

CHROMBIO. 243

Note

Fluorimetrische Bestimmung von Nifluminsäure aus Plasma durch direkte Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen

ANNETTE SCHUMACHER*, HEINRICH E. GEISLER und ERNST MUTSCHLER**

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

(Eingegangen am 17. Mai 1978; geänderte Fassung eingegangen am 9. August 1978)

Nifluminsäure [2-(*m*-Trifluormethyl-anilino)-nicotinsäure] ist ein in der Rheumatherapie häufig verwendetes Antirheumatikum und Antiphlogistikum. Es gibt jedoch bisher nur wenige in der Literatur beschriebene Verfahren zur quantitativen Analyse dieses Wirkstoffes in biologischem Material. 1968 und 1971 bestimmten Boisier et al. [1, 2] den Nifluminsäureplasmaspiegel spektral-photometrisch bei 286 nm. Das Verfahren erfordert jedoch eine Extraktion aus dem Plasma und beinhaltet keine Abtrennung der Substanz von evtl. bei gleicher Wellenlänge absorbierenden Stoffen (z.B. Metaboliten).

Die Messung radioaktiv markierter Nifluminsäure, 1973 von Lan et al. [3] durchgeführt, kann zwar auch zu Plasmaspiegelbestimmungen herangezogen werden, erfasst werden dabei jedoch gleichzeitig ausser der Nifluminsäure alle radioaktiv markierten Abbauprodukte.

Das von uns entwickelte fluorimetrische Verfahren besitzt gegenüber den genannten Methoden die Vorteile (1) einer niedrigen Nachweisgrenze (≤ 10 ng pro Fleck); (2) einer chromatographischen Abtrennung der Substanz von Metaboliten und Plasmabestandteilen; und (3) eines geringen Arbeitsaufwandes und einer grossen Genauigkeit durch die direkte Bestimmung aus Plasma ohne vorherige Extraktion.

Bei dem von uns entwickelten Verfahren entsteht vermutlich aus der nicht fluoreszierenden Nifluminsäure durch Cyclisierung mit Formaldehyd, analog zu der von Dell und Kamp [4] beschriebenen Reaktion für Flufenaminsäure, ein fluoreszierendes Pyridooxazin-Derivat. Ein Zusatz von Ameisensäure als saurer Katalysator steigert die Fluoreszenzintensität erheblich.

*Teilergebnisse der Dissertation A. Schumacher, in Vorbereitung.

**Anforderung von Sonderdrucken: Prof. Dr. Dr. Ernst Mutschler, Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Robert-Mayer-Strasse 7—9, 6000 Frankfurt/Main, B.R.D.

METHODIK

Die zu chromatographierende Lösung wird wie folgt hergestellt: 1 Volumenteil Plasma wird mit 2 Volumenteilen Methanol versetzt und scharf abzentrifugiert, wobei das gefällte Eiweiss sedimentiert. Entsprechend der zu erwartenden Konzentration werden von der überstehenden Lösung 20–100 μ l strichförmig mit dem Linomaten III (Camag) auf Kieselgel-60-Fertigplatten (Merck, Darmstadt, B.R.D.) 20 \times 20 cm ohne Fluoreszenzindikator 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 Standards werden durch Zusatz von Nifluminsäure zu gepooltem Plasma hergestellt. Dazu werden 60.0 mg Nifluminsäure in 100.0 ml Aceton gelöst und 1.0 ml dieser Lösung nochmals auf 10.0 ml verdünnt, entsprechend einer Konzentration von 600.0 μ g pro 10.0 ml Aceton. 5.0 ml dieser Lösung werden 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 μ g Nifluminsäure pro 1.0 ml Plasma. Nach Zugabe von 2 Volumenteilen Methanol und Zentrifugation wird der Überstand als Standardlösung verwendet.

Die Chromatographie erfolgt 10 Min nachdem der letzte Fleck aufgetragen ist, um ein gleichmässiges Trocknen der Proben auf der Platte zu erreichen. Mit dem Fließmittel Chloroform–Methanol–Ameisensäure (95:7:7, v/v) bei einer Fließstrecke von 12 cm wird die Substanz von ihren Metaboliten und Plasmabestandteilen abgetrennt.

Nach der Chromatographie wird die Platte für 15 Min bei 130° im Wärmeschrank getrocknet. Anschliessend erfolgt die Umsetzung mit Formaldehyd direkt auf der Dünnschicht-Platte während 30 Min bei 130° zu intensiv fluoreszierenden Flecken. Dabei steht die Platte in einer Dünnschicht-Kammer zusammen mit zwei Glasschiffchen, von denen das eine mit 2.5 g Paraformaldehyd und 0.5 ml konz. Schwefelsäure, das andere mit 1 ml Ameisensäure gefüllt ist.

Die direkte quantitative Messung, 30 Min nach Herausnahme der Platte aus der Kammer, erfolgt mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer KM 3 der Firma Zeiss. Exzitation: Hg-Linie 265 nm der Hg-Mitteldrucklampe St 41, Spaltgrösse 1 \times 8 mm. Emission: > 430 nm. Als Sperrfilter für die Exzitationsstrahlung verwendeten wir den Kantenfilter F1 43. Die Intensität der Emissionsstrahlung wird durch einen Photoelektronenvervielfacher gemessen, die Aufzeichnung der Fluoreszenzintensitäts–Ortskurven erfolgt durch einen Perkin-Elmer-Recorder 56, Tischgeschwindigkeit 50 mm/Min, Schreibervorschub 120 mm/Min. Die Auswertung erfolgt über die Flächen unter den Fluoreszenzintensitäts–Ortskurven.

Nach der vorstehenden Methode wurden die Präzision und Richtigkeit des Verfahrens bestimmt. Da bei einer therapeutischen Tagesdosis von 3 \times 250 mg Nifluminsäure-Blutspiegel von ca. 12 μ g/ml erreicht werden, wurden zur Bestimmung von Präzision und Richtigkeit zu jeweils 1.0 ml Testplasma (1) 12.0 μ g, (b) 6.0 μ g, und (c) 1.0 μ g Nifluminsäure zugesetzt. Bei den Untersuchungen auf Richtigkeit des Verfahrens verwendeten wir als Standards die jeweils gleichen Mengen Nifluminsäure, gelöst im Methanol–Wasser (2:1).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei einer Konzentration von $12.0 \mu\text{g}$ Nifluminsäure pro ml Testplasma war die relative Standardabweichung 3.3%, bei $6.0 \mu\text{g/ml}$ 3.6%, und bei $1.0 \mu\text{g/ml}$ 7.7%.

Die Wiederfindungsraten bei der Bestimmung der Richtigkeit des Verfahrens lagen 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) Nifluminsäuremenge 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 uns am günstigsten, als Standard gepooltes Plasma zu verwenden und dies genauso wie die zu bestimmenden Proben zu behandeln. Dadurch wird der Fehler infolge der Volumenkontraktion ausgeschlossen und der Fehler durch schwankenden Eiweissgehalt so klein wie möglich gehalten.

Die Bestimmung der Linearität zwischen den Flächen unter den Fluoreszenzintensitäts-Ortskurven und den aufgetragenen Substanzmengen im Konzentrationsbereich von 10–200 ng/Fleck ergab einen linearen Regressionskoeffizienten von 0.998, gemittelt aus zwei Eichkurven. Die Eichkurven gehen durch den Nullpunkt. Zur Erstellung der Eichgeraden genügt daher jeweils ein einziger Kurvenpunkt, der zur Erhöhung der Genauigkeit aus drei Messwerten ermittelt wird.

Das Fluoreszenzmaximum des an das Sorbens gebundenen Umsetzungsproduktes der Nifluminsäure liegt, wie aus Fig. 1 hervorgeht, bei 450 nm.

Zur Überprüfung unserer Methode wurde einer Versuchsperson eine einmalige Dosis von 250 mg Nifluminsäure verabreicht und 5, 9 und 26 Stunden nach der Einnahme Blut entnommen. Die Proben wurden, Zusammen mit einem $6.0 \mu\text{g}$ Nifluminsäure pro 1.0 ml Plasma enthaltenden Standard, nach der beschriebenen Methode aufgearbeitet. Die Auswertung der Platten erfolgte 30 Min nach

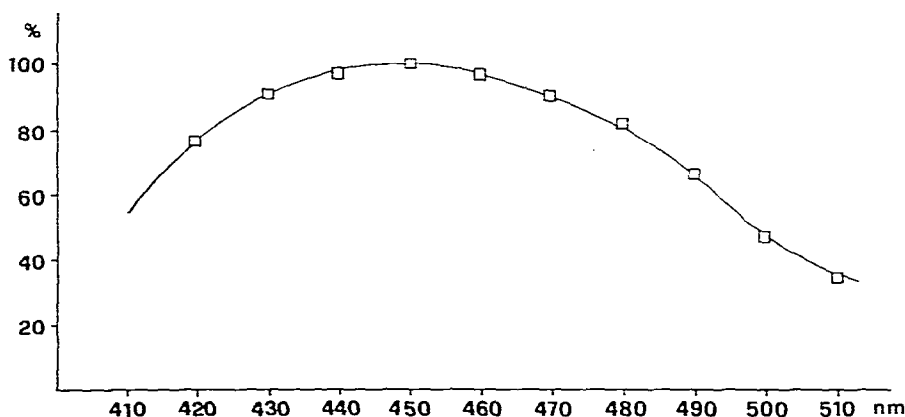


Fig. 1. Emissionsspektrum der mit Formaldehyd umgesetzten Nifluminsäure. Exzitation: Hg-Linie 265 nm.

Herausnahme aus der Kammer, da, wie auf Fig. 2 ersichtlich, nach anfänglich recht schneller Abnahme der Fluoreszenzintensität bis auf ein relativ stabiles Niveau, dann gut reproduzierbare Werte gefunden werden.

Bei längerer Applikation von Nifluminsäure ist mit dem Auftreten der von Cohen et al. [5] beschriebenen Hauptmetaboliten 5-Hydroxynifluminsäure und 4'-Hydroxynifluminsäure zu rechnen, da diese nach Lan et al. [3] Halbwertszeiten von 15 h aufweisen und daher nach mehrmaliger Gabe im üblichen 8-h-Rhythmus einen deutlich höheren Plasmaspiegel erreichen werden als nach einmaliger Gabe. Daher wurde ihr Verhalten bei unserer Bestimmungsmethode ebenfalls untersucht. Die Metaboliten wurden als Standards zu Testplasma zugesetzt und unter gleichen Bedingungen aufgearbeitet.

Nach erfolgter Methanolfällung wurden von dem Überstand der 5-h-Probe 20 μ l, der 9-h-Probe 40 μ l und der 26-h-Probe ebenfalls 40 μ l aufgetragen. Es ergaben sich Blutspiegel von 15.6 μ g pro 1.0 ml nach 5 h und 5.0 μ g pro 1.0 ml nach 9 h. Nach 26 h waren nur noch Spuren von Nifluminsäure vorhanden.

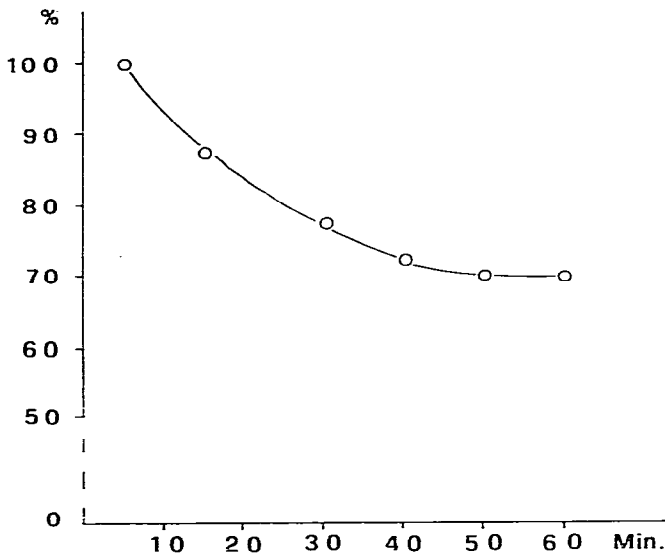


Fig. 2. Abnahme der Fluoreszenzintensität der mit Formaldehyd umgesetzten Nifluminsäure.

In Fig. 3 ist die Fluoreszenzintensitäts—Ortskurve des Chromatogramms des 9-h-Wertes dargestellt und als Vergleich dazu die Fluoreszenzintensitäts—Ortskurve eines Chromatogramms, bei dem 40 μ l des Überstandes einer Methanolfällung von 1.0 ml Plasma ohne Nifluminsäure aufgetrennt wurden. Der hR_F -Wert der Nifluminsäure beträgt 36. Die Hauptmetaboliten erreichen hR_F -Werte von 20 für 5-Hydroxynifluminsäure und 6 für 4'-Hydroxynifluminsäure.

4'-Hydroxynifluminsäure reagiert nach dem beschriebenen Verfahren nicht zu einem fluoreszierenden Produkt. Der hR_F -Wert wurde durch Fluoreszenzlöschung auf einer Kieselgel-60-Fertigplatte (Merck) 20 \times 20 cm mit Fluoreszenzindikator ermittelt. Die 5-Hydroxynifluminsäure ergibt mit Formaldehyd

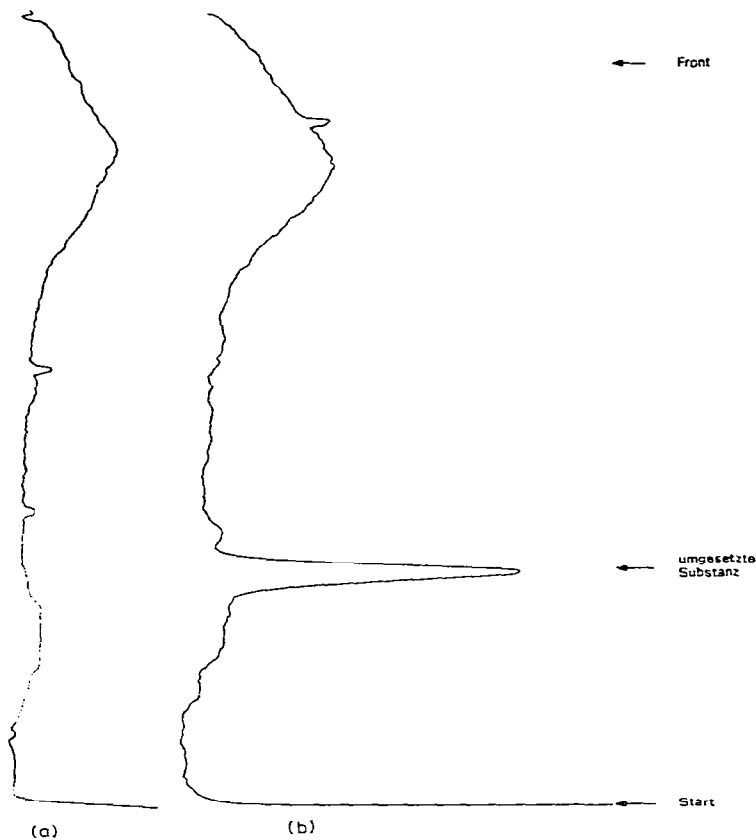


Fig. 3. Fluoreszenzintensitäts—Ortskurven der Chromatogramme eines Plasmas ohne Nifluminsäure (a) und eines 5.0 μg pro 1.0 ml enthaltenden Plasmas (b). Das Nifluminsäure enthaltende Plasma wurde 9 h nach der Einnahme einer einmaligen Dosis von 250 mg Nifluminsäure gewonnen. Aufgetragen wurde je 40 μl eines Überstandes von 1.0 ml Plasma und 2.0 ml Methanol. Die Fluoreszenzreaktion erfolgte nach der Chromatographie direkt auf der Platte mit Formaldehyd.

ein fluoreszierendes Produkt und kann daher gleichzeitig neben der Nifluminsäure quantitativ mitbestimmt werden. Bei einmaliger Gabe von 250 mg Nifluminsäure ist jedoch nach 9 h, wie aus Fig. 3b ersichtlich, noch keine 5-Hydroxynifluminsäure im Plasma nachweisbar.

DANK

Wir danken der Dr. Robert Pflieger-Stiftung für eine Sachbeihilfe.

LITERATUR

- 1 J.R. Boissier, J.P. Tillement, C. Frossard und P. Fabiani, *Ann. Pharm. Fr.*, 26 (1968) 707.
- 2 J.R. Boissier, J.P. Tillement und C. Larousse, *Thérapie*, 25 (1971) 211.
- 3 S.J. Lan, T.J. Chando, I. Weliky und E.C. Schreiber, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 186 (1973) 323.
- 4 H.D. Dell und R. Kamp, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 303 (1970) 785.
- 5 A.I. Cohen, I. Weliky, S.J. Lan und S.D. Levine, *Biomed. Mass. Spectrom.*, 1 (1974) 1.