

Journal of Chromatography, 146 (1978) 169—174.

Biomedical Applications

© Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 157

Note

Fluorimetrische Bestimmung von Flufenaminsäure aus Plasma durch direkte Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen*

H.E. GEISLER, E. MUTSCHLER** und A. SCHUMACHER

Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Robert-Mayer-Strasse 7-9, 6000 Frankfurt/Main (B.R.D.)

(Eingegangen am 21. Oktober 1977; geänderte Fassung eingegangen am 7. Februar 1978)

Flufenaminsäure (N-(*m*-Trifluormethylphenyl)-anthranilsäure) wird als Antiphlogistikum und Antirheumatikum therapeutisch häufig verwendet. Für die quantitative Analyse dieses Wirkstoffes wurden bereits mehrere Methoden entwickelt [1—11]. Von diesen eignen sich jedoch nur wenige für Messungen des Flufenaminsäuregehaltes in biologischem Material. Die wesentlichen sind nachstehend angeführt.

Panse et al. [4] bestimmten Flufenaminsäure im Harn durch direkte quantitative Dünnschichtchromatographie bei 288 nm in Remission. Eigene Untersuchungen ergaben jedoch, dass die Messung in Remission bei einem molaren Extinktionskoeffizienten von 19108 (l/mol X cm) eine höhere Nachweisgrenze besitzt als die fluorimetrische Bestimmung und eine direkte Messung der Plasmaspiegel ohne vorherige Anreicherung der Substanz durch Extraktion nicht möglich wäre.

Metha und Schulman [5] bezeichnen die native Fluoreszenz der Flufenaminsäure in organischen Lösungsmitteln für Fluoreszenzmessungen als durchaus ausreichend, was jedoch in mehreren Arbeiten anderer Autoren, die sich deshalb um eine Verbesserung der Fluoreszenzeigenschaften z.B. durch Säurezusatz bemühten, angezweifelt wurde.

Zur fluorimetrischen Bestimmung in Lösung verwendeten Glatzko [1], Buchanan et al. [6] sowie Panse et al. [7] Tetrachlorkohlenstoff als Lösungsmittel. Die Fluoreszenz der Flufenaminsäure wurde dabei durch Zugabe von Halogenessigsäuren — teilweise nach vorausgehender Oxidation mit Kaliumdichromat — verstärkt.

*Teilergebnisse der Dissertation A. Schumacher, in Vorbereitung.

**An den Anforderungen von Sonderdrucken zu richten sind.

Nach Angaben von Dell und Kutschbach [8] sind als Lösungsmittel für Flufenaminsäurebestimmungen solche mit einer Dielektrizitätskonstanten von Null geeignet, wenn ihnen Halogenessigsäuren zugesetzt werden.

Gute Ergebnisse erzielten Hattori et al. [9] bei der fluorimetrischen Bestimmung der Flufenaminsäure als Aluminiumkomplex. Die Nachweisgrenze lag bei 4 ng/ml, wobei die Bestimmung allerdings nur in Pufferlösung und nicht aus Plasma erfolgte. Nachteilig ist hierbei der grosse Arbeitsaufwand, die notwendige Elution von der Platte und die Herstellung einer Blindlösung.

Eine Derivatisierung der Flufenaminsäure zu besser fluoreszierenden Produkten wurde erstmals von Dell und Kamp [10] durchgeführt. Sie setzen entweder die Substanz mit konzentrierter Schwefelsäure zu gut fluoreszierendem Trifluormethylacridon um oder führten eine Cyclisierungsreaktion mit Formaldehyd durch.

Mit Formaldehyd cyclisiert Flufenaminsäure zu 1-(*m*-Trifluormethylphenyl)-4-oxo-1,2-dihydro-3,1,4-benzoxazin. Diese Reaktion wird sauer katalysiert (Fig. 1). Diese Umsetzung benutzten Schmollack und Wenzel [11] zur quantitativen Flufenaminsäurebestimmung. Da hierbei jedoch keine chromatographische Auftrennung erfolgt, ist die Methode zur Blutspiegelbestimmung der Flufenaminsäure nicht geeignet.

Die in der Literatur beschriebenen Methoden sind zum Teil nicht selektiv, da keine Abtrennung von störenden Begleitsubstanzen erfolgt. In den Fällen, in denen eine Dünnschichtchromatographie (DC) durchgeführt wird, schliesst sich eine Elution der Substanz von der Platte vor der Messung an. Ein solches Verfahren ist arbeitsaufwendig und eventuell mit Fehlern behaftet. Infolge einer zu hohen Nachweisgrenze sind viele Verfahren wegen der notwendigen Konzentrierung der Substanz nach Elution aus dem Plasma ebenfalls sehr arbeitsintensiv. Unser Ziel war es daher, die Flufenaminsäure direkt aus dem Plasma nach DC-Abtrennung von Metaboliten und Plasmabestandteilen auf der Platte zu bestimmen.

Nachdem auf Grund von Vorversuchen die von Dell und Kamp [10] beschriebene Umsetzung mit Formaldehyd sich als erfolgversprechend erwiesen hatte, versuchten wir die Reaktionsbedingungen so zu verbessern, dass für quantitative Analysen brauchbare Ergebnisse erhalten werden. Dell und Kamp setzten die Flufenaminsäure nach Chromatographie mit Paraformaldehyd und konzentrierter Schwefelsäure während 2 h bei 80° um. Wir konnten zeigen, dass eine Zugabe von Ameisensäure zu den genannten Substanzen die notwendige Reaktionszeit auf 45 min verkürzt, die Fluoreszenzintensität erhöht

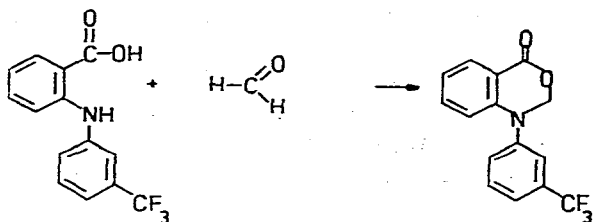


Fig. 1. Umsetzung der Flufenaminsäure mit Formaldehyd zu 1-(*m*-Trifluormethylphenyl)-4-oxo-1,2-dihydro-3,1,4-benzoxazin.

und die relative Standardabweichung bei einer Bestimmung von 10 $\mu\text{g/ml}$ Plasma von 6.9% auf 1.5% verbessert. Die Nachweisgrenze ist dabei so niedrig, dass Mengen ≤ 2 ng/Fleck messbar sind. Eine Extraktion aus dem Plasma ist daher nicht notwendig, die Elution von der Platte entfällt ebenfalls, wodurch das Verfahren wesentlich vereinfacht wird.

METHODIK

Die zu chromatographierende Lösung wird wie folgt hergestellt: Ein Volumenteil Plasma wird mit zwei Volumenteilen Methanol versetzt und scharf zentrifugiert, wobei das gefällte Eiweiss sedimentiert. Entsprechend der zu erwartenden Konzentration werden von der überstehenden Lösung 10–50 μl strichförmig mit dem Linomaten III (Camag) auf Kieselgel-60-Fertigplatten, 20 \times 20 cm, ohne Fluoreszenzindikator (Merck, Darmstadt, B.R.D.), aufgetragen. Bei einer Strichbreite von 10 mm pro Fleck und einem 25-mm-Abstand der äusseren Startlinien vom Plattenrand können acht Proben und drei Standards auf eine Platte aufgetragen werden. Die drei Standards werden durch Zusatz von Flufenaminsäure zu gepooltem Plasma hergestellt.

Dazu werden 60.0 mg Flufenaminsäure in 100.0 ml Aceton gelöst und 1.0 ml dieser Lösung wird nochmals auf 10.0 ml verdünnt, entsprechend einer Konzentration von 600.0 μg pro 10.0 ml Aceton. Eine 5.0-ml-Probe dieser Lösung wird nun durch Einblasen von Stickstoff bis zur Trockne eingengt, dann werden 50.0 ml gepooltes Plasma zugegeben. Dadurch ergibt sich eine Konzentration von 6.0 μg Flufenaminsäure/ml Plasma. Nach Zugabe von zwei Volumenteilen Methanol und Zentrifugation wird der Überstand als Standardlösung verwendet.

Die DC erfolgt unter Standardbedingungen mit dem Fließmittel Chloroform–Methanol (70:30, v/v) in Ammoniakatmosphäre Fließstrecke 12 cm. In diesem System wird die Substanz von ihren Metaboliten und Plasmabestandteilen getrennt.

In Fig. 2 ist die Fluoreszenzintensitäts-Ortskurve des Chromatogramms eines 3.9 $\mu\text{g/ml}$ Flufenaminsäure enthaltenden Plasmas dargestellt.

Nach dem Trocknen der Platte (ca. 5 min nach der Chromatographie) wird die Flufenaminsäure mit Formaldehyd umgesetzt. Dabei wird die Platte in eine Trennkammer gestellt, auf deren Boden ein Glasschiffchen, gefüllt mit 2 g Paraformaldehyd und 0.25 ml konzentrierter Schwefelsäure, sowie ein Glasschiffchen mit 0.1 ml Ameisensäure stehen. Die geschlossene Kammer wird für 45 min bei 100° in einen Wärmeschrank gestellt. Nach Abkühlen der Platte (ca. 10 min nach Herausnahme aus dem Wärmeschrank) wird eine direkte quantitative Messung der Fluoreszenz mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer KM3 der Firma Zeiss vorgenommen. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgt durch die Hg-Linie 365 nm ($27.4 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$) der Hg-Mitteldrucklampe St 41 bei einer Spaltgrösse von 1 \times 8 mm.

Wie aus dem abgebildeten Emissionsspektrum des an das Sorbens gebundenen Benzoxazin Derivates (Fig. 3) hervorgeht, liegt das Fluoreszenzmaximum bei 455 nm. Als Sperrfilter für die Exzitationsstrahlung verwendeten wir den Kantenfilter Fl 43.

Die Intensität der Emissionsstrahlung wird durch einen Photoelektronenvervielfacher gemessen, die Aufzeichnung der Fluoreszenzintensitäts-Ortskurve

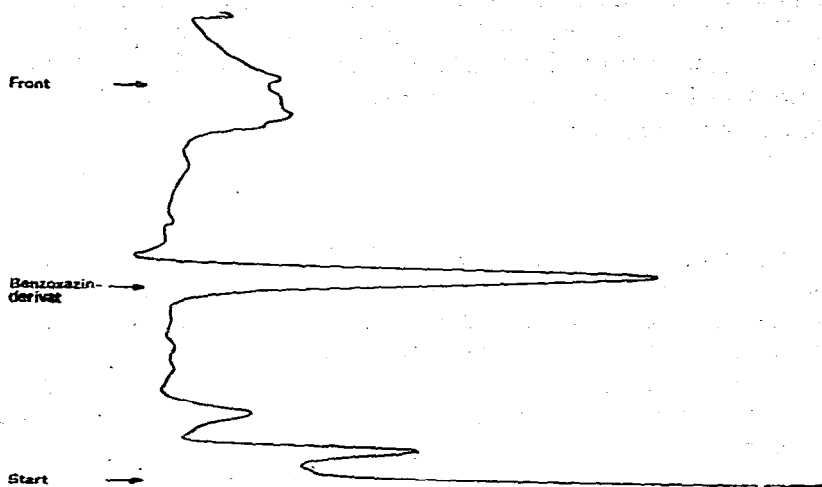


Fig. 2. Fluoreszenzintensitäts-Ortskurve des Chromatogramms eines $3.9 \mu\text{g/ml}$ Flufenaminsäure enthaltenden Plasmas. Die Plasmaprobe wurde 5 h nach der letzten Einnahme von 200 mg Flufenaminsäure bei einer Erhaltungsdosis von 600 mg pro die gewonnen. Aufgetragen wurden $50.0 \mu\text{l}$ eines Überstandes von 1.0 ml Plasma und 2.0 ml Methanol. Die Fluoreszenzreaktion erfolgte nach der Chromatographie direkt auf der Platte mit Formaldehyd.

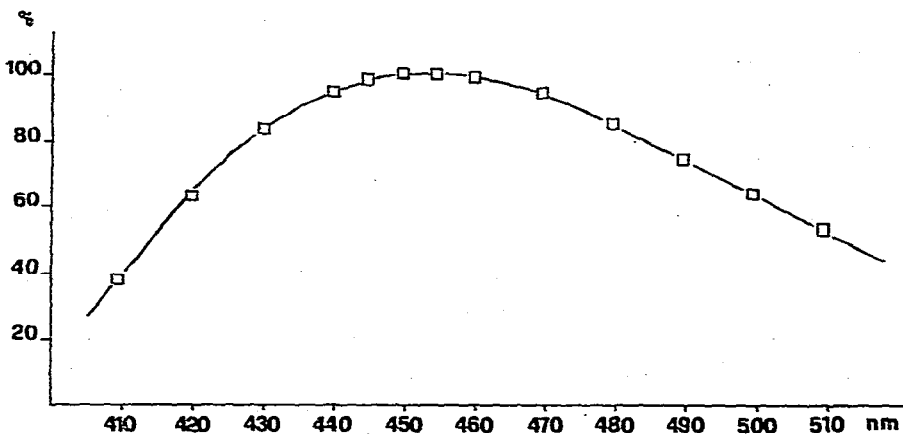


Fig. 3. Emissionsspektrum des Benzoxazin-Derivates der Flufenaminsäure. Exzitation: Hg-Linie 365 nm.

erfolgt durch einen Perkin-Elmer-Recorder 56, Tischgeschwindigkeit 100 mm/min, Schreibervorschub 120 mm/min. Unter den genannten Bedingungen besteht in Konzentrationen von 2 bis 200 ng pro Fleck sowohl zwischen den Höhen der aufgezeichneten Fluoreszenzintensitäts-Ortskurven und den aufgetragenen Substanzmengen als auch zwischen den Flächen unter den Ortskurven und den aufgetragenen Substanzmengen Linearität, die Eichkurven gehen durch den Nullpunkt. Zur Erstellung der Eichgeraden genügt daher ein einziger Kurvenpunkt, der zur Erhöhung der Genauigkeit aus drei Messwerten ermittelt wird. Bei unseren Untersuchungen benutzten wir zur Auswertung die

Höhe der Fluoreszenzintensitäts-Ortskurven.

Zur Überprüfung der Methode wurde einer Versuchsperson eine einmalige Dosis von 200 mg Flufenaminsäure verabreicht und 6, 12 und 24 h nach der Einnahme Blut entnommen. Die Proben wurden, zusammen mit einem 3.0 μg Flufenaminsäure/ml Plasma enthaltenden Standard, nach der beschriebenen Methode aufgearbeitet. Die Auftragemenge betrug jeweils 50.0 μl des Überstandes der Methanolfällung. Es ergaben sich Blutspiegel von 1.92 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nach 6 h und 0.225 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nach 12 h. Nach 24 h waren nur noch Spuren von Flufenaminsäure nachweisbar.

Die Bestimmung störende Metaboliten wurden nicht beobachtet. Ein DC-Fleck im hR_F -Bereich von 15 (hR_F von Flufenaminsäure: 37) könnte mit einem der von Glatzko [1] beschriebenen hydroxylierten oder konjugierten Metaboliten identisch sein.

PRÄZISION UND RICHTIGKEIT DES VERFAHRENS

Bei der mittleren therapeutischen Tagesdosis von dreimal 200 mg Flufenaminsäure werden Blutspiegelmaxima bis 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ erreicht. Die Präzision des Verfahrens wurde daher für die Konzentrationen (a) 10.0 μg , (b) 1.0 μg , (c) 0.5 μg Flufenaminsäure/ml Plasma bestimmt.

Nach der oben beschriebenen Methode wurden (jeweils $n=8$) (a) 10.0 μg , (b) 1.0 μg , (c) 0.5 μg Flufenaminsäure/ml Aceton unter Stickstoff zur Trockne eingengt und in 1.0 ml Plasma aufgenommen. Die Eiweissfällung erfolgte jeweils mit 2.0 ml Methanol. Aufgetragen wurden dann von der Lösung (a) 10 μl , (b) 50 μl , (c) 50 μl .

Die weitere Behandlung der Proben erfolgte wie oben beschrieben, wobei die Registrierung der Kurven bei Lösung a und b mit 0.5 V und bei Lösung c mit 0.2 V Eingangsspannung am Schreiber durchgeführt wurden (Ausgang des KM3 0–1 V).

Die Ergebnisse sind in Tabelle I aufgeführt.

TABELLE I

PRÄZISION DES VERFAHRENS ZUR BESTIMMUNG VON FLUFENAMINSÄURE

Konzentration im Testplasma ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Relative Standardabweichung (%)
10.0	1.5
1.0	3.1
0.5	8.5

Bei den Untersuchungen auf Richtigkeit des Verfahrens, bei denen als Standard in Methanol–Wasser (2:1) gelöste Flufenaminsäure benutzt wurde, lagen die Wiederfindungsraten über 100%, was einerseits durch eine Volumenkontraktion des Plasma–Methanol-Gemisches und andererseits durch eine Volumenverminderung infolge des ausgefallenen Eiweisses erklärt wird. Wird die ursprüngliche im Plasma vorhandene (durch Einwaage bekannte) Flufen-

aminsäure-Menge auf das Volumen des Plasma-Methanol-Gemisches nach der Zentrifugation berechnet, so liegt die Wiederfindungsrate etwa bei 100%.

Geringe Schwankungen sind bei verändertem Eiweißgehalt des Plasmas zu erwarten. Deshalb erschien es am günstigsten, als Standard gepooltes Plasma zu benutzen, und dies genauso wie die zu bestimmende Probe zu behandeln. Dadurch wird der Fehler infolge der Volumenkontraktion ausgeschlossen und der Fehler durch schwankenden Eiweißgehalt so klein wie möglich gehalten.

Die vorstehend beschriebene Bestimmungsmethode für Flufenaminsäure aus Humanplasma ist wegen ihrer einfachen Durchführung und ihres geringen Zeit- und Arbeitsaufwandes bei hoher Selektivität und guter Genauigkeit für Reihenuntersuchungen geeignet.

LITERATUR

- 1 A.J. Glatzko, *Ann. Phys. Med. (Suppl.)*, 9 (1967) 23.
- 2 H.-D. Dell und J. Fiedler, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, 270 (1974) 278.
- 3 T. Minamikawa, K. Sakai, N. Hashitani, E. Fukushima und N. Yamagishi, *Chem. Pharm. Bull.*, 21 (1973) 1632.
- 4 P. Panse, P. Zeiller und K.H. Sensch, *Arzneim.-Forsch.*, 24 (1974) 1298.
- 5 A.C. Mehta und S.G. Schulman, *Talanta*, 20 (1973) 702.
- 6 R.A. Buchanan, C.J. Eaton, S.T. Koeff und A.W. Kinkel, *Curr. Ther. Res.*, 11 (1969) 1583.
- 7 P. Panse, P. Zeiller und K.H. Sensch, *Arzneim.-Forsch.*, 21 (1971) 1605.
- 8 H.D. Dell und B. Kutschbach, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, 262 (1972) 356.
- 9 Y. Hattori, T. Arai, T. Hori und R. Fujihira, *Chem. Pharm. Bull.*, 18 (1970) 1063.
- 10 H.D. Dell und R. Kamp, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 303 (1970) 785.
- 11 W. Schmollack und U. Wenzel, *Pharmazie*, 29 (1974) 533.