

Journal of Chromatography, 275 (1983) 463–467

Biomedical Applications

Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 1690

Note

Fluorimetrische Bestimmung von Naproxen im Serum durch direkte quantitative Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie

U. KNIE

*Institut für Pharmazeutische Technologie der Universität Münster, Hittorfstr. 58–62,
D-4400 Münster (B.R.D.)*

(Eingegangen am 5. November 1982; geänderte Fassung eingegangen am 2. März 1983)

Naproxen [(+)-6-Methoxy- α -methyl-2-naphthalinessigsäure] wird auf Grund seiner antiphlogistischen und analgetischen Wirkung zur Behandlung von Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises eingesetzt [1, 2].

Die in der Literatur am häufigsten beschriebenen Methoden zur Bestimmung von Naproxen in biologischem Material basieren auf gaschromatographischen (GC) oder hochleistungsflüssigkeitschromatographischen (HPLC) Verfahren [3–19]. Die hier beschriebene Bestimmungsmethode beruht auf der Beobachtung, dass Naproxen nach der dünnschichtchromatographischen Trennung durch Bestrahlen mit UV-Licht auf der Hochleistungs-dünnschichtchromatographie (HPTLC) Platte ein blau fluoreszierendes Photoprodukt bildet, das dann fluorimetrisch gemessen wird.

METHODEN

Geräte

Die Probenauftragung wurde mit dem Linomat III (Camag, Berlin, B.R.D.) durchgeführt. Die Entwicklung der HPTLC-Platten erfolgte in Camag Doppeltrog Kammern. Die Bestrahlung der HPTLC-Platten mit UV-Licht (254 nm) erfolgte im Fluotest Universal (Original Hanau, Hanau, B.R.D.). Die fluorimetrische Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit einem Camag TLC-Scanner mit angeschlossenen Varian CDS 111 A Integrator (Varian, Darmstadt, B.R.D.) und W+W Recorder 1100 (W+W Electronic AG, Basel-Münchenstein, Schweiz).

Chemikalien und Materialien

Naproxen wurde freundlicherweise von der Fa. Syntex (Palo Alto, CA, U.S.A.) zur Verfügung gestellt. Die TLC Trennung erfolgte auf HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 o.F. 10 × 20 cm (Merck, Darmstadt, B.R.D.). Alle anderen verwendeten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad p.a.

Aufarbeitung der Serumproben

In einem verschliessbaren Zentrifugenglas wurden 0.1 ml Serum mit 1.0 ml Methanol versetzt und 2 min gründlich gemischt (Vortex-Genie). Anschliessend wurde 5 min lang zentrifugiert, um das gefällte Eiweiss abzutrennen. Vom Überstand wurden 20 μ l mit dem Linomaten auf die HPTLC-Platte aufgetragen.

Test- und Standardseren

Zur Ermittlung von Eichkurven, Wiederfindungsrate und Reproduzierbarkeit sowie zur quantitativen Bestimmung von Serumproben mit unbekanntem Naproxengehalt wurden Test- und Standardseren mit bekanntem Gehalt an Naproxen hergestellt.

Hierzu wurden entsprechende Volumina einer Stammlösung von Naproxen in Ethylacetat (10 mg/100 ml) bei Raumtemperatur durch Einleiten von Stickstoff zur Trockene eingengt und der Rückstand in 1.0 ml gepooltem Human-Serum aufgenommen.

Chromatographie der HPTLC-Platten

Die Probenauftragung erfolgte strichförmig (5 mm) bei einem Abstand von 15 mm der äusseren Proben vom Plattenrand und einem Abstand der Proben von 6 mm untereinander. Der Abstand der Startlinie vom unteren Plattenrand betrug 15 mm. Jede Probe bzw. jeder Standard wurde zweimal pro Platte nach der Data Pair Methode [20] aufgetragen. Die Entwicklung der Platten erfolgte mit dem Fliessmittel Chloroform-Methanol-Ameisensäure (95:7:7, v/v) (Kammersättigung) bei einer Trennstrecke von 5 cm ($R_F = 0.45$); Entwicklungszeit ca. 8 min. Hierbei wird Naproxen auch von seinem Metaboliten 6-Desmethyl-naproxen ($R_F 0.37$) abgetrennt. Nach sorgfältigem Trocknen der Platten im Warmluftstrom wurden sie 1.5 h mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt. Nach dieser Zeit hat die Fluoreszenzintensität ihren höchsten Wert erreicht und bleibt mindestens 120 min stabil. Das bei der UV-Bestrahlung entstehende blau fluoreszierende Hauptprodukt (Fig. 1) konnte auf Grund seiner UV-, IR-, MS- und $^1\text{H-NMR}$ -Spektren als das 6-Methoxy-2-acetonaphthon identifiziert werden.

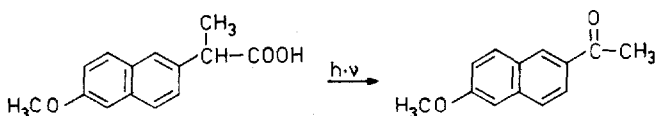


Fig. 1. Photoreaktion (Hauptprodukt) von Naproxen auf HPTLC-Kieselgel 60 Platten ($\lambda = 254$ nm).

Fluoreszenzmessung

Die in-situ quantitative Auswertung der Chromatogramme erfolgte bei λ_{ex} 313 nm, 30 nm Bandbreite und einer Spaltbreite von 6 mm × 0.3 mm. Als

Sekundärfilter diente der Kantenfilter 400 nm. Die Scan-Geschwindigkeit betrug 0.5 mm/sec, die Photomultiplierempfindlichkeit Sens 10. Die Fluoreszenz—Ortskurven wurden vom Schreiber bei einem Papiervorschub von 3 cm/min aufgezeichnet. Jeder Fleck wurde dreimal gemessen und der Mittelwert der Integratorwerte gebildet.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Eichgeraden, die bei der Bestimmung von Serumproben mit bekanntem Gehalt an Naproxen erhalten wurden, zeigten für den Bereich von 5–80 μg Naproxen pro ml Serum eine lineare Beziehung zwischen der Peakfläche und der Serumkonzentration (Korrelationskoeffizient $r \geq 0.999$). Da die Eichgerade durch den Nullpunkt geht, reicht eine Standardkonzentration bei der Bestimmung der unbekanntenen Serumproben aus.

Testseren mit 10, 20, 40 und 60 μg Naproxen pro ml Serum dienten zur Bestimmung der Wiederfindungsrate und Präzision. Jede Serumkonzentration wurde achtmal an einem Tag bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengefasst. Die Untersuchung derselben Serumprobe mit einem Gehalt von 50 μg Naproxen pro ml Serum gegen einen Standard derselben Konzentration an fünf verschiedenen Tagen ergab einen Mittelwert von 50.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Serum und eine relative Standardabweichung von 2.0%.

Bei den Werten der Tabelle I wurde die Volumenverringerung durch ausgefälltes Eiweiss und die Volumenkontraktion bei der Zugabe von Methanol zum Serum bei der Berechnung der Wiederfindungsrate berücksichtigt. Diese Volumenänderung brauchte bei den eigentlichen pharmakokinetischen Untersuchungen nicht berücksichtigt zu werden, da bei diesen Messungen für jeden Probanden aus dessen Leerserum ein eigener Standard (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Serum) hergestellt wurde. Die Verwendung von probandeneigenem Serum zur Herstellung des Standards hat im Vergleich zu gepooltem Serum den Vorteil, dass individuelle Schwankungen im Proteingehalt des Serums das Ergebnis nicht beeinflussen.

TABELLE I

WIEDERFINDUNG UND REPRODUZIERBARKEIT

Zugesetzte Menge Naproxen pro ml Serum ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Anzahl der Bestimmungen	Wiedergefundene Menge		
		%	$\mu\text{g}/\text{ml}$	S_{rel} (%) [*]
10	8	99.6 \pm 3.2	9.96 \pm 0.32	3.2
20	8	99.4 \pm 2.3	19.88 \pm 0.46	2.3
40	8	95.2 \pm 2.8	38.07 \pm 1.12	2.9
60	8	93.0 \pm 1.0	55.77 \pm 0.60	1.1

* S_{rel} = relative Standardabweichung.

Fig. 2 zeigt die Fluoreszenz—Ortskurve einer Serumprobe mit Naproxen (b) und des entsprechenden Leerserums (a). Die Serumprobe stammt von einem Probanden zur Zeit des maximalen Serumspiegels nach der Applikation

eines Suppositoriums mit 500 mg Naproxen und entspricht einer Serumkonzentration von $56.6 \mu\text{g/ml}$. Es sind keine störenden Begleitfluoreszenzen beim Leerserum zu erkennen.

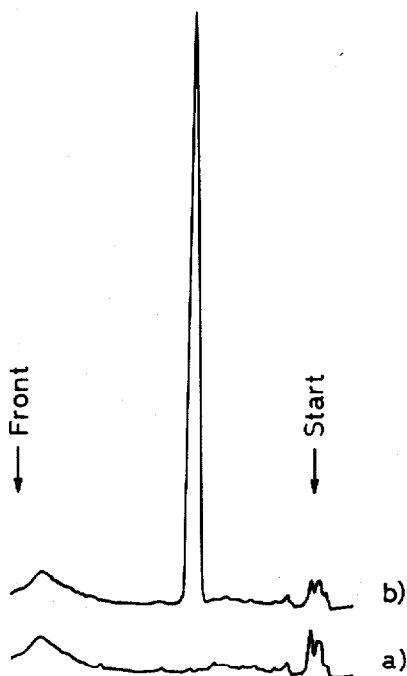


Fig. 2. Fluoreszenzintensitäts-Ortskurven der Chromatogramme eines Leerserums (a) und eines naproxenhaltigen Serums (b). Die Serumprobe (a) wurde einem Probanden vor der Applikation eines 500-mg Naproxen-Suppositoriums, die Probe (b) zur Zeit des max. Serumspiegels ($\approx 56.6 \mu\text{g/ml}$) entnommen.

Die Vorteile der hier beschriebenen Methode zur Bestimmung von Naproxen im Serum liegen einmal in der geringen benötigten Probenmenge (0.1 ml Serum) und der hohen Empfindlichkeit fluorimetrischer Messungen. Die Nachweisgrenze liegt unter $1 \mu\text{g/ml}$ Serum (2 ng pro Fleck), die Erfassungsgrenze liegt bei ca. $1\text{--}2 \mu\text{g}$ Naproxen pro ml Serum. Mit dieser Methode gelang es erstmals, Naproxen im Serum mit genügender Empfindlichkeit fluorimetrisch durch in-situ quantitative TLC zu bestimmen. Zum anderen ist das Analysenverfahren gering im Arbeitsaufwand und gut reproduzierbar.

Gegenüber den HPLC- und GC-Verfahren liegt der Vorteil der beschriebenen Methode darin, dass sie durch die Kombination von chromatographischer Trennung und anschließender Bildung eines fluoreszierenden Photoproduktes sehr spezifisch ist. Ausserdem entfallen arbeitsaufwendige Extraktions- und Derivatisierungsschritte, die bei den GC-Verfahren in jedem Fall und bei den HPLC-Verfahren zumindest teilweise nötig sind.

Im Rahmen biopharmazeutischer Untersuchungen zur Absorption von Naproxen aus Suppositorien wurde die hier beschriebene Methode mit Erfolg zur Bestimmung von Naproxen im Serum eingesetzt [21].

LITERATUR

- 1 R.N. Brogden, R.C. Heel, T.M. Speight und G.S. Avery, *Drugs*, 18 (1979) 241.
- 2 G. Katona, *Arzneim.-Forsch.*, 25 (1975) 327.
- 3 R.A. Runkel, K.S. Kraft, G. Boost, H. Sevelius, E. Forchielli, R. Hill, R. Magoun, J.B. Szakacs und E. Segre, *Chem. Pharm. Bull.*, 20 (1972) 1457.
- 4 J.P. Desager, M. Vanderbist und M.D. Harvengt, *J. Clin. Pharmacol.*, 16 (1976) 189.
- 5 S.H. Wan und S.B. Matin, *J. Chromatogr.*, 170 (1979) 473.
- 6 B. Amos, L. Marple, J. Smithers und S.B. Matin, *J. Chromatogr.*, 206 (1981) 151.
- 7 M. Broquaire, V. Rovei und R. Braithwaite, *J. Chromatogr.*, 224 (1981) 43.
- 8 W.O.A. Thomas, T.M. Jefferies und R.T. Parfitt, *J. Pharm. Pharmacol.*, 31 (1979) Suppl. 91 P.
- 9 R.A. Upton, J.N. Buskin, T.W. Guentert, R.L. Williams und S. Riegelman, *J. Chromatogr.*, 190 (1980) 119.
- 10 F. Nielsen-Kudsk, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 47 (1980) 267.
- 11 L.J. Dusci und L.P. Hackett, *J. Chromatogr.*, 172 (1979) 516.
- 12 W.O.A. Thomas, T.M. Jefferies und R.T. Parfitt, *J. Pharm. Pharmacol.*, 30 (1978) Suppl. 66 P.
- 13 D. Westerlund und A. Theodorsen, *J. Chromatogr.*, 144 (1977) 27.
- 14 K.-G. Wahlund, *J. Chromatogr.*, 218 (1981) 671.
- 15 R.F. Burgoyne und P.R. Brown, *J. Liquid Chromatogr.*, 3 (1980) 101.
- 16 D. Westerlund, A. Theodorsen und Y. Jaksch, *J. Liquid Chromatogr.*, 2 (1979) 969.
- 17 J.K. Baker und E.K. Fifer, *J. Pharm. Sci.*, 69 (1980) 590.
- 18 J.T. Slattery und G. Levy, *Clin. Biochem.*, 12 (1979) 100.
- 19 J. Goto, N. Goto und T. Nambara, *J. Chromatogr.*, 239 (1982) 559.
- 20 H. Bethke, W. Santi und R.W. Frei, *J. Chromatogr. Sci.*, 12 (1974) 392.
- 21 Th. Eckert, U. Knie, N. van Husen und W. Heers, *Pharm. Ind.*, 44 (1982) 927.