

TIYOPENTALİN ELEKTROANALİTİK DAVRANIŞLARININ
İNCELENMESİ VE TIYOPENTAL KAN DÜZEYLERİNİN
GELİŞTİRİLEN YÖNTEMLE ÖLÇÜMÜ

Kim. Müh. Nevin ÇALLI

Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği Uyarınca
Analitik Kimya Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr. Muzaffer TUNÇEL

Ağustos 1989

Anadolu Üniversitesi
Merkezi Kütüphane

Nevin ÇALLI'nın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı
 " TİYOPENTALİN ELEKTROANALİTİK DAVRANIŞLARININ İNCELENMESİ
 VE TİYOPENTAL KAN DÜZEYLERİNİN GELİŞTİRİLEN YÖNTEMLE ÖLÇÜMÜ"
 başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeli-
 ği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul
 edilmiştir.

.19.1.09.1989.

Üye: Prof.Dr. K. Hüsnü Can BAŞER (imza)

Üye: Prof.Dr. Muzaffer TUNÇEL (imza)

Üye: Yrd.Doç.Dr. Neşe KIRIMER (imza)

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ...22.09.1989..... gün ve ...122/270.. sayılı kararıyla onaylanmıştır.

(imza)
 Enstitü Müdürü

Prof.Dr. Nurettin BAŞARAKI

ASLI GİBİDİR
 22 EYLÜL 1989
 İsmet YILMAZ
 Enstitü Sekreteri

ÖZET

Bu çalışmada tiyopentalin elektroanalitik davranışları polarografik olarak incelendi ve koşullar standardize edildi. Diferensiyel puls polarografisi kullanılarak iyi bir korelasyonla doğrusal bir ilişki elde edildi.

Bu çalışmada önerilen yöntem kandaki tiyopentalin tayini için kullanıldı ve yöntemin iyi bir doğrusallık, tekrar edilebilirlik ve herhangi bir girişim olmaksızın uygulanabildiği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler : Puls polarografisi, Tiyopental tayini,
Kanda tiyopental tayini

SUMMARY

The electroanalytical behaviours of thiopental were examined polarographically in this study and the conditions were optimized. A linear relation was obtained using the differential pulse polaraphy with a good correlation.

The method proposed here were used in the determination of thiopental in blood and it was concluded that the method could be employed with a good accuracy, reproducibility and without any interference.

Key words : Puls polarography, Determination of thiopental,
Determination of thiopental in blood

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince gösterdiği maddi ve manevi yardımlarından dolayı Eczacılık Fakültesi Dekanı sayın Prof.Dr.İhsan SARIKARDAŞOĞLU'na,

Değerli bilgilerinden yararlandığım, olumlu eleştirileri ile çalışmalarına katkıda bulunan, fikirleri ile beni yönlendiren, yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım sayın hocam Prof.Dr.Muzaffer TUNÇEL'e,

Tıbbi Bitkiler Araştırma Merkezi'nin olanaklarından yararlanmamı sağlayan Merkez Müdürü sayın Prof.Dr.Kemal Hüsnü Can BAŞER'e,

Değerli bilgileri ile beni aydınlatan, anlayışlı ve yardımsever yaklaşımlarıyla ilgi ve desteğini gördüğüm Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyelerinden sayın Yrd.Doç.Dr. Şeref DEMİRAYAK'a, sayın Yrd.Doç.Dr.Gülhan ZİTOUNİ'ye,

Çalışma materyalim olan kanların sağlanmasında büyük ilgi ve yardımlarını gördüğüm Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Animasyon Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof.Dr.Belkız TANRIVERDİ şahsında tüm anestezi bölümü doktor ve hemşirelerine,

Sonsuz maddi ve manevi desteklerinden dolayı Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki çalışma arkadaşlarıma,

Teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	3
2.1. Tiyopentalin Fiziksel Özellikleri	3
2.2. Tiyopentalin Kimyasal Özellikleri	4
2.3. Tiyopentalin Elde Edilişi	5
2.4. Tiyopentalin Farmakolojik Etkileri	6
2.5. Tiyopentalin Biyolojik Materyallerden Ekstraksiyon Yöntemleri	6
2.6. Yapılan Analitik Çalışmalar	7
3. MATERYAL VE METOD	11
3.1. Kullanılan Aletler	11
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	13
3.3. Potansiyometrik Yöntem Kullanılarak Standart Maddelerin Saflık Derecelerinin Belirlenmesi .	14
3.3.1. Tiyopental	14
3.3.2. Tiyopental-Na	15
3.4. Voltametrik Yöntem Kullanılarak Standart Eğri- nin Elde Edilmesi	17
3.5. Voltametrik Yöntem Kullanılarak Dağılma Katsayısının Belirlenmesi	21
3.6. Voltametrik Yöntem Kullanılarak İnsan Kanında Tiyopental Miktar Tayini	22
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	25
KAYNAKLAR DİZİNİ	27
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Potansiyostatın blok şeması	12
3.2. PRG-5' in şeması	13
3.3. Tiyopental için tipik potansiyometrik titrasyon eğrisi	14
3.4. Tiyopental-Na için tipik potansiyometrik titrasyon eğrisi	16
3.5. Çeşitli derişimlerdeki tiyopental çözeltilerinin polarogramları	18
3.6. Tiyopentalin diferensiyel puls polarografik C-I _d ilişkili grafiği	19
3.7. İnsan kanlarından ekstraksiyon sonucunda elde edilen tiyopentalin polarogramı	23

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Tiyopental için potansiyometrik titrasyondan elde edilen sonuçlar	15
3.2. Tiyopental-Na için potansiyometrik titrasyondan elde edilen sonuçlar	16
3.3. Polarografik koşullar	17
3.4. $C-I_p$, $C-I_d$ ilişkilerini gösteren değerler ...	19
3.5. Tiyopentalin derişim-sınır akımı ilişkisinin istatistiksel değerlendirmesi	20
3.6. Anestezi edilen hasta kanlarından elde edilen polarografi sonuçları	24

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İlk olarak 1882'de sentezlenmiş olan barbiturik asitin 5, 5 dietil türevi Carl Fischer ve Von Mering tarafından hipnotik bir ilaç olarak tedavi alanına kazandırılmıştır. Günümüze kadar sayısız türevleri sentez edilmiş ve bazıları hipnotik ve antikonvüzan olarak kullanılmışlardır.

Çok kısa etki süreli barbiturat türevi olan tiyopental ise ilk kez 1935' de J. S. Lundy tarafından bulunmuştur.

Barbituratların etki sürelerini beşinci karbonda bulunan substituentlerin karakterleri belirlemektedir. Barbiturik asitin kendisi oldukça fazla iyonize olan ve oldukça güçlü sayılabilecek bir organik asittir. Bu maddenin sedatif ve hipnotik etkisi yoktur. Barbiturat türevleri, barbiturik asitte beşinci karbondaki iki hidrojen yerine alkil, alkenil, sikloalkenil veya aril radikallerinin girmesiyle oluşurlar. Barbituratların asit olmaları ikinci karbondaki karbonil grubunun laktim-laktam olarak iki tautomeri halinde bulunmaları ile ilgilidir. Laktim şekli asidik özellik gösterir ve bazlarla tuz oluşturabilir.

Beşinci karbondaki hidrojenler yerine radikal grupların girmesi primidin halkasındaki elektron rezonansını azaltır ve ikinci karbondaki iyonizasyon eğilimini düşürür. Hipnotik etki gücü noniyonize durumdaki yani serbest asit durumdaki şeklin yağ/su dağılım katsayısı ile doğru orantılı olarak artar. Substituentlerin yağda çözünürlükleri oranında barbituratların etki süreleri de değişir. Yağda çözünürlükleri çok yüksek olan kısa etki süreli türevler hipnotik etki için kullanılmayıp genel anestezi amacıyla kullanılırlar.

İkinci karbondaki karbonil yerine tiyo grubunun getirilmesiyle barbiturat türevinin yağdaki çözünürlüğü daha da artırılmış olan tiyobarbituratlar elde edilir. Genel anestezi için en çok kullanılan barbiturat türevi tiyopentaldir.

Barbituratların etki süreleri ilaçların metabolizasyon zamanlarıyla ilgili olmayıp yağ/su dağılım katsayılarına bağlı olarak kandan çok kısa sürede vücudun yağlı dokularına

depo edilmesiyle yakından ilgilidir. Genel anestezi olarak kullanılan tiyopental genellikle intravenöz olarak ve daha az oranda rektal yoldan uygulanır.

Tiyopentalin miktar tayini için literatürde kromatografik (1, 2, 4, 9, 10), spektrofotometrik (14), titrimetrik (3, 7) ve elektrokimyasal (12, 13, 18) yöntemler verilmiştir. Gaz kromatografisi (1, 2, 9) ve HPLC (4, 10) yöntemleriyle tiyopentalin miktar tayininin incelenebilmesi için tiyopentalin serbest asit haline getirilmesi gerekmiş bu da ilacın ekstraksiyon işlemleri sırasında gerçekleştirilmiştir.

Titrimetrik yöntemlerde molekülün ikinci karbonundaki tiyon grubunun özelliklerinden yararlanılmıştır. Tiyon grubu tiyolaktam-tiyolaktim formlarında bulunabilir. Asit ve nötr ortamda tiyolaktam, bazik ortamda ise tiyolaktim formunda bulunur. Bu özelliklerden yararlanarak asit-baz titrasyonları yapılabilir. Tiyolaktim formunda ağır metallerle çökelti vermesi temeline dayanılarak titrimetrik yöntemler de uygulanabilir. Örneğin gümüş nitrat (7) ve civa nitrat (3) ile titrasyonları yapılmıştır.

Tiyon grubunun oksitlenmesi temeline dayanan yöntemler de uygulanmıştır. Oksidan madde olarak iyot ve brom gibi yumuşak oksidanlar seçilmiştir.

Elektrokimyasal olarak doğru akım polarografisi, alternatif akım polarografisi, diferensiyel puls polarografisi (13), katodik sıyırma voltametri (18) gibi yöntemler uygulanmıştır. Burada maddenin kolaylıkla oksitlenebilme özelliğinden yararlanılmıştır.

Bu çalışmada duyarlı bir yöntem olan diferensiyel puls polarografisi tekniği uygulanmıştır. Titrimetrik, kromatografik ve spektrofotometrik yöntemlerin literatürde geniş bir şekilde kullanılmaları ve daha duyarlı olması nedeniyle bu yöntem seçilmiştir.

Ayrıca polarografik yöntemde incelenecek maddenin derişiminin 10^{-8} M dolaylarına kadar inilebilmesi, fazla saflaştırma işlemine gerek kalmaması ve diferensiyel sınır akımının her maddenin kendine özgü olması ve birbirleriyle girişim

yapmalarını bu yöntemin seçilmesinde etkili olmuştur.

Kanda polarografik eğrileri etkileyen birçok madde bulunduğu için, polarografik koşullarda eğrilere yansiyabilecek bir bölüm maddenin ortamdaki uzaklaştırılabilmesi için bir ön ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Bu ekstraksiyonda eğrilere yansiyabilecek maddeler böylece ortamdaki uzaklaştırılmıştır.

Yapılan çalışmalar sırasında tiyopentalin kandan ayrılabilmesi için bir ekstraksiyon işlemine gerek duyulmuştur. Bu nedenle de kandaki gerçek miktarın bulunabilmesi için organik çözücü ile kan arasında dağılım katsayısının hesaplanması gerekmiştir. Değişik ekstraksiyon teknikleri denenmiş ve en uygunu seçilerek deneylerde kullanılmıştır.

Çalışmalar sırasında tiyopentalin sınır akımının pH, civa haznesine uygulanan basınç, damlama süresi, potansiyel değişim hızı ve sıcaklık gibi etkileri incelenerek optimizasyon koşulları sağlanmış ve sonuçlar asit-baz titrimetrik analiz sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Tiyopentalin Fiziksel Özellikleri

Tiyopental asit ve sodyum tuzu halinde bulunabilen beyaz, acı lezzetli ve hafif kükürt kokulu, higroskopik amorf bir tozdur. Tiyopentalin asit şekli metil alkol, etil alkol, eter, kloroform, toluen, etil asetat gibi organik çözücülerde kolaylıkla çözünür. Suda hemen hemen hiç çözünmez. Sodyum tuzu ise suda ve alkolde çok çözünmesine karşın benzen, heksan gibi organik çözücülerde çözünmez.

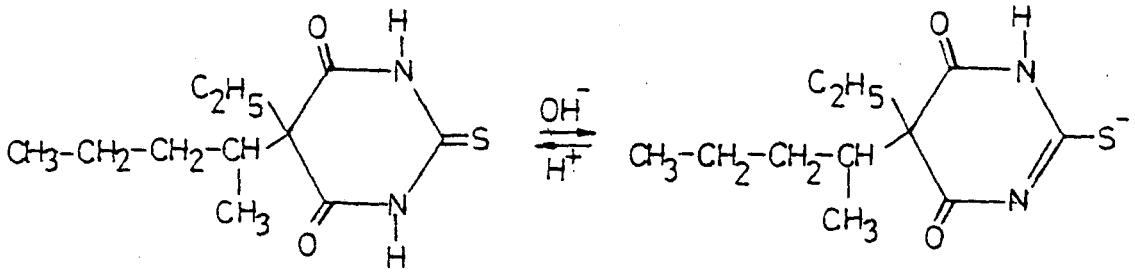
Tıbbi amaçlar için tiyopental sodyumun sudaki çözeltisi kullanılır. Hazırlanan çözeltinin 24 saat içinde kullanılması gerekir. En uygunu enjeksiyon sırasında taze hazırlanmış çözeltinin kullanılmasıdır.

Tiyopental sodyumun özelliklerini atmosferik karbondioksitten korunabilmesi için preparatlara ilacın ağırlığının % 6 sı kadar sodyum karbonat eklenir.

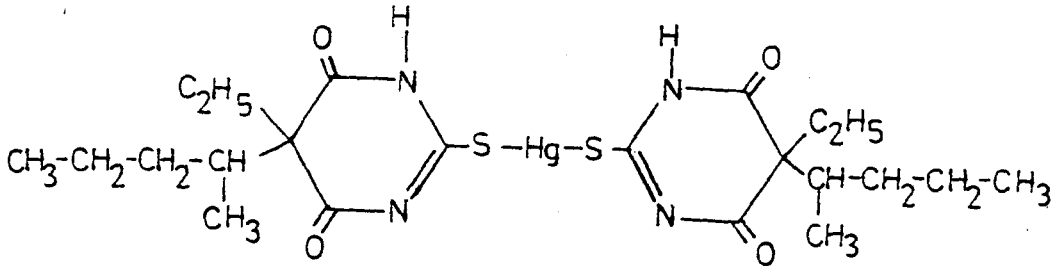
Taze hazırlanmış çözeltinin pH' sı 9.9-10.6 arasındadır. Dolayısıyla asit maddelerle uyumsuzdur. Çözeltinin pH' sı kan pH' sından daha baziktir. pH=7.4 de % 61 oranında non-iyonize formda bulunur. (6)

2.2. Tiyopentalin Kimyasal Özellikleri

Tiyopental, tiyolaktim ve tiyolaktam dengesi içinde bulunur.



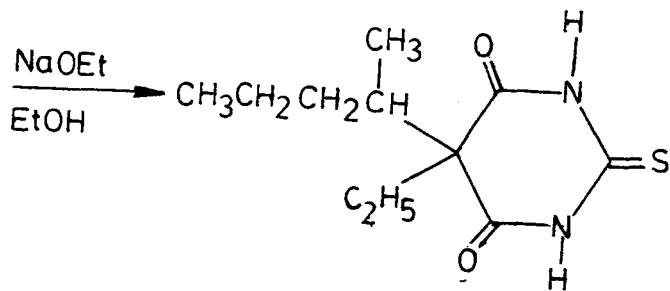
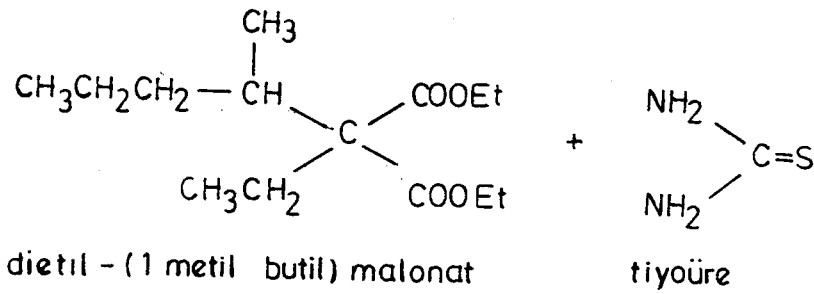
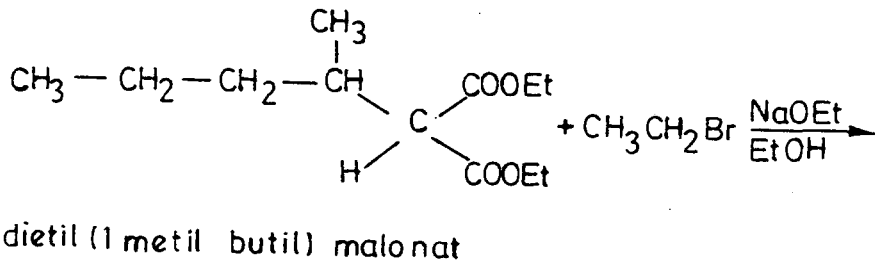
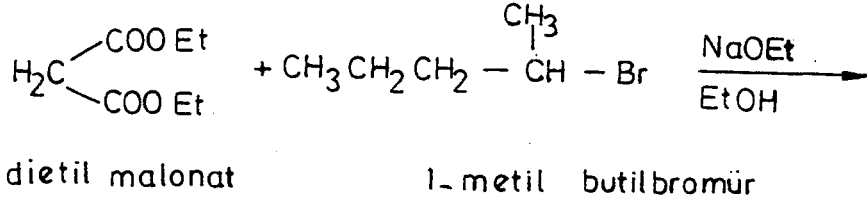
Madde asit ve nötr ortamda tiyolaktam, bazik ortamda tiyolaktim şeklindedir. Bu nedenle bazik ortamda kolaylıkla tuzlarını oluşturabilir. Kuvvetli bazik ortamda (pH=10) ağır metallere kompleks yapabilir.



Bu yüzden çalışmalar sırasında ortamda ağır metal tuzlarının bulunmamasına dikkat etmek gerekir. (19)

2.3. Tiyopentalin Elde Edilişi

Tiyobarbiturik asit ;



5 etil-5(1 metil butil) tiyobarbiturik asit

şeklinde elde edilmektedir. (6)

2.4. Tiyopentalin Farmakolojik Etkileri

Tiyopental yağ/su dağılım katsayısının yüksekliği nedeniyle kan-beyin engelini hızla geçer ve beyin-omurilik sıvısındaki ilaç dağılımı, plazmadaki bağlı olmayan ilaç dağılımına hemen hemen eşit olur.

Organizmaya verildiğinde santral sinir sisteminde giderek artan bir depresyon oluşturur. Ancak bu kısa sürelidir. Tiyopentalin analjezik özelliği yoktur. Hatta ağrı ve dokunma duyusuna aşırı bir duyarlılık ortaya çıkabilir. Kan basıncında düşmeye neden olur. 750 mg'ın üstündeki dozlarda karaciğerde işlev bozukluklarına yol açar. Kan şekeri üzerinde herhangi bir etkisi yoktur. Cilt damarlarını genişletir ve hipodermi yapabilir. Kalp debisini azaltıcı etkisi de belirtilmektedir. (6)

2.5. Tiyopentalin Biyolojik Materyallerden Ekstraksiyon Yöntemleri

Gruhl ve Mayer (10), serum ve standart serumlar üzerinde etil asetat ile ekstraksiyonunu çalışmışlardır. Serum içindeki tiyopentalin belirlenmesi amacıyla hasta serumlarındaki tiyopentalin izo-amil alkol, n-pentan, n-hekzan, n-heptan, benzen, n-butanol, izo-butanol, toluen, kloroform ve etil asetat gibi değişik organik çözücülerle ekstraksiyonlarda HCl ve NaCl ilavesi gereği duymuşlardır. En iyi ekstraksiyon işlemine başka herhangi bir kimyasal madde ilavesi olmaksızın etil asetat ile ulaşıldığı gözlenmiştir. Bu yöntemde tekrarlanabilirliğin $\% 100 \pm 0.7$ olduğu belirtilmiştir. Kan örneklerini etil asetat ile hızla çalkalayarak santrifüj etmişler ve ayrılan etil asetat fazını HPLC'de incelemişlerdir.

Anderson ve Fuller (1), diklorometan ile ekstraksiyonunu çalışmışlardır. Alınan kan örnekleri üzerine iç standart olarak probarbital ve fosfat tamponu (pH= 5.5) ekledikten sonra homojen olana kadar karıştırmışlardır. Ekstraksiyon işlemini takiben diklorometan fazını kuruluğa kadar buharlaştırdıktan sonra kalıntıyı asetonitrilde çözmüşlerdir.

Asetonitrilde çözünebilecek yağ materyalini ayırabilmek için de elde ettikleri bu çözeltiyi asetonitrille doyurulmuş n-hegzan ile yeniden ekstre etmişlerdir. n-hegzan fazını ayırdıktan sonra asetonitril fazını gaz kromatografisi yöntemi ile incelemişlerdir.

Beery (2), plazma ve idrar örneklerini kloroform ile önce iki kez çalkalayarak ekstre etmiştir. Kloroform fazlarını birleştirdikten sonra 0.5 N sodyum hidroksit ile ekstraksiyon işlemini yinelemiştir. Böylece organik faza geçen tiyopentali sodyum tuzu halinde geri kazanmıştır. Daha sonra bu sulu fazı hidroklorik asit ile asitlendirmiş ve kloroform ile iki kez daha ekstre etmiştir. Kloroform fazını kuruluğa kadar buharlaştırdıktan sonra kalıntıyı kloroformda çözerek gaz kromatografisinde incelemiştir.

Björkman ve Idvall (4), tiyopental ve metoheksital içeren kan ve plazma örneklerini toluenle ekstraksiyonunu incelemişlerdir. Bu amaçla metoheksital içeren kan örneklerine tiyopental, hidroklorik asit ve sodyum hidroksit ekleyerek standart çözeltiler serisi hazırlamışlardır. Her örneği ayrı ayrı toluenle ekstre ettikten sonra toluen fazlarını kuruluğa kadar buharlaştırmışlardır. Kalıntıları asetonitril ve disodyum hidrojen fosfat karışımında çözerek gaz kromatografisi yöntemiyle incelemişlerdir.

2.6. Yapılan Analitik Çalışmalar

Mairesse-Ducarmoise ve arkadaşları (12), tiyopental ve sodyum tiyopentalin damlayan civa elektrot kullanarak doğru akım, alternatif akım ve diferensiyel puls tekniklerini pH'a, derişime, yarı dalga potansiyeline ve civanın damlama süresine bağlı olarak incelemişlerdir. Bu değişkenleri sabit tutarak pik yüksekliklerinin derişime bağlı olarak doğrusallık gösterdiğini gözlemişlerdir. Yöntemin analitik yönden tiyopental miktar tayini için uygun bir yöntem olduğu vurgulanmıştır.

Sastry ve arkadaşları (14), tiyopentali diğer tiyöüre türevleri ile birlikte spektrofotometrik olarak incelemişler-

dir. Bu amaçla tiyoüre veya türevlerini bazik ortamda iyot çözeltisi ile yükseltgenmesi temeline dayanan bir yol izlenmişlerdir. Örneklerdeki tiyoüre veya türevlerini sodyum hidroksit çözeltilerinde belli miktarda iyot ilavesi ile yükseltmişlerdir. Reaksiyon sırasında tiyoüre türevi kendisine karşılık gelen üre türevine çevrilmiştir. Daha sonra iyodun aşırısını pH = 3 de spektrofotometrik olarak ölçmüşlerdir. Elde edilen kalibrasyon eğrisinden yararlanarak tiyoüre türevlerinin miktarlarını hesaplamışlardır. Oluşan renkli ürünün dayanıklı ve yöntemin duyarlı olduğunu, dolayısıyla ilaç örneklerindeki rutin analizler için uygun bir yöntem olduğunu vurgulamışlardır.

Björkman ve Idvall (4), metoheksital ve tiyopental içeren kan örneklerini toluenle ekstre ederek ekstraksiyon verimlerini incelemişlerdir. Ayrıca tiyopental ve metoheksitalin birlikte tayini için duyarlı bir HPLC yöntemi geliştirerek yöntemin farmakokinetiği için fizibilite çalışmasını vermişlerdir. $\mu\text{g/ml}$ derişim düzeyinde tiyopental verimi için plazmada $\% 91 \pm 1$ ve hemolize kanda $\% 82 \pm 2$ olarak bulunduğunu belirtmişlerdir.

Bazı tiyobarbiturik asit türevlerinin polaropuls ve katodik sıyırma voltametresi yöntemleri kullanılarak analizleri pH = 4-12 arasında Vanesorn ve arkadaşları (18) tarafından asılı civa elektrot ile incelenmiştir. 2-Tiyobarbituratların indirgenmesini doğru akım polarografisi yöntemi ile incelemeleri sırasında moleküldeki substitusyonun özelliğinin ve I_{lim} değerinin ortamın pH'ına büyük ölçüde bağlı olduğu sonucuna varmışlardır. pH = 8 de ise elektrot yüzeyinde yan ürünlerin olduğunu gözlemişlerdir. Anodik sıyırma voltametresi yöntemi ile yan ürünlerden biri olan civa sülfürü saptamışlardır.

Anderson ve Fuller (1), zayıf asit ve nötral karakterdeki ilaçların biyolojik materyalden ekstraksiyonla temizleme işleminde pH = 2-5.5 aralığındaki tampon sistemlerini denemişler, bütün ekstraksiyon işlemlerinde pH = 5.5 fosfat tampununun en uygun sulu faz olduğu sonucuna varmışlardır. Çünkü bu pH'da protein çökmesi veya emülsiyon oluşmamıştır.

Ekstraksiyon işleminde organik faz olarak diklorometan kullanmışlar, elde ettikleri ekstraktı hegzan ve asetonitril arasındaki dağılım özelliklerinden yararlanarak temizlenmesini sağlamışlar ve asetonitril fazını gaz kromatografisinde incelemişlerdir. İlaçların diğer kan maddelerinden etkilenmemesinin analizlerini yapabilmışlar ve alikonma indekslerinin kromatografik davranışın belirlenmesinde çok güvenilir bir parametre olduğunu saptamışlardır.

Billabert ve arkadaşları (3), tiyol grubu taşıyan veya tautomerik olarak kolaylıkla tiyole geçebilen tiyon yapısındaki maddelerin analizlerini civalı ve platin damlalı belirteci elektrot ve civa sülfatlı referans elektrot kullanarak potansiyometrik yöntemle yapmışlardır.

Yöntemin duyarlılığını diğer tiyol grubu taşımayan amino asitlerin etkilemediğini gözlemişlerdir. Uyguladıkları yöntemle elde ettikleri sonuçları diğer kimyasal tayin yöntemleriyle elde edilmiş olan sonuçlarla karşılaştırmalar yapmışlar ve uyum içinde olduklarını saptamışlardır.

Mairesse-Ducarmoise ve arkadaşları (13), tiyol gruplarını civa ile reaksiyon sonucunda açığa çıkan iki protonu kulometrik yöntemle tiyollerin miktar tayinlerini yapmışlardır. Çalışmaları sırasında disülfürlerin civa ile reaksiyona girmemesi nedeniyle tiyollerin reaksiyonlarını bozmadıklarını gözlemişlerdir. Bu özellikten yararlanarak tiyollerle disülfürler ayrılabilmişlerdir. Ayrıca disülfürlerin elektrolitik reaksiyonla tiyollere indirgenmesi ile disülfür miktarına da geçilebildiğini saptamışlardır.

Coşofret ve Bunaciu (7), ticari olarak bulunan katı membran Ag / S^{-2} - seçici elektrot ve kendilerinin geliştirdiği Ag -seçici elektrot sistemlerini kullanarak gümüş nitrat çözeltisiyle potansiyometrik titrasyon yöntemiyle tiyobarbituratların tayinlerini gerçekleştirmişlerdir. İşlemler sırasında oluşan tiyobarbiturat-gümüş kompleksinin yapısını elde edilen sonuçlar ve IR verilerinin desteğiyle aydınlatmışlardır. Analiz için optimum derişim ve diğer koşulları belirlemişlerdir.

Gruhl ve Mayer (10), serum içindeki tiyopentalin belirlenebilmesi için hassas bir HPLC yöntemi tanımlamışlardır. Bunun için tiyopentali öncelikle hasta serumlarından ekstre etmişlerdir. Ekstraksiyon için değişik solvanlar kullanmışlar ancak en iyi sonuca başka herhangi bir kimyasal madde ilavesi olmaksızın etil asetat ile ulaşıldığı sonucuna varmışlardır. Hasta serumlarından tiyopentali etil asetat ile ekstre edip ayırdıktan sonra elde ettikleri solvanı direkt olarak yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde incelemişlerdir. Uyguladıkları bu sistemde standart hatayı $\% \pm 0.7$ olarak belirlemişlerdir.

Beery (2), plazma ve idrardaki barbituratların gaz kromatografik analizlerini yapmıştır. Söz konusu biyolojik sıvılardan ilacın ekstraksiyonu sırasında bazı kan ürünlerinin de izole edildiğini ve bunların kromatografi kolonunu kısa sürede kullanılmaz duruma getirdiğini, aynı zamanda da analiz maddeleriyle girişim yaptıklarını gözlemiştir. Bu durumu önlemek üzere bazı ek geri ekstraksiyon işlemleri uygulamıştır.

Watson ve arkadaşları (17) tarafından, en sık kullanılan on barbiturat türevinin modifiye EMIT-Tox serum barbiturat tayin yöntemiyle incelemeleri yapılmış ve kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Hipertansiyon tedavisi gören hastalarda barbiturat kullanımı ve barbituratlarla zehirlenme olayları gibi durumlarda kan serumundaki barbiturat derişimini hızlı bir şekilde ve duyarlı olarak belirlenmesi sağlanmıştır.

Greenwood ve arkadaşları (9), karışık kullanılan bazı barbiturat türevlerinin analizini özel bir kolon üzerinde gaz kromatografisi yöntemiyle gerçekleştirdiler. İncelemelerde barbiturat türevinin sodyum tuzları kolona verildiğinde bu tuz formlarının kolonda ilerlemeleri güç olduğundan türevlerin serbest asit şekline geçirerek analizini hızlandırılması amacıyla taşıyıcı gaza formik asit ilave edilmiştir.

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Aletler

Bu deneylerde Tacussel Firmasının PRG-5, üç elektrotlu polarografik sistemi kullanılmıştır. Bu sistem bir potansiyostat ve çeşitli polarografik komut bölümlerinden oluşmaktadır.

Potansiyostat çalışma elektrodu ile referans elektrodu arasındaki gerilimi değişmez tutmaktadır. Genel olarak bir potansiyostat şeması Şekil 3.1'de verilmiştir. Burada V_2 referans potansiyelinin potansiyometre ile referans elektrot arasındaki herhangi bir potansiyel farkı yalnız çalışma ve karşı elektrot arasında R_s ve R_c kontrol dirençlerinden akan bir akımla meydana gelebilir. Eğer doğru akım güç kaynağının kutup işaretleri şekilde gösterildiği gibi ise güç amplifikatöründen gelecek herhangi bir akım çalışma elektrodunu referans elektroda göre pozitif yapacaktır. Yani çalışma elektrodu anodik olarak polarizlenecektir. Çalışma elektrodu ile referans elektrot arasındaki potansiyel farkı hücreden geçen akımla R_c den geçen akıma bağlıdır. R_c nin uçları arasındaki potansiyelle V_2 arasındaki farka V_e hata sinyali denir ve çalışma elektrodu ve preamplifikatörün girişi arasındaki potansiyel farkına eşittir. Bu hata sinyali preamplifikatörde amplifiye edilir. Çıkış sinyali güç amplifikatörüne verilir. Preamplifikatörün çıkış işareti öyledir ki çalışma elektrodu ile referans elektrot arasındaki potansiyel farkında meydana gelecek herhangi bir değişim güç amplifikatöründen çıkacak akımın azalmasına neden olur. Böylece, çalışma ve referans elektrot arasındaki gerilim değişmez tutulur. PRG-5 sisteminin blok şeması Şekil 3.2 de görülmektedir.

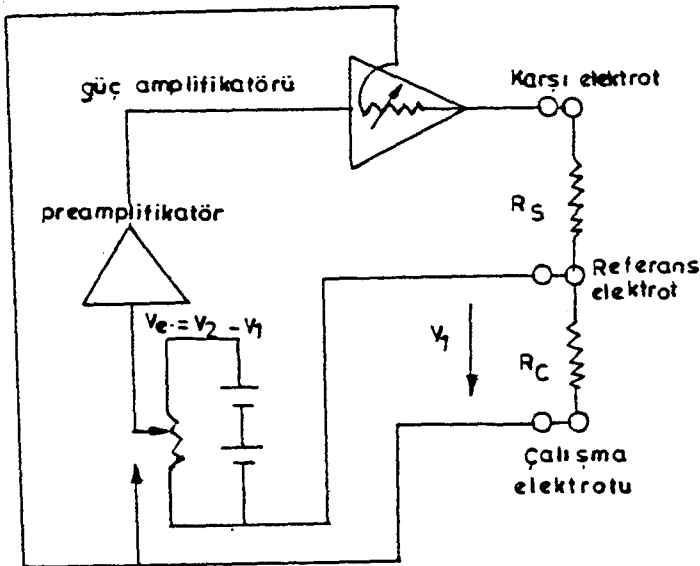
Kontrol birimi çeşitli bölümlerden oluşmakta ve aşağıdaki işlevleri yerine getirmektedir.

a. Başlangıç ve bitiş potansiyellerini ayarlayıp kaydedici üzerinde bulunan ve potansiyeli sürekli değiştirmeye yarayan bir potansiyometreye kumanda eden kontrol birimidir.

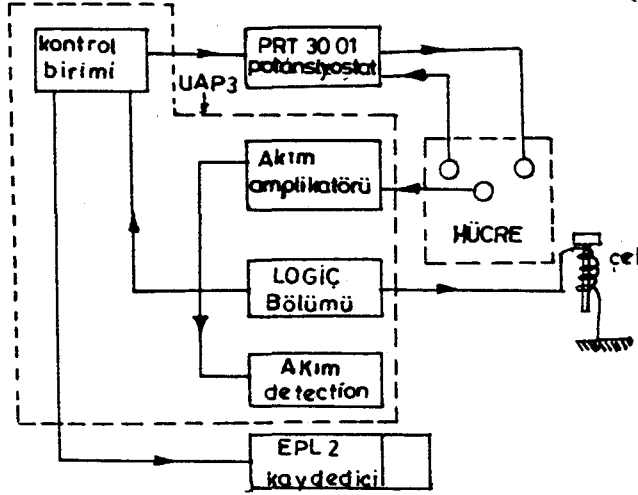
b. Kaydedilecek akımın istenilen duyarlıkta seçilmesini sağlayan bir akım amplifikatörü,

c. Polarografide damlama süresini, çekicinin vuruş şiddeti ve frekansını ayarlayan logic bölümü,

d. Yüksek duyarlık elde edilmesinde kullanılan akım dedection bölümlerinden oluşmaktadır.



Şekil 3.1 Potansiyostatın blok şeması



Şekil 3.2 PRG-5'in şeması

pH ölçümlerinde cam elektrotla bağlantılı P 114 Model Consort pH-metre kullanılmıştır.

Ayrıca analitik işlemlerde, gerekli aletlerden ve cam malzemelerden yararlanılmıştır.

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Standart tiyopental ve sodyum tiyopental preparat olarak bulunan şeklinden, saflaştırılarak elde edilmiştir. Bu işlemler aşağıdaki yol izlenerek yapılmıştır.

Enjeksiyonluk tiyopental-Na distile edilmiş suda çözülerek derişik hidroklorik asit ile tiyopental halinde çöktürülmüştür. Çökelti üç kez alkol-su karışımında kristallendirilmiştir. Tiyopental-Na enjeksiyonluk tiyopental-Na'un üç kez alkol-eter karışımında kristallendirilmesiyle elde edilmiştir.

Elde edilen tiyopental ve tiyopental-Na'un erime noktası tayin edilmiş, ayrıca miktar tayini potansiyometrik olarak yapılmış ve literatür değerleriyle uygunluğu saptanmıştır.

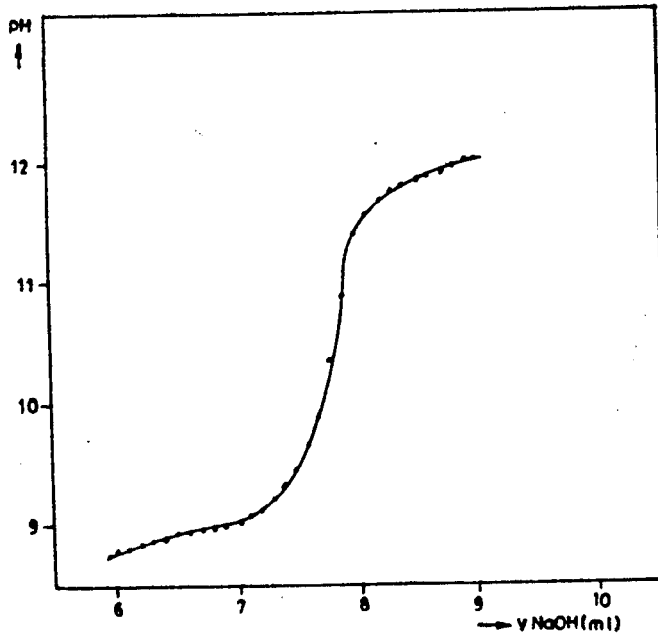
3.3. Potansiyometrik Yöntem Kullanılarak Standart Maddelerin Saflık Derecelerinin Belirlenmesi

3.3.1. Tiyopental

Tiyopental asit özellikte olması nedeniyle titrasyon sırasında sodyum hidroksit çözeltisi kullanılmıştır. Sodyum hidroksit çözeltisinin normalitesi potansiyometrik yöntem kullanılarak potasyum hidrojen ftalat ile ayarlanmıştır.

Çeşitli miktarlarda tartılan tiyopental 50 ml % 50 lik etanol içinde çözülmüş ve 0.0225 N sodyum hidroksit ile titre edilmiştir. Her bir hacim sodyum hidroksit ilavesinden sonra çözeltinin iyice karışması beklenilmiş ve daha sonra pH değerleri okunmuştur.

İlave edilen sodyum hidroksit çözeltisi hacmine karşı okunan pH değerleri grafiğe geçirildiğinde Şekil 3.3 deki titrasyon eğrisi elde edilmiştir.



Şekil 3.3 Tiyopental için tipik potansiyometrik titrasyon eğrisi

Bu titrasyon eğrisinden yararlanarak $(V_1 + V_2) / 2$ değerlerine karşı $\Delta \text{pH} / \Delta V$ değerleri yani I.türev, V hacim değerlerine karşı $\Delta^2 \text{pH} / \Delta V^2$ değerleri yani II.türev eğrileri çizilerek eşdeğerlik noktası duyarlıklı olarak belirlenmiştir. Bu eşdeğerlik noktası için harcanan sodyum hidroksit hacminden yararlanarak tiyopental miktar ve yüzdeleri hesaplanmıştır. Bu değerler Çizelge 3.1 de toplu olarak verilmiştir.

Çizelge 3.1 Tiyopental için potansiyometrik titrasyondan elde edilen sonuçlar

Tartılan Tiyopental (mg)	NaOH Hacmi (ml)	Hesaplanan Tiyopental (mg)	% Tiyopental
21.84	4.05	21.98	100.66
21.44	3.95	21.44	100.00
24.91	4.60	24.97	100.25
25.97	4.80	26.06	100.35
28.04	5.20	28.23	100.66
34.09	6.32	34.31	100.66
42.55	7.83	42.51	99.90

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi

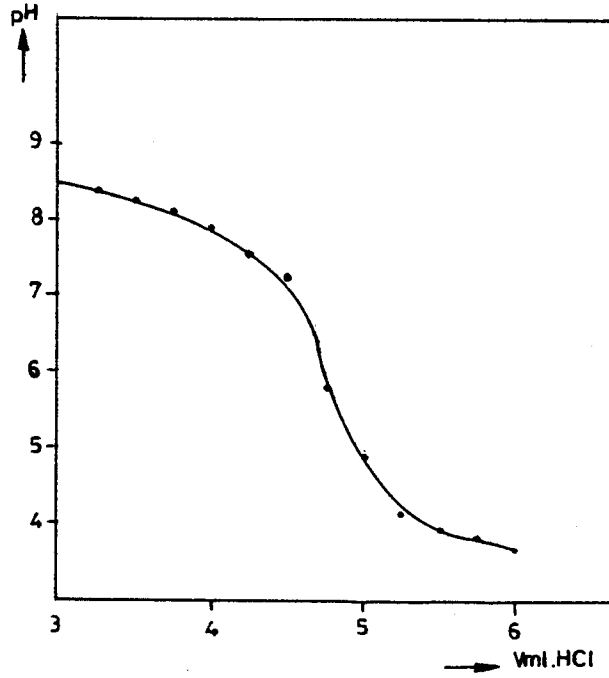
Ortalama yüzde saf madde miktarı : 100.35

Standart sapma : 0.3222

3.3.2. Tiyopental-Na

Tiyopental-Na bazik özellik gösteren bir maddedir. Bu nedenle titrasyon sırasında hidroklorik asit çözeltisi kullanılmıştır. Hidroklorik asit çözeltisi, normalitesi belli sodyum hidroksit çözeltisi ile potansiyometrik yöntem kullanılarak ayarlanmıştır.

Tiyopental-Na'un saflığını belirlemek için Bölüm 3.3.1 de anlatılan yol izlenmiştir. Bu yöntemle elde edilen titrasyon eğrisi Şekil 3.4 de, sonuçlar Çizelge 3.2 de verilmiştir.



Şekil 3.4 Tiyopental-Na için tipik potansiyometrik titrasyon eğrisi

Çizelge 3.2 Tiyopental-Na için potansiyometrik titrasyondan elde edilen sonuçlar

Tartılan Tiyopental (mg)	HCl Hacmi (ml)	Hesaplanan Tiyopental (mg)	% Tiyopental-Na
30.70	4.17	29.83	97.16
35.60	4.98	35.60	100.00
37.50	5.26	37.58	100.20
33.72	4.67	33.38	99.00
39.20	5.48	39.20	99.99
39.80	5.65	40.40	101.50
40.20	5.63	40.25	100.12

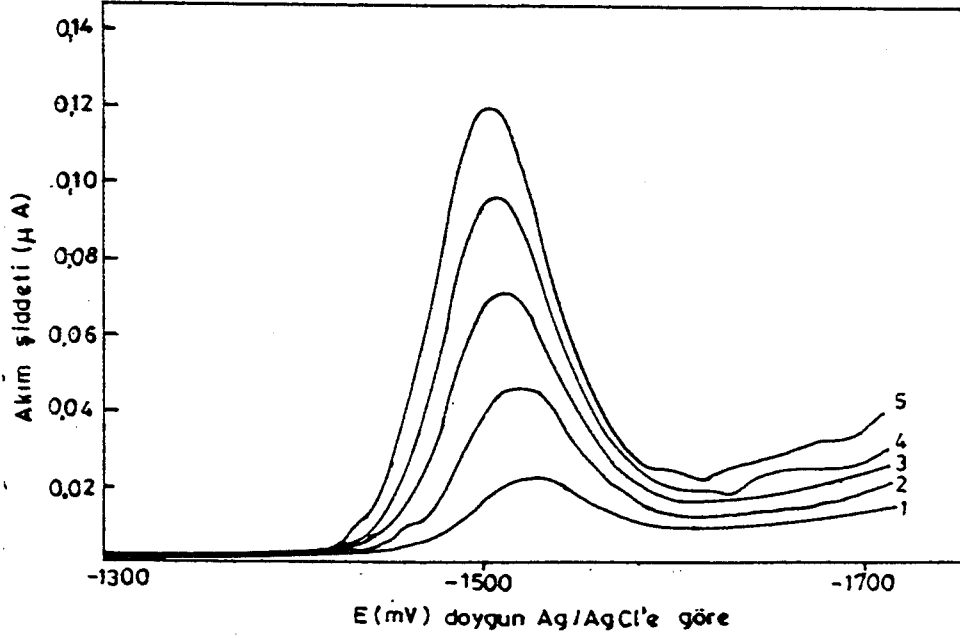
Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi
 Ortalama yüzde saf madde miktarı : 99.71
 Standart sapma : 1.241

3.4. Voltametrik Yöntem Kullanılarak Standart Eğrinin Elde Edilmesi

Tiyopentalin 9.118×10^{-4} M derişimdeki çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden balonjölere 1, 2, 3, 4, 5, ml aktarıldı. Herbirine 2 ml 1 M potasyum klorür çözeltisi ve boraks tamponu (pH = 9.21) ilave edilerek çözeltiler 10 mililitreye tamamlandı. Elde edilen bu çözeltiler iyice karıştırıldı. Çizelge 3.3 deki koşullarda herbirinin ayrı ayrı polarogramları alındı.

Çizelge 3.3 Polarografik koşullar

Uygulanan tarz	$\Delta I / \Delta t$
Başlangıç potansiyeli	-1300 mV
Potansiyel değişim hızı	4 mV / s
Kağıt hızı	10 s / cm
Duyarlık aralığı	500 nA
Damlama süresi	0.6 s
Uygulanan basınç	1 Bar
Damping	6



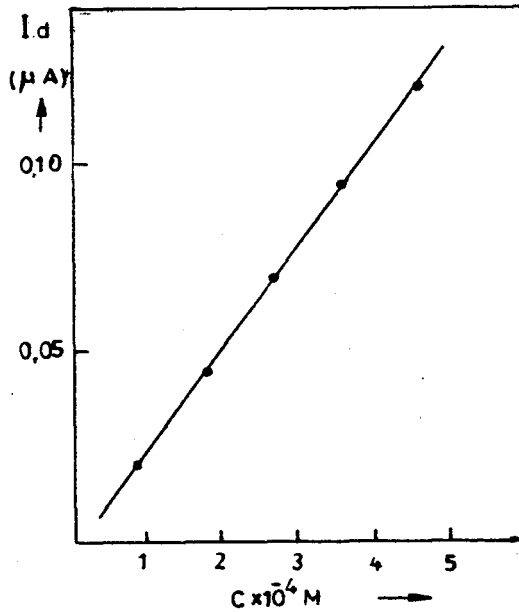
Şekil 3.5 Çeşitli derişimlerdeki tiyopental çözeltilerinin polarogramları.

Her bir derişime karşılık gelen I_p değerleri ölçüldü. Bu değerler Çizelge 3.4 de toplu olarak gösterilmiştir.

Çizelge 3.4 C-I_p , C-I_d ilişkilerini gösteren değerler

C (M)	I _p (mm)	I _d (μA)
0.912x10 ⁻⁴	11	0.022
1.824x10 ⁻⁴	23	0.046
2.735x10 ⁻⁴	35	0.070
3.647x10 ⁻⁴	48	0.096
4.559x10 ⁻⁴	60	0.120

Tablodaki derişim değerleri I_d' ye karşı grafiğe geçirildiğinde elde edilen kalibrasyon eğrisi Şekil 3.6 da gösterilmiştir.



Şekil 3.6 Tiyopentalin diferensiyel puls polarografik C-I_d ilişkili grafiği.

Şekil 3.6 daki grafikten yararlanarak yapılan regresyon analizi ve istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 3.5 de verilmiştir.

Çizelge 3.5 Tiyopentalin derişim-sınır akımı ilişkisinin istatistiksel değerlendirmesi

Simple - Y : I d (μA) X : Derişim (M)				
DF:	R-squared:	Std. Err.:	Coef. Var.:	
4	.999803	.00063	.889334	
Beta Coefficient Table				
Parameter:	Value:	Std. Err.:	Variance:	T-Value:
INTERCEPT	-.003008	.00066	4.362009E-7	-4.334675
SLOPE	269.825831	2.184017	4.76993	123.545663
Analysis of Variance Table				
Source	DF:	Sum Squares:	Mean Square:	F-test:
REGRESSION	1	.006052	.006052	15265.531357
RESIDUAL	3	.000001	3.364751E-7	p < .0001
TOTAL	4	.006053		
Residual Information Table				
SS[e(i)-e(i-1)]:	e ≥ 0:	e < 0:	D/W test:	
.000003	2	3	2.534538	

Bu verilerden yararlanılarak doğru denklemi :

$$I_d = 23.008 \times 10^{-3} + 269.82 C$$

olarak bulunmuştur. Bu denklemde I_d , μA cinsinden sınır akımını ; C, M cinsinden derişimi göstermektedir.

3.5. Voltametrik Yöntem Kullanılarak Dağılma Katsayısının Belirlenmesi

Tiyopentalin 9.41×10^{-4} M derişimdeki çözeltisinden bir mililitre alındı. Üzerine bir mililitre derişik hidroklorik asit ilave edildi. Hacim distile su ile beş mililitreye tamamlandı. Kloroform ile bir kez ekstraksiyon yapıldı. Kloroform fazı kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Kalıntı 8 ml boraks tamponunda (pH = 9.24) çözüldü. 2 ml, 1 M potasyum klorür çözeltisi ilave edilip Çizelge 3.3'de belirtilen koşullarda polarogramı alındı.

Aynı koşullarda yapılan birkaç deney sonucu elde edilen polarogramlardaki diferensiyel sınır akımları ortalaması alınarak dağılma katsayısı Eşitlik-1 yardımıyla hesaplandı.

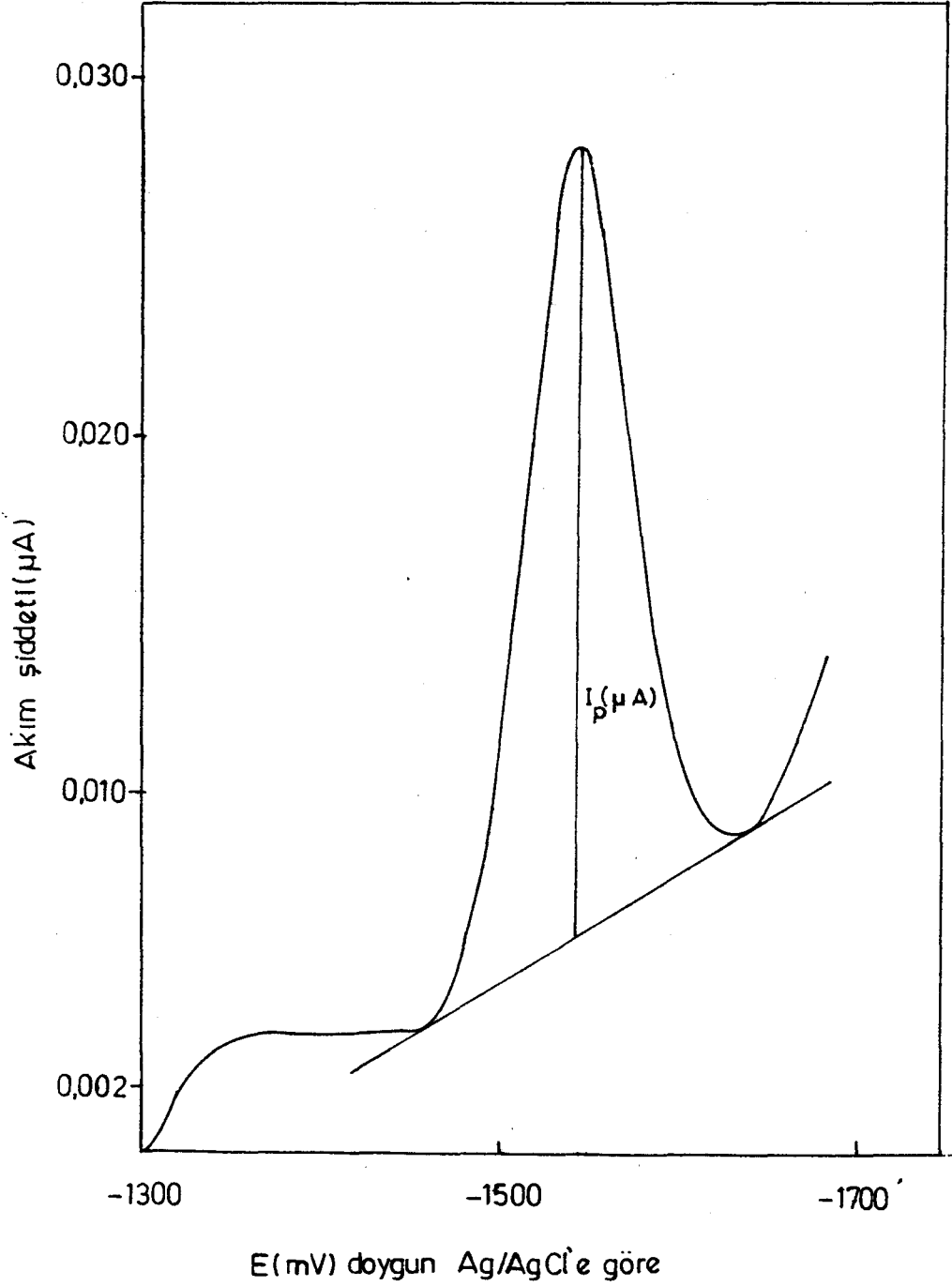
$$W_n = W_0 \left(\frac{KV}{KV + S} \right)^n \dots \dots \dots \text{Eşitlik-1}$$

Bu eşitlikte ; W_n : Sulu fazda kalan madde miktarı...(g)
 W_0 : Başlangıçtaki madde miktarı.....(g)
 V : Sulu fazın hacmi.....(ml)
 S : Organik çözücü hacmi.....(ml)
 K : Dağılma katsayısı
 n : Çalkalama sayısı' nı göstermektedir.

Yapılan hesaplamalar sonucunda dağılma katsayısı kloroform için 0.45 olarak bulunmuştur.

3.6. Voltametrik Yöntem Kullanılarak İnsan Kanında Tiyopental Miktar Tayini

Anestezi sırasında tiyopental enjekte edilen hastadan bir dakika içerisinde kan alındı. 0.1 N sodyum hidroksit çözeltisinden 1-2 damla ilave edilerek kanın pH' sı yükseltildi. Bir saat bekledikten sonra santrifüj edilerek serum ayrıldı. Bir mililitre serum alındı, üzerine bir mililitre derişik hidroklorik asit ilave edildi. Hacim distile su ile beş mililitreye tamamlandı. Her çalkalama sırasında beş mililitre kloroform kullanılarak üç kez ekstraksiyon yapıldı. Kloroform fazları birleştirildi ve düşük sıcaklıklarda kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Kalıntı 8 ml boraks tamponu (pH=9.24) içerisinde çözüldü. 2 ml potasyum klorür ilave edildi ve Çizelge 3.3'de belirtilen koşullarda polarogramları alındı (Şekil 3.7). Sonuçlar Çizelge 3.6' da toplu olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.7 İnsan kanlarından ekstraksiyon sonucunda elde edilen tiyopentalin polarogramı

Çizelge 3.6 Aneztezi edilen hasta kanlarından elde edilen polarografi sonuçları

I_p (mm)	I_d (μA)	C (M)	C_g (M)	C (g/l)	C(g/5 l)	C(mg/5 l)	VD(mg)
32	0.0064	3.48×10^{-5}	7.76×10^{-5}	0.01872	0.0936	93.6	175
52	0.0104	4.96×10^{-5}	11.02×10^{-5}	0.02659	0.1330	133.0	250
65	0.0130	5.93×10^{-5}	13.17×10^{-5}	0.03178	0.1589	158.9	300
73	0.0146	6.52×10^{-5}	14.49×10^{-5}	0.03496	0.1748	174.8	325
81	0.0162	7.11×10^{-5}	15.80×10^{-5}	0.03812	0.1906	190.6	350
97	0.0194	8.30×10^{-5}	18.44×10^{-5}	0.04449	0.2225	222.5	400
111	0.0222	9.26×10^{-5}	20.58×10^{-5}	0.04966	0.2483	248.3	450
114	0.0228	9.56×10^{-5}	21.24×10^{-5}	0.05125	0.2563	256.3	475
125	0.0250	1.04×10^{-4}	23.11×10^{-5}	0.05576	0.2788	278.8	500

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, anesteziye edilmiş hastalardan elde edilen kan örneklerindeki tiyopentalin miktar tayininin yapılması amaçlanmıştır. Bu düşünceden hareketle öncelikle tiyopentalin ticari preparatlarındaki etken madde miktarının bulunması için rutin olarak çalışılacak yöntemler araştırıldı. Tiyopental-Na'un ticari preparattaki madde miktarını bulmak üzere yapılan potansiyometrik titrasyon işlemlerinde sonucun % 112-116 arasında değiştiği gözlemlendi. Bu sonucun ticari preparattaki etken maddenin stabilitesini sağlamak üzere, preparatlara etken madde ağırlığının % 6 sı kadar Na_2CO_3 ilavesiyle ortaya çıktığı literatür değerleri yardımıyla saptandı.(6) Bu nedenle hem tiyopentalin hem de tiyopental-Na'un saf madde olarak elde edilmesi gerekmiştir. Saflaştırılarak elde edilen maddeler kullanılarak yapılan potansiyometrik titrasyonlar sonucunda tatmin edici sonuçlar elde edilmiştir.

Gerçekte ilaç kana verildiğinde, kan pH'sı ortamında tiyopental-Na, asidik formunu yeniden kazanmaktadır. Bu nedenle tiyopental-Na miktarının bulunmasına gerek kalmamaktadır. Tiyopental-Na genellikle intravenöz yoldan kullanılmaktadır ve örnek olarak alınan biyolojik materyal yine kan olmaktadır. Etken maddenin biyolojik materyaldeki miktar tayininin yapılabilmesi için kandan izolasyonu gerekmiştir. Bu da ekstraksiyon yöntemleriyle mümkün olmuştur. Ekstraksiyonla bir sıvıdan tüm maddenin çekilmesi mümkün olmadığı için ekstraksiyon veriminin saptanması gerekmiştir. Literatür verilerinden de yararlanarak kan serumunun kloroformla ekstre edilmesi uygun görülmüştür. 0.45 olarak bulunan ekstraksiyon sabiti daha sonraki işlemlerde kandaki gerçek tiyopental miktarlarının bulunmasında kullanılmıştır.

Literatürde, tiyopentalin kan örneklerinden miktar tayininin yapılmasında kromatografik (1, 2, 4, 9, 10) ve spektrofotometrik (14) yöntemler kullanılmıştır. Bu işlemlerde maddenin kandan izolasyonu için bir çok ekstraksiyon ve

temizleme işlemlerine gerek duyulmuştur. Bu çalışmada geliştirilen polarografik yöntemde kan serumunun kloroformla bir kez ekstraksiyonu yeterli bulunmuştur. Böylece rutin analizler için uygulanabilen bir yöntem elde edilmiştir. Ekstraksiyon sırasında tiyopentalle birlikte ekstre edilebilen kan maddeleri kolaylıkla ayrılabilir. Her maddenin sınır akımının farklı olması nedeniyle de diğer kan maddelerinin girişim yapmaları önlenmiş olmaktadır.

Hasta serumlarında elde edilen madde miktarlarını hesaplamak üzere standart doğru elde edildi. Bunun için belli derişimlerde standart çözeltiler serisi hazırlandı. Ekstraksiyon işlemleri yapılarak her bir derişim için polarografik sınır akımları tayin edildi. Bu değerler kullanılarak standart doğru denklemi elde edildi.

Hasta serumlarından elde edilen örneklerdeki madde miktarına geçmek için standart doğru denklemi ve ekstraksiyon sabiti kullanıldı. Bulunan sonuçlar Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Kan numunesi ilacın verilmişinden itibaren 5, 10, 15, 30 dakika sonra alınarak incelenmiş ve tiyopentale rastlanmamıştır. Bu da tiyopentalin yağ/su dağılım katsayısının yüksek olması nedeniyle verilmişinden hemen sonra yağlı dokulara geçmesinden ileri gelmektedir.

Kan numunesi alma zamanı bu özellikten dolayı ilacın verilmişinden 30 sn sonra olarak saptanmıştır. Bu seçimle elde edilen sonuçlar tekrarlanabilir özelliktedir ve verilen dozun ortalama % 54.47 'si olarak bulunmuştur. Bu tutarlı sonuçlarla rutin deneylerde kullanılabilir sonuçlar elde edilmiştir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Anderson, W. H. and Fuller, D. C. : A simplified procedure for the isolation, characterization and identification of weak acid and neutral drugs from whole blood. *Journal of Analytical Toxicology*, 11 : pp. 198-204, 1987
2. Beery, D. J. : Gas chromatographic analysis of the commonly prescribed barbiturates at therapeutic and overdose levels plasma and urine. *Journal of Chromatography*, 86 : pp. 89-105, 1973
3. Billabert, A., Callanquin, M. and Hamon, M. : Dosage potentiometrique de quelques derives soufres par les sels mercuriques. *Analisis*, 3(5) : pp. 258-262, 1975
4. Björkman, S. and Idvall, J. : A high-performance liquid chromatographic method for methohexital and thio-pental in plasma or whole blood. *Journal of Chromatography*, 307 : pp. 481-487, 1984
5. British Pharmacopoeia 1980, Volume I-II, London Her Majesty's Stationary Office : pp. 453-673, 1980
6. Churchill-Davidson, H. C. : A Practice of Anaesthesia Hald-Luke LTD. London, fifth edition : pp. 1292-1294, 1984
7. Coşofret, V.V. and Bunaciu, A. A. : Determination of some thiobarbiturates with ion-selective membrane electrodes. *Analytical Letters*, 12(6) : pp. 617-628, 1979
8. Erdik, E., Obalı, M., Yüksekışık, N., Öktemer, A., Pekel, T., İhsanoğlu, E. ve Özgüner, S. : Denel Organik Kimya. Ankara Üniv. Organik Kimya Araştırma Enstitüsü, No. 1 : s. 74-77, 1978
9. Greenwood, N. D., Guppy, I. W. and Simmons, H. P. : The direct gas chromatographic analysis of barbiturates as their sodium salts. *Journal of Chromatographic Science*, 13 : pp. 349-354, 1975
10. Gruhl, V. H. and Mayer, H. : Einfache und rasche bestimmung von thiopental im serum mit HPLC. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 22 : pp. 385-388, 1984
11. Kayaalp, S. O. : Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. II : s. 1292-1294, Ankara, 1982

12. Mairesse-Ducarmois, C. A., Patriarche, G. J. and Vandenbalck, J. L. : Contribution a l'electrochimie des thiols et disulfures. *Analytica Chimica Acta*, 79 : pp. 69-78, 1975
13. Mairesse-Ducarmois, C. A., Vandenbalck, J. L. and Patriarche, G. J. : Determination coulometrique de thiols et disulfures a l'aide du mercure (II) electrogenere. *J. Pharm. Belg.* 28 : pp. 300-306, 1973
14. Sastry, C. S. P., Satyanarayana, P. and Tummuru, M. K. : Indirect spectrophotometric determination of thiourea and its derivatives with metol and sulphanilamide. *Indian Journal of Chemistry*, 24 A : pp. 258-259, 1985
15. Türk Farmakopesi. T.C. Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı Yayınları. 435 : Milli Eğitim Basımevi, İstanbul, 1974
16. USP Pharmacopoeia National Formulary, USP XX, United States Pharmacopeial Convention, Inc. : pp. 794-795, 1980
17. Watson, A. T., Manno, J. E. and Manno, B. R. : Quantitation of barbiturates by a modification of the EMIT-tox serum barbiturate assay. *Journal of Analytical Toxicology*, 7 : pp. 257-261, 1983
18. Vaneesorn, Y., Smyth, W. F. : The determination of some 2-thiobarbiturates by cathodic stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta*, 117 : pp. 183-191, 1980
19. Vido, J. A. : *Burgers Medicinal Chemistry Part III*, 4th Edition by M. E. Walff : p. 795, John Wiley