

A.Ü.Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Kürsüsü
Prof. Dr. M. Şahin Akman

**SULFAMİD İHTİVA EDEN İLAÇLARIN İNCE TABAKA
KROMATOĞRAFİSİ, ÇIKAN (ASCENDING) METOT VE
SİRKÜLER KAGIT KROMATOĞRAFİSİ İLE
İNCELENMESİ**

M.Şahin Akman* **Kemal Ozan**** **Selahattin Ceylan*****

Summary

**Separation and Identification of Sulphonamides by
Thin-Layer and Paper Chromatography**

Pharmaceutical preparations which contain various sulphonamides were separated and identified by thin-layer chromatography, ascending method and circular method paper chromatography. These three chromatographic methods were compared.

Özet

Sulfamid ihtiva eden çeşitli ilaçlar ince tabaka kromatografisi, çıkan metot ve sirküler kâğıt kromatografisi vasıtasıyla incelendi. Solvén olarak amonyakla doyurulmuş iso-butil alkol, belirtme ayıracı olarak da HCl ile asitlendirilmiş p-dimetilaminobenzaldehid kullanıldı. Her üç kromatografi tekniğinin de bu ayırıcıların kullanılması suretiyle farmasötik sulfamid preparatlarının seperasyon ve identifikasyonunda yeterli sonuçlar verdiği saptandı. Sirküler kâğıt kromatografisinin ilaç analizlerinde ve öğrenci tatbikatlarında kullanılmak üzere uygun ve ekonomik olduğu kanısına varıldı.

* A.Ü. Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Kürsüsü Profesörü, Ankara, Türkiye.

** Aynı Kürsüde doçent.

*** Aynı kürsüde Dr. Asistan.

Giriş

Kromatografi, diğer fizikoşimik metotların yetersiz kaldığı veya güçlüğüle uygulanabildiği, kimyasal bakımdan birbirine çok yakın bileşiklerin ayırt edilecek tanınmalarını mümkün kılar. Bu yönden düşünüldüğü zaman sulfamidlerin gerek nitel ve gerekse nicel olarak tanınmaları için kromatografik metotlar çok uygundur.

Sulfamidlerin arı halde iken ya da çeşitli farmasötik preparatlardan ekstrakte edildikten sonra teşhisleri için birçok araştırmacılar kromatografik metodlarla çalışmışlardır. Bunlardan başlıcaları ince tabaka kromatografisi (2,3,8), çıkan metot kâğıt kromatografisi (1,4,5,6) ve sirküler kâğıt kromatografisini (7) kapsamaktadır.

Memleketimizde son zamanlarda ilaç kontrolü sorunu, bu konu ile doğrudan ilişkisi olsun olmasın, herkesin zihnini kurcalayan bir önem kazanmıştır. Bu alanda güvenilir metodların uygulanarak yanılmaya meydan vermeyecek analiz sonuçlarına ulaşılması zorunlu olmaktadır. Bu çalışmamızda, çeşitli kromatografik metot ve tekniklerin sulfamidlerin ayırt edilmesinde ve tanınmalarındaki yararlarının karşılaştırılması ve dolayısıyla memleketimizde imâl edilen sulfamidli ilaçların nitel olarak kontrolleri yönünden incelemeler yapılmıştır.

Materyal ve Metod

Toz, tablet, komprime veya solusyon şeklinde 10 çeşit sulfamid (sulfanilamid, sulfatiazol, sulfapiridin, sulfamezatin, diazinol, sulfadiazin, madribon, gantrisin, Eftolon, albusid) ince tabaka kromatografisi, çıkan metot kâğıt kromatografisi ve sirküler kâğıt kromatografisi olmak üzere üç teknikle kromatografiye tâbi tutuldu. Bu amaçla literatürde belirtilen bazı metotlardan (1,4,5,7,8) yararlanıldı.

Sulfamid çözeltilerinin hazırlanması: Kromatografisi yapılacak sulfamidlerin kromatograma uygulamak için kullanılacak çözeltilerini hazırlamak amacıyla materyal kısmında adı geçen her bir sulfamiden 0,250 g. aktif madde isabet edecek şekilde tartıldı; 3-4 ml. amonyakta eritildi ve damıtık su ile 5 ml.ye ulaştırıldı. Tablet, komprime ya da toz karışımı olarak hazırlanmış sulfamidli preparatların ihtiva ettiği taşıyıcı maddeler çökelti ve bulanıklık husule getirdiğinden bunları ayırt etmek için çözeltiler ayrı ayrı süzgeç kâğıdından süzülme suretiyle berraklaştırıldı. Albucid göz damlası, Eftolon solusyon ve Sulfamezathin solusyon olduğu gibi kullanıldı.

Amonyaklı butanol çözeltisi: Kromatogramların devalopmanı için kullanılacak solvanı hazırlamak üzere aşağıdaki formülde gösterilen miktarlarda alınan üç sıvı bir ayırma hunisinde birçok defalar çalkalandıktan sonra kendi haline bırakıldı. Altta kalan sıvı faz çekildi ve amonyaklı su ile doymuş butanolden ibaret olan üstteki faz solvan olarak kullanıldı.

İso-butil alkol	500 ml.
Damıtık su	375 ml.
Amonyak (% 25 d:0,91)	125 ml.

p-Dimetilaminobenzaldehid ayırıcı (Ehrlich ayırıcı): Devalope edilmiş ve kurutulmuş kromatogramlardaki sulfamid lekelerinin görünür duruma getirilmesi için formülü aşağıda verilen belirtme ayırıcı hazırlandı.

p-Dimetilaminobenzaldehid	1 g.
Hidroklorik asit (d:1, 19)	10 ml.
Damıtık su q.s.p.	100 ml.

1. *İnce tabaka kromatografisi*: Silica Gel G ile 0,250 mm. kalınlıkta kaplanmış ve 105° C'de 30 dakika müddetle aktive edilmiş 20x20 cm. boyutlarındaki cam plakalar kullanıldı. Plakalar üzerinde 2 cm. aralıklarla işaretlenmiş olan uygulama noktalarına sulfamid çözeltilerinden 1 mikropipet damlası konuldu. Havası amonyaklı butanolle doyurulmuş tank içerisinde 10 cm. mesafeye kadar (ortalama 1 saat 30 dakika) devalopman yapıldı.

2. *Çıkan metot kâğıt kromatografisi*: 10x20 cm. boyutlarında kesilen bir Whatman No: 1 süzgeç kâğıdı parçası üzerinde 2 cm. aralıklarla işaretlenmiş noktalara sulfamidler yukarıda anlatıldığı miktarda uygulanarak 10 cm. mesafeye kadar (ortalama 2 saat 30 dakika) devalope edildi.

3. *Sirküler kâğıt kromatografisi*: Whatman No: 1 süzgeç kâğıdı 17 cm. çapında bir daire biçiminde kesildi; 8 üçgene ayrılacak şekilde merkezden geçen kıvrımlar yapıldı. Merkez noktası, kâğıttan bir fitil takmak için 1 mm. çapında delindi. Ayrıca merkezden 1 cm. mesafede kıvrım yerlerine isabet edecek şekilde küçük delikler açıldı ve bu deliklerin aralarına sulfamid çözeltilerinden 1 mikropipet damlası uygulandı (Şekil 3). 15 cm. iç çapındaki bir petri kutusuna amonyaklı butanol (50 ml.) konuldu; sirküler kâğıt oturtularak petri kutusunun kapağı kapatıldı ve hepsi solvan buharlarıyla doymun durumdaki bir cam akvaryuma yerleştirilerek, solvan petri kutusu kapağının iç kenarları hizasına gelinceye kadar (ortalama 2 saat) devalopman yapıldı. Devalopman süresi merkezdeki deliğin çapına ve dolayısıyla

kâğıt fitilin kalınlığına bağlı olarak değişmektedir. Fitil ince olduğu takdirde bu süre uzar.

Sulfamid lekelerinin belirtilmesi: Her üç teknikle devalope edilmiş kromatogramlar 50°C'de etüvde 15 dakika kurumaya bırakıldı. Sonra p-dimetilanobenzaldehid ayırıcı püskürtüldü ve bu şekilde sulfamidler beyaz zemin üzerinde portakal sarısı renginde lekeler halinde görünür duruma getirildi.

Sonuçlar

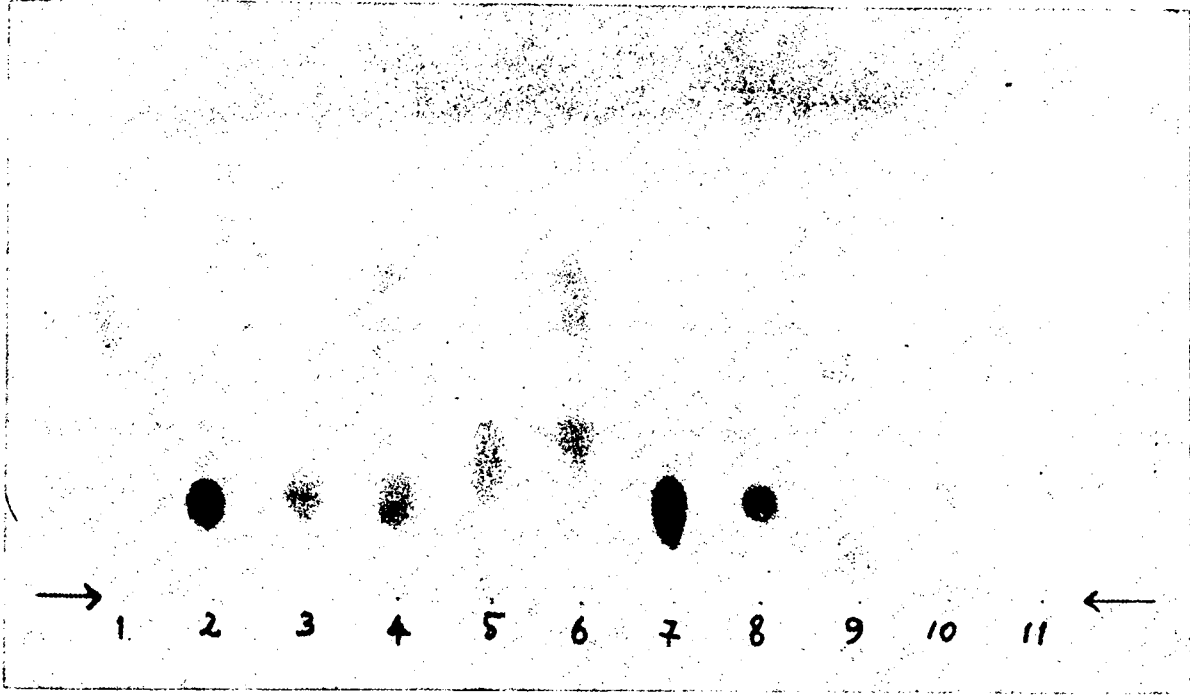
Üç kromatografi tekniği ile toplam olarak 15 deney yapılmış ve Tablo: I'de özetlenmiş olan sonuçlar elde edilmiştir. Tablo: I'den ve Şekil: I,II ve III'den anlaşılacağı gibi her üç teknikle de aynı solvan ve aynı belirtme ayırıcı kullanılarak yapılan deneylerde 10

TABLO: I

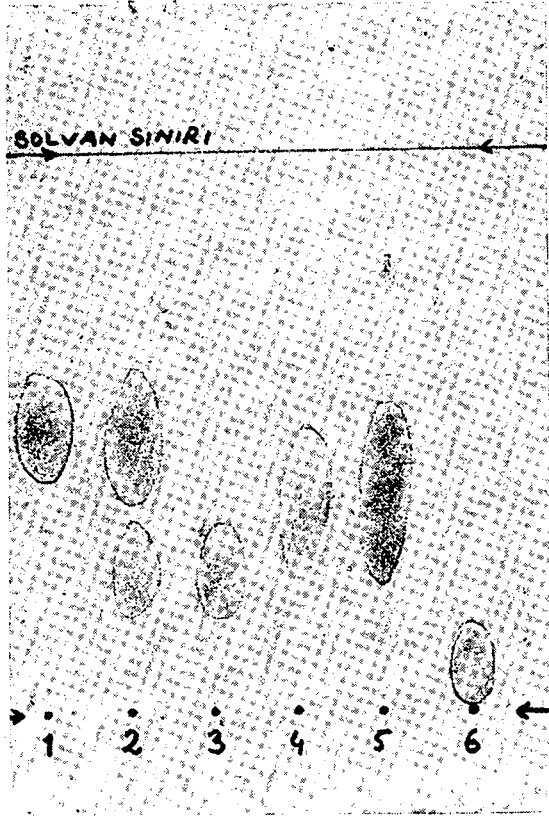
Deneycrimizde kullandığımız sulfamid preparatlarının bileşimleri ve kromatografilerinden alınan sonuçlar

İlacın Adı	Bileşimi	Analiz Sonuçları*
1. Sulfanilamid	Sulfanilamid (saf)	+
2. Sulfatiazol	Sulfatiazol (saf)	+
3. SP ₃ (Eczacıbaşı) Kont. no: 85721 İmal T. 1.10.1968	Penisillin krist. Sulfanilamid Sulfatiazol	— + +
4. SP ₃ (Eczacıbaşı) Kont. no: 96065 İmal T. 26.11.1969	Penisillin krist. Sulfanilamid Sulfatiazol	+ + +
5. Sulfacol (Wander) (serpme tozu)	Sulfanilamid Sulfapiridin Ca Aluminyum hidr. koll.	+ + +
6. Sulfapyridin (tabl.) (May and Baker)	Sulfapiridin	+
7. Ultradiazin (kompr.) (Atabay)	Sulfadiazin	+
8. Diazinol (kompr.) (Wander)	Diazinol	—
9. Gantrisin (tabl.) (Roche)	Sulfizoksazol	+
10. Albucid (damla) (Schering)	Sulfasetamid natrium	+
11. Madribon (tabl.) (Roche)	Sulfadimetoksin	+
12. Eftolon (Vet. sol.) (Pfizer)	5- (p-aminobenzen sulfonamid)-1- fenil pirazol	+
13. Sulphamezathine (Vet. sol.) (Doğu İlaç Fb.)	Sulfamezatin	+

* (+) işareti tesbit edilen, (—) işareti tesbit edilemeyen sulfamidleri belirtmektedir.



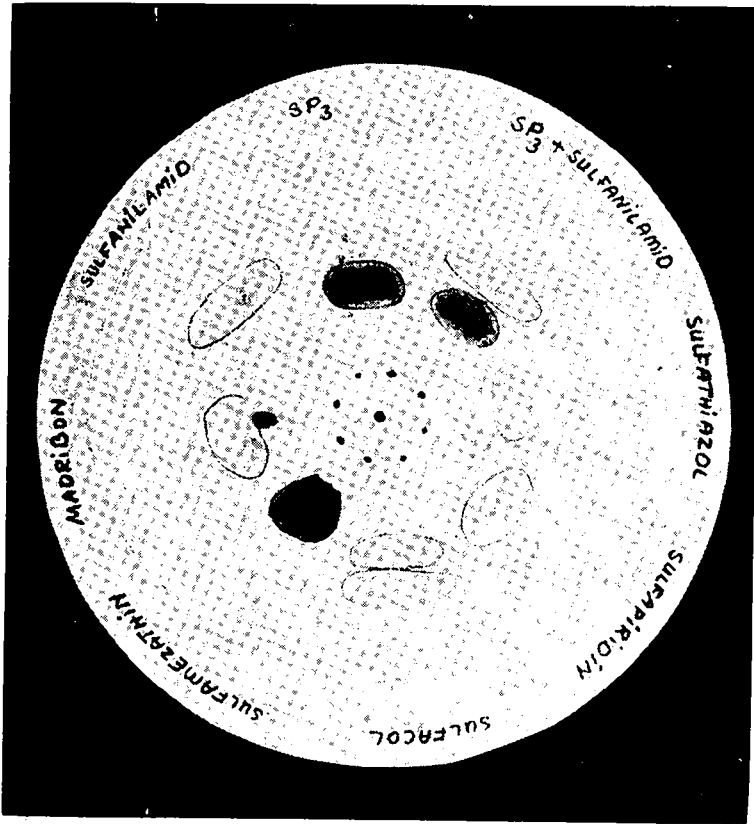
Şekil: I. Çeşitli sulfamidlerin ince tabaka kromatografisinde verdiği lekeler. (Oklar başlangıç noktasını, üstteki çizgi solvan sınırını göstermektedir) 1. Sulfanilamid (standart), 2. SP₂ tozu (Kont. no. 85721, İmal T.1.10.1963), 3. Sulfatiazol (standart), 4. Sulfanilamid +sulfatiazol (standartlar), 5. Sulfapyridin tablet, 8. Sulfacol toz, 7 Sulphamezathin vet. sol., 8. Diazinol komprime, 9. Ultr Diazin komprime, 10. Madribon tablet, 11. Gantrisin tablet.



Şekil: II. Çeşitli sulfamidlerin çıkan metot kâğıt kromatografisinde verdiği lekeler. 1. Sulfanilamid standart, 2. SP₃ tozu (Kont. no. 96065, İmal T.26.11.1969), 3. Sulfatiazol standart, 4. Sulfapyridin tablet, 5. Eftolon vet. sol., 6. Albucid göz damlası.

sulfamidin teşhisleri olumlu sonuçlar vermiştir. Piyasadan temin edilmiş olan 10 çeşit sulfamid preparatının hepsinde de formüllerinde belirtilen sulfamidlerin mevcut olduğu kalitatif olarak ortaya konulmuştur. Ancak SP₃ serpmeye tozunun 85721 kontrol no.lu ve 1.10.1968 tarihinde imâl edilmiş olan nümunesinde (Şekil I ve III'te görüleceği gibi) sulfatiazol tesbit edilmiş, fakat sulfanilamid tesbit edilmemiştir. Buna karşılık SP₃ serpmeye tozunun 96065 kontrol no.lu ve 26.11.1969 tarihinde imâl edilmiş olan diğer bir nümunesinde (Şekil: II'de görüleceği gibi) gerek sulfatiazol ve gerekse sulfanilamid bulunduğu tesbit edilmiştir.

Sulfamidlerin Rf değerleri Tablo: II'de ortalama olarak verilmiştir. SP₃ analizinde yanılmaya meydan vermemek için toz halindeki saf sulfatiazol ve sulfanilamidden hazırladığımız çözeltileri standart maddeler olarak kullandık.



Şekil: III. Çeşitli sulfamidlerin sirküler kâğıt kromatografisinde verdiği lekeler. (Kromatogramdaki SP₃ lekesi Kont. no. 85721, İmal T.1.10.1968 olan preparata aittir. Yanındaki üçgen içerisinde kontrol için sulfanilamid standart ile birlikte uygulanmış SP₃ lekesi görülmektedir).

TABLO: II

Deneylerimizde kullandığımız sulfamidlerin ortalama Rf değerleri

İlacın adı	Çıkan metot kâğıt kromatografisi	İnce tabaka kromatigrafisi
1. Sulfanilamid	0.50	0.47
2. Sulfatiazol	0.25	0.16
3. Sulfapiridin	0.37	0.23
4. Sulfamezatin	0.24	0.15
5. Diazinol	—	0.17
6. Sulfadiazin	—	0.07
7. Madribon	—	0.18
8. Gantrisin	—	0.17
9. Eftolon	0.40	—
10. Albusid	0.08	—

Tartışma

Sulfamid ihtiva eden çeşitli farmasötik preparatların analizlerinin en uygun bir teknikle yapılabilmesini sağlamak amacıyla literatürde belirtilen çeşitli metodların (1,4,5,7,8) faydalı gördüğümüz yanlarını birleştirerek ince tabaka kromatografisi ve kâğıt kromatografisine uygulanabilecek bir tek metod haline getirdik. Literatürde solvan olarak belirtilen n-butil alkol yerine iso-butil alkolün de aynı maksat için yararlı olduğunu gördük.

Kendi başına bütün sulfamidleri identifiye edebilecek derecede ayırt etmeye elverişli bir solvan bulunmadığı belirtilmektedir (4) ve kromatogramlarda Rf değerlerinin birinden diğerine değişmesi sebebiyle yanılmadan iyi bir ayırım yapabilmek için meçhul nünunelerle birlikte aynı kromatogram üzerinde standartların da kullanılması önemlidir (2). Bu bakımdan değişik solvan sistemlerinin ve değişik belirtme ayıraçlarının kullanılması yerine en uygun bir solvanın ve belirtme ayıraçının ince tabaka kromatografisi; çıkan metod ve sirküler kâğıt kromatografisi olmak üzere üç tekniğe uygulanarak, yeri geldiği zaman imkânlarla ve analizin amacına en elverişli olanının kullanılmasının daha yararlı olup olmayacağını araştırdık. Sulfamidlerin analizinde burada tanımladığımız ince tabaka kromatografisi daha hassas çalışmakta ve diğerlerine nazaran daha güvenilir bir sonuca götürmektedir. Ancak oldukça komplike, imkân ve eleman isteyen bir metottur. Çıkan metod kâğıt kromatografisi de aynı güvenilir sonuçları vermiştir ve daha az emek ve ustalıkla gerçekleştirilebilmektedir. Ancak her iki metod sirküler kâğıt kromatografisi ile karşılaştırılırsa hem fazla malzeme sarfiyatını gerektirmediğinden ekonomik oluşu ve hem de basit laboratuvar şartlarında kolaylık ve kısa zamanda yapılabilmesi sebebiyle ilaç analizlerinin yapılmasında ve özellikle öğrenci tatbikatlarında sirküler kâğıt kromatografisinin uygun olduğu kanısındayız.

Bu çalışmanın faydalı bir sonucu da piyasadaki beşerî ve veteriner sulfamid preparatlarının başlıcalarının kapsadığı etken maddelerin kontrol edilmiş olmasıdır. Gerektiğinde nicel analiz yapabilmek için kromatogramlardaki lekeler asitle tamponlanmış p-dimetilaminobenzaldehid ayıraçında criülerek kurtarılıp sulfamidlerin miktar tayinleri için kullanılabilir (5).

Literatür

- 1 - **De Reeder, P.L.** (1953): *Qualitative and quantitative analysis of mixtures of sulfonamides V.* Anal. Chim. Acta, 8,325-336.

- 2 - **Kho, B.T.** and **Klein, S.** (1963): *Thin-layer chromatography in drug analysis II. Procedure for the identification of various N⁴-substituted sulfonamides.* J.Pharm. Sci., 52,404-406.
- 3 - **Klein, S.** and **Kho, B.T.** (1962): *Identification procedure for various sulfonamides in pharmaceutical combinations.* J.Pharm. Sci., 51, 966-970.
- 4 - **Robinson, R.** (1951): *Identification of sulphonamides by paper partition chromatography.* Nature, 168, 512-513.
- 5 - **San, G.L.** and **Ultée, A.J.** (1952): *Paper partition chromatography of sulfonamides.* Nature, 169, 586.
- 6 - **Steel, A.E.** (1951): *Identification of sulfonamides on paper chromatograms.* Nature, 168, 877.
- 7 - **Truhaut, R.** and **Mangeot, A.** (1961): *Fiches de travaux pratiques de chimie (essais de médicaments).* Faculté de Pharmacie de Paris. pp. 69-70.
- 8 - **Wollish, E.G.** et al. (1961): *Thin-layer chromatography. Recent development in equipment and applications.* Anal. Chem., 33, 1138-1142.

Yazı "Dergi Yazı Kuruluna" 7.7.1970 günü gelmiştir.