

Journal of Chromatography, 232 (1982) 145–153

Biomedical Applications

Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 1356

DIE QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON FEPRAZON UND EINEM FEPRAZON-METABOLITEN IN HUMANPLASMA NACH HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCROMATOGRAPHISCHER ODER DÜNN-SCHICHTCHROMATOGRAPHISCHER TRENNUNG*

HILDEGARD SPAHN und ERNST MUTSCHLER*

Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Theodor-Stern-Kai 7, Gebäude 75A, D-6000 Frankfurt am Main 70 (B.R.D.)

(Eingegangen am 10. Februar 1982; geänderte Fassung eingegangen am 4. April 1982)

SUMMARY

Determination of feprazone and one of its metabolites in human plasma after high-performance liquid chromatographic or thin-layer chromatographic separation

Two procedures suitable for pharmacokinetic routine analysis are described for the simultaneous determination of feprazone and one of its metabolites (DA 3505) in plasma samples. After extraction from acidified plasma feprazone and DA 3505 are determined by measuring UV absorbance after thin-layer chromatographic (TLC) separation (reversed-phase TLC plates; methanol–water–formic acid) or high-performance liquid chromatographic (HPLC) separation (silica gel column; hexane–tetrahydrofuran–acetic acid). Limits of detection are 0.1 µg feprazone per ml plasma and 0.2 µg of its metabolite per ml plasma using the HPLC method. Concentrations down to about 0.5 µg/ml plasma of both compounds can be determined using the TLC method.

EINLEITUNG

Bei der Testung von 1,2-Diphenyl-3,5-dioxypyrazolidinen, die in 4-Stellung einen oder mehrere Isopren-Reste enthalten, wurde als antiinflammatorisch und analgetisch gut wirksame Substanz das 4-Prenyl-1,2-diphenyl-3,5-dioxypyrazolidin (Feprazon; Fig. 1a) gefunden, das im Vergleich zu Phenylbutazon bei ähnlicher Wirksamkeit einen schwächeren ulzerogenen Effekt zeigen soll [1–4].

Aus Humanurin wurden als wichtigste Metaboliten von Feprazon das 3'-Hydroxymethylbutenylderivat (DA 3505, M I; siehe Fig. 1b) und das C-Glucu-

*Teilergebnisse der Dissertation von H. Spahn, 1981.



Fig. 1. Strukturformeln von Feprazon (a) und dem Feprazon-Metaboliten M I (b).

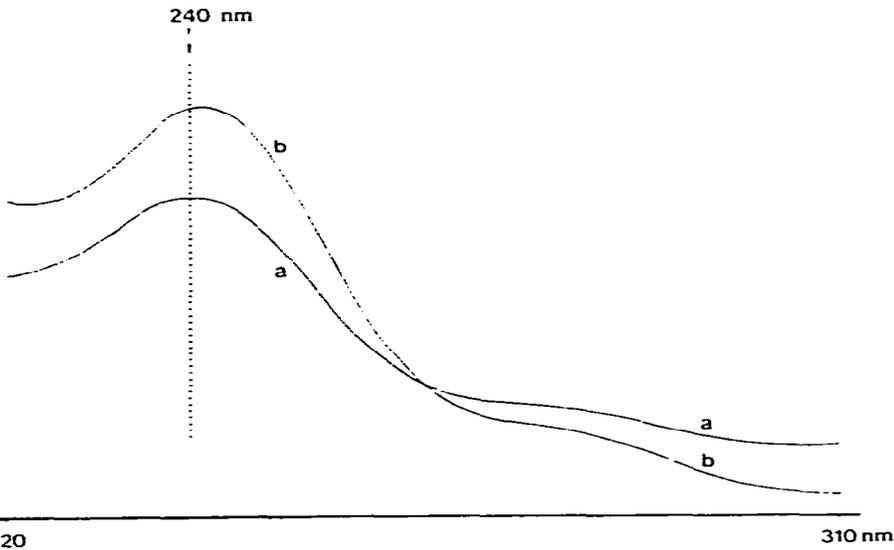


Fig. 2. UV-Absorptionsspektren von Feprazon (a) und dessen Metaboliten DA 3505 (b) in *n*-Hexan-Tetrahydrofuran-Eisessig (780:220:0.5, v/v/v). Konzentrationen der aufgetragenen Lösungen: 10 µg/ml.

ronic (C4-β; M II) von Feprazon isoliert; über 50% des applizierten Feprazon werden beim Menschen als C-Glucuronid über die Nieren ausgeschieden [5, 6]. Von Bruchhausen und Geimer [7] untersuchten mit Hilfe einer gaschromatographischen Bestimmungsmethode die Pharmakokinetik von Feprazon nach peroraler Applikation Feprazon-haltiger Lösungen und Kapseln. Dabei wurden Plasmahalbwertszeiten von ca. 22 h gefunden.

In dieser Arbeit werden zwei Methoden zur quantitativen Bestimmung von Feprazon in Plasmaproben beschrieben, bei denen auch die gleichzeitige Bestimmung des 3'-Hydroxy-Derivats möglich ist. Feprazon und auch dessen Metabolit DA 3505 können sowohl mit einem Cyclohexan-Diethylether als auch mit einem Chloroform-Diisopropylether-Gemisch aus der angesäuerten Plasmaphase extrahiert werden. Mit Chloroform-Diisopropylether ist ferner eine "Mikrophasenextraktion", d.h. eine Extraktion mit einem geringen Lösungsmittelvolumen, möglich. Eine chromatographische Trennung der Substanzen selbst sowie von mitextrahierten Plasmabestandteilen ist sowohl mit hochleistungsflüssigkeitschromatographischen (HPLC) als auch mit dünn-schichtchromatographischen (TLC) Methoden zu erreichen. Die hochleistungsflüssigkeitschromatographische Bestimmung von Feprazon und DA 3505 er-

folgt nach Trennung auf einer Kieselgel 60-Säule mit einem essigsäuren *n*-Hexan-Tetrahydrofuran-Gemisch als mobiler Phase durch Messung der UV-Absorption bei 240 nm (Fig. 2). Die dünnschichtchromatographische Trennung wird auf RP-8-HPTLC-Platten mit einem sauren Wasser-Methanol-Gemisch als Fließmittel durchgeführt. Die Detektion erfolgt über Absorptionsmessung in Remission bei einer Wellenlänge von 241 nm.

EXPERIMENTELLER TEIL

Geräte

Flüssigkeitschromatograph LC 601, variabler Wellenlängen-Detektor LC 55, Minigrator M2 (Perkin-Elmer); Servogor Sb-Schreiber. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit einem Beckman-Spektralphotometer (Modell 24).

Chromatogramm-Spektralphotometer KM 3 der Fa. Zeiss; Perkin-Elmer-Recorder Modell 56; Linomat III (Camag) mit Hamilton-Spritze; Tecam[®]-Heizblock mit Stickstoffbegasung.

Chemikalien

Die Substanzen Feprazon und DA 3505 wurden von der Fa. Boehringer Ingelheim zur Verfügung gestellt. Die Lösungsmittel und Reagenzien (p.a.-Qualität; nur *n*-Hexan, Tetrahydrofuran und Chloroform in LiChrosolv[®]-Qualität) wurden von der Fa. Merck (Darmstadt, B.R.D.) bezogen.

Als innerer Standard (HPLC) wird das 2,4-Dinitrophenylhydrazon des 3,4-Dimethoxybenzaldehyds [8, 9], als Extraktionsmittel eine Lösung des inneren Standards (25 µg/ml) in einem Gemisch von Chloroform-Diisopropylether (1:3, v/v) verwendet. Vom inneren Standard wird eine Stammlösung (5 mg in 10 ml Chloroform) hergestellt, die kühl aufbewahrt wird. 0.5 ml der Stammlösung wird mit 2 ml Chloroform gemischt; mit Diisopropylether p.a. wird auf 10 ml aufgefüllt (= "Extraktionsmittel" für die HPLC-Bestimmung).

Extraktion

HPLC-Bestimmung. 0.5 ml Citratplasma wird mit 0.5 ml 1 N Salzsäure und 0.3 ml Extraktionsmittel versetzt. Nach 20-minütigem Schütteln werden die Phasen durch Zentrifugation getrennt. Die organische Oberphase wird sofort chromatographiert oder von der Plasmaphase abgetrennt und in einem gut verschliessbaren Gefäss bis zur Analyse aufbewahrt. 20 µl der überstehenden Phase werden chromatographiert.

TLC-Bestimmung. (a) 0.5 ml Plasma wird mit 0.5 ml 1 N Salzsäure und 300 µl eines Gemisches von Chloroform-Diisopropylether (1:3, v/v; ohne Zusatz eines inneren Standards) versetzt. Nach 20-minütigem Schütteln wird 10 min zentrifugiert. 50 µl der überstehenden organischen Phase werden strichförmig auf die TLC-Platte aufgetragen.

(b) 0.5 ml Plasma wird in einem Sovirel[®]-Glas mit 0.5 ml 1 N Salzsäure und 4 ml eines Gemisches von Cyclohexan-Diethylether (1:1, v/v) versetzt, 20 min geschüttelt und danach zentrifugiert. Die organische Phase wird abgetrennt und in ein zweites Glas überführt. Der Extrakt wird unter Stickstoffbegasung bei 60°C eingedampft; die Wände des Eindämpfgefässes werden dabei mit

wenig Diethylether abgespült. Der verbleibende Rückstand wird mit 300 μ l Dichlormethan aufgenommen. 40 μ l der resultierenden Lösung werden auf die TLC-Platte aufgetragen.

Chromatographie

HPLC. Chromatographische Bedingungen: analytische Säule der Fa. Knauer (Länge 250 mm, Innendurchmesser 4.5 mm, Füllmaterial: LiChrosorb[®] Si 100 (Merck), 7 μ m; *n*-Hexan–Tetrahydrofuran–Essigsäure reinst (780:220:0.5, v/v/v) als mobile Phase; Temperatur: 50°C; Flussrate: 3 ml/min (entsprechend einem Druck von 3.45–4.14 MPa); Detektion durch Messung der UV-Absorption bei 240 nm (Fig. 2).

Als Retentionszeiten wurden 102 sec für Feprazon und 450 sec für DA 3505 gefunden, d.h. der Peak des Metaboliten erscheint erst nach 7.5 min. Zur Verkürzung der Analysenzeiten bei Reihenuntersuchungen ist es möglich, jeweils zwei Proben in kurzem Abstand hintereinander zu injizieren (siehe Fig. 3), was allerdings die Werte für die Standardabweichung bei der Bestimmung von DA 3505 geringfügig erhöht.

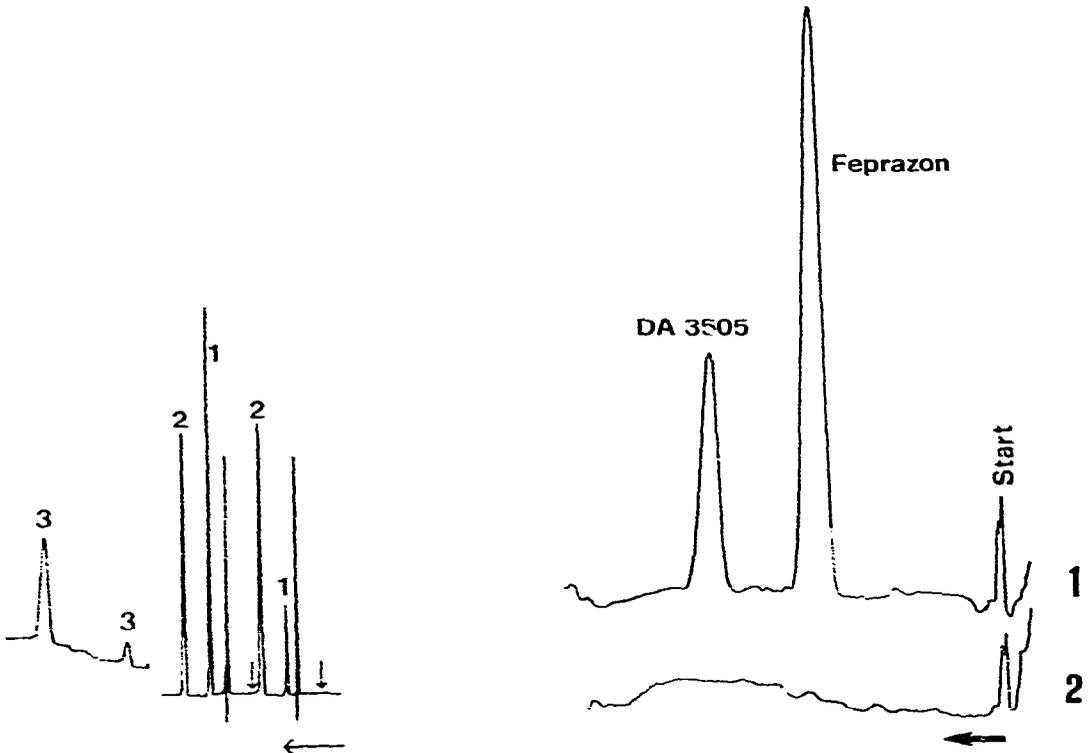


Fig. 3. Chromatogramme von Feprazon und DA 3505 nach Extraktion aus Plasma eines Probanden, dem 400 mg Feprazon oral appliziert wurden, und HPLC-Trennung. Analyse von zwei Plasmaproben. Peaks: 1 = Feprazon, 2 = innerer Standard, 3 = DA 3505 (Schreiberverstärkung gegenüber 1 und 2 verzehnfacht).

Fig. 4. Absorptions–Orts-Kurve eines Plasmaextrakts nach dünnenschichtchromatographischer Trennung. 1 = Plasmastandard mit 20 μ g Feprazon und 5 μ g DA 3505 pro ml Plasma, 2 = Leerplasma.

TLC. Die Lösungen werden mit dem Linomaten III auf reversed-phase-Platten aufgetragen.

Chromatographische Bedingungen: RP-8-Platten der Fa. Merck, 5 mm Bandbreite beim Auftragen; Methanol-Wasser (dest.)-Ameisensäure (80:20:2, v/v/v) als Fließmittel (TLC-Kammer gesättigt); 6 cm Laufstrecke; Detektion durch Absorptionsmessung in Remission bei 241 nm (Deuteriumlampe) bei einer Spaltgröße von 0.5×6 mm.

Fig. 4 zeigt die Absorptions-Orts-Kurve nach Chromatographie eines Plasmaextrakts.

Auswertung

Bei der HPLC-Bestimmung erfolgt die Auswertung bei Feprazon über die ausgedruckten Integratoreinheiten (Quotient Feprazon/innerem Standard); die nach einmaliger Feprazon-Applikation auftretenden sehr niedrigen Konzentrationen von DA 3505 werden graphisch über die Fläche unter der Kurve (Höhe mal Halbwertsbreite) ermittelt.

Nach TLC-Trennung werden die Feprazon-Konzentrationen und die Konzentrationen des Metaboliten ebenfalls über die Fläche unter der Kurve ermittelt. Für jede TLC-Platte wird eine Eichgerade mit mindestens zwei Plasmapstandards erstellt.

Präzision und Richtigkeit

Zur Untersuchung der Wiederfindung bei einmaliger "Mikrophasenextraktion" wurde die Plasmaphase ein zweites Mal mit dem Extraktionsmittel extrahiert. Ferner wurden auf die TLC-Platte methanolische Lösungen der Substanzen aufgetragen.

Die relativen Standardabweichungen und die Linearität der Eichgeraden wurden mit Plasmapstandardlösungen geprüft.

Bestimmung der Plasmaspiegel von Feprazon und DA 3505 nach einmaliger oraler Gabe von Feprazon durch quantitative TLC

Einem männlichen Probanden wurden 400 mg Feprazon oral appliziert. Über einen Zeitraum von 72 h wurden Blutproben entnommen. Die Plasma-gewinnung erfolgte durch Zentrifugation. Die Plasmaproben wurden bis zur Analyse bei -18°C gelagert. Die Plasmaspiegel von Feprazon und dessen Hydroxylierungsprodukt DA 3505 wurden dünnschichtchromatographisch nach der oben beschriebenen Methode bestimmt.

Vergleich der TLC- und der HPLC-Methode

Der Feprazon-Gehalt von Plasmaproben wurde jeweils dünnschichtchromatographisch und hochleistungsflüssigkeitschromatographisch bestimmt. In einem Koordinatensystem wurden die mit den beiden Methoden gefundenen Konzentrationen gegeneinander aufgetragen.

ERGEBNISSE

HPLC-Bestimmung

Bei Feprazon besteht Linearität zwischen dem ermittelten Quotienten und

den eingesetzten Konzentrationen in dem Bereich von 0–80 µg/ml Plasma. Die Eichgerade für Feprazon wurde mit fünf Plasmastandardlösungen der Konzentrationen 70, 50, 10, 5 und 1 µg/ml ermittelt. Die Gerade verläuft nahezu durch den Nullpunkt, der Korrelationskoeffizient (r) beträgt 0.999.

Da bei dem Feprazon-Metaboliten DA 3505 nur sehr niedrige Plasmaspiegel zu erwarten sind, wurde die Linearität der Eichgeraden bei dieser Substanz nur bis zu einem Höchstwert von 20 µg/ml Plasma nachgewiesen ($r = 0.98$). Die Nachweisgrenze aus Plasma liegt für Feprazon bei 0.1 µg/ml, für DA 3505 bei 0.2 µg/ml. Die Ergebnisse der Bestimmung der relativen Standardabweichung sind in Tabelle I aufgeführt.

TABELLE I

ANGABE DER RELATIVEN STANDARDABWEICHUNG ($n - 1$) BEI DER HPLC-BESTIMMUNG VON FEPRAZON UND DA 3505

	Konzentration (µg/ml)	n	Standardabweichung (%)
Feprazon	50	11	1.9
	10	12	2.8
	2	13	1.9
	0.8	7	3.0
DA 3505	10	10	3.5
	5	10	4.9
	1	8	6.9

Die Wiederfindungsraten bei einmaliger Extraktion betragen für Feprazon und DA 3505 89.9 bzw. 80.5%. (Durch eine zweite Extraktion lassen sich in der Plasmaphase noch 10.2% des eingesetzten Feprazon und 19.5% des Metaboliten nachweisen.) Der innere Standard verbleibt zu 98.2% in der organischen Oberphase.

TLC-Bestimmung

Die Flächen unter den Kurven sind den vorhandenen Substanzkonzentrationen direkt proportional; die Eichkurve verläuft im Bereich von 0–70 µg Feprazon/ml Plasma annähernd linear ($r = 0.999$).

Die mit der Extraktionsmethode (a) erzielten Wiederfindungsraten entsprechen den bei der HPLC-Bestimmung für die Mikrophasenextraktion ermittelten Werten. Bei Methode (b) beträgt die Wiederfindungsrate für beide Substanzen nahezu 100% (für Feprazon 99.2% und für DA 3505 98.6%).

Für Feprazon und DA 3505 liegt die Grenze der quantitativen Erfassung bei dieser Methode bei etwa 20 ng/Peak (entsprechend 0.45 µg/ml Plasma).

In Tabelle II sind die bei verschiedenen Substanzkonzentrationen gefundenen relativen Standardabweichungen aufgeführt.

Die gefundenen Plasmakonzentrationen sind in Fig. 5 halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Jeder Punkt ist ein Mittelwert von mindestens zwei getrennten Bestimmungen. Die beim Vergleich der beiden Methoden ermittelten Konzentrationen sind in Fig. 6 gegeneinander aufgetragen. Die gefundenen Werten sind alle um die theoretische Gerade ($y = x$) verteilt.

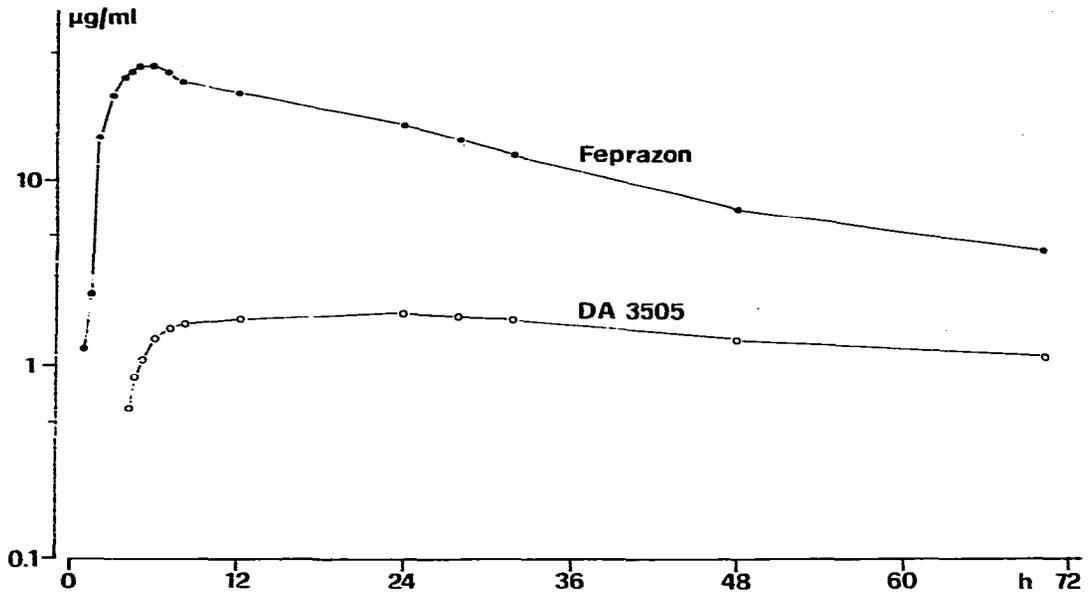


Fig. 5. Dünnschichtchromatographisch bestimmte Plasmaspiegel von Feprazon und DA 3505 nach einmaliger oraler Gabe von 400 mg Feprazon (semilogarithmische Auftragung).

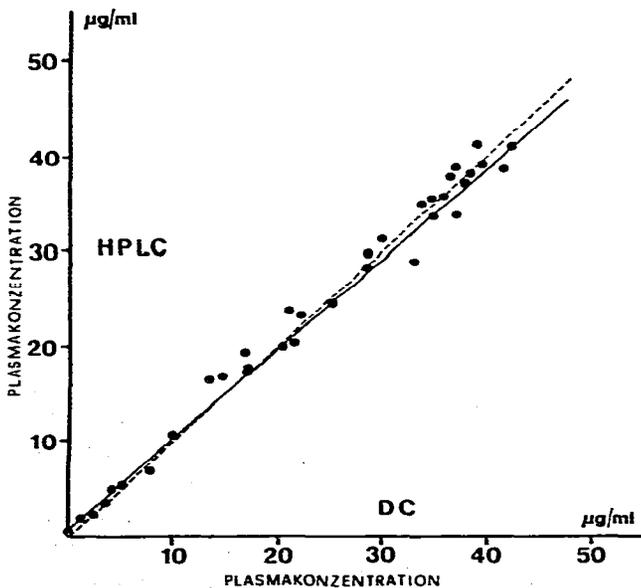


Fig. 6. Vergleich der HPLC- und der TLC-Methode bei der Bestimmung von Feprazon-Plasmaproben. Die durchgezogene Gerade stellt die ermittelte Regressionsgerade $y = 0.94x + 2.04$ dar; die gestrichelte Linie ist die theoretische Gerade $y = x$. Regressionsrechnung: $n = 35$; $r = 0.989$.

TABELLE II

RELATIVE STANDARDABWEICHUNG BEI DER TLC-BESTIMMUNG VON FEPRAZON UND DA 3505

Mikrophasenextraktion = Extraktionsmethode (a).

	Konzentration ($\mu\text{g/ml}$ Plasma)	<i>n</i>	Standardabweichung (%)
Feprazon	50	12	2.1
	25	12	1.9
	10	12	2.7
	5	12	3.1
	1	12	4.9
DA 3505	20	12	2.3
	10	12	3.1
	5	12	4.2
<i>Standardabweichung auf einer TLC-Platte</i>			
Feprazon	50	8	0.4
DA 3505	10	8	2.2

DISKUSSION

Die Empfindlichkeit und die Genauigkeit der beschriebenen Methoden ermöglichen eine schnelle und exakte Bestimmung des Feprazon-Gehalts von Plasmaproben auch bei einmaliger therapeutischer Dosierung. Werden Plasmaproben untersucht, bei denen höhere Konzentrationen zu erwarten sind (chronische Gabe), ist vor allem bei der Mikrophasenextraktion eine Verminderung des eingesetzten Plasmavolumens oder der Zusatz eines grösseren Volumens des Extraktionsmittels erforderlich. Die Vorteile der Mikrophasenextraktion liegen in der sehr schonenden Aufarbeitung, da das Eindampfen des Extrakts entfällt, sowie einem geringen Zeitaufwand bei der Aufarbeitung von Plasmaproben.

Da die Retentionszeit des Metaboliten verhältnismässig hoch ist, ergibt sich bei der HPLC-Trennung eine Verbreiterung des Peaks, die bewirkt, dass dieser in geringen Konzentrationen bei normaler Verstärkung kaum auf dem Registrierpapier zu erkennen ist und meist auch kein Integratorsignal mehr auslöst. Die Konzentration des Metaboliten in Plasmaproben kann aber graphisch (Höhe mal Halbwertsbreite) ermittelt werden, wenn der Schreiberausschlag ungefähr um das Zehnfache verstärkt wird. Da der Metabolit bei normaler Verstärkereinstellung keine nennenswerte Veränderung der Basislinie hervorruft, ist es möglich, den Feprazon-Gehalt von Plasmaproben rasch zu bestimmen; der Metabolit stört die Bestimmung nicht, sofern er nicht in ungewöhnlich hohen Konzentrationen auftritt. Auf diese Weise steht wegen der kurzen Retentionszeit von Feprazon und dem inneren Standard für Reihenuntersuchungen eine Methode zur Verfügung, bei der Feprazon-Gehaltsbestimmungen sehr schnell durchgeführt werden können. Der Möglichkeit der sehr schnellen Aufarbeitung durch Mikrophasenextraktion sowohl bei der HPLC-

als auch bei der TLC-Methode steht eine — verglichen mit der Extraktion mit einem grösseren Lösungsmittelvolumen — geringere Wiederfindungsrate gegenüber. Beide Extraktionsverfahren (a und b) und beide chromatographischen Verfahren liefern jedoch reproduzierbare Ergebnisse und sind für Routineanalysen einsetzbar.

ZUSAMMENFASSUNG

Es werden zwei für pharmakokinetische Untersuchungen geeignete Verfahren für die gleichzeitige Bestimmung von Feprazon und einem seiner Metaboliten (DA 3505) in Plasma beschrieben. Nach Extraktion aus angesäuertem Plasma werden Feprazon und DA 3505 nach dünn-schichtchromatographischer (RP-8-Platten; Methanol—Wasser—Ameisensäure) oder hochleistungsflüssigkeitschromatographischer Trennung (Kieselgel-Säule; Hexan—Tetrahydrofuran—Essigsäure) durch Messung der UV-Absorption bestimmt.

Die Nachweisgrenzen für Feprazon und DA 3505 liegen bei dem hochleistungsflüssigkeitschromatographischen Verfahren bei 0.1 bzw. 0.2 $\mu\text{g/ml}$ Plasma, bei der dünn-schichtchromatographischen Methode für beide Verbindungen bei etwa 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Plasma.

DANK

Der Dr. Robert-Pfleger-Stiftung danken wir für eine Sachbeihilfe.

LITERATUR

- 1 S. Casadio, G. Pala, E. Marazzi-Uberti, B. Lumachi, E. Crescenzi, A. Donetti, A. Mantegani und C. Bianchi, *Arzneim.-Forsch.*, 22 (1972) 171.
- 2 G. Pala, A. Mantegani, A. Donetti, B. Lumachi, E. Marazzi-Uberti und S. Casadio, *Arzneim.-Forsch.*, 22 (1972) 174.
- 3 C. Bianchi, B. Lumachi und E. Marazzi-Uberti, *Arzneim.-Forsch.*, 22 (1972) 183.
- 4 E. Marazzi-Uberti, C. Bianchi, M. Gaetani und L. Pozzi, *Arzneim.-Forsch.*, 22 (1972) 191.
- 5 V. von Bruchhausen, in F.D. Hart (Herausgeber), *Feprazone, New Biological and Chemical Aspects, Proceedings of the IX Eur. Congr. Rheumatol.*, Excerpta Medica, Amsterdam, 1980, S. 10—15.
- 6 H. Yamaguchi, J. Kubo, K. Sekine, T. Naruchi, Y. Hashimoto und R. Kato, *Drug Metab. Dispos.*, 7 (1979) 340.
- 7 V. von Bruchhausen und R. Geimer, *Pharmatherapeutika*, 2 (1979) 253.
- 8 N.J. Pound und R.W. Sears, *J. Pharm. Sci.*, 64 (1975) 284.
- 9 H. Spahn und E. Mutschler, *Arzneim.-Forsch.*, 31 (1981) 495.