

Bilimsel Arařtırmalar

İndometasin'in Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi İle Yeni Bir Miktar Tayini Yöntemi

Seçkin ÖZDEN(*)
Tuncel ÖZDEN(*)
İsmail YALÇIN(*)
Ningur NOYANALPAN(**)

Özet : Bu çalışmada antienflamatuvar, antipiretik ve analjezik etkili bir bileşik olan indometasin için Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi ile yeni bir miktar tayini yöntemi ortaya konulmuş, yöntem Türkiye'de satılan 5 indometasin kapsül preparatına uygulanmış ve USP XX ile NF XIII de verilen yöntemle karşılaştırılmıştır. Verilen yöntemin daha çabuk, hassas ve kolay olduğu ortaya konulmuştur.

A NEW QUANTITATIVE DETERMINATION OF INDOMETHACINE BY NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY

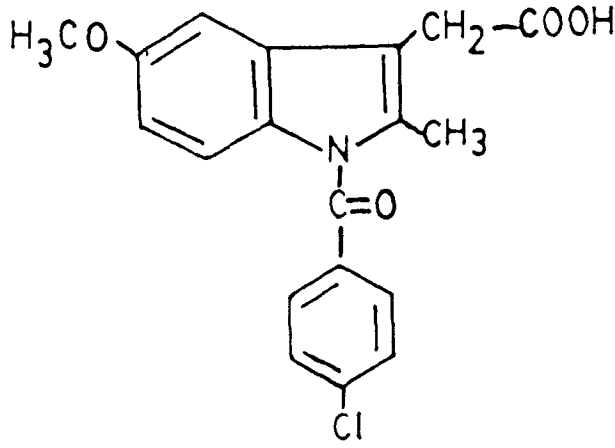
Summary : In this research a new quantitative Nuclear Magnetic Resonance spectrometric determination of Indomethacine is realized and the method is applicated to five commercial preparations marketed in Turkey. The method is also compared with the method given in USP XX and NF XIII. The NMR method has been found more rapid, producing more accurate results and more specific than the other one.

- (*) A.Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Tandoğan - Ankara.
(**) G.Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, F'iler - Ankara.

GİRİŞ

Daha önceki çalışmalarımızda, Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi ile yapılan ilaç miktar tayini yöntemleri ve uygulanışı verilmişti (1, 2). Bu çalışmada da indometasin için yeni bir yöntem geliştirilmiş ve bu bileşiği taşıyan ticari preparatlara uygulanmıştır.

İndometasin, kimyasal okunuşu 1-(p-klorobenzoil)-5-metoksi-2-metilindol-3-asetik asit olan ve non-steroid antiinflamatuvar, antipiretik ve analjezik etkili bir ilaçtır. Türkiye piyasasında Calmocin, Endol, Endomet, Endosetli ve Romacid olmak üzere kapsülleri şeklinde 5 preparatı bulunmaktadır.



INDOMETASIN

DENEYSEL KISIM

Bu çalışmada Perkin Elmer R 32 90 MHz NMR Spektrometresi ve PYE Unicam SP 1700 Ultraviyole Spektrofotometresi kullanılmıştır.

Miktar tayini uygulamalarında kullanılan standart indometasin bileşiği MSD (Clermont-Ferrand/Fransa) firmasından temin edilmiştir ve %99.8 saflıktadır.

İŞLEM

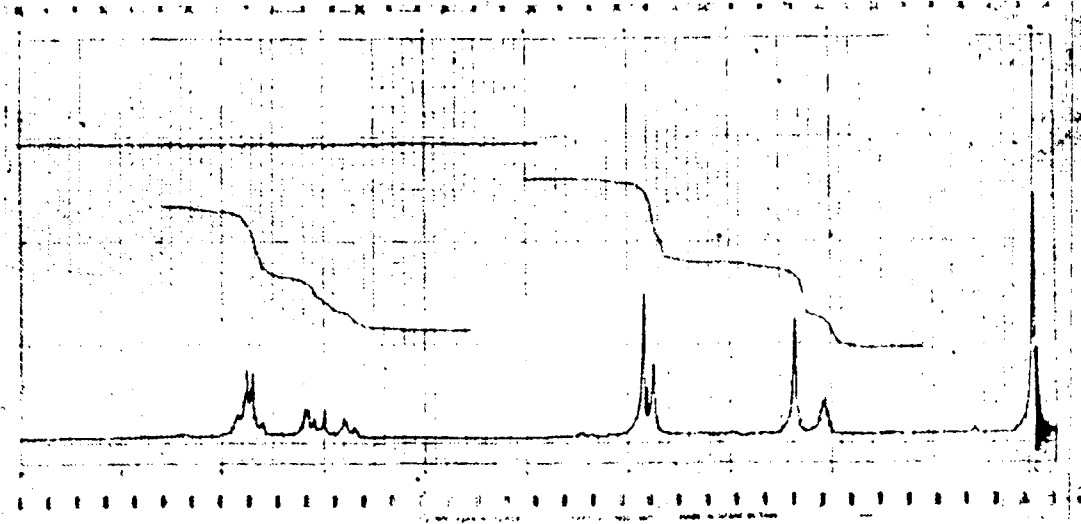
30 kapsül muhtevası tam ola-

rak tartılır, bir havanda ince toz haline getirilip iyice karıştırılır ve 50 mg civarında indometasine eşdeğer miktar tam olarak tartılıp bir santrifüj tüpüne konur. Üzerine 100 mg civarında tam tartılmış mandelik asit ilave edilir. Karışıma 1 ml aseton-d₆ konularak iyice karıştırılır ve 10 dakika santrifüje edilir. Bu süre sonunda santrifüj tüpündeki berrak çözeltilerden ucuna pamuk takılmış bir pastör pipeti yardımıyla 0.4 ml civarında alınır. NMR tüpüne doldurulur, 0-10 δ ppm arasında spektrumu çekilir ve

miktar tayininde kullanılacak sinyallerin birçok kez integrali alınarak ortalama integral değerleri cm cinsinden hesaplanır.

Indometasin'in 90 MHz NMR spektrumunda, 2.35 δ ppm de metil protonları (3H, s), 3.75 δ ppm de asetik asit kalıntısının metilen protonları (2H, s), 3.85 δ ppm de metoksil grubunun metil protonla-

rı (3H, s), 6.65 - 7.30 δ ppm de indol halkasının aromatik protonları (3H, m) ve 7.55 - 7.95 δ ppm de p-klorobenzoil grubunun aromatik protonları (4H, dd) görülmektedir. Spektrumda karboksil grubunun protonuna ait sinyal gözlenmemiştir. Muhtemelen bu proton daha düşük alanda sinyal vermektedir. 2.08 δ ppm de ise asetona ait sinyal bulunmaktadır (Spektrum 1).

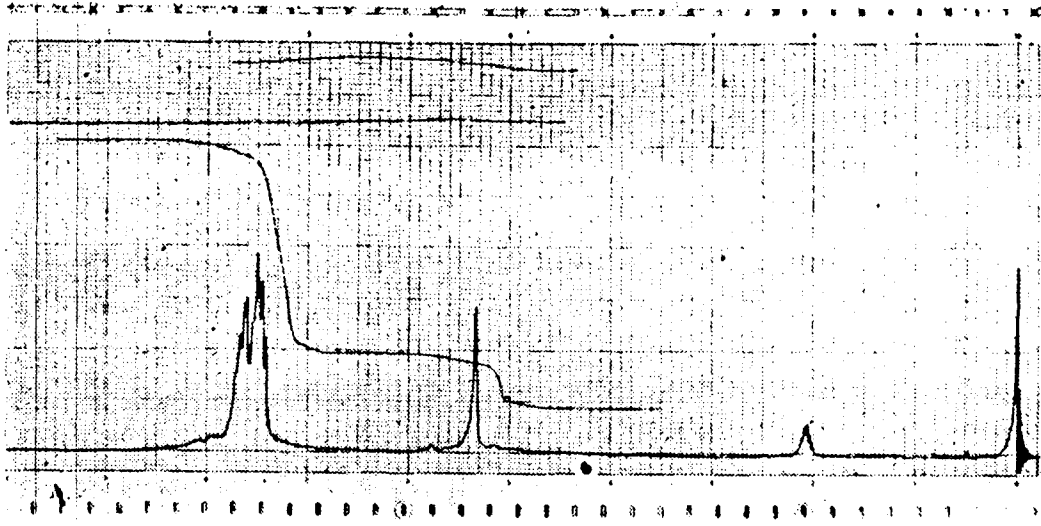


Spektrum 1. Indometasin'in 90 MHz NMR Spektrumu

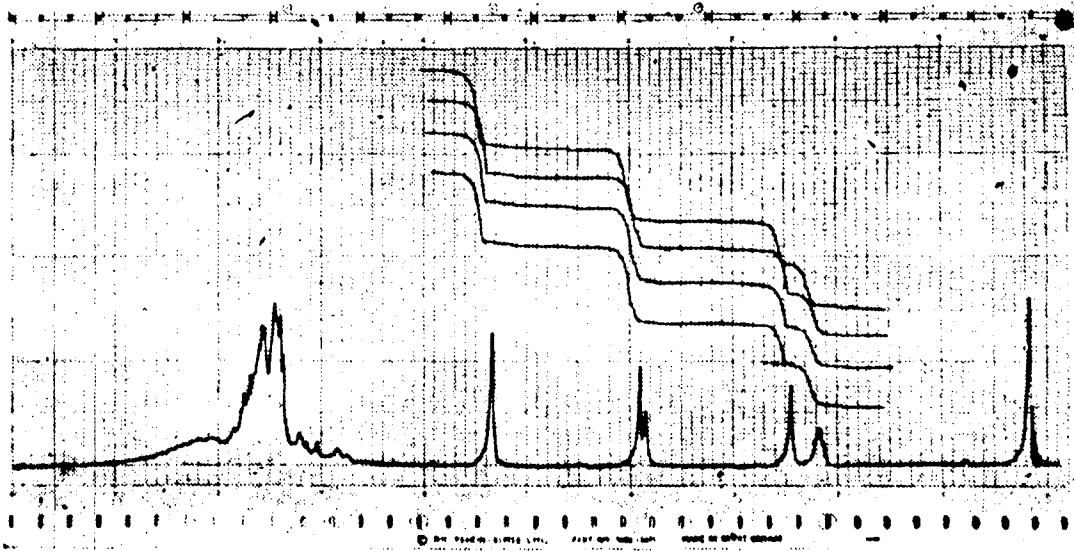
Mandelik asit'in 90 MHz NMR spektrumunda 5.33 δ ppm de metil grubunun protonu (1H, s), 7.30 - 7.80 δ ppm de benzen halkasının protonları (5H, m) ve 10.50 δ ppm de O - H protonu (1H, s) görülmektedir. Bu sinyal muhtemelen alkol protonuna aittir ve karboksil grubunun protonuna ait sinyal daha düşük alana kaymaktadır. Spektrumda asetona ait sinyal ise yine 2.08 δ ppm de bulunmaktadır (Spektrum 2).

Mandelik asit ve indometasin karışımının 90 MHz NMR spektrumunda ise iki bileşimin aromatik protonlarının dışındaki protonlara ait sinyaller birbirleri ile karışmaktadır (Spektrum 3).

Mandelik asit ve indometasin karışımının spektrumundan hareketle yapılan miktar tayininde referans sinyali olarak mandelik asitin metil protonuna ait olan 5.33 δ ppm deki sinyal alınmıştır. Indometasin'e ait sinyallerden ise ay-



Spektrum 2. Mandelik Asit'in 90 MHz NMR Spektrumu



Spektrum 3. Mandelik asit ve İndometasin Karışımının 90 MHz NMR Spektrumu

rı ayrı 2.35 δ ppm deki metil protonlarının sinyali ile 3.75 ve 3.85 δ ppm deki metilen ve metil sinyallerinin toplam integrali kullanılmıştır. Böylece, miktar tayini aynı spektrumdan hareketle iki değişik integral değeri kullanılarak iki kez yapılmış ve sonuçların karşılaştırılması mümkün olmuştur.

Türkiye piyasasında bulunan indometasin preparatlarının miktar tayini USP XX ve NF XIII de verilen yöntem olan ultraviyole spektroskopisi yöntemi (3,4) ile de yapılmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır.

USP XX ve NF XIII Miktar Tayini Yöntemi

a) Referans Standart Indometasin Çözeltisinin Hazırlanması

25 mg civarında tam tartılmış indometasin 200 ml lik bir balon jode 2 ml metanolde çözülmüş ve pH 7.2 fosfat tamponu (4) ile 200 ml ye tamamlanmıştır. Çözeltinin 25 ml si 3 kez 25 er ml metilen klorür ile ekstre edilmiş, ekstreler 100 ml lik bir balonjoje içine pamuktan süzülerek aktarılmış ve pamuk metilen klorür ile yıkanarak çözelti 100 ml ye tamamlanmıştır.

b) Numunenin Hazırlanması

20 indometasin kapsülü muhtevası tam olarak tartılmış, bir havan içinde ince toz edilip iyice karıştırıldıktan sonra 25 mg civarında indometasine eşdeğer miktar tam olarak tartılarak alınıp 200 ml

lik bir balonjoje içine aktarıldıktan sonra referans çözeltisinin hazırlanmasındaki işlem aynen uygulanmıştır.

c) İşlem

Ultraviyole spektrofotometresinde, 1 cm kalınlığındaki küvet içinde 319 nm de görülen maksimumda absorbans değerleri ölçülmüştür. Ölçme hem referans indometasin çözeltisi, hem de numune çözeltisi için metilen klorüre karşı yapılmıştır.

HESAPLAR

a) NMR Yöntemi

NMR yöntemi ile yapılan miktar tayininde, beher kapsülde bulunan indometasin miktarı aşağıda verilen denklemlerle bulunmuştur :

$$\frac{\text{Indometasin (mg)}}{\text{Kapsül Sayısı}} = \frac{I}{I} \times \frac{N}{N} \times \frac{\text{İlave edilen mandelik asit miktarı (mg)}}{\text{Man. Asit}}$$

Denklemlerde :

$$I = \frac{\text{indometasin}}{\text{Man. Asit}} = \frac{\text{a) } 2.35 \delta \text{ ppm deki sinyalin ortalama integral değeri (cm)}}{\text{b) } 3.75 \text{ ve } 3.85 \delta \text{ ppm deki sinyallerin ortalama toplam integral değerleri (cm)}} = \frac{\text{5.33 } \delta \text{ ppm deki sinyalin ortalama integral değeri (cm)}}{\text{Man. Asit}}$$

$$N = \frac{\text{Molekül Ağırlığı}}{\text{Sinyali veren proton sayısı}} = \frac{\text{a) } 2.35 \delta \text{ ppm deki sinyal için } 357.79}{3} = 119.26$$
$$\text{b) } 3.75 \text{ ve } 3.85 \delta \text{ ppm deki sinyal için } \frac{357.79}{5} = 71.56$$

$$^N \text{Man. Asit} = \frac{\text{Molekül Ağırlığı}}{\text{Sinyali veren proton sayısı}}$$

$$= \frac{152.15}{1} = 152.15$$

b) USP XX ve NF XIII Yöntemi

Uygulanan yöntem ile beher kapsülde bulunan indometasin miktarı aşağıda verilen denklemle bulundu.

$$0.8 C \times \frac{A_v}{A_s}$$

C = Standart çözeltideki mcg/ml cinsinden indometasin miktarı

A_v = Numune çözeltisinin 319 nm deki absorbens değeri

A_s = Standart çözeltinin 319 nm deki absorbens değeri

Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi yöntemi ile USP XX ve NF XIII yöntemi uygulanarak yapılan 7 deney sonucu beher kapsül içinde bulunan ortalama indometasin miktarları ve her yöntem için bulunan % sapma değerleri Tablo I'de verilmiştir.

Grupların birbirinden farklı anlamlılığa sahip olup olmadıkları Tek Yönlü Varyans Analizi yapılması suretiyle istatistiksel olarak saptanmıştır (5, 6). %5 anlamlılık düzeyinde tablo f değeri 3.24 tür Hesapla bulunan F değeri (44.7) tablo değerinden daha büyük olduğu için sonuç 0.05 düzeyinde an-

lamdır. ($P < 0.05$). O halde, 4 ortalama arasında 0.05 düzeyinde anlamlı bir fark vardır. Ortalamalar arasında yalnızca iki tanesinin arasındaki farklılık sebebiyle de böyle bir sonuç elde edilebileceğinden grupların ortalamaları teorik miktarlarla karşılaştırılarak t testi yapılmıştır. Buna göre USP XX ve NF XIII yöntemi ile bulunan değerlerin ortalaması teorik miktarlarla karşılaştırıldığında 0.05 düzeyinde önemli farklılık olduğu görülmektedir. Aynı işlem NMR yöntemi ile bulunan sonuçlar için uygulandığında farkın önemsiz olduğu bulunmuştur. Bulunan değerler aşağıda verilmektedir :

$$F = 44.7$$

$$\text{Tablo } F_{16}^3 = 3.24 \quad P < 0.05$$

$$t_{1,2} = 0.83 \quad P > 0.05$$

$$t_{1,3} = 1.16 \quad P > 0.05$$

$$t_{1,4} = 4.78 \quad P < 0.05$$

$$\text{Tablo } t^{16} = 2.120$$

$t_{1,2}$ = Teorik miktarlar ile NMR yöntemi (2.35 δ ppm deki sinyal için) ortalamalarının karşılaştırılması sonucu bulunan değer.

$t_{1,3}$ = Teorik miktarlar ile NMR yöntemi (3.75 + 3.85 δ ppm deki sinyal için) ortalamalarının karşılaştırılması sonucu bulunan değer.

$t_{1,4}$ = Teorik miktarlar ile USP XX ve NF XIII yöntemi ortalamalarının karşılaştırılması sonucu bulunan değer.

SONUÇ

Gerek Tablo : 1 ve gerek t testleri sonucu bulunan değerler, bu çalışmada verilen yeni yöntemin USP XX ve NF XIII yöntemine nazaran daha hassas, çabuk, basit olması sebebiyle üstün olduğunu göstermektedir. Tablo : 1 de görülen standart sapma neticeleri hataların kişisel olduğunu, yani analizi yapan kişinin yapacağı hataların NMR yönteminde çok daha az etkili olduğunu göstermektedir. Nükleer manyetik rezonans spektrometresi bulunan analiz laboratuvarlarında kolayca uygulanabilecek bir yöntem olan NMR yöntemi, pahalı bir çözücü olan aseton - d₆ nın bulunmadığı durumlarda 3.75 ve 3.85 δ ppm deki sinyaller üzerinden hesap yapılarak ve normal aseton kullanılarak sonuç alınabilir.

(Geliş Tarihi : 25.11.1982)

KAYNAKLAR

1. Noyanalpan, N., Özden, T., «A New Quantitative Determination Method for Aspirin, Phenacetin and Caffeine and Their Mixtures Using NMR Spectrometer», *J. Fac. Pharm. Ankara*, 7, 96 - 103 (1977).
2. Noyanalpan, N., Özden, T., «Quantitative Determination of Meprobamate by NMR in Commercial Preparations Marketed in Turkey», *J. Fac. Pharm. Ankara*, 7, 189 - 195 (1977).
3. *USP XX 1980*, Merck Printing Company, Easton, Pa. 18042, U.S.A.
4. *National Formulary XIII*, American Pharmaceutical Association, Washington, DC 20037, U.S.A., 1970.
5. Kutsal, A., Muluk, F.Z., «Uygulamalı Temel İstatistik», H.Ü. Yayınları, Ankara, 1972.
6. Heperkan, Y., «Tıpta İstatistik Yöntem ve Uygulamaları», A.Ü. Tıp Fakültesi Yayınları, Ankara, 1981.

Tablo 1. İndometasin Preparatlarının NMR, USP XX ve NF XIII Yöntemleri ile Yapılan Miktar Tayini Sonuçları

Preparat İsmi	Beher Kap- sülde Bulun- ması Gere- ken Teorik Miktar (mg)	NMR Yöntemi				USP XX ve NF XIII Yöntemi	
		2.35 δ ppm deki sinyal için		3.75 + 3.85 δ ppm deki sinyal için		Bulunan mg (St. sap.)	% Sapma
		Bulunan mg (St. sap.)	% Sapma	Bulunan mg (St. sap.)	% Sapma		
Calmocin	25.00	24.81 (± 0.016)	0.76	24.73 (± 0.013)	1.08	24.08 (± 0.015)	3.68
Endol	25.00	24.75 (± 0.026)	1.00	24.71 (± 0.033)	1.16	23.67 (± 0.010)	5.32
Endomet	25.00	24.78 (± 0.010)	0.88	24.69 (± 0.017)	1.24	23.36 (± 0.010)	6.16
Endosetin	25.00	24.71 (± 0.014)	1.16	24.67 (± 0.016)	1.32	23.68 (± 0.015)	5.28
Romacid	25.00	24.89 (± 0.019)	0.44	24.75 (± 0.015)	1.00	24.22 (± 0.011)	3.12