

**Y.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**





T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI ALİFATİK-AROMATİK İMİNLERİN VE METABOLİK ARA
ÜRÜNLERİNİN *İN VİTRO* MİKROZOMAL METABOLİZMALARI

724097

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DENEYİMANTASYON MERKEZİ**

ENİS KAHVECİOĞLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ

124097

FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof.Dr. Mert ÜLGEN

İSTANBUL-2003

I

Çalışmalarında bilgi ve desteğinden yararlandığım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Mert Ülgen'e, ayrıca yardımlarını hiçbir konuda esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sevim Rollas'a ve Araştırma Görevlisi Başak Oral'a, hayatımın her aşamasında olduğu gibi tezimin hazırlanmasında da manevi ve maddi her türlü desteği veren aileme en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

II

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	4
4.1. Schiff Bazları Hakkında Genel Bilgiler.....	4
4.2. Nitronların Sentezi.....	8
4.3. Oksaziridinlerin Sentezi.....	11
İlaç Metabolizma Reaksiyonları.....	15
Faz I reaksiyonları.....	16
4.4 Oksidatif Reaksiyonlar.....	16
4.4.1.Aromatik, Alifatik ve Olefinik Karbon Atomlarının Oksidasyonu	16
4.4.2.Karbon-Kükürt İçeren Bileşiklerinin Oksidasyonu	18
4.4.3 Karbon-Azot Bileşiklerinin Oksidasyonu.....	20
4.5. Redüksiyon.....	25
4.6. Hidroliz.....	26
4.7. Faz II Reaksiyonları.....	28
4.8 İn Vitro Mikrozomal Metabolizma Tekniklerinin Önemi	29
4.8.1.Ön Ekstraksiyon Denemeleri	29
4.8.2. Mikrozomal Preparatın hazırlanması Ve Standart Ko-Faktör Karışımları ..	31
4.8.3. Karaciger Mikrozomal Preparatının Hazırlanması	32
4.8.4 Standart Ko-Faktör Karışımları Ve Ön İnkübasyon	32
4.8.5 İnkübasyon	34
4.8.6. Biyolojik Sistemden Ekstraksiyon Ve Evaporasyon	34
5.Gereç ve Yöntem	36
5.1 Araç ve Gereçler	36
5.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	36
5.1.2. Kullanılan Elektronik Cihazlar	36

5.2. Genel Sentez Yöntemleri.....	37
5.2.1. N-(4-nitro/klorobenziliden)isopropilamin[1a,1b].....	37
5.2.2. N-(4-nitro/klorobenzoil)isopropilamin[2a,2b].....	37
5.2.3. N-(4-nitro/klorofenil)isopropilamin[3a,3b].....	37
5.2.4. α -(4-nitro/klorofenil)-N-isopropil oksaziridin[4a,4b].....	37
5.2.5. α -(4-nitro/klorobenzil)-N-isopropil nitron[5a,5b].....	38
5.3.Kromatografik Çalışmalar.....	39
5.3.1 İnce Tabaka Kromatografisi.....	39
5.3.2Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi.....	39
5.3.3 N-(4-klorobenziliden)isopropilamin'in Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi ile Stabilite Çalışması	40
6.BULGULAR.....	42
6.1. N-(4-nitrobenziliden)isopropilamin[1a].....	42
6.2. N-(4-nitrobenzoil)isopropilamin[2a].....	44
6.3. N-(4-nitrobenzil)-isopropilamin [2a].....	44
6.4. α -(4-nitrobenzil)-N-isopropil oksaziridin [4a].....	45
6.5. α -(4-nitrofenil)-N- isopropil nitron [5a].....	45
6.6. N-(4-klorobenziliden)isopropilamin [1b].....	46
6.7. N-(4-klorobenzoil)isopropilamin[2b].....	47
6.8. N-(4-klorobenzil)isopropilamin [3b].....	48
6.9. α -(4-klorofenil)-N-isopropil oksaziridin [4b].....	49
6.10. α -(4-klorofenil)-N-isopropil nitron[5b].....	50
6.11. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi Çalışmaları İle İlgili Bulgular	50
6.12. İnce Tabaka Kromatografi Çalışmaları İle İlgili Bulgular	52
7.Tartışma	69
8.Sonuç.....	75
9.Kaynaklar.....	76
10.Özgeçmiş.....	87

III

KISALTMALAR VE SİMGELER

DMSO-d₆	: Döterodimetilsülfoksit
d	: Dublet
e.b.	: eğilme bandı
e.n.	: erime noktası
F₂₅₄	: 254 nm'de fluoresans gösteren silika jel
g.b.	: gerilme bandı
Hz	: Hertz
¹H-NMR	: Proton Nükleer magnetic rezonans
HPLC	: High Pressure liquid chromatography
IR	: Infrared
İ.T.K.	: İnce Tabaka Kromatografisi
m	: Multiplet
M.A.	: Molekül ağırlığı
MHz	: Megahertz
ppm	: parts per million (milyonda bir)
q	: Quarted
R_f	: Retensiyon faktörü
RZ	: Retensiyon zamanı
s	: Singlet
t	: Triplet
TMS	: Tetrametilsilan
UV	: Ultraviyole
δ	: Kimyasal kayma
λ_{maks}	: Maksimum absorbsiyon gösteren dalga boyu
ν_{maks}	: Maksimum absorbsiyon gösteren dalga sayısı
ε	: Maksimum absorbsiyon gösteren dalga boyundaki molar absortivite katsayısı

IV

i. Şekillerin Listesi

Şekil 1: *In vitro* ilaç metabolizmasında izlenecek safhalar

Şekil 2: Mikrozomal Preparatın Hazırlanması

Şekil 3: Bileşik 1a'nın IR spektrumu

Şekil 4: Bileşik 1a'nın ¹H-NMR spektrumu

Şekil 5: Bileşik 1b'nin IR spektrumu

Şekil 6: Bileşik 1b'nin ¹H-NMR spektrumu

Şekil 7: Bileşik 2b'nin ¹H-NMR spektrumu

Şekil 8: Bileşik 4b'nin ¹H-NMR spektrumu

Şekil 9: N-(4-nitro/klorobenziliden)isopropilamin'in olası metabolik yolları

Şekil 10: α -(4-Nitrofenil)isopropilamin ve α -(4-nitrobenzil)-N-isopropil oksaziridin'in kromatogramları ve UV spektrumları [Mobil faz: asetonitril:su (50:50 h/h)].

Şekil 11: 4-nitrobenzaldehit ve N-(4-nitrobenziliden)isopropilamin'in kromatogramları ve UV spektrumları [Mobil faz: asetonitril:su (50:50 h/h)].

Şekil 12: α -(4-Nitrofenil)-N-isopropilamin nitron'un kromatogramı ve 254 nm'de UV spektrumu [Mobil faz: asetonitril:su (50:50 h/h)].

Şekil 13: α -(4-Nitrofenil)-N-isopropilamin nitron'un bozunma ürününün kromatogramı ve UV spektrumu [Mobil faz: asetonitril:su (50:50 h/h)].

Şekil 14: α -(4-Nitrofenil)-N-isopropilamin nitron'un üç gün sonraki ve N-(4-nitrofenil)isopropilamin'in UV spektrumu [Mobil faz: 0.02M fosfat tamponu:asetonitril (50:50 h/h)].

Şekil 15: N-(4-klorobenziliden)isopropilamin'in kolon B ile asetonitril:su (50:50 h/h) ve akış hızı:1ml/dk olan sistemde kromatogramı ve UV spektrumu

Şekil 16: α -(4-klorobenzil)-N-isopropil oksaziridin'in kolon B ile asetonitril:su (50:50 h/h) ve akış hızı:1ml/dk olan sistemde kromatogramı ve UV spektrumu

Şekil 17: α -(4-Nitrofenil)-N-isopropil nitron'un kolon B ile asetonitril:su (50:50 h/h) ve akış hızı:1ml/dk olan sistemde kromatogramı ve UV spektrumu

Şekil 18: N-(4-klorobenzoil)isopropilamin 'in kolon B ile asetonitril:su (50:50 h/h) ve akış hızı:1ml/dk olan sistemde kromatogramı ve UV spektrumu

Şekil 19: 4-klorobenzaldehit'in kolon B ile asetonitril:su (50:50 h/h) ve akış hızı:1ml/dk olan sistemde kromatogramı ve UV spektrumu

Şekil 20: N-(4-klorobenziliden) isopropilamin'in kolon B ile asetonitril:su (50:50 h/h) ve akış hızı:1ml/dk olan sistemde karaciğer mikrozomal prepatı kullanılarak yapılan inkübasyon sonrası elde edilen metabolik ekstraktan alınan HPLC kromatogramı (A: N-(4-klorobenziliden)isopropilamin, B: N-(4-klorobenzoil)isopropilamin, C: 4-klorobenzaldehit)

Şekil 21: N-(4-klorobenziliden)isopropilamin'in kolon B ile asetonitril:su (50:50 h/h) ve akış hızı:1ml/dk olan sistemde denatüre mikrozomlarla yapılan inkübasyon sonrası elde edilen metabolik ekstraktan alınan HPLC kromatogramı

Şekil 22: N-(4-klorobenziliden)isopropilamin'in kolon B ile asetonitril:su (50:50 h/h) ve akış hızı:1ml/dk olan sistemde ko-faktörsüz ortamda yapılan inkübasyon sonrası elde edilen metabolik ekstraktan alınan HPLC kromatogramı

Şekil 23: Standart ve metabolik imin, amid, aldehit ve oksaziridin bileşiklerine ait UV spektrumları (1b: N-(4-klorobenziliden)isopropilamin

2b: N-(4-klorobenzoil)isopropilamin 4b: α -(4-klorobenzil)-N-isopropil oksaziridin)

Şekil 24: N-(4-klorobenziliden)isopropilamin, 4-klorobenzaldehit ve N-(4-klorobenziliden) isopropilamin'in 37°C'de su banyosunda 15 dakika ısıtılmasıyla elde edilen kromatogramlar.

ii. Tabloların Listesi

Tablo 1. Oksidatif mikrozomal metabolizma çalışmalarında kullanılan standart

Tablo 2 . Madde 1a ve metabolitler'in kolon A ile asetonitril: su (50:50 h/h) ve akış hızı:1ml/dk. olan sistemde retensiyon zamanları.

Tablo 3 . Madde 1 a ve metabolitler'in kolon A ile asetonitril 0.02M fosfat tamponu (50:50 h/h) ve akış hızı:0.7 ml/dk. olan sistemde retensiyon zamanları

Tablo 4 . Madde 1b ve metabolitler'in kolon A ile asetonitril:su (50:50 h/h) ve akış hızı:1ml/dk. olan sistemde retensiyon zamanları

Tablo 5 . Madde 1b ve metabolitler'in kolon B ile asetonyril :0.02M fosfat tamponu (50:50 h/h) ve akış hızı:1ml/dk. olan sistemde retensiyon zamanları

Tablo 6 . Madde 1b ve metabolitler'in asetonyril:su (50:50 h/h) ve akış hızı:1ml/dk. olan sistemde retensiyon zamanları

Tablo 7 . Madde 1a ve metabolitler'in petrol eteri : aseton sisteminde $R_f \times 100$ değerleri

Tablo 8 . Madde 1b ve metabolitler'in petrol eteri : aseton sisteminde $R_f \times 100$ değerleri



1.ÖZET

Bazı Alifatik-Aromatik İminlerin ve Metabolik Ara Ürünlerinin *in vitro* Mikrozomal Metabolizmaları

Literatürde, iminlerin kimyasal ve metabolik oksidasyonu ile oluşan oksaziridinlerin çoğunun stabil olmayıp sonradan nitron ve amidlere dönüştüğü bildirilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda N-alkil- α -arilnitronlara karşılık gelen oksaziridinlerin, N, α -arilnitronlara karşılık gelenlere göre daha stabil oldukları ileri sürüldüğünden mevcut çalışmamızda, kimyasal veya metabolik olarak stabil oksaziridin vermesi beklenen N-(4-nitrobenziliden)isopropilamin ve N-(4-klorobenziliden)isopropilamin bileşiklerinin karaciğer mikrozomal preparatları kullanılarak *in vitro* metabolizmasının çalışılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla, substrat olarak kullanılacak olan iki imin, metanollü ortamda isopropilamin ve 4-nitro/klorobenzaldehit'in ısıtılması ile elde edilmiştir. Model olarak seçilen iminlere karşılık gelen oksaziridin, nitron ve amid metabolitleri de literatürde mevcut metodları kullanarak sentezlenmiştir. Daha sonra iminlerin ve olası metabolitlerinin yapıları aydınlatılmıştır. Bu bileşiklerin birbirinden ayrıldığı bir zıt faz HPLC sistemi geliştirilmeye çalışılmış ve kimyasal olarak ön stabilite çalışması yapılmıştır. Mevcut sonuçlar bileşiklerin çoğunun stabil olmayıp kimyasal olarak bozunma ürünlerine dönüştüğünü göstermektedir. Tüm metabolitlerin birbirinden ayrıldığı uygun bir HPLC metodunun geliştirilmesini takiben, iminlerin *NADPH* ile takviye edilmiş karaciğer mikrozomal preparatları kullanarak *in vitro* metabolizmaları çalışılmış ve oluşan metabolitler aydınlatılmıştır.

2.SUMMARY

The *in vitro* Microsomal Metabolism Of Some Alifatic-Aromatic Imines And Their Metabolic Intermediates

It has been known in the literature that oxaziridines, which are formed by chemical and metabolic oxidation of imines, are not stable and transformed into nitrones and amides. In the previous studies, since it was postulated that oxaziridines corresponded to N-alkyl- α -arylnitrones were more stable compared to N, α -diaryl analogues, it is now planned to study the *in vitro* metabolism of N-(4-nitrobenzylidene)isopropylamine and N-(4-chlorobenzylidene)isopropylamine which were expected to produce stable oxaziridines either chemically or metabolically.

For this aim, the two imines which will be used as substrates were obtained by heating 4-nitro/chlorobenzaldehyde and isopropylamine in a methanolic medium. The potential oxaziridine, nitrone and amide metabolites corresponded to these model imines were also synthesised using the methods available in the literature. Then, the structures of these imines and their potential metabolites were confirmed using spectral methods. Following this, an HPLC method for the separation of all these compounds were designed and preliminary chemical experiments were conducted. The results have shown that most of the compounds were not stable and transformed into artifact products chemically. Plannes are to develop a better HPLC separation method for these compounds followed by studying the *in vitro* microsomal metabolism of these imines using rat liver microsomal preparations fortified with *NADPH* as a co-factor.

3.GİRİŞ ve AMAÇ

Bu tezin amacı, stabil oksaziridinlere karşılık gelen model imin bileşiklerinin sentezlenerek bu bileşiklerin metabolik olarak kendilerine karşılık gelen oksaziridin, nitron veya amid bileşiklerine ve karşılık gelen hidroliz ürünlerine dönüşüp dönüşmeyeceğinin araştırılmasıdır. Diğer bir amaçta bu iminlerin non-enzimatik organizma şartlarında özellikle hidroliz ürünleri olmak üzere, herhangi bir bozulma ürününe dönüşüp dönüşmeyeceklerini incelemektedir.

Bu çalışmada, isopropilamin'in 4-nitrobenzaldehit ve 4-klorobenzaldehitte kondensasyonu sonucu oluşacak iminlerin ve olası metabolik ürünleri olarak karşılık gelen oksaziridin, nitron ve amid bileşiklerinin sentezlenmesi, yapılarının aydınlatılması amaçlanmıştır. Daha sonra da NADPH ilavesi ile sıçan hepatik mikrozomları kullanılarak inkübasyonların yapılması, ayrıca substrat ve metabolitlerin sıvı-sıvı ekstraksiyonunu takiben elde edilen metabolik ekstratların yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile ayrımlarının sağlanması ve oluşan metabolitlerin yapılarının aydınlatılması amaçlanmıştır.

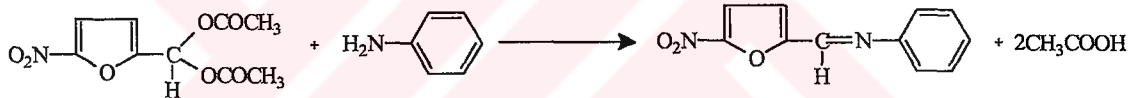
Daha önce yapılan çalışmalarda nonsüstitüe iminlerin karşılık gelen oksimlere metabolize olduğu bildirilmiştir (36). Literatürde, çeşitli asetaminofenon iminlerinin de oksimlere dönüştüğü yer almaktadır (32). Diaromatik iminlerin *in vitro* mikrozomal metabolizmaları sonunda stabil olmayan oksaziridinler üzerinden amid ve nitronlara dönüştüğü Gorrod ve Ülgen tarafından ileri sürülmüştür. Ancak bu oksaziridinleri kimyasal olarak sentezlemek mümkün olmamış, HPLC-UV metodu ile bu bileşiklerin oksaziridin olabileceği belirtilmiştir (36,37). İmin oksidasyonu ile oluşan oksaziridinlerin çoğu durumda stabil olmayıp bunların sonradan nitron ve amidlere dönüşen ara ürünler olduğu Emmons tarafından bildirilmiştir. (22,23) Splitter ve Calvin ise, N-alkil- α -arilnitronlara karşılık gelen oksaziridinlerin, N, α -diarilnitronlara karşılık gelenlere göre daha stabil olduklarını göstermişlerdir (76). Bu nedenle bu çalışmada isopropilamin'den hareketle benzilideniminlerin ve karşılık gelen stabil oksaziridin, nitron ve amidlerin sentezlenmesi planlanmıştır. İminlerin metabolik veya kimyasal olarak kendilerine karşılık gelen oksaziridin, nitron veya amid bileşiklerine ve hidroliz ürünlerine dönüşüp dönüşmeyeceğinin araştırılması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

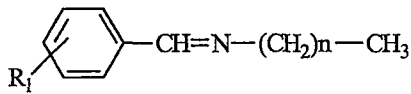
4.1. Schiff Bazları Hakkında Genel Bilgiler

Schiff bazı yapısındaki ilk bileşik 1864 yılında H.Schiff tarafından primer aminlerle karbonil bileşiklerinin kondensasyonu sonucu elde edilmiştir (48). Schiff bazı adı ile bilinen azometin grubu içeren bileşikler çok hızlı hidroliz oldukları için biyolojik aktivitelerini saptamak güçtür.

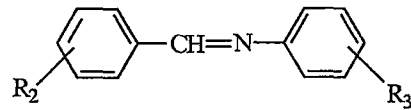
Fenech ve ark. (25) 5-nitrofurfuriliden diasetatın anilin ile reaksiyonu sonucunda elde ettikleri 5-nitrofurfuriliden anilinin *Esheria coli*, *Eberthella typhosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus equia*'ya karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini saptamışlardır.



Czerwinska ve ark. (19) benzaldehit ve türevlerinin, aromatik primer aminlerle veya polimetilendiaminlerle etanollü ortamda ısıtılmaları sonucunda çeşitli yapıda Schiff bazlarını sentezlemişler ve bileşiklerin antibakteriyel ve antifungal etkilerini araştırmışlardır. Orto konumunda hidroksil grubu taşıyan yapılarda aktivitenin daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.



R₁=H, 5-Me, 3-MeOH, 5-Cl, 5-Br, 3,5-Br₂
n=1, 1, 4, 3, 4, 3, 1



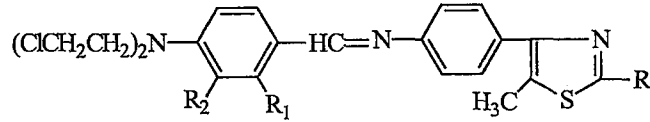
R₂=H, 2-OH, 2-OH, (2-OH, 3-MeOH)
R₃=2-OH, H, 2-OH, 2-OH

Popp ve Krisch (64) 4-[bis(2-kloroetil)amino]-2-sübstitüe benzaldehitlerle sübstitüe aromatik, alifatik veya sikloalkilaminlerin tepkimesinden Schiff bazlarını elde etmişlerdir. Araştırmacılar sikloalkil aminlerden türeyen Schiff bazlarının antikanser aktivitelerinin diğer alifatik aminlerinkinden daha kuvvetli olduğunu tespit etmişlerdir.

Walker ve Klett (88) sübstitüe aromatik aldehitlerle p-aminosalisilik asit ve dialkilaminleri toluen veya benzenli ortamda ısıtarak çeşitli yapıda elde ettikleri Schiff bazlarını düşük kardiovasküler, analjezik ve sedatif aktivite gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Hodnett ve Dunn (42) sübstitüe anilin ve benzaldehitlerin reaksiyonu sonucu oluşan Schiff bazlarının antitümör aktiviteye sahip olduklarını ve aktivitenin kullanılan aldehite bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Modi ve ark. (56) 4-(p-aminofenil)-2,5-disübstitüe tiyazol hidroklorür'ün etanolü ortamda 4-[N,N-bis(2-kloroetil)amino]sübstitüe benzaldehitlerle ısıtılmasıyla elde edilen Schiff bazlarının antitümör etkiye sahip olduklarını bildirmişlerdir.

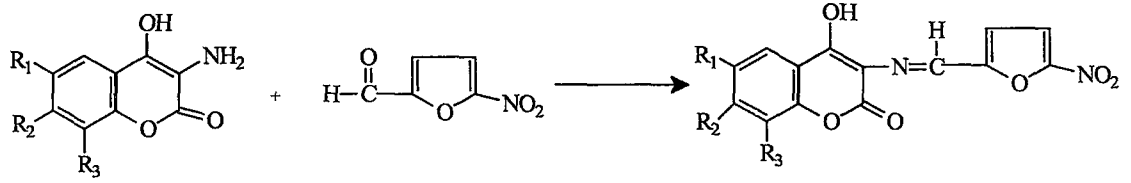


$\text{R} = \text{C}_6\text{H}_5, \text{p-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4, \text{CH}_3, \text{p-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$

$\text{R}_1 = \text{OCH}_3, \text{OCH}_3, \text{H}, \text{H}$

$\text{R}_2 = \text{H}, \text{H}, \text{OCH}_3, \text{OC}_2\text{H}_5$

Patonay ve ark. (61) sübstitüe 3-amino-4-hidroksikumarinleri 5-nitrofurfural ile formik asitli ortamda toluen ile ısıtılmasıyla sübstitüe 3-(5-nitrofurfurilidenamino)-4-hidroksikumarinler'i elde etmişler. Bileşiklerin gram pozitif ve negatif bakterilere karşı antibakteriyel, antifungal aktivitelerinin olduğunu tespit etmişlerdir.

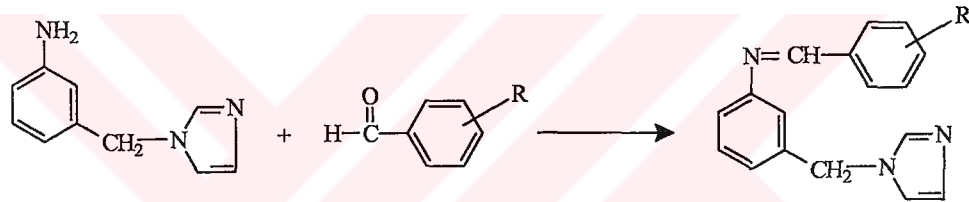


$R_1 = \text{H, H, H, Cl, H}$

$R_2 = \text{OH, C}_6\text{H}_5\text{COO, OH, H, H}$

$R_3 = \text{CH}_3, \text{H, H, H, Cl}$

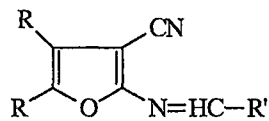
Porretta ve ark. (65) sübstitüe benzaldehit ve 3-[(1H-imidazol-1-il)metil]anilini glasiyel asetik asitli içerisinde etanollü ortamda ısıtarak Schiff bazlarını sentezlemişlerdir. Schiff bazlarının 3-nitro ve 4-kloro benzaldehit türevlerinin antifungal aktiviteye sahip olduklarını bildirmişlerdir.



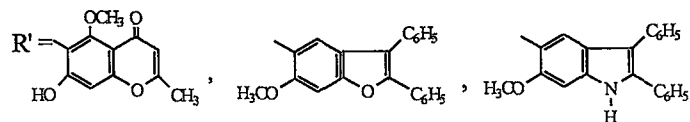
$R = 2\text{-Cl, 3-NO}_2, 3,4,5\text{-OCH}_3, 4\text{-N(CH}_3)_2, 4\text{-NHCOCH}_3, 4\text{-Cl}$

Wang ve ark. (89) hidroksiaminoguanidin türevi Schiff bazlarının antiviral aktiviteye sahip olduklarını ve sübstitüe benzaldehitin orto konumundaki hidroksil grubunun hidroksiaminoguanidin ile intramoleküler hidrojen bağı yaparak Schiff bazının stabilitesini ve biyolojik aktivitesini arttırdığını tespit etmişlerdir.

Atta ve Ameen (5) β -enaminonitrillerin heteroarilkarboksilli aldehitlerle reaksiyonu sonucu oluşan Schiff bazlarının antiinflamatuvar aktivitelerinin yanısıra ülser oluşturma risklerinin asetilsalisilik asite kıyasla oldukça düşük olduğunu tespit etmişlerdir.



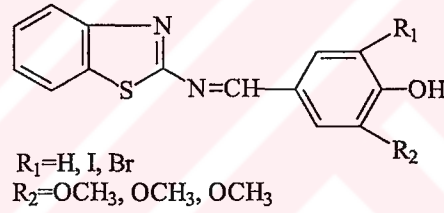
$R = \text{C}_6\text{H}_5, 2\text{-füril}$



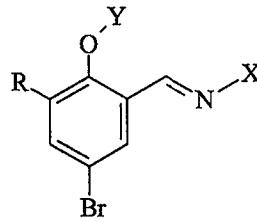
Al-Ani ve ark. (1,2) antiinflamatuvar aktiviteye sahip saddamin'i (salisilidenbenzilamin) ve aspirini sodium benzoatla birlikte gönüllü insanlara vererek *in vivo* metabolizmasını araştırmışlardır. Schiff bazı olan saddamin'in önce salisil aldehite daha sonrada oksidasyonla salisilik asit metabolitine dönüştüğünü tespit etmişlerdir.

Sridhar ve ark. (77) izatin ve aromatik primer aminlerden hareketle elde ettikleri Schiff bazlarının analjezik ve antipiretik aktiviteye sahip olduklarını tespit etmişlerdir.

Cardile ve ark. (13) benzotiyazol ve sübtitüe p-hidroksibenzaldehitin reaksiyonu sonucu elde edilen Schiff bazlarının domuzlarda *in vitro* metabolizması sonucunda antiinflamatuvar etkiye sahip olduklarını bildirmişlerdir.



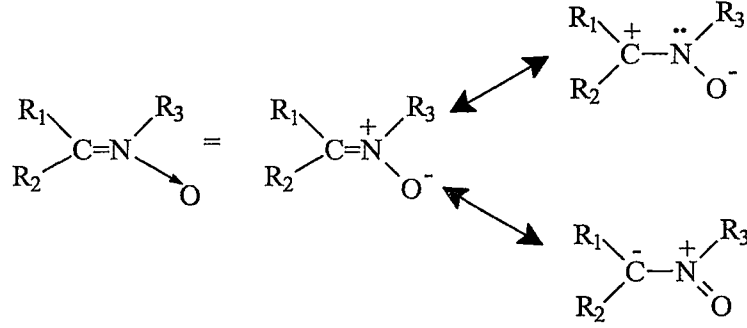
Schiff ve ark (71) 4-bromofenol ve sübtitüe aminlerin etanollü ortamda susuz HClO_4 varlığında ısıtılmasıyla Schiff bazlarını elde etmişleridir.



X=siklopropil	R= H	Y=H
X=etil	R= H	Y=H
X=pentaflorofenil	R= H	Y=H
X=pentaflorofenil	R= $\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Y=H
X=siklopropil	R= $\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Y=H
X=pentaflorofenil	R= H	Y= OCH_3

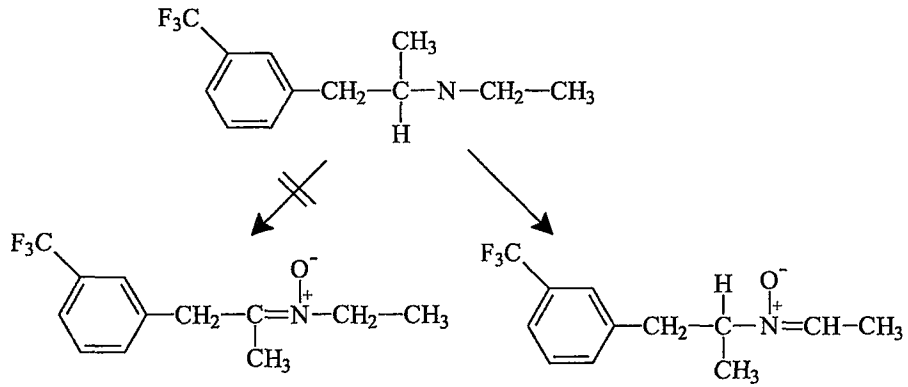
4.2. Nitronların Sentezi

Nitronlar azot atomu üzerindeki pozitif yükün gösterdiği iki şekilde formüle edilirler. Bu pozitif yük azot atomu ve α -karbon atomu üzerinde delokalize olup, 1,3-dipolar yapıyı oluşturur. Delokalizasyon α -karbon atomu veya azot atomu üzerindeki sübstitüentlere bağlıdır.

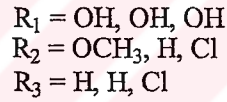
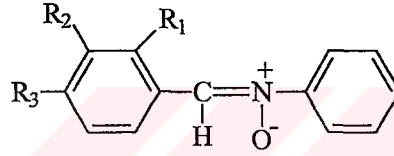


Gorrod ve Gooderham (33,35) N-benzil-4-sübstitüe anilin'in soğutulmuş asetondaki çözeltisinin 3-kloroperbenzoik asit ile reaksiyonu sonucu karşılık gelen nitronları elde etmişler, araştırmacılar sekonder aminin 3-kloroperbenzoik asit'e oranının 2/1'den az olması durumunda verimin düştüğünü fazla olması durumunda ise nitrosa bileşiğinin oluştuğunu saptamışlardır. Ayrıca aseton yerine eter ve halojellenmiş çözücülerin kullanılması sonucunda yan ürünlerin oluştuğunu bildirmişlerdir.

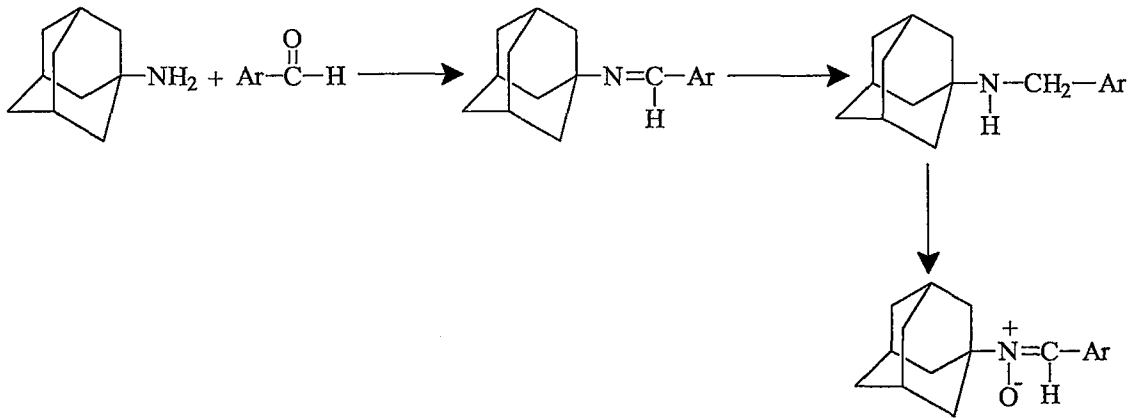
Beckett ve ark. (7) N-hidroksifenfluramin asit okzalatin civa oksitle oksidasyonu sonucunda daha önceki çalışmalarda belirtildiği gibi N-etil- α -metil- α -(m-triflorometilbenzil)nitron'un değilde α -metil-N-[1-(m-triflorometilbenzil)etil] nitron'un oluştuğunu tespit etmişlerdir.



Dziembowska ve ark. (21) fenilhidroksilaminlerin etanollü ortamda süstitüe aldehitlerle kondensasyonu sonucunda α -süstitüearil-N-fenil nitronları elde etmişlerdir.



Sar ve ark. (70) 1-aminoadamantan'ın aromatik aldehitlerle reaksiyonu sonucu elde ettikleri Schiff bazlarının NaBH_4 ile redüksiyonu sonucu sekonder aminleri, bunların NaWO_4 çözeltisinde hidrojen peroksit ile oksidasyonu sonucunda da karşılık gelen nitronları elde etmişlerdir.



Ar = p- NO_2 , H, p- NH_2 , OH

Forcato ve ark. (26) sekonder aminlerin NaMoO_4 , Na_2WO_4 , MeReO_3 , SeO_2 veya titanyum alkoksit gibi katalizörlerin varlığında hidrojen peroksit ile reaksiyonu sonucunda nitronları elde etmişlerdir. Kullanılan katalizör ortamda yan ürün olarak suyun oluşmasını engellemekle birlikte trialkonolamin ligandını zayıf bir şekilde bağlanmaktadır.

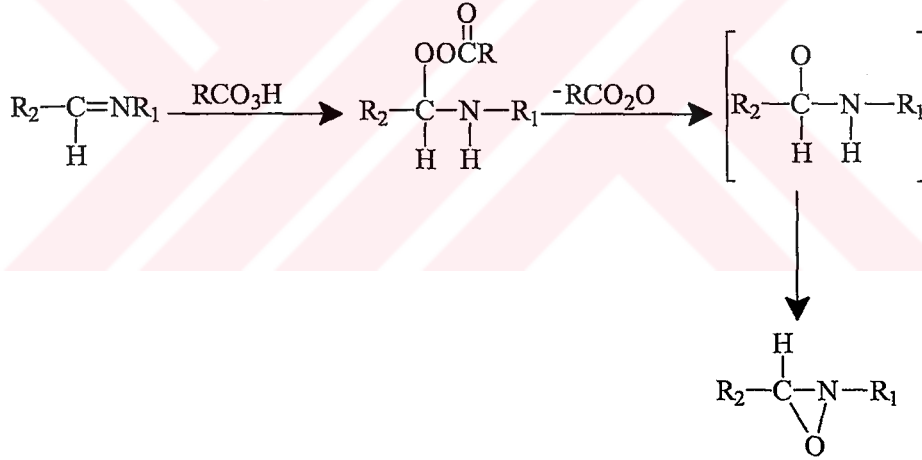
Colonna ve ark (17) siklohegzan monooksijenazın tersiyer ve sekonder aminlerin, hidroksilamin, N-oksit ve nitronlara oksidasyonunu katalizlediğini tespit etmişlerdir. N-süstitüe benzilaminlerle yaptıkları çalışmada sterik ve elektronik etkilerin reaksiyonu etkilediğini saptamışlardır.

Amin	Oluşan Ürün	Dönüşüm yüzdesi
N-Metilbenzilamin	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}=\text{N}(\text{O})\text{CH}_3$	10
	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{N}(\text{O})=\text{CH}_2$	8
	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{N}(\text{OH})\text{CH}_3$	80
N-Metilbenzilhidroksilamin	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}=\text{N}(\text{O})\text{CH}_3$	36
	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{N}(\text{O})=\text{CH}_2$	16
N-Etilbenzilamin	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}=\text{N}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$	30
	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{N}(\text{O})=\text{CHCH}_3$	18
N- <i>iso</i> -Propilbenzilamin	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}=\text{N}(\text{O})\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	13
N- <i>tert</i> -Butilbenzilamin	—	—
N-n-Butilbenzilamin	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}=\text{N}(\text{O})(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$	14
	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{N}(\text{O})=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$	2
N-Metil-p-klorobenzilamin	—	—

4.3. Oksaziridinlerin Sentezi

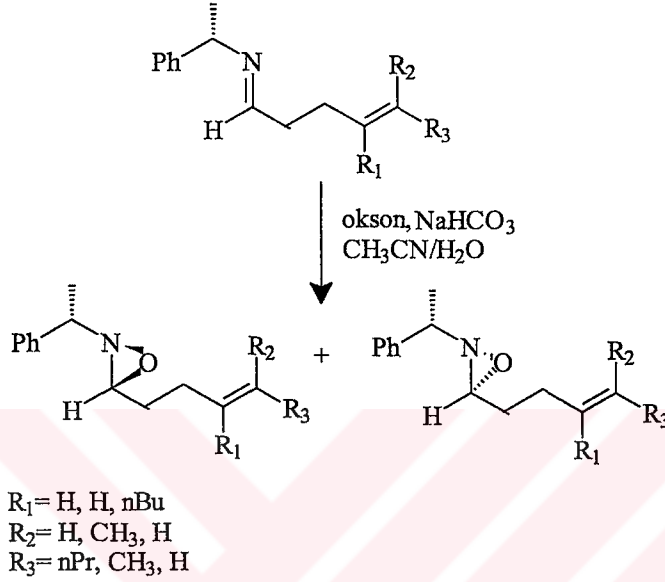
Nitronların yapı izomeri olan oksaziridinler oksijen-azot-karbon atomlarından oluşan üç üyeli halkalardır. Nitronlar ve azoksi bileşikleride üç üyeli halkalar şeklinde gösterilmelerine rağmen oksaziridinlerin elde edilerek tanımlanması Emmons tarafından gerçekleştirilmiştir.

Emmons (22,23) metilen klorür içerisindeki perasetik asit ile yine aynı çözelti içerisindeki iminlerin dikloroetanlı ortamda oksidasyonu sonucunda oksaziridinleri elde etmiştir. Araştırmacı oksaziridinlerin elde edilmesinde en önemli faktörün başlangıç maddesi olan iminlerin asidik ortamda stabil olmaları gerektiğini ve hidrolizi önlemek amacıyla reaksiyonun susuz çözücüler içerisinde yapılması gerektiğini bildirmişlerdir. Elde edilen oksaziridinlerin stabilitelerinin 2 ve 3 konumlarındaki sübstitüentlere bağlı olduğunu tespit etmiştir.

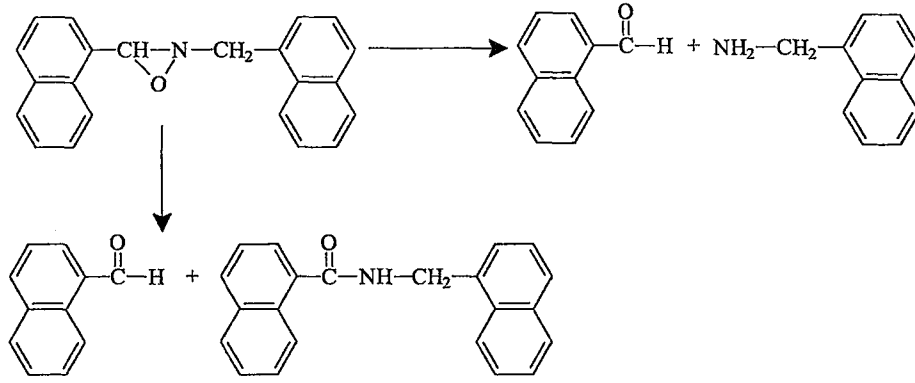


Larson ve ark. (47) N-fenildibenzoil nitronu p-ksilen çözeltisi ile ısıtarak N-fenildibenzoil oksaziridini elde etmişlerdir. Araştırmacılar daha önceki çalışmalarda nitronların termal reaksiyonlarla amidlere, fotolizle de oksaziridinlere dönüştüğünü tespit etmişlerdir.

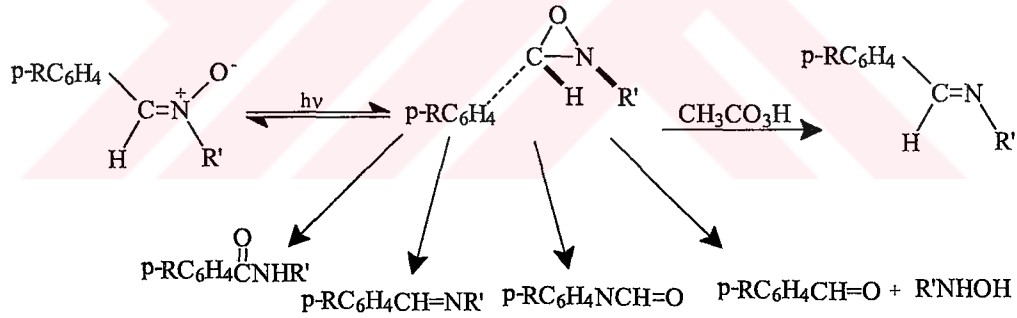
Armstrong ve Draffan (4) (S)- α -metilbenzilamin ve doymamış aldehytlerin reaksiyonları sonucu elde ettikleri Schiff bazlarını okson, sodyumbikarbonat ve CH₃CN/H₂O ile oksidasyonu sonucunda diastereoizomerik oksaziridinleri elde etmişlerdir.



Ohba ve ark. (58) N-(1-naftiliden)-1-naftelenmetilamin-N-oksidi azot gazı altında pyrex filtrelerle UV ışık altında bozulmasıyla 3-(1-naftil)-2-(1-naftelenmetil)oksaziridini elde etmişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri oksaziridin değişik solventlerdeki stabilitiesini araştırmışlar 3-(1-naftil)-2-(1-naftelenmetil) oksaziridin'in benzofenon içerisindeki asetonitril içeren çözeltisinin 2 saat oda temperaturünde bırakılması sonucu 1-naftilaldehit ve N-(1-naftoil)-1-naftelenmetilamin oluşurken, 9,10-disiyanoantrasen içerisindeki asetonitril içeren çözeltisinin oda temperaturünde bırakılmasıyla 1-naftilaldehit ve 1-naftalenilmetilaminin oluştuğunu bildirmişlerdir.



Splitter ve Calvin (76) N-alkil- α -aril ve N- α -diaril nitronların etanol, asetonitril, benzen gibi çözücüler içerisinde UV radyasyonun etkisiyle oksaziridinlere, ışınla süresinin uzatılmasıyla tamamen amidlere dönüştüğünü bildirmişlerdir. N-alkil- α -aril nitronlardan elde edilen oksaziridinler dayanıklı iken, N- α -diaril nitronlardan elde edilenlerin dayanıksız olduklarını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar oksaziridinlerin stabiliteilerinin çözücüye ve süstitüentlere bağlı olduğunuda bildirmişlerdir.



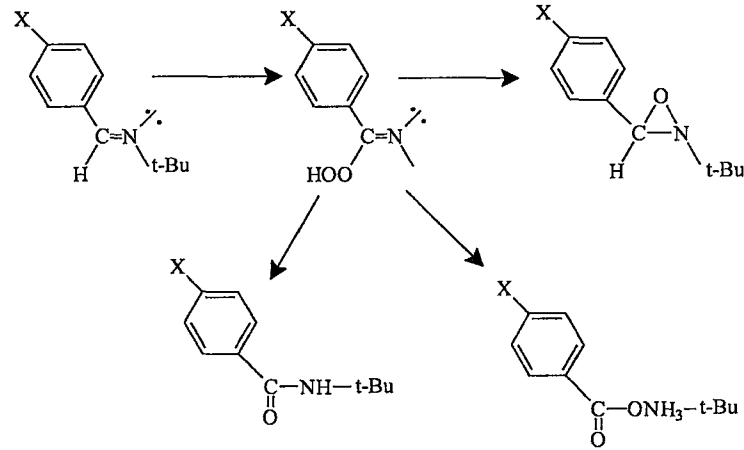
R= NO₂, NO₂, H, NO₂, H, (CH₃)₂N, , (CH₃)₂N, CH₃O, CH₃O

R'= C₂H₅, t-C₄H₉, t-C₄H₉, C₆H₅, C₆H₅, m-NO₂C₆H₅, C₆H₅, C₂H₅

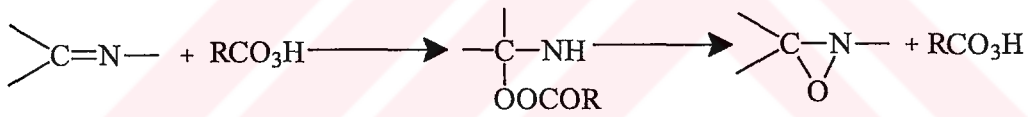
Shinzawa ve Tonako (74) α -N-difenil nitronların protik çözücülerde ışığa maruz bırakarak oksaziridinleri elde etmişler, fotoisomerizasyonun veriminin ortamdaki nitronun konsantrasyonuna, temperatüre, ışığa maruz bırakılma zamanı ile hidrojen bağının oluşumuna bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Auret ve ark. (6) iminlerin otoksidasyonu sonucunda stabil olmayan, çok reaktif nötral peroksi imidik asitlerin oluştuğunu ve bunlarla iminlerin reaksiyonu

sonucunda da amid ve oksaziridinlerin meydana geldiğini bildirmişlerdir.

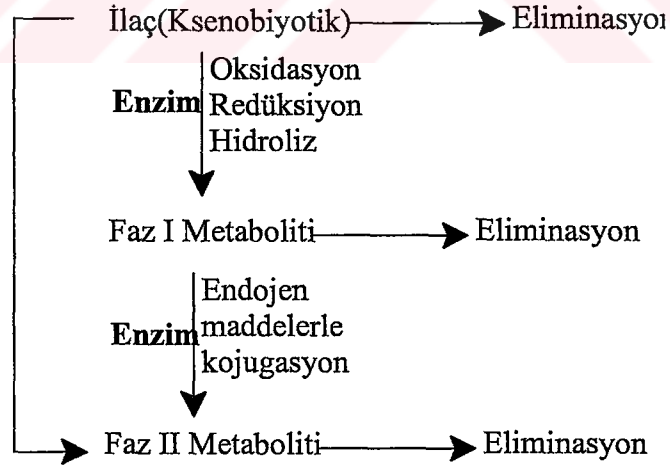


Ogata ve Sawaki (57) iminlerden perbenzoik asitlerle oksaziridinlerin oluşumunda reaksiyon kinetiğinin sübstitüentlere bağlı olduğunu ve reaksiyon mekanizmasının iki adımda yürüdüğünü tespit etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar karboksilik asit veya protik solventlerin reaksiyonu hızlandırırken, eter ve alkol gibi bazik solventlerin yavaşlattığını bildirmişlerdir.



İlaç Metabolizma Reaksiyonları

Birçok ilaç ve ksenobiyotik organizmadan elimine edilmeden önce metabolik reaksiyonlara uğrar. Bunlar faz-I (fonksiyonilizasyon) ve faz-II (konjugasyon) reaksiyonları olarak sınıflandırılırlar. Faz-I reaksiyonlarında molekül oksidasyon, redüksiyon veya hidrolize uğrayarak faz-I metabolitleri oluşur. Bunu sonucunda faz-I reaksiyonları ile molekülde faz-II reaksiyonlarına uğrayabilecek hidroksil (-OH), amino (-NH₂), tiyol (-SH) ve karboksil (-COOH) gibi fonksiyonel gruplar oluşur. Faz-I metabolitleri, faz-II reaksiyonu ile vücutta bulunan spesifik endojen maddelerle enzimatik reaksiyona uğrar ve faz-II metabolitleri oluşur. Konjugasyon reaksiyonları sonucu genellikle polar ve non-toksik karakterli (asetilasyon ve metilasyon hariç) metabolitler oluşur. İlaçlar normal olarak faz-I reaksiyonunu takiben faz-II reaksiyonuna uğrar. Bazen metabolize olacak fonksiyonel gruplar taşımayan veya çok polar olan bileşikler, metabolize olamadan veya faz-II reaksiyonuna uğramadan organizmadan direkt olarak elimine olabilir (52,67).



FAZ I REAKSİYONLARI

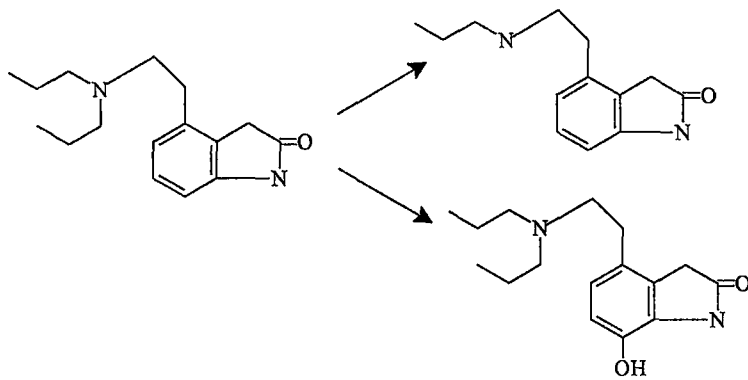
4.4 Oksidatif Reaksiyonlar

Bir çok ilaç ve ksenobiyotiğin organizmada eliminasyonunu sağlayan oksidatif reaksiyonlar aromatik, alifatik, alisiklik, benzilik, allilik hidroksilasyon, olefinlerin oksidasyonu, karbon-azot, karbon-oksijen ve karbon kükürt içeren yapıların oksidasyonu şeklinde yürümektedir. Bu reaksiyonlar pek çok enzim sistemi ile kataliz edilmektedir. En önemlisi mikrozomal enzim sistemi olup, en bilinen örnekleri sitokrom P-450'ye bağımlı karma fonksiyonlu oksidazlar (MFO) ve mikrozomal flavin momooksijenazlardır (FMO) . Diğer önemli enzimler flavoprotein olan NADPH-sitokrom-c-redüktaz (NADPH-sitokrom P-450 redüktaz) ve sitokrom-b₅'dir (33,43). Enzimlerin genel stokiyometrisi şöyle gösterilebilir (35,69).

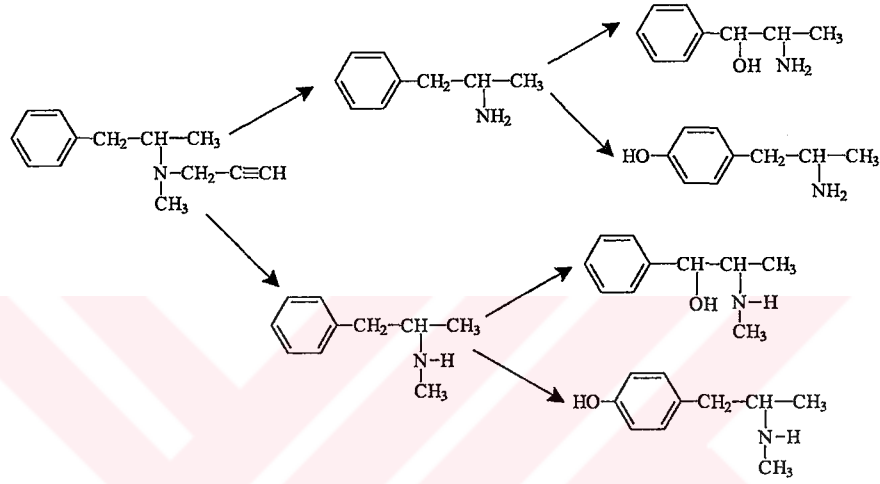


4.4.1 Aromatik, Alifatik ve Olefinik Karbon Atomlarının Oksidasyonu

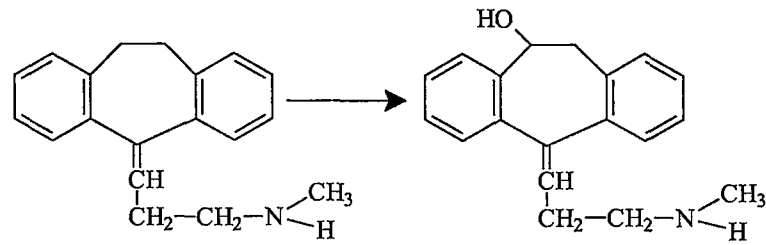
Bloomer ve ark. (10) parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan, dopamin D₂ reseptör a gonisti r epilnol'un *in vitro* metabolizması sonucunda N-despropilasyon ve aromatik oksidasyona uğradığını ve biyotransformasyondan sorumlu enzimin sitokrom P-450 bir alt fraksiyonları olan 1A2 ve 3A olduklarını tespit etmişlerdir.



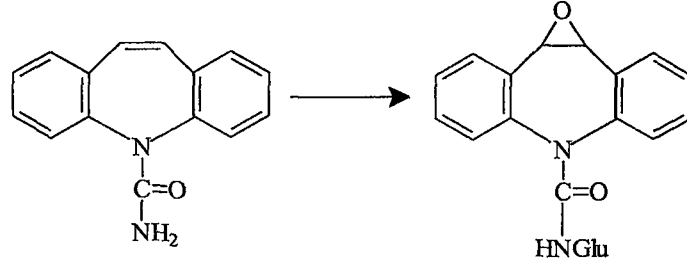
Shin (73) geriye dönüşümsüz bir monoamin oksidaz inhibitörü olan ve L-dopamin ile birlikte parkinson hastalığında kullanılan selegilin hidroklorür'ün [N-metil-N-proparjil(2-fenil-1-metil)etilamonyum klorür] insan idrarında *in vivo* metabolizması sonucunda major metabolitlerinin β -karbonunda hidroksilasyon ve aromatik hidroksilasyon olduğunu tespit etmiştir.



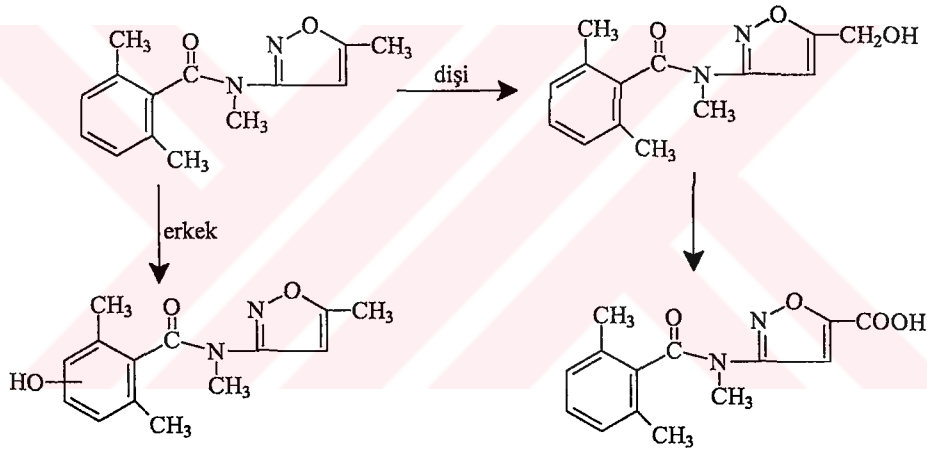
Trisiklik bir antidepresan olan nortriptilin'in (59) cDNA ile işaretlenmiş insan sitokrom P-450 isoenzimleri kullanılarak *in vitro* metabolizması çalışılmış ve en önemli biyotransformasyon yolunun hidroksilasyon olduğu tespit edilmiştir.



Maggs ve ark. (51) karbamazepin metabolizmasını antiepileptik hastaların idrarında GC/MS yardımıyla aydınlattıklarında 10,11-epoksit karbamazepin N-glukuronidi düşük miktarda tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

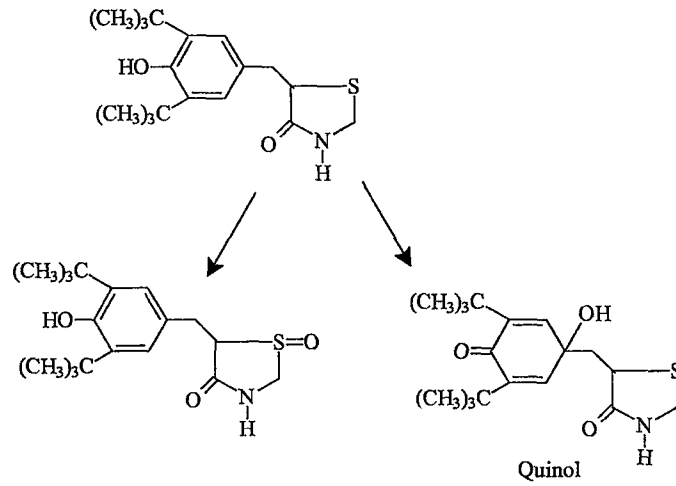


Maurizis ve ark. (55) antikonvülsan etkiye sahip 2,6-dimetilbenzamid-N-(5-metil-3-izoksazol)'un erkek ve dişi sıçanlarda metabolizmasının farklı olduğunu, erkek sıçanlarda fenil halkasına bağlı metil gruplarını oksidasyona uğrarken, dişi sıçanlarda izoksazol halkasına bağlı metil grupları oksidasyona uğradığını saptamışlardır.



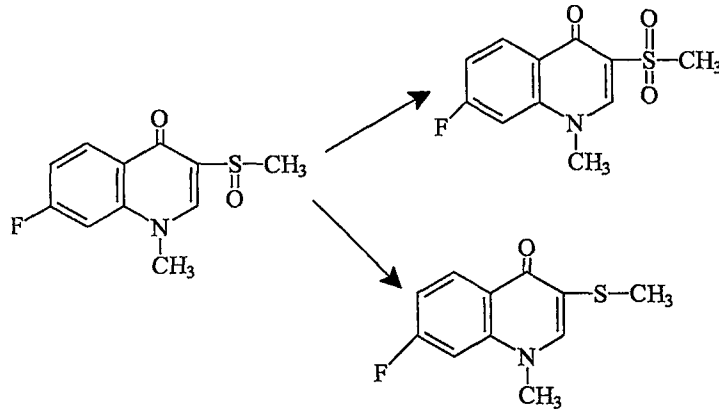
4.4.2 Karbon-kükürt içeren bileşiklerin oksidasyonu

Surapeni ve ark. (79) bağırsak hastalıklarında antiinflamatuvar etkili tazofelonun insan karaciğerinde *in vitro* metabolizması sonucu quinol ve sülfoksit metabolitleri gözlenirken *in vivo* metabolizması sonucunda sadece sülfoksit metabolitinin gözlendiğini tespit etmişlerdir.



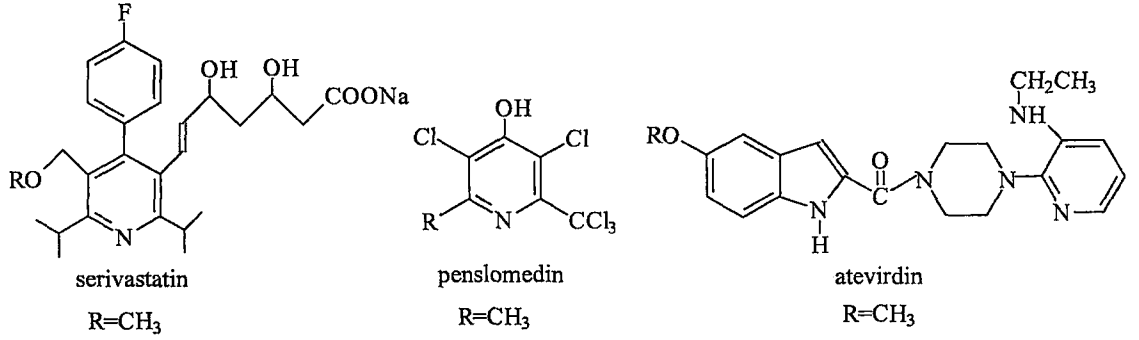
Antipiskotik ajan olarak kullanılan 5-[2-(4-(1,2-benzisotiyazol-3-il)piperazin-1-il)etil]-6-kloroindol-2-on hidroklorür hidrat'ın *in vivo* biyotransformasyonu sonucunda önce sülfoksit daha sonrada sülfon metabolitlerine dönüştüğünü tespit etmişlerdir (66).

Kashiyama ve ark. (44) periferik vazodilatör olarak kullanılan floseqinan'ın [(±)-7-floro-1-metil-3-metilsülfinil-4-quinolon] dişi ve erkek sıçanlarda *in vitro* metabolizmasını karaciğerden hazırlanan mikrozomal preparatları kullanarak yapmışlar ve erkek sıçanlarda S-oksidasyon metabolitini dişi sıçanlara göre daha yüksek konsantrasyonlarda elde etmişlerdir.



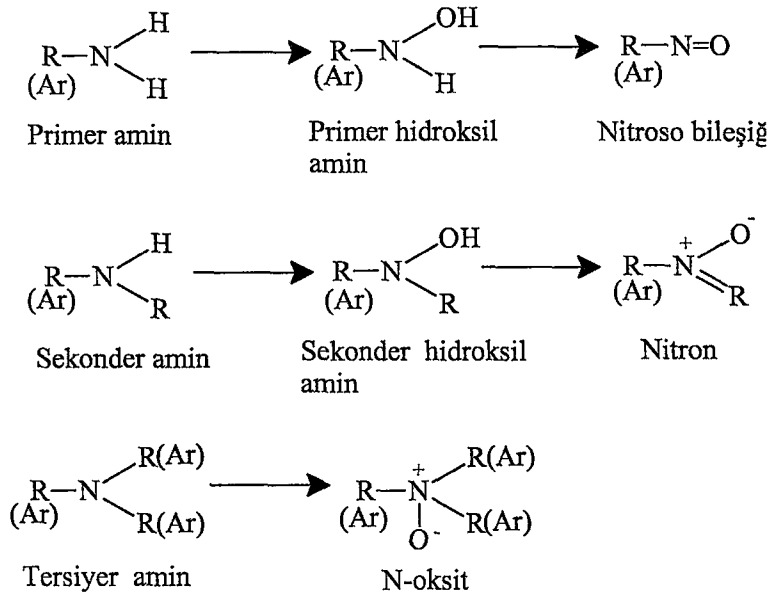
4.4.3 Karbon oksijen içeren yapılarda oksidasyon

Hiperkolestrolemede kullanılan serivastatin hidroklorür (11), antitümoral ajan olan penslomedin (41) ve HIV-1 inhibitörü olan atevirdin (14) O-demetilasyona uğrayarak karşılık gelen fenolik metabolitlerine dönüşürler.

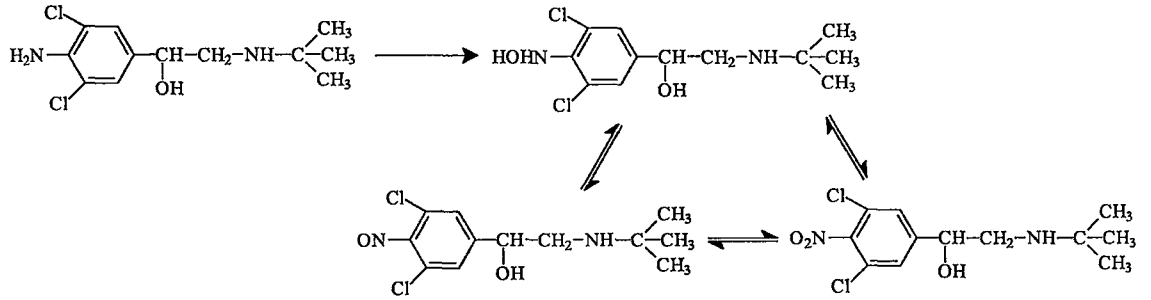


4.4.4 Karbon-azot bileşiklerinin oksidasyonu

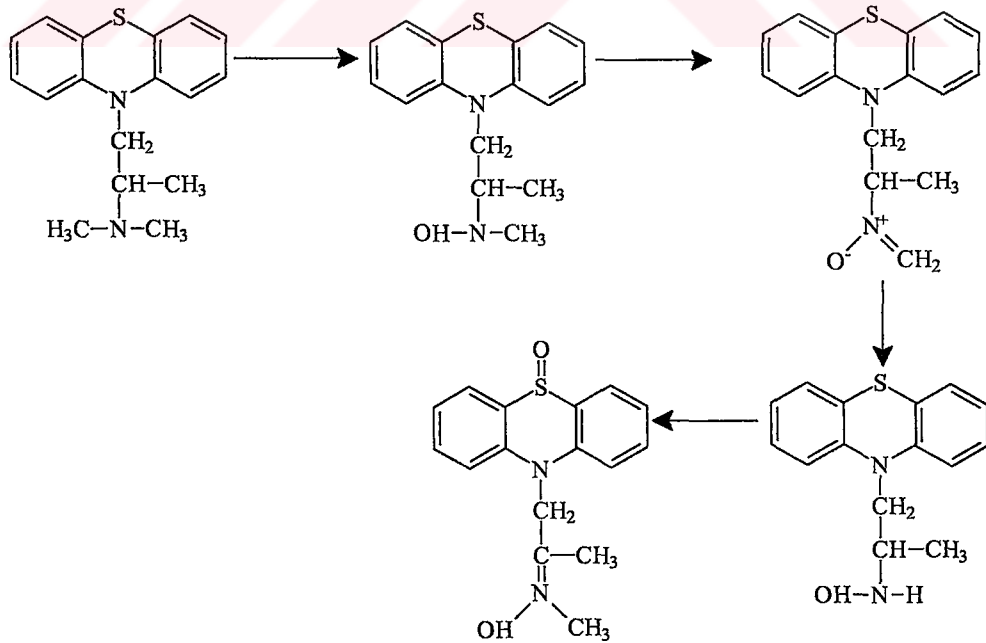
Primer, sekonder, tersiyer alifatik (aromatik) aminler, heterosiklik azot veya amid fonksiyonel gruplarına sahip bileşikler oksidatif N-dealkilasyon, N-hidroksilasyon veya N-oksidasyona uğrayarak metabolize olurlar.



Zalko ve ark. (92) hayvanlarda bronkospazmolitik olarak kullanılan slenbuterol'un dişi ve erkek sıçanlarda *in vivo* metabolizması sonucunda oluşan hidroksil amin, nitroso ve nitro metabolitlerinin kimyasal olarak stabil olmadıklarını saptamışlardır.

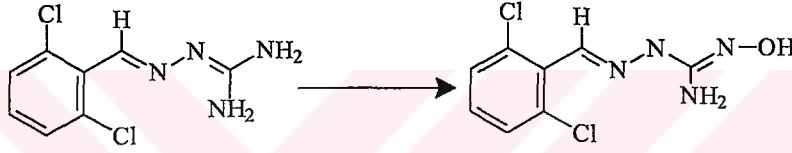


Clement ve ark. (16) antihistaminik bir ilaç olan prometazin'in domuzlarda *in vitro* metabolizmasını karaciğerden hazırlanan mikrozomal preparatları kullanarak yapmışlar ve prometazin'in sekonder hidroksilamin, nitron, N-hidroksididesmetilprometazin ve oksim sülfoksite dönüştüğünü tespit etmişlerdir.

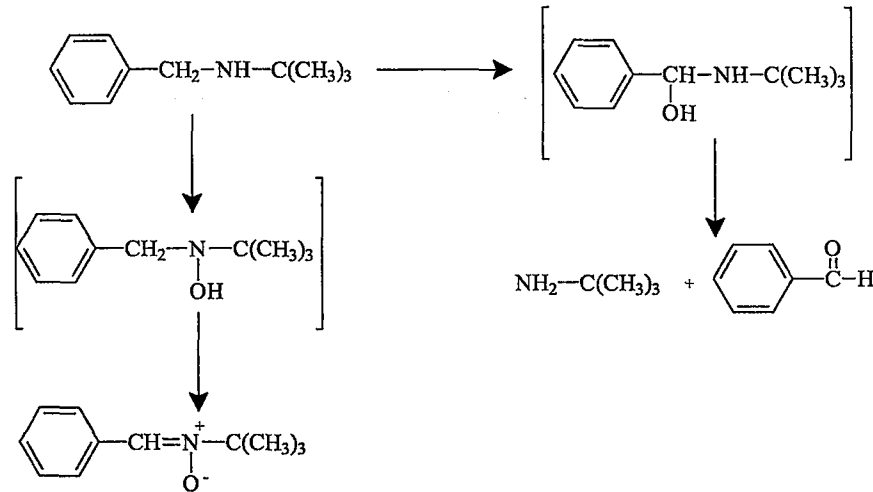


Antipsikotik ilaç olan olanzapin'in (2-metil-4-(4-metil-1-piperazinil)-10H-tiyon [2,3-B] [1,5]benzodiazepin) maymun idrarında 2-hidroksimetilolanzapin N-oksit metaboliti gözlenirken, insan, köpek ve sıçan idrarında N-oksit metaboliti gözlenmiştir (54).

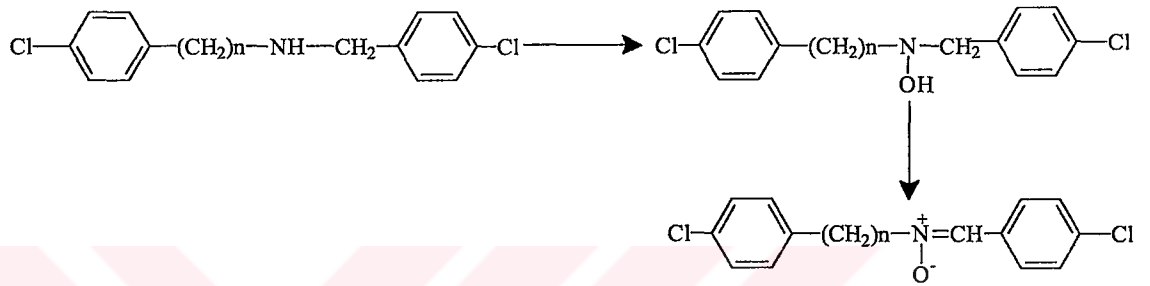
Clement ve Demesmaeker (15) 1-(2,6-diklorobenzilidenamino)guanidin'i model bileşik olarak kullandıkları çalışmalarında insan karaciğerinden elde edilen mikrozomların inkübasyonu sonucu olarak elde edilen N-hidroksilasyonun sitokrom P-450 enzim sistemi tarafından gerçekleştirildiğini tespit etmişlerdir.



Ülgen ve ark. (87) N-benzil-ter-butilamin'in mikrozomal metabolizması sonucu benzil grubunu dealkilasyonuyla benzaldehit'in ve muhtemelen sekonder hidroksilamin bileşiği üzerinden oksidasyonla α -fenil-N(ter-butil)nitron'un oluştuğunu bildirmişlerdir.



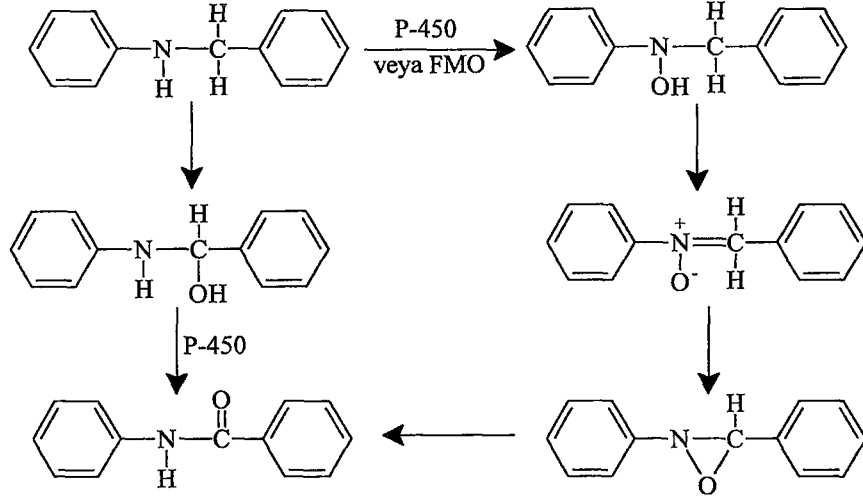
Küçüküzü ve ark. (46) N-(4-klorobenzil)-4-kloroanilin ve N-(4-klorobenzil)-4-klorobenzilamin'in sıçanlarda *in vitro* metabolizmasını karaciğerden hazırlanan mikrozomal preparatları kullanarak yapmışlar ve N-oksidasyon ürünleri olan hidroksilamin ve nitron metabolitleri ile dealkilasyon metabolitini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar metabolizma sonucu oluşan nitronların stabil olmaları nedeniyle amid metabolitinin oluşmadığını bildirmişlerdir.



N-(4-klorobenzil)-4-kloroanilin n=0

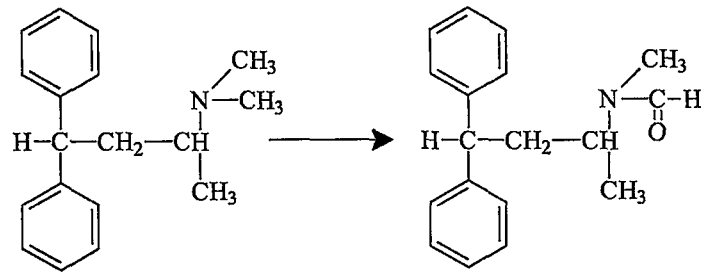
N-(4-klorobenzil)-4-klorobenzilamin n=1

Gooderham ve Gorrod (28,29,34) N-benzil-4-sübstitüe anilin'lerin sıçan, hamster, fare, kobay ve tavşan gibi deney hayvanlarında *in vitro* metabolizması sonucunda N-dealkilasyon, aromatik hidroksilasyon, ve N-oksidasyon reaksiyonlarının gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Sadece N-benzil-4-kloroanilin'in N-oksidasyonu ile oluşan N-benzil-4-(klorofenil)hidroksilamin'in oluştuğunu bununda oksidasyonla α -fenil-N-(sübstitüefenil)nitron'a dönüştüğünü belirtmişlerdir. N-Debenzilasyon reaksiyonunun sitokrom P-450 tarafından, N-oksidasyonun ise hem sitokrom P-450 hem de flavin içeren monooksijenazlar tarafından katalizlendiğini tespit etmişlerdir.

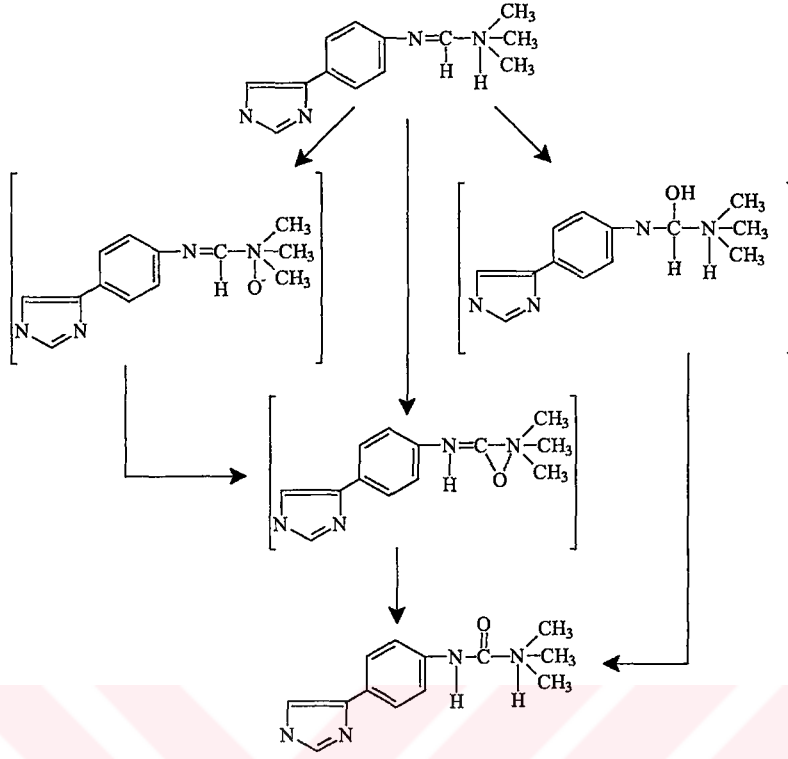


Ülgen ve ark (83,86) süstitüe N-benzilanilinlerin *in vitro* metabolizması sonucunda N-debenzilyasyon, aromatik hidroksilasyon, ve N-hidroksilasyon reaksiyonlarının gerçekleştiğini bildirmişler ve N- ve C-oksidasyon yolunun hem anilin hem de benzil halkasındaki süstitüentlere bağı olduğunu saptamışlardır. Substrata bağı bulunan metil gruplarının elektron verici veya sterik etkilerinin amid oluşumunu arttırdığı, anilin halkasında bulunan halojenlerin ise amid oluşumunu engellediğini tespit etmişlerdir.

(+)-3-Dimetilamino-1,1-difenilbutan hidroklorür'ün (resipavrin) sıçanlardaki metabolizması sonucunda oluşan formamidin isomerik nitronun yerdeğiştirmesi sonucunda oluştuğı düşünölmüştür (75).



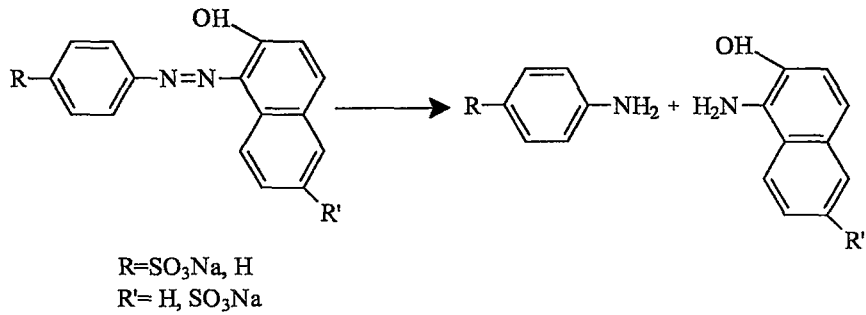
Mifentidin'in enzimatik N-oksidasyonu sonucu oluşan üre metabolitinin dayanıklı olmayan oksaziridinin kimyasal yer değıştirmesi sonucu oluşmuş olabileceğı düşünölmüştür (62).



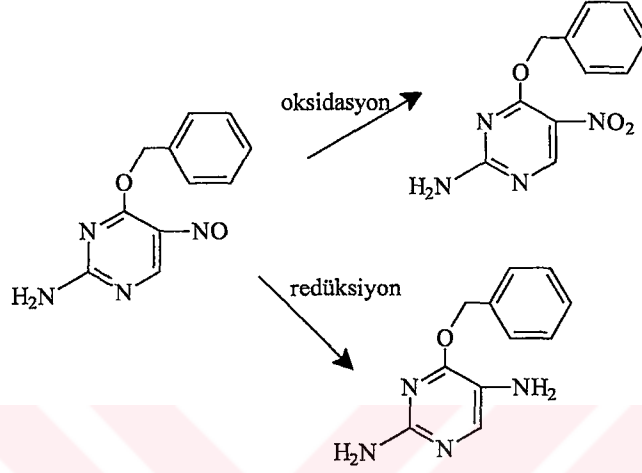
4.5 Redüksiyon

Karbonil, azo ve nitro grubu içeren ksenobiyotiklerin biyoredüksiyonu ile alkol ve amin türevi metabolitler meydana gelmektedir.

Wever ve ark. (90) azo boyar maddeler olan 1-(4-sülfo-1-fenilazo)-2-naftol-6-sülfonik asit disodyum tuzu ve 1-(4-sülfo-1-fenilazo)-2-naftol-6-sülfonik asit sodyum tuzunun olası mutajenik etkilerini incelemek amacıyla sıçan idrar, feçes ve safrasında metabolizmasını incelemişlerdir. Azo grubunun redüksiyonu ile sülfonik asit ve 1-amino-2-naftol metabolitlerinin oluştuğunu tespit etmişlerdir.



Roy ve ark. (69) 2,4-diamino-6-benziloksi-5-nitrosopirimidin'in sıçanlarda *in vitro* metabolizmasını karaciğerden hazırlanan mikrozomal preparatları kullanarak yapmışlar ve nitroso grubunun oksidasyon ve redüksiyon metabolitlerini tespit etmişlerdir.

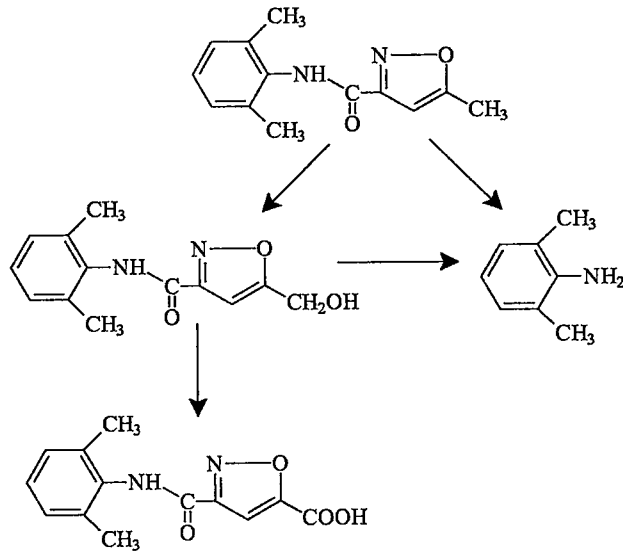


4.6 Hidroliz

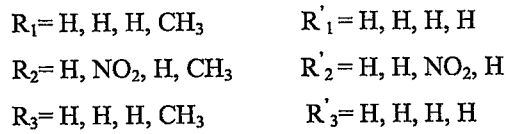
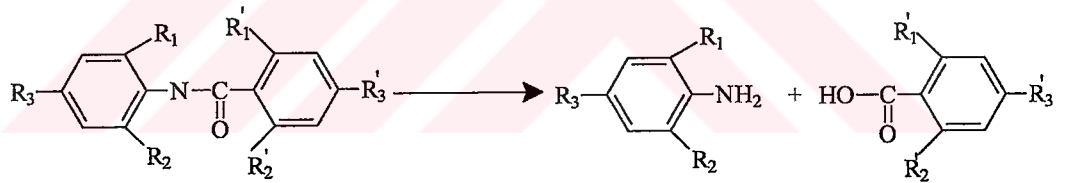
Birçok ilacın yapısında bulunan esterler ve amidler kan, karaciğer, böbrekler ve diğer dokulardaki enzimler tarafından hidrolize uğrayarak karboksilli asitler, alkoller, fenol ve amin türevi metabolitlere dönüşürler.

Gordon ve ark (30) kanser tedavisinde antiemetik ilaç olarak kullanılan serotonin antagonisti 8-metil-8-azobisiklo-[3,2,1]oktan-3-il 3,5-diklorobenzoat'ın *in vivo* metabolizması sonucunda hidrolize uğrayarak 3,5-diklorobenzoik asit metabolitinin gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

Antikonvülsan aktiviteye sahip N-(2,6-dimetilfenil)-5-metil-3-isoksazol karboksamid'in sıçan ve insan karaciğer mikrozomal preparatlarını inkübasyonu sonucunda oksidasyona ve hidrolize uğradığını tespit etmişlerdir (53).



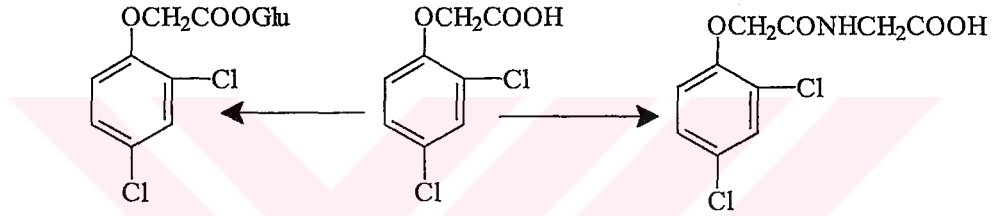
Ülgen ve ark. (85) çeşitli süstitüe benzanilidlerin *in vitro* olarak hamster karaciğer mikrozomlarıyla hidrolize uğradıklarını sadece N-benzoil-2,4,6-trietilanilin'in hidrolize dirençli olduğunu bu durumun da metil gruplarının elektron verici ve sterik etkilerinden dolayı meydana geldiğini bildirmişlerdir.



4.7 FAZ II REAKSİYONLARI

Faz II reaksiyonları polar endojen yapıların transferaz enzimlerinin yardımıyla ksenobiyotikler veya onların metabolitlerine bağlanmasını amaçlayan reaksiyonlardır. En önemli faz II reaksiyonları; glukuronik asit, glutatyon, amino asit, sülfat konjugasyonu, metilasyon ve asetilasyondur.

Griffin ve ark. (38) herbesit olarak kullanılan 2,4-diklorofenoksiasetik asit'in glisin ve glukuronik asit konjugasyonuna uğradığını sıçan, maymun ve hamsterlarda yapılan *in vivo* çalışmalarla belirlemişlerdir.



Konjektif kalp yetmezliğinde intropik ajan olarak kullanılan (\pm)-6-[3-(3,4-dimetoksibenzilamino)-2-hidroksipropoksi]-2(1H)-qinolinon'un (toborinon) sıçanlarda *in vivo* metabolizması sonucunda O-demetilasyona uğradıktan sonra glukuronik asit ve sülfat konjugatları meydana gelirken, köpeklerde sistein konjugatının oluştuğunu saptamışlardır (45).

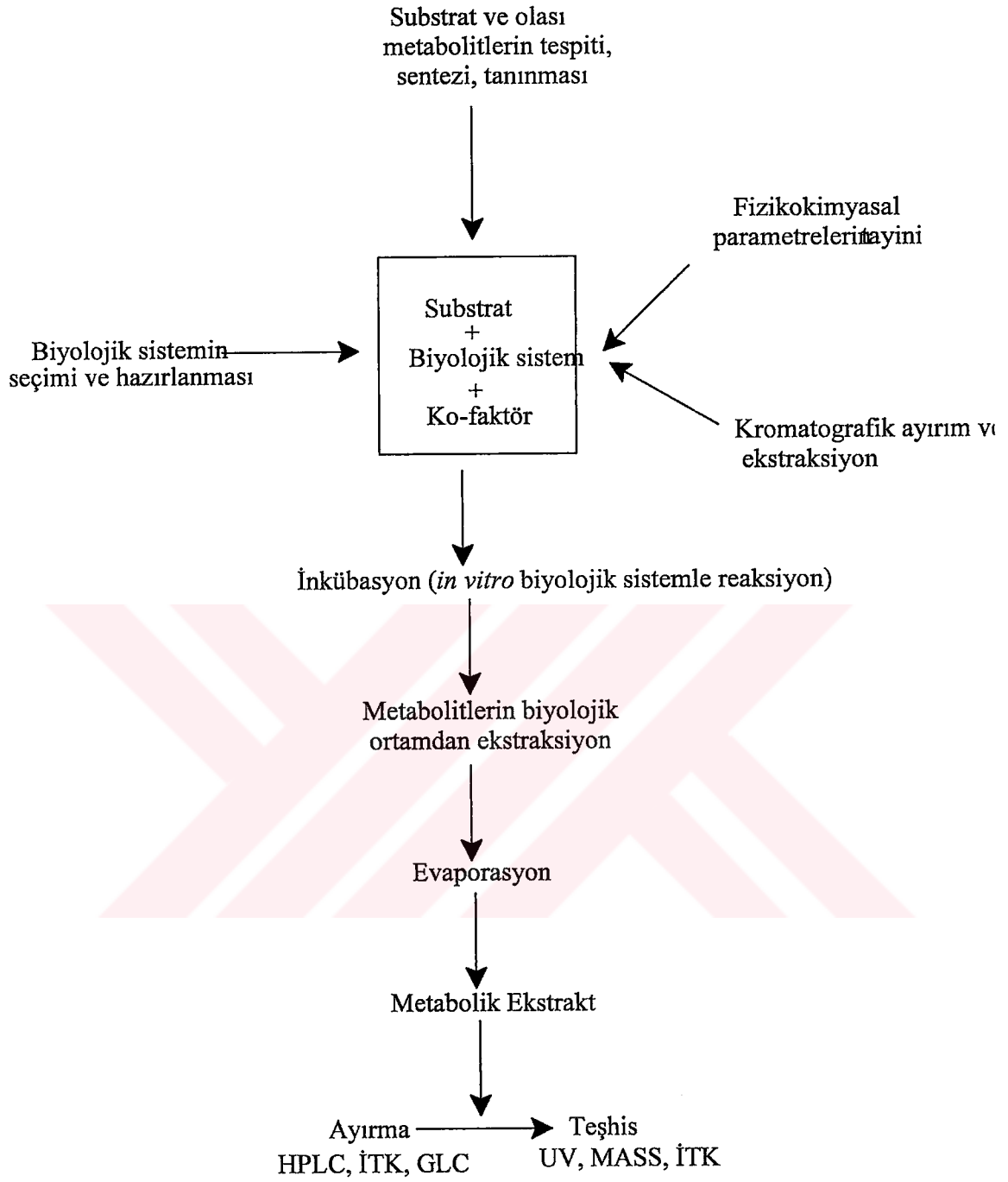
Yu ve ark. (91) balıklarda inflamasyonda kullanılan proflavin'in (3,6-diaminoakridin) *in vivo* metabolizması sonucunda major metabolit olarak 3-N-glukuronidil proflavin, 3-N-glukuronidi, 6-N-asetilproflavin ve 3-N-asetil proflavin'i tespit etmişlerdir.

4.8 *İn vitro* Mikrozomal Metabolizma Tekniklerinin Önemi

İlaçlar veya diğer ksenobiyotiklerin metabolizmalarının araştırılmasında *in vivo* tekniklerin yanında *in vitro* mikrozomal tekniklerde kullanılmaktadır. Metabolik yolların kompleks olması halinde, bu metabolitleri eliminasyon ürünlerinden saptamak çoğu zaman mümkün olmayabileceğinden *in vivo* çalışmalarla metabolizmanın ilk ürünleri olan primer metabolitler gözlenemez (81). Bu nedenlerden dolayı hem metabolitleri tanımlamak hem de metabolitlerin oluşumundan sorumlu enzimleri ortaya çıkarmak için *in vivo* deneylerden önce *in vitro* deneyler yapılır. *İn vitro* deneylerde izlenmesi gereken safhalar şekil1'de gösterilmiştir. *İn vitro* teknikte, hücre alt fraksiyonlarının (sitosol, mitokondri, mikrozomal fraksiyonlar) santrifüjleme yöntemi ile ayrılmasından yararlanır. Bunlar karaciğerin endoplazmik retikulumunda bulunurlar ve çeşitli enzimleri taşırlar.

4.8.1 Ön Ekstraksiyon Denemeleri

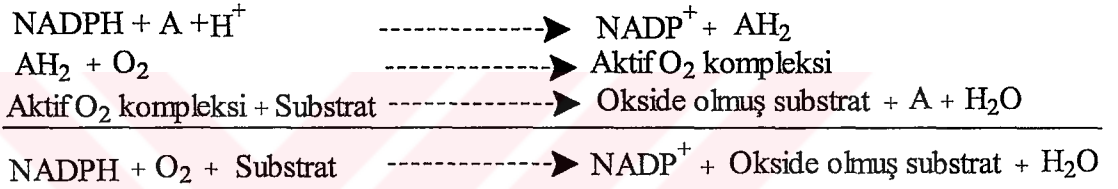
Substrat ve metabolitlerin, çeşitli analiz teknikleri uygulanarak metabolizma deneyi sonrası tanımlanabilmesi için sulu fazdan organik faza geçirilmesi gerekmektedir. Biyolojik örneklerden, substrat ve metabolitlerin ayrımında kullanılan iki farklı yöntem vardır. Bunlardan ilki sıvı-sıvı ekstraksiyonu diğeri ise sıvı-katı ekstraksiyonudur. Sıvı-sıvı ekstraksiyonda; substrat ve metabolitlerin nötral, asidik ya da bazik olabilmesi nedeniyle bazı durumlarda ilgili metabolitin sulu sistemden organik faza geçişini kolaylaştırabilmek için ortamın pH'ı ayarlanabilir. Ayrıca ekstraksiyon yapılmadan önce inkübasyon ortamına sodyum klorür ilave edilemesi polar özelliğe sahip metabolitlerin, metabolize olmayan substratla birlikte sulu fazdaki çözünürlüklerinin azaltılmasını ve suda çözünürlüğü yüksek olan metabolitlerin organik faza yönelmesini sağlayacaktır (8,18, 33, 36). Ekstraksiyon çözücüsünün seçiminde ekstre edilecek bileşiğin çözücü içerisindeki stabilitesi, toksisitesi, ekstraksiyon gücü ve ekstraksiyon solventinin saflığı önemlidir. Günümüzde sıvı-katı ekstraksiyon için Sep-pak C₁₈ kartuşlar kullanılmaktadır.



Şekil 1: *In vitro* ilaç metabolizmasında izlenecek safhalar

4.8.2 Mikrozomal Preparatın Hazırlanması ve Standart Ko-Faktör karışımları

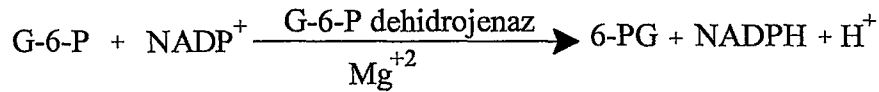
Steroidlerin, yağ asitlerinin ve ksenobiyotiklerin metabolizmasını yürüten sitokrom P-450 izoenzimleri ve mikrozomal flavin monoooksijenazlar (MFMO), aktiviteleri için redüklenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), moleküler oksijen ve magnezyum iyonlarına gereksinim duyarlar. NADPH'ın görevi mikrozomlarda bulunan ve oksijen ile aktif bir oksijen ara ürünü yapan bunu da substrata transfer eden bir komponenti redüklemektir. Bu sisteme karma fonksiyonlu oksidaz (MFO) denir. Bu reaksiyon sırasında bir atom oksijen substrata diğer atom ise suya gider (81).



A : Mikrozomal komponentin okside olmuş şekli

AH₂ : Mikrozomal komponentin redüklenmiş şekli

Çoğu metabolizma reaksiyonlarında NADPH gereksinimi olduğundan bu madde inkübasyon ortamına direkt ilave edilebilir veya çok pahalı olduğu için kimyasal olarak sentezlenebilir.



G-6-P : Glukoz-6-fosfat

NADP⁺ : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

6-PG : 6-fosfoglukonolakton

NADPH : Redüklenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

Bu reaksiyonda G-6-P dehidrojenaz enzimi ancak magnezyum iyonları varlığında aktivite gösterebilir.

4.8.3 Karaciğer Mikrozomal Preparatının Hazırlanması

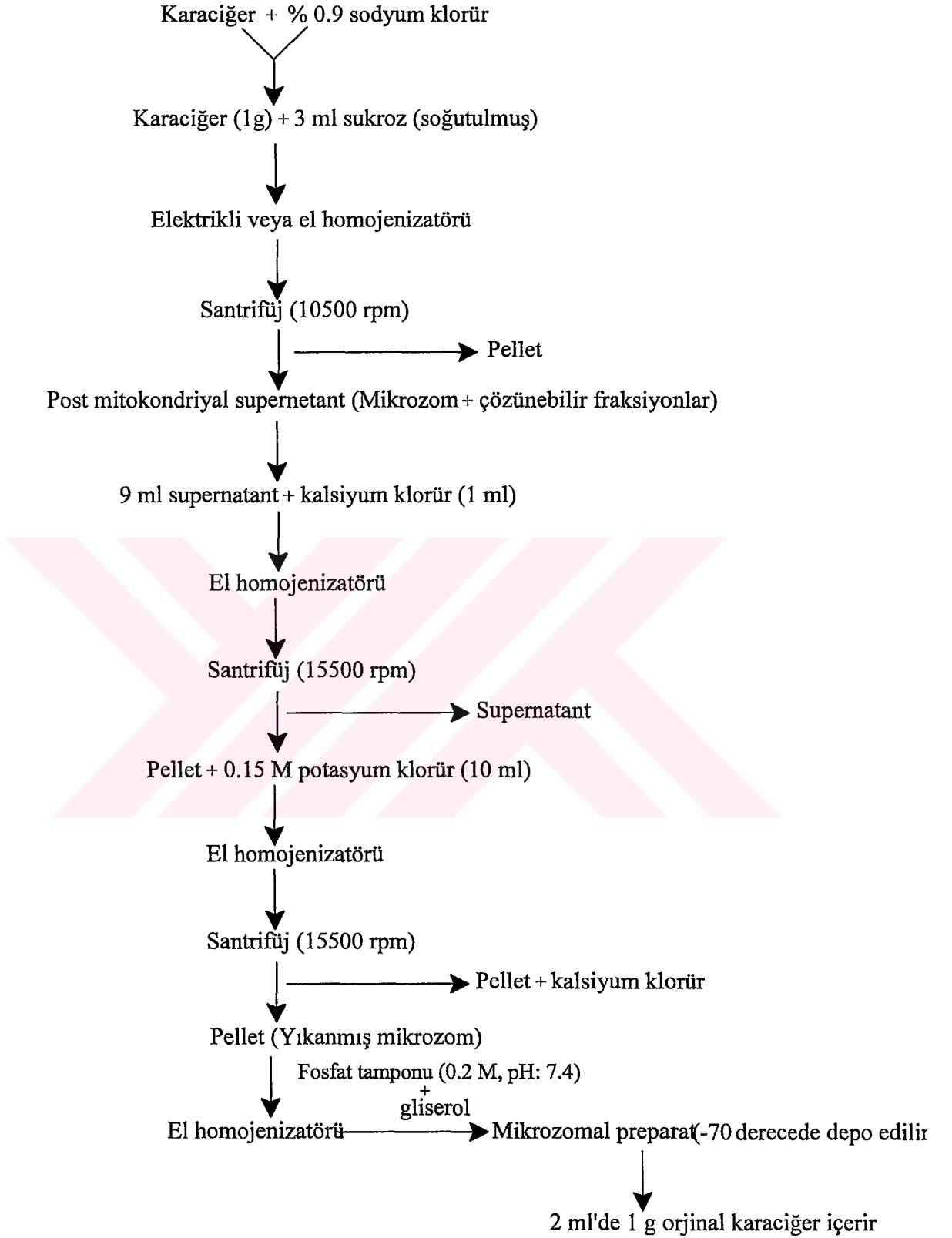
Mikrozomal preparatlar sıçan, kobay, tavşan, maymun ve domuz gibi deney hayvanlarının karaciğerinden hazırlanabilir. Santrifüj sırasında mikrozomların kaybolmaması için deneyde kullanılacak hayvanlar 24 saat aç bırakılarak glikojen seviyeleri azaltılıp yalnızca su verilir. Karaciğer çıkartıldıktan sonra bütün işlemler buzda yapılır, çözelti ve malzemelerle soğuk şartlarda çalışılır. Mikrozomal preparatın hazırlanması için günümüzde gelişmiş bir yöntem olan kalsiyum klorürle çöktürme yöntemi kullanılır. Bu yöntemin esası endoplazmik retikulum fragmentlerinin sırayla santrifüjüne dayanır (81). Çalışma sırasında %0.9 sodyum klorür, 0.25 M sukroz, 80mM kalsiyum klorür, 0.15 M potasyum klorür ve 0.2 M pH: 7.4 fosfat tamponu kullanılır.

4.8.4 Standart Ko-faktör Karışımları ve Ön İnkübasyon

Aromatik hidroksilasyon, epoksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları için tablo 1'de belirtilen ko-faktör karışımları kullanılır. Bu maddeler 25 ml'lik bir inkübasyon erleni için 2ml, pH: 7.4 fosfat tamponunda çözülerek inkübasyon yapılmadan kısa bir süre önce hazırlanır. Ancak G-6-P dehidrojenaz bu karışım içerisinde bekletildiği takdirde çok çabuk deaktive olduğu için ön inkübasyondan hemen önce ko-faktör çözeltisine ilave edilir. Tüm ko-faktörler 37°C'lik çalkalayıcı su banyosunda (inkübatörde) 5 dakika inkübe edilirler böylece ön inkübasyonla NADPH üretimi sağlanır.

KO-FAKTÖR	MİKTAR
NADP disodyum	1.57 mg(2 µmol)
G-6-P disodyum	3.04 mg (10 µmol)
G-6-P dehidrojenaz	1.40 µl (1 ünite)
MgCl ₂ (% 50 a/a)	8.00 µl(20 µmol)

Tablo 1- Oksidatif mikrozomal metabolizma çalışmalarında kullanılan standart ko-faktör karışımları ve miktarları



Şekil 2: Mikrozomal Preparatın Hazırlanması

4.8.5 İnkübasyon

İnkübasyon, metabolizması çalışılacak bileşiğin (substratın) ko-faktörler varlığında mikrozomal preparatla vücut ısısında (37°C) reaksiyona sokulmasıdır. Bir inkübasyon erleni veya tüpü başına standart inkübasyon ortamına ilave edilecek substrat miktarı genellikle 2-5 µmol/50 µl'dir.

Substratı çözmek için su, metanol, 2-metoksietanol veya dimetilsülfoksit kullanılabilir. Bu deneylerde test erleninin yanında denatüre mikrozomların kullanıldığı ya da ko-faktörlerin ilave edilmediği kontrol erleni de düzenlenir. Bu şekilde kontrol deneyleri de kullanılarak yapılan inkübasyonda metabolitlerin enzimatik ya da kimyasal olarak oluştuğu belirlenir. Deneyler istatistiksel hataları önlemek ya da meydana gelebilecek kayıplar açısından en az ikili ya da üçlü halde paralel halde yürütülür. Bütün reaksiyon şartları daha önce belirtildiği şekilde hazırlandıktan sonra substratlar 37°C'lik çalkalayıcı su banyosunda yarın saat inkübasyona tabi tutulur. Çeşitli hayvan türleri arasında enzimatik farklılıklar bulunabileceğinden, farklı deney hayvanlarında tekrarlanmak suretiyle kalitatif olarak saptanan metabolitler ve tespit edildikleri hayvan türleri tablo halinde kaydedilir.

İnkübasyondan sonra substrat ve metabolitlerin kromatografik yöntemlerle ayrılabilmesi için onların biyolojik sistemden organik çözücüye çekilmesi gerekir. Metabolizma çalışmasında en iyi verimle bunu sağlayabilecek ekstraksiyon çözücüsü önceden yapılan denemelerle tespit edilir.

4.8.6 Biyolojik Sistemden Ekstraksiyon ve Evaporasyon

Enzimatik reaksiyon, önceden tespit edilmiş ekstraksiyon çözücüsü ilave edilerek durdurulur. Eğer substrat kuvvetli hidrofilik ise her tüpe genellikle 1 g sodyum klorür eklenerek sudaki çözünürlük azaltılır (8,18, 33).

İçerisinde değişmeden kalan substrat, metabolitler ve organik fazın karışımını içeren tüpler önce vortex tüp karıştırıcısı ile sonra 15 dakika tüp çalkalayıcısı ile

karıştırılır. Tüp içerikleri 5-110 dakika santrifüjlendikten sonra organik fazların toplanmasını takip eden işlem iki kez yapılır ve toplanan organik fazlar düşük sıcaklıktaki su banyosunda ya da azot gazı altında uçurulduğunda metabolik ekstraktlar elde edilir. Metabolik ekstraktların kromatografik sistemlere uygulanmasından sonra metabolitler, standartları ile karşılaştırılarak tayin edilebilirler



5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1 Araç ve Gereçler

5.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Aseton (Merck), asetonitril (Merck), etil alkol, eter (Merck), diklorometan (Merck), isopropilamin (%99, d: 0.687, Merck), 4-klorobenzaldehit (Merck), 4-klorobenzoil klorür (%98, d: 1.242, Merck), kloroform (Merck), 3-kloroperbenzoik asit (Merck), metil alkol (Carlo Erba), 4-nitrobenzaldehit (Merck), 4-nitrobenzoil klorür (Merck), petrol eteri (Merck), potasyum karbonat (Merck), silikajel plaklar (Merck Kieselgel 60 F-0.2 mm), sodyum borohidür (Merck), sodyum sülfat (Merck), Sodyum nitrit (Merck).

5.1.2. Kullanılan Elektronik Cihazlar

Ultraviyole Spektrofotometre	Beckman UV 530
Infrared Spektrofotometre	Perkin Elmer 1600 FITR
Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometre.....	Bruker AVANC-DPX 400 ve BrukerAC 200L Krotas MS-9/50

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi: Agilent 1100

Enjektör : Rheodyne Model 7125

Dedektör : Diode-Array

Kaydedici : Unicam 4880 Chromotography Data Handling System

5.2 Genel Sentez Yöntemleri

5.2.1 N-(4-nitro/ klorobenziliden)isopropilamin [1a,1b]

4-Nitro/klorobenzaldehit'in metanollü çözeltisine 0.01 mol isopropilamin ilave edilerek geri çeviren soğutucu altında su banyosunda bir buçuk saat ısıtılır. Oluşan çökelti süzülür, kurutulur ve metanolden billurlandırılır.

5.2.2 N-(4-nitro/klorobenzoil)isopropilamin [2a, 2b]

2N Sodyum hidroksit çözeltisi içerisindeki isopropilamin'in üzerine 4-kloro/nitrobenzoil klorür porsiyonlar halinde ilave edildi ve magnetik karıştırıcıda 20 dakika çalkalandı. Daha sonra oluşan katı ürün bol su ile yıkandı. Kurutulan ham ürün etanolden billurlandırılarak saflaştırıldı (12, 49, 85).

5.2.3 N-(4-nitro/klorobenzil)isopropilamin [3a, 3b]

N-(4-nitro/klorobenzilidenamino)isopropilamin küçük bir cam balona alınarak mümkün olan en az miktarda metanolde çözüldü. Oda sıcaklığında tutulan ve bir manyetik karıştırıcıyla sürekli karıştırılan bu çözeltiye hesaplı miktarda sodyum borohidrür, küçük porsiyonlar halinde 30 dakika içinde ilave edildi. Sodyum borohidrür'ün tamamı ilave edildikten sonra reaksiyona 15 dakika daha devam edildi. Reaksiyon bitiminde soğumaya bırakılan reaksiyon karışımı üzerine damla damla su ilave edilerek sodyum borohidrür'ün aşırısı dekompoze edilip ve dietileterle ekstre edildi. Eterli çözelti susuz sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra çözücünün uçurulması ile kazanılan ham ürün petrol eteri ile yıkanarak saflaştırıldı (9, 50).

5.2.4 α -(4-nitro/klorobenzil)-N-isopropil oksaziridin [4a, 4b]

N-(4-nitro/klorobenziliden)isopropilamin 10 ml diklorometanda çözülerek küçük bir cam balona alındı. Reaksiyon kabı ışıktan korunmak için alüminyum folyo ile kaplandı. Manyetik karıştırıcıyla karıştırılan bu çözeltiye 3-kloroperbenzoik asidin 10 ml diklorometandaki çözeltisi damla damla ilave edildi. Reaksiyon hafifçe ısıtılarak

4 saat karıştırıldı. Diklorometanlı çözelti 0.5 M potasyum karbonat çözeltisi ile üç defa yıkandı. Organik faz ayrılarak çözücü alçak basınç altında uçuruldu. Ham ürün petrol eteri ile yıkanarak safsızlıklarından uzaklaştırıldı (22, 23).

5.2.5 α -(4-nitro/klorobenzil)-N-isopropil nitron [5a,5b]

N-(4-nitro/klorobenzil)isopropilamin 10 ml asetonda (potasyum karbonatla kurutulmuş) çözülerek küçük bir cam balona alındı. Reaksiyon kabı ışıktan korunmak için alüminyum folyo ile kaplandı. Bir manyetik karıştırıcıyla sürekli karıştırılan bu çözeltiye hesaplı miktar 3-kloroperbenzoik asidin 10 ml asetondaki çözeltisi damla damla ilave edildi. Karıştırmaya 4 saat daha devam edildikten sonra aseton alçak basınç altında oda sıcaklığında uçuruldu. Geriye kalan artık diklorometanla çözülerek üç kere 25 ml (0.5 M) potasyum karbonat çözeltisiyle yıkanarak sulu faz alındı. Diklorometanlı çözelti susuz sodyum sülfatla kurutulduktan sonra alçak basınç altında uçurularak elde edilen ham ürün soğuk dieterle yıkanarak safsızlıklarından uzaklaştırıldı (35, 84, 60).

5.3 Kromatografik Çalışmalar

5.3.1 İnce Tabaka Kromatografisi

Bu kromatografi yönteminde ayrılacak madde karışımının uygun bir çözücüdeki çözeltisi cam veya metal plaklar üzerine ince bir tabaka halinde kaplanmış adsorban maddeden hareketli faz yardımıyla yürütülür. Adsorban olarak tabaka kalınlığı 0.2 mm olan silikajel F₂₅₄ (20×20) hazır plaklar kullanılır. Hareketli faz genellikle birkaç çözücülerden ibarettir. Bu yöntemde esas substrat ve metabolitlerin polarite farklılıklarından dolayı uygun çözücü karışımından ayrılmasıdır.

Kromatogramda ayrılan renksiz maddeler çeşitli renklerde ortaya çıkarılabilir. Ultraviyole bölgede absorpsiyon gösteriyorlarsa kromatogramda lekeler kolaylıkla tespit edilebilir. Ancak tersi durum söz konusu olduğunda maddelerin bir kimyasal reaksiyon ile renkli türevlerini oluşturmalarından yararlanılabilir (20). Kromatografi çalışmaları sonucu çözücü petrol eteri : aseton (70:30 h/h) sistemi kullanılmıştır.

Bileşiklerin metanoldeki çözeltileri plağa tatbik edildikten sonra çözücü buharı ile doygun hale getirilmiş tanka yerleştirilir. Elde edilen lekelerin uygulama noktasına olan uzaklığı (A) ve çözücü frontunun uygulama noktasına olan uzaklığı ölçülerek her bileşik için R_f değeri hesaplanır. Kromatogramda bileşiklerin yerleri dalga boyu 254 nm olan UV ışık altında verdikleri mor renk ile belirlenmiştir. Schiff bazları DAC belirteci ile (200 mg 4-dimetilsinnamaldehit'in 50 ml 1 M HCl ve 50 ml etanoldeki çözeltisi) turuncu renk vermektedir.

5.3.2 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

Metabolizma çalışmalarında kullanılan Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi analiz alanında hızlı, tekrarlanabilir ve az miktarda örneklerle çalışma imkanı sağlar. Bu teknikte esas substrat ve metabolitlerin uygun bir çözücü sistem (hareketli faz) ve kolon (durgun faz) kullanarak uygun retensiyon zamanları ve tekrarlanabilir deney koşulları elde etmek suretiyle ayrımlarının yapılmasıdır (81).

Metabolizma çalışmalarında substrat ve inkübasyon sonucu oluşan metabolitler farklı polariteler gösterdikleri için genellikle durgun faz olarak nonpolar dolgu maddeleri, hareketli faz olarak da metanol, asetonitril, su, tampon sistemleri veya bunların karışımları gibi polar çözücüler kullanılabilir (Zıt faz kromatografisi). Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi biyolojik materyaldeki ilaç ve metabolitlerin analizine olanak sağlamakla birlikte bu konuda plazmadaki ilaç düzeylerinin saptanması, doz ayarlanması, biyoyararlanım gibi konularda da yardımcı olmaktadır (24).

Sentezlenen substrat ve olası metabolitler 1 mg tartıldı ve 1ml metanolde çözüldü. Bu çözeltiden 50 µl alındı, metanol ile 1 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan seyreltik standart çözeltilerden 10-100 µl hacimler de Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi'ne (YBSK) enjekte edildi. Böylece substrat ve olası metabolitlerin kolonda ayrımları sağlanarak, kolonda tutulma zamanları (Retensiyon Zamanı, RZ) tespit edildi.

Çalışma Koşulları :

:

Dedektör : Dalga boyları 220, 254, 280, 360 nm olan Agilent 1100 Diode-Array.

Akış Hızı : 1 ml/ dk.

Kolonlar : Kolon A: Nova-Pak C₁₈ (3.9 × 150 mm) Kolon B: Kromasil 100-5C₁₈ (250x4.6mm)

Pompa: Agilent 1100

Enjeksiyon Ünitesi: Rheodyne 7725i

Kullanılan Mobil Faz : Asetonitril:bidistile su (50 : 50 h/h)

asetonitril(50 :50 h/h) 0.02M fosfat tamponu (pH 7.03)

5.3.3 N-(4-klorobenziliden)isopropilamin'in Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Stabilite Çalışması

N-(4-klorobenziliden)isopropilamin'in belirli konsantrasyondaki çözeltisi hazırlandı ve oda temperaturünde 0., 15., 30., 45., 60., dakikalarda ve 24., 48.

saatlerde Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisine enjekte edildi. Madde 37°C'de su banyosunda ısıtılarak yine aynı zamanlarda enjekte edildi. Bu çalışmanın amacı 1b bileşiği inkübasyon sırasında hidrolize uğrarsa, karşılık gelen amin ve aldehitleri yani olası metabonatları tespit etmektir.

Dedektör : Dalgaboyu 254 nm olan Hewlett Packard 1050 değişebilir dalgaboylu
UV Dedektör

Pompa : Gilson Model 302 isokratik

İntegratör : Shimadzu C-R8A

Akış Hızı : 1.9 ml/ dk.

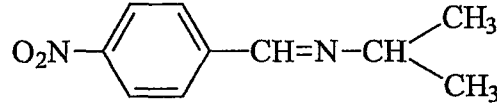
Kolon : Waters m-bondopak C₁₈ (16 cm)

Enjeksiyon Ünitesi: Rheodyne 7215

Kullanılan Mobil Faz : Asetonitril:su (50 : 50 h/h)

6. BULGULAR

6.1 N-(4-nitrobenziliden)isopropilamin [1a]

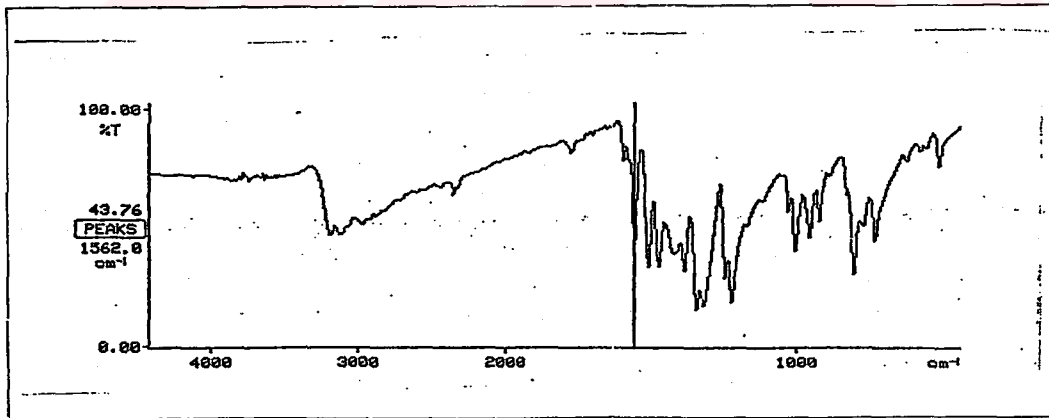


İsopropilamin (0.01 mol, 0.8 ml) ve 4-nitrobenzaldehit'ten (0.01mol, 1.51 g.) hareketle 5.2.1'de verilen yönteme göre hazırlanır. Ham  r n metanolden billurlandırılarak saflaştırılır. Beyaz renkli toz madde, e.n 50-52  C.

Spektral Bulgular :

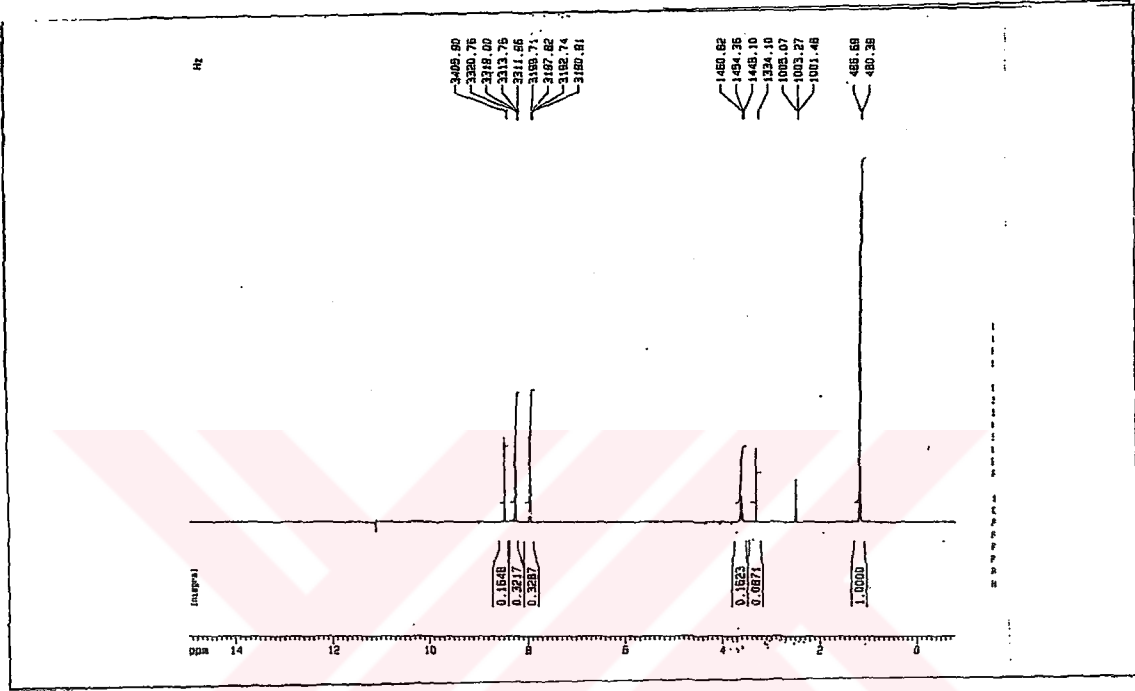
UV spektrumu λ_{maks} (nm): 277 (ϵ : 20180), 213 (ϵ : 11400) (100ml'sinde 0.1 mg madde içeren metanollü c zelti).

IR Spektrumu (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}): 2920 (aromatik =C-H ve metil C-H gerilime bandı); 1662 (imin C=N gerilme bandı); 1610, 1524, 1464, (aromatik halka C=C gerilme bandı); 1550 (Ar-NO₂ asimetric gerilme bandı); 1345 (Ar-NO₂ simetric gerilme bandı); 830 (1,4-disübstitüe benzen).



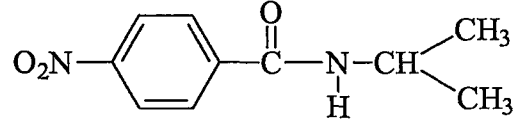
Şekil 3 : Bileşik 1a'nın IR spektrumu

¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆/TMS), δ(ppm) : 1.21 (d, 6H, metil protonları); 2.50 (çözücü piki); 3.30 (çözücü içindeki su piki); 3.63 (m, 1H, N-CH); 7.99 (d, 2H, -NO₂ grubuna göre meta konumundaki fenil protonları); 8.29 (d, 2H, klor grubuna göre orto konumundaki fenil protonları); 8.51 (s, 1H, CH=N).



Şekil 4 : Bileşik 1a'nın ¹H-NMR spektrumu

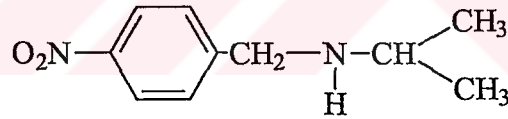
6.2 N-(4-nitrobenzoil)isopropilamin [2a]



İsopropilamin (0.01 mol, 0.8 ml), 4-nitrobenzoil klorür (0.01mol, 1.85 g) ve 2N sodyum hidroksit çözeltisinden hareketle 5.2.2’de verilen yöntemle hazırlanır. Ham ürün etanolden billurlandırılarak saflaştırılır. Beyaz renkli toz madde, e.n 149-151 °C (lit e.n.145-146 °C) (27).

UV spektrumu λ_{maks} (nm): 265 (ϵ : 21180); 206 (ϵ : 10800) (100ml’sinde 0.1 mg madde içeren metanollü çözelti).

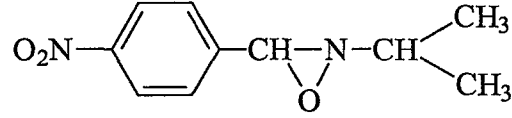
6.3 N-(4-nitrobenzil)isopropilamin [3a]



4-(nitrobenzilidenamino)-N-isopropilamin (0.003 mol, 0.567 g) ve sodyum borohidürden (0.003 mol, 0.113 g) hareketle 5.2.3’de verilen yöntemle hazırlanır. Ham ürün petrol eteri ile muamele edilerek saflaştırılır. Sarı renkli madde, e.n 229-231 °C (lit e.n 225-227 °C) (80).

UV spektrumu λ_{maks} (nm): 270 (ϵ : 18200), 211 (ϵ : 11420) (100ml’sinde 0.1 mg madde içeren metanollü çözelti).

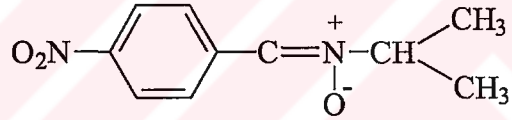
6.4 α -(4-nitrobenzil)-N-isopropil oksaziridin [4a]



4-(nitrobenzilidenamino)-N-isopropilamin (0.001 mol, 0.189 g) ve 3-kloroperbenzoik asitten (0.001mol, 0.171 g) hareketle 5.2.4'de verilen yöntemle göre hazırlanır. Ham ürün metanol ile muamele edilerek saflaştırılır. Beyaz billuri toz madde, e.n 142-144°C.

UV spektrumu λ_{maks} (nm): 228 (ϵ : 19600) (100ml'sinde 0.1 mg madde içeren metanollü çözelti).

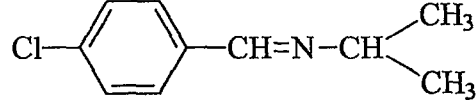
6.5 α -(4-nitrofenil)-N-isopropil nitron [5a]



N-(4-nitrofenil)-isopropilamin (0.001 mol, 0.191 g) ve 3-kloroperbenzoik asitten (0.001mol, 0.171 g) hareketle 5.2.5'de verilen yöntemle göre hazırlanır. Ham ürün petrol eteri ile muamele edilerek saflaştırılır. Sarı renkli sıvı.

UV spektrumu λ_{maks} (nm): 320 (ϵ : 24500), 252 (ϵ : 20180), 211 (ϵ : 12100) (100ml'sinde 0.1 mg madde içeren metanollü çözelti).

6.6 N-(4-klorobenziliden)isopropilamin [1b]

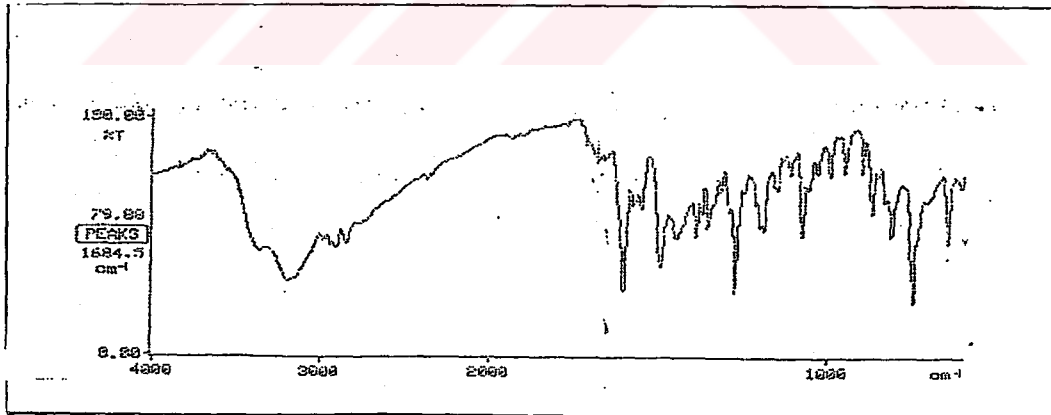


İsopropilamin (0.01 mol, 0.8 ml) ve 4-klorobenzaldehit'ten (0.01mol, 1.40 g) hareketle 5.2.1'de verilen yönteme göre hazırlanır. Ham  r n metanolden billurlandırılarak saflaştırılır. Beyaz renkli toz madde, e.n 136-138  C.

Spektral Bulgular :

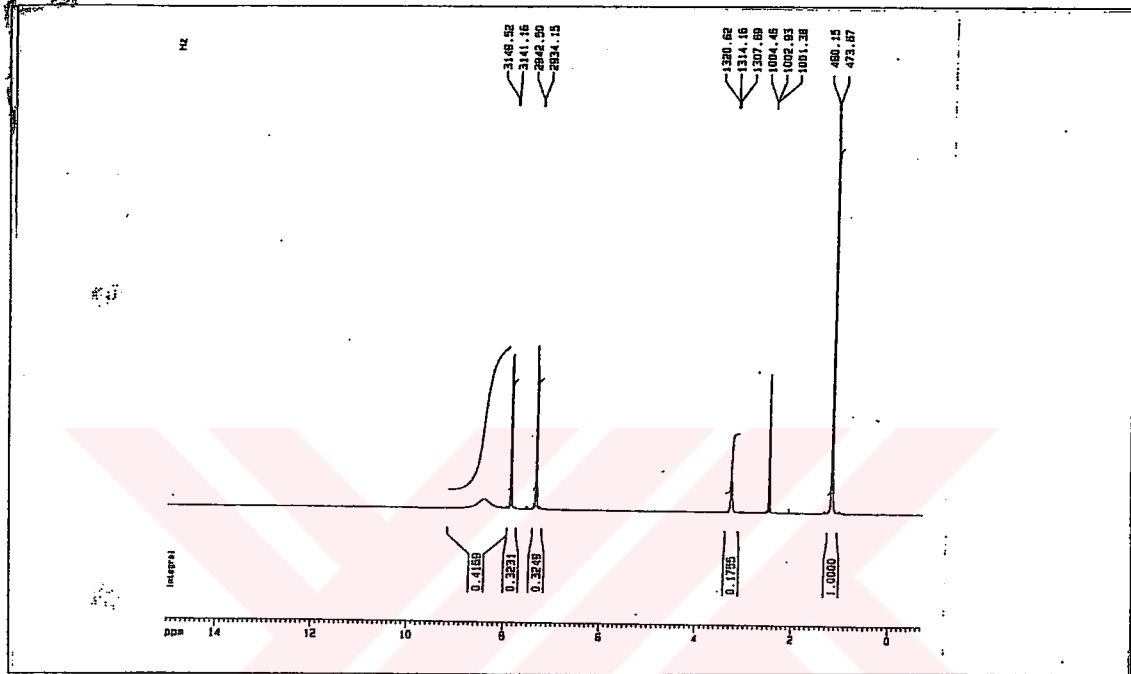
UV spektrumu λ_{maks} (nm): 233 (ϵ : 21420), (100ml'sinde 0.1 mg madde içeren metanollü  zelti).

IR Spektrumu (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}): 2940 (aromatik =C-H ve metil C-H gerilime bandı); 1650 (imin C=N gerilme bandı); 1620, 1580, 1530, 1475, (aromatik halka C=C gerilme bandı); 1075 (Ar-Cl gerilme bandı); 824 (1,4-disübstitüe benzen).



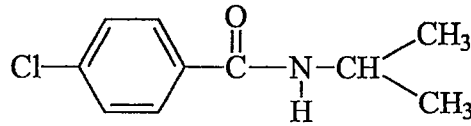
Şekil 5 : Bileşik 1b'nin IR spektrumu

¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆/TMS), δ(ppm) : 1.19 (d, 6H, metil protonları); 2.50 (çözücü piki); 3.28 (m, 1H, N-CH); 7.34 (d, 2H, -Cl grubuna göre orto konumundaki fenil protonları); 7.86 (d, 2H, klor grubuna göre meta konumundaki fenil protonları); 7.94 (s, 1H, CH=N).



Şekil 6 : Bileşik 1b'nin ¹H-NMR spektrumu

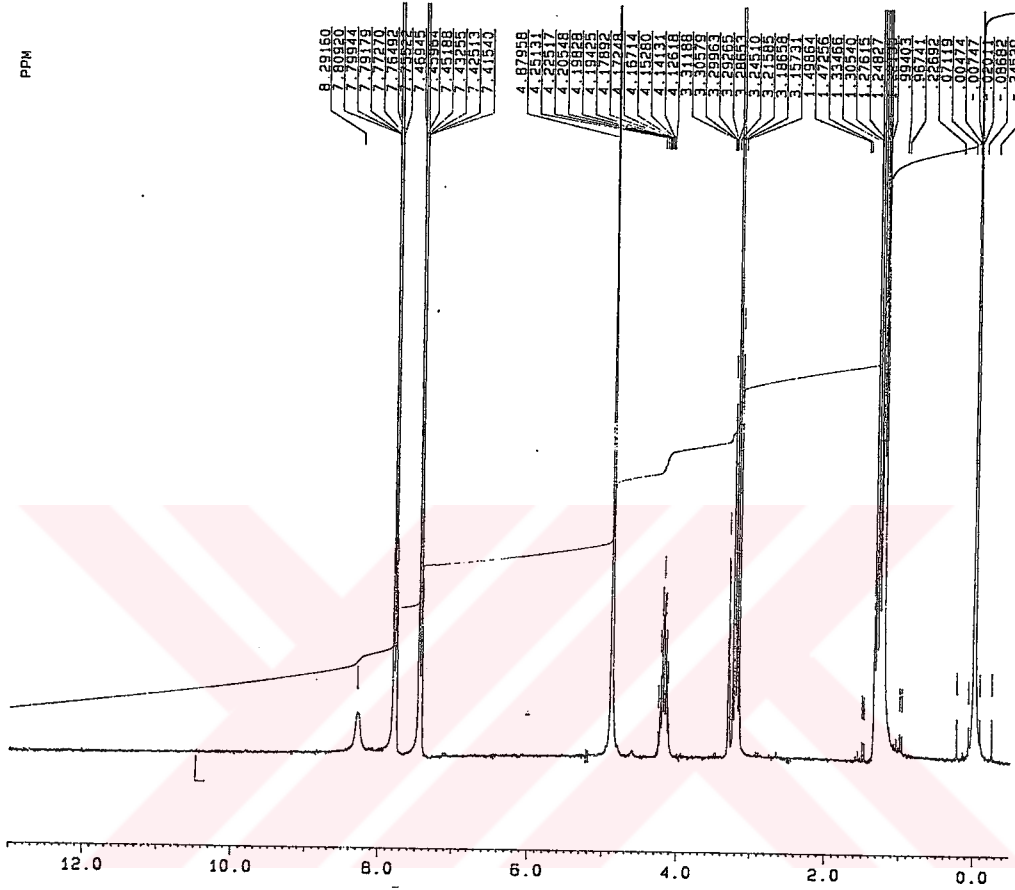
6.7 N-(4-klorobenzoil)isopropilamin [2b]



İsopropilamin (0.01 mol, 0.8 ml), 4-klorobenzoil klorür (0.01mol, 1.85 g) ve 2N sodyum hidroksit çözeltisinden hareketle 5.2.2'de verilen yönteme göre hazırlanır. Ham ürün etanolden billurlandırılarak saflaştırılır. Beyaz billuri orjinal toz madde, e.n. 238-240 °C .

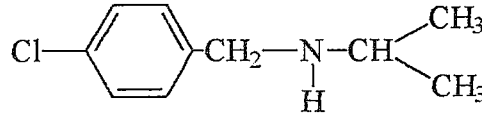
UV s spektrumu λ_{maks} (nm): 232 (ϵ : 23400); 206 (ϵ : 10400) (100ml'sinde 0.1 mg madde içeren metanollü çözelti).

$^1\text{H-NMR}$ Spektrumu (MeOH/TMS), $\delta(\text{ppm})$: 1.22-1.33 (m, 6H, metil protonları); 3.30 (çözücü içindeki su piki); 4.12-4.25 (m, 1H, $\text{CH}_2(\text{CH}_3)_2$); 4.88 (çözücü piki); 7.42-7.81 (m, 4H, aromatik protonlar); 8.29 (s, 1H, NH).



Şekil 7: Bileşik 2b'nin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

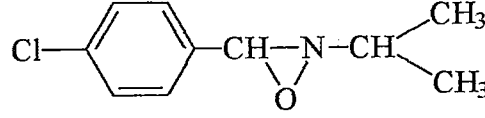
6.8 N-(4-klorobenzil)isopropilamin [3b]



4-(klorobenzilidenamino)isopropilamin (0.003 mol, 0.534g) ve sodyum borohidürden (0.003 mol, 0.113 g) hareketle 5.2.3'de verilen yönteme göre hazırlanır. Ham ürün petrol eteri ile muamele edilerek saflaştırılır. Beyaz billuri toz madde, e.n. 199-201 °C (lit e.n 196-198°C) (72).

UV spektrumu λ_{maks} (nm): 226 (ϵ : 21600); 206 (ϵ : 11200) (100ml'sinde 0.1 mg madde içeren metanollü çözelti).

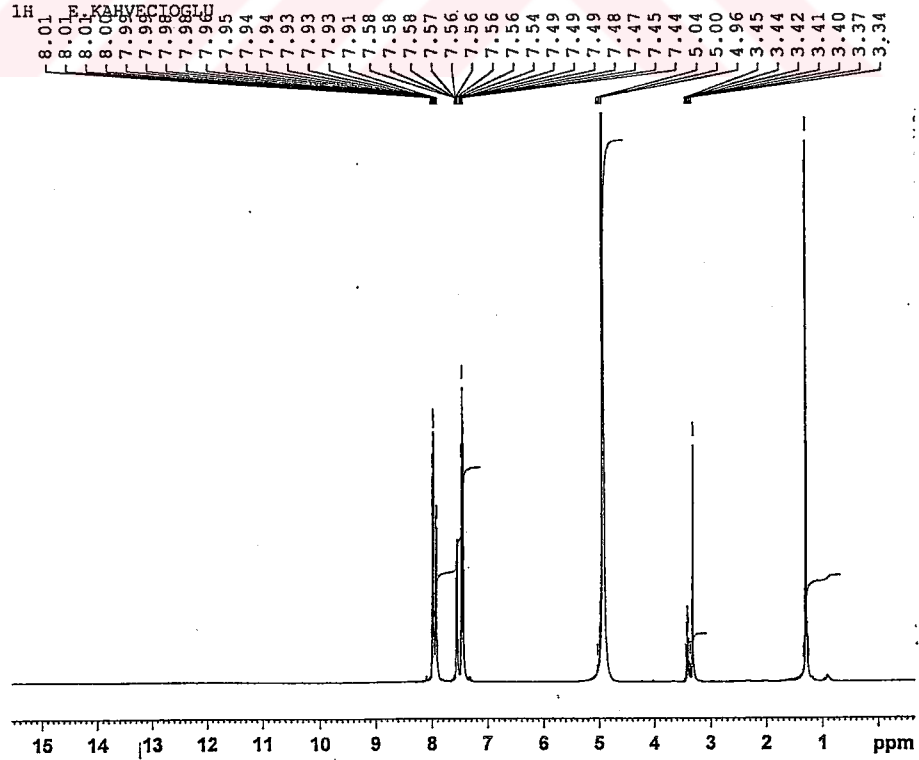
6.9 α -(4-klorobenzil)-N-isopropil oksaziridin [4b]



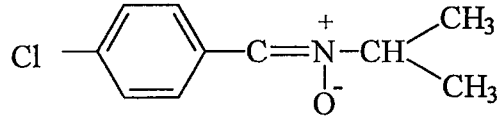
4-(klorobenzilidenamino)-N-isopropilamin (0.001 mol, 0.178 g) ve 3-kloroperbenzoik asitten (0.001mol, 0.171 g) hareketle 5.2.4'de verilen yöntemle göre hazırlanır. Ham ürün metanol ile muamele edilerek saflaştırılır. Beyaz billuri orjinal toz madde, e.n.132-134 °C.

UV spektrumu λ_{maks} (nm): 226 (ϵ : 17400); 204 (ϵ : 13200) (100ml'sinde 0.1 mg madde içeren metanollü çözelti).

$^1\text{H-NMR}$ Spektrumu (MeOH/TMS), δ (ppm) : 1.26-1.35 (m, 6H, metil protonları); 3.33-3.45 (m, 2H, oksaziridin CH ve CH (CH₃)₂), 5.03 (çözücü piki); 7.44-8.01 (m, 4H, aromatik protonlar).



6.10 α -(4-klorofenil)-N-isopropil nitron[5b]



N-(4-klorofenil)-isopropilamin (0.001mol 0.185g) ve 3-kloroperbenzoik asitten (0.001mol, 0.171g) hareketle 5.2.5'de verilen yöntemle göre hazırlanır. Ürün saflaştırılma aşamasında bozulmuştur.

6.11 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi Çalışmaları İle İlgili Bulgular

Madde 1a ve 1b'nin *in vitro* metabolizma çalışmalarında metabolitlerin ayrılabilmesi için farklı sistemler denenerek uygun mobil faz tespit edilmeye çalışılmıştır.

Tablo 2 . Madde 1a ve metabolitler'in kolon A ile asetonytril:su (50:50 h/h) ve akış hızı: 1ml/dk. olan sistemde retensiyon zamanları

	BİLEŞİKLER	RETENSİYON ZAMANLARI (dk.)
1a	N-(4-nitrobenziliden)isopropilamin	3.04
2a	N-(4-nitrobenzoil)isopropilamin	2.06
3a	N-(4-nitrobenzil)isopropilamin	1.67
4a	α -(4-nitrobenzil)-N-isopropil oksaziridin	1.32
5a	α -(4-nitrobenzil)-N-isopropil nitron	2.10
	4-nitrobenzaldehit	2.36

Tablo 3 . Madde 1 a ve m metabolitler'in kolon A ile asetonitril 0.02M fosfat tamponu (50:50 h/h) ve akış hızı:0.7 ml/dk. olan sistemde retensiyon zamanları

	BİLEŞİKLER	RETENSİYON ZAMANLARI (dk.)
1a	N-(4-nitrobenziliden)isopropilamin	5.32
2a	N-(4-nitrobenzoil)isopropilamin	2.13
3a	N-(4-nitrobenzil)isopropilamin	2.50
4a	α -(4-nitrobenzil)-N-isopropil oksaziridin	1.01
5a	α -(4-nitrobenzil)-N-isopropil nitron	2.12

Tablo 4 . Madde 1b ve metabolitler'in kolon A ile asetonitril:su (50:50 h/h) ve akış hızı:1ml/dk. olan sistemde retensiyon zamanları

	BİLEŞİKLER	RETENSİYON ZAMANLARI (dk.)
1b	N-(4-klorobenziliden)isopropilamin	1.72
2b	N-(4-klorobenzoil)isopropilamin	2.50
3b	N-(4-klorobenzil)isopropilamin	1.28
4b	α -(4-klorobenzil)-N-isopropil oksaziridin	1.10
	4-klorobenzaldehit	3.36

Tablo 5 . Madde 1b ve metabolitler'in kolon B ile asetonitril :0.02M fosfat tamponu (50:50 h/h) ve akış hızı:1ml/dk. olan sistemde retensiyon zamanları

	BİLEŞİKLER	RETENSİYON ZAMANLARI (dk.)
1b	N-(4-klorobenziliden)isopropilamin	2.20
2b	N-(4-klorobenzoil)isopropilamin	6.20
4b	α -(4-klorobenzil)-N-isopropil oksaziridin	2.10
5b	α -(4-klorobenzil)-N-isopropil nitron	2.10
	4-klorobenzaldehit	7.60

Tablo 6 .Madde 1b ve metabolitler'in asetonitril:su (50:50 h/h) ve akış hızı:1ml/dk. olan sistemde retensiyon zamanları

	BİLEŞİKLER	RETENSİYON ZAMANLARI (dk.)
1b	N-(4-klorobenziliden)isopropilamin	2.82
2b	N-(4-klorobenzoil)isopropilamin	7.74
3b	N-(4-klorobenzil)isopropilamin	1.62
4b	α -(4-klorobenzil)-N-isopropil oksaziridin	3.08
5b	α -(4-klorobenzil)-N-isopropil nitron	3.17
	4-klorobenzaldehit	10.90

6.12 İnce Tabaka Kromatografi Çalışmaları İle İlgili Bulgular

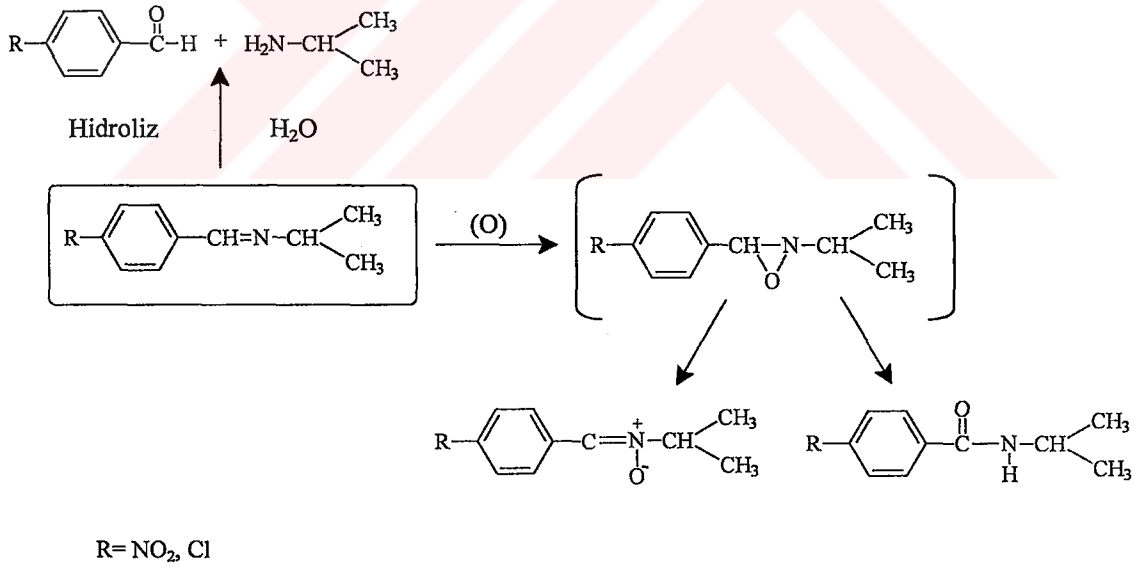
Madde 1a, 1b ve metabolitlerinin safsızlıklarını tespit etmek amacıyla ince tabaka kromatografisinden yararlanılmıştır.

Tablo 7 . Madde 1a ve metabolitler'in petrol eteri:aseton sisteminde Rf x100 değerleri

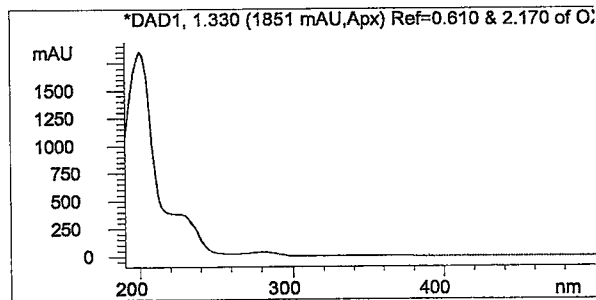
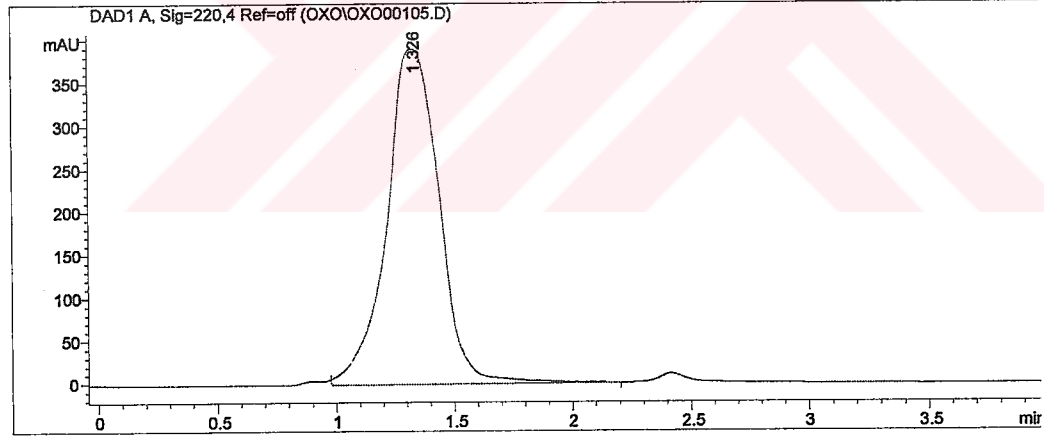
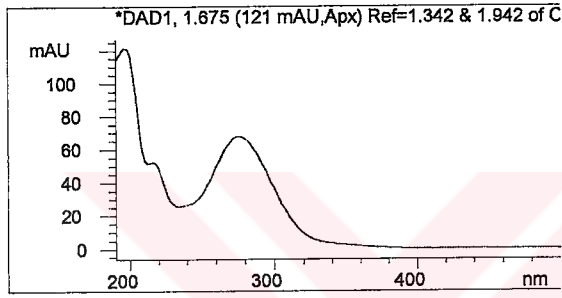
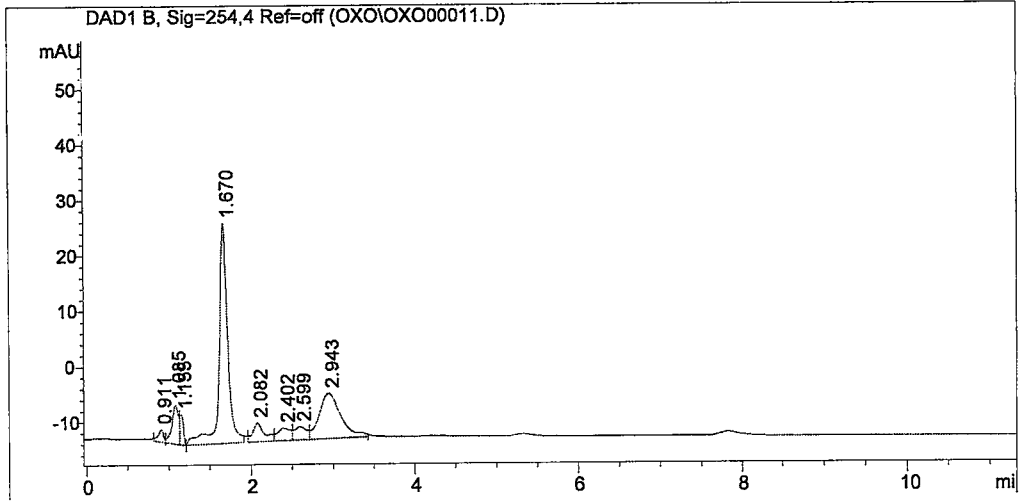
	BİLEŞİKLER	Rfx100 Değerleri
1a	N-(4-nitrobenziliden)isopropilamin	36,8
2a	N-(4-nitrobenzoil)isopropilamin	19,2
3a	N-(4-nitrobenzil)isopropilamin	5,2
4a	α -(4-nitrobenzil)-N-isopropil oksaziridin	15,7
5a	α -(4-nitrobenzil)-N-isopropil nitron	16.2
	4-nitrobenzaldehit	17,5

Tablo 8 . Madde 1b ve metabolitler'in petrol eteri:aseton sisteminde Rf x100 değerleri

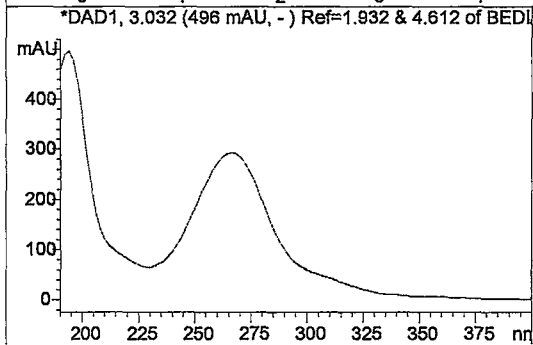
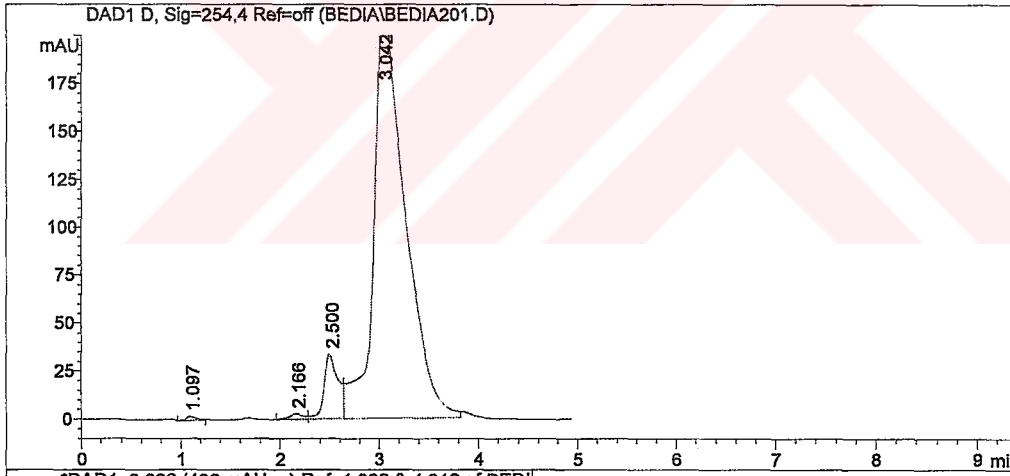
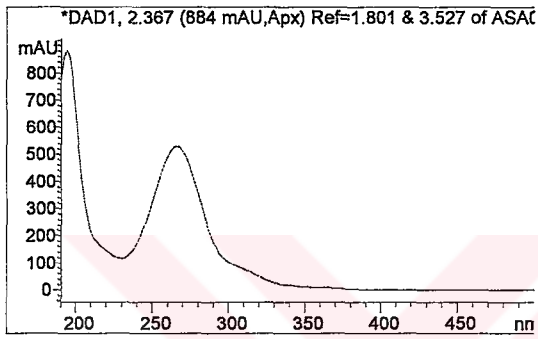
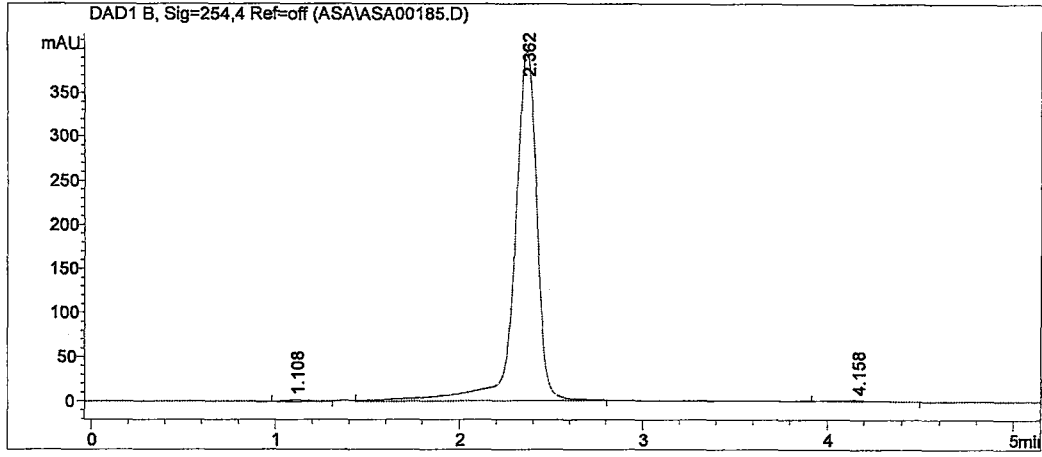
	BİLEŞİKLER	Rfx100 Değerleri
1b	N-(4-klorobenziliden)isopropilamin	8.3
2b	N-(4-klorobenzil)isopropilamin	41.6
3b	N-(4-klorobenzil)isopropilamin	10.1
4b	α -(4-klorobenzil)-N-isopropil oksaziridin	33.3
5c	4-klorobenzaldehit	38.2



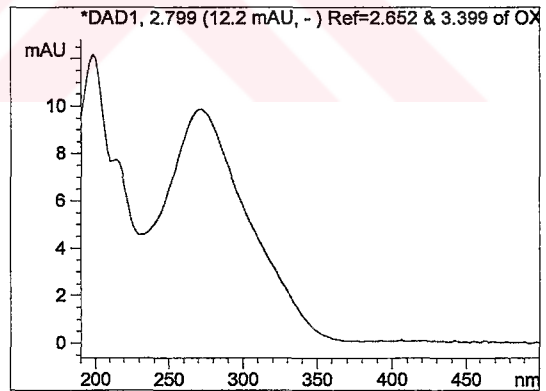
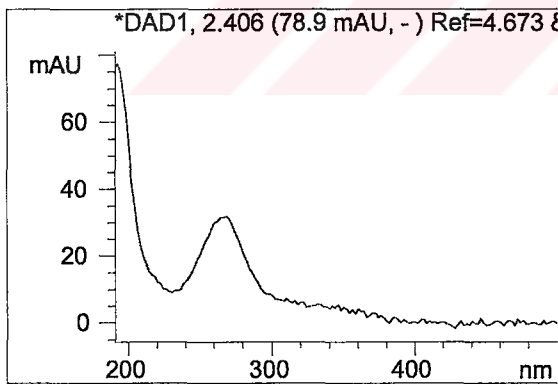
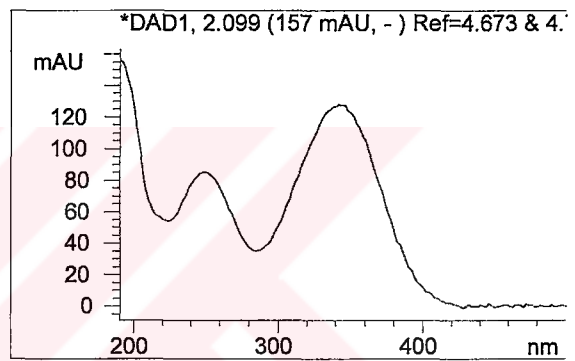
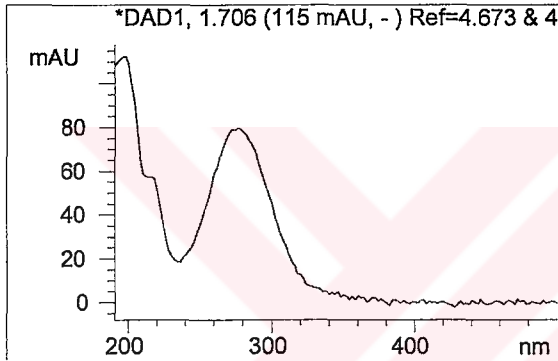
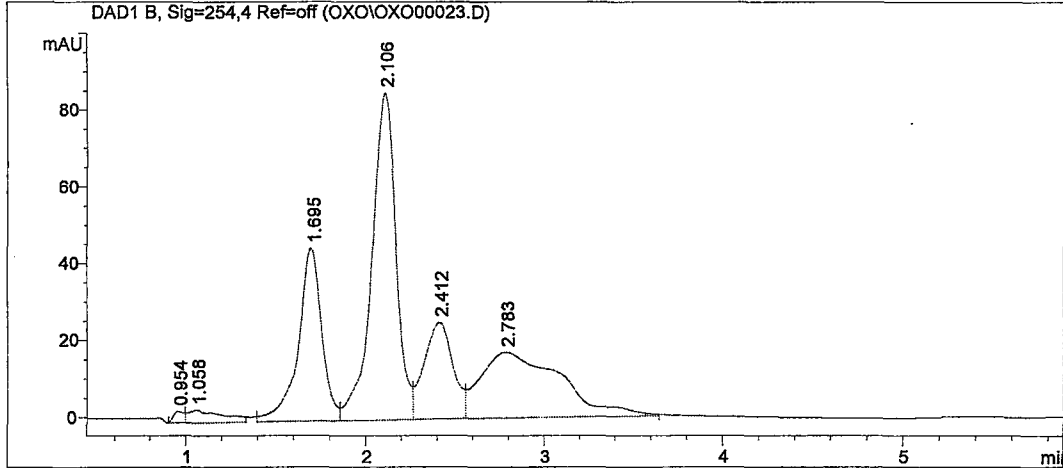
Şekil 9: N-(4-nitro/klorobenziliden)isopropilamin'in olası metabolik yolları



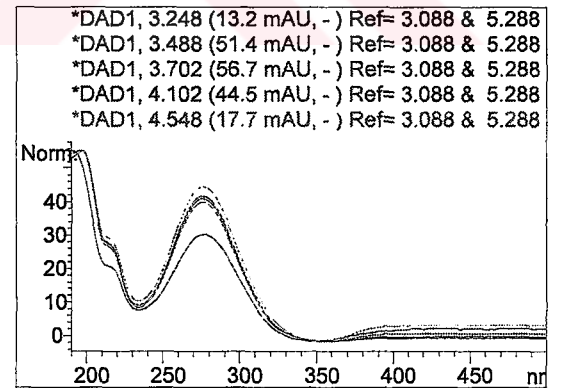
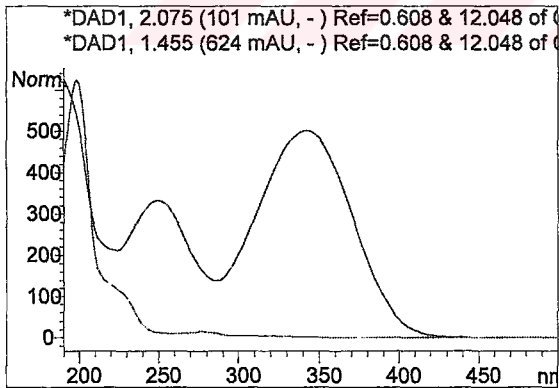
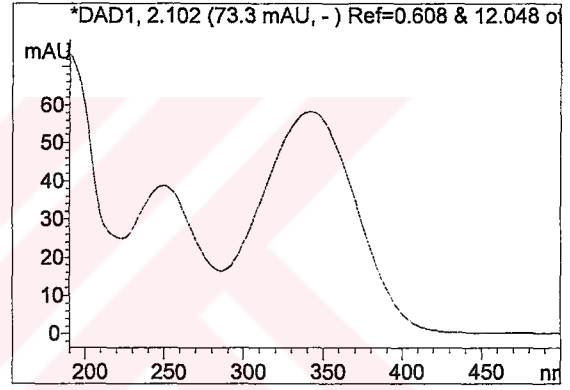
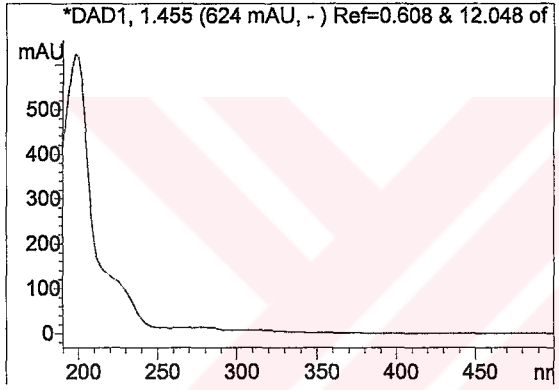
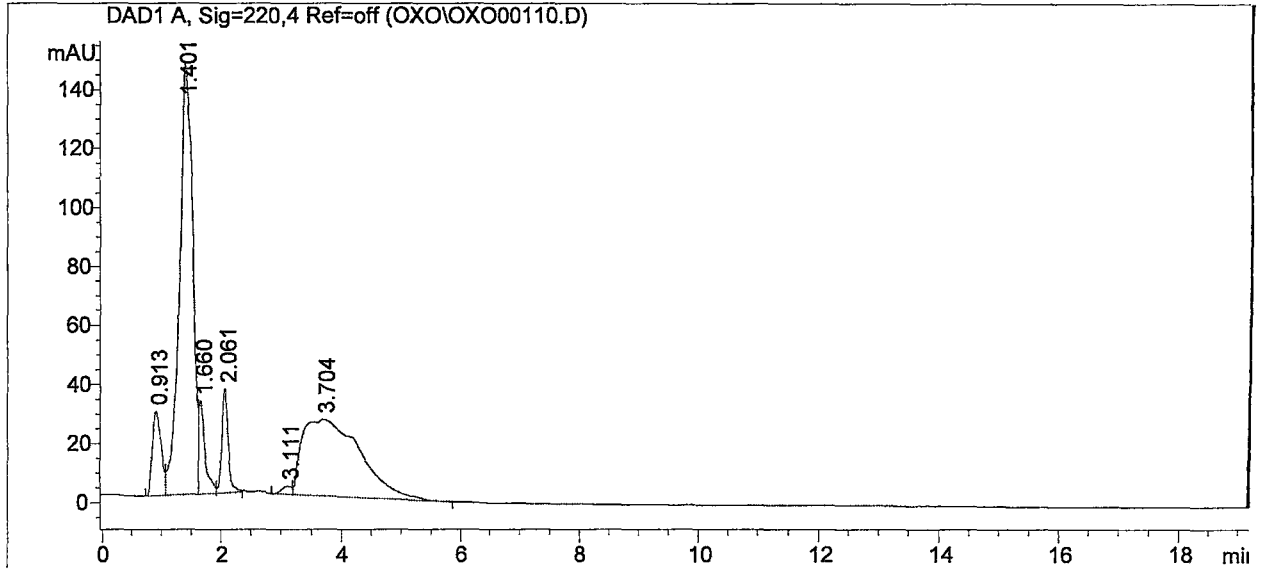
Şekil 10: α -(4-Nitrofenil)isopropilamin ve α -(4-nitrobenzil)-N-isopropil oksaziridin'in kromatogramları ve UV spektrumları [Mobil faz: asetonitril:su (50:50 h/h)].



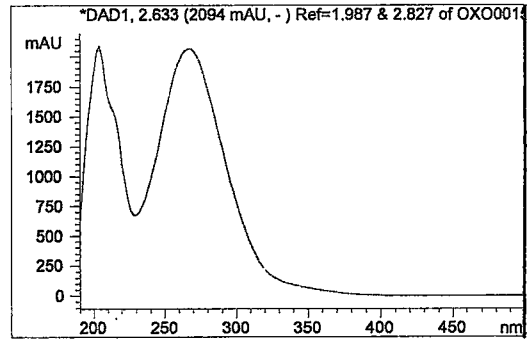
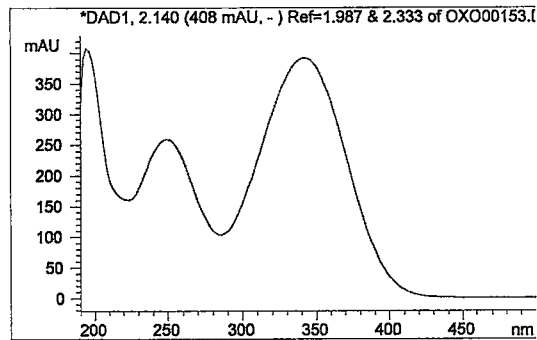
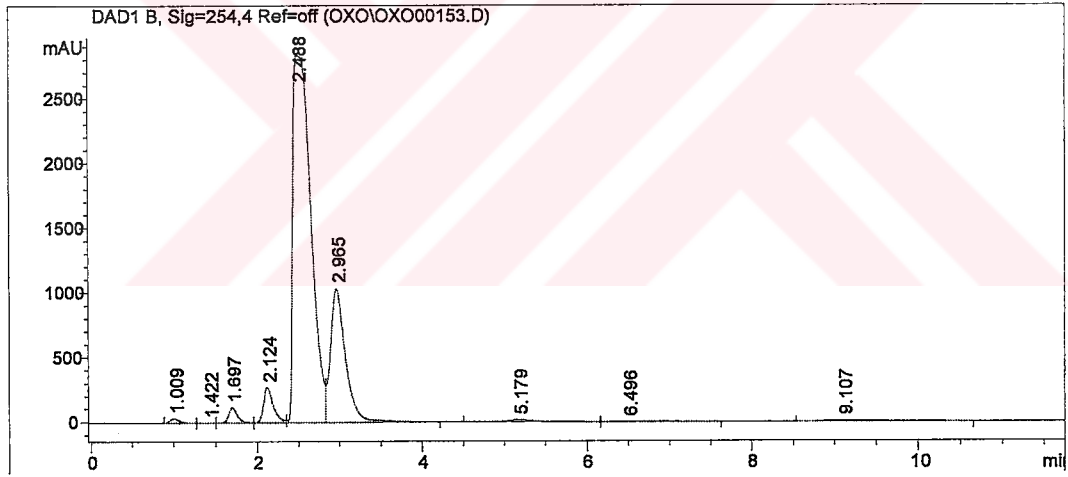
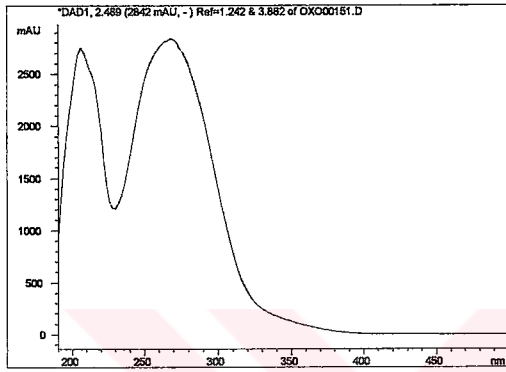
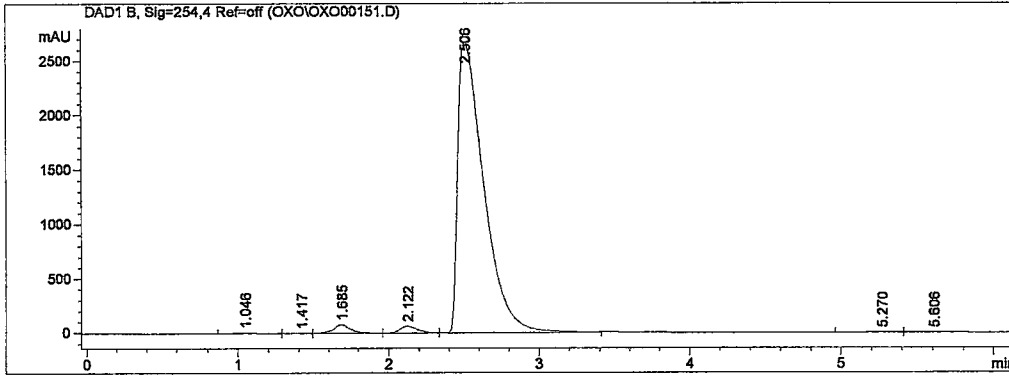
Şekil 11: 4-nitrobenzaldehit ve N-(4-nitrobenziliden)isopropilamin'in kromatogramları ve UV spektrumları [Mobil faz: asetonitril:su (50:50 h/h)].



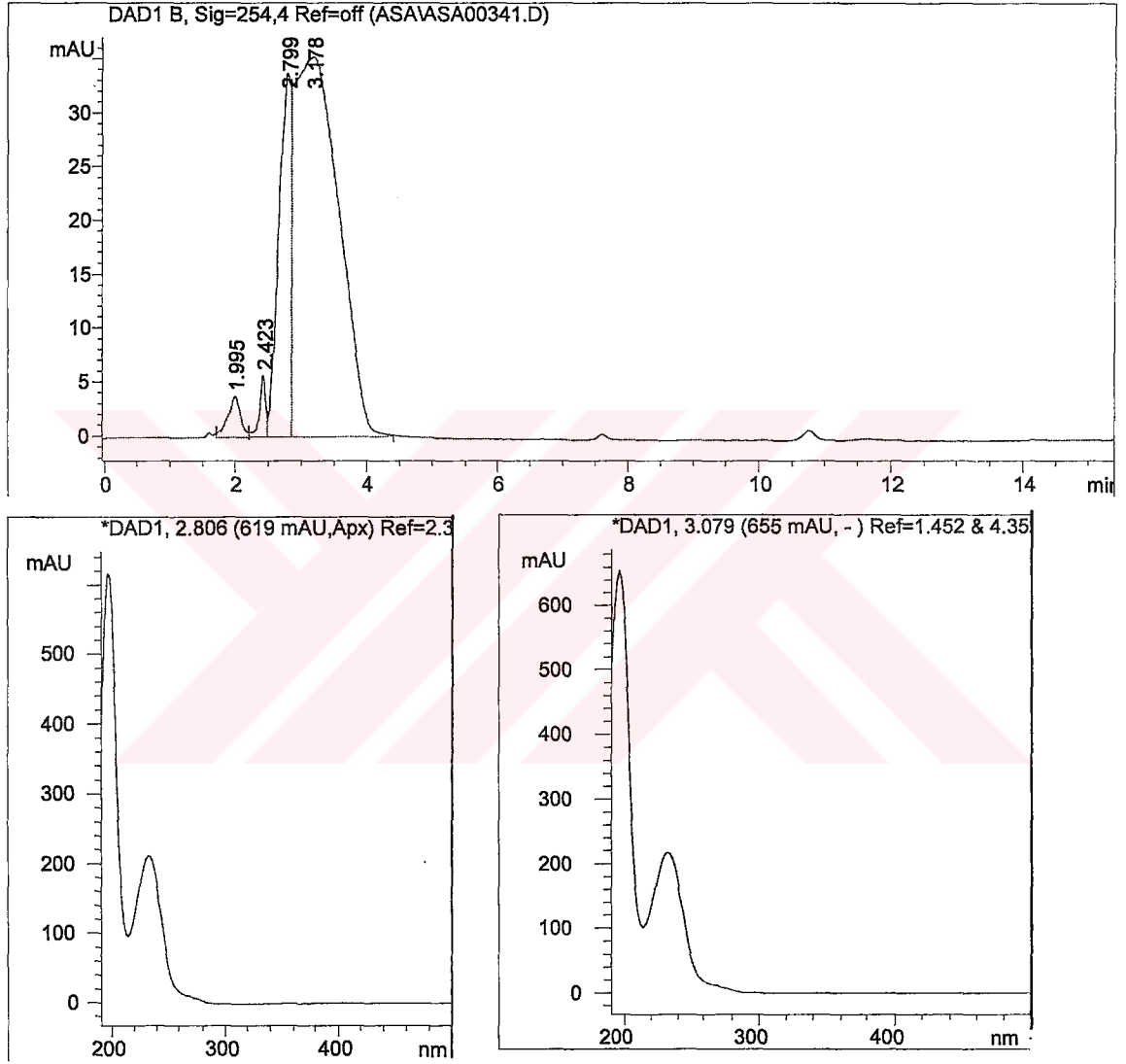
Şekil 12: α -(4-Nitrofenil)-N-isopropilamin nitron'un kromatogramı ve 254 nm'de UV spektrumu [Mobil faz: asetonyril:su (50:50 h/h)].



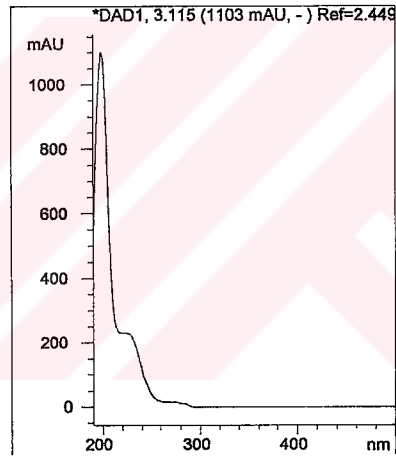
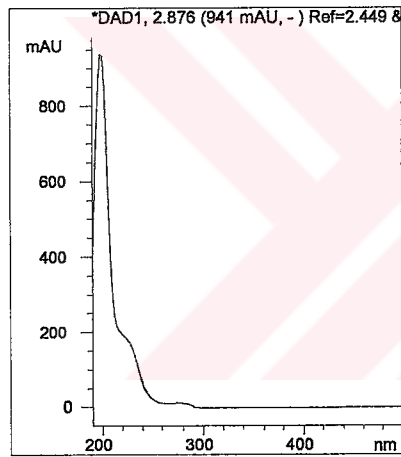
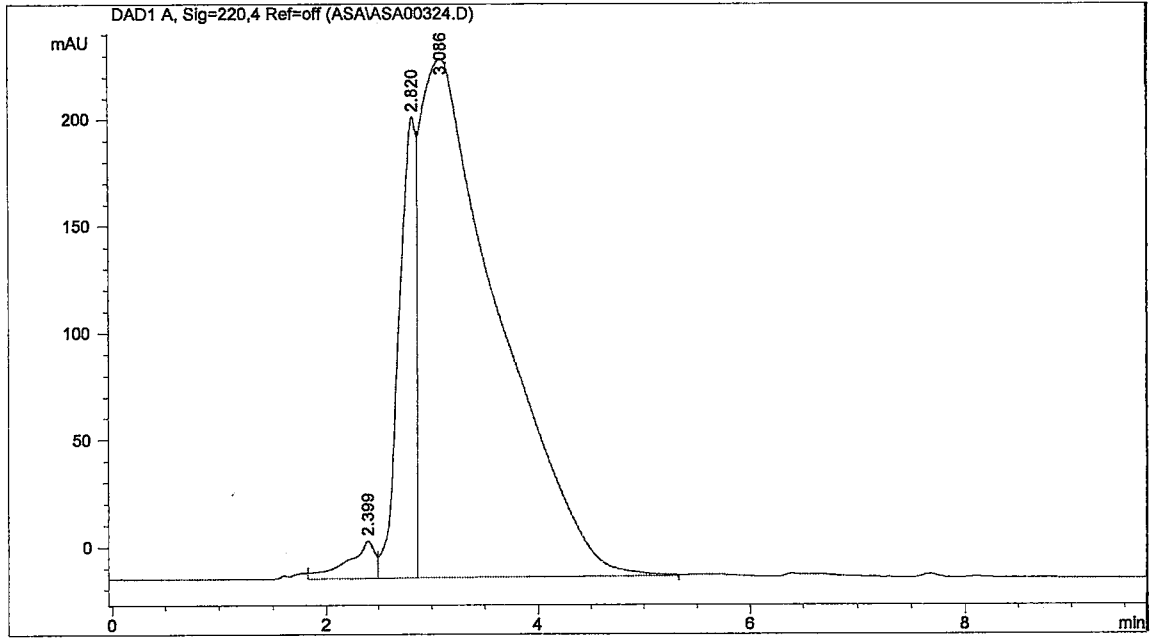
Şekil 13: α -(4-Nitrofenil)-N-isopropilamin nitron'un bozunma ürününün kromatogramı ve UV spektrumu [Mobil faz: asetonitril:su (50:50 h/h)].



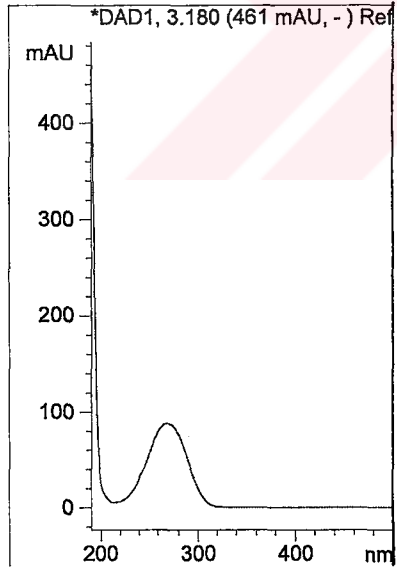
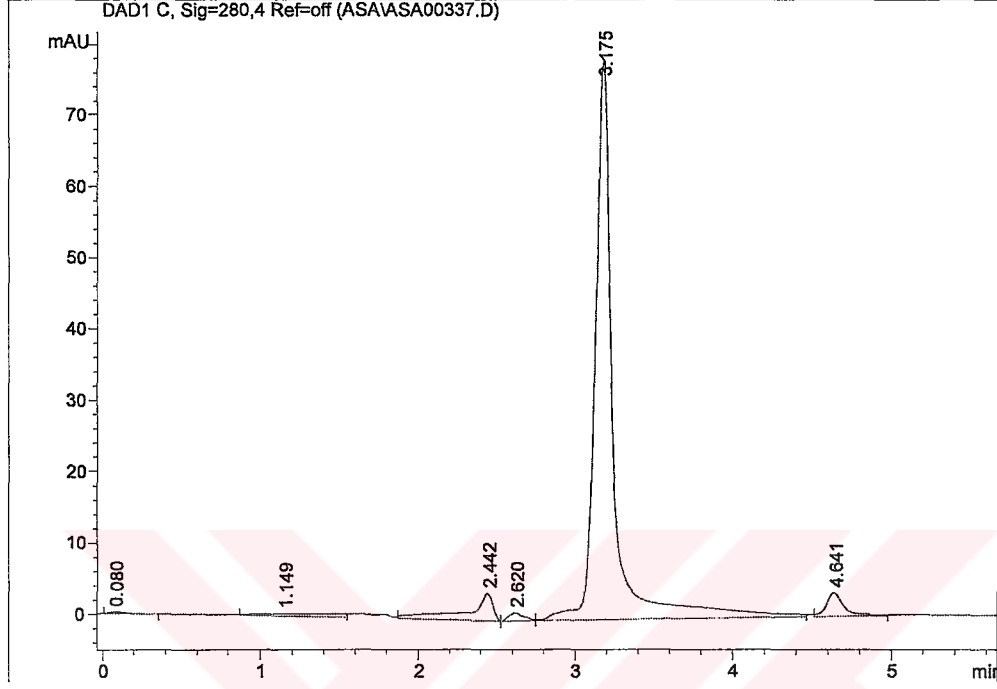
Şekil 14: α -(4-Nitrofenil)-N-isopropilamin nitron'un üç gün sonraki ve N-(4-nitrofenil)isopropilamin'in UV spektrumu [Mobil faz: 0.02M fosfat tamponu:asetonitril (50:50 h/h)]



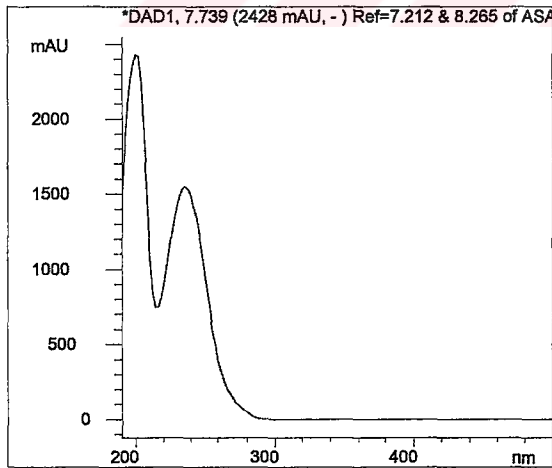
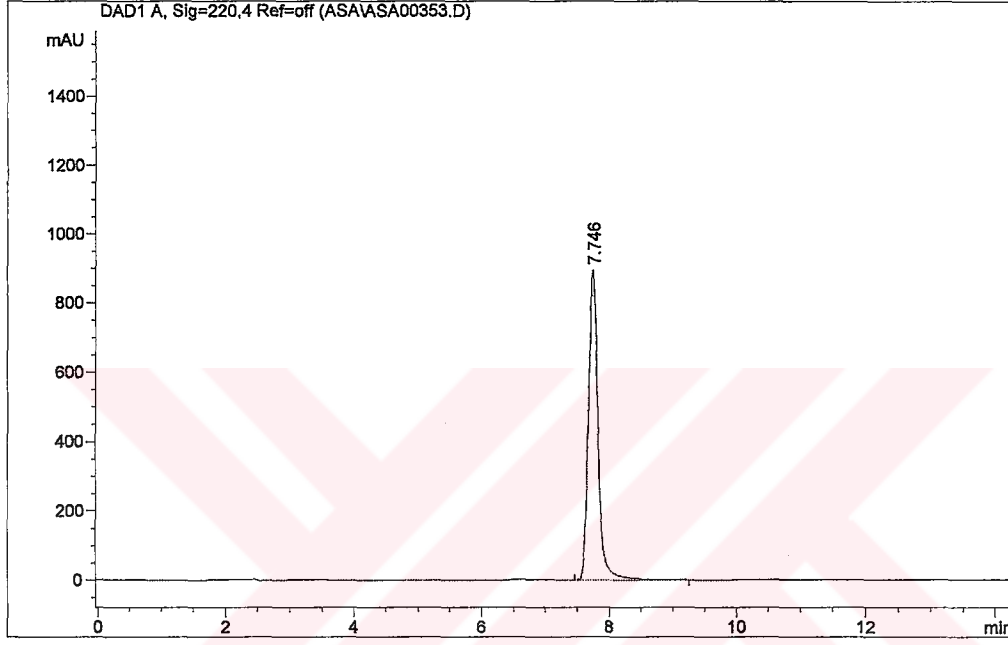
Şekil 15: N-(4-klorobenziliden)isopropilamin'in kolon B ile asetonitril:su (50:50 h/h) ve akış hızı: 1ml/dk olan sistemde kromatogramı ve UV spektrumu



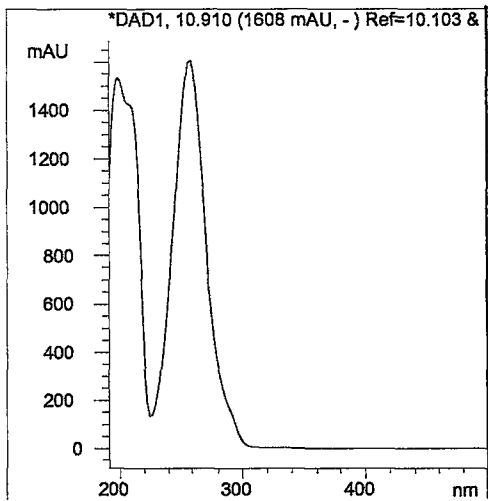
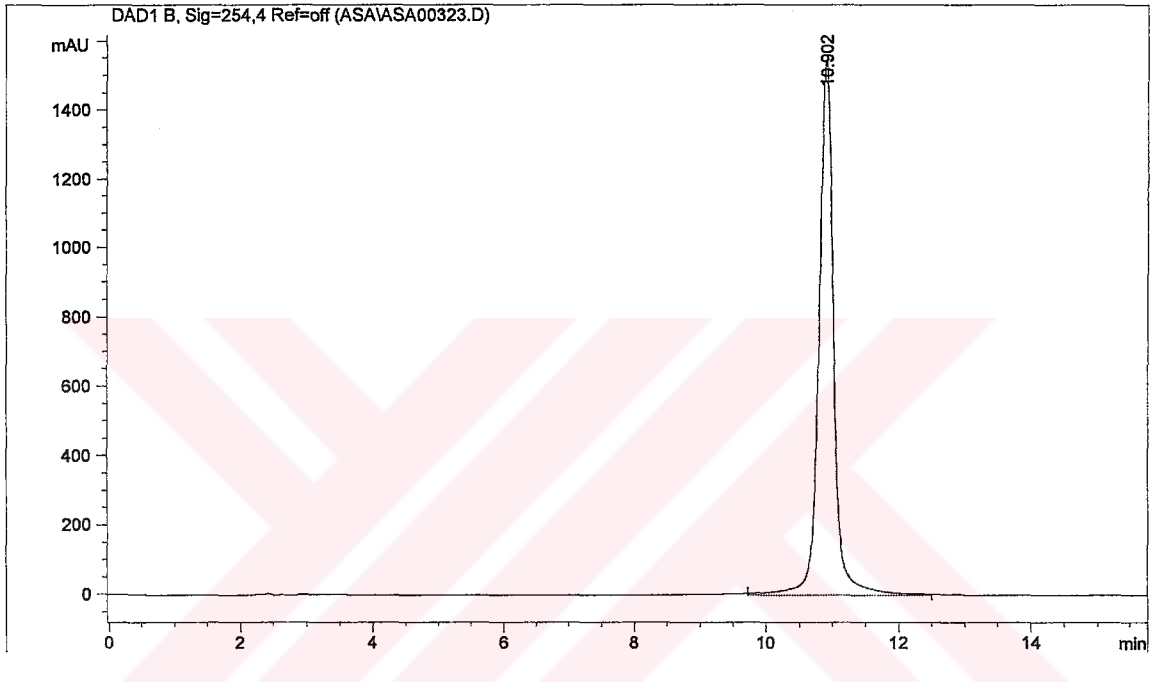
Şekil 16: α -(4-klorobenzil)-N-isopropil oksaziridin'in kolon B ile asetonitril:su (50:50 h/h) ve akış hızı:1ml/dk olan sistemde kromatogramı ve UV spektrumu



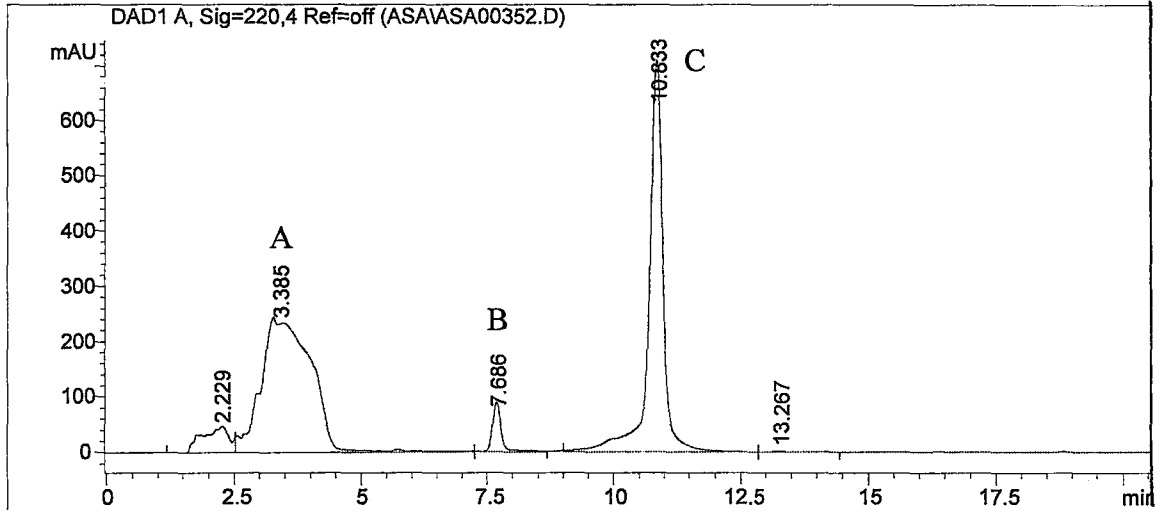
Şekil 17: α -(4-Nitrofenil)-N-isopropil nitron'un kolon B ile asetonitril:su (50:50 h/h) ve akış hızı: 1ml/dk olan sistemde kromatogramı ve UV spektrumu



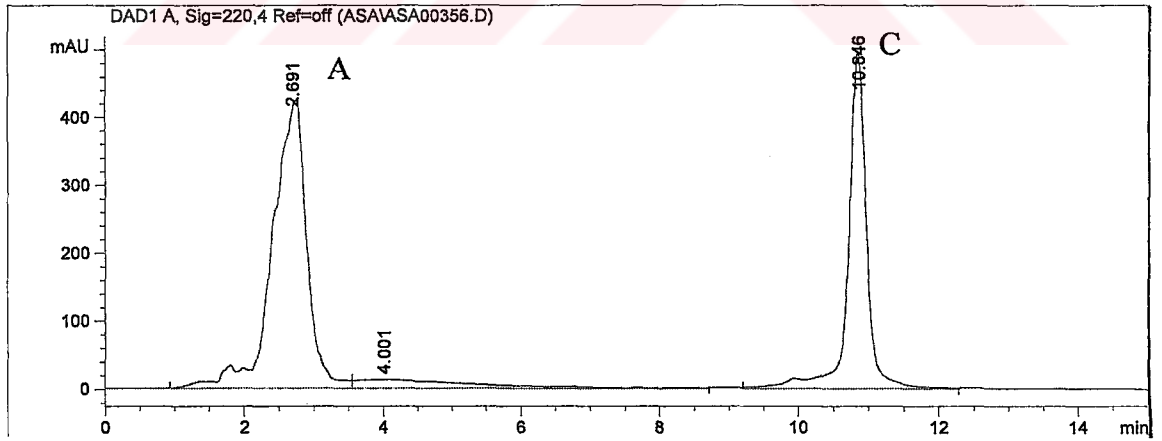
Şekil 18: N-(4-klorobenzoil)isopropilamin 'in kolon B ile asetonitril:su (50:50 h/h) ve akış hızı: 1ml/dk olan sistemde kromatogramı ve UV spektrumu



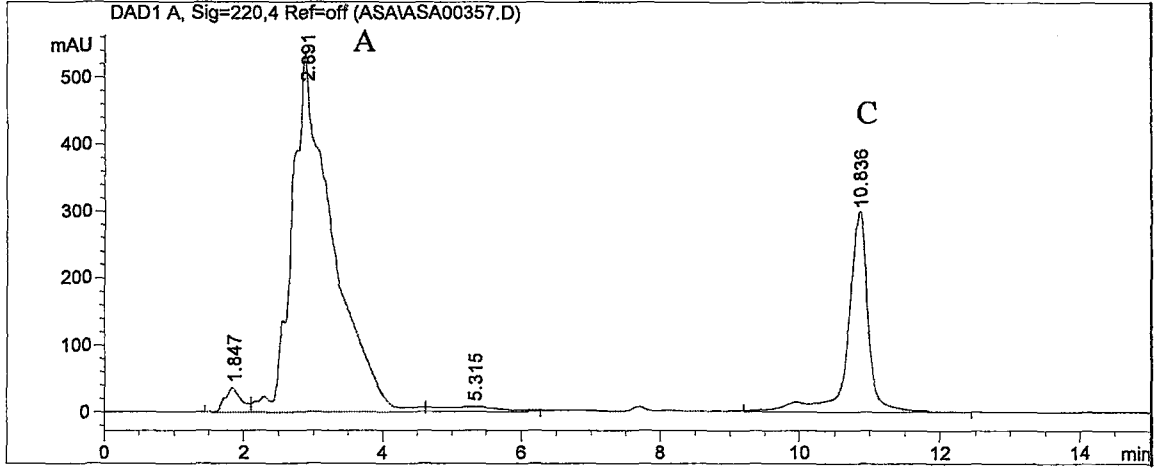
Şekil 19: 4-klorobenzaldehit'in kolon B ile asetonitril:su (50:50 h/h) ve akış hızı:1ml/dk olan sistemde kromatogramı ve UV spektrumu



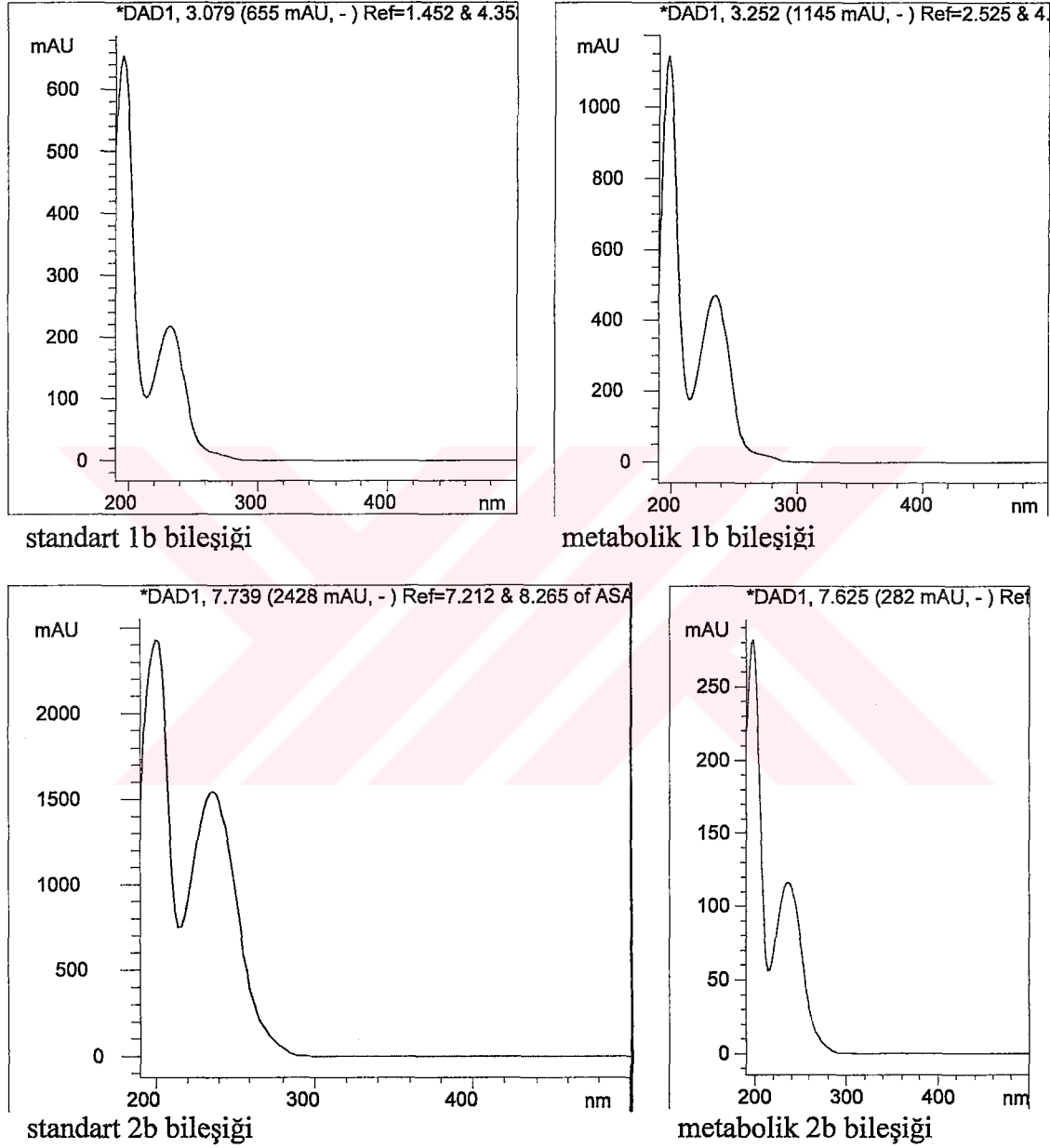
Şekil 20: N-(4-klorobenziliden) isopropilamin'in kolon B ile asetonitril:su (50:50 h/h) ve akış hızı:1ml/dk olan sistemde karaciğer mikrozomal prepatı kullanılarak yapılan inkübasyon sonrası elde edilen metabolik ekstraktan alınan HPLC kromatogramı (A: N-(4-klorobenziliden)isopropilamin, B: N-(4-klorobenzoil)isopropilamin, C: 4-klorobenzaldehit)



Şekil 21: N-(4-klorobenziliden)isopropilamin'in kolon B ile asetonitril:su (50:50 h/h) ve akış hızı:1ml/dk olan sistemde denatüre mikrozomlarla yapılan inkübasyon sonrası elde edilen metabolik ekstraktan alınan HPLC kromatogramı (A: N-(4-klorobenziliden)isopropilamin, C: 4-klorobenzaldehit)

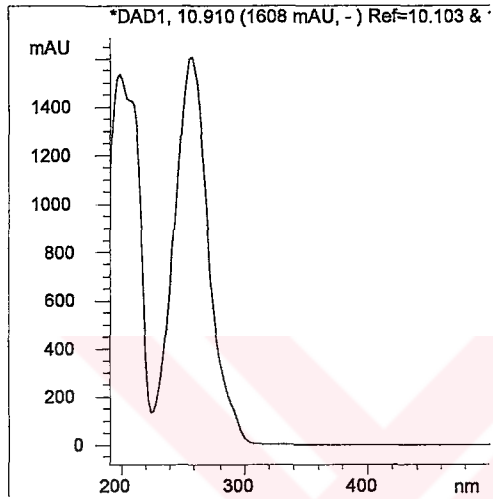


Şekil 22: N-(4-klorobenziliden)isopropilamin'in kolon B ile asetonitril:su (50:50 h/h) ve akış hızı:1ml/dk olan sistemde ko-faktörsüz ortamda yapılan inkübasyon sonrası elde edilen metabolik ekstraktan alınan HPLC kromatogramı
(A: N-(4-klorobenziliden)isopropilamin, C: 4-klorobenzaldehit)

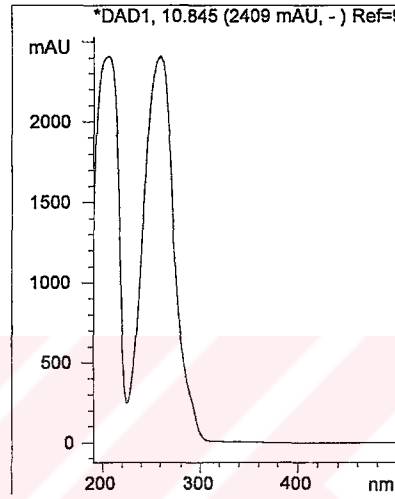


Şekil 23: Standart ve metabolik imin, amid, aldehit ve oksaziridin bileşiklerine ait UV spektrumları (1b: N-(4-klorobenziliden)isopropilamin
2b: N-(4-klorobenzil)isopropilamin 4b: α -(4-klorobenzil)-N-isopropil oksaziridin)

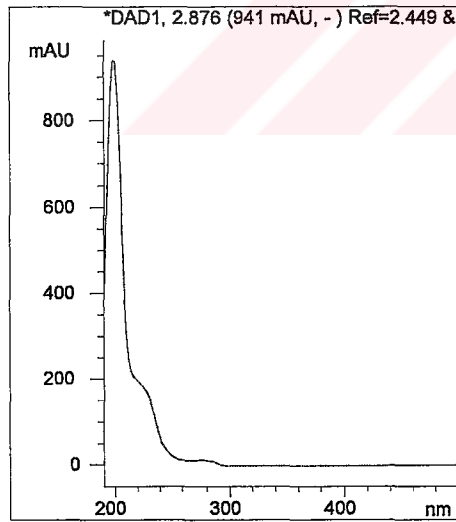
Şekil 23'ün devamı



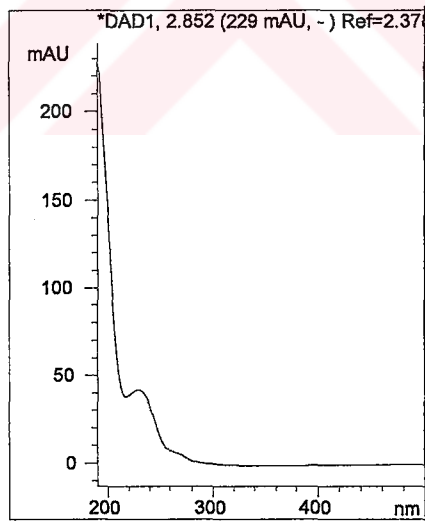
standart 4-klorobenzaldehit



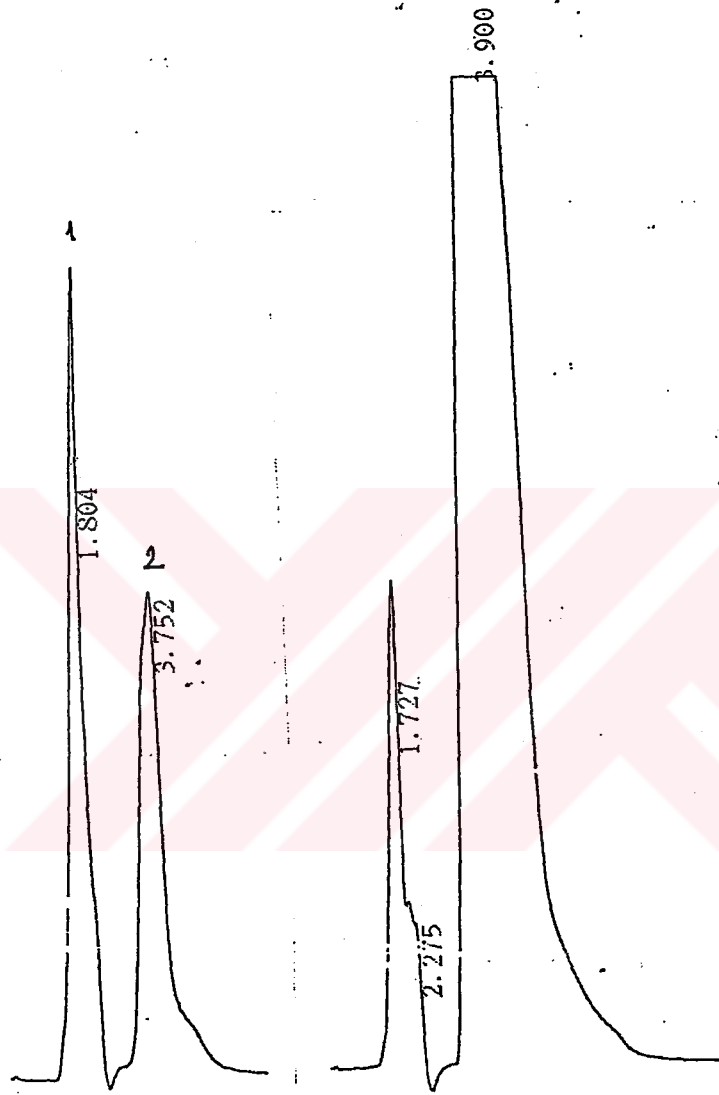
metabolik 4-klorobenzaldehit



standart 4b bileşiği



metabolik 4b bileşiği



Şekil 24: N-(4-klorobenziliden)isopropilamin, 4-klorobenzaldehit ve N-(4-kloro benziliden) isopropilamin'in 37°C'de su banyosunda 15 dakika ısıtılmasıyla elde edilen kromatogramlar.

7. TARTIŞMA

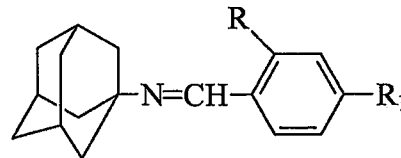
İsopropilamin'in 4-klorobenzaldehit ve 4-nitrobenzaldehyit ile metanollü ortamda geri çeviren soğutucu altında ısıtılması ile 1a ve 1b bileşikleri sentez edilmiştir. Literatürlerde Schiff bazlarının metanol, benzen, piridin, toluen gibi ortamlarda aldehit ve aminin ısıtılmasıyla elde edildiği bildirilmiştir (39,40). 1a ve 1b maddelerinin sentezi metanollü ortamda gerçekleştirilmiş olup % 60 ve % 42 verimle elde edilmiştir. Bileşiklerin saflıkları İnce Tabaka Kromatografisi ve Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi ile tespit edilmiştir.

1a ve 1b maddelerinin metanol içerisinde alınan UV spektrumlarında imin grubunu karakterize eden maksimum absorpsiyon bandları 277 ve 233 nm'lerde tespit edilmiştir.

Gürsoy ve Amal (39, 40) aminotiyazollerin çeşitli aldehitlerle reaksiyonu sonucu elde ettikleri Schiff bazlarında imin gruplarının maksimum absorpsiyonlarını 344-255 nm'lerde tespit etmişlerdir. Supuran ve ark. (78) ise elde ettikleri Schiff bazlarının 272-264 nm'lerde absorpsiyona sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Madde 1a ve 1b'nin KBr içerisinde alınan IR spektrumlarında imin grubuna ait gerilme bandları 1662 ve 1650 cm^{-1} olarak saptanmıştır.

Amal ve ark. (3) 1-aminoadamantan'ın sübstitüe benzaldehitlerle reaksiyonu sonucu elde ettikleri Schiff bazlarında imin grubuna ait gerilme bandlarını 1661 ve 1645 cm^{-1} olarak tespit etmişlerdir.



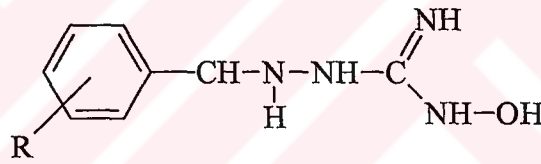
R=OH, H
R₁=H, OCH₃

1a'nın 4 konumunda $-\text{NO}_2$ grubuna ait asimetric gerilme bandları 1550 cm^{-1} , simetric gerilme bandı 13345 cm^{-1} 'de, 1b'nin Ar-Cl gerilme bandında 1075 cm^{-1} 'de tespit edilmiştir.

1a ve 1b'nin DMSO içerisinde alınan $^1\text{H-NMR}$ spektrumlarında imin protonları 8.51 ve 7.94 ppm'de gözlenmiştir.

Schilf ve ark. (71) 5-bromosüstitüe benzaldehit ve süstitüe aminlerin kondensasyonu ile elde edilen Schiff bazlarının iminlere ait protonları 8.24-8.95 ppm'lerde tespit etmişlerdir.

Pignatello ve ark. (63) hidrokiaminoguanidin ve süstitüe benzaldehitin tepkimesinden oluşan Schiff bazlarının $\text{CH}=\text{N}$ protonlarını 7.7. ppm'de tespit etmişlerdir.



R= 3,4-(OCH_2O), 4- OCH_3 , 2,5-(OCH_3)₂, 2,3,4-(OCH_3)₃

1a'nın NMR spektrumunda nitro grubunun meta konumundaki protonlar daha fazla gölgelenerek 7.99 ppm'de doublet, orto konumundakiler ise yine doublet şeklinde 8.29 ppm'de tespit edilmiştir. Madde 1b'de klorun indüktif etkiyle elektron çekme özelliği rezonans etkiyle elektron verme özelliğinden daha kuvvetli olduğundan kloro göre orto konumundaki protonlar daha az gölgelendikleri için 7.34 ppm'de doublet meta konumundaki protonlar ise 7.86 ppm'de doublet olarak gözlenmiştir.

Rollas ve ark. (68) 5-(4-nitrofenil)-1,2,4-triazolin-3-tiyon bileşiğinde nitro grubunun meta konumundaki protonları 7.31 ppm'de, orto konumundakileri 8.22 ppm'de tespit etmişlerdir.

1a ve 1b'nin olası metabolitlerinden olan N-(4-nitrobenzoil)isopropilamin ve N-(4-klorobenzoil)isopropilamin isopropilaminin NaOH'li ortamda p-nitro ve p-kloro benzoil klorürlerle benzoillenmesi sonucu elde edilmiştir (12,84). Amid yapısındaki 2a ve 2b bileşiklerinin metanol içerisinde alınan UV spektrumlarında 265 ve 233 nm'lerde görülen bandların karbonil yapılarını simgelemektedir (82).

N-(4-Nitrobenziliden)isopropilamin ve N-(4-klorobenziliden) isopropilaminin perasitlerle diklorometanlı ortamda oksidasyonu sonucu α -(4-nitrobenzil)-N-isopropil oksaziridin ve α -(4-klorobenzil)-N-isopropil oksaziridin elde edilmiştir (22, 23).Emmons oksaziridinlerin elde edilmesinde en önemli faktörün başlangıç maddesi olan iminlerin asidik ortamda stabil olmaları gerektiğini ve hidrolizi önlemek amacıyla reaksiyonun susuz çözücüler içerisinde yapılması gerektiğini bildirmişlerdir. Elde edilen oksaziridinlerin stabilitelerinin 2 ve 3 konumlarındaki sübstitüentlere bağlı olduğunu tespit etmiştir. Splitter ve Calvin (76) N-alkil- α -aril nitronlardan elde edilen oksaziridinler dayanıklı iken, N- α -diaril nitronlardan elde edilenlerin ise elde dayanıksız olduklarını tespit etmişlerdir. Elde edilen oksaziridinlerin UV spektrumlarında maksimum absorpsiyon bandları 228 ve 226 nm'lerde tespit edilmiştir (31, 32).

Nitronlar UV radyasyon ve direkt güneş ışığından etkilenerek çeşitli bozunma ürünleri verdiği bilindiğinden sentezler sırasında reaksiyon ortamı ışıktan korunmuş ve billurlandırma işleminde mümkün olduğunca ışıktan kaçınılmıştır (37, 76). α -(4-Nitrofenil)-N-isopropil nitron yüksek basınçlı sıvı kromatografisine verildiğinde saf olarak sentezlenememiş olduğu ve sekonder amin safsızlığının yanında N-(4-nitrobenziliden)isopropilamin ve 4-nitrobenzaldehit safsızlıklarının varlığı tespit edilmiştir. (Şekil 10, 11, 12).

Aynı örnek bir gün sonra enjekte edildiğinde yüksek oranda oksaziridin izomerine dönüştüğü UV spektrumları karşılaştırılarak tespit edilmiştir (Şekil 13).

Örnek üç gün sonra asetonitril:0.02M fosfat tamponu (pH:7.03) sisteminde yüksek basınçlı sıvı kromatografisine enjekte edildiğinde ise yüksek oranda N-(4-nitrobenzil)isopropilamin'e dönüştüğü UV spektrumları karşılaştırılarak tespit edilmiştir (Şekil 12 ve Şekil 14).

Substrat ve metabolitleri tespit etmek amacıyla yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde farklı mobil faz sistemleri denenmiştir. Mobil faz olarak asetonitril:su (50:50 h/h) kullanıldığında N-(4-nitrobenziliden)isopropilamin retensiyon zamanı 3.04 dakika olarak tespit edilirken α -(4-nitrobenzil)-N-isopropil oksaziridin çok polar olduğundan 1.32 dakikada gözlenmiştir. asetonitril:su (30:70 h/h) mobil faz sistemi kullanıldığında ise N-(4-nitrobenziliden)isopropilamin 10.45 dakikada gözlenirken α -(4-nitrobenzil)-N-isopropil oksaziridin 1.09 dakikada tespit edilmiştir. asetonitril:su (10: 90, 70:30 h/h) mobil faz sistemlerinde de yine oksaziridin metaboliti dokulara ait piklerin çıkabileceği kısa retensiyon zamanlarında saptanmıştır. Mobil faz olarak pH: 7.03'de 0.02M fosfat tamponu:asetonitril kullanıldığında da uygun bir ayırım sağlanamamıştır.

N-(4-nitrobenziliden)isopropilaminin stabilitesinin son derece düşük olması nedeniyle çalışmanın N-(4-klorobenziliden)isopropilaminin metabolizması üzerinde yoğunlaşmasına karar verilmiştir.

Bu nedenle ilgili N-(4-klorobenziliden)isopropilamin bileşiğinin ve bunlara karşılık gelen olası metabolitleri asetonitril:su (50:50,h/h) sisteminde incelenmiş ancak bileşiklerin ayırımı mümkün olmamıştır.

Daha sonra aynı solvent sistemi, farklı bir kolonda (kolon B) kullanılmış, bu sistemde 1b, 2b bileşikleri ve 4-klorobenzaldehit'le ayırımı sağlanmakla birlikte (tablo 6) 4b ve 5b bileşiklerinden ayırımı mümkün olmamıştır. Su yerine, tampon sistemi kullanılması da bu üç maddenin birbirinden ayırımını sağlanmamıştır (tablo 5). Bu nedenle mevcut çalışmada tablo 6'da gösterilen sistemin kullanılmasına karar verilmiştir.

N-(4-klorobenziliden)isopropilamin'in inkübasyonu, 4.8.2' de belirtilen standart yönteme göre elde edilen karaciğer mikrozomal preparatları ile yapılmıştır. Bu inkübasyonda deney tüpü başına 2 μ mol N-(4-klorobenziliden)isopropilamin [1b] (50 μ l metanolde), 1ml mikrozomal preparat (0.5g. orjinal karaciğere eşdeğer) ve 0.5ml

standart ko-faktör karışımı kullanılmış ve 4.8.4' de belirtilen şekilde reaksiyon gerçekleşmiştir. İnkübasyon protokolü aşağıdaki gibidir:

TÜPLER	SUBSTRAT	MİKROZOM	KO-FAKTÖR
1 TEST	+	+	+
2 TEST	+	+	+
3 KONTROL	+	Denatüre	+
4 KONTROL	+	Denatüre	+
5 KONTROL	+	+	Tampon
6 KONTROL	+	+	Tampon

Reaksiyon deney tüplerine üçer ml diklorometan ilavesiyle durdurulmuştur. Tüpler daha sonra ikişer dakika vortekslenerek, beşer dakika santrifüj edilmiştir. Diklorometan fazları alt faz temiz tüplere alınarak işlem bir kez daha üçer ml diklorometan ilavesiyle tekrarlanmıştır. Diklorometanın karanlıkta ve oda sıcaklığında uçurulması ile metabolik ekstraktlar elde edilmiştir.

Metabolik ekstraktların HPLC analizi ile elde edilen sonuçlar N-(4-klorobenziliden)isopropilamin [1b] bileşiğinin metabolik olarak karşılık gelen N-(4-klorobenzoil)isopropilamin [2b] türevine dönüştüğünü göstermiştir (Şekil 20). Gerek denatüre mikrozomlarla (kontrol 3,4) gerekse ko-faktör ilave etmeksizin yapılan kontrol denemelerinde (kontrol 5,6) 2b metabolitine rastlanmaması (Şekil 21 ve Şekil 22) bu bileşiğin metabolik oksidasyon sonucu oluştuğunu göstermekte ve daha önce diaromatik iminler üzerinde yapılan çalışmayı desteklemektedir(37).

Ayrıca standart ve metabolik N-(4-klorobenzoil)isopropilamin [2b] bileşiğinin UV spektrumları benzerlik göstermektedir (Şekil 23).

N-(4-klorobenziliden)isopropilamin'in inkübasyon sonrası hidrolitik bir reaksiyonla karşılık gelen 4-klorobenzaldehit'e dönüşümü hem test hem de kontrol mikrozomlarıyla yapılan denemelerde saptanmıştır (Şekil 20, 21, 22). Bu olay hidrolitik reaksiyonun non-enzimatik olarak gerçekleştiğini göstermektedir. Standart ve reaksiyon sonucu oluşan 4-klorobenzaldehit UV spektrumları (Şekil 23) de gösterilmektedir.

Kullanılan HPLC sisteminde 4b ve 5b bileşiklerinin 1b bileşiğinden ayrılamaması nedeni ile metabolik ekstrakt yalnızca UV spektrum değerlendirilmesi yöntemi ile 4b ve 5b bileşiklerini içerip içermediği açısından analiz edilmiştir (Şekil 23).

Alınan sonuçlarda nitron bileşiğinin oluşmadığı (yaklaşık 280nm maksimum absorpsiyon gösteriyor) ancak yaklaşık 230nm de absorpsiyon gösteren ve oksaziridine tekabül eden (Şekil 23) bir maddenin oluştuğu görülmektedir. N-(4-klorobenziliden)isopropilamin [1b] bileşiğinin hidrolizinde süre ve sıcaklığın etkisini incelemek için yapılan ön çalışmada N-(4-klorobenziliden)isopropilamin'in belirli konsantrasyondaki (1mg/ml) metanoldeki çözeltisi hazırlanıp oda sıcaklığında 0., 15., 30., 45., 60., dakikalarda ve 24., 48. saatlerde Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisine enjekte edildiğinde 48 saatte bile bozulmadığı saptanmıştır. Örnek 37°C'de çalkalayıcı su banyosunda 15 dakika tutulduktan sonra enjekte edildiğinde ise hidrolize uğradığı ve yüksek konsantrasyonda 4-klorobenzaldehit'e dönüştüğü tespit edilmiştir (Şekil 24).

8. SONUÇ

Stabil oksaziridinlere karşılık gelen model imin bileşiklerin sentezlenmesi ve *in vitro* karaciğer mikrozomal metabolizmalarının (özellikle oksaziridin metabolitlerinin) araştırılması amacıyla yapılan bu çalışmada, iki adet Schiff bazı N-(4-nitrobenziliden)isopropilamin ve N-(4-klorobenziliden)isopropilamin, ayrıca kendilerine karşılık gelen oksidasyon metabolitleri olan oksaziridin, nitron ve amidler sentezlenmiş ve bu bileşiklerin yapıları spektroskopik yöntemlerle aydınlatılmıştır. Daha sonra tüm bu bileşiklerin birbirinden ayrıldığı bir zıt faz HPLC sistemi geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu bileşiklerden prototip olarak seçilen N-(4-klorobenziliden)isopropilamin karaciğer mikrozomal preparatları ile inkübe edilmiş ve bu bileşimin metabolik oksidasyon reaksiyon sonrası karşılık gelen oksaziridin ve amid türevlerine dönüştüğü tespit edilmiştir. Bu bileşimin ayrıca 37°C'lik organizma sıcaklığında büyük ölçüde (non-enzimatik olarak) hidroliz sonucu karşılık gelen aldehit metabolitini verdiği saptanmıştır. İminlerin vücut sıcaklığında kolaylıkla hidrolize olarak aldehit ve amin bileşiklerine dönüşümü, organizmadaki endojen bileşiklerle birleşebilme kabiliyetindeki bu son iki ürünün potansiyel toksik reaksiyon oluşturma riski yükseltmektedir. Mevcut sonuçlar, araştırma konumuzu oluşturan iminlerin ve potansiyel metabolitlerinin gerek vücut ısısında gerekse karanlıkta ve uygun sıcaklıklardaki saklama şartlarında bile kimyasal bozulma ürünlerine dönüşebileceğini göstermiştir. Bu nedenle, organik ilaç tasarımında bu tip bileşikler kullanılacağına bozunma potansiyellerinin de dikkate alınması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1-Al-Ani M.R., Wood S.G., Lawson A.: Comparison of the major urinary metabolites of saddamine and aspirin using thin-layer chromatography. *J.Chromatogr.*, 166: 626-631, 1978.

2-Al-Ani M.R., Wood S.G., Lawson A.: The metabolism of saddamine in man: The fate of the benzylamine moiety of saddamine. *Eur. J. Drug Met. Pharm.*, 2: 117-119, 1979.

3-Amal H., Gürsoy A., Kreutzberger A.: 1-Aminoadamantan'ın Schiff bazları. *J. Fac. Pharm. Istanbul*, 10: 61-66, 1974.

4-Armstrong A., Draffan A.G.: Highyl stereoselective intramolecular epoxidation in unsaturated oxaziridines. *Tetrahedron Letters*, 40: 4453-4456, 1999.

5- Atta S.M., Ameen A.: Preparation of new Schiff bases derived from β -enamino-nitriles and hetarylcarboxaldehydes. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 43(11): 1354-1356, 1993.

6-Auret B.J.,Boyd D.R.,Coulter P.B.:Autoxidation reactions of imines to form oxaziridines and amides.*J.Chem.Soc.*,463,1984.

7-Beckett A.H.,Coutts R.T.,Ogunbona F.A.:The structure of nitrones derived from amphetamines. *J.Pharm.Pharmac.*, 26: 312-316, 1974.

8-Beckett A.H.,Hutt A.J.,Navas G.E.:Metabolism of imipramine in vitro synthesis and characterization of N-hydroxydesmethylimipramine.*Xenobitica.*,13:391,1983.

9-Billman J.H.,Diesing A.C.: Reduction of schiff bases with sodium borohydride. *J.Org.Chem.* 22:1068-1070,1957.

10-Bloomer C.J.,Clarke E.S.,Chenery.:In vitro identification of the P450 enzymes responsible for the metabolism of ropinirole. Drug Metab. Dispos.,25(7):840-844,1997.

11-Boberg M.,Angerbauer R.,Kanhai W.K.,Karl W.,Kern A.,Ratke M.,Steinke W.:Biotransformation of cerivastatin in mice,rats,and dogs in vivo . Drug Metab. Dispos.,26(7):640-652,1998.

12-Braun J.V.,Beschke E.: Die aufspaltung des pyrrolidins nach der halogenphosphoormethode.39(4):4119-4125,1906.

13-Cardile V.,Panico A.M.,Geronikaki A.,Gentile B.,Ronsisvalle G.:In vitro evaluation of thiazolyl and benzothiazolyl schiff bases on pig cartilage. Il Farmaco.,57:1009-1013,2002.

14-Chang M.,Sood V.K.,Wilson G.J.,Kloosterman D.A.,Sanders P.E.,Schuette M.E.,Judy R.W.,Voorman R.L.,Maio.S.M.,Slatter J.G.:Absorption, distribution, metabolism and excretion of atevirdine in the rat. Drug Metab. Dispos.,26(10):1008-1018,1998.

15-Clement B.,Demesmaeker M:Formation of guanoxabenz from guanabenz in human liver.Drug Metab. Dispos.,25(11):1266-1271,1997

16-Clement B.,Lustig K.L.,Ziegler D.M.:Oxidation of desmethylpromethazine catalyzed by pig liver flavin-containing monooxygenase.Drug Metab. Dispos.,21(1):21-24,1993.

17-Colanna S.,Pironti V.,Pasta P.,Zambianchi F.:Oxidation of amines catalyzed by cyclohexanone monooxygenase.Tetrahedron Letters.,44(4):869-871,2003.

18-Cowan D.A.,Patterson L.H.,Damani L.A.,Gorrod J.W.:Metabolism of 4-substituted N-ethyl-N-methylanilines chromatographic and mass spectrometric identification of N-oxidation metabolic products formed in vitro biomed.Mass Spect.,9:233,1982.

- 19- Czerwinska E., Eckstein Z., Kowalik R., Krzywicka H., Zwierz E.: Bactericidal and fungicidal activity of Schiff bases derived from salicylaldehyde. *Dissertationes Pharm.*, 15(5): 369-378, 1964 (Chem. Abst. 61: 3007, 1964).
- 20-Damani L.A, Patterson L.H., Gorrod J. W.: Thin-layer chromatographic separation and identification of tertiary aromatic amines and their N-oxides. *J.Chromatog.*, 155:337, 1978.
- 21-Dziembowska T., Majewski E., Rozwadowski Z., Brzezinski B.: Intramolecular hydrogen bonds in N-oxides of schiff bases. *J.of Molecular Structure.*, 403:183-187, 1997.
- 22-Emmons W.D.: The synthesis of oxaziranes. *J.Am.Chem.Soc.*, 78:6208-6209, 1956.
- 23-Emmons W.D.: The preparation and properties of oxaziranes. *J.Am Chem.Soc.*, 79:5739-5754, 1957.
- 24-Ergenç N., Gürsoy A., Ateş Ö.: İlaçların tanınması ve kantitatif tayini. İ.Ü.3566:55 İstanbul.
- 25- Fenech G., Tommasini A., La Rosa C.: Synthesis of some derivatives of 5-nitrofurfural and their antibacterial action *in vitro*. *Il Farmaco*, 10: 398-412, 1955 (Chem. Abst. 50: 4108, 1959).
- 26-Forcato M., Nugent W.A., Licini G.: A waterproof catalyst for the oxidation of secondary amines to nitrones with alkyl hydroperoxides. *Tetrahedron Letters.*, 44(1):49-52, 2003.
- 27-Fusco R., Canonica L.: Reduction of phenylhydrazone-p-sulfonic acids. *Chimica e Industria.*, 32:208-210, 1950. (Chem Abst 45:4645, 1951.)

28-Gooderham N.J.,Gorrod J.W.:Microsomal N-oxidation of secondary aromatic amines.Gorrod J.W.,Damani,L.A.ed .,Biological Oxidation Of Nitrogen In Organic Molecules Ellis Horwood Ltd.,Chichester,81-94,1985.

29-Gooderham N.J.,Gorrod J.W.: Microsomal formation of amides from secondary aromatic Amines.Gorrod J. W.et al Ed .,development of Drugs &Modern Medicines.Ellis Horwood Ltd Chichester .,319-323,1986.

30-Gordon W.P., Cheng H.,Larsen D.L.,Ragner.J.A.,Landmesser N.G.: Identification of urinary metabolites of 8-methyl-8-azabicyclo- [3,2,1]octan-3-yl 3,5 dichlorobenzoate (Mdl72,222) in the dog and monkey.Drug Metab.Dispos.,20:596-603,1992.

31-Gorrod J.W.: Chemical determinants of the enzymology of organic nitrogen oxidation. Am. Soc. Pharm. and Exp. Ther.13:283,1985.

32-Gorrod J.W.,Christou M.: Metabolic N-hydroxylation of substituted acetophenone imines. I.Evidence for formation of isomeric oximes. Xenobiotica.,16:575-585

33-Gorrod J.W.,Gooderham N.J.:Microsomal N- and C-oxidation of 4-substituted N-benzylanilines:Xenobiotica:15,1021,1985

34-Gorrod J.W.,Gooderman N.J.: The metabolism of N-benzyl-4-substituted anilines: factors influencing in vitro C- and N-oxidation.Xenobiotica .,15(12):1021-1031,1985.

35-Gorrod J.W.,Gooderham N.J.:Improved preparation of α ,N-diphenylnitrones and N-benzyl-N-phenylhydroxylamines by direct oxidation of secondary anilines.Arch.Pharm.(Weinheim).,319:261-265,1986.

36-Gorrod J.W.,Patterson L.H.:The metabolism of 4-substituted N-ethyl-N-methylanilines III. Effect of various inhibitors,activators and inducers on C- and N-oxidation.Xenobiotica.,13:521,1983

- 37-Gorrod J.W., Ülgen M.: Metabolic N-oxidation of diarylamines: A new metabolic reaction of potential toxicological significance. *Drug Metabolism Reviews.*,26(1&2):241-252,1994.
- 38-Griffin R.J., Godfrey V.B., Kim Y., Burka L.T.: Sex-dependent differences in the disposition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in sprague-dawley rats B6C3F1 mice and syrian hamsters. *Drug Metab. Dispos.*, 25(9):1065-1071
- 39- Gürsoy A., Amal H.: 2-Amino-1,3,4-tiazol Schiff bazları. *J. Fac. Pharm. Istanbul*, 3: 148-154, 1967.
- 40-Gürsoy A., Amal H.: 2-Amino-4-fenazoniltiazolün Schiff bazları. *J. Fac. Pharm. Istanbul*, 3: 95-104, 1967.
- 41-Hartman R.N., Leo U.K., Brewer G.T., Strong M.J.:The in vitro metabolism of penclomedine in mouse, rat, and human Systems. *Drug Metab. Dispos.*,26(6):513-519,1998.
- 42-Hodnett M.E., Dunn J.W.: Structure antitumor activity correlation of some Schiff bases. *J. Med. Chem.*, 13(4): 768-770, 1970.
- 43-Kadlubar F.F., Morton K.C., Ziegler D.M.: Microsomal catalysed hydroperoxide dependent C-oxidation of amines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,54:1255,1973.
- 44-Kashiyama E., Yokoi T., Odomi M., Funae Y., Inoue K., Kamataki T.:Cytochrome P450 responsible for the stereoselective S-oxidation of flosequinan in hepatic microsomes from rats and humans. *Drug Metab. Dispos.*,25(6):716-724,1997.
- 45-Kitani M., Miyamoto G., Nagasawa M., Toshihide Y., Matsubara J., Uchida M., Odomi M.:Biotransformation of the novel inotropic agent toborinone (OPC-18790) in rats and dogs. *Drug Metab. Dispos.*, 25(6):663-674 ,1997

46-Kucukguzel S.G., Kucukguzel I., Ulgen M.: Metabolic and chemical studies on N-(4-chlorobenzyl)-N'-benzoylhydrazine. *Farmaco.*,55:624-630,2000.

47-Larsen B.S.,Schroll G.,Lawesson S.O.:The mass spectra of nitrones C-O bond formation upon electron impact.*Tetrahedron Letters.*,24:5193-5203,1968.

48-Layer R.W.: The chemistry of imines. *J. Pharm. Sci.*, 63: 489-510, 1963.

49-Leonard N.J.,Nommensen E.W.: Studies on the mechanism of the von braun reaction.*J.Am.Chem.Soc.*,71:2808-2813,1949.

50-Low C.M.,Ülgen M.,Gorrod J.W.,The recognition of a diarylimine as a metabonate produced during incubation of N-benzyl-4-chloroaniline with hepatic microsomal preparations.*J.Pharm.Pharmacol.*,46:585,1994.

51-Maggs J.L., Pirmohamed M.,Kitteringham.N.R.,Park.BK.: Characterization of the metabolites of carbamazepine in patient urine by liquid chromatography/mass spectrometry. *Drug Metab. Dispos.*,25(3):275-280,1997

52-Marten T.R.:Metabolites are important too.*Chemistry in Britain.*,745,1985.

53-Martin S.W,Bishop.F.E, Kerr B M.,Moor M.,Moore M.,Sheffels P.,Rashed M.,Slatter J.G.,Cedille L.B.,Lepage F.,Descombe J.J.,Picard M.,Baillie T.A.,Levy R.H:Pharmacokinetics and metabolism of the novel anticonvulsant agent N-(2,6-dimethylphenyl)-5-methyl-3-isoxazolecarboxamide (D2624)in rats and humans. *Drug Metab. Dispos.*,25(1):40-46,1997.

54-Mattiuz E.,Franklin R.,Gillespie T.,Murphy A.,Bernstein J.,Chiu A.,Hotten T.,Kassahun K:Disposition and metabolism of olanzapine in mice,dogs,and rhesus monkeys.*Drug Metab. Dispos.*,25(5):573-583,1997.

55-Maurizis J.C., Madelmont J.C., Rapp M., Marijnen C., Cerf M.C., Gillardin J.M., Lepage F., Inserm V.A: Disposition and metabolism of 2,6-dimethylbenzamide N-(5-methyl-3-isoxazolyl)(D2916) in male and female rats. *Drug Metab Dispos.*, 25(1):33-39, 1997.

56-Modi J.D., Sabnis S.S., Deliwala C.V.: Antitumor agents. Schiff bases from benzaldehyde nitrogen mustards and 2-phenyl-4-[(3-amino-4-methoxy)phenyl]thiazole. *J. Med. Chem.*, 14(5): 450-451, 1971.

57-Ogata Y., Sawaki Y.: Peracid oxidation of imines kinetics of oxazirane formation from benzylidene-tert-butylamines and perbenzoic acid. *J. Amer. Chem. Soc.*, 95(14)4687-4689, 1973.

58-Ohba Y., Kubo K., Sakurai T.: Sensitized ring-opening reactions of 3-(1-naphthyl)-2-(1-naphthalenemethyl)oxaziridine. *Journal Of Photochemistry and Photobiology.*, 113:45-51, 1998.

59-Olesen O.V., Linnet K.: Hydroxylation and demethylation of the tricyclic antidepressant nortriptyline by cDNA-expressed human cytochrome P-450 isozymes. *Drug Metab. Dispos.*, 25(6):740-744, 1997.

60-Parli C.J., Wang N., McMahon R.E.: The enzymatic N-hydroxylation of an imine. A new cytochrome P-450-dependent reaction catalysed by hepatic microsomal monooxygenases. *J. Biol. Chem.*, 246:6953-6955.

61-Patonay T., Litkei G.Y., Bogнар R., Erdei J., Miszti C.: Synthesis, antibacterial and antifungal activity of 4-hydroxycoumarin derivatives, analogues of novobiocin. *Pharmazie*, 39: 86-91, 1984.

62-Pattichis K.: The in vitro metabolic fate of mifentidine, A novel histamine H₂-receptor antagonist. King's College London: Phd. Thesis, London, 1991.

63- Pignatello R., Panico A., Mazzone P., Pinizzotto M.R., Garozzo A., Furneri P.M.: Schiff bases of N-hydroxy-N-aminoguanidines as antiviral, antibacterial and anticancer agents. Eur. J. Med. Chem., 29: 781-785, 1994.

64-Popp F.D., Krisch W.: Synthesis of potential anticancer agents. V. Schiff bases and related compounds. J. Org. Chem., 26: 3858-3860, 1961.

65-Porretta G.C., Biava M., Cerreto F., Scalzo M., Panico S., Simonetti N., Villa A.: Research on anti-bacterial and anti-fungal agents II. Synthesis and anti-fungal activity of new (1H-imidazol-1ylmethyl)-benzenamine derivatives. Eur. J. Med. Chem., 23: 311-317, 1988.

66-Prakash C.,Kamel A.,Gummerus J.,Wilner K.:Metabolism and excretion of a new antipsychotic drug,ziprasidone,in humans.Drug Metab. Dispos.,25(7):863-872,1997.

67-Rollas S.: İlaçların metabolizması.M.Ü Yayın no:525 ; Eczacılık Fak .yayın no:10 İstanbul .

68-Rollas S,Yılmaz N., Erdeniz H.,Kiraz M.: Antimicrobial activities of some 5-(4-nitro aminophenyl)-1,2,4-triazoline-3-thione derivates. Journal Medical Science Research.,26:83-84,1998.

69-Roy S.K.,Moschel .R.C.,Dolan M.E.:Pharmacokinetics and metabolism in rats of 2,4-diamino-6-benzyloxy-5-nitrosopyrimidine,an inactivator of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase: Drug Metab. Dispos.,24(11)1205-1211,1996.

70-Sar C.,Hideg E., Vass I.,Hideg K.:Synthesis of α -aryl N-adamant -1-yl nitrones and using them for spin trapping of hydroxyl Radicals. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters.,379-384,1998.

71-Schilf W.,Szady-Chelmieniecka A.,Grech E.,Przybylski P.,Brzezinski B.: Spectroscopic studies of new schiff and schiff-mannich bases of ortho-derivates of 4-bromophenol. Journal of Molecular Structure.,643:115-121,2002.

72-Shapiro S.L.,Parrino V.A.,Freedman L.: Hypoglycemic agents I.chemical properties of α -phenethylbiguanide. A new hypoglemic agent. J.Am.Chem.Soc.(Chem.Abst.53,21738)

73-Shin S H:Metabolism of selegiline in humans.Drug Metab. Dispos.,25(6):657-662,1997.

74-Shinzawa K.,Tanaka I.:The photochemical isomerization of α ,N-diphenylnitron: The Journal Of Chemistry; 68(6): 1205-12113, 1964.

75-Slatter J.G.,Abbott F.S.,Burton R.: Identification of the biliary metabolites of (+) - 3-dimethylamino-1,1-diphenylbutane H CL (recipavrin) i n rats. Xenobiotica.,20: 999-1024.

76-Splitter J.S.,Calvin M.:Preparation of oxaziranes by irradiation of nitrones.J.Org.Chem.,23:1958.

77-Sridhar S.K.,Ramesh A.: Synthesis,characterization and pharmacological screening of some isatinoid compounds. Indian J. Chem.,41:668-672,2002.

78-Supuran C .T., Nicolae A ., Popescu A .: Carbonic anhydrase inhibitors. Part 35. Synthesis of Schiff bases derived from sulfanilamide and aromatic aldehydes: The first inhibitors with equally high affinity towards cytosolic and membrane-bound isozymes. Eur. J. Med. Chem., 31: 431-438, 1996

79-Surapaneni S.S.,Clay M.P.,Spangle L.A.,Paschal J.W.,Lindstrom T.D.:In vitro biotransformation and identification of human cytochrome P450 isozyme dependent metabolism of tazofelone.Drug Metab. Dispos.,25(12):1383-1388,1997.

- 80-Surrey A.R.: N-alkyl-N-(substituted-benzyl)dihaloacetamides. Amebicidal Preps.,(Chem Abs 53:8072, 1958).
- 81-Ülgen M.:In vitro oksidatif mikrozamal 1.faz ilaç metabolizması teknikleri.J Pharm.Univ.Mar.,9:165,1993.
- 82-Ülgen M.,Erçak K.,Küçükgülzel İ.,Gorrod J.W.: In vitro microsomal metabolic studies on secondary aromatic amides. Boll. Chim.Farmaceutico.,136(9):600-604,1997.
- 83-Ülgen M.,Gorrod J.W.: Microsomal formation of N-benzyl-4-hydroxymetyaniline from N-benzyl-4-methylaniline.J.Pharm Pharmacol.,44:865-866,1992.
- 84-Ülgen M.,Gorrod J.W.: Synthesis, characterization and chromatografic studies on some new substituted α -N-Diarylnitrones. J.Pharm. Univ.Mar.,8(2):135-143,1992.
- 85-Ülgen M.,Gorrod J. W.:Synthesis,isolation and characterization of some substituted N-benzyl and N-benzoyl anilines.J.Fac.Pharm.İstanbul.,30:1-9,1994.
- 86-Ülgen M.,Gorrod J.W.,Barlow D.: Structure-activity relationships in the formation of amides from substituted N-benzylanilines.Xenobiotica.,24(0)735-748,1994.
- 87-Ülgen M.,Yılmaz F.,Unsalan S.,Gorrod J.W.: Chemical and metabolic studies on N-Benzyl-Tert-butylamine and its potential metabolitis.Drug Metabolism and Drug Interactions.,12(2): 131-143,1995.
- 88-Walker N.G., Klett A.M.: Synthesis of varied heterocyclic and substituted aryl alkyl secondary amines, related Schiff bases and amides. J. Med. Chem., 9(4): 624-630, 1966.
- 89-Wang P., Keck J.G., Lien E.J., Lai M.M.C.: Design, synthesis, testing and quantitative structure-activity relationship analysis of substituted salicylaldehyde Schiff

bases of 1-amino-3-hydroxyguanidine tosylate as new antiviral agents against coronavirus. *J. Med. Chem.*, 33: 608-614, 1990.

90-Wever J.,Münzer R.,Renner H.W.:Testing of sunset yellow and orange II for genotoxicity in different laboratory animal species.*Environmental and Molecular Mutagenesis.*,13:271-276,1989.

91-Yu Z.,Hayton.W.L.,Chan K.K.: Characterization of proflavine metabolites in rainbow trout. *Drug Metab. Dispos.*,25(4):431-436 ,1997

92-Zalko D.,Debrauwer L.,Bories G.,Tulliez J.:Metabolism of clenbuterol in rats.*Drug Metab. Dispos.*,26(9):891-899,1998.



10. ÖZGEÇMİŞ

21 Şubat 1977 Akşehir'de doğdum. Orta öğrenimimi Akşehir Atatürk Ortaokulu'nda, lise öğrenimimi İstanbul Bilfen Lisesi'nde tamamladım. 1994 yılında Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde öğrenimime başladım. 1998 yılında mezun olduktan sonra serbest eczacılık yapmaya başladım.2000 yılında Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasotik Kimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladım. Halen serbest eczacılık yapmaktayım.



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans öğrencisi Enis KAHVECİOĞLU'nun, çalışması jürimiz tarafından Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak uygun görülmüştür.

İMZA

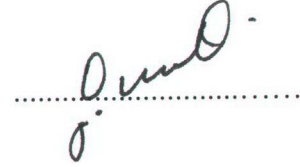
Tez Danışmanı : Prof.Dr.Mert ÜLGEN
Üniversitesi : Marmara



Üye : Prof.Dr.Sevim ROLLAS
Üniversitesi : Marmara




Üye : Doç.Dr.Gülden Z.OMURTAG
Üniversitesi : Marmara



ONAY

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 15 / 10 / 2003 tarih ve 01 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof.Dr.Sevim ROLLAS
Müdür

**T.C. TÜRKİYE KÜLTÜR VE TURİZM BAKANLIĞI
FARMASÖTİK ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ**