

Türkiyede Satılan İlaçlardaki Antranilik Asit ve Sübstitüe Aril Asetik Asit Türevi Antiromatizmal Bileşikler Üzerinde Araştırmalar. I. Renk Reaksiyonları, İnce Tabaka Kromatografileri, R_M Değerleri ve LD_{50} ile R_M Değerleri Arasındaki İlişkiler.

Studies on the Anthranilic Acid and Substituted Aryl Acetic Acid Derived Antirheumatoid Compounds Used in the Drugs Marketed in Turkey. I. Color Reactions, Thin Layer Chromatography, R_M Values and Relations Between R_M Values and LD_{50} 's.

Ningur NOYANALPAN*

Okan ATAY**

Seçkin ÖZDEN*

Bazı antranilik asit türevleri ile (1), bazı sübstitüe aril asetik asit türevleri (7) antiromatizmal etkilidir. Türkiyede satılan antiromatizmal ilaçların önemli bir kısmını bu grup bileşikler oluşturmaktadır. Satışa sunulan ilaçların içinde antranilik asit türevi olarak **Mefenamic Acid**, **Flufenamic Acid** başta gelmektedir. **Niflumic Acid** yapı olarak antranilik asit türevlerine benzeyen fakat benzen çekirdeği yerine piridin halkası içeren izomeridir. **Sodium Diclofenac**'da antranilik asit türevlerine yakınlık gösterir, ancak karboksil grubu ile benzen halkası arasına bir metilen grubu girmiştir. Bu grubun girişi nedeni ile asetik asit türevi olarak düşünülür. **Ibuprofen**, **Ketoprofen**, **Aclofenac**, **Fenoprofen**, **Naproxen**, **Fenopropen Calcium**, **Methiazinic Acid** ve **Sodim Diclofenac** sübstitüe aril asetik asit türevi olarak sınıflandırılır. Bu bileşiklerin çoğunda hem aromatik kısım hem de asitin 2 nolu konumu sübstitüe edilmiştir.

Bu grup bileşikler diğer antiromatizmal bileşikler ile düşünülerek bir çok analitik yöntem denenmiştir. Nitel olarak kromatogra-

Redaksiyona verildiği tarih: 12 Nisan 1978.

* Farmasötik Kimya Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi.

** İlaç Kontrol Şb., Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü, Ankara.

fik çalışmalar, (3-6,8,11) nicel olarak da bazı titrimetrik yöntemler denenmiştir¹¹. Adı geçen bileşiklerin tümünün asit olmasından yararlanarak alkali ile titrimetrik saptamalar yapılmıştır. Nitel yönden iyi ayrılmayan türevler diazometan ile metillenerek ayrılmaları sağlanmıştır.

Bu ilaçlardan çoğunun absorpsiyonu, distribüsyonu, metabolizasyonu ve ekskresyonu üzerine çalışmalar yapılmıştır. (9,10) Ancak yukarıda adı edilen bileşikler literatürde sistematik olarak ele alınmamış yalnız bu grubun analizi üzerinde durulmamıştır. Ayrıca bu bileşiklerin R_M , P , σ ve bunlara bağlı değerleri üzerinde yapılan çalışmalar yeterli değildir. Bu nedenle yukarıda adları sayılan bütün bileşiklerin renk reaksiyonları, ince tabaka kromatografileri, R_f değerleri incelenmiştir. Daha sonra tüm bileşiklerin R_M değerleri verilmiştir. Bu bileşiklerin $\log P$ leri üzerinde yapılan çalışmalar bazı ilginç sonuçlar göstermiştir. Bu nedenle $\log P$ leri ve diğer fiziko kimyasal parametreleri ile ilgili çalışmalar ileride yayınlanacaktır.

Kromatografik çalışmalardan sonra çoğunun R_M değerleri ile LD_{50} leri korrele edilmiştir. Bu amaçla grafikler hazırlanıp biyolojik etki-leşim yönünden birbirlerine yakınlıkları bulunanlar gösterilmiştir.

DENEL KISIM

MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışmada kullanılan bileşiklerin tümü önce ilaç ilkel bileşiği olarak arı şekilde ele alınmış, tüm renk reaksiyonları bu arı bileşiklerle incelenmiştir. Daha sonra kromatografik çalışmalar için yine arı bileşikler kullanılmıştır. Kromatografik denemeler bir kez de piyasada satılmakta olan ilaçlarla denenmiştir. Arı bileşiklerle preparat arasında separasyon ve R_f değerleri yönünden herhangi bir ayrıcalık bulunmamıştır.

Çalışmamızda kullanılan kimyasal bileşiklerin tümü analitik nitelikte arıdır. Adsorban olarak Kieselgel HF₂₅₄ kullanılmıştır. Tabaka kalınlığı 0.3 mm dir. Aktivasyon 110°C da 30 dakika süre ile yapılmıştır.

Her bileşikten 25 mg, 10 ml metanol içinde çözülmüş ve plak üzerine bu çözeltiden 0.01 ml konularak çalışılmıştır. Lekeler önce ultra viyole ışığı altında incelenmiş daha sonra aşağıda listesi verilen belirteçler uygulanmıştır.

Bu çalışmada kullanılan renk belirteçleri aşağıda gösterilmektedir. Tablo 1 de, aşağıda taşıdıkları sayılar ile gösterilmiştir.

1. Dragendorff Belirteci.

1.7 g bazik bizmut nitrat ve 20 g tartarik asitin 80 ml sudaki çözeltisi ile 16 g potasyum iyodürün 40 ml sudaki çözeltisinden eşit niceliklerde karıştırılıp 5 ml sini 50 ml % 20 tartarik asitli suda çözerek hazırlanan belirteçdir.

2. İyod/ Kloroform Belirteci.

Kloroform içinde % 0.5 lik iyod çözeltisidir.

3. Demir (III) Klorür Belirteci.

0.5 N HCl içinde 6 mol sulu demir (III) klorürün % 2.5 luk çözeltisidir.

4. Sodyum Diklorofenol-İndofenol'ün etanol içindeki 0.1 lik çözeltisidir.

5. Hidrojen peroksit Belirteci.

Hidrojen peroksitin % 0.3 lük sulu çözeltisidir.

6. p-Fenilendiamin HCl Belirteci.

p-Fenilendiamin HCl'in % 10 triklorasetik asitteki % 0.05 lik çözeltisidir.

7. Formaldehid - Sülfürik Asit Belirteci.

1 ml % 37 lik formaldehid'in 50 ml konsantre sülfürik asit içindeki çözeltisidir.

8. Dimetilaminobenzaldehid HCl Belirteci.

1 g p-Dimetilaminobenzaldehid'in 25 ml % 36 HCl de çözülerek metanolla 100 ml ye tamamlanmış çözeltisidir.

Yukarıda verilen belirteçlerden başka denenen fakat iyi sonuç alınamayan belirteçler şunlardır:

9. 5 mol sulu bakır sülfat'ın % 10 luk sulu çözeltisinin amonyakla 5/1 oranında karıştırılıp süzülmesinden elde edilen süzüntü.

10. Glukoz - Anilin Belirteci.

10 ml % 10 luk glukoz çözeltisi ile 10 ml Anilin'in etanollü çözeltisinin karıştırılıp n-Butanol ile 50 ml'ye tamamlanmasıyla elde edilen çözelti.

Bu çalışmada denenmiş bulunan solvan sistemlerinden bazıları başarılı olmamıştır. Başarılı ayırmalar sağlayan solvan sistemleri aşağıda gösterilmiştir. Bunlardan ilk dördü, R_M değerlerinin LD_{50} değerleri ile korrelasyonunu yapabilmek amacı ile en az polardan en çok polara doğru giden bir düzen içinde aynı solvan sisteminin değişimiyle hazırlanmıştır. Beşinci solvan sistemi bu amacın dışında yalnız iyi bir ayırım elde etmek için uygulanmıştır.

Sistem- I . Benzen: Aseton: Metanol (55:20:10)

Sistem- II . Benzen: Aseton: Metanol (55:35:10)

Sistem- III . Benzen: Aseton: Metanol (55:35:20)

Sistem- IV . Benzen: Aseton: Metanol (45:25:30)

Sistem- V . Toluen: Aseton: kons. Amonyak (50:50:1)

BULGULAR

Bu çalışmada denenmiş bulunan belirteçler, solvanlar Materyal ve Yöntem'de liste şeklinde verilmiştir. Bu belirteçler ile incelenmekte olan bileşiklerin verdikleri renkler ve floresans Tablo I de gösterilmektedir.

Literatürde denenmiş bulunan kromatografi solvanları (1,3-6,9) genellikle asidik ya da alkalidir. Daha sonra R_M değerleri hesaplanıp bunların LD_{50} liler ile korrelasyonu yapılacağı için nötral solvanlarla çalışmak tercih edilmiştir. Ayrıca literatürde verilen solvan sistemleri ile bu grup bileşiklerin iyi ayrılmadığı saptanmıştır. Bunun üzerine yapılan çalışmalar, Materyel ve Yöntem'de liste şeklinde verilen solvanların bulunmasını sağlamıştır. Bu solvan sistemleri ile tüm bileşikler birbirlerinden iyi bir şekilde ayrılmaktadır. Her bir solvan sistemi için bileşiklerin ayrı ayrı R_f ve R_M değerleri Tablo II de verilmektedir.

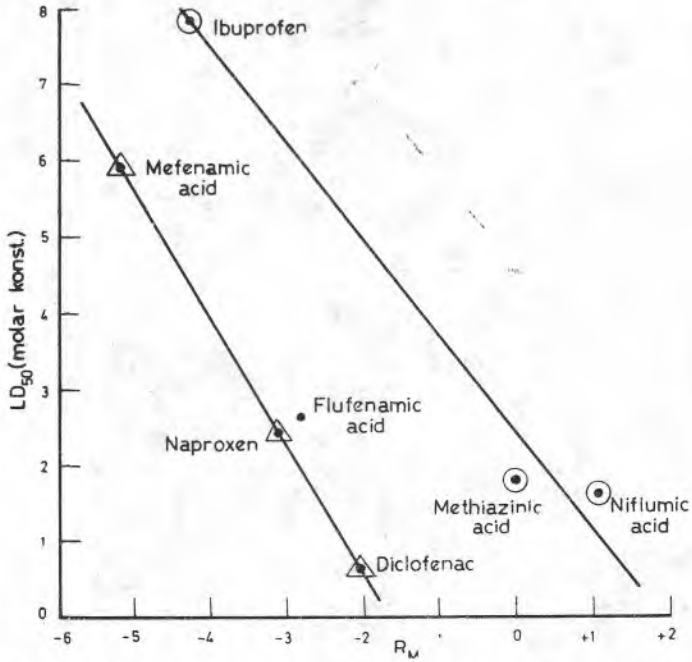
R_M değerleri ile LD_{50} değerleri arasında yapılan korrelasyon çalışmaları Grafik I ve Grafik II de gösterilmektedir. Bu grafik çalışmalarına göre, **Ibuprofen**, **Methiazinic Acid**, **Niflumic Acid** arasında ve **Mefenamic Acid**, **Naproxen**, **Diclofenac** arasında biyolojik etkileşim yönünden bir benzerlik bulunabilir.

Tablo 1. Antranilik asit ve sübtitüe aril asit türevi antiromatizmal bileşikler için kullanılan renk belirteçleri ile alınan reaksiyonlar.

Belirteçler	Mefenamic Acid	Flufenamic Acid	Niflumic Acid	Ibuprofen	Ketoprofen	Aclofenac	Diclofenac	Naproxen	Fenopropen Calcium	Methiazinic Acid
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Pembe
2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Sarı-Pembe
3 110° C da 15 dakika ısı	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Pembe
	Yeşil	Yeşil Kahverengi	— —	— —	— —	— —	Koyu Kırmızı Kahverengi	— —	— —	Pembe-Kırmızı
4 % 12.5 HCl püs- kürtülüp 110°C da 15 dakika ısı	Pembe	Pembe	Pembe	Pembe	Açık Pembe	—	Mor	Açık Pembe	—	Pembe
	Açık Mor	Açık Mor	Açık Mor	Açık Mor	Açık Mor	Açık Mor	Açık Mor	Açık Mor	Açık Mor	Koyu Pembe
5 366 nm UV altın- da.	Zayıf Floresans	Güçlü Floresans	—	—	—	—	—	—	—	—
6 366 nm UV altın- da.	Zayıf Floresans	Güçlü Floresans	—	—	—	—	—	—	—	Koyu pembe
7 110°C da 15 dak. ısı	—	—	—	—	—	—	Açık Mor	—	—	Pembe
	Açık Gri	Açık Gri	—	—	—	—	Açık Mor	Açık Kahverengi	Açık Mor	Koyu Pembe
8 110°C da 15 dak. ısı.	—	—	—	—	—	—	Açık Mor	—	—	Pembe
	Gri	Açık Gri	—	—	—	—	Mor	—	—	—

Tablo 11. Antranilik asit ve süstitüe aril asetik asit türevlerinin R_f ve R_M değeri.

Bileşimin adı	Sistem I.		Sistem II.		Sistem III.		Sistem IV.		Sistem V.	
	R _f	R _M	R _f	R _M	R _f	R _M	R _f	R _M	R _f	R _M
Methiazinic Acid	0.425	(0.131)	0.717	-(0.403)	0.768	-(0.519)	0.581	-(0.756)	0.360	(0.244)
Flufenamic Acid	0.475	(0.043)	0.582	-(0.143)	0.662	-(0.212)	0.787	-(0.567)	0.212	(0.560)
Niflumic Acid	0.450	(0.087)	0.355	(0.251)	0.433	(0.116)	0.729	-(0.439)	0.133	(0.814)
Ibuprofen	0.437	(0.109)	0.711	-(0.390)	0.737	-(0.447)	0.367	-(0.515)	0.424	(0.132)
Ketoprofen	0.400	(0.176)	0.582	-(0.143)	0.593	-(0.163)	0.619	-(0.208)	0.248	(0.481)
Aclofenac	0.293	(0.382)	0.582	-(0.143)	0.525	-(0.043)	0.612	-(0.197)	0.242	(0.495)
Diclofenac Na	0.525	-(0.043)	0.596	-(0.168)	0.618	-(0.209)	0.722	-(0.414)	0.206	(0.585)
Naproxen	0.306	(0.355)	0.656	-(0.280)	0.668	-(0.303)	0.696	-(0.369)	0.309	(0.347)
Fenoprofen Ca	0.393	(0.189)	0.718	-(0.405)	0.756	-(0.492)	0.787	-(0.567)	0.315	(0.337)
Methiazinic Acid	0.156	(0.733)	0.521	-(0.036)	0.462	(0.065)	0.406	(0.165)	0.170	(0.688)



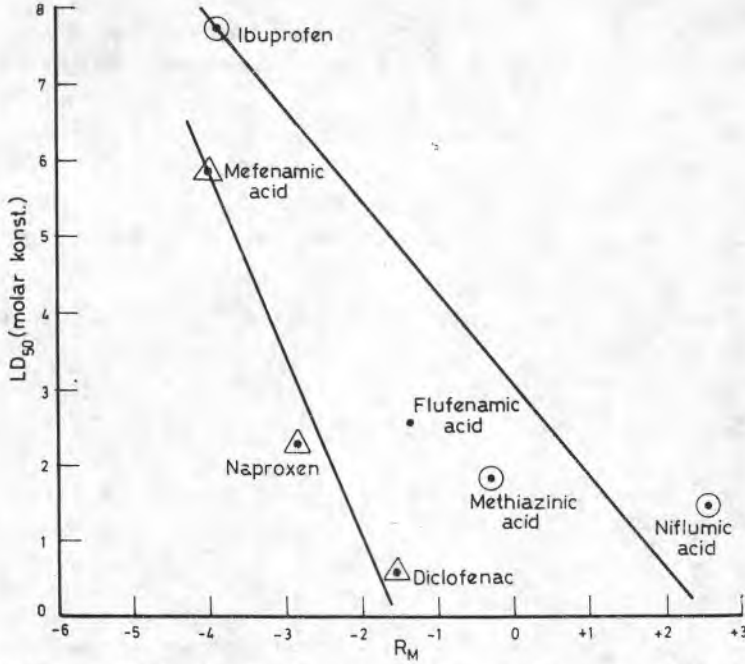
Grafik 1. Sistem II ile elde edilen kromatografik R_M değerleri ve LD_{50} (Molar konsantrasyon) arasındaki ilişkiler.

SONUÇ ve TARTIŞMA

Antranilik asit ve süstitüe aril asetik asit türevleri için yapılmış bulunan kromatografik çalışmalar yeterli değildir. Bu nedenle adı geçen türevler bu çalışmada sistematik olarak incelenmiştir. Ayrıca bu türevlerin renk reaksiyonları ve R_M değerleri incelenmiştir. Literatürün verdiği ince tabaka kromatografisi solvanları eldeki seri bileşikler için iyi sonuç vermemiştir. Bu nedenle yeni solvan sistemleri geliştirilmiş ve bu solvan sisteminin oranları değiştirilerek daha sağlıklı R_M değerlerinin bulunmasına çalışılmıştır.

Bu bileşiklerden bir kısmının in vivo ortamdaki absorpsiyonu, distribüsyonu, metabolizasyonu ve eliminasyonu araştırılmıştır.^{7,8} Fakat bu bulgular in vitro deneyler ile karşılaştırılmamıştır.

Tablo II deki solvan sistemleri soldan sağa doğru polariteleri yükselen bir sırada dizilmiştir. En solda Sistem I yer almaktadır. Son-



Grafik II. Sistem III ile elde edilen kromatografik R_M değerleri ve LD_{50} (Molar konsantrasyon) arasındaki ilişkiler.

ra sırası ile diğerleri gelmektedir. Sistem V'e kadar R_f değerlerinin ve buna bağlı olarak da R_M değerlerinin düzgün bir biçimde değiştiği görülmektedir. Ancak Sistem V içeriği nedeniyle korrelasyonun dışındadır.

İlaçların R_M değerleri ile biyolojik etkinliklerini gösteren parametreler arasında korrelasyon kurmak mümkündür. Bunlar arasında en çok kullanılanlardan birisi de LD_{50} dir (2). Bu çalışmamızda antiromatizmal bileşiklerin R_M değerleri ile LD_{50} leri arasındaki korrelasyon incelenmiştir. Bu amaçla her bileşiğin R_M 'si apsise, LD_{50} lerin molekül ağırlığına bölünmesiyle elde edilen LD_{50} (Molar konsantrasyon) değerleri ise ordinata konulmuştur. Beş solvan sistemi ile ayrı ayrı grafikler çizilmiştir. Bu grafikler arasında en iyi korrelasyonları verenler Sistem I ve Sistem III solvanları ile yapılan çalışmalar olmuştur. Bu solvan sistemleri ile yapılan çalışmaların sonuçları Grafik I ve Grafik II de verilmiştir.

Görüldüğü gibi her iki grafikte de üçlü gruplar birlikte davranmaktadır. Bu gruplar, 1) **Ibuprofen, Methiazinic Acid, Niflumic Acid**, 2) **Mefenamic Acid, Naproxen, Diclofenac**'tan oluşmaktadır. Bu bileşiklerin aynı doğru üzerinde yer almaları, aralarında bir etkileşim benzerliği ya da etkileştikleri reseptörler yönünden bir benzerlik olduğu anlamına gelebilir. Bu nedenle her iki gruba giren bileşiklerin etki göstermek üzere organizmadaki adsorbsiyonları, distribüsyonları, diğer etkileşimleri arasında bir bağıntı bulunabilir.

Daha önce belirtildiği gibi, bu bileşiklerin log P leri üzerinde yapılan çalışmalar bazı beklenmedik sonuçlar göstermiştir. Bu sonuçların kesinleşmesinden sonra ilgili yayınlar yapılacaktır.

ÖZET

Bu çalışmada, Türkiyede satılan antiromatizmal ilaçlar içinde bulunan antranilik asit ve süstitüe aril asetik asit türevi bileşiklerin renk reaksiyonları, ince tabaka kromatografileri, R_M değerleri ve bu değerlerin LD_{50} ile olan ilişkileri incelenmiştir.

Denenmiş bulunan renk belirteçlerinden 8 tanesi olumlu sonuç vermiştir. Literatürün vermiş olduğu solvan sistemleri dışında, Benzen: Aseton: Metanol solvan sistemi değişik oranlarda kullanılarak başarılı ayrımlar yapılmıştır. Literatürde verilen solvan sistemleri genellikle asittir. Yukarıda adı edilen solvan sistemi nötraldir. Bu nedenle R_M değerlerinin LD_{50} ve log P ile korrelasyonunda daha başarılı sonuçlar almak mümkündür.

Benzen: Aseton: Metanol solvan sisteminin polaritesi düzgün bir biçimde artırılarak R_f 'nin değişimi incelenmiş ve R_M değerleri hesaplanmıştır. İncelenen bileşiklerden çoğunun LD_{50} leri ile R_M değerleri arasındaki ilişkiler grafiksel olarak incelenmiştir. Bulgulara göre incelenen bileşiklerden **Ibuprofen, Methiazinic Acid, Niflumic Acid** arasında ve **Mefenamic Acid, Naproxen, Diclofenac** arasında biyolojik etkileşim ve absorbabiliteleri yönünden benzerlik vardır.

İlerde yapılacak yayınlarda diğer ayrıntılara girilecektir.

SUMMARY

In this research the color reactions, thin layer chromatographic separation and R_M values of the derivatives of antranilic acid and substituted aryl acetic acid which are used in the antirheumatoid drugs marketed in Turkey and also the relations of these values with LD_{50} 's have been studied.

Eight color reagents have been applied successfully. Using the solvent system Benzene: Aceton: Methanol which is not mentioned in the literature, successful separations have been obtained by changing the ratio of the components. Solvent systems mentioned in the literature are generally acidic but the ones given above are neutral. Therefore better correlations can be attained between R_M values and LD_{50} 's, log P values. By increasing the polarity of the solvent system Benzene: Aceton: Methanol the change in R_f values has been studied and R_M values have been calculated.

For most of the compounds the relations between LD_{50} and R_M values have been studied.

According to our findings there is a similarity among **Ibuprofen**, **Methiazinic Acid** and **Niflumic Acid** on one part and among **Mefenamic Acid**, **Naproxen** and **Diclofenac** on the other from the point of biological interactions and absorbability.

Other details will be further exploited with the publications in future.

LİTERATÜR

1. Adams, S.S., Cobb, R., *Progress in Medicinal Chemistry*, 5, Edited by G.P. Ellis and G.B. West, Butterworths. London, 1967.
2. Boyce, C.B.C., Milborrow, B.V., *Nature (London)* **208**, 537 (1965).
3. Eiden, F., *Dtsch. Apotheker-Ztg.*, **107**, 1522 (1967).
4. Grant, D.W., *J. Chromatog.*, **10**, 511 (1963).
5. Heacock, R.A., Mahon, M.E., *ibid.*, **17**, 338 (1965).
6. Kucharczyk, N., Fohl, J., Wymetal, J., *ibid.*, **11**, 55 (1963).
7. Northover, B.J., *J. Pathol. Bacteriol.*, **85**, 361 (1963).
8. Passera, C., Padrotti, A., Ferrari, G., *J. Chromatog.*, **14**, 289 (1964).
9. Rubin, A., Rodda, B.E., Warrick, P., Ridolfo, A., Gruber, C.M., *J. Pharm. Sci.*, **60**, 1797 (1971).
10. Runkel, R., Chaplin, M., Boost, G., Segre, E., Forchielli, E., *ibid.*, **61**, 703 (1972).
11. Unterhalt, B., *Archiv der Pharmazie.*, **303**, 445 (1970)