

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<sup>®</sup>) 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  $\gamma$ -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  $\mu$ l, 20 h, 20 °C;  
Coatingpuffer: 0,05 M Carbonatpuffer pH 9,6
- ◆ 4  $\times$  Waschen mit je 200  $\mu$ l TPBS
- ◆ Inkubation: 50  $\mu$ l 1-HCl-Standards, 15 min, 20 °C
- ◆ Inkubation: POD-Konjugat (**3b**) 30:1 (1:31,25), 50  $\mu$ l, 120 min, 20 °C
- ◆ 4  $\times$  Waschen mit je 200  $\mu$ l TPBS
- ◆ Substratinkubation: TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 95  $\mu$ l, 1 h, 20 °C
- ◆ Abstoppen: 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50  $\mu$ l, 5 min

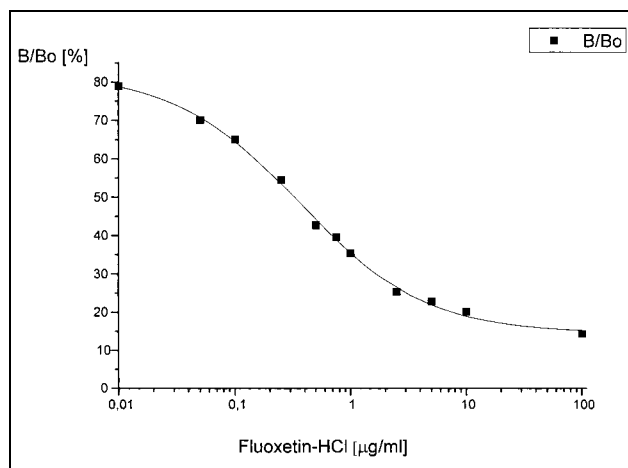
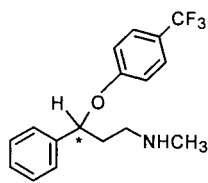
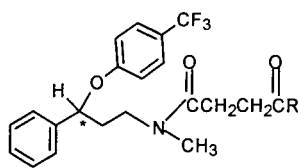
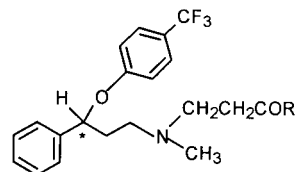


Abb.: Kalibrationskurve für den Fluoxetin-ELISA (logistische 4-Parameter-Anpassung)

**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) Et<sub>3</sub>N 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 Et<sub>2</sub>O 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. H<sub>2</sub>O, trocknet und kristallisiert aus absol. EtOH um. Ausbeute: 82%, Schmp. 115 °C.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ (ppm) = 2,2 (m<sub>c</sub>, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 2,6 (m, 4H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH); 3,0 (d, 3H, NCH<sub>3</sub>, Rotationsbehinderung); 3,6 (m<sub>c</sub>, 2H, CH<sub>2</sub>N); 5,2 (m<sub>c</sub>, 1H, CH); 6,85 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-2'/6'); 7,25–7,35 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); 7,38 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-3'/5'). C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>4</sub> (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) Et<sub>3</sub>N 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. H<sub>2</sub>O 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 Et<sub>2</sub>O 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%.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ (ppm) = 2,0 (m<sub>c</sub>, 1H); 2,15 (m<sub>c</sub>, 1H); 2,2 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>); 2,45 (m<sub>c</sub>, 2H, CH<sub>2</sub>N); 2,7 (m<sub>c</sub>, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 5,3 (m<sub>c</sub>, 1H, CH); 6,9 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-2'/6'); 7,25–7,35 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); 7,4 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-3'/5'). C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>3</sub> (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. H<sub>2</sub>O, sowie 141,0 mg (0,74 mmol) 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-HCl (EDC), gelöst in 2,5 ml dest. H<sub>2</sub>O, 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. H<sub>2</sub>O, 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/Et<sub>3</sub>N 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 Et<sub>3</sub>N 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. H<sub>2</sub>O. 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. H<sub>2</sub>O (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/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 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  
Hittorfstr. 58–62  
D-48149 Münster