

Journal of Chromatography, 181 (1980) 512-515

Biomedical Applications

© Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 481

Note

Quantitative Bestimmung von Diclofenac-Natrium aus Plasma durch Absorptionsmessung mit Hilfe der direkten Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen*

ANETTE SCHUMACHER, HEINRICH E. GEISSLER und ERNST MUTSCHLER**

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

(Eingegangen am 21. September 1979)

Diclofenac-Natrium (Voltaren[®]), das Natriumsalz der o-(2,6-Dichlorphenyl)-aminophenylessigsäure, hat in letzter Zeit grosse Bedeutung in der Rheumattherapie erlangt.

In der Literatur wurden bisher drei Verfahren zur quantitativen Bestimmung dieses Wirkstoffes in biologischem Material beschrieben. Stierlin und Mitarbeiter [1-4] führten die Messungen mit radioaktiv markierter Substanz durch. Da dabei jedoch auch radioaktiv markierte Abbauprodukte mitbestimmt werden und bei pharmakokinetischen Untersuchungen in grösserem Rahmen eine quantitative Erfassung nach Einnahme des handelsüblichen Präparates erforderlich ist, eignet sich dieses Verfahren nicht für Reihenuntersuchungen.

Geiger et al. [5] entwickelten 1975 ein empfindliches gaschromatographisches Verfahren, das später von mehreren Arbeitsgruppen [1, 2, 4, 6, 7] angewandt wurde. Der Nachteil der Methode besteht in einer komplizierten, langwierigen 4-stufigen Extraktion und Derivatisierung der Substanz vor ihrer Bestimmung.

Von Brombacher et al. [8] wurde 1977 ein vereinfachtes Extraktionsverfahren für die Gaschromatographie angegeben; insgesamt bleibt aber die Methode wegen der erforderlichen Derivatisierung noch immer arbeits- und zeitaufwendig. Als Nachweisgrenze werden 100 ng/ml angegeben.

Wir versuchten daher, eine dünnschichtchromatographische Methode zu entwickeln, die bei guter Spezifität und Genauigkeit eine rasche und einfache Erfassung von Diclofenac aus biologischem Material ermöglicht.

*Teilergebnisse der Dissertation A. Schumacher, in Vorbereitung.

**An den die Korrespondenz zu richten ist.

METHODIK

1.0 ml Plasma wird mit 0.1 ml 3 N HCl angesäuert und in eine Spritze mit Luerlock-Anschluss aufgezogen. Die Spritze wird anschliessend auf eine SEP-PAK C₁₈-Kartusche (Waters Assoc., Königstein, B.R.D.) aufgesteckt und das Plasma durch die Kartusche langsam hindurchgedrückt. Mit 5.0 ml Wasser werden hydrophile und anschliessend mit einer Mischung von Äthanol-Wasser (35:65, v/v) lipophilere Plasmabestandteile ausgewaschen. Mit 2.0 ml Methanol p.A. wird anschliessend die Substanz aus der Kartusche eluiert, wobei die ersten 0.4 ml, die als Mischfraktion noch keine Substanz enthalten, verworfen werden.

Die Methanolfraktion wird bei 80° unter Einblasen von Stickstoff zur Trockne eingeengt, der Rückstand wird anschliessend in 100 µl Essigsäureäthylester aufgenommen. Davon werden 40 µl strichförmig mit einem Linomat III (Camag, Muttenz, Schweiz) auf HPTLC-Fertigplatten Kieselgel-60 F₂₅₄ mit Konzentrierungszone (Merck, Darmstadt, B.R.D.) 10 × 20 cm aufgetragen. Die Strichbreite beträgt 5 mm. Bei einem 1-cm-Abstand der Punkte voneinander können 15 Proben und drei Standards auf eine Platte aufgetragen werden.

Standards werden durch Zusatz von Diclofenac-Natrium zu gepooltem Plasma hergestellt. Dazu werden 10.0 mg Substanz in 100.0 ml Aceton gelöst und 0.8 ml dieser Lösung nochmals auf 10.0 ml verdünnt, entsprechend einer Konzentration von 80.0 µg Diclofenac-Natrium pro 10.0 ml Aceton. 5.0 ml dieser Lösung werden durch Einblasen von Stickstoff bis zur Trockne eingeengt, dann werden 50.0 ml gepooltes Plasma zugegeben. Dadurch ergibt sich eine Konzentration von 800.0 ng Diclofenac-Natrium pro 1.0 ml Plasma.

Nach dem Trocknen der Proben auf der Platte erfolgt die Chromatographie in dem Fliessmittel Dichlormethan-Methanol-Tetrahydrofuran (85:15:0.5), wobei die Substanz bei einer Laufstrecke von 7 cm einen *hR_F*-Wert von 64 besitzt.

Nach der Chromatographie wird die Platte für 10–15 min unter einer UV-Lampe (254 nm) zur Minderung der Untergrundabsorption der Platte bestrahlt und anschliessend direkt mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer

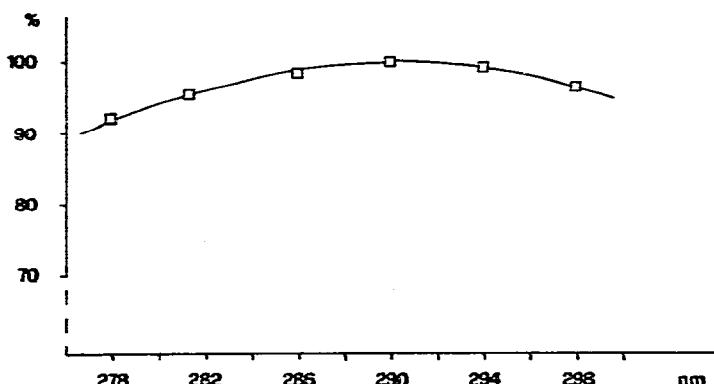


Fig. 1. Absorptionsspektrum in Remission von Diclofenac nach Chromatographie auf HPTLC-Fertigplatten Kieselgel-60 F₂₅₄ mit Konzentrierungszone (Merck) 10 × 20 cm mit Dichlormethan-Methanol-Tetrahydrofuran (85:15:0.5).

KM 3 der Firma Zeiss ausgewertet. Gemessen wird im Absorptionsmaximum auf der Platte von 290 nm (Fig. 1) unter Verwendung einer Deuteriumlampe. Messanordnung: Remission Monochromator-Probe; Spaltgrösse: 1 X 3.5 mm.

Die Absorptions-Ortskurven werden durch einen Perkin-Elmer-Recorder 56 aufgezeichnet, wobei die Eingangsspannung am Schreiber entsprechend der Konzentration pro Fleck von 1 bis 0.2 V verändert werden kann. Die Tischgeschwindigkeit beträgt 20 mm/min, der Schreibervorschub 120 mm/min. Die Auswertung erfolgt über die Flächen unter den Absorptions-Ortskurven.

Zur Bestimmung der Linearität zwischen den Flächen unter den Absorptions-Ortskurven und den aufgetragenen Substanzmengen wurden Testplasmen mit 125.0, 250.0, 500.0, 1000.0, 1500.0, 2000.0 und 2500.0 ng Diclofenac-Natrium pro ml verwendet. Zur Ermittlung der Präzision des Verfahrens wurden, entsprechend der nach der therapeutischen Dosis von 50 mg im biologischen Material zu erwartenden Konzentrationen, pro ml Testplasma 1500.0, 750.0 und 200.0 ng Diclofenac-Natrium zugesetzt.

Die Untersuchungen auf Richtigkeit des Verfahrens wurden mit Lösungen von Diclofenac in Aceton durchgeführt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Eichkurven gehen durch den 0-Punkt. Linearität zwischen den Flächen unter den Absorptions-Ortskurven und den aufgetragenen Substanzmengen besteht von 0 bis 800 ng Diclofenac pro Fleck (\approx 0—2.0 μ g Diclofenac-Natrium pro 1.0 ml Plasma). Bestimmbare Mengen < 100 ng pro ml Plasma.

Der mittlere lineare Regressionskoeffizient beträgt 0.996. Zur Erstellung der Eichgeraden genügt daher jeweils ein einziger Kurvenpunkt, der zur Erhöhung der Genauigkeit aus drei Messwerten ermittelt wird.

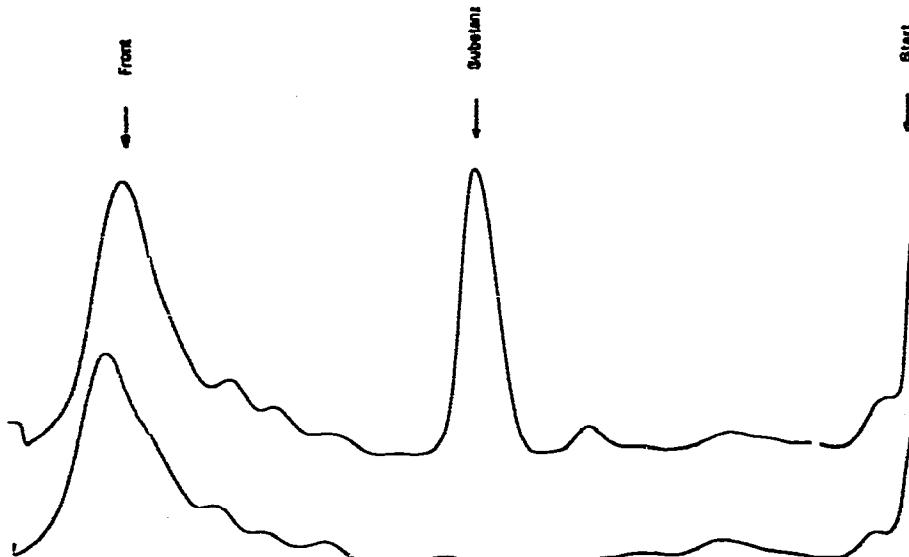


Fig. 2. Absorptions-Ortskurven der Chromatogramme eines Plasmas ohne Diclofenac-Natrium und eines Probanden-Plasmas nach oraler Gabe von 50 mg Voltaren® zur Zeit des maximalen Blutspiegels.

Bei einer Konzentration von 1500.0 ng Diclofenac-Natrium pro ml Testplasma betrug die relative Standardabweichung 3.5%, bei 750.0 ng 4% und bei 200.0 ng 6% ($N = 8$).

Die Wiederfindungsraten betrugen, unabhängig von den Konzentrationen der Proben an Diclofenac-Natrium, 75%.

Zur Überprüfung der Methode wurde Versuchspersonen eine einmalige Dosis von 50 mg Diclofenac-Natrium oral verabreicht. Die Ergebnisse stimmen weitgehend mit den durch gaschromatographische Analysen enthaltenen Daten überein. In Fig. 2 ist die Absorptions-Ortskurve eines Chromatogramms eines Probanden-Plasmas zur Zeit des maximalen Blutspiegels dargestellt und als Vergleich dazu die Absorptions-Ortskurve des Leerwertes, der vor Einnahme der Substanz abgenommen wurde.

LITERATUR

- 1 W. Riess, H. Stierlin, J.W. Faigle, U.P. Geiger, K. Schmidt, A. Gerardin, M. Sulc, J. Wagner und W. Theobald, Therapiewoche, 26 (1976) 2891.
- 2 W. Riess, H. Stierlin, P. Degen, J.W. Faigle, A. Gerardin, J. Moppert, A. Sallmann, K. Schmid, A. Schweizer, M. Sulc, W. Theobald und J. Wagner, Scand. J. Rheumatol., 22 (1978) 22.
- 3 H. Stierlin, J.W. Faigle und A. Colombi, Scand. J. Rheumatol., 22 (1978) 30.
- 4 W. Riess, H. Stierlin, U.P. Geiger, A. Gerardin, K. Schmid, J. Wagner und W. Theobald, in F.J. Wagenhäuser (Herausgeber), Polyarthritiden, Verlag Hans Huber, Bern, Stuttgart, Wien, 1977, S. 301.
- 5 U.P. Geiger, P.H. Degen und A. Sioufi, J. Chromatogr., 111 (1975) 293.
- 6 J.V. Willis und M.J. Kendall, Scand. J. Rheumatol., 22 (1978) 36.
- 7 F.O. Müller, H.K.L. Hundt und D.G. Müller, Int. J. Clin. Pharmacol., 15 (1977) 397.
- 8 P.J. Brombacher, H.M.H.G. Cremers, P.E. Verheesen und R.A.M. Quanjet-Schreurs, Arzneim.-Forsch., 27 (1977) 1597.