View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Portal de revistas de la Universidad de Granada

Una nueva aproximación a la optimización terapéutica del diclofenaco

A novel approach towards therapeutic optimization of diclofenac

YADAV MR*#, HALEN PK#, CHAGTI KK#, HEMALATHA B# Y GIRIDHAR R#

 # Pharmacy Department, Faculty of Technology and Engineering, Kalabhavan, The M.S. University of Baroda, Vadodara-390001. India. head-pharm@msubaroda.ac.in
*** para correspondencia: mryadav11@yahoo.co.in**

Los autores desean expresar su agradecimiento por la ayuda financiera recibida al AICTE (All India Council of Technical Education) de Nueva Delhi por la beca de investigación proporcionada a través del proyecto de investigación principal TAPTEC, y a M/s. Ranbaxy Ltd., Gurgaon (India) por proporcionar la muestra gratuita de diclofenaco.

RESUMEN

Con objeto de obtener compuestos con menor toxicidad gástrica que el diclofenaco, se sintetizaron y evaluaron cinco ésteres derivados aminoetílicos N,N-sustituidos derivados del diclofenaco. Estos ésteres se diseñaron para satisfacer el requisito estructural de disponer de una actividad anticolinérgica intacta antes de la separación. Además de bloquear el grupo carboxilo ácido mediante esterificación, esta actividad se incorporó a los ésteres sintetizados, con el beneficio adicional esperado de la reducción de la secreción de ácido gástrico y la consecuente eliminación de la irritación local mediante un mecanismo dual. En este estudio se describen la síntesis, la cinética de la hidrólisis y la actividad biológica de estos ésteres. Todos los derivados de éster permanecieron estables en tampones de pH 2,0 y 7,4 durante un período de tiempo suficiente, lo que aseguró su absorción en estado intacto y la eliminación de la irritación gástrica local producida por el fármaco principal. Se observó una rápida hidrólisis enzimática de todos los derivados en un 80% de suero humano combinado. Se descubrió que los ésteres sintetizados poseían la actividad anticolinérgica propuesta. Se mantuvo la actividad antiinflamatoria en la mayoría de los compuestos y se logró una significativa reducción del potencial ulcerogénico en comparación con el diclofenaco.

PALABRAS CLAVE: Diclofenaco. Efecto de contacto directo. Toxicidad gastrointestinal. Daño en la mucosa. Profármacos. Ulcerogenicidad.

ABSTRACT

In an effort for obtaining compounds with lower gastric toxicity than diclofenac, five different N,N-disubstitutedaminoethyl ester derivatives of diclofenac were synthesized and evaluated. These esters were designed so as to satisfy the structural requirement for them to possess the anticholinergic activity in intact form before cleavage. Besides blocking the acidic carboxyl group by esterification this activity was incorporated into the synthesized esters with an expected additional benefit of having reduced gastric acid secretion and thereby abolishing the local irritation by a dual mechanism. This report describes the synthesis, hydrolysis kinetics and the biological activity of these esters. All the ester derivatives were found to be stable in buffers (pH 2.0 and 7.4) for sufficient time period, assuring them to be absorbed intact and to successfully overcome the local gastric irritation of the parent drug. A fast enzymatic hydrolysis was observed for all the derivatives in 80% pooled human serum. The synthesized esters were found to possess the proposed anticholinergic activity. The anti-inflammatory activity for most of the compounds was retained with a significant reduction in the ulcerogenic potential compared to diclofenac.
KEY WORDS**: Diclofenac. Direct contact effect. Gastrointestinal toxicity. Mucosal injury. Prodrugs. Ulcerogenicity.

INTRODUCCIÓN

Los agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE) son los fármacos recetados con mayor frecuencia en todo el mundo. Sin embargo, su utilidad clínica sigue estando limitada principalmente por los efectos secundarios nocivos que producen sobre todo en el tracto gastrointestinal[1]. Todos los fármacos AINE comunes producen una acción local en el epitelio gástrico debido a su naturaleza ácida. En el medio gástrico ácido, sus formas lipofílicas son absorbidas por las células con mayor facilidad. Sin embargo, el elevado pH intracelular da lugar a la captura de los fármacos AINE ionizados, que muestran a continuación su acción antiprostaglandínica local aún con mayor intensidad y provocan un daño en la mucosa[2,3]. El uso de profármacos para bloquear temporalmente el grupo ácido de los fármacos AINE se ha propuesto como una forma de disminuir la toxicidad gastrointestinal causada por el efecto del contacto directo[4,5]. Estos profármacos liberan la fracción principal tras la absorción al sufrir la hidrólisis química o enzimática.

Nuestra propuesta para reducir la toxicidad gastrointestinal de los fármacos AINE ácidos es novedosa e innovadora, pensamos que el bloqueo del grupo carboxilato mediante un éster de aminoalcohol incorporaría propiedades anticolinérgicas intrínsecas en los ésteres así sintetizados. Para ello, nos propusimos sintetizar los ésteres aminoetílicos disustituidos-N,N de aquellos fármacos AINE que estructuralmente se asemejan a la potente clase de éster de aminoalcohol de los agentes anticolinérgicos. Los requisitos estructurales de un compuesto de la clase de éster de aminoalcohol de los agentes anticolinérgicos son un 'Nitrógeno' terciario terminal, un enlace de etileno entre el grupo carbonilo del éster y este 'Nitrógeno' terminal y la presencia de grandes grupos en el terminal carboxilo[6]. Los ésteres diseñados también satisfacen estos requisitos estructurales. La racionalidad del diseño de estos fármacos se basa no sólo en el beneficio derivado del bloqueo temporal del grupo carboxilato, sino también en la esperada actividad anticolinérgica de los ésteres precursores, que podrían ayudar de este modo en la disminución de la toxicidad gastrointes-

INTRODUCTION

Non-steroidal anti-inflammatory agents (NSAIDs) are the most commonly prescribed drugs in the world. However, their clinical utility continues to be principally limited by their undesired side effects mainly on the gastrointestinal (GI) tract[1]. All common NSAIDs, because of their acidic nature have a local action on gastric epithelium. In the acidic gastric medium, their lipophilic forms are more easily absorbed into the cells. However, the intracellular high pH causes the entrapment of the ionized NSAIDs, which then express their antiprostaglandin action at the site even more intensely and lead to further mucosal injury[2,3]. The use of prodrugs to temporarily mask the acidic group of NSAIDs has been postulated as an approach to decrease the GI toxicity due to the direct contact effect[4,5]. These prodrugs release the parent moiety after absorption by undergoing enzymatic/chemical hydrolysis.

Our approach to reduce the GI toxicity of acidic NSAIDs is innovative and novel in the sense that we thought of blocking the free carboxyl group into aminoalcohol ester functionality thereby incorporating intrinsic anticholinergic activity into these esters so synthesized. We therefore, planned to synthesize the N,N-disubstitutedaminoethyl esters of NSAIDs which structurally resembled the potent aminoalcohol ester class of anticholinergics. A terminal tertiary 'Nitrogen', an ethylene bridge between the ester carbonyl group and this terminal 'Nitrogen', and the presence of bulky groups at the carboxyl terminal are the structural requirements for a compound of aminoalcohol ester class of anticholinergics[6]. These structural requirements are also satisfied by our designed esters. The rationale behind this drug design is based on the expected advantage that besides, the temporarily blocked carboxyl group the existence of anticholinergic activity in these intact esters would further aid in decreasing the GI toxicity by decreasing the gastric acid secretions.

The combination of these two properties, of being anticholinergic when intact and anti-inflammatory after hydrolysis may lead to a much wider scope for these esters with possible indication in ophthalmic inflammatory

tinal disminuyendo las secreciones de ácido gástrico.

La combinación de estas dos propiedades, la propiedad anticolinérgica en estado intacto y la antiinflamatoria tras la hidrólisis, puede conducir a un uso mucho más amplio de estos ésteres con una posible indicación en estados de inflamación ocular y broncoespasmo. Los fármacos AINE se utilizan menos en estados inflamatorios oculares debido a la escasa absorción que se deriva de su elevada naturaleza polar. Se espera que los ésteres de aminoalcohol diseñados sean absorbidos fácilmente por el ojo como formas no iónicas en el pH ligeramente alcalino del ojo. La actividad anticolinérgica debe causar midriasis, que ayudará al cirujano en el examen ocular. Además, tras la separación, el fármaco AINE principal liberado debe provocar una actividad antiinflamatoria normal. El ipratropio y el tiotropio son algunos de los fármacos anticolinérgicos de inhalación que se utilizan en enfermedades pulmonares obstructivas crónicas como el asma (que se considera una afección principalmente inflamatoria[7]), junto con diversos agonistas β-2. Debido a su acción dual, los ésteres derivados sintetizados podrían ser de utilidad en este tipo de afecciones respiratorias, que requieren una doble acción antiinflamatoria y anticolinérgica.

En este estudio se presenta un informe de la síntesis y evaluación de cinco ésteres aminoetílicos disustituidos-N,N distintos del diclofenaco (1).

MATERIALES Y MÉTODOS

La muestra de diclofenaco (1) se recibió de forma gratuita. Los aminoalcoholes y el carragenato (Lambda) se adquirieron en Sigma Aldrich. El resto de los reactivos y de las sustancias químicas fueron de grado analítico. Se utilizó agua destilada en la preparación de las soluciones tampón. Los puntos de fusión se determinaron en capilares abiertos y no están corregidos. Los espectros de infrarrojos se registraron en un espectrómetro Shimadzu-8300 FTIR con un disco de KBr. Las mediciones espectrales de PMR se realizaron en $CDCl_3$ en un instrumento de 200 MHz. Las desviaciones químicas se indican en partes por

conditions and in conditions of bronchospasm. NSAIDs in general have found less use in inflammatory conditions of eye due to their highly polar nature leading to poor absorption. Our designed aminoalcohol esters are expected to be readily absorbed into the eye as non-ionic forms in the slightly alkaline pH of the eye. The anticholinergic activity should cause mydriasis, aiding in eye examination by the surgeon. Further, after cleavage the liberated parent NSAID will elicit normal anti-inflammatory activity. Secondly, asthma is considered predominantly to be an inflammatory disorder[7] and drugs like ipratropium and tiotropium are a few inhalational anticholinergic drugs used in chronic obstructive pulmonary disease like asthma, along with various β-2 agonists. The synthesized ester derivatives due to their dual action could be of use in such respiratory disorders, which demand simultaneous anti-inflammatory and anticholinergic actions.

In this paper, we report the synthesis and evaluation of five different N,N-disubstitutedaminoethyl esters for diclofenac (1).

MATERIALS AND METHODS

Diclofenac(1) was received as gift sample. The aminoalcohols and carrageenan (Lambda) were purchased from Sigma Aldrich. All other chemicals and reagents were of analytical grade. Distilled water was used in preparation of buffer solutions. The melting points were taken in open capillaries and are uncorrected. The IR spectra were recorded on a Shimadzu-8300 FTIR using KBr disc. PMR spectra were recorded in $CDCl_3$ on a 200 MHz instrument, the chemical shifts are reported in parts per million (δ) relative to TMS as internal standard. The spectrophotometric studies were carried out on a Shimadzu UV-1601 spectrophotometer. Purity of the compounds was tested on TLC plates (Silica gel G, E Merck). The spots were located by exposure to iodine vapors. Anhydrous sodium sulphate was used as the drying agent.

millón (δ) usando TMS como estándar interno. Los estudios espectrofotométricos se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1601. La pureza de los compuestos se analizó en placas de CCF (gel de sílice G, E Merck). Los puntos se localizaron por exposición a vapores de yodo. Se utilizó sulfato sódico anhidro como agente secante.

Síntesis de hidrocloruros de 2-aminoetil ésteres N,N-disustituidos derivados del ciclofenaco (1a-e)

Método A

Se disolvió el diclofenaco (1), (1,0 g, 3,39 mmol) en diclorometano mediante reflujo y, a continuación, se trató gota a gota con cloruro de tionilo (0,4 ml, 5,37 mmol) después de enfriar a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 2-Aminoetanol N,N-disustituido (2a, Figura 1) (1,5 ml, 0,015 mmol) y el carbonato potásico anhidro (1,0 g) y se volvió a agitar la mezcla durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla de reacción se diluyó con cloroformo hasta 200 ml y se filtró. La capa orgánica se lavó con agua helada para eliminar el exceso de aminoalcohol. Posteriormente, se secó la capa orgánica y se eliminó el disolvente para obtener un producto sólido, que se cristalizó mediante el uso de acetona y éter isopropílico. Se realizó el procedimiento anterior con todos los aminoalcoholes (2b-e). Los productos así obtenidos se caracterizaron en función de los datos espectrales y en todos los casos se obtuvo como resultado el oxindol (3).

Método B

A N,N-dimetilaminoetanol (2a, 1,0 ml, 0,01 mol) se le agregó gota a gota cloruro de tionilo (1,5 ml, 0,02 mol) en cloroformo destilado recién preparado (20 ml) con agitación a temperatura ambiente y reflujo durante 15 minutos en agua calentada al baño María. A continuación, se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se le añadió agua helada (20 ml). Se añadió bromuro de tetrae-

Synthesis of 2-[N,N-disubstituted amino]ethyl ester hydroclorides of diclofenac (1a-e)

Method A

Diclofenac (1), (1.0g, 3.39 mmol) was dissolved in dichloromethane by refluxing and then treated dropwise with thionyl chloride (0.4ml, 5.37mmol) after cooling to room temperature. The reaction mixture was stirred for 2 hours at room temperature followed by the addition of the N,N-dimethyl- aminoethyl alcohol (2a, Figure 1) (1.5ml, 0.015mmol) and anhydrous potassium carbonate (1.0g) with further stirring for 2 hours at room temperature. The reaction mixture was then diluted with chloroform to 200 ml and filtered. The organic layer was washed with ice-cold water to remove the excess of the aminoalcohol. The organic layer was dried and the solvent removed to give a solid product, which was crystallized by using acetone and isopropyl ether. The above route was tried with all the aminoalcohols (2b-e). The products so obtained were characterized based on the spectral data to be the oxindole (3) in all the cases.

Method B

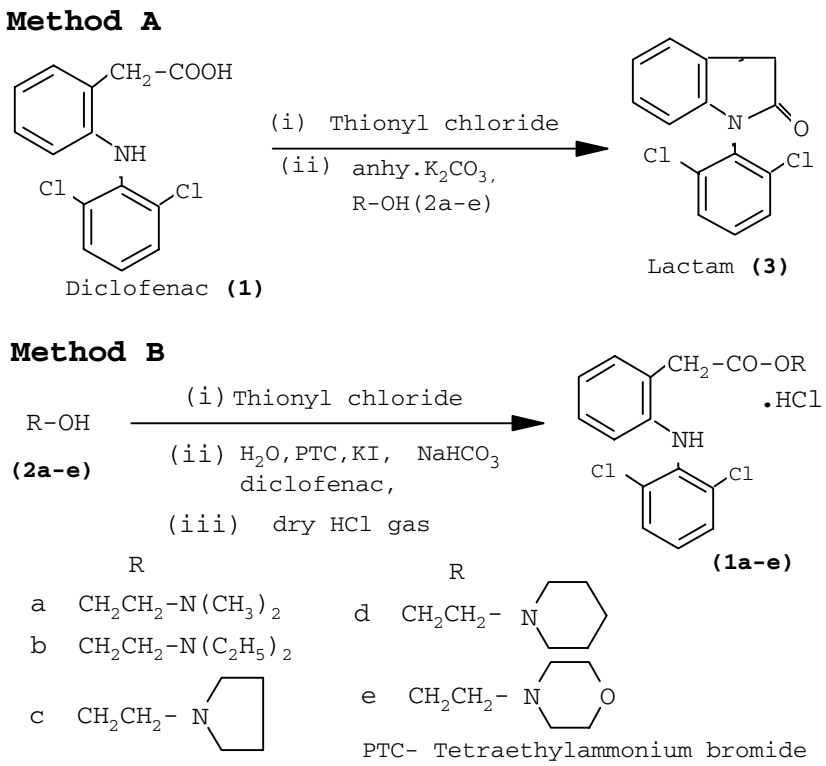
N,N-Dimethylaminoethanol (2a,1.0ml, 0.01 mol) was treated dropwise with thionyl chloride (1.5 ml, 0.02 mol) in freshly distilled chloroform (20 ml) under stirring at room temperature and refluxed for 15 minutes on a water bath. The reaction mixture was then cooled to room temperature and ice cold water (20 ml) was added to it. Tetraethylammonium bromide (1.5 g), potassium iodide (300mg), diclofenac (1.5g, 5.09 mmol) and sodium bicarbonate (3.5g) were added to the above solution and the reaction mixture was stirred for 15 -18 hours. The reaction mixture was monitored by TLC for the absence of diclofenac in the organic layer, diluted with chloroform (200 ml) and washed several times with ice-cold water. The chloroform layer was dried and removed completely to afford the oily product. The oily residue so obtained was dissolved in dry isopropyl ether, dry hydrogen chloride passed through it till saturation to obtain solid hydrochloride salt. The solid salt was filtered, dried and crystallized from

tilamonio (1,5 g), yoduro potásico (300 mg), diclofenaco (1,5 g, 5,09 mmol) y bicarbonato sódico (3,5 g) a la solución anterior y se agitó la mezcla de reacción durante 15-18 horas. La mezcla de reacción se analizó mediante cromatografía de capa fina (CCF) para comprobar la ausencia de diclofenaco en la capa orgánica, se diluyó con cloroformo (200 ml) y se lavó varias veces con agua helada. La capa de cloroformo se secó y se retiró por completo para obtener un producto oleoso. El residuo oleoso obtenido se disolvió en éter isopropílico seco y se pasó por cloruro de hidrógeno seco hasta la saturación para obtener sal de clorhidrato sólida. La sal sólida se filtró, secó y cristalizó a partir del éter de acetato de isopropilo seco para obtener el clorhidrato del éster (1a). Se utilizó el procedimiento de síntesis anterior (Figura 1) para preparar compuestos (1a-e) (rendimiento del 48 al 55%) en lugar del método establecido[8].

dry acetone-isopropyl ether to afford ester hydrochloride (1a). The above synthetic route (Figure 1) was used to prepare compounds (1a-e) (yield 48 to 55%)better than the reported method[8].

FIGURA 1. Síntesis de los ésteres del diclofenaco (1).

FIGURE 1. Synthesis of esters of diclofenac (1).



Estudios de hidrólisis

Cinética de la hidrólisis de (1a-e) en una solución acuosa.

Las reacciones se iniciaron manteniendo una concentración de 1 mg/ml de los ésteres (1a-e) en tampón pH 7,4 y en tampón pH 2,0 a 37±1 °C. A intervalos determinados, se extrajo una muestra (1,0 ml) y se transfirió a un embudo independiente con 9 ml de tampón pH 2,0. Esta solución acidificada se extrajo con cloroformo (2x5 ml). El extracto combinado de cloroformo se extrajo posteriormente con hidróxido sódico (0,1 N, 2x5 ml). Este extracto acuoso combinado se calentó al baño María durante 30 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se midió la absorbencia de la capa acuosa combinada a 274 nm con una muestra en blanco tratada de forma similar, pero sin la solución del fármaco. La hidrólisis se controló mediante un método espectrofotométrico UV y las constantes de velocidad, k, para la hidrólisis de los compuestos se determinaron gráficamente mediante la regresión lineal de los logaritmos del éster residual frente a las líneas de tiempo. Se analizaron muestras triplicadas y se calculó $t_{1/2}$ (ecuación $t_{1/2}$ = 0,693/k) (Tabla 2).

Hydrolyses studies

Kinetics of hydrolyses of (1a-e) in aqueous solution.

Reactions were initiated by maintaining a 1mg/ml concentration of the esters (1a-e) in pH 7.4 buffer and in pH 2.0 buffer at 37±1°C. At definite time intervals, sample (1.0ml) was withdrawn and transferred to a separating funnel containing 9 ml of pH 2.0 buffer. This acidified solution was extracted into chloroform (2x5 ml). The combined chloroform extract was further extracted into sodium hydroxide (0.1 N, 2x 5 ml). The pooled aqueous extract was heated on a water bath for 30 minutes, cooled to room temperature and the absorbance measured for the combined aqueous layer at 274 nm using a blank treated similarly but without the drug solution. The hydrolysis was monitored by a UV spectrophotometric method and the rate constants, k, for hydrolysis of compounds were determined by linear regression of log of residual ester versus time plots. Triplicate samples were analyzed and $t_{1/2}$ was calculated (equation $t_{1/2}$ = 0.693/k) (Table 2).

TABLA 2. Hidrólisis enzimática y química de los derivados (1a-e)

TABLE 2. Chemical and Enzymatic Hydrolysis of Derivatives (1a-e)

Compuesto *Compound*	$t_{1/2}$ (h)Tampón pH 7,4 *$t_{1/2}$ (h) Buffer pH 7.4*	% de fármaco AINE principal liberado (En 80% de suero humano) *% Release of parent NSAID (In 80% human serum)*		
		$^{1/2}$ h	1 h	2h
1a	208	38,6	72,9	80,5
1b	369	39,6	56,6	73,1
1c	317	13,7	15,0	23,1
1d	295	11,7	20,2	26,4
1e	271	20,90	22,94	35,73

Cinética de la hidrólisis de (1a-e) en 80% de suero humano

Se introdujo suero humano combinado (4 ml) en un matraz cónico taponado y se mantuvo a 37+1 °C al baño María. A esto se agregó la solución del derivado (1a-e) (1 ml, 5 mg/ml en tampón fosfato pH 7,4) y, a intervalos de tiempo adecuados, se extrajeron alícuotas (0,5 ml) que se transfirieron a un embudo independiente con ácido tricloroacético (1 ml, 10% p/v). A continuación, se agregaron 8,5 ml de tampón (pH 2,0) y se extrajo esta solución de proteína precipitada con éter isopropílico (2x 5 ml). El extracto etéreo combinado se extrajo posteriormente con una solución de hidróxido sódico (0,1 N, 2x5 ml). El extracto acuoso combinado se calentó en cada caso al baño María durante 30 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La absorbencia se midió a 274 nm (λ_{max}) comparándola con una solución de hidróxido sódico en blanco (0,1 N) tratada de forma similar, pero sin la solución del fármaco. La hidrólisis se controló mediante un método espectrofotométrico UV y se calculó el porcentaje de liberación del fármaco principal durante un período de tiempo definido. Se realizaron tres determinaciones y se calculó el porcentaje medio de liberación del fármaco principal (Tabla 2).

Evaluación biológica

El fármaco principal (en 1% p/v de carboximetilcelulosa) y los compuestos (en agua destilada) se administraron por vía oral en una dosis equimolar. El protocolo para los experimentos realizados con animales fue aprobado por el IAEC (Institutional Animal Ethics Committee, Comité de ética animal institucional) de conformidad con lo estipulado por el CPCSEA (Committee for the Purpose of Control and Supervision of Experiments on Animals, Comité de control y supervisión de experimentos en animales).

Kinetics of hydrolysis of (1a-e) in 80% human serum

Pooled human serum (4 ml) was taken in a stoppered conical flask and maintained at 37 +1°C in a waterbath. To this the derivative solution (1a-e) (1 ml, 5 mg/ml in pH 7.4 phosphate buffer) was added and at appropriate time intervals aliquots (0.5 ml) were withdrawn and transferred to a separating funnel containing trichloroacetic acid (1 ml, 10%w/v). Further 8.5 ml of buffer (pH 2.0) was added and this protein precipitated solution was extracted with isopropyl ether (2x 5 ml) and the combined ethereal extract was then extracted with sodium hydroxide solution (0.1 N, 2x 5 ml) and the pooled aqueous extract in each case was heated on a water bath for 30 minutes, cooled to room temperature and the absorbance measured at 274 nm (λ_{max}) against blank sodium hydroxide solution (0.1 N) which was treated similarly without the drug solution. The hydrolysis was monitored by a UV spectrophotometric method and percent release of the parent drug over definite time interval was calculated. Three determinations were performed and average percentage release of the parent drug was calculated (Table 2).

Biological evaluation

The parent drug (in 1% w/v carboxymethylcellulose) and the compounds (in distilled water) were given orally at equimolar dose. The protocol for the animal experiments performed was approved by the IAEC (Institutional Animal Ethics Committee) as registered under CPCSEA (Committee for the Purpose of Control and Supervision of Experiments on Animals).

Rat carrageenan-induced hind paw edema test

Sprague Dawley rats of either sex were used. The acute anti-inflammatory activity of the compounds was screened by the carrageenan induced rat hind paw edema assay according to method of Winter *et al*[9]. Diclofenac (1) was given at a dose of 20 mg/kg body weight and derivatives (1a-e) were administered at dose

Prueba del edema inducido por carragenatos en patas traseras de ratas

Se utilizaron ratas Sprague Dawley de ambos sexos. La actividad antiinflamatoria aguda de los compuestos se analizó mediante el ensayo del edema inducido por carragenatos en patas traseras de ratas conforme al método de Winter *et al*[9]. Se administró diclofenaco (1) en una dosis de 20 mg/kg de peso corporal y se administraron los derivados (1a-e) en una dosis equivalente a 20 mg/kg de diclofenaco (1). El porcentaje de inhibición de la dilatación se calculó con la fórmula:

% Inhibición de edema de la pata = (1-$Ed_{fármaco}/Ed_{control}$) x 100, donde $Ed_{fármaco}$ y $Ed_{control}$ representan el volumen del edema en las ratas del grupo tratado con fármaco y el grupo de control, respectivamente.

Actividad analgésica

Se evaluó la actividad analgésica de los derivados (1a-e) mediante el ensayo de convulsiones inducidas por ácido acético en el ratón como describen Koster *et al*[10]. Se utilizaron ratones albinos suizos de ambos sexos (n = 6, 18-22 g). El diclofenaco (1) (45 mg/kg de peso corporal) o sus ésteres derivados (1a-e) se administraron por vía oral en una dosis equivalente a 45 mg/kg de diclofenaco. Transcurrida 1 hora de la administración del fármaco, se provocó el síndrome convulsivo mediante el ácido acético (0,6% v/v en solución salina al 0,9%, 10 ml/kg de peso corporal por vía intraperitoneal) y se contabilizó el número de convulsiones de cada ratón 5 minutos después de la inyección durante un período de 20 minutos. El número medio de convulsiones de cada grupo de ratones tratados con fármaco se comparó con el de los ratones del grupo de control, y el grado de analgesia se expresó como el porcentaje de inhibición calculado según la fórmula:

% Inhibición de convulsiones = (1-T/S) x 100, donde S y T representan el número de convulsiones del grupo de control y del grupo de ratones tratados con fármaco.

equivalent to 20 mg/kg of diclofenac (1). The percentage inhibition of swelling was calculated by the formula:

% Inhibition of paw edema = (1- $Ed_{drug}/Ed_{control}$) x 100, where Ed_{drug} and $Ed_{control}$ are the edema volume in drug treated and control group rats.

Analgesic Activity

Analgesic activity of the derivatives (1a-e) was assessed by the acetic acid induced writhing assay in the mouse as described by Koster *et al*[10]. Swiss albino mice of either sex (n = 6, 18-22 g) were used. Diclofenac (1) (45 mg/kg body weight) or its ester derivatives (1a-e) were given orally at dose equivalent to 45 mg/kg of diclofenac. After 1 h of drug administration the writhing syndrome was elicited by acetic acid (0.6 % v/v in 0.9% saline, i.p. 10 ml/kg body weight of) and the number of writhes for each mouse was counted after 5 minutes of injection for a period of 20 minutes. The average number of writhes in each group of drug treated mice was compared with that in the control and degree of analgesia was expressed as % inhibition calculated according to formula:

% Inhibition of writhing = (1-T/S) x 100, where S and T are the number of writhes in control and drug treated group of mice.

Ulcerogenicity

Sprague Dawley rats (n =6, 150-200 g) of either sex were used. The rats were fasted for 36 h with water ad libitum prior to administration of drug solutions and for 4 h post dosing. The control group received no drug. Diclofenac (1) (75 mg/kg) was given orally and derivatives (1a-e) at dose equivalent to 75 mg/kg of diclofenac. The animals were sacrificed and their stomach was dissected out, cut along the greater curvature, washed with normal saline and kept in 5% formalin for 15 minutes and gastric mucosa was observed for the lesions using a 2x2 binocular magnifier and the results were expressed as ulcer index[11] (Table 3) as per the formula:

Ulcerogenicidad

Se utilizaron ratas Sprague Dawley de ambos sexos (n = 6, 150-200 g). Las ratas se mantuvieron en ayuno durante 36 horas con agua *ad libitum* antes de la administración de las soluciones de fármaco y durante 4 horas tras la administración de las dosis. Al grupo de control no se le administró ningún fármaco. Se administró diclofenaco (1) (75 mg/kg) por vía oral y los derivados (1a-e) en una dosis equivalente a 75 mg/kg de diclofenaco. Se sacrificaron los animales y se diseccionaron por la curvatura mayor del estómago, que se lavó con solución salina normal y se mantuvo en formol al 5% durante 15 minutos. Se observó la mucosa gástrica para examinar las lesiones utilizando una lupa binocular de 2x2 y se expresaron los resultados como un índice de úlcera[11] (Tabla 3) de acuerdo con la siguiente fórmula:

Índice de úlcera = 10(Au/Am), donde Am = área de mucosa total, $Au = Al + Ac + Ap,A_l$ es el área de lesiones lineales, Ac es el área de lesiones circulares y Ap es el número total de lesiones de tamaño inferior a 5 mm.

Ulcer index = 10(Au/Am), where Am = total mucosal area, $Au = Al + Ac + Ap,A_l$ is area of linear lesions, Ac is area of circular lesions and Ap is Total no. of piteaches/5.

TABLA 3. Actividad analgésica, antiinflamatoria y anticolinérgica, y ulcerogenicidad del diclofenaco (1) y sus derivados de éster (1a-e)

TABLE 3. Anticholinergic, antiinflammatory, analgesic activities and ulcerogenicity of diclofenac (1) and its ester derivatives (1a-e)

Compuesto *Compound*	pA_2	Volumen del edema ± ESM *Edema volume ± SEM*	% de inhibición del edema (3ª h) *% Inhibi-tion ofedema (3rd h)*	Índice de úlcera *Ulcer Index*	Nº de convulsiones ± ESM *No. of writhing ± SEM*	% de inhibición de convulsiones *% Inhibi-tion of writhing*
Control	-	0,920±0,059	0,00	0,000	36,60±1,44	0,00
Diclofenaco **Dosis (mg/kg)**		0,068±0,030 **20,0**	92,60	0,797±0,029 **75,0**	15,60±1,63 **45,0**	57,38
1a	5,09	0,154±0,025	83,26	0,522±0,095*	11,20±3,38	69,40
1b	4,47	0,118±0,011	87,17	0,329±0,074*	10,00±1,64	72,68
1c	4,28	0,188±0,031	79,56*	0,426±0,119*	15,00±1,70	59,02
1d	3,96	0,287±0,039	68,75*	0,323±0,051*	14,00±2,45	61,75
1e	3,95	0,14±0,026	84,78	0,368±0,054*	22,00±3,27	39,89*

*P<0,05 frente al diclofenaco. Los resultados se expresan como ± ESM (error estándar de la media). Para el cálculo estadístico, se realizó la prueba *t*-Student.
*P<0.05 versus diclofenac, Results are given as ± SEM (standard error of mean).Student's t-test was performed for the statistical calculations.

Actividad anticolinérgica

La actividad anticolinérgica se determinó en íleon aislado de rata[12]. Las ratas que pesaban 150-200 g se mantuvieron en ayuno toda la noche, con agua a su disposición. Se alojaron de forma independiente, se les diseccionó el abdomen y se introdujo el íleon en una solución Tyrode a 37±1 °C con ventilación. Se tensó una sección de tejido de 1,0-1,5 cm de longitud (1 g). El tejido se estabilizó con lavados Tyrode fresco cada 10 minutos y se registró la curva dosis-respuesta (CDR) hasta que se obtuvo la respuesta máxima a la acetilcolina. A continuación, se permitió que el tejido estuviera en contacto con la solución de Tyrode que contenía el derivado (1a-e) o el sulfato de atropina durante media hora y se volvió a registrar la CDR para la acetilcolina. Se calculó el porcentaje de respuesta para ambas CDR y se trazó frente al logaritmo [M] de acetilcolina en el mismo papel del gráfico para buscar el EC_{50} en presencia y en ausencia del antagonista (derivado o atropina). El valor de pA_2 se calculó con la fórmula,

pA_2= -log[M]+log(x-1)donde, log[M] = concentración molar de antagonista y x = EC_{50} encontrado en presencia de antagonista / EC_{50} encontrado en ausencia de antagonista.

RESULTADOS

Resumen

Los métodos A y B (Figura 1) se probaron para lograr la síntesis de los derivados de diclofenaco deseados (1a-e). Sin embargo, el método B consiguió alcanzar el objetivo. Los datos físicos y espectrales de los compuestos sintetizados aparecen en la Tabla 1.

Anticholinergic Activity

Anticholinergic activity was determined on isolated rat ileum[12]. Rats weighing 150-200 g were fasted overnight having access to water. They were housed single, the abdomen was dissected and the ileum was placed in Tyrode solution at 37±1°C with aeration. A 1.0-1.5 cm length of the tissue was mounted under tension (1 g). The tissue was stabilized with washings of fresh Tyrode every 10 minutes and dose response curve (DRC) was recorded till maximum response was got for acetylcholine. The tissue was then allowed to be in contact with the Tyrode containing the derivative (1a-e) or atropine sulphate for half an hour and the DRC was repeated again for acetylcholine. The percentage response was calculated for both the DRCs and plotted against log [M] of acetylcholine on the same graph paper to find the EC_{50} in presence and absence of the antagonist (derivative or atropine). The pA_2 value was calculated by formula,

pA_2= -log[M]+log(x-1)where, log[M] = molar conc. of antagonist and x = EC_{50} found in presence of antagonist / EC_{50} found in absence of antagonist.

RESULTS

Synthesis

Methods A and B (Figure 1) were tried to achieve the synthesis of the desired derivatives of diclofenac (1a-e). However, method B proved to be successful in achieving the target. The spectral and physical data for the synthesized compounds have been given in Table 1.

TABLA 1. Datos espectrales y físicos de los derivados (1a-e).

TABLE 1. The physical and spectral data of derivatives (1a-e).

Compuesto *Compound*	p.f(C) *m.p(C)*	I.R.(KBr,cm-1) *I.R.(KBr,cm-1)*	PMR (ppm, CDCl3) *PMR (ppm, CDCl3)*
1a	187-89	3283,1734,1587, 1233,760	2,75 (s, 6H, N(CH3)2); 3,32 (t, 2H, -CH2N); 3,93 (s, 2H, ArCH2); 4,60 (t, 2H, O-CH2); 6,48-7,36 (m, 8H, ArH, ArNH); 12,74 (b, 1H, N.HCl)
1b	147-49	3315,1730,1588, 1228,782	1,30 (t, 6H, N(CH2CH3)2); 3,12 (q, 4H, N(CH2CH3)2); 3,32 (t, 2H, -CH2-N); 3,86 (s, 2H, ArCH2); 4,60 (t, 2H, O-CH2); 6,50-7,37 (m, 8H, ArH, ArNH); 12,50 (b, 1H, N.HCl)
1c	195-97	3271,1741.1564, 1248,767	1,60-3,70 (m, 12H, -CH2-N(CH2) 5); 3,93 (s, 2H, ArCH2); 4,70 (t, 2H, O-CH2); 6,50-7,37 (m, 8H, ArH, ArNH); 12,80 (b, 1H, .HCl)
1d	192-94	3351,1741,1559, 1250,753	1,91-3,3 (m, 12H, -CH2-N(CH2) 5); 3,93 (s, 2H, ArCH2); 4,70 (t, 2H, O-CH2); 6,49-7,37 (m, 8H, ArH, ArNH); 12,6 (b, 1H, .HCl)
1e	173-75	3348,1738,1559, 1238,740	2,6 (t, 2H, -CH2N), 3,2-3,4(m, 4H, N(CH2)2); 3,7(t, 2H, CH2-O); 3,9(s, 2H, ArCH2); 4,1(t, 2H, CH2-O); 4,7(t,2H, O-CH2); 6,48-7,38(m, 8H, ArH, ArNH); 13,30(b, 1H, .HCl)
3	112-15	1732,1613,1490, 1302, 783,750	3.78 (s, 2H, ArCH2), 6.39-6.41 (d, 1H, Ar-7-CH), 7.07-7.12 (m, 1H, Ar-5-CH),7.18-7.23(m,1H, Ar-4'-CH), 7.33-7.37 (m, 1H, Ar-6-CH), 7.38-7.40 (d,1H,Ar-4-CH) and 7.49-7.52 (d, 2H,Ar-3'-CH,Ar-5'-CH)

Estudios de hidrólisis

La hidrólisis química y enzimática de los ésteres derivados (1a-e) se realizó en soluciones tampón acuosas (pH 2,0 y pH 7,4) y en suero humano (80%), respectivamente. Las vidas medias correspondientes en solución tampón y el porcentaje de liberación del fármaco principal en hidrólisis enzimática aparecen en la Tabla 2.

Hydrolyses studies

Chemical and enzymatic hydrolyses of the ester derivatives (1a-e) were performed in aqueous buffer solutions (pH 2.0 and pH 7.4) and in human serum (80%), respectively. The corresponding half-lives in buffer solution and percent release of the parent drug on enzymatic hydrolysis are given in Table 2.

Evaluación biológica

La potencia anticolinérgica de todos los derivados se determinó en una preparación de íleon aislado de rata con acetilcolina como agonista y sulfato de atropina como antagonista estándar. Los resultados se han expresado como el valor de pA2 (Tabla 3). La actividad antiinflamatoria aguda de los derivados se determinó mediante el ensayo de edema inducido por carragenatos en las patas traseras de ratas y los resultados se expresan como el porcentaje de inhibición del edema de patas traseras en comparación con el grupo de control. La toxicidad gástrica de los derivados y el fármaco principal se evaluó en las ratas y el valor del índice de úlcera aparece en la Tabla 3. El síndrome convulsivo inducido por ácido acético se utilizó para evaluar la actividad analgésica de los derivados seleccionados y el porcentaje de inhibición de las convulsiones en comparación con el grupo de control aparece en la Tabla 3. Se utilizó la prueba *t*-Student para calcular el error estándar de la media (ESM) en los cálculos estadísticos.

DISCUSIÓN

Resumen

Los ésteres derivados no se pudieron sintetizar mediante el método general basado en convertir el ácido carboxílico en cloruro ácido (Método A) y, a continuación, hacer reaccionar el cloruro ácido obtenido de este modo con el tipo de aminoalcohol necesario. Al hacer reaccionar el aminoalcohol (2a-e) de este modo con el diclofenaco (Método A, Figura 1), se obtuvo una mezcla de reacción de color oscuro en todas las ocasiones. Al procesar las mezclas de reacción y purificación mediante una cristalización repetitiva, se aisló lactama (3) en todas las ocasiones. Este hecho se confirmó a través de los datos espectrales (Tabla 3). La formación de lactama (3) se puede explicar fácilmente como un ataque nucleofílico interno por parte del amino 'N' al carbonilo 'C'. Finalmente, los ésteres (1a-e) se sintetizaron mediante el método B, que implica el uso de un catalizador de transferencia de

Biological evaluation

The anticholinergic potency for all the derivatives was determined on isolated rat ileum preparation against acetylcholine as agonist and atropine sulphate as the standard antagonist. The results have been expressed as pA_2 value (Table 3). The acute anti-inflammatory activity for the derivatives was determined by the carrageenan-induced rat-hind paw edema assay and the results are expressed as percent inhibition of paw edema in comparison to control group. The gastric toxicity of the derivatives and parent drug was evaluated in rats and the value of ulcer index is given in Table 3. Acetic acid induced writhing syndrome was used for evaluating the analgesic activity of the selected derivatives and the percent inhibition of writhing in comparison to control is tabulated (Table 3). Student's t-test was used for calculating the SEM (standard error of mean) in the statistical calculations.

DISCUSSION

Synthesis

The ester derivatives could not be synthesized by the general method of converting carboxylic acid into acid chloride (Method A), and then reacting the acid chloride so obtained with the required type of aminoalcohol. By reacting the aminoalcohol (2a-e) in this fashion with diclofenac (Method A, Figure 1) dark colored reaction mixtures were obtained every time. On processing the reaction mixtures and purification using repeated crystallization, lactam (3) was isolated everytime. It was confirmed by the spectral data (Table 3). Formation of the lactam (3) can be easily explained as internal nucleophilic attack by the amino 'N' on the carbonyl 'C'. Finally the esters (1a-e) were synthesized by method B involving the use of a phase transfer catalyst (PTC, tetraethylammonium bromide). This involved (Method B), reaction of the chloroderivative of the aminoalcohols with diclofenac in a biphasic medium using a PTC. The reaction was completed over a period of 12-14 hours for the various aminoalcohols (2a-e). The simple work up followed by recrysta-

fase (PTC, bromuro de tetraetilamonio). El Método B implicó la reacción del cloroderivado de los aminoalcoholes con el diclofenaco en un medio bifásico mediante un catalizador de transferencia de fase. Esta reacción se completó en un período de entre 12 y 14 horas para los distintos aminoalcoholes (2a-e). Este sencillo estímulo seguido de la recristalización dio lugar a los compuestos cristalinos (1a-e) con un rendimiento del 48-55%. El Método B ofreció un rendimiento mucho más mejorado que el rendimiento del método establecido[8] (40%), que utiliza diciclohexilcarbodiimida como agente de acoplamiento, para el compuesto 1e.

Estudios de hidrólisis

Los derivados (1a-e) demostraron ser bastante estables en soluciones tampón acuosas. No se pudo observar hidrólisis en el tampón de pH 2,0 a 37±1 °C en el caso de todos los derivados hasta transcurridas 8 horas. Se observó una hidrólisis lenta en el tampón de pH 7,4, pero las vidas medias que se muestran en la Tabla 2 indican que todos los derivados serían lo suficientemente estables en el pH intestinal para su absorción en estado intacto. Al analizar estas observaciones se podría asumir que la irritación local producida por el grupo carboxílico libre se podría bloquear con éxito. Además, la forma protonada del nitrógeno básico de estos compuestos en el pH ácido del estómago resistiría su absorción en el estómago. Todos los derivados presentaron vulnerabilidad a sufrir hidrólisis enzimática (Tabla 2), y se puede concluir que los derivados liberarán la fracción principal después de la absorción. Por tanto, los ésteres (1a-e) parecen poseer los requisitos químicos necesarios (buena estabilidad acuosa y elevada conversión enzimática) para ser considerados unos derivados útiles para la administración oral.

Evaluación biológica

De acuerdo con nuestra hipótesis acerca de la existencia de actividad anticolinérgica en estos derivados (1a-e), todos los ésteres derivados presentaron esta actividad con un

lization yielded the crystalline compounds (1a-e) with a yield of 48-55%. Method B offered a much more improved yield than the yield (40%) in a reported method[8] using dicyclohexylcarbodiimide as the coupling agent, for the compound 1e.

Hydrolyses studies

The derivatives (1a-e) have shown good stability in aqueous buffer solutions. No hydrolysis could be noticed in buffer of pH 2.0 at 37±1°C for all the derivatives till 8 hours. Slow hydrolysis was observed in buffer of pH 7.4 but the half-lives shown (Table 2) indicate that all the derivatives would have sufficient stability in the intestinal pH to be absorbed intact. Looking at these observations it could be assumed that the local irritation produced by the free carboxylic group could be successfully blocked. Moreover, protonated form at the basic nitrogen of these compounds in the acidic pH of the stomach would resist their absorption into the stomach. All the derivatives exhibited susceptibility to undergo enzymatic hydrolysis (Table 2), and it can be concluded that the derivatives will successfully release the parent moiety after absorption. Thus the esters (1a-e) have appeared to possess the chemical requirements (good aqueous stability and high enzymatic conversion) to be regarded as derivatives useful for oral administration.

Biological evaluation

As per our hypothesis regarding the existence of anticholinergic activity in these derivatives (1a-e) all the ester derivatives exhibited this activity with pA_2 value (Table 3) ranging from 3.95 to 5.19 though, they showed much weaker activity than the standard atropine sulphate (pA_2 8.20). All the ester derivatives of diclofenac except (1c) and (1d) exhibited anti-inflammatory activity (Table 3), which was not significantly different ($P<0.05$) from diclofenac at equimolar dose levels.

A significant reduction ($P<0.05$) was observed in the ulcerogenic potential of these compounds (1a-e) when compared to diclo-

valor de pA_2 (Tabla 3) que osciló entre 3,95 y 5,19. No obstante, presentaron una actividad mucho más débil que el sulfato de atropina estándar (pA_2 8,20). Todos los ésteres derivados del diclofenaco, excepto (1c) y (1d), presentaron actividad antiinflamatoria (Tabla 3), que no resultó significativamente distinta ($P<0,05$) a la del diclofenaco a niveles de dosis equimolar.

Se observó una reducción significativa ($P<0,05$) en el potencial ulcerogénico de estos compuestos (1a-e) al compararlos con el diclofenaco (Tabla 3). Si se tiene en cuenta la estabilidad de todos los derivados en soluciones tampón acuosas y la rápida hidrólisis enzimática, se puede concluir que la ulcerogenicidad observada se puede deber a la conversión de los ésteres en la fracción principal tras la absorción a través del tracto gastrointestinal, que es el responsable de la inhibición sistémica de la síntesis de la prostaglandina. Esta observación confirma el bloqueo con éxito del grupo carboxilo ácido para evitar la irritación gastrointestinal local. Además, la existencia de actividad anticolinérgica intrínseca en los derivados también podría haber contribuido a reducir la ulcerogenicidad mediante el descenso de las secreciones de ácido gástrico.

Todos los derivados (1a-e), excepto (1e), mostraron una actividad analgésica (Tabla 3) superior o igual a la del fármaco principal de referencia.

En síntesis, en la serie (1a-e), los compuestos 1a, 1b y 1e demostraron conservar la potencia antiinflamatoria del diclofenaco del compuesto principal (1), además de una reducción significativa de la irritación gástrica y una actividad analgésica mucho más elevada que (1) a niveles de dosis equimolar. Se realizarán estudios con el resto de fármacos AINE ácidos mediante este nuevo y prometedor método.

CONCLUSIÓN

Se obtuvo una cantidad suficiente de todos los ésteres de aminoalcohol. Al analizar los datos sobre la estabilidad química en los tampones y la hidrólisis enzimática en plasma humano, se podría asumir que todos los ésteres

fenac (Table 3). Considering the stability of all the derivatives in aqueous buffer solutions and the rapid enzymatic hydrolysis, it can be concluded that the observed ulcerogenicity may be due to conversion of the esters to the parent moiety following absorption from the gastrointestinal tract, which is responsible for the systemic inhibition of the prostaglandin synthesis. This observation supports the successful blockade of acidic carboxyl group to prevent local GI irritation. Further, the existence of inherent anticholinergic activity of the derivatives might have also contributed in decreasing the ulcerogenicity by decreasing the gastric acid secretions.

All the derivatives (1a-e) except (1e) exhibited analgesic activity (Table 3), either similar to or higher than the reference parent drug.

Briefly in the series (1a-e) the compounds 1a, 1b and 1e have been found to retain the anti-inflammatory potency of the parent compound diclofenac (1) with a significant reduction in gastric irritation and with the analgesic activity much higher than (1) at equimolar dose levels. This promising novel approach is being studied for the other acidic NSAIDs.

CONCLUSION

All the aminoalcohol esters were obtained in good yield. Looking at the data on chemical stability in buffers and enzymatic hydrolysis in human plasma it could be assumed that all the ester derivatives of diclofenac would survive the gastrointestinal conditions to be absorbed intact and after absorption would successfully release the parent drug by the action of esterases. Moreover, besides overcoming the local gastrointestinal irritation due to the blocked acidic group, the existence of anticholinergic activity would further aid in decreasing the gastric irritation by decreasing the gastric acid secetion. In brief, the novel approach has resulted in aminoalcohol ester derivatives of diclofenac retaining the desired anti-inflammatory potency with a significant reduction in the gastric irritation. Further work towards application of this approach to other clinically used NSAIDs is in progress.

res derivados del diclofenaco sobrevivirían a las condiciones gastrointestinales para ser absorbidos en estado intacto y liberarían satisfactoriamente el fármaco principal después de la absorción mediante la acción de los ésteres. Además, aparte de acabar con la irritación gastrointestinal local gracias al bloqueo del grupo ácido, la existencia de actividad anticolinérgica puede ayudar a reducir la irritación gástrica al reducir la secreción de ácido gástrico. En resumen, este novedoso método ha dado lugar a ésteres derivados de aminoalcohol del diclofenaco que mantienen la potencia antiinflamatoria deseada y reducen significativamente la irritación gástrica. Se están desarrollando trabajos adicionales encaminados hacia la aplicación de este método a otros fármacos AINE de uso clínico.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Insel PA. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 9th ed. New York: Mc Graw-Hill; 1996.
2. Wallace JL, Cirino G. The development of gastrointestinal sparing non-steroidal anti-inflammatory drugs. Trends Pharmacol. Sci. 1994; 15:405-409.
3. Gavalas A, Hadjipetrou L, Kourounakis P. Synthesis of novel derivatives of aroyl-aminoalcohols and 3-aminosubstituted 1-phenylpropanols with potential anti-inflammatory and immunomodulating activity. J. Pharm. Pharmacol. 1998; 50:583-587.
4. Rainsford KD, Whitehouse MN. Gastric irritancy of aspirin and its congeners: anti-inflammatory activity without this side effect. J.Pharm. Pharmacol. 1976; 28:599-600.
5. Whitehouse W, Rainsford KD. Esterification of acidic anti-inflammatory drugs suppress their gastro toxicity without adversely affecting their anti-inflammatory activity in rats. J. Pharm. Pharmacol. 1980; 32:795-796.
6. Gearien JE, Karin MA. Principles of Medicinal Chemistry. 5th ed. Philadelphia: Lea and Febiger; 1981.
7. Gupta YK. Anti-inflammatory agents in asthma. Drugs: News and Views 1994; 2:3-14.
8. Tamara VK, Narurkar MM. Crider AM, Khan MA. Morpholinoalkyl ester prodrugs of diclofenac: Synthesis, In vitro and In vivo Evaluation. J. Pharm. Sci. 1994; 83:44-49.
9. Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenan induced edema in hind paw of rats as an assay for anti-inflammatory activity. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1962; 111:544-547.
10. Koster R, Anderson M. Acetic acid for analgesic screening. J. Fed. Proc. 1959; 18: 412-414.
11. Parmar NS, Desai JK. A review of current methodology for the evaluation of gastric and duodenal antiulcer agents. Indian J. Pharmacol. 1993; 25:120-126.
12. Kulkarni SK. Handbook of experimental pharmacology. 3rd ed. Delhi: Nirali Prakashan; 1995.