükler deterjanın ne oranda çok olduğunu açıklamaktadır.

b) Madensel ve endüstrisel kirletenler :

Başlıca kirli ırmaklarımız Sakarya, Kızılırmak, Porsuk, Seyhan, Maden ilçesinden geçen Dicle'nin kolu ve Karabükten geçen deresi ile, Zonguldak'ta Üzülmüş, Bartın dereleridir. Bunları kirletenler şöyledir :

i) Bakırlı kirletenler : Ergani Bakır Fabrikaları'nın atıkları, Murgul Bakır İşletmesi'nin atıkları ile derelerinin simsiyah atıklarını bizzat izledik.

ii) Demirli atıklar: Karabük ve Kırıkkale fabrikalarının atıkları ile Kızılırmak ve kolları kirlenmektedir.

iii) Bor ile kirlenimâ Simav Çayı ile sulanan çevre bahçe ve tarlalarda meyve ve ürünlerin yozlaşmakta olduğu köylülerce DSİ ye şikâyet edilmiştir. Bunu araştıran Gamsız (8), Simav çayı üzerinde bulunan beş bor madeninin atık sularını incelemiş ve: I. madenin atık sularında 192 mbg (ppm), II. madeninde 200 mbk, III. madeninde 260 mbk, IV. madeninde 123 mbk bor bulunduğunu saptamıştır. Maden alanına girişte çay suyunda 0.29 mbk bor varken, bu miktar sulama alanlarına geldiğinde 4.2 mbk a yükselmiş bulunuyordu.

Kaliforniya Üniversitesi'nde yapılan çalışmada, sulama sularında bor miktarının 4 mbk mı aşması halinde soğan, havuç, pancar, 2 mbk mı aşmasında patates, zeytin, arpa, biber, 1 mbk mı aşarsa meyvelerin zarar gördüğü anlaşılmıştır/Tekinel (35).

Meyve ve sebzelere zarar vermekte olan Simav Çayı sularının insanlarda ne gibi hastalıklara yol açtığını henüz bilmiyoruz, araştırılmalıdır. Emet bor yatakları ve Eskişehir bor bölgesinde de henüz bir araştırma yapılmamıştır.

### 3 — ALTPAYI EKSİKLİĞİ

Kentleşim hızının gereği kadar ciddiye alınmaması ve plân-lama önerilerine aldırış edilmemesi bir vakıadır (5). Bugünkü du-ruma varışta bilgisizliğin söz konusu olamayacağını vurgulayabi-liriz. Kolerla salgını (1970) (Sağmalcılar, İstanbul) sırasında ku-rulan bakanlıklararası altyapı komisyonunda, Almanya'da olduğu gibi, sarf edilen her m<sup>3</sup> su için 1 M<sup>3</sup> su ücreti kadar 1 M<sup>3</sup>/pis su atımı (kanalizasyon) parası alınmasını bizzat ben dökümanları ile birlikte önermiştim. Bu «vergidir» diye hüsnükabul görmedi. Kay-nağı olmadan iş yapılamayacağına göre kanalizasyonlar da yapı-lamazdı. Sonuç koleradan sonra hepatitis, tifo, dizanteri salgınları Ankara'da gözlerimiz önünde sürüp gitmektedir. Kanal ve çöp so-runu sürdürdükçe salgınlar da sürüp gidecektir. Bu hastalıklar doğal olduklarından, durumun çevre ile ilintisine değindik, okadar!

### 4 — HAVA KİRLİLİĞİ

Bu Ankara, İzmir, Erzurum, İstanbul'un Haliç ve Teşvikiye bölgeleri ile Çorum ve diğer bazı kentlerimiz için sorun haline gelmiştir. Daha 1927 yılında Türkiye'de meteoroloji konusunda rapor vermek için çağırılan Macar Prof. Retli (Rethly) 1927 yılında verdiği raporda (4). Gölaşana göre, «Eğer kent kuruluşunda tedbir alınmazsa tipik karasal sis, endüstriyelleşme ile artacaktır... 1925 yılı Kasım ayı ile 1927 yılı Temmuz ayına kadar geçen 20 aylık zamanda Etlik sadece 29 gün sis altında kalmış, buna karşılık Ankara'da 280 gün sisli geçmiştir...» demekte idi. Raporun ve yazışmaların U. E. Çölaşan tarafından atılan evrak arasında bu-lunmuş olması işe ne denli önem verildiğini gösterir.

Ankara'da hava kirliliğinin bilimsel verilerini Sevim Yumu-turuğ ozaman duman için kullanılan Koh birimi (Goh unit) ile şöyle belirtmiştir :

O zamanlar bu tür yayınlar pek fazla önemsenmemiştir. Fa-kat bilimsel yayınlardan başka radyo, TV, gazetelerle bu konuda halkın aydınlatılmasına çalışılmıştır. Hıfzıssıhha Okulu Hava Kir-liliği laboratuvarında 1978, 1979, 1980 ve 1981 yıllarına ait ölçüm-ler devam etmiştir. Doç. Dr. A. İleri ve Kim. Müh. Canan Ünal'-

Tablo 7 — 1964 yılında Ankara'da hava kirliliğinin durumu.

Semt Adı	SO <sub>2</sub> mbk (milyonda bir)	Duman Koh birimi	Koh birimi ölçeğine göre hava kirliliği	
Kavaklıdere	0.40	1.30	0.0-0.9	çok açık hava
Cebeci	0.25	3.30	1 -1.9	orta derece
Kızılay	0.27	3.98	2 -2.9	Ağır derecede
Ulus	0.35	3.95	3 -3.9	Çok ağır
Sıhhiye	0.30	2.45	4	Aşırı yüklü
Bahçelievler	0.35	2.80		

S.Yumuturuğ: A.Ü. Tıp Fak. Mec. 1965, XVII, No.dan

dan aldığımız gözlem kayıtlarına dayanarak hazırladığımız logaritma temelli eğrilerde SO<sub>2</sub> ve duman için Ankara havasının durumu ve gidişini izleyebilirsiniz. Ankara havasında 1973-1977 yılları arasında SO<sub>2</sub> miktarı % 13.8 den % 16.9 a çıktığını ve Zn, As, Sb ve Hg gibi elementlerin yüksek düzeyde bulduklarını Gündüz ve Somer TÜBİTAK 1977 Bilim Kongresinde (32) bildirmişlerdir. Ankara'da çimento fabrikalarının dumanları sonucu arada sırada gece aydınlanımı (night illumination) oluşmaktadır. Akyol (3), İzmir havasının gece aydınlanmasının arttığını, zira çimento fabrikasının çıkarttığı toz ve duman 7 km uzaklıkta bile 40 mgr/M<sup>3</sup> mini toz: micro dust içerdiğini aynı kongrede bildirmiştir. Bu, dünya standardının çok üstünde bir kirliliktir. Benzer kirlilikler Çorum, Trabzon, İstanbul Kartal ve Bakırköy'de de her gün izlenebilmektedir.

Murgul Bakır, İzmit'te Petkim, Mannesmann Boru, Klor, Bandırma gübre ve H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fabrikalarının dumanları da o bölgeleri kirliletmektedir.

Tablo 18 de Ankara'nın semtlerinde SO<sub>2</sub> ve duman yoğunluk durumu üç yıl için verilmiştir. DSÖ'nün normları, tablodaki veriler ile karşılaştırılmak üzere, şöyledir : DSÖ SO<sub>2</sub> normu 150 mgr/M<sup>3</sup> Duman 75 mgr/M<sup>3</sup> dür.

Bu normların ne kadar üstünde bir durum olduğu açıktır. Kirlilik artışı için gerekli önlemler alınamayıp tartışmalar teorik dü-

zeyde kaldığından, meteorolojik terinile **inversiyon olayının** görüldüğü 11 Ocak 1982 de Ankara Valiliği kenti alarm durumuna davet etmiştir, Radyo ve TV ile gazetelerde tablo 8 deki verileri ilân etmek durumunda kalmıştır.

Ankara'da bu yılın kirliliğinin anı artışı belki de ANKARA ASTMASI adı verilebilecek hastalıkların başgöstermesi ve dramatik hal almasını bekleyebiliriz. Bu tip olgular görülmeğe başlamıştır. Umarız ki alınacak önlemler ile böyle bir sendrom yerleşmesin.

### **Bu durum önlenebilir mi?**

ABD lerinde EPA (Environment Protection Agency: Çevre Koruma İdaresi) nin verdiği rakamlar yapılan gayretlerin boşa gitmediğini göstermiştir. Bunu tablo 9 da özetliyoruz :

**Tablo 9 — EPA verilerine göre ABD lerinde elde edilen sonuçlar.**

Yer adı	yıl	Toz/ton	yıl	azalan toz miktarı/ton
Massaçüset'te	1972 de	29 000 idi	1979 da	790 tona inmiş
Meyn (Main) de	1979 da	41 000 idi	1979 da	3500 tona inmiş
Detroit'te	1972 de	139 000 idi	1979 da	8200 tona indi

Meyn de Penobskot ırmağında sadece bir tek salmon balığı tutulabildiği 1970 yılındaki kirlilik azalınca 1978 de günde bir tane tutulabilir hale gelmiştir. (Time Magazine, 18 Jan. 1982, S: 17 den)

Bir yandan sıtma, verem, şarkıbaşı gibi hastalıkların yeneden artış göstermeğe başladığı yurdumuzda koruyucu tıp önlemlerinin alınmasının ihmal edilmesi ile mevcutlara ilâveten yeni **ÇEVRE HASTALIKLARI** nın katılmasının ne geniş sosyal ve ekonomik sorunlar yaratabileceğine buradan işaret etmeden geçmeyeceğiz.

Unutmayalım : **KORUMA TEDAVİDEN DAİMA DAHA UCUZDUR.**

**Tablo 5 — Türkiye'de sigortalı işçilerin işkollarına göre dağılışı ve artışı.**

İŞKOLLARI/İllar	1973	1980	Artış farkı	% artışı
1) Kömür, maden, T. gaz, petrol, taş ve diğer madenler	93 618	109 396	15 778	0.8
2) Besin. içki, tütün işk.	86 911	232 293	165 382	247.0
3) Dokuma, kundura, konfeksiyon	194 097	227 772	26 675	13.5
4) Ağaç, mobilya, kâğıt işk.	72 142	63 260	-8 882	eksilmiş
5) Matbaa, yayım işk.	18 540	19 305	765	4.0
6) Kauçuk ve kimya işk.	51 212	60 379	9 166	16.0
7) Madeni eşya işk.	158 533	207 700	49 167	31.0
8) Makina. taşıt. elektrikli eş.	162 152	222 558	60 378	37.1
9) İnşaat	329 145	479 899	150 754	45.8
10) Elektrik, havagazı, ısıtma ve sıhhi tesisat işk.	60 480	90 700	30 220	49.86
11) Ticaret, bankacılık, sigorta	108 467	141 885	33 218	30.5
12) Ulaştırma hizmetleri işk.	61 861	88 664	26 903	43.3
13) Hizmetler, otelcilik, v.b.	179 197	229 915	50 728	28.3

DİE'nin 1981 yılı sigortalı işçileri tablosunda özetlenmiştir (S.P.) Toplam sigortalı işçilerin sayısı 1973 (1 649 079) iken 1980 de (2 204 907) olup artış (555 728) dir ve artış oranı % 120 dir.

**Tablo 6 — Hıfzıssıhha Okulu gözlemlerine göre Ankara'nın semtlerinde hava kirliliği:**

Semtlerin adı	Ocak ayı SO <sub>2</sub> (µg (mikrogram))			Ocak ayı duman (mikrogram)			Temmuz ayı duman				
	1980	1981	1982	1980	1981	1982	1980	1981	1982	1980	1982
Cebeci	645	465	1793	178	122	954	38	49	27	38	
Ulus	375	391	1370	216	154	943	56	100	49	49	
Kızılay	664	—	1740	243	—	1035	28	—	23	28	
Kavaklıdere	192	—	2935	178	—	1035	—	46	—	5	
Bahçelievler	401	—	—	99	—	—	17	—	14	—	
Sıhhiye	583	442	1567	173	115	1268	53	58	20	32	

Rakamlar M<sup>3</sup> havada µg (mikrogram) olarak verilmiş. 0.5 den yüksek kesirler 1 yapılmıştır. Veriler Doç. Dr. Abdullah İleri ve Kim. Müh. Canan Yücel'in müsadeleri ile bu çizelge için alınmıştır. (S.P.) (—) Alet bozulduğundan gözlem yapılamamıştır.

## KAYNAKLAR

- 1 — Aksoy, Muzaffer, Erdem S.; Leukemia in shoe-workers, exposed chemically to benzene, *Blood*, 44, 937, 1974.
- 2 — Aksoy ve ark. Leukemia in workers due to occupational exposure to benzene, *Lancet* 441, 1978
- 3 — Akyol M.Ü., İzmir'de hava kirliliği, TÜBİTAK VI. Bilim Kongresi, Çevre, S: 23, 1977
- 4 — Çölaşan Umran Emin, Prof. Rethly'nin Ankara havası için raporu adlı tebliği, Makine Mühendisleri Odası Simpozyumu, 26 Ocak 1982, Ankara,
- 5 — DPT şehirleşme sorunları özel ihtisas komisyonu raporu, III. Beş Yıllık Plan için, 1973
- 6 — Ettema J.H. ve Moscow, Effect of Noise and mental load on physiological functions; Report to International Institute for System Analysis, Conference on health and environment, 29-30 Oct 1979, Laxenburg, Austria.
- 7 — Fagnani F., Management of radiological risks; a model for environmental risk control; Rep. to IISA conf. 29-30 Oct 1979, Laxenburg.
- 8 — Gamsız Emel, Simav çayının boraks madeni atık sularının kirlenmesinin incelenmesi, Kimya Mühendisliği Odası Mec. 9/83, 23, 1977
- 9 — Göray Ovat, Hapçıoğlu; Deterjanların sağlık yönünden araştırılması, İstanbul Tıp Fak. Mec. 42, 58, 1979.
- 10 — Hall Alice J., Spiegel T., The Hudson River alive. *The National Geographical Magazine*. Jan. p: 62, 1978.
- 11 — Hradecky Karel, Ein Beitrag zum Problem des Manegersyndrome, *Acta Medica Sociologica*, S: 158, 1965, Roma.
- 12 — İbarez F.R.A., Pictorial History of Medicine. *Time-Life* Pub. 1965, sayfa 169 da Ramazzini paragrafı
- 13 — İstanbul Univ. Hukuk Fak. Ceza Hukuku Enstitüsü: Şehirleşmenin doğurduğu ceza adaleti sorunları simpozyumu: 17-19 Aralık 1973, İstanbul.
- 14 — Kanep V.V. Czareobrodsev G.T., Social and Hygenic aspects and interrelation between nature and society. Report to IISA Conf. 28-29 Oct 1979, Laxenburg.

- 15 --- Karapars Rezzan. Ankara şehrinin alımantasyon suyunun ve çevredeki akarsularının deterjan yönünden araştırılması, A.Ü. Tıp Fak. Mec. XXXIX/4, 853, 1976
- 16 --- Komerov Y.M. Environment and Health, Scientific Review. Rep. To IASSA Conf. 29-30 Oct. 1979, Laxenburg.
- 17 — Hall Alice, Spiegel T., The Hudson that River Alive, The National Geographical Magazine, Jan. 1978, p: 62
- 18 — Özenci Hatice, Ankara ve çevresindeki dere sularında Salmonella araştırması, Mikrobiyoloji Bülteni 11/4, 521, 1977 ve dergide çıkan bu konudaki diğer yazılar.
- 19 — Karel Brodecky, Ein Beitrag zum Problem des Menagersyndrome, Acta Medica Sociologica, p: 158, Roma 1965.
- 20 — Parvi V. Komi P., Sensory nerve conduction among vibration exposed lumberjacks, Rep. to IASSA Conf. 28-29 Oct 1979, Laxenburg, Austria.
- 21 — Özyurt Gürayten, Gemlik, bir başka Haliç mi oluyor? Milliyet 8 Ağ. 1979
- 22 — Payzın S., Bilgin Y., Change and Pollution of Environment in the newly industrialised countries; Report to IASSA Conf. Health and Environment, Oct. 29-30, 1979, Laxenburg, Austria.
- 23 — Payzın Sabahattin, Şehre göçecek 20 milyon köylü için neler yapılmalı? Milliyet Gazetesi, 1968
- 24 — Payzın S., Tekeşin A., Türkiye'nin nüfus ve Sağlık Sorunları, Türkçe ve İngilizce kitap, S.S.Y. Bakanlığı Yayını 1964
- 25 — Payzın S., Mikotoksinler, bilinen en güçlü karsinogenler ve teratogenler, A.Ü. Tıp F. Mec. XXVI, 5-6/1367, 1975.
- 26 — Payzın S., Yumlu Ç., Özenci M., Mercangöz F.; Türkiye'nin Doğu İllerinde soyutulan V. cholerae Eltor tipleri ve özellikleri, A.Ü. Tıp F. Mec. 37/3, 454, 1975
- 27 — Payzın S. Karayara ve penbeyara hastalıklarının viruslarla ilgili olmadığına dair doku kültürü sonuçlarını bildiren dekanlığa verilen rapor.
- 28 — Pesticidler: Avrupa Konseyi Ekspertler Komitesi Raporu, 4. baskı, S.S.Y. Bak. Sağlık İşleri Gnl. Md. ce yayınlanmış çeviri, 1977.
- 29 — Rantanen J., Sturch J., Moikkala M. Effects of different physical factors on the health of the population and methods for measurement of their effects. Rep. to IASSA Conf. 29-30 Oct 1979, Laxenburg.
- 30 — Shiga-AMLEV'in her dört yılda bir yapılan her kongresinde tebliğleri.

- 31 — Rohleder H. Occurrence and fate of environmental chemicals in soil and water, Rep. to, IIASA Conf. 29-30 Oct. 1979, Laxenburg
- 32 — Somer ve Gündüz G., Ankara havasındaki eser elementler, TÜBİTAK VI. Bilim Kongresi - Çevre, S: 69, 1977
- 33 — Sungur Türkân, Su ürünlerinde cıva rezidüleri konusunda bir araştırma, A.Ü. Tıp Fak. Mec. XXVI, 142, 1973
- 34 — Tasev T.A. Environment pollution and human pathology, Rep. To IIASA Conf. 29-30 Oct 1979. Laxenburg.
- 35 — Tekinel O. Problems and factors affecting boron accumulation in soil and waters, Thesis for doctorate at Univ. California, 1963
- 36 — TÜBİTAK VI. Bilim Kongresinde Akyol M.Ü. nün İzmir hava kirliliği ve diğer bildiriler ile VII. bilim kongresinde Payzın ve Bilgi-



## LEISHMANIASIS VE TATARCIKLAR

Mülkiye KASAP (\*)

Mihri MİMOĞLU (\*\*)

### Ö Z E T

Çeşitli ülkelerde ve yurdumuzda da bulunan Leishmaniasis'in çeşitlerini içeren bu derleme aynı zamanda Tatarcıkların da vektör olarak oynadıkları rolü kapsamaktadır. Yapılacak çalışmalara ışık tutması amacıyla Tatarcıkların Laboratuvar koşullarında üretilmeleri üzerine bir yöntem de verilmiştir.

### Leishmaniasis :

Leishmaniasis *Leishmania* cinsine bağlı tek hücreli (Protozoa) parazitlerin meydana getirdiği hastalıktır. Asalak, sineklerin sindirim kanalında yuvarlağa yakın oval yapılı, kamçılı formda (promastigot), insan ve diğer memeli vücudunda ise kamçısızdır (amastigot). Hastalık genel olarak iç organlar leishmaniasis'i (Kala-Azar) ve deri Leishmaniasis'i olmak üzere ikiye ayrılır. Kala-Azar'ın etkeni *Leishmania donovani* ve deri leishmaniasis'inin etkeni de *Leishmania tropica*'dır. Bu etkenleri morfolojik olarak birbirinden ayırmak mümkün değildir.

Kala-Azar'a yurdumuzun daha çok kıyı bölgelerinde ve 1-4 yaş arasındaki çocuklarda daha sık olmak üzere rastlanır. Rize, Trabzon, Gümüşhane, İstanbul, Kocaeli, Bursa, Manisa, Aydın, Antalya, Denizli, İçel ve Adana'da tesbit edilen vakalar yanında, Ankara ve Erzurum'dan da kayıtlar vardır (1, 9, 16, 26)

Kala-Azar veya iç organlar Leishmaniasis'i çok değişken konakçı rezervuarına sahip, komplike bir hastalıktır. Bu nedenle ge-

\* Y. Doç. Ç.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, ADANA

\*\* Prof. Dr. Hemşehri Sok. 37/1 G.O.P. ANKARA

nelleme yapılırken daima dışında kalanların olduğunu da düşünmeliyiz. Kala-Azar'ın yaptığı epidemi ve gösterdiği klinik tablolar dikkate alınarak 4-5 tipinin mevcudiyetinden söz edilmiştir.

Hindistan'da, Kala-Azar endemik ve epidemik olarak seyretmekte ve çoğunlukla gençlerde görülmektedir. Hayvan rezervuarı bilinmediğinden bu durum insanın kendisinin rezervuar olduğu kanısını yaratmaktadır. Periferik kandan hazırlanan yayma preparatta parazit kolaylıkla görülür ve vektör, paraziti insandan kan emme esnasında alır. Bunun için başta gelen vektör, evcil bir tür olan **Phlebotomus argentipes**'dir.

Sudan ve Tropikal Afrika'nın diğer kısımlarında olay sayısı azalır ise de genç erkeklerde ensidans oranı daha yüksektir. Bölgede rezervuar, parazite toleranslı olan kemiricilerdir; bunlar büyük olasılıkla parazitin orijinal konakçılarıdır.

Akdeniz ve parazitin bulunduğu diğer bölgelerde, genel olarak 5 yaşın altındaki çocuklar hastalanır. Bu bölgelerde köpekler parazite karşı çok duyarlıdır. Hastalığın bu formunun başka bir tür **Leishmania infantum** tarafından oluşturulduğu ileri sürülmüşse de bilahare bunun **L. donovani**'nin sincimi olduğu kabul edilmiştir.

Yeni Dünya'da Kala-Azar Meksika'dan Arjantin'e kadar çeşitli yerlerde saptanmış ise de Kuzeydoğu Brezilya'da çok önemli bir sağlık sorunudur. Akdeniz'de olduğu gibi orada da köpekler ve yabani tilki, **Lycalopex vetulus** rezervuardır; hastalık insanlarda seyrek görülür. Lainson ve Shaw (15) Yeni Dünya'da parazitin uzun süredir bulunduğunu ve vektörünün evcil bir tür olan **Lutzomyia longipalpis** olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Kuzeydoğu Çin'de bazen görülen tür daha çok hayvanları etkiler. Akdeniz türünün bir çeşidi diye kabul edilmektedir.

Hangi tür tatarcığın iç organlar Leishmaniasis'inin gerçek vektörü olduğunu saptamak çok zordur. Yere ve zamana göre hastalığın farklılık göstermesi laboratuvar hayvanlarının da hastalığa karşı fazla duyarlı olmaması soruna ayrı bir güçlük getirir. Hastalığa duyarlı hamsterler üzerinde yapılan denemeler sonucu (16) eski dünya'da 15 tür ve alttür **Phlebotomus** ile yeni dünya'da 2 **Lutzomyia** türünün vektör oldukları anlaşılmış, bunlardan **P. argentipes** en önemlisi olup ayrıca **Phlebotomus martini**, **P. lan-**

geroni, tropikal Afrika'da, *P. longicuspis*, Cezayir'de, *P. major* ve *P. perniciosus*, Akdeniz'de, *P. simici* Doğu Akdeniz'de *P. chinensis*'in de Çin'de vektör oldukları saptanmıştır (26).

### Deri Leishmaniasisi

Eski dünya'da Şarkçıbanı ve yeni dünya'da (chiclero) deri ülseri diye tanınan hastalık değişik klinik belirtiler gösterir. Şarkçıbanı Akdeniz ülkeleri, Arabistan, Hindistan, Rusya'nın güney bölgesi, Afrika'nın bazı bölgelerinde yaygın olarak bulunur; iki tipi vardır. Birisi sulu yada (ıslak) tipi ki bu *L. tropica major* tarafından oluşturulur ve hayvanlarda daha çok görülür; taşıyıcısı *Phlebotomus caucasicus*'tur. Bu hastalığı hayvanlardan insana *Ph. papatasi* taşır. Çıbanın diğer formu kuru olup daha çok köpeklerde görülür; insana *Ph. papatasi* ve *Ph. sergenti* ile taşınır; etkeni *L. tropica tropica*'dır (11).

Amerikan deri Leishmaniasis'i de tropik ve subtropik Amerika'da Texas'tan Arjantin'e kadar yaygındır. Buradaki *Leishmania* türleri de *L. braziliensis*, *L. peruana* ve *L. mexicana*'dir. *L. braziliensis*, çok ağır seyrederek daha ziyade burun bölgesinde yayılır, burun kemiklerinde lezyonlar meydana getirir ve ölümlü sonuçlanabilir. *L. peruana* ve *L. mexicana* daha selinü seyrederek Amerika'da 14 tür *Lutzomyia*'nın deri leishmaniasis'ini taşıdığı açıklanmıştır (16).

### Üç gün humması (= papatasi humması, tatarcık humması)

Mevsimsel bir hastalık olup *Phlebotomus*'ların bol olduğu Akdeniz, Güney Çin, Hindistan'ın bazı yöreleri, Seylan, Yakın ve Ortadoğu ile merkezi Asya'da görülür. Diğer ateşli hastalıklarla da karıştırılabilen bu humma öldürücü değildir. Hastalığın etkeni bir virus olup, kuluçka devri 24 saattir. Virüs roğrudan doğruya *Phlebotomus*'larda üremektedir.

### Tatarcıklar (*Phlebotomidae*) :

Tatarcıklar küçük boyda, vücut ve kanatları sık kıllarla örtülü, çift kanatlı (Diptera) kan emen sineklerdir. Erginleri 1.5 - 3.5 mm boyundadır. *Phlebotom*'lar ev ve ahırlarda, duvarların çatlak ve deliklerinde, taş yığınlarında, doğada kemirgen, kertenkele ve

kuş gibi hayvanların yuvalarında yaşar. genel olarak nemli, loş ya da karanlık, rüzgârsız ve sessiz yerleri tercih ederler.

Tatarcıkların yalnız dişileri kan emer, erkekleri bitki özsuyu ile geçinirler, Ömürleri 2-3 haftadır. Dişi tatarcık döllendikten 8-10 gün sonra yumurtlar; her dişi 20-50 kadar yumurta bırakır. Dişinin yumurta geliştirme süresi ve larvaların erginleşmesi çevrenin fiziksel yapısı ile doğrudan ilişkilidir. Sıcaklık ve nem arzu ettikleri faktörlerin başında gelir.

Tatarcıklar yurdumuzda da oldukça yaygın durumdadır. Karanlıkta sessizce gelerek bacaklardan kan emer ve varlıklarını hissettirmeden uçup giderler. Şimdiye dek çeşitli araştırmacılar tarafından bulunduğu bildirilen tatarcık türleri şunlardır: **P. papatasi**, **P. chinensis** lyreniae, **P. c. halepensis**, **P. c. brevis**, **P. c. var. simici**, **P. alexandri**, **P. caucasicus**, **P. sergenti**, **P. perniciosus** lobbi, **P. jasseli**, **P. minutus**, **P. wenyoni**, **P. kandelakii**, **P. balcanicus**, **P. laroussei**, **P. maojr**, **P. tobbi**, **P. pertiliævi galileus**, **P. mascittii** ve **P. minutus var. parroti** (9, 18, 19, 27, 29).

Dünya Sağlık Örgütünün sıtma ve sivrisinekten sonra üzerinde önemle durduğu konu Leishmaniasis ve tatarcıklardır. Sıtma ile savaş çalışmaları sürdürülürken çoğu yerlerde kullanılan insektisitler vektör tatarcıklar üzerinde de etkili olmuştur. Yurdumuzda da bu nedenle tatarcıkların taşıdıkları hastalıklar (Kala-Azar ve Şarkçıbanı) eradike edilmiş görünümüne bürünmüştür. Ama sivrisineklerde olduğu gibi tatarcıklarda da direnç oluşması bu paraziter hastalıkların yeniden dirilmesine neden olmuştur.

**Leishmania**'lar başlıca memeli, kertenkele ve tatarcıkların parazitidir. Bizi bunlardan özellikle **L. donovani** ve **L. tropica** ile neden oldukları Kala-Azar ve Şarkçıbanı'nın tarihçesi ilgilerdirir (27). Özellikle Kala-Azar'ın tanısında klinik tabloyu kanıtlayacak ve bizi kesin sonuca götürecektir direkt ve indirekt laboratuvar yöntemlerinin önemli yeri vardır. Çünkü bu hastalığı sıtma, tifo, Malta humması, rasi humma, tüberküloz, enfeksiyöz mononukleaz, enfeksiyöz hepatit, Hodgkin hastalığı, çocuklarda görülen Banti hastalığı ve diğer ateşli salgınlarla karşılaştırmak mümkündür (22).

1970 - 1980 yılları arasında İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Tropikal Hastalıklar ve Parazitoloji Kürsüsü ile Deri Hasta-

lıklar ve Frengi Kürsüsüne başvuran hastalardan 156.sında **Leishmania tropica** saptanmıştır (12).

**Leishmania** enfeksiyonlarının epidemiyolojisi, insan ve çeşitli hayvanlarda leishmaniasis, **Leishmania**'ların morfolojisi, fizyoloji ve biyolojisi, leishmaniasiste bağışıklık, **Leishmania** enfeksiyonlarının patogenezi ve patolojisi, laboratuvar tanı yöntemleri, leishmaniasis'le savaş ve korunma, deri leishmaniasis'i ve Kala-Azar'ın kliniğe dair ayrıntılı bilgiler birçok araştırmacı tarafından verilmiştir (3, 4, 7, 8, 9, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 27, 28, 29).

Leishmaniasis'le savaş için, ilâçla tedavi, biyokimyasal analizler, immünoloji, epidemiyoloji, parazitoloji, vektör biyolojisi ve kontrolü üzerinde gerekli araştırmaların sürdürülmesi ve pentavalan antimon bileşikleriyle tedavi denemeleri yapılmalıdır (2).

Tatarcıkların biyoloji ve ekolojileri ile ilgili araştırmalar, diğer Diptera için uygulanan yöntemlerin bunlarda yetersiz kaldığını ortaya koymuştur. Bunların popülasyonunu saptamada yapay ışıklı ve yemli atraplar olumlu sonuçlar vermiştir; doğa ve meskenlerdeki yoğunluklarını gün ışığına çıkarmak için, 20x30 cm. boyunda, üzerinde yapışkan madde bulunan, hint yağıyla cilalanmış standart kâğıtlar kullanılmalıdır. Bu kâğıtlar zeminden 4-5 cm. yükseklikte, yapışkan yüzü toprağa dönük ve ona paralel olarak bırakılmalı, kâğıtlar ahırlarda kuytu ve karanlık köşelere yerleştirilmeli, en çok 24 saat orada bırakılmalıdır. Böylece tatarcıkların değişik mevsimlerdeki davranış, yoğunluk ve popülasyon dinamiği saptanmış olur. Bu işlev 5-7 gün aralıkla tekrarlanabilir (16).

Hindistan'da Kala-Azar'ın başta gelen vektörü **P. argentipes**, genel olarak sığır ahırının içinde ya da dışında ürer. İnsan ve hayvan barınakları yanyana, bazen içiçe olduğundan, tatarcıklar kan bulmakta sıkıntı çekmezler. 1977 yılında Bilhar bölgesinde başgösteren Kala-Azar salgını nedeniyle vektör kontrolüne önem verilmiştir. 1979 Eylülünden 1980 Ağustos ayına dek, ayda iki kez, tatarcıklara, her gece, altı gönüllü kişiden, saat 18.00 - 06.00 arasında, kan emdirilmiş, her gece ısı, nem ve yağış protokola işlenmiştir. Şubat ayında da saat 06.00 - 18.00 arasında, gün ışığında, tatarcıklar toplanmıştır. Tatarcıkların yalnız dişileri vektör olup bölgede Nisan ve Mayıs aylarında üremekte, insan vücudunun sırt ve alt kısımlarından kan emmektedirler (12).

Yeni ve basit bir yöntem olarak, inek ahırının kuytu ve rutubetli dört köşesinin zemininden 10 gr. toprak kazıntısı alınır ve 6 cm. çapında çömlek kapların dibine serilir, kabın üstü steril pamukla örtülür, ıslak bir kum üzerine konur; ısı 28°C olan kapalı bir yerde muhafaza edilir, her gün gözden geçirilerek larva ve ergin tatarcıklar araştırılır. Bu yöntemle başarılı sonuçlar alınmaktadır (13).

Yeryüzünde bugüne kadar 600 **Phlebotomus** türünden ancak 20'sinin 10. generasyona kadar laboratuvarında üretimi sağlanmıştır. Endris ve arkadaşlarının çalışmaları (8) ile, üçü insandan kan emen tür olmak üzere, dokuz tatarcığın laboratuvarında üretimi yeni bir yöntemle sağlanmıştır.

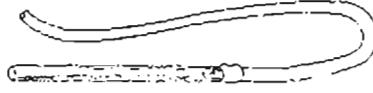
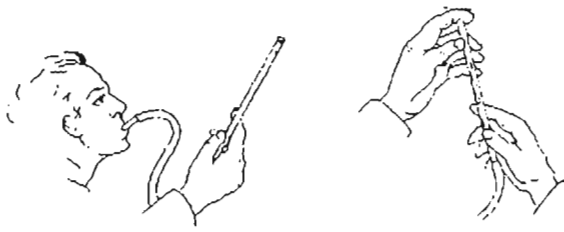
Dünya Sağlık Örgütü'nün leishmaniasis bilimsel çalışma grubu, 1977 yılında tatarcıkların toplanmaları ve laboratuvarında üretilerek kolonilerinin elde edilmesi gerektiği üzerinde karara varmıştır. Çünkü bu sayede sözü edilen Diptera'nın vektörlük potansiyeli, *Leishmania*'ların biyolojisi, kan emdikleri sırada parazitlerin konakçıya geçme durumu incelenebilecektir. Ayrıca genetik araştırmalar, tatarcıkların fizyolojileri, davranışlarının kontrollü olarak izlenmesi yönlerinden incelemeler yapılabilecektir. **Phlebotomus** kolonilerinin insektisitlerle kontrol altına alınması, onlara karşı direnç oluşturma mekanizması da gün ışığına çıkarılmış olabilecektir.

### **Tatarcıkların Laboratuvarında Üretilmesi İçin Yeni Bir Yöntem:**

Tatarcıklar yaşadıkları yerlerden, ışıklı kapanların içinden ya da insan ve hayvanların üzerinden, basit ağız aspiratörü (Şekil 1) ile yakalanır. Ağız aspiratörleri kullanılırken çok sayıda sineği tüp içerisine almamaya ve kuvvetle üflememeye dikkat edilmelidir.

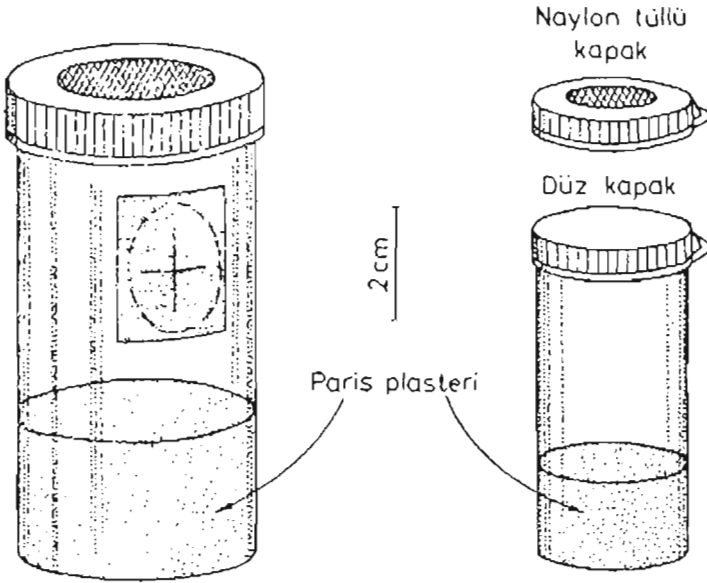
Toplanan dişi ve erkek tatarcıklar 120 ml. büyüklükteki toplama kaplarına (Şekil 2) alınır. Her kaba en çok 50 sinek konur ve laboratuvara getirilmek üzere ıslak bir havlu üzerine yerleştirilir. Laboratuvara gelince beslenme kafesine aktarılırlar.

Kan emmiş ya da yumurtalı olan her bir dişi daha önceden tabanı alçılanmış ve ıslatılmış olan toplama kaplarına (Şekil 3) ayrı ayrı yerleştirilir. Her birinin tavanına 1:1 oranında sulandırılmış bal verilmiş olan kaplar, daha büyük ve tabanına 1 kat ı-



Ağız aspiratörü

Şekil 1. Emme tüpü payreks camdan yapılmış iç çapı 1 cm. dir. Esnek lastik tüpten önce ince delikli bir naylon tül konur. Bu tül emilen tatarcıkların ağıza girmesine engel olur.

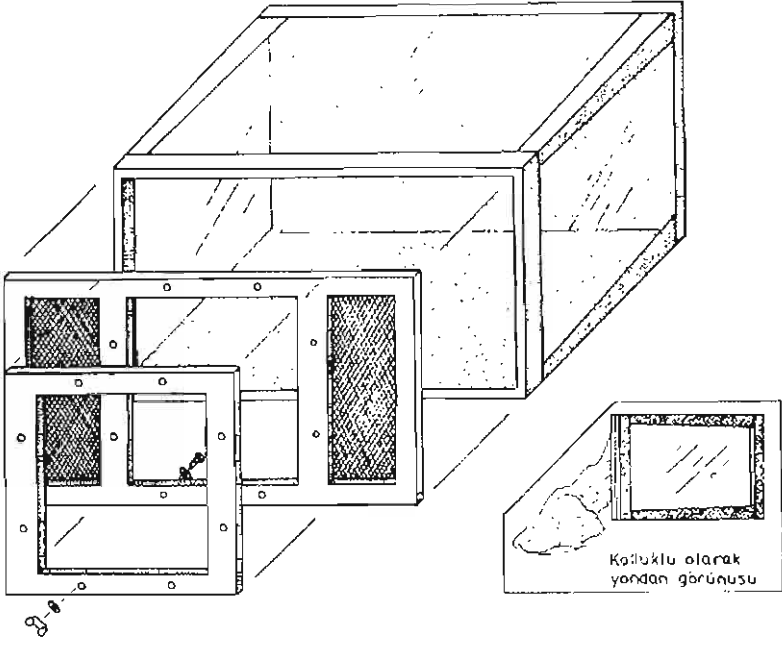


120 ML'lik numune kavanozu

26 ML'lik kavanoz

Şekil 2 (solda). Üretim ve ergin tatarcıkları muhafaza için kafes kapağı naylon tüllü, yan tarafında + şeklinde latex lastikleri kesilerek yapıştırılmış olup içinden toplanacak tatarcıklar için ağız aspiratörü buradan içeriye sokulur.

Şekil 3 (sağda). Bu kavanozda 50 kadar larva üretilir ve 1-2 er - gin tatarcık muhafaza edilebilir

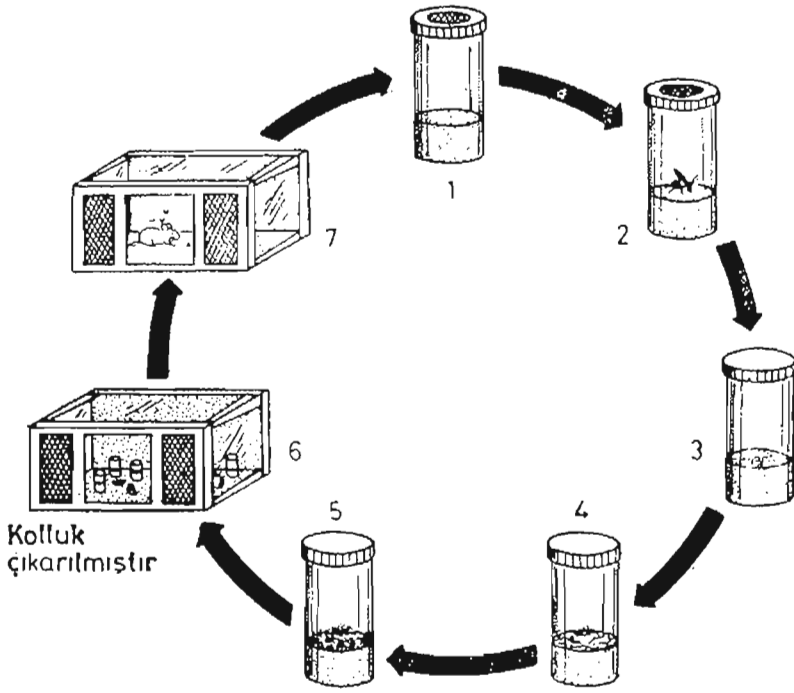


Şekil 4. Cam akvaryumun modifiye edilmiş şekli olup ergin tatarcıkların muhafaza kafesi olarak kullanılır. Cephedeki iki panelin önden ve kumaştan yapılmış kollu tatarık toplama kapağının yandan görünüşü.



Şekil 5. Dişi bir *Lutzomyia anthophora*'nın laboratuvarında orman faresinin (*Neotoma micropus*) kulağından kan emmesi.





Şekil 6. Tatarcıkların üretilmesinde genel görünüm: 1. Üretim kavanzonunun tabanındaki paris plasteri musluk suyu ile ıslatılır. 2. Dışarıdan toplanan ya da laboratuvarıda üretilen gebe diş tatarcıklar teker teker bu kaplara konur ve her kapağın naylon kafes tülü üzerine şeker solusyonundan bir damla konur. 3. Diş tatarcık yumurladıktan sonra kavanzonun kafesli kapağı üstü düz kapakla değiştirilir. 4. Larva yumurtadan çıkmadan önce besin maddesi paris plasteri üzerine ufalanır. 5. Larva geliştikçe beslenmelerine devam edilir. 6. Kapağı kaldırılan 26 ml.lik kavanzon püpa evresindeki tatarcıklarla birlikte 6. nolu beslenme kafesine konur, çıkan erginlerin şeker ihtiyacını karşılamak üzere elma dilimlerinden yararlanır. 7. Kanını emmeleri için de besleme kafesine memeli bir laboratuvar hayvanı konur.

lak havlu yayılmış olan ağız kapalı plastik kaplara alınır ve yüksek nem için havlu sık sık ıslatılır.

Aç tatarcıklar için, beslenme kafesi (Şekil 4. 6) içerisine, konakçılar silindirik biçimindeki kaplar içinde veya serbest olarak bırakılır ve dişi tatarcıkların kan emmesi sağlanır. Konakçıların sinekleri yemesini engellemek için ya ağızları bantla kapatılır veya bayıltılırlar.

Beslenme kafesindeki tatarcıklara kan emmek için konakçı verilmediğinde yuvarlak kesilmiş ve kafesin kenarlarına eğik konulmuş elmalar verilir ve şeker ihtiyaçları karşılanır.

Eşleşme beslenme kafesinde, beslenme esnasında ya da daha çok beslenmeden son ra, bazen de beslenmeden önce olur. O halde çiftleşmeden emin olmak için dişiler kutulara tek tek konulmadan önce, 12-24 saat kadar, beslenme kafesinde bırakılmalıdır.

Tüm *Lutzomyia* türleri laboratuvarlarda 22-28°C, % 75-95 RH ve 14:10 LD fotoperiyodunda yetiştirilir.

Yumurtlamadan sonra dişi tatarcıklar yeniden beslenmek için beslenme kabına konular. Yumurtlama kabındaki yumurtalar alınır ve tabandaki alçı ıslatılır, kenarlarda su kalmamasına dikkat edilir. Bu yumurtalar 10 gün içinde açılır fakat *L. cruciata*, *L. diabolica* ve *L. vexator* da 14-40 gün kadar sürmektedir. Yumurtlama kapları aynı zamanda üreme kapları olarak da kullanılabilir.

Larva yemi olarak tavşan dışkısı, laboratuvar tavşanı yemleri ve kapalı kutularda bırakılmış nemli tohumlar kullanılır. Bunlar alçının üzerine, yumurta açılmadan önce, bir miktar serpilerek verilir.

Larvalarda ömür uzunluğu, 1. - 4. gömlek larvalar arasında 20-40 gündür. Larvalar larva yiyeceklerinin kalıntıları üzerinde, üreme kabının kenarlarında ya da tavanında pupaya geçerler. Çıkan erginler beslenme kafesine aktarılır burada elma dilimleri ile beslenir.

Ergin dişiler ilk kanı, türe göre, erginleşince, 1-6 gün içinde alırlar. Dişilere kan emmeleri için gündüzün konakçı verilir, ama beslenme kafesi karartılır. Bazı türler, örneğin *Lutzomyia cayennensis hispaniolae* dişileri gündüz kan emerler.

Eğer yetiştirme kapları doğrudan doğruya tavşanın kulağına ya da tıraş edilmiş bir bölgesine sıkıca yapıştırılırsa bu yöntemle de tatarcıkların kan emmeleri sağlanır (Şekil 5).

## LEISMANIASIS AND SANDFLIES

Mülkiye KASAP

Mihri MİMİOĞLU

### SUMMARY

This review contains the types of Leishmaniasis found in several countries and in Turkey. It also mentions the role of vector sandflies in Leishmaniasis. We described a new and simple method for the laboratory breeding of sandflies to help to the workers for their future research.

### KAYNAKLAR

- (1) Akalin, M.S.: Anadolu Flebotomları. T. Hfz. Tec. Biol. Mec. 2 (2) : 113 - 126, 1940.
- (2) Anon. N: Leishmaniase. Newsletter, 12, 13 - 15, 1978.
- (3) Belding, D.L.: Textbook of Clinical Parasitology. App. Cent. Crofts. Ins. New York, USA, 1956.
- (4) Budak, S.: Leishmaniasis'te korunma ve kontrol Türk. Parazit Derg. 2: 109 - 117, 1981.
- (5) Çetin, E.T., Ang. Ö. ve Töreci, K.: Tıbbi Parazitoloji. İ.Ü. Tıp Fak., İstanbul, 1979.
- (6) Dergacheva, T.I., Zherikhina, I.I. and Koutinsyna, E.I.: A method of counting sandflies (Diptera, Phlebotominae). WHO/LEISH/79 - 15, 1979.
- (7) Doğan, F.: Leishmania enfeksiyonlarının epidemiyolojisi, Leishmania'ların rezervuar ve vektörleri. Türk. Parazit. Derg., 2: 25-50, 1981. WHO/VBC/718.
- (8) Endris, R.G., Perkins, P.V., Young, D.G. and Johnson, R.N.: Techniques for laboratory rearing of sandflies (Diptera: Psychodidae). Mosq. News, 42 (3), 400 - 407, 1982.
- (9) Erel, D.: Anadolu vektörleri ve mücadele metotları. SSYB Hıfz. Okulu Yayın No: 47 Ankara, 1973.
- (10) Gezen, C.: Deri leishmaniasisi (Şark Çıbanı). Türk. Parazit. Derg., 2: 59 - 65, 1981.
- (11) Harwood, R.F. and James, M.T.: Entomology in Human and Animal Health. Macmillan Pub. Com. New York, 1979.
- (12) Hati, A.K., Das, G.S., De, N. and Sur, S.: A longitudinal study on Phlebotomus argentipes man contact in a village in West Bengal. WHO/VBC/81 - 801, 1981.

- (13) Hati, A.K., Auddy, S. and Ghash, K.K.: Annew simple technique for detection of sandfly larvae in nature WHO/VBC/ 855, 1982.
- (14) Kasımoğlu, Ö., Kocabalkan, D. ve Eraksoy, H.: 1970-1980 yılları arasında İstanbul'da belirlenen *Leishmania tropica* vakaları. Türk. Parazit. Derg., 1: 55-59, 1982.
- (15) Lainson, R. and Shaw, J.J.: The Leishmaniasis and leishmaniasis of the new world with particular reference te Brezil. Bol. of Sanit. Panam., 78: 93-114, 1974.
- (16) Lewis, D.J.: The biology of Phlebotomidae in relation to Leishmaniasis. Annu. Rev. Entomol., 9: 363-384, 1974.
- (17) Merdivenci, A.: Medikal Entomoloji. Ders Kitabı 89, Hilal Matbaacılık Koll. Şirk., İstanbul, 1973.
- (18) Merdivenci, A.: Medikal Protozooloji Ders Kitabı. Hilal Matbaacılık Koll. Şirk., İstanbul, 1974.
- (19) Merdivenci, A.: Medikal Parazitoloji Pratiği. İ.Ü. Cer. Tıp Fak. Yayın., 89-90. İstanbul, 1979.
- (20) Mirmioğlu, M.M., Göksoy, K. ve Sayın, F.: Veteriner ve Tıbbi Protozooloji. A.Ü. Vet. Fak. Yayını, 232, 134. 1968.
- (21) Mirmioğlu, M.M. ve Kasap, M.: Medikal Parazitoloji Laboratuvar Yöntemleri. Cum. Ü. Yayın No: 2 Sivas, 1978.
- (22) Orhan, V. ve Yaşarol, Ş.: *Leishmania*'ların morfoloji, fizyoloji ve evrimi. Türk. Parazit. Derg., 2: 11-24, 1981.
- (23) Özcel, M.A. ve Sermet, T.: *Leishmaniasis*'de immünite. Türk. Parazit. Derg., 2: 75-83, 1981.
- (24) Özcel, M.A. ve Sermet, T.: *Leishmaniasis*'de Laboratuvar tanısı. Türk. Parazit. Derg., 2: 85-88, 1981.
- (25) Tümbay, E.: Kala-Azar Kliniği. Türk. Parazit. Derg., 2: 67-73. 1981.
- (26) Swaminath, C.S., Shortt, H.E. and Anderson, L.A.K.: Transmission of Indian Kala-Azar to man by the bites of *Phlebotomus argentes*. Ann. Brun. Indian J. Med., 30: 473-477, 1942.
- (27) Unat, E.K.: Tıp Parazitolojisi. İkinci baskı. İ.Ü. Cer. Tıp Fak. Yayını, Celtik Matbaacılık Koll. Şirk. İstanbul. 1979.
- (28) Yaşarol, Ş. ve Özler, N.: Türkiye'de *Phlebotomus*'lar üzerinde şimdiye dek yapılan çalışmalar ve Ege bölgesi *Phlebotomus*'ları üzerindeki araştırmalarımız. Türk. Parazit. Derg., 2: 33-36, 1982.
- (29) Yaşarol, Ş.: Medikal Parazitoloji. Ege Ü. Tıp Fak. Yayını, No: 93: 49-70, 1978

# **$\beta$ -CYCLODEXTRİN İNCLUSION BİLEŞİKLERİNİN FARMASİ TEKNİĞİNDE KULLANILIŞI**

Doç. Dr. O.N. YALÇINDAĞ

Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Müessesesi  
ANKARA

## **Ö Z E T**

Bu makalemiz cyclodextrinler, bilhassa  $\beta$ -Cyclodextrin'in muhtelif ilaç maddeleri ile yapmış olduğu inclusion kompleksleri (kapatma bileşikleri) hakkında esas bilgileri vermek için tertip edilmiştir.

## **GİRİŞ :**

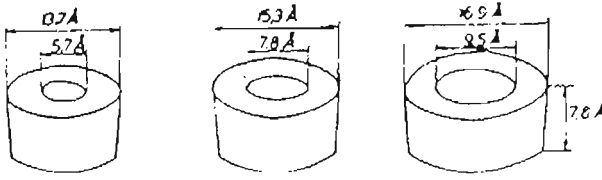
İnclusion kompleksleri, mâlum olduğu üzere, bir molekülün yapısı icabı boşluklarına veya kristal yapısına, diğer bir molekülün kapanması ve van-der Waals kuvvetleriyle tesbit edilmesile hüsule gelen komplekslerdir. İşte cyclodextrinler böyle kompleksler (kapatma bileşikleri) teşkiline özellikle istidatlıdırlar.

Cyclodextrinlerin bünyesi :

Cyclodextrinler (Scharinger Dextrinleri) siklik moleküllerdir 1,4 halka kapanmasına bağlı, glüköz ünitelerinden oluşurlar. Böyle yapılı bir çok üniteler, birbirleri üzerine yığılıp, kristal örgü halinde kanal şeklinde bir boşluk meydana getirirlerki, bu boşlukta bazı maddeler depo olabilirler.

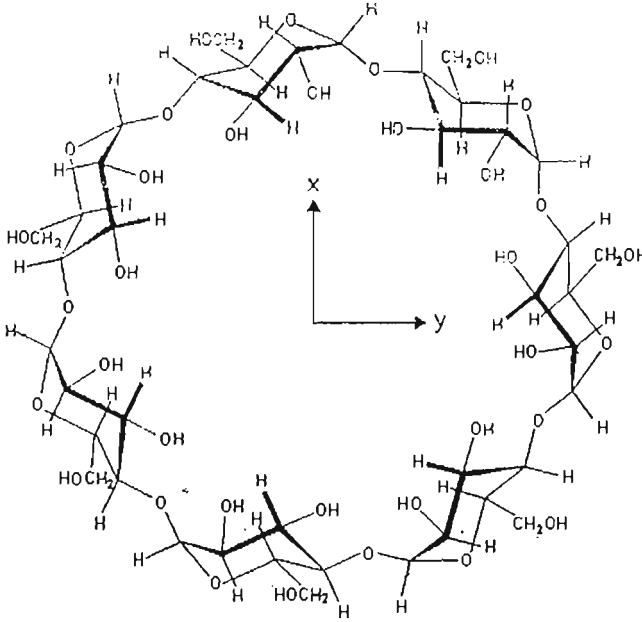
Cyclodextrinlerin elde edilışleri, nişastanın enzimatik yıkılışı ile olur. Bu iş *Bacterium macerans* tan çıkan bir *Amylase* ile olur. Burada  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  - cyclodextrinlerin bir karışımı meydana gelir. Bunlardan  $\beta$ -Cyclodextrin kısmı miktarca en fazladır.

Röntgenografik ve kriyoskopik çalışmalara dayanılarak, aşağıdaki bünye ve boşluk çapları tesbit edilmiştir :



Şekil 1.

- $\alpha$  — Cyclodextrin (Cyclohexaamylose) 6 A  
 $\beta$  — Cyclodextrin (Cycloheptaamylose) 7-8 A  
 $\gamma$  — Cyclodextrin (Cyclooctaamylose) 9-10 A  
 $\mu$  - Cyclodextrine'in bünyesi şöyledir :



Şekil 2

Cyclodextrinlerde boşluk, oyuk teşekkül etmiş bulunduğundan, buna tekabül eden ilâve bileşiği, molekül kapatma bileşiği tipinde olacaktır. Buna göre, örgü, bir misafir bileşik tarafından kısmi işgal halinde dahi stabil olabilir mi? Ekseri diğer kapatma bileşik-leri, çözününce tekrar kendilerini teşkil eden kısımlara parçalanırlar. Cyclodextrin ilâve bileşiklerinde iş böyle değildir. Halka

şeklindeki molekülün sabitliği yüzünden, böyle kompleksler çözeltili halinde de mevcuttur, kristal şeklindeki cyclodextrin ilâve bileşiklerinin davranışlarıyla en alakalı kimseler Cramer, Manglein bunların çok sabit olduklarını söylemişlerdir. Bunlar hatta vakumda, 100°C. de de danıklıdırlar. Sudan da parçalanmadan kristallendirilebilirler. Yukarıda Cyclodextrinlerin oyuklarının çaplarının farklı olduklarını gördük. Neticede bunlara kapanan molekül-lerin cinsleride farklı olur.  $\beta$ -Cyclodextrin'in oyuğu daha büyük olduğu için, deliği küçük  $\alpha$ -cyclodextrin'e nazaran daha büyük molekülleri alabilir. Bir kaç misalle bunu göstermek istiyoruz :

$\alpha$ - Cyclodextrin	$\beta$ - cyclodextrin	$\gamma$ - cyclodextrin
Fluorobenzol	Fluorobenzol	Fluorobenzol
Cyclohexan	Cyclohexan	Cyclohexan
	Naphthalin	Naphthalin
		Anthracen
Diphenyl	Diphenyl	Diphenyl
Propion asidi		
Bütür asidi	Bütür asidi	
		Ephedrin
	Lüminal	
	Papaverin	
	Ergosterin	

Naphthalin,  $\alpha$  cyclodextrin'in kanalı için büyük gelirken, Anthracen  $\gamma$  - cyclodextrin'in kanalında kolayca yer bulur. Propion asidi,  $\alpha$  - cyclodextrin'in oyuğunda iyi yer bulur.  $\beta$  - ve  $\gamma$  - cyclodextrin kanallarında tutunamaz.

#### Stabilite problemleri :

$\beta$  - Cyclodextrin, suda iyi eriyen bir maddedir. Şunu da ilâve edelimki, misafir molekül bunun eririliliğini azaltır.

Rütubet çekme bakımından,  $\beta$  - cyclodextrin ve  $\beta$  - cyclodextrin salisil asidi kapatma bileşiği (Inclusion bileşiği) nin durumları incelenmiştir. Nisbi rütubet artışıyla % su muhtevaları da artar.  $\beta$  - Cyclodextrin % 30 nisbi rütubette % 50 su çekerken, % 50 nisbi rütubette % 10 su çeker. % 70 nisbi rütubette ise % 15, % 100 nisbi rütubette % 23 civarında su çeker.  $\beta$  - Cyclodextrin - Salisil asidi inclusion bileşiği ise biraz daha az (% 100 nisbi rütubette % 20) su çeker. Bunun sebebi,  $\beta$  - cyclodextrin spesifik yüzeyinin

büyükliğünün,  $\beta$  - cyclodextrin - salisil asidi inclusion bileşiğinin-  
kinden büyük olmasıdır. Bu isbat edilmiştir ve  $\beta$  - cyclodextrin  
0,470 m<sup>2</sup>/g. ve  $\beta$  - cyclodextrin - salisil asidi inclusion kompleksi  
0,398 m<sup>2</sup>/g. bulunmuştur.  $\beta$  - cyclodextrin - salisil asidi inclusion  
kompleksi 3 ay % 100 nisbi rütubette saklanmış ve % 20 su aldığı  
görülmüştür. Buna rağmen sabit kalmıştır. 120°C. de ve 18 mm.  
basınçta hiç salisil asidi kaybı olmamıştır. Nişasta (% 16,2 su  
muhtevalı) ile ezdikten sonra, 3 ay % 100 rütubet derecesinde bek-  
lettikten sonra da gene bir parçalanma tesbit edilememiştir. Ka-  
patma bileşiğinde bulunan salisil asidi, yakuum süblimasyonu ile  
uzaklaşdırılamamıştır. Aynı madde yüksek hararetlere karşı da  
sabit bulunmuştur. Süblimasyon noktasının üstünde ısıtılıncada,  
kapatılmış salisil asidi süblime olmamıştır.  $\beta$  - cyclodextrin ile sal-  
sil asidi inclusion bileşiği, Nişasta:Laktoz 7:3 karışım ile komp-  
resyonda da stabil görülmüştür. Bu komprimeler, 30'/160° arasın-  
da tutulmuş ve salisil asidi süblimasyonu görülmemiştir.

Halbuki salisil asidi,  $\beta$  - cyclodextrin, laktoz ve nişasta karışı-  
mının kompresyonu ile elde edilen tabletlerin 160° de ısıtılmasile  
salisil asidinin % 71,5 uğunu kaybettiği görülmüştür.

Inclusion bileşiğinin, otooksidasyona karşı stabilitesi hususun-  
da konuşabilmek için, saf halde sür'atle otooksidatif bozulmağa  
uğrayan maddeler seçilmiş, bunlardan Linol asidi, Askaridol ve  
salmcogra asidi etil esteri gibi maddelerle çalışılmıştır.

$\beta$  - Cyclodextrin - Linol asidi kapatma bileşiğinde, linol asidi-  
nin otooksidasyondan korunduğu tesbit edilmiştir. Renksiz, koku-  
suz, kristal bir madde olan bileşiğin tablet haline getirilmesinin  
kolay olduğuda görülmüştür.

Laktoz/Nişasta/Jelatin'den yapılmış basit granüle ile karıştı-  
rılan bileşik, direkt kompresyonla basılmış, ve 8 ay (4 ayı % 100  
nisbi rütubette) müddetle bekletilmekle bir parçalanma gösterme-  
miştir.

$\beta$  - Cyclodextrin - Askaridol kapatma bileşiği :

Askaridol bilhassa ışığın tesiri ile oksijen alır. Bu iş, yüksek  
hararetin tesiri ile artar. Askaridolün Thiouré ile ışığa dayanık-  
lı bir kapatma bileşiği yaptığı bulunmuştur. Bu bileşik yakından  
incelenmiş ve çalışma Askaridol'ün tanıma reaksiyonu olarak Al-  
man kodeksine alınmıştır. Bu bileşik yüksek tazyıkla ve vakuum



kullanılarak parçalanabilir.

$\beta$  - Cyclodextrin - Askaridol inclusion kompleksi, renksiz, billuri, kokusuz tozudur. Hafif tatlıca lezzeti vardır, Dil üzerinde uzun zaman tutulursa, yakıcı tesir yapar ve % 9,3 Askaridol ihtiva eder. Bu maddeler, tazıyk, yüksek nisbi rütubet, yüksek hararet ve ışık tesiri altında sabit kalırlar.

Manometrik Warburg muayenesinde, 37°C. de 20 günde şidetli güneş ışığının tesirinde (Mayıs, Haziran) hiç oksijen sarf etmemiştir. Buna karşı, aynı miktar saf Arkaridol ile, kısa endüksiyon devresinden sonra, oksijen alışı görülmüştür.

Bu inclusion bileşiğı, % 100 rütubet ve 20°C. ısıda 5 ay bekletilince, hiç bir parçalanma göstermemiştir.

$\beta$  - cyclodextrin - şolmoogra asidi etil esteri kapatma biyeşiğı :  
Bu bileşikte, % 2,3 ester vardır. Renksiz billuri, kokusuz tozudur. Bu bileşikle yapılan tecrübelerde tamamen sabit bulunmuştur.

#### **Çözünürlüğü arttırma :**

Cyclodextrin molekülü, moleküler ambalaj malzemesi olarak düşünülebilirki, içten hidrofob, dıştan hidrofil karakterdedir.  $\beta$  - Cyclodextrin, suda zor eriyen hidrofob bir molekülle, bir kapatma bileşeiğı teşkil ederse, bu hidrofob molekül, hiç değilse bir kısmı iç yüzeyi hidrofob, yani hidrofob bir yüzeyle temas etmektedir. Ve dış yüzeyi ise hidrofildir. Neticede yükselmiş bir suda çözünürlük meydana çıkar. Burada hiç bir kimyevi değışiklik olmaz. Mâmâfi kapanan molekülün reaksiyon kaabiliyeti, ehemmiyetli derecede azalır.

#### **İLAÇ ABSORBSİYONUNUN SÜR'ATLENME VEYA YAVAŞLAMASI :**

Kapatma veya Inclusion bileşikleri vasıtasile bir ilâcın absorbsiyonunu sür'atlendirmek veya yavaşlatmak mümkündür. Suda zor eriyen tesirli maddelerin absorbsiyonlarının sür'atlenmesi enteresandır.

Çok ufalanmış toz partikülleri bile milyarlarca molekülden yapılmışlardır. Müessir madde, hakiki moleküler dispers halde kapatma kompleksinde bulunmaktadır. Bu sebeple müessir madde-

nin kapatma bileşiminde çözünmesi ve neticede absorpsiyonu, su-  
da veya barsak usaresinde eriyen müessir madde kristalciğinden  
daha sür'atli olacaktır.

Tritiumla işaretlenmiş stearik asidin absorpsiyonunun fare-  
lerde tetkiki göstermişdirki, serbest stearik aside nazaran Amyle-  
se kompleksinin absorpsiyonu daha yavaş,  $\beta$ - cyclodextrine bağlı  
olan stearik asit epey daha sür'atli olarak absorbe olmuştur.

Szejtli et al. (1) cyclodextrin inclusion bileşikleri sayesinde  
ilâç absorpsiyonunun yükselmesi hususunda yaptıkları çalışmala-  
rın neticesinde kimya ve fizikçe farklı 4 ilâcın ve onların  $\beta$ - cyclo-  
dextrin inclusion komplekslerinin ağızdan absorpsiyonunu fare-  
lerde mukayese suretile göstermişlerdir bu 4 ilâç :

Suda erir madde salisil asidi  $^{14}\text{C}$

Suda az erir sıvı DDVP  $^{32}\text{P}$

Suda erimez kristal madde Indomethacine

Tipik bir lipid Stearik asit  $^3\text{H}$

Suda çözünen bileşiklerin kompleks teşkili, absorpsiyonu dü-  
zeltmemekte varılan maxima kan seviyesini azaltmaktadır.

Suda erimeyen maddelerin ise absorpsiyonu, moleküler disper-  
site yüzünden sür'atlenmektedir. Kompleks kullanmakla daha yük-  
sek kan seviyelerine varmak mümkündür.  $\beta$ - cyclodextrin komp-  
leksi şeklinde ilâçların ağızdan verilmesile, yan tesirlerin azaltıl-  
ması imkân dahiline girmekle, bazı hallerde daha iyi absorpsiyon  
yüzünden verilecek dozun azaltılması imkânı görülmektedir.

## **İLÂÇLARIN BİYİYARARLILIKLARININ CYCLODEXTRİNLERLE YÜKSELTİLMESİ**

$\beta$ - cyclodextrin'in oral toksisite tetkiklerinin ferahlık verici ne-  
ticeleri ve endüstriyel olarak hazırlanması, paranteral olmayan  
ilâç preparatlarının formülasyon tekniğinde yeni bir yol açmıştır.

$\beta$ - cyclodextrin'in oral ilâç preparatlarında kullanılması, gele-  
cek 10 sene içinde, genel kullanılan bir metod haline gelecektir.  
İlâçların moleküler kapsüllenmelerinin, yani  $\beta$ - cyclodextrin komp-  
leksi teşkilinin, bir çok faydeleri vardır. Meselâ :

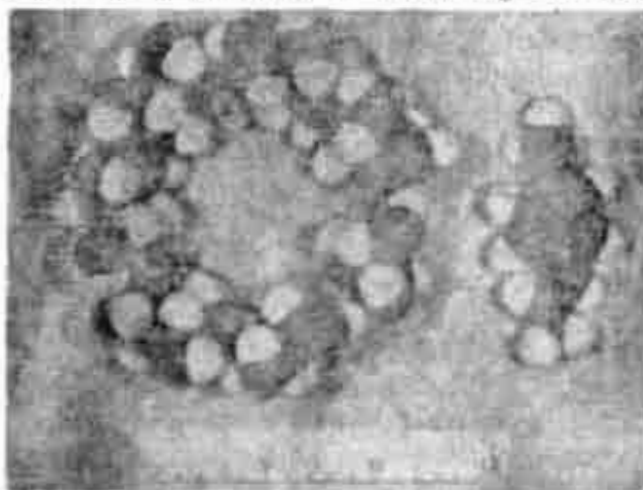
Biyoyararlılığın yükselmesi, Cyclodextrinle komplekse edilen,  
zor çözünür ilâç, daha iyi çözünen hidrofil matrix içinde, moleküler

ler olarak disperse olur, neticede sulu ortamda ilâcın yükseltilmiş çözünürlüğüne sebep olur. Çözünürlüğün düzelmesi genellikle ilâcın kan seviyesinin yükselmesine neden olur ki, bu hal biyolojik tesirlerle de tezahür eder. Aynı ilâcın dozunu, şayet cyclodextrin kompleksi kullanılırsa daha fazla biyolojik tesir yapar. Yani diğer taraftan aynı biyolojik tesire, azaltılmış dozlarda varmak mümkündür. Bu hususlar, İndometacin, Flufenamik asit ve barbitürat.  $\alpha$ -cyclodextrin kompleksleriyle yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (2).

**Tesirli madde komplekslerinin stabilize edilmesi, tesirli madde komplekslerinin sulu çözeltilerde parçalanma sür'atlerinin arttırılması :**

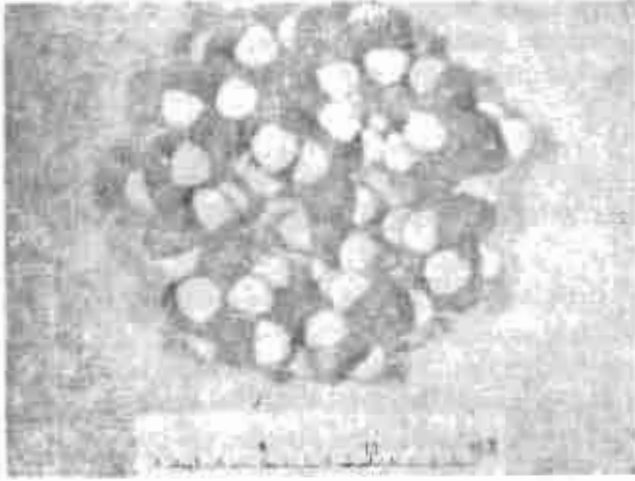
Şayet kapatma bileşiği teşkilî, sulu çözelti halinde, kompleksin kristal şeklinde ayrılması için müsait şartlarda yapılmamış ise, komplekste kapalı bulunan tesirli maddenin reaksiyon kabiliyetini fark edilir derecede değiştirir. Bazı hallerde bu, pratik kullanım için, büyük ehemmiyeti haiz olabilir (3).

Meselâ : Anetol sulu vasıtta nisbeten sür'atle parçalanır.  $\beta$ -Cyclodextrinsiz bir çözeltide Anetol 3 saatte başlangıç miktarının % 68 ine düşerken, her mol Anetol 1 veya 2 mol  $\alpha$ -cyclodextrin ihtivâ eden çözeltide kayıp sadece % 5 olur. 1 mol  $\beta$ -cyclodextrin 1 mol Anetol ortamında bir hadut düşüğe varılmış olur



Sekil: 3

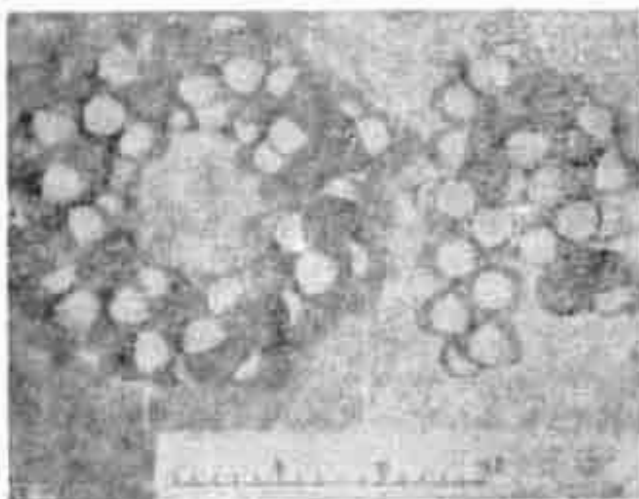
ve bu halde Anestol kaybı az olur. Bu hal  $\beta$ -cyclodextrin konsantrasyonuna bağıl değildir. Bu buluş daha çözeltide husule gelen kompleks teşkilinin 1:1 oranında olduğuna tasdik ediyor. Bunları şekillerde görüyoruz: Şekil - 3 ve Şekil - 4.



Şekil : 4

#### Farmasötik Preparatlarda Kapatma Bileşikleri :

En gayri müstait geçimsizlik problemleri, kapatma kompleks teşkil ile çözülür. Kompleks halinde kapatılmış bulunan tesirli madde, aynı preparatda bulunan başka tesirli maddeler veya sıvağlarla reaksiyon yapmaz. Böylece preparatın stabilitesi ehemmiyetle derecede yükselir. Ekseriya preparatın kötü lezzeti bu şekilde ya ehemmiyetli derecede azalır veya tamamen örtülür. Bir preparatdaki bozucu maddeler, kapatma bileşiği halinde getirilmekle tesirleri kaldırılır. Bundan başka muayyen gayri sabit müessir maddeler, katı fazla, stabilize edilebilirler. Bunlara misal olarak Prostaglandin E<sub>2</sub> den bahsedelim : Muhtelif Prostaglandinler, iki yan zincir ihtiva eden, sıklık, doymamış oxy yağ asitleridir. Bunlar fevkalâde küçük miktarlarda tesirlidirler. Genellikle PGE tipi en tesirli olanlardır. Bu da çok gayri sabittir. Cyclodextrinlerle, prostaglandinler E<sub>2</sub> türü bir kompleks teşkil ederler, hidroxyl grupları kompleks içinde kapalı bulunan prostaglandin parçalanmaz. Bu şekilde molekül stabilize edilmiş olur. (Şekil : 5)



Şekil : 5

#### Yağda eriyen vitaminlerin $\beta$ -cyclodextrin ile stabilizasyonu

J. Szejtli (4) ye göre 1 mol D<sub>3</sub> vitamini için 2 mol  $\beta$ -cyclodextrin ile bir kapsül teşkil eder. Bu kompleks bileşik kristal bir yapıda olup, yüksek stabiliteyi haizdir.

— D<sub>3</sub> vitamini suda pratik olarak erimez,  $\beta$ -cyclodextrin kompleksi halinde suda bir miktar erir, kapatma bileşiğinin bu özelliği, biyoyararlılık bakımından faydalıdır.

— D<sub>3</sub> vitamini 80°C. de havada ısıtılsa 24 saat zarfında kâmilen parçalanır. Kompleksi ise, aynı şartlarda 43 gün sonra ilk D<sub>3</sub> vitamini muhtevaının % 49 unu parçalanmadan muhafaza eder.

— D<sub>3</sub> vitamini ışığa karşı hassas bir maddedir,  $\beta$ -cyclodextrin kompleksi ve  $\beta$ -cyclodextrin ve D<sub>3</sub> vitamini fiziksel karışımı 1 mm. tabaka kalınlığı halinde 400-600 nm. lik (2900 lux) ışık yüklemesine tabi tutulmuştur. 320 saat sonra karışımda, D<sub>3</sub> vitamini miktarı, ilk değerın % 45 i kadar bulunduğu halde, komplekste % 95 i kadar bulunmuştur. Bu hususta yapılmış hayvan tecrübeleri göstermiştir ki  $\beta$ -cyclodextrinle kompleks halde olan D<sub>3</sub> vitamini tıpkı serbest D<sub>3</sub> vitamini gibi tesir göstermektedir (4).

### **K<sub>1</sub> Vitamininin $\beta$ - cyclodextrin ile stabilizasyonu :**

Menadion molekülü,  $\beta$  - cyclodextrin molekülünün oyuğunda kâfi yer bulmaktadır. Buna rağmen spektrumlar, (UV ve sirküler dichroism) Menadion molekülünün benzol halkasının, bu boşlukta oturduğunu ve kinon kısmının ise bu boşluğun dışında lokalize olduğunu göstermektedir. Menadion -  $\beta$  - cyclodextrin kompleksi, Frömring tarafından 1970 de hazırlanmıştır ve suda çözünürlüğü incelenmiştir (5).

Bu şekilde kompleks haline getirilen K<sub>1</sub> vitamini, serbest K<sub>1</sub> vitaminine nazaran, daha sür'atle erimekte ve daha yüksek çözünme hududuna sahip bulunmaktadır.

Civciv ve tavşanlar üzerinde yapılan tecrübelerde, Menadion -  $\beta$  - cyclodextrin kompleksinin biyolojik tesirliliği tetkik edilmiştir. Her iki cins hayvanda da komplekse edilmiş K<sub>1</sub> vitamini, serbest K<sub>1</sub> vitamininkinden az tesir yapmadığı tesbit edilmiştir.

### **Uçucu, kolay okside elabilen labil maddelerin $\beta$ - cyclodextrinle inclusion bileşikleri :**

Muhtelif bitkisel eteri yağlar, terpenler ihtivâ ederler. Hava oksijeni, ışık ve hararetin tesiri ile okside olurlar, parçalanırlar, reçine gibi bir madde haline gelir veya uçarlar.

Bu maddeleri stabilize etmek için, yeni imkânlardan biri, cyclodextrinlerle inclusion kompleksi haline getirilmeleridir.

Szejtli et al. (6) 25 çeşitli eteri yağ ve koku maddesini  $\beta$  - Cyclodextrin kompleksi haline getirmiş, kristal yapıda olan bu kompleksler, gaz-likit kromatografisi ile yapılan tayinlere göre, % 8 - 13 arasında eteri yağ ihtivâ etmektedir. Bu komplekslerde bulunan eteri yağlar, pratik olarak ilk terkiplerini korunmaktadır. Kompleksler, ancak 160°C. üzerinde ısıtılmakla uçucu maddelerini kaybetmektedirler. Böylece normal saklama şartlarında uçuculuk, oksidasyon ve hararetle dekompozisyon o nisbette azdırki, preparat özelliklerini kaybetmeden uzun zaman saklanabilirler. Bu kompleksler gıda sanayinde mikrobiyel kontaminasyon olmadan, standard terkipte stabil aromatik preparatlar olarak kullanılabilirler.

Szejtli et al (7)  $\beta$  - cyclodextrin - Nitrogliserin kapatma komplekslerini hazırlamışlar ve incelemişlerdir. Bu kompleks kristal yapıda ve stökiyometrik, patlamaya karşı emin, bir komplekstir. Hararete karşı, katı bir maddeye adsorbe ettirilmiş Nitrogliserine

nazaran ehemmiyetli derecede sâbit olup, katı ilâç şekillerinin hazırlanmasına elverişlidir.

Yoichi Ikeda et al (8) eteri yağların  $\alpha$  ve  $\beta$  cyclodextrinlerle inclusion bileşikleriyle uğraşmışlardır.

Masaki otagiri et al. (9) 21 adet barsitürat ve Thiobarbitüratın, sulu çözelti halinde  $\beta$ -cyclodextrin ile yaptıkları inclusion komplekslerinin, interaction tarzının spektroskopik tetkikini yapmışlardır.

Haruhusi Ueda et al. (10)  $\beta$ -Cyclodextrin ile sulu çözültide Tolbutamid ve Chlorpropamid'in inclusion bileşiklerinin NMR Spektroskopisini yapmışlardır. Aynı müellifler, (11)  $\beta$ -cyclodextrin'in tolbutamid ile yaptığı inclusion bileşiğinin katı halde, NMR spektroskopisini ve Raman spektroskopisi ile uğraşmışlardır.

A. Bivâri et al. (12)  $\beta$ -cyclodextrin ve Benzoe asidi arasında 1:1 ve 1:2 kompleks teşkilini incelemişlerdir.

H. Jones (13) ün araştırmalarına göre, suda çok az eriyen Digoxin'in gastro-entestinal yoldan absorpsiyonu, dissolüsyon derecesile mahduttur. Suda  $\beta$ -cyclodextrin çözeltisi temasında çözünlülüğü 200 defa artmaktadır.  $\beta$ -cyclodextrin kompleksi, (3:1) hazırlanmış, bunun çok sür'atli dissolüsyon karakteri gösterdiğini bulunmuştur.

Chao-Han Chan (14) Menadion'un  $\beta$ -cyclodextrin ve Deoxycholic asitle sulu çözültide kompleks teşkilini incelemiştir.

U. İ. Corrigan et al. (15)  $\beta$ -cyclodextrin - ilâç sistemlerinden ilâç erime nisbetinin yükselmesinin mekanizması üzerinde çalışmışlardır.

## NETİCE

Bu yazıda,  $\beta$ -cyclodextrin inclusion komplekslerinin bünyeleri ve ilâç endüstrisinde kullanılmalarının faydaları izah edilmeğe çalışılmıştır. Bir çok araştırmacılara göre, istikbâlde pek çok müesir madde  $\beta$ -cyclodextrin kompleksli haline getirilerek kullanılacaktır.

## $\beta$ -CYCLODEXTRIN INCLUSION COMPLEXES AND THEIR USES IN THE PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY

### SUMMARY

The  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes and their use in pharmaceutical industry is discussed.

## KAYNAKLAR

1. Szejtli J. et al. (1979) Farmakonok felszívódásának fokozása ciklodextrin zárványkomplex képzéssel Acta pharm. Hung. 49, 207
2. Szejtli J. (1981) Enhancement of Drug bioavailability by cyclodextrins Starch/Stärke 33, 387
3. Szejtli J. (1977) Einige Anwendungsmöglichkeiten der cyclodextrine in der Arzneimittelinindustrie, Starch/Stärke 29, 26
4. Szejtli et al. (1980) Stabilisierung fettlöslicher Vitamine mit beta-Cyclodextrin Starch/Stärke 32, 386
5. Szejtli et al. (1982) The  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex of Menadiolone (Vitamin K<sub>3</sub>) Pharmazie, 37, 725
6. Szejtli J. et al. (1979) Molecular encapsulation of volatile easily oxidizable labile flavour substances by cyclodextrins. Acta chimica Acad. scient. Hungaricae 101, 27
7. Szejtli J. et al. (1979) A nitroglycerin  $\beta$ -ciklodextrin zárványkomplex. Acta Pharm. Hung. 49, 30
8. Yoichi Ikeda et al. (1982) Inclusion complexation of essential oils with,  $\alpha$  and  $\beta$ -cyclodextrins. Yakugaku Zasshi 102, 83
9. Otagiri M. et al. (1976) Inclusion complexation of Barbiturates with  $\beta$ -cyclodextrin in aqueous solution. Spectroscopic study on the mode of interaction Chem. Pharm. Bull. 24, 1146
10. Ueda H. et al. (1980) Nuclear magnetic Resonance (NMR) spectroscopy of Inclusion compounds of Tolbutamide and chlorpropamide with  $\beta$ -cyclodextrin in Aqueous solution. Chem. Pharm. Bull. 28, 1415
11. Ueda H. et al. (1981) Solid state magnetic Resonance spectroscopy and Raman Spectroscopy of the inclusion compound of Tolbutamide with  $\beta$ -cyclodextrin Chem. Pharm. Bull. 29, 2710
12. Buvári A. et al. (1982) The 1:1 and 1:2 complex formation between  $\beta$ -cyclodextrin and Benzoic acid. Acta Chim. Acad. Scient. Hung. 110, 51
13. Jones H. (1981) Complex formation between Digoxin and beta cyclodextrin. J. Pharm. Pharmacol. 33 suppl. 27 p
14. Chao-Han Chau (1982) Interaction of Menadiolone with  $\beta$ -cyclodextrin and Deoxycholic acid in Aq. Soln. J. of the Taiwan pharm. Assoc. 34, 23
15. Corrigan O.J. et al. (1982) Mechanism of Drug dissol. rate enhancement from  $\beta$ -cyclodextrin-Drug system. J. Pharm. Pharmacol. 34, 621



# DOĞAL VE YARI SENTETİK ANTIOKSIDANLAR İÇİN UYGULANMIŞ BULUNAN NİTEL VE NİCEL AYIRMA YÖNTEMLERİ

Dr. Eczacı Erten ONUR

Refik Saydam Merkez Hıfzussıha Enstitüsü, İlaç Kontrol Laboratuvarı

## ÖZET

Bu makalemizde birçok araştırmacının doğal ve yarı sentetik antioksidanların nitel ve nicel ayırmalarında uygulamış oldukları çeşitli yöntemlerden bahsettik.

## GİRİŞ :

Oksidasyona engel olmak amacı ile kullanılan antioksidanlar bugün, Modern Kimya teknolojisinin hemen hemen bütün alanlarında (kozmetikte, besin sanayiinde, eczacılıkta, kauçuk sanayiinde...) kullanılmaktadır.

Antioksidanlar sinergist etki gösterdikleri için yalnız kullanılmalarından çok, iki veya daha fazla antioksidanla kombine olarak kullanılmaktadırlar.

Gerek eczacılıkta, gerekse besin sanayiinde kullanılan antioksidanlar arasında, yan etkilerinin az olması yönünden doğal ve yarı sentetik antioksidanlar önemli bir yer tutar. Bu bakımdan biz bu makalemizde birçok araştırmacının doğal ve yarı sentetik antioksidanların nitel ve nicel ayırmalarında uygulamış oldukları çeşitli yöntemlerden bahsettik.

**Doğal ve yarı sentetik antioksidanlar için uygulanmış bulunan nitel ve nicel ayırma yöntemi :**

Birçok araştırmacı, antioksidanları ayırmak, birbiri yanında tanımak için çeşitli yöntemler kullanmışlardır.

## Kağıt kromatografisi yöntemi :

Kağıt kromatografisi alanında ilk araştırmacılar olarak F. Braco ve K. L. Baxteri söyleyebiliriz. Bunlar tokoferollerini kağıt üzerinde ayırmışlardır. Kağıdı önce lipofil maddeler, parafin veya silikonlarla kaplamışlardır.

Gander ise, böyle kaplamaları, sistemi komplike yapması bakımından doğru bulmamıştır.

Kakao yağı ve margarine ilâve edilen 10 antioksidan madde- nin ayrılması için iki uygun sistem bulunmuştur (1). Bunlar a) Benzin: Benzen: Glasiyal asetik asit (1:1:1/2) b) Su: Etil asetat (97,5 : 2,5) dir. Bu yöntemi yağlı sıvınlarda bulunan antioksidan- ların tanınmaları için de tatbik edilmiştir. Teorik olarak % 0.1 antioksidan bulunan yağlı sıvınlarda eterde çözülmüş, çözelti 72°C lik alkol ile iyice çalkalanmış ve alkollü ekstrakt kağıt kromatografi- si için kullanılmıştır.

Aynı araştırmacılar (2), bu yöntemi geliştirerek antioksidanla- rın miktar tayinine geçmişlerdir. Bunun için yine, Benzin: Ben- zen, Aset asidi (1:1:1/2) çözücü sistemi kullanılmıştır. Lekeler iki türlü hesap edilmiştir. a) Leke alanı yöntemi, b) Gravimetrik yön- tem ile.

Kağıtta, direkt kantitatif kromatografik tekniklerden birçok araştırmacılar tarafından kullanılmış çeşitli yöntemler vardır.

Leke yüzeyi ile konsantrasyon logaritması arasında bir ilgi aranmıştır. Suppozituarda bulunan antioksidanların tayini için (3) kağıt kromatografisi tatbik edilmiş % 72 etanol ve metanolün eşit orandaki karışımı, antioksidanların ekstraksiyonu için kulla- nılmıştır. 6 sıvınlara tatbik edilen bu metod, birkaç ticari olarak bu- lunan suppozituar hariç diğerlerinde başarılamamıştır.

Gallat, gallik asit, BHA, NDGA; petrol eterindeki % 7 sıvı pa- rafin emdirilmiş kağıt ve Kloroform: Kons. asetik asit (99 : 1) çö- zücü sistemi kullanarak ayrılabilmiştir (4). Bu yöntem, daha sonra domuz yağında bulunan antioksidanların tanınmaları için kullanılmıştır.

Bazı gallatlar, Benzol: Benzin: Kons. asetik asit (1:1:0.5) ka- rışımı ile ayrılmıştır. Revelatör olarak,  $Fe_2(SO_4)_3 \cdot (NH_4)_2 SO_4$  ve  $K_2Fe(CN)_6$  kullanılmıştır.

FG, BHA, BHT ve NDGA'nın ayrılması için, benzolde pamuk yağı emdirilmiş veya asetilenmiş kağıt tavsiye edilmiştir. Üç çözücü sistem kullanarak antioksidanlar ayrılabilmiştir.

Antioksidanları ayırmak için, % 7 petrol eterinde çözülmüş, sıvı parafin çözeltisi ile kaplanmış kromatografi kağıdı, çözücü sistemi olarak Metanol: Su (1:4) veya Etil asetat: Su (1:20), reventör olarak da NH<sub>4</sub>Cl AgNO<sub>3</sub> çözeltisi kullanılmıştır.

Tokoferollerin izomerlerinin ayrılmasında kağıt kromatografisi yöntemi spesifik olması bakımından önemlidir. Kağıt üzerinde çeşitli kaplama maddeleri kullanılmıştır (vazelin, likit parafin ve silikonlar gibi). Tabii tokoferol karışımları (5) vazelinin eterdeki % 2,5 luk çözeltisine daldırılmış ve kurutulmuş ve kağıt, çözücü sistemi olarak da, % 75 sulu etanol kullanarak ayrılabilmiştir.

Bazı araştırmacılar (6), çinko karbonat ile doyurulmuş kağıt kullanmışlardır. Sikloheksan ile bir saat yürüttükten sonra, alfa, beta, gamma ve delta tokoferol, ekstrakttaki sterollerden, pigmentlerden ayrılabilmiştir. Bu kağıt, sıvı parafin ile kaplandıktan sonra % 75 sulu alkol ile, ikinci yürütmede (dimensionda) epsilon, zeta tokoferoller ve tokoferol olmayan maddeler ayrılmıştır.

1959 da, yağlarda ve besin ürünlerinde tokoferollerin tayini için Green ve arkadaşlarının çalışmasına dayanan, iki boyutlu kağıt kromatografisi teklif edilmiştir (7). Lekeler, ultraviyole lambası altında ve dipiridilferrikolorür çözeltisi kullanarak tespit edilmiştir.

L-Askorbik asit ve d-İzoaskorbik asidi, metafosforik asidin gliserindeki, % 3 lük çözeltisine daldırılan ve kurutulan silisik asit kaplanmış özel kağıt ve solvan sistemi olarak da suda doyurulmuş metil etil keton kullanarak ayrılabilmişlerdir. Sonra lekeler metafosforik asit - asetik asit çözeltisi ile elüe edilerek, fluorometrik yöntem ile tayin edilmiştir (8).

1955 de, askorbik asit ve dehidroaskorbik asit, kağıt kromatografisi ile ayrılabilmiştir (9).

Bazı antioksidanların kağıt kromatografisi ile tayininde, kağıt cinsi, solvan sistemi ve kaynakları tablo halinde verilmiştir (10).

### **İnce tabaka kromatografisi yöntemi (11-39)**

İnce tabaka kromatografisi için adsorban olarak en çok silicagel, kieselguhr ve poliamid kullanılmıştır.

Seher 1959 da (II) antioksidanların, silicagel üzerinde kloroform veya benzen ile veya her ikisi ile iki boyutlu kromatografi ile ayırabilmiştir. Aktioksidanların daha kolay tanınmaları için, ayrı tabaka üzerinde özel reaktifler kullanılmıştır. Aynı araştırmacı, polihidroksi maddelerin ayrılması için 0.5 normal oksalik asit ile doyurulmuş silicagel, çözücü sistemi olarak Benzen: Etil asetat (6:4) kullanmıştır.

Birçok gallatlar, 5:1 veya 5:2 oranında silicagel ve kieselguhrun bir karışımı ve iki çözücü sistemi (4:1) ve (6:1) oranında Heksan: Asetik asit kullanarak ayrılmıştır.

NDGA, BHA, propil gallat ve askorbil palmitat, poliamid ince tabakaları ve Metanol; Aseton; Su (60:20:20), (60:10:30) sistemi kullanarak ayrılabilmiştir (12).

Gallik asit esterleri, butilhidroksianizol, butilhidroksitolien, sesamol, nordihidrogujaretik asit ve askorbil palmitat; nişasta ve Movilith CT 5A lı poliamid tabakaları ve silicagel tabakaları ve üç tip çözücü sistemi kullanarak ayrılabilmiştir.

Bunların Rf değerleri ile gallik asit esterlerinin alkil zincir uzunlukları arasında bir korrelasyon bulunmuştur (13).

Poliamid tabakasının, mobil solvan terkibine bağlı olarak polar veya apolar stationary faz gibi davranacağı ispat edilmiştir. Örneğin, poliamid asetik asit kompleksi ile, polar bir stationary faz meydana gelmektedir.

Gallatların ayrılması için, sellüloz ve shell Sol. A: n. Propanol: Asetik asit: Formik asit (45:6:3:6) sistemi kullanılmıştır.. BHA, BHT, NDGA ve tokoferollerin ayrılması için, aynı solvan sistemi ve metanol ile hazırlanan silicagel tavsiye edilmiştir. Ancak bu sistem, NDGA ve propil gallatı ayırmaz (14).

Antioksidanların karışımı, silicagel G üzerinde, önce benzen, sonra asetonitril kullanılarak iki boyutlu kromatografi ile ayrılmıştır. Sonra lekeler kazınarak kolorimetrik yöntem uygulanmıştır (15).

Yağda çözünen 11 antioksidan, iki boyutlu kromatografi ile ayrılabilmiştir (16).

Kullanılan plaklar, 40 g silicagel G, 80 ml % 0.2 etilen glikozbis. (beta-aminoetil eter) N,N,N',N' tetra aset asidi disodyum çö-

zeltisinin 90 saniye çalkalanıp karışımın plaklara yayılması ve havada kuruduktan sonra 15 saat 110-115°C de, aktive edilmesiyle hazırlanmıştır. Mobil fazlar :

1 — 100 ml benzen, 50 ml kloroform, 12 g polietilen glikol 1000

2 — 148,5 ml saf diizopropil eter, 11,5 ml saf anhidr formik asit 5 ml sudur.

Bu metod daha sonra, basit pomatlar ve gliseridlere, kompleks emülsiyon pomatlarına, zânk ve musilajlar ihtiva eden sıvı emülsiyonlara ilâve edilen, bazı yağda çözünen antioksidanların nitel olarak ayrılmaları için tatbik edilmiştir (17).

Bazı antioksidanlar, silicagel G plağı ve benzen solvanı ile ayrılmıştır, lekeleri görünür hale getirmek için yürütülen plağın, etanolde % 1 linoleik asit çözeltisi tatbik edilmiş, 30 dakika ultraviole lambası altında tutulmuştur (354 nm).

Böylece linoleik asidin oksidasyonu hızlandırılmıştır, sonra, N-N-Dimetilparafenilen-diaminin, Kloroform: Asetik asit: Su (5:5:1) karışımında % 0.1 lik çözeltisi ile muamele edilmiştir. Antioksidanlar, pembe bir zemin üzerinde beyaz olarak görünmüşlerdir. Ultraviole lambası altında, sarı zemin üzerinde mavi renkte görünürler (18).

BHT, Vitamin A preparatlarından, kieselgel plakları ve petrol eteri solvanı kullanılarak ayrılabilmiştir (19).

Bazı araştırmacılar (20), üzerinde çalıştıkları 10 antioksidanı ancak üç solvan sistemi ile ayırabilmişlerdir. Adsorban olarak kieselgel HF<sub>254</sub> solvan sistemi olarak da 1) Kloroform 2) Petrol eteri: Benzen: Aset asidi (1:2:1) 3) Petrol eteri: Benzen: Metanol: Kloroform: Aset asidi (1:1:3:3:2) kullanmışlardır.

Aynı araştırmacılar plak üzerinde antioksidanların direkt olarak dansitometre ile ölçülebileceğini göstermişlerdir (21).

6 antioksidan, silicagel G üzerinde, Tiriklorotilen: Asetik asit: Formik asit: İzobutanol (15:1:2:2) solvan sistemi ile ayrılabilmiştir (22).

Çeşitli besin numunelerinde bulunan bazı antioksidanlar, Martelle-Nanon metodu ile tayin edilmiştir (23).

Sıvı ve katı yağlarda, askorbil palmitatın nicel tayini üzerinde durulmuştur. Askorbil palmitat, 2,6-diklorofenol-indofenol ile ok-

side edilmiş ve 2,4-dinitrofenilhidrazin ile reaksiyona sokulmuştur. Askorbik asidin 2,4-dinitroosazonu meydana gelmiştir. Bu türev tokoferoller gibi fenolik grupları içeren bileşiklerden, ince tabaka kromatografisi ile ayrılabilmiştir. Bu yöntem için, silicagel H ve Kloroform: Etil asetat (50:50) solvan sistemi kullanılmıştır. Developmandan sonra, osazonun kırmızı lekesi kazanmış ve % 85 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile elüe edilerek 520-525 nm de kolorimetrik tayini yapılmıştır (24).

Ayrındaki askorbik asit, yukarıdaki yöntemle yakın bir yöntem ile tayin edilmiştir (25).

İnce tabaka kromatografisi ile tokoferollerin analizine ait geniş bilgi vardır (12).

Vitamin preparatlarında E Vitamininin tayini için, adsorban olarak fluorensans madde ilâve edilmiş silicagel, solvan sistemi olarak da tolien kullanılmıştır (26).

Sıvı ve katı yağlardaki tokoferoller homologlarını, n-Heksan: Etil asetat (92,5 : 7,5) solvan sistemi ve silicagel G plakları ile ayrılmıştır (27).

Bazı antioksidanların ince tabaka kromatografisi ile tayininde kullanılan birçok adsorban, solvan sistemi ve kaynaklar tablo halinde gösterilmiştir (10).

Tokoferollerin (27), bazı amin ve fenolik antioksidanların kromatografik durumu incelenmiştir (II). Birçok araştırmacı çeşitli antioksidanları aynı yöntemle tayin etmişlerdir (27-37).

### Gaz kromatografisi yöntemi (38-53)

Antioksidanların gaz kromatografisi üzerinde yapılan araştırmalar şöylece özetlenebilir.

Gallik asit esterleri için, polifenolik maddeler için kullanılan yöntemlerden yararlanılmaktadır. Polifenoller uçucu hale getirmek için metillenmiş, ya da, asetillenmiş veya silylize edilmişlerdir. Uçucu bileşikler, % 10 ya da % 20 SE 30 taşıyan diatoports kolonununun geçirilerek ayrılmıştır. Detektör olarak genellikle flame iyonizasyon detektör kullanılmaktadır (38).

BHA ve BHT esasen uçucu bileşikler olduğundan, türevlerini hazırlamaya gerek yoktur. Bu bileşikleri ayırmak için, kolon olarak Apiezon L silicon gum SE 30 ve tween 80 karışımı, % 20 SE 30 taşıyan Chromosorb W (39), % 3 OV-3 taşıyan chromosorb W (40)

kullanılmıştır. Detektör genellikle flame iyonizasyon detektör ve ya elektron yakalayıcı detektördür (40-41).

Bu bileşiklerin trifluorasetatlarından yararlanarak benzer kolonlar üzerinde daha iyi bir ayırımı yapılabileceği de ortaya konulmuş bulunmaktadır.

Vitamin konsantrasyonlarında bulunan BHA ve BHT nin (42), askorbik asidin (43), sistin, sisteinin (44) tayini için, gaz likit kromatografisi yöntemi kullanılmıştır.

Gıda ürünlerinde kullanılan antioksidanların tayin yöntemlerinin bir derlemesi yapılmıştır (45, 10).

Tokoferollerin çeşitli homologlarını birbirinden ayırmak için bir çok araştırmacı tarafından gaz likit kromatografisi yöntemi tatbik edilmiştir (46-48). Bunun için ilk defa % 4 SE 30, % 5 QF-1 ve % 4 polietilenglikol adiptot olmak üzere, üç likit faz kullanılmış (46), çoğu kez ise, likit faz olarak SE 30 kullanılmıştır. Bu yöntemde delta, gama, beta ve alfa tokoferoller hemen ayrılanlardır ve sıra ile elüe edilirler. Estanın, gama tokoferolden ayrılması zordur. Geniş kolon ve uzun zaman ister. Bu bileşiklerin asetat esterlerinin retention zamanları daha uzundur.

Çeşitli preparatlarda Vit. E nin tayini, için de aynı yöntem kullanılmıştır (49-52). Bitkisel yağlarda bazı antioksidanlar da GIC ile tayin edilmiştir (53).

#### Ultraviyole absorpsiyon yöntemi :

Yağlarda, polietilende, gıda ürünlerinde bulunan birçok antioksidanlar önce silisik asitli kolon (54), alüminyum oksit kolonu (55-56) silastic 181 kolonu (57) sephadex LH<sub>20</sub> (58) kullanılarak antioksidanları yanında bulunan diğer maddelerden ayrılmış ve sonra kolon elüe edilerek, spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.

Birçok araştırmacı, Vitamin E nin spektrofotometrik tayini üzerinde durmuşlardır (59, 60). Yağlarda ve besin ürünlerinde bulunan alfa tokoferolün tayini için bir yöntem önerilmiştir (55). Yöntemin prensibi, numunenin sabunlaştırılması ve sabunlaşmayan maddenin ekstraksiyonu ve alüminyum oksit kolonunda adsorpsiyon kromatografisi, parafin kaplanmış kağıt şeritleri üzerinde alfa tokoferol fraksiyonunun partisiyon kromatografisini ve elüsyonun spektrofotometrik tayinini içerir.

Yağlardaki antioksidanların ultraviyole spektrumu üzerine, solventlerin ve yağların oksidasyon ürünlerinin etkisi incelenmiş (61), daha sonra da yağlardaki antioksidanların direkt ultraviyole spektrofotometrik tayinleri (62) üzerinde durulmuştur. Çeşitli antioksidan ilâveleri yapılmış, domuz yağı numunelerinin direkt kloroform ekstraktındaki, ultraviyole yöntemi, kompleksometrik ve kolorimetrik yöntemlerle karşılaştırılmıştır.

Birçok araştırmacı, sıvı yağda bulunan antioksidanların özel ekstraksiyonundan sonra (63), etoxyquinin (64), besin yağlarında bulunan gallik asitlerin ve besin endüstrisinde yaygın olarak kullanılan antioksidan karışımlarının ultraviyole spektrofotometrik tayinleri üzerinde durmuşlardır (65).

Gallatların, BHA, BHT, NDGA ve dibutilhidroksitolienin farklı solvanlarda, absorpsiyon spektraları incelenmiş (66), daha sonra da bu antioksidanların spektrofotometrik tayinlerine etki eden faktörler saptanmıştır (67).

#### **Kolorimetrik yöntem (68-88)**

Antioksidanlar için en yaygın olarak kullanılan yöntem, kolorimetrik yöntemdir. Bunları aşağıdaki şekillerde sınıflandırabiliriz.

Gibbs Reaksiyonu: BHA ün alkollü çözeltisinin, boraks tamponu (PH: 9,4) yanında, 2,6 - dikolorokinonklorimid ile mavi bir indofenol meydana getirmesi ve rengin 620 nm de okunmasıdır (69, 74, 75, 81).

Bu metod BHA için, BHT yanında spesifiktir, zira BHT'nin, orto ve para konumundaki fenolik hidroksil grubu bloke edilmiştir.

Bu reaksiyonunun ticari olarak bulunan BHA nün başlıca izomeri olan 3-terciyer butil hidroksianizol için etkili olduğu saptanmıştır (74).

**Emmerie-Engel Metodu** : Bu yöntemin ilk tatbikatı, yağlara ilâve edilen fenolik antioksidanların analizi için yapılmıştır.

Yöntemin esası, fenolik antioksidanların % 50 lik alkollü çözeltilerinin ferri klorür ile ferro tuzuna indirgenmesine ve sonra ferro tuzunun 2,2' - dipiridil reaktifi ile kırmızı dipiridil kompleksine ve bu rengin absorbansının 515 nm de okunmasına dayanır (7, 69, 70, 74, 75, 87).



**Sülfanilik Asit Yöntemi:** Yöntem, kalevi çözeltide diazolanmış, sülfanilik asit ve BHA ün reaksiyonu ile meydana gelen renge dayanır (80). BHT de bu reaktif ile reaksiyona girer, fakat öyle yavaş girer ki, reaktifi ilâve ettikten sonra, 5-10 dakika içinde, ölçme yapılırsa az bir interferansa rastlanır.

Propil gallat da bu reaktif ile renk meydana getirir. Onun için, başlangıçta propil gallat, amonyum asetat ile ekstre edilerek kaldırılmalıdır.

**Mitchell Yöntemi:** Literatürde, demir tartaratin bütün polifenollerle reaksiyon yaptığı, ancak reaksiyon ürünlerinin birçok hallerde çözünmediği kolorimetrik olarak doze edilemeyeceği yazılıdır.

Ancak, NDGA nın % 25 lik etil alkollü ekstraktı, sodyum karbonat-sodyum bikarbonat tampon çözeltisi ile PH = 10 a ayarlanırsa, ilâve edilen ferro sülfat ile çözünen mor renk meydana gelir. 515 nm de okunur.

Propil gallatin tayini için, ilk olarak progallol tanenleri değerlendirmek için tatbik edilen yöntemden yararlanılmıştır. Buna göre, antioksidanlı katı ve sıvı yağın petrol eteri çözeltisinden (PH: 7-7,6), sulu amonyum asetat ile ekstre edilen propil gallat, ferro tartarat ile koyu mor renk meydana getirmekte ve bu rengin absorpsansı 530 nm de okunmaktadır (69, 79).

**Szalkowski ve Gander Yöntemi (BHT, için):** BHT için, ilk spesifik kolorimetrik yöntemdir. Yöntem, BHT nin % 5 lik metanollü çözeltisinin, sodyum nitrat ve dianisidin reaktifleri ile reaksiyona girmesi, meydana gelen portakal-kırmızı renkte bileşiğin kloroform ile ekstraksiyonuna ve bunun 520 nm de okunmasına dayanır. Renk kloroformlu fazda mor renktedir (88).

### **Titrimetrik Yöntem**

Kompleksometrik titrasyon ile (89) BHT, askorbil palmitat ve suda çözünmeyen gallatların bazıları için  $AgNO_3$  indirgenmesine dayanan bir yöntem geliştirilmiştir.

Serimetrik titrasyon ile, total tokoferollerin tayini yapılmıştır (83, 87). Metot seryum  $^{++}$  sülfatın, tokoferoller tarafından indirgenmesine dayanır.

Alfa tokoferolün, bulunduğu ortamdan tokoferol olmayan maddelerin % 85  $H_2SO_4$  ile kaldırılmasından sonra, serimetrik titrasyonla direkt tayini yapılmıştır (90).

İyodometrik titrasyon ile, metionin (91), ve askorbik asit (92), 2-6-diklorofenol indolofenol ile, askorbil palmitat ve Vitamin C, polarografik yöntem ile (93), yağlarda, fenolik antioksidanlar, potansiyometrik yöntem ile (94), Vitamin C üzerinde çalışılmıştır.

Ayrıca propil galdatın luminesansanalizi (95), Vitamin E nin (96) ve besin ürünlerinde EHA ve BHT nin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi (97-99), Vitamin C nin yarı otomatik (100) ve otomatik floresanmetrik (101) tayin yöntemleri ve Fenolik antioksidanların (102-104), Askorbik asit ve dehidroaskorbik asidin HPLC tayin yöntemleri vardır (105).

## QUANTITATIVE AND QUALITATIVE SEPARATION METHODS FOR NATURAL AND SEMI - SYNTHETIC ANTIOXIDANTS

### SUMMARY

In our paper, many methods are reviewed with many references for separation and assay of natural and semisynthetic antioxidants as qualitative and quantitative.

### KAYNAKLAR

- 1 — Salazar R. Alemany P.: Aportacion al Analisis Cromatografico de Antioxidantes. *Galenica Act.*, 12: 1, 1959.
- 2 — Salazar R.: Analisis Cromatografico Aplicado a la Determination Cuantitativa de Antioxidantes. *Ibid.*, 13: 333, 1960.
- 3 — Pozo A.D., Salazar R., Fauli C.: La Cromatografia-Papel en la Investigation de Antioxidantes en Excipientes Grasos Artificiales Para Supositorios. *Galenica Act.* 18: 133, 1965.
- 4 — Sedlacek B.A.J.: A New Paper-Chromatographic Method for the Separation and identification of Synthetic Antioxydants. *Fette Seifen Anstrichmitt.* 65: 915, 1963.
- 5 — Brown F.: The Estimation of Vitamin E. *Biochem. J.*, 51: 237, 1952.
- 6 — Ritter E.: Newer Analytical Techniques-Vitamins Ass. *Food and Drug off.* 31: 94, 1967.
- 7 — Analytical Methods Committee. Report Prepared by the Vitamin E Panel: The Determination of Tocopherols in Oils, Foods and Feeding Stuffs. *Analyst*, 84: 366, 1959.
- 8 — Weeks C.E., Deutsch M.J.: L-Ascorbic and d-Isoscorbic Acids ; Quantitative Separation and Assay. *J. of the AOAC.*, 50: 793, 1967.
- 9 — Schmith H., Staudinger H.J.: Papierchromatographische Bestimmung Von Ascorbinsaure und D:hydroascorbinsäure. *Biochem. Zeitschrift*, 326: 343, 1955.

- 10 — Wheeler D.A.: Determination of Antioxydants in Polymeric Materials. *Talanta*, 15: 1315, 1968.
- 11 — Macek K.: Pharmaceutical Applications of Thin-Layer and Paper Chromatography. Elsevier Publishing Company New York, 1972.
- 12 — Stahl E.: Thin-Layer Chromatography. Second Edition, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1969.
- 13 — Copius peereboom, J.W.: Thin Layer Chromatography on Polyamide Layers: Separation of Fat Antioxidants. *Nature*, 204: 748, 1964.
- 14 — Salo T., Makinen R., Salminen K.: Dunnschichtchromatographie Von Antioxydantien. *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.*, 125: 450, 1964.
- 15 — Salazarabudhe M.R.: Application of Thin-Layer Chromatography to the Quantitative Estimation of Antioxidants: BHA, BHT, PG, and NDGA. *J. of AOAC*, 47: 882, 1964.
- 16 — Schorderet M., Kapetanidis I., Mirmanoff A.: Separation et Identification Par Chromatographie en Couche Mince de Onze Agents Antioxydants Liposolubles. *Pharm. Acta Helv.* 41: 680, 1966.
- 17 — Schorderet M., Kapetanidis I.: Mise en Evidence par Chromatographie sur Couche Mince de Quelques Agents Antioxydants Liposolubles, Incorpores A des Glycerides et a des Preparations Galeniques. *Pharma. Acta Helv.* 42: 350, 1967.
- 18 — Vicque E., Abe Y., Marol J.: Nuevo Metodo Para la Detecion de Antioxydantes en Grasas: Grasas Aceites. 18: 310, 1967.
- 19 — Eklund E., Westermack H.: Om Bestamning av Butylhydroxitoluen (BHT) I a-Vitamin Preparat. *Farm. Natisblad*, 76: 164, 1967.
- 20 — Martelli A., Nano G.M.: Riconoscimento E Dosamento di Antiossidanti Mediante Cromatografia su Strato Sottile. *II Farmaco-Ed. Pr.*, 22: 661, 1967.
- 21 — Pujol Forn M.: Determination of Antioxidants in Fatty Foods by Fluorimetric or Densitometric Methods after their Separation by TLC. *Grasas Aceites*, 31: 187, 1980 - Ref. C.A. 93: 262753, 1980.
- 22 — Mathew T.V., Das D.K., Mitra S.N.: Separation, Identification and Estimation of Ethyl Gallate, Propyl Gallate, n-Octyl Gallate, n-Dodecyl Gallate, BHA and BHT by Thin Layer Chromatography.: *Res. Ind.* 14: 84, 1969.
- 23 -- Valdehita M.L., Vicente M.C.: Investigacion de Antioxydantes en Grasas Comestibles por Cromatografia on Capa Fina.: *Anal. Bromatol.* 23: 107, 1971.
- 24 — Strohecker R.: Nachweis und Bestimmung von Ascorbylpalmitat in Stabilisierten Fetten: Fette Seifen Anstrichmitt., 66: 787, 1964.
- 25 — Beljaars P.R., Harrocks W.V.S., Rondags T.M.N.: Vitamins and Others Nutrients-Assay of L(-)-Ascorbic Acid in Buttermilkby Densitometric Transmittance Measurement of the Dehydroascorbic Acid Osazone. *J. of AOAC*, 57: 65, 1974.
- 26 -- Croward R.R., Narsmore D.C., Esmerian O.K.: Assay of Vitamin E in Multivitamin Products Using Thin Layer Chromatography.: *J. Pharm. Sci.* 57: 1716, 1968.

- 27 — Muller - mulot W.: Rapid Method for the Quantitative Determination of Individual Tocopherols in Oils and Fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 53: 732, 1976.
- 28 — Nakazato M. et al.: Simultaneous Determination of TBHQ, BHA, BHT in Edible Oil. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 21: 64, 1980.
- 29 — Pujol Forn, Marti: Nutrition Antioxidants: Study and Determination in Foods. *Circ. Farm.* 38: 233, 1980 - Ref. C.A. 93: 184360 s, 1980.
- 30 — Van Peteghem, Carlos H., Dekeyser D.A.: Systematic Identification of Antioxidants in Lards Shortenings and Vegetable Oils by TLC. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64: 1331, 1981.
- 31 — Pujol Forn, Marti: Study and Determination in Foods. *Circ. Farm.* 38: 313 1980 - Ref. C.A. 95: 154956 g, 1981.
- 32 — Pujol Forn Marti: Alimentary Antioxidants. *Circ. Farm.* 38: 461, 1980 - Ref. C.A. 94: 180393 s, 1981.
- 33 — Pujol Forn Marti: Antioxidants in Foods. *Circ. Farm.* 39: 5, 1981 - Ref. C.A. 95: 95545 e, 1981.
- 34 — Iu PAC (INTERNATIONAL UNION of PURE and APPLIED CHEMISTRY) Bulgarian; IUPAC Standard Methods for Analysis of Oils, Fats and Soaps. *Mislo-Sapunena Prom. - St.* 17: II. C. 9, 1981 - Ref. C.A., 95: 202177, 1981.
- 35 — Majur H., Lewandowska I.: Determination of Selected Antioxidants Used in the Production of Plastics. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* 32: 245, 1981 - Ref. C.A. 96: 160935 u, 1982.
- 36 — Guldborg M.: Collaborative Study of a Quantitative TLC - Method for Detection of Antioxidants (BHA, BHT, Gallates and NDGA) in Food. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 309: 117, 1981 - Ref. C.A., 96: 33457 q, 1982.
- 37 — Pujol Forn, Marti: Food Antioxidants. *Circ. Farm.* 39: 199, 1981 - Ref. 96: 33402 t, 1982.
- 38 — Forge I., Buchi J.: Synthese, Physikalisch-Chemisch Eigenschaften und Antioxydative Wirkung Einiger Gallussaure - Ester. 2. Mitteilung. Synthese, Reinheitsprufung und Quantitative Bestimmung J., *Pharm. Acta Helv.* 45: 227, 1970.
- 39 — Choy T.K. Quattrone J.J., Alicino N.J.: A Gas Chromatographic Method for the Determination of the Antioxidants BHA, BHT and Ethoxyquin in Aqueous and in Hydrocarbon Soluble Samples. *J. Chrom.* 12: 171, 1963.
- 40 — Page B.D., Kennedy B.P.C.: Rapid Determination of BHA, TBHQ, and PG in edible Oils by Electron capture Gas-Liquid Chromatography. *J. of AOAC.*, 59: 1208, 1976.
- 41 — Dilli S., Robards K.: Comparative Gas Chromatographic Behaviour and Detection Limits of 2, 6-Ditert-Butyl-4-Methylphenol, 3-tert-Butyl-4-Hydroxyanisole (BHA), and the Trifluoroacetate of BHA. *J. of Chrom.*, 133: 363, 1977.
- 42 — Meena P.S., Kulkarni V.S.: Determination of BHA and BHT in Vitamin Concentrates by G.L.C. *Indian J. Technol.* 5: 168, 1967.

- 43 -- Schlack J.E.: Quantitative Determination of L-Ascorbic Acid by Gas-Liquid Chromatography. *J. of the AOAC.*, 57: 1346, 1974.
- 44 -- Moodie I.M., George R.D.: Gas-Liquid Chromatography of Amino Acids. *J. Chrom.* 124: 315, 1976.
- 45 -- Stuckey B.N., Osborne C.E.: A Review of Antioxidant Analysis in Food Products. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 42: 228, 1965.
- 46 -- Wilson P.W., Kodicek E., Booth V.H.: Separation of Tocopherols by Gas-Liquid Chromatography. *J. Biochem.* 84: 524, 1962.
- 47 -- Libby D.A., Sheppard A.J.: Gas-Liquid Chromatographic Method for the Determination of Fat Soluble Vitamins, I. Application to Vitamin E. *J. of AOAC.* 47: 371, 1964.
- 48 -- Sheppard A.J., Posser A.R., Hubbard W.D.: Gas Chromatography of the Fat-Soluble Vitamins. A Review. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 49: 619, 1972.
- 49 -- Pillsbury H.C., Sheppard A.J., Libby D.A.: Gas-Liquid Chromatographic Method for the Determination of Fat-Soluble Vitamins V. Application to Pharmaceuticals Containing Vitamin E. *J. of the AOAC.* 50: 899, 1967.
- 50 -- Mahn F.P., Viswanthan V., Plinten C., Menyharth A., Senkowski B.Z. Determination of Vit. E. in Multivitamin Products by GLC. *J. Pharm. Sci.*, 57: 2149, 1968.
- 51 -- Rudy B.C., Mahn F.P., Senkowski B.Z., Sheppard A.J., Hubbard W.D.: Collaborative Study of the Gas - Chromatographic (Liquid) Assay for Vitamin E. *J. of AOAC.*, 1211, 1972.
- 52 -- Bowman P.B., West W.E.: Gas chromatographic Assay for Alfa - Tocopheryl Acetate in Multivitamin Products. *J. Pharm. Sci.* 57: 1880, 1968.
- 53 -- Wyatt D.M.: Simultaneous Analyses of BHA, TBHQ, BHT, and PG by GLC as Extracted from Refined Vegetable Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58: 917, 1981.
- 54 -- Phillips M.A., Hinkel R.D.: Determination of 2,6-Di-Tert-Butyl-P-Cresol in Edible Fats by Ultraviolet Spectrophotometry. *J. Agr. Food Chem.*, 5: 379, 1957.
- 55 -- Lambertsen G., Braekkan O.R.: The Spectrophotometric Determination of Alfa-Tocopherol. *The Analyst*, 84: 706, 1959.
- 56 -- Campbell R.H., Wise R.W.: Determination of Some Mixed Phenolic Antioxidants in Polyethylene. *J. of Chrom.*, 12: 178, 1963.
- 57 -- Berger K.G., Sylvester N.D., Haines D.M.: The Determination of Chemical Antioxidants in Fats After Separation by Partition Chromatography. *Analyst*, 85: 341, 1960.
- 58 -- Kaufman P.: The Separation of BHA Isomers on Sephadex LH-20. *J. Of Chrom.* 132: 356, 1977.
- 59 -- Pazarina G., Cosmin A.: Spektrophotometrische Bestimmung des Vitamins E Aus Oligen Injektionslosungen. *Pharm. Zentral.* 108: 115, 1969.

- 60 — Mulder F.J., Keuning K.J.: Spectrophotometric Assay of Alfa - Tocopherol. *Recueil*, 20: 1029, 1961.
- 61 — Sedláček B.A.J.: Studium der U.V. Spektren von Antioxydantien I. Einfluss der Lösungsmittel und der Ranzigkeit der Fette auf die U.V. Spektren. *Fette-Seifen-Anstrichmitt.*, 64: 653, 1962.
- 62 — Sedláček B.A.J.: Studium der U.V. Spektren von Antioxydantien II: Eine Neue Direkte U.V. Spectrophotometrische Methode der Bestimmung der Antioxydantien in Fetten. *Ibid.*, 64: 982, 1962.
- 63 — Vigneron P.Y., Spicht P.: Antioxygènes D' une Huile par Spectrophotometrie. *Rev. Fr. Corps Gras*, 17: 295, 1970.
- 64 — Alicino N.J., Choy T., Klein H.C., Quattrone J.J.: Determination of Ethoxyquin by U.V. Spectrophotometry. *J. Agr. Food Chem.*, 11: 340, 1963.
- 65 — Cuzzoni M.T., Gazzani G.: Sulla Determinazione Spetrofotometrica Degli Esteri Dell'Acide Gallico in Grassi Alimentari. *Il Farmaco - Ed. Pr.*, 29: 739, 1974.
- 66 — Pozo A.D.: Determination Espectrofotometrica U.V. de Antioxidantes. *Galenica Acta*, 16: 45, 1963.
- 67 — Pozo A.D., Salazar R.: Determinacion Espectrofotometrica U.V. de Antioxidantes en Excipientes Grasos de Uso Farmaceutico. *Ibid.*, 16: 195, 1963.
- 68 — Furia T.E.: *Handbook of Food Additives*. 2. Edition, Cleveland Chemical Rubber Co. Cleveland, 1972.
- 69 — Anglin C., Mahon J.H., Chapman R.A.: Determination of Antioxydants in Edible Fats. *Agric. and Food Chem.*, 4: 1016, 1956.
- 70 — Frohock A.H.: The Effect of Water on Determination of Tocopherols. *Analyst*, 84: 567, 1959.
- 71 — Pellerin F. et Mancheron D.: Essais Physicochimiques des Recipients en Plastique pour Preparations Injectables. *Ann. Pharm. Française* 27: 65, 1969.
- 72 — Schwien W.G., Conroy H.W.: Qualitative Analysis of PG, NDGA, BHA and BHT in Fats and Oils. *J. of AOAC*, 48: 489, 1965.
- 73 — Heidrick P.L., Conroy H.W.: Antioxidants in Oils, Fats and Waxes *Ibid.*, 45: 244, 1962.
- 74 — Mahon J.H., Chapman R.A.: Estimation of 2-and 3-tert-Butyl-4-Hydroxyanisole Isomers. *Anal. Chem.*, 24: 534, 1952.
- 75 — Flipic V.J., Ogg C.L.: Determination of BHA and BHT in Potato Flakes. *J. of AOAC*, 43: 795, 1960.
- 76 — Johnson D.P.: Spectrophotometric Determination of BHA and BHT in Vegetable Oils. *Ibid.*, 50: 1293, 1957.
- 77 — Schmall M., Pifer C.W., Wollsch E.G., Buschinsky R., Gainer H.: Colorimetric Determination of ascorbic Acid. *Anal. Chem.*, 26: 1521, 1954.
- 78 — Hashmi M.H., Adil, A.S., Viegas A., Ahmad I.: Microdetermination of Ascorbic Acid and Tryptophan by Colorimetry. *Microchim. Acta No: 3: 457, 1970.*

- 79 -- Vos H.J., Wessels H., Six C.W. ths: The Quantitative Determination of the Antioxidants Propyl, Octyl, and Dodecyl Gallate in Oils and Fats. *Analyst*, 82: 362, 1957.
- 80 -- Laszlo H., Dugan L.R.: A new Method for Quantitative Determination of BHA. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 38: 178, 1961.
- 81 -- Sloman K.G., Remagnoli R.J., Cavagnol J.C.: Trace Analysis of BHA and BHT in Food Products. *J. of AOAC*, 45: 76, 1962.
- 82 -- Liddel H.F., Saville B.: Colorimetric Determination of Cystein. *Analyst*, 84: 188, 1959.
- 83 -- Lachman R.W.: Assay of Vitamin E in Pharmaceutical Products. *J. Pharm. Sci.* 53: 201, 1964.
- 84 -- Fisher W.T., Edwards N.M., Lehman R.W.: Simplified Assay of Vitamins A and E in Mixtures. *J. Pharm. Sci.*, 53: 294, 1964.
- 85 -- Castren E.: The Determination of Vitamin E in the Presence of Vitamin A in Pharmaceutical Preparations. *Farm. Aikakauslehti*, 9: 181, 1961.
- 86 -- IUPAC Standard Methods for Analyses of Oils, Fats and Soaps II. C. 10: Determination of BHA and BHT in Oils and Fats. *Maslo-Sapunera Prom.* ST. 17: II. C. 10, 1981-Ref. 95: 252178 m, 1981.
- 87 -- Strohecker R., Henning R.M.: Vitamin Assay. Verlag Chemie, GMBH. Weinheim/Bergstr. 1965.
- 88 -- Szalkowski C.R., Garber J.E.: Determination of 2,6-Ditert-Butyl-4-Hydroxytoluene (BHT): Application to Edible Fats and Oils. *Agr. Food Chem.*, 10: 499, 1962.
- 89 -- Sedláček P.A.J.: Komplexometrische Bestimmung von Antioxydantien IV. *Fette Seifen Anstrichmitt.* 63, 1053, 1961.
- 90 -- Chapman D.G., Lichen F., Campbell J.A.: A Method for the Separation of Alpha-Tocopherol From the Non-Alpha-Tocopherols. *J. Am. Pharm. Assoc.* XL: 372, 1951.
- 91 -- Möhrle H.: Zur Gehaltsbestimmung von Methionin. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 107, 781, 1967.
- 92 -- The United States Pharmacopeia, 19 th rev., Mack Publishing Co., Easton, Pa. 1975.
- 93 -- Franzke C.L., Kretzschmann F., Reining K.: Ein Polarographisches Verfahren zur Bestimmung Phenolischer Antioxydantien in Nahrungsfetten mit Hilfe einer Rotierenden Graphitelektrode. *Fette-Seifen Anstrichmitt.* 73: 472, 1958
- 94 -- Robert M. et al.: Rapid Potentiometric Determination of Ascorbic Acid. *Analytical Chem.*, 34: 1342, 1962.
- 95 -- Lutz H.W., Hurtubise R.J.: Luminescence Analysis of Food Antioxydants Determination of Propyl in Lard. *J. Agr. Food Chem.* 17: 352, 1969.
- 96 -- Shaikh B., Huang H., Zielinski W.L.: High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Supplemental Vitamin E in Feed. *J. of the AOAC* 60: 137, 1977.

- 97 -- Ciruolo L., et al.: Determination of Mixtures of BHA and BHT in Food Products by High-Pressure Liquid Chromatography. *Rass. Chim.*, 30: 145, 1978 - Ref. C.A., 90: 4498 z, 1979.
- 98 -- Bhaskar Anil, Belevadi V.K.: Determination of BHA and BHT in edible Oils and Fats Using HPLC. *J. Oil Technol. Assoc. India*, 12: 23, 1980 - Ref. C.A. 94: 172972 a, 1981.
- 99 -- Hammond K.J.: The Determination of BHA, BHT, and Individual Gallate Esters in Fats and Oils by HPLC. *J. Assoc. Public Anal.* 18: 17, 1978 - Ref., C.A., 93: 24570 p, 1980.
- 100 -- Egberg D.C., Potter R.H., Heroff J.C.: Semiautomated Method for the Fluorometric Determination of Total Vitamin C in Food Products. *J. of the AOAC*, 60: 126, 1977.
- 101 -- Roy R.B., Conetta A., Salpeter J.: Automated Fluorometric Method for the Determination of Total Vitamin C in Food Products. *J. of the AOAC*, 59: 1244, 1976.
- 102 -- Page, B. Denis: HPLC Determination of nine Phenolic Antioxidants in Oils, Lards and Shortenings. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 62: 1239, 1979.
- 103 -- King, William P.: HPLC with Amperometric Detection for Determining Phenolic Preservatives. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63: 137, 1980.
- 104 -- Archer A.W.: The Determination of Phenolic Antioxidants in Edible Oils and Fats by HPLC. *Anal. Chim. Acta*, 128: 235, 1981.
- 105 -- Rose, Richard C.; Nahrwold David L.: Quantitative Analyses of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid by HPLC. *Anal. Biochem.* 114: 140, 1981.