

2.2. 4-n-Pentylamino-1,2-anthracinon (6b)

Ausbeute: 1050 mg (45%) orange Kristalle vom Schmp. 237 °C. DC (CH₂Cl₂/CH₃OH (10 + 1)): R_f = 0,76. MS (70 eV) m/z (rel. Int.): 293 (M⁺, 59), 250 (42), 236 (79), 222 (37), 152 (100). IR (KBr, cm⁻¹): 3250, 1680, 1625, 1600, 1550. ¹H-NMR (CDCl₃, δ, ppm): 0,92 (t, ³J = 7,0 Hz, 3 H, N-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃); 1,35-1,40 (m, 4 H, N-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃); 1,70-1,75 (m, 2 H, N-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃); 3,38-3,43 (m, 2 H, N-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃); 5,82 (s, 1 H, 3-H); 7,71 (dd, ³J = 7,0 Hz, ⁴J = 1,5 Hz, 1 H, 6 oder 7-H); 7,76 (dd, ³J = 7,0 Hz, ⁴J = 1,5 Hz, 1 H, 6 oder 7-H); 8,01 (d, ³J = 8,0 Hz, 1 H, 5 oder 8-H); 8,20 (d, ³J = 8,0 Hz, 1 H, 5 oder 8-H); 8,44 (t, ⁴J = 0,35 Hz, 1 H, NH); 8,62 (s, 1 H, 9 oder 10-H); 8,68 (s, 1 H, 9 oder 10-H). UV/Vis (CH₂Cl₂, nm): λ_{max} (log ε) = 308 (4,33), 407 (3,66). C₁₉H₁₉NO₂ (293,4)

2.3. 4-[4-(Methylamino)phenyl]-1,2-anthracinon (9)

Ausbeute: 250 mg (10%) rote Kristalle vom Schmp. 118 °C. DC (CH₂Cl₂/CH₃OH (10 + 1)): R_f = 0,91. MS (70 eV) m/z (rel. Int.): 313 (M⁺, 30), 285 (100), 256 (8), 215 (10). IR (KBr, cm⁻¹): 3350, 1690, 1645, 1600, 1570. ¹H-NMR (CDCl₃, δ, ppm): 2,97 (s, 3 H, CH₃); 4,15 (bs, 1 H, NH); 6,54 (s, 1 H, 3-H); 6,75 (d, ³J = 8,5 Hz, 2 H, 3' und 5'-H); 7,42 (d, ³J = 8,5 Hz, 2 H, 2' und 6'-H); 7,61-7,63 (m, 2 H, 6 und 7-H); 7,80 (d, ³J = 6,7 Hz, 1 H, 5 oder 8-H); 7,92 (s, 1 H, 9 oder 10-H); 8,00 (d, ³J = 8,8 Hz, 1 H, 5 oder 8-H); 8,76 (s, 1 H, 9 oder 10-H). UV/Vis (CH₂Cl₂, nm): λ_{max} (log ε) = 299 (4,36), 451 (3,80). C₂₁H₁₅NO₂, (313,4).

2.4. 4-N-Methyl-phenylamino-1,2-anthracinon (10)

Ausbeute: 1000 mg (40%) orange Kristalle vom Schmp. 234 °C. DC (CH₂Cl₂/CH₃OH (10 + 1)): R_f = 0,85. MS (70 eV) m/z (rel. Int.): 313 (M⁺, 6), 254 (8), 207 (34), 196 (10), 166 (12), 149 (19), 139 (15), 131 (11), 120 (18), 107 (23), 84 (37), 77 (37), 43 (100). IR (KBr, cm⁻¹): 3060, 1690, 1630, 1590, 1570. ¹H-NMR (CDCl₃, δ, ppm): 3,56 (s, 3 H, CH₃); 6,41 (s, 1 H, 3-H); 7,20-7,25 (m, 3 H, arom.); 7,33-7,37 (m, 3 H, arom.); 7,46-7,54 (m, 3 H, arom.); 7,90 (d, ³J = 8,0 Hz, 1 H, 5 oder 8-H); 8,62 (ss, 1 H, 9 oder 10-H). UV/Vis (CH₂Cl₂, nm): λ_{max} (log ε) = 297 (4,47), 433 (4,00). C₂₁H₁₅NO₂ (313,4)

Literatur

- 1 Roth, H. J.; Eger, K.; Troschütz, R.: *Arzneistoffanalyse*, 3. Aufl., S. 333, Stuttgart 1990
- 2 Hartke, K.; Lohmann, U.: *Dtsch. Apoth. Ztg.* **123**, 1013 (1983)
- 3 Fieser, L. F.: *J. Am. Chem. Soc.* **50**, 465 (1928)
- 4 Teuber, H. J.; Staiger, G.: *Chem. Ber.* **87**, 1251 (1954)
- 5 Kallmayer, H.-J.; Bock, U.: *Pharmazie* **53**, 535 (1998)
- 6 Hartmann, H.; Fabian, J.: *Light Absorption of Organic Colorants*, 1. Aufl. S. 89, Berlin 1980
- 7 Kallmayer, H.-J.; Bock, U.: *Pharmazie* **53**, 307 (1998)

Eingegangen am 2. Oktober 1998
Angenommen am 25. November 1998

Prof. Dr. Hans-Jörg Kallmayer
Postfach 1150
D-66041 Saarbrücken

Laboratoire de Pharmacochimie des Produits Naturels et Analogues
Structuraux, Faculté de Pharmacie, Tours, France

Separation of flavonoids, coumarins and anthocyanins in plant extracts by Overpressured Layer Chromatography

N. GALAND, J. POTHIER, V. MASON and C. VIEL

Flavonoids, coumarins and anthocyanins embrace a wide range of plant substances which possess pharmacological activity [1]. In this paper we report the analysis of these compounds with Overpressured Layer Chromatography (OPLC) [2].

There are relatively few publications about flavonoids OPLC and the eluent composition for glycosides separation is complex [3, 4]. In previous studies on alkaloids and ammonium quaternary salts we have obtained good results with EtOAc [5, 6]. For flavonoids this solvent was too polar for an efficient separation. We have reduced the polarity by adding CHCl₃. The best eluent was EtOAc/CHCl₃ (60 + 40 v/v). This method was applied to different medicinal plant extracts (Table). The chromatography was realized on the corresponding aglycones, obtained from extracts by acidic hydrolysis and characterised by comparison with hRf of authentic samples. Fig. 1a reports the densitogram from orange flower (*Citrus aurantium* var. *amara*).

For furanochromones, the best results are obtained with EtOAc/CHCl₃ (90 + 10 v/v). Fig. 1b reports the densitogram of the chromatography from *Ammi visnaga*.

About relationships between structure and hRf of flavonoid derivatives we note that the presence of a C = C (flavone) or C = C - OH (flavonol) arrangement increases the polarity of the molecule; for example apigenin and kaempferol have hRf values lower than naringenin. The same conclusion is valid when a phenol or methoxy group is present as substituent; for example the hRf of quercetin is lower than that of kaempferol, also luteolin or diosmetin than apigenin.

Concerning the flavone - isoflavone skeleton, the last type is a little less polar than the first, this is related to a lower conjugation in the molecule. The same constataions formulated for flavonoid derivatives about the increase in polarity with supplementary phenolic or methoxy group is valid for the furanochromone series (khellin and visnagin).

Several authors have separated coumarins, and furanocoumarin aglycones or glycosides by OPLC [4, 7,8] using complex eluents, two dimensional overpressured layer chromatography, or by circular OPLC.

We report here the results concerning coumarin algycones present in medicinal plants (Table). For simple coumarins and furanocoumarins, EtOAc as mobile phase is too polar and the eluent polarity has been reduced by adding CHCl₃, and so we have used EtOAc/CHCl₃ (60 + 40 v/v) (Table).

For some of these compounds, e.g. bergapten, methoxsalen and psoralen, the hRf differences are weak, in relation with structure analogies. However the fluorescence at 365 nm shows differences in the coloration for psoralen, bergapten and methoxsalen. For the two last compounds the similarity in fluorescence is in relation to structural isomerism. Fig. 1c shows the densitogram of *Aesculus hippocastanum*.

Concerning relationships between hRf and structure, the presence of a furanic cycle in 6, 7 or 7, 8 position does

SHORT COMMUNICATIONS

Table: Studied compounds and plants

Compounds	hRf	Fluorescence 365 nm or * color in visible	Plants
Flavonoids			
Chalcone	98	brown-red	
Flavone	87	red	
Flavanone	85	blue	
Flavones			
Apigenin	56	blue	<i>Crataegus monogyna</i>
Diosmetin	52	orange	<i>Barosma betulina</i>
Luteolin	15	brown-orange	<i>Citrus aurantium</i>
Myricetin	7	yellow-brown	<i>Tilia cordata</i>
Flavonols			
Kaempferol	56	lemon yellow	<i>Ginkgo biloba, Tilia cordata</i>
Quercetin	48	yellow-brown	<i>Crataegus monogyna, Ginkgo biloba, Sophora japonica, Tilia cordata</i>
Rhamnetin	9	yellow	
Flavanones			
Eriodictyol	44	yellow	<i>Citrus aurantium</i>
Hesperetin	69	white	<i>Citrus aurantium</i>
Naringenin	74	pale yellow	<i>Citrus aurantium</i>
Isoflavones			
Genistein	69	blue	
Furanochromones			
Khellin	50	brown-orange	<i>Ammi visnaga</i>
Visnagin	95	blue-violet	<i>Ammi visnaga</i>
Coumarins			
Simple coumarins			
Coumarin	86	—	<i>Dipteryx odorata</i> <i>Melilotus officinalis</i>
Aesculetin	40	pale yellow	<i>Aesculus hippocastanum</i>
Scopoletin	51	pale blue	<i>Aesculus hippocastanum, Anthemis nobilis, Ruta graveolens</i>
Umbelliferone	68	pale blue	<i>Angelica archangelica, Hieracium pilosella, Matricaria chamomilla, Ruta graveolens</i>
6,7-Furanocoumarins			
Bergapten	85	yellow	<i>Ruta graveolens</i>
Methoxsalen (Xanthotoxin)	87	yellow	<i>Ruta graveolens</i>
Psoralen	82	blue-violet	<i>Ruta graveolens</i>
7,8-Furanocoumarins			
Angelicin	95	white	<i>Angelica archangelica</i>
Anthocyanins			
Cyanidin	39	purple*	<i>Centaurea cyanus, Papaver rhoeas, Ribes nigrum, Vaccinium myrtillus, Vitis vinifera</i>
Delphinidin	28	blue*	<i>Hibiscus sabdariffa, Ribes nigrum, Vaccinium myrtillus</i>
Malvidin	34	mauve*	<i>Malva sylvestris, Vaccinium myrtillus</i>

not influence the molecule polarity; for example, compare hRf of coumarin, psoralen and angelicin. As in the flavonoid series, the presence of a phenolic or a methoxy group in the homocycle slightly increases the polarity if only one group is present on 6,7-furanocoumarin compounds, more strongly in simple coumarins.

Acidic hydrolysis of anthocyanines gives the corresponding free flavylum salt [1], the separation of which was difficult but could be realized by adding MeEtCO to EtOAc to increase polarity and HCOOH and HCl 2M to stabilize the colour of these compounds. The eluent used was EtOAc/MeEtCO/HCOOH/HCl 2M (65 + 10 + 6 + 9 v/v). Anthocyanins can be recognized by their colours visual on chro-

matograms (Table). It is important to visualize the chromatogram immediately because the colours of the spots fade fairly rapidly after separation. The densitogram of *Malva sylvestris* is shown as an example (Fig. 1d).

About relationships between structure and hRf we note as in the flavonoid and coumarin series that a supplementary OH or OCH₃ in the phenyl group substituted on position 2 of the flavylum structure increases the polarity: delphinidin and malvidin compared to cyanidin.

In conclusion, to separate phenolic compounds, it is necessary to employ binary or more complex eluents while in the case of alkaloids a good separation can be obtained with a single solvent. However, OPLC is an interesting

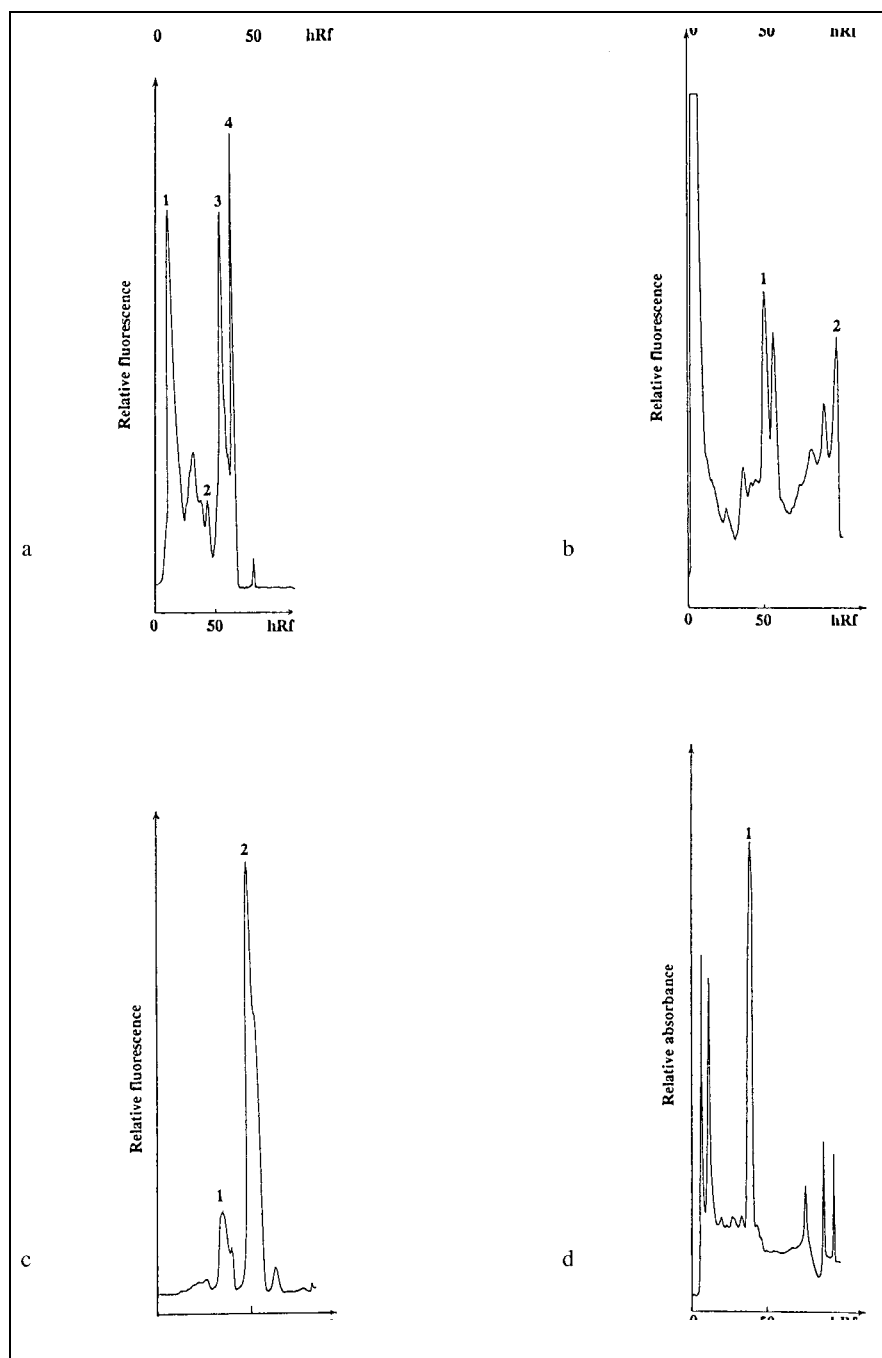


Fig: Densitograms obtained from different plant extracts; a: *Citrus aurantium* extract: 1) luteolin, 2) eriodictyol, 3) hesperetin, 4) naringenin (lamp Hg, 365 nm, slit 1.4 mm); b: *Ammi visnaga* extract: 1) khellin, 2) visnagin (lamp Hg, 365 nm, slit 0.6 mm); c: *Aesculus hippocastanum* (bark) extract: 1) aesculetin, 2) scopoletin (lamp Hg, 365 nm, slit 0.4 mm); d: *Malva sylvestris* extract: 1) malvidol (lamp Hg, 530 nm, slit 1.4 mm)

method to separate compounds from plant extracts like polyphenols and a transfer to semi-preparative mode can be envisaged.

Experimental

1. Plant material and standards

Powdered plant material (5 g) was mixed thoroughly with 50 ml MeOH by shaking for about 4 h. After filtration and evaporation at reduced pressure, the dry residue was hydrolysed with HCl 2M during 1 h at 100 °C [9]. The cooled solution was extracted with 3 × 50 ml EtOAc, and dried over anhydrous Na_2SO_4 . Then the solvent was evaporated to dryness at reduced pressure and the residue was taken up with 1 ml of MeOH.

All authentic samples studied were commercially pure products obtained from Extrasynthèse, Lyon, France; solutions were prepared at a concentration of 1 mg/ml in MeOH and stored at 4 °C

2. Apparatus and preparation of OPLC plates

OPLC was performed with a Chrompres 25 (OPLC – NIT Engineering Company, Budapest, Hungary) using 20 × 20 cm Kieselgel 60 F₂₅₄ glass

TLC plates (Merck Art. 5715). Three sides of the plates were impregnated with Impress polymer suspension No. II. A Linomat IV (Camag, Muttenz, Switzerland) was used to apply samples on plates. Densitograms were recorded with a Camag Model 76510 TLC/HPTLC scanner (365 nm for flavonoids, furanochromones and coumarins, and 530 nm for anthocyanins).

3. Analytical conditions

All solvents and reagents were of analytical grade Merck (Darmstadt, Germany). Before use, solvents were filtered through a 0.45 µm Millipore® membrane after sonication. Three mobile phases are employed: (1) EtOAc/CHCl₃ (60 + 40 v/v) for flavonoids and coumarins (2) EtOAc/CHCl₃ (90 + 10 v/v) for furanochromones and (3) EtOAc/MeEtCO/HCOOH/HCl 2M (65 + 10 + 6 + 9 v/v) in the case of anthocyanins.

During chromatography, the external pressure of the water cushion was 16 bar. The starting mobile phase pressure was 20 bar and plates were developed on a distance of 17 cm with a mobile phase flow rate of 0.40 ml/min. The development time was included between 12 and 25 min depending on the eluent.

The separations were checked: (1) by visual observation under UV illumination ($\lambda = 365$ nm) for coumarins, furanochromones and (2) spraying with 1% methanolic diphenylboric acid β -ethylamino ester, followed by

5 p.100 ethanolic polyethyleneglycol 400 (NP/PEG reagent [10]) then observation at $\lambda = 365$ nm for flavonoids, and (3) by direct visual observation without reagent treatment for anthocyanins.

References

- 1 Bruneton, J.: Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants, Technique et Documentation – Lavoisier, Paris 1995
- 2 Tyihák, E.; Mincsovics, E.: J. Planar Chromatogr. **4**, 288 (1991)
- 3 Dallenbach-Tölke, K.; Sticher, O.: J. Planar Chromatogr. **1**, 73 (1988)
- 4 Dugo, P.; Mondello, L.; Lamonica, G.; Dugo, G.: J. Planar Chromatogr. **9**, 120 (1996)
- 5 Pothier, J.; Galand, N.; Viel, C.: J. Planar Chromatogr. **4**, 392 (1991)
- 6 Pothier, J.; Galand, N.; Tivollier, P.; Viel, C.: J. Planar Chromatogr. **3**, 220 (1993)
- 7 Zogg, G.; Nyiredy, S.; Sticher, O.: J. Liquid Chrom. **10**, 3605 (1987)
- 8 Vuorela, P.; Rahko, E.-L.; Hiltunen, R.; Vaorela, H.: J. Chromatogr. **670**, 191 (1994)
- 9 Harborne, J. B.: Phytochemical Methods, 1. Ed., p. 69, Chapman and Hall, London, 1973
- 10 Wagner, H.; Bladt, S.: Plant Drug Analysis, 2. Ed., p. 362, Springer, Berlin, 1996

Received November 24, 1998
Accepted January 27, 1999

Prof. Dr. Claude Viel
Faculté des Sciences Pharmaceutiques
Université de Tours
31 avenue Monge
37200 Tours
France

Institut für Pharmazeutische Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, Germany

Enzymimmunoassay zur Bestimmung des Antidepressivums Fluoxetin

S. KRAICZEK und B. UNTERHALT

Der selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Fluoxetin (**1**) wird seit einigen Jahren als Racemat zur Therapie depressiver Erkrankungen eingesetzt. Die analytische Bestimmung beispielsweise in Handelspräparaten (Fluctin[®]) sowie im Blutplasma erfolgt derzeit durch GC [1–3] und HPLC [4–7]. Als alternative Methode bietet sich ein Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) an, der im Rahmen des Projekts „Immunchemische Methoden in der Wirkstoffanalytik“ entwickelt werden sollte.

Zum Aufbau dieses ELISA wurde **1** mit Bernsteinsäureanhydrid zum *N*-(3-Oxycarbonylpropionyl)fluoxetin (**2a**) umgesetzt, dessen Konjugat mit Rinderserumalbumin (**2b**) zur Immunisierung weißer männlicher Neuseelandkaninchen verwendet und die polyklonalen Antiseren gewonnen. Die γ -Globulinfraktionen einiger Entnahmen erbrachten keine höhere Empfindlichkeit des ELISA als die Antiseren selbst.

Als Marker diente an *N*-(2-Oxycarbonyl)fluoxetin (**3a**) angebundene Meerrettich-Peroxidase (**3b**) – der Spacer wurde bewußt verändert –, die Enzym-Substrat-Reaktion erfolgte mit Tetramethylbenzidin (TMB)/Wasserstoffperoxid (Tabelle).

Im Rahmen der Validierung wurden Präzision, Sensitivität, Spezifität und Richtigkeit überprüft. Intraserielle bzw.

Tabelle: Pipettierschema für den Fluoxetin-ELISA

- ◆ Coating: **2b**-As, (100,0 mg/l), 100 μ l, 20 h, 20 °C;
Coatingpuffer: 0,05 M Carbonatpuffer pH 9,6
- ◆ 4 \times Waschen mit je 200 μ l TPBS
- ◆ Inkubation: 50 μ l 1-HCl-Standards, 15 min, 20 °C
- ◆ Inkubation: POD-Konjugat (**3b**) 30:1 (1:31,25), 50 μ l, 120 min, 20 °C
- ◆ 4 \times Waschen mit je 200 μ l TPBS
- ◆ Substratinkubation: TMB/H₂O₂, 95 μ l, 1 h, 20 °C
- ◆ Abstoppen: 2 M H₂SO₄, 50 μ l, 5 min

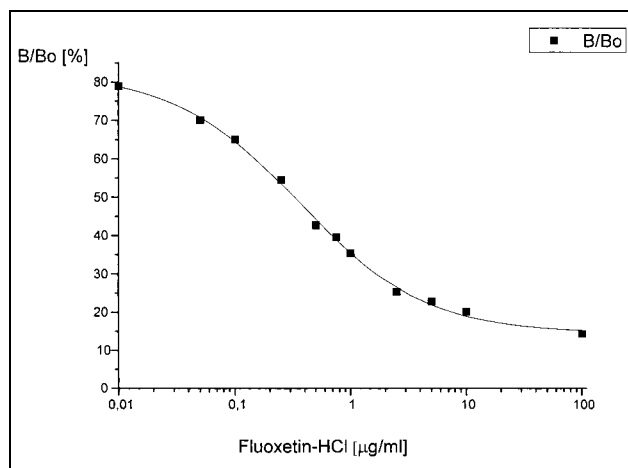
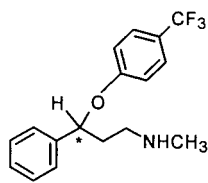
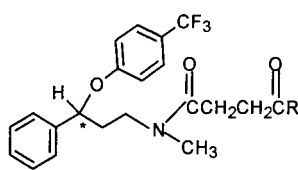
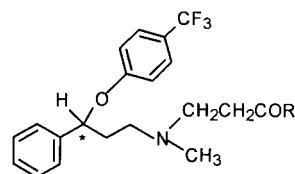


Abb.: Kalibrationskurve für den Fluoxetin-ELISA (logistische 4-Parameter-Anpassung)

**1****2****a:** R = OH**b:** R = NH-BSA**3****a:** R = OH**b:** R = NH-POD

interserielle Präzisionswerte lagen bei 4,6–6,7% bzw. 3,4–9,9%, die Bestimmungsgrenze errechnet sich zu 5 ng/ml (Abb.). Erste Untersuchungen an klinischen Serum- und Urinproben unterstreichen Qualität und Einsatzfähigkeit des neuen Fluoxetin-ELISA in der Routineanalytik [8–10].

Experimenteller Teil

Allgemeine Angaben sind der Literatur [11] zu entnehmen. Die Ergebnisse der Elementaranalysen lagen in akzeptablen Grenzen.

1. N-(3-Oxycarbonylpropionyl)fluoxetin (2a)

140 mg (1,4 mmol) Bernsteinsäureanhydrid werden zu einer Lösung von 0,5 g (1,6 mmol) **1** in 50 ml EtOH und 4,0 g (40 mmol) Et₃N gegeben. Man rührt 48 h lang bei RT, engt ein und erhält ein hellgelbes Öl. Dieses wird in 40 ml 1 M NaOH gelöst, dreimal mit je 15 ml Et₂O gewaschen und der pH-Wert mit 1 M HCl auf 6,5 eingestellt. Man läßt über Nacht im Kühlschrank stehen, saugt die Kristalle ab, wäscht mit dest. H₂O, trocknet und kristallisiert aus absol. EtOH um. Ausbeute: 82%, Schmp. 115 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ (ppm) = 2,2 (m_c, 2H, CH₂CH₂N); 2,6 (m, 4H, COCH₂CH₂COOH); 3,0 (d, 3H, NCH₃, Rotationsbehinderung); 3,6 (m_c, 2H, CH₂N); 5,2 (m_c, 1H, CH); 6,85 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-2'/6'); 7,25–7,35 (m, 5H, C₆H₅); 7,38 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-3'/5'). C₂₁H₂₂F₃NO₄ (409,4)

2. N-(2-Oxycarbonylpropionyl)fluoxetin (3a)

Zu einer Lösung von 0,8 g (2,6 mmol) **1** und 4,0 g (40 mmol) Et₃N in 30 ml MeOH gibt man 0,23 g (2,68 mmol) Acrylsäuremethylester hinzu. Die Mischung wird 48 h lang bei 65 °C zum Rückfluß erhitzt. Nach dem Einengen löst man in 2,4 ml 0,1 M HCl, verdünnt mit dest. H₂O auf 40 ml und erhält nach der Zugabe von 6,0 ml 1 M NaOH eine milchige Fällung. Diese wird durch kontinuierliches schnelles Rühren bei gelindem Erhitzen zum Rückfluß in Suspension gehalten. Nach etwa 75 min läßt man auf RT abkühlen, wäscht dreimal mit je 20 ml Et₂O und stellt mit 1 M HCl auf pH 6,5 ein. Nach 20 h Stehenlassen im Kühlschrank kann das Produkt als gelbliches Öl isoliert werden. Ausbeute: 75%.

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ (ppm) = 2,0 (m_c, 1H); 2,15 (m_c, 1H); 2,2 (s, 3H, NCH₃); 2,45 (m_c, 2H, CH₂N); 2,7 (m_c, 4H, CH₂CH₂); 5,3 (m_c, 1H, CH); 6,9 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-2'/6'); 7,25–7,35 (m, 5H, C₆H₅); 7,4 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-3'/5'). C₂₀H₂₂F₃NO₃ (381,4)

3. Fluoxetin-BSA-Konjugat (2b)

0,1 g (0,245 mmol) **2a** werden in 24,5 ml 1 M NaOH gelöst, der pH-Wert wird mit 1 M HCl auf 8,0 eingestellt. Man fügt 10 mg (0,09 mmol) 4-DMAP als Katalysator hinzu. 162 mg (2,45 μmol) BSA, gelöst in 13,0 ml dest. H₂O, sowie 141,0 mg (0,74 mmol) 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-HCl (EDC), gelöst in 2,5 ml dest. H₂O, werden hinzugegeben. Man rührt 16 h lang bei RT (pH 6,8), setzt 367,5 mg (1,9 mmol) EDC, gelöst in 6,5 ml dest. H₂O, hinzu und läßt 5,5 h lang bei RT rühren. Der Ansatz wird über Nacht in den Kühlschrank gestellt, die vollständige Umsetzung durch DC kontrolliert (Fließmittel EtOAc/Et₃N 9,5:0,5). Man dialysiert gegen 0,012 M Acetat-Puffer (pH 4) und gegen 0,042 M Carbonat-Puffer (pH 8) bei 4 °C. UV-spektrometrische Kontrollen (200–300 nm) des Dialysierwassers zeigen, daß eine 2täg. Dialyse mit jeweils dreimaligem Pufferwechsel ausreicht. Bei der Lyophilisation erhält man das Produkt als farblose feinkristalline Masse. Die UV-spektroskopische Analyse des Vollantigens [12] ergibt eine Anbindungsrate von 30 Molekülen Hapten pro Trägermolekül.

4. Gewinnung und Untersuchung der polyklonalen Antikörper

Die Gewinnung der Fluoxetin-Antikörper erfolgt nach einem eigens konzipierten Immunisierungs- und Entnahmeplan [8–10]. Über einen Zeitraum

von 8 Monaten standen 4 weiße männliche Neuseelandkaninchen bei artgerechter Haltung zur Verfügung. Dieser Versuch war behördlich genehmigt. Die Untersuchung der Antikörper wurde durchgeführt mit der Agargel-Doppeldiffusion nach Ouchterlony (Prüfung auf Identitäts-/Teilidentitätsreaktivität, Titration einer Antigen- bzw. Konjugatlösung, Titration einer BSA-Lösung, Austestung der Absorption mit BSA).

Zur weiteren Charakterisierung/Standardisierung der Antiseren war der Proteingehalt aller Entnahmen nach Bradford zu bestimmen. Die Gewinnung der γ-Globulinfraktion gelang mittels Ionenaustauschchromatographie [8–10].

5. Fluoxetin-POD-Konjugat (3b) aus 3a

Unter Feuchtigkeitsausschluß werden 15 mg (0,04 mmol) **3a** in 5,00 ml trockenem DMF gelöst, mit 20 μl Et₃N versetzt und auf –12 °C abgekühlt. Nach der Zugabe von 30 μl Chlorameisensäureisobutylester wird der Ansatz weitere 30 min lang bei –12 °C gekühlt.

10 mg (0,25 μmol) POD löst man in 10 ml bidest. H₂O. Jeweils 2,5 ml (0,0625 μmol) dieser POD-Lösung werden mit 0,500 ml, 0,250 ml, 0,125 ml sowie 0,063 ml der obigen Lösung (molares Verhältnis 60:1, 30:1, 15:1, 7,5:1) bei –12 °C versetzt. Die jeweils zwei mal vier Ansätze werden 1 h lang bei 0 °C leicht bewegt und weitere 30 min lang bei RT belassen. Es wird gegen bidest. H₂O (22 h) und gegen 0,1 M Tris-/HCl-Puffer pH 8,0 (25 h) bei 4 °C dialysiert. Nach der Portionierung werden die rotbraun gefärbten Enzymkonjugatlösungen 1:1 mit Glycerol verdünnt und im Tiefkühlschrank gelagert. Die Anbindungsrate beträgt nach UV-spektrometrischer Bestimmung 2,5–4,1.

Das auf die gleiche Weise hergestellte POD-Konjugat aus **2a** (Anbindungsrate 1,5–3,7) wurde nicht verwendet.

6. Testdurchführung

Mikrotiterplatten werden mit dem Antiserum **2b** der 2. Entnahme des 2. Kaninchens (100 μl pro Cavität) gecoatet. Man gibt in 3 benachbarte wells je 50 μl einer Lösung von **1**-Standards, fügt 50 μl **3b** hinzu, wäscht und inkubiert mit TMB/H₂O₂. Nach dem Abstoppen der Reaktion mißt man bei 450 nm im ELISA-Reader (Tabelle).

Literatur

- Dixit, V.; Nguyen, H.; Dixit, V. M.: J. Chromatogr. **563**, 379 (1991)
- Torok-Both, G. A.; Baker, G. B.; Coutts, R. T.; Mc Kenna, K. F.; Aspeslet, L. J.: J. Chromatogr. **579**, 99 (1992)
- Lantz, R. J.; Farid, K. Z.; Koons, J.; Tenbarger, J. B.; Bopp, R. J.: J. Chromatogr. **614**, 175 (1993)
- Misztal, G.; Hopkala, H.: Pharmazie **52**, 854 (1997)
- Holladay, J. W.; Dewey, M. J.; Yoo, S. D.: J. Chromatogr. B **704**, 259 (1997)
- Clausing, P.; Rushing, L. G.; Newport, G. D.; Bowyer, J. F.: J. Chromatogr. B **692**, 419 (1997)
- Brit. Pharm. 1998: Fluoxetine Hydrochloride
- Kraiczek, S.: Diss. Münster 1998
- Kraiczek, S.; Unterhalt, B.: Sci. Pharm. **66**, S 73 (1998)
- Kraiczek, S.; Unterhalt, B.: Pharmazie **53**, 53 (1998)
- Unterhalt, B.; Baudner, S.; Gerke, C.; Kütter, M.; Langfermann, C.: Pharmazie **49**, 829 (1994)
- Erlanger, B. F.; Borek, F.; Beiser, S. M.; Lieberman, S.: J. Biol. Chem. **234**, 1090 (1959)

Eingegangen am 22. Dezember 1998

Angenommen am 2. Februar 1999

Prof. Dr. B. Unterhalt
Institut für Pharm. Chemie
Hitdorferstr. 58–62
D-48149 Münster