



Sonderdruck aus:

»ARZNEIMITTEL-FORSCHUNG«
»DRUG RESEARCH«

Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 25, Nr. 4, 517—524 (1975)

Editio Cantor KG / Aulendorf i. Württ.

Aus dem Pharmazeutischen Institut der Universität Bern (Schweiz)

Polarographische Bestimmung einiger phenylsubstituierter Antikonvulsiva

Von W. Wiegrebe und L. Wehrhahn

Herrn Professor Dr. Fr. Šantavý, Olomouc (Tschechoslowakei), zum 60. Geburtstag gewidmet

1. Einleitung und Zielsetzung

Für die Bestimmung des Blutspiegels der therapeutisch wichtigen Antiepileptika wurden bereits zahlreiche Methoden veröffentlicht, die größtenteils den Nachteil eines beträchtlichen Arbeits- und Zeitaufwandes besitzen. Häufig werden spektrophotometrische und gaschromatographische Methoden verwendet [1]. Auch polarographische Bestimmungen wurden bekannt [2, 3]. Schließlich existieren noch Möglichkeiten der halbquantitativen Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen [1].

Wir haben uns um die Entwicklung einer möglichst einfachen und trotzdem hinreichend exakten Bestimmungsvorschrift für die noch nicht metabolisierten Antikonvulsiva bemüht und legten unserer Arbeit die Methode von Huisman [4] für phenylsubstituierte Antiepileptika zugrunde. Huisman umgeht eine Vielzahl von Arbeitsschritten, indem er alle Substanzen gemeinsam extrahiert und — unter Verzicht auf komplizierte Reinigung und Entfernung von Serumbestandteilen — gemeinsam nitrirt. Erst dann werden die einzelnen Substanzen durch Dünnschichtchromatographie getrennt und — nach Eluierung des Kieselgels, Reduktion der Nitrogruppe, Diazotierung und Kupplung zu einem Azofarbstoff — auf spektrophotometrischem Wege bestimmt.

Zusätzlich zu den von Huisman [4] genannten störenden Substanzen fanden wir, daß die Benzodiazepine Chlordiazepoxid, Diazepam und Nitrazepam interferieren.

Den ersten Teil dieser Vorschrift übernahmen wir nahezu unverändert (s. 2.4.). Die quantitative Bestimmung wurde durch polarographische Auswertung der Dünnschichtchromatogramme ohne Entfernung des Sorptionsmittels [5] wesentlich vereinfacht.

2. Experimentelle Angaben

2.1. Reagentien

zur Extraktion von Plasma:

Salzsäure 37proz., p.a. (Merck)

Natriumchlorid (Helv. VI)

Extraktionsgemisch:

Chloroform reinst, frisch destilliert, 60 Vol.-T.

Essigsäuremethylester, z. Synth. (Merck), 40 Vol.-T.

Natriumsulfat, getrocknet (Helv. VI)

Al₂O₃ sauer, Akt.-Stufe I (Woelm)

Aktivkohle, p.a. (Merck)

Athanol, absol., p.a. (Merck)

zur Nitrirung:

Nitriersäure aus 95 Vol.-T. H₂SO₄, d = 1,84, p.a. (Merck)

und 5 Vol.-T. HNO₃, rauchend, d = 1,52, p.a. (Merck)

2.2. Angaben zur Dünnschichtchromatographie

Kieselgel GF₂₅₄ (Merck)

Fließmittel [6] $\left. \begin{array}{l} \text{Chloroform } 45 \\ \text{Isopropanol } 45 \\ \text{NH}_3, 25\text{proz. } 10 \end{array} \right\} \text{Vol.-T.}$

Plattengröße 20×20 cm

Schichtdicke 0,3 mm

Entwicklung: 2×45 min, Zwischentrocknung 5 min bei 110° C

Kammersättigung

Detektion: UV-Licht 254 nm

2.3. Angaben zur Polarographie

Polarographiestand mit „synchronisiertem Tropfkontroller“, Type E 354 (Metrohm)

Ag/AgCl-Bezugselektrode

Tropfende Hg-Elektrode

Impulse/sec : 3

Impulsstärke : 2 } $\cong 2,75 \text{ mg Hg} \times \text{sec}^{-1}$

Schreiber: Polarecord Type E 261 R (Metrohm)

Spannungsbereich: 0 bis -3 V

Stromempfindlichkeit: 5×10^{-8} bzw. $1 \times 10^{-8} \text{ A/mm}$

Ladestromkompensation: 20 bzw. 10

Dämpfung: 4

Papier- u. Spannungsvorschub: „schnell“

Es wurde ein 5-ml-Gefäß verwendet.

Die Grundlösung setzte sich zusammen aus:

Britton-Robinson-Puffer I [7] (BR-Puffer I), pH 3,5, 3 ml

(= 60‰);

Dimethylformamid (DMF), z. Synth. (Merck), 1,5 ml (= 30‰¹⁾;

0,1proz. Gelatinelösung 0,5 ml (= 10‰; entspricht einer Gelatine-

Gesamtkonzentration von 0,01‰).

Der resultierende pH-Wert betrug 4,34 (sämtliche pH-Werte wurden mit dem Metrohm pH-Meter E 396 gemessen).

Der in der Lösung befindliche Sauerstoff wurde durch 5minütiges Begasen mit gereinigtem N₂ entfernt. Während des Polarographierens leiteten wir (entgegen der üblichen Empfehlung) keinen Stickstoff über die Probe, da die Gleichmäßigkeit des Tropfenfalles beeinträchtigt wurde.

Temp. der Lösung: 25° C ($\pm 0,5^\circ$), thermostatisierter Wassermantel.

Die Untersuchung jeder der von uns bearbeiteten Substanzen gliedert sich in drei Abschnitte: zwei stehen im Zusammenhang mit der polarographischen Bestimmung der Substanz bzw. ihrer Nitroprodukte, einer behandelt die Extraktion aus Plasma.

Zunächst mußte geklärt werden, mit welcher Genauigkeit das nitririerte Antikonvulsivum (im folgenden „Nitroprodukt“) vom Sorptionsmittel der DC-Platte eluiert werden kann. Dazu waren 2 Versuchsreihen notwendig:

¹⁾ 1,5 ml sind zur Eluierung der betr. Kieselgelmengen notwendig; wir konnten daher zur Steigerung der Empfindlichkeit kein 1-ml-Gefäß verwenden, auch hätte das Kieselgel darin zuviel Raum eingenommen. Nach Oelschläger et al. [8] gereinigtes DMF brachte unter unseren Bedingungen keine Vorteile.

2.3.1. Direkte Polarographie des Nitroproduktes

Von einer Stammlösung des entsprechenden Nitroproduktes in DMF ($1 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) wurden steigende Mengen direkt in das Polarographie-Gefäß pipettiert, mit DMF auf 1,5 ml ergänzt und nach Zugabe von BR-Puffer und Gelatinelösung polarographisch bestimmt.

2.3.2. Polarographie nach Chromatographie

350 μl einer Stammlösung des jeweiligen Antiepileptikums in Äthanol ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurden zur Trockne eingedampft, der Rückstand wurde mit 350 μl Nitriersäure nitrirt und in steigenden Mengen auf Platten mit dem Sorptionsmittel Kieselgel GF₂₅₄ aufgetragen. Nach dem Entwickeln des Chromatogramms wurden die Nitroprodukt-Flecken unter UV-Licht 254 nm markiert, mit einem Sicherheitsabstand von ca. 2–3 mm abgeschabt und im Reagensglas mit Schliffstopfen mit 1,5 ml DMF durch 3minütiges Schütteln auf dem Vortex-Mixer (Stufe 10) eluiert. Nach Zugabe der übrigen Grundlösungsbestandteile wurde ein aliquoter Teil polarographisch bestimmt. Die Mengen der eingesetzten Antiepileptika mußten vor der vergleichenden graphischen Darstellung mit den nach Abschnitt 2.3.1. erhaltenen Werten auf die entsprechenden Mengen des Nitroproduktes umgerechnet werden.

2.4. Extraktion von Plasmen

Wir versetzten menschliche Plasmen mit Antiepileptika und extrahierten auf verschiedenen Wegen. Es wurden Standardbedingungen erarbeitet und in mehreren Reihenversuchen mit Plasmen verschiedener Herkunft Eichkurven aufgestellt, die es uns ermöglichten, später auf die Verwendung innerer und äußerer Standards zu verzichten.

Wir suchten zunächst nach einem Extraktionsmittel, das nach Extrahieren und Zentrifugieren die obere Phase bildete und somit der Weiterverarbeitung leichter zugänglich war. Fürst et al. [9] hatten mit Cyclohexan/Isopropanol 20+1 gute Extraktionsraten erzielt. Bei der Verwendung dieses Gemisches in der sonst unveränderten Vorschrift von Huisman [4] zeigte sich jedoch (DC), daß bei jedem Arbeitsvorgang mehr Substanz als mit Huisman's Extraktionsgemisch verloren ging; nach dem Schütteln mit Kohle waren die Substanzen nur noch in Spuren, bzw. bei Einsatz von geringen Mengen gar nicht mehr wiederzufinden. Wir kamen deshalb wieder auf das Extraktionsgemisch nach Huisman [4] zurück. Die Schwierigkeit des Abpipettierens der unteren organischen Phase nach dem Extrahieren konnten wir dadurch umgehen, daß wir nicht mehr zentrifugierten, sondern filtrierten. Die koagulierten Plasmabestandteile blieben im Filter zurück; der wäßrige Anteil der Lösung war so gering, daß die nach Huisman [4] zuzufügenden 3 g Na₂SO₄ für die Trocknung der organischen Phase ausreichten.

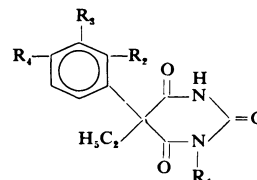
Unsere Versuche führten zu folgender Arbeitsvorschrift:

Je 3 ml Plasma wurden mit verschiedenen Mengen einer Stammlösung des betreffenden Antiepileptikums in Äthanol ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) versetzt und nach Zusatz von 0,1 ml 37proz. HCl und 0,9 g NaCl mit 30 ml Extraktionsgemisch 5 min auf dem Vortex-Mixer (Stufe 10) extrahiert. Nach Filtrieren (Faltenfilter Schleicher u. Schüll, Nr. 595) wurde die organische Phase 5 min mit 3 g Na₂SO₄ und dann 30 sec mit 100 mg Al₂O₃ und 100 mg Aktivkohle geschüttelt. 20 ml der durch ein hartes Faltenfilter (Schleicher u. Schüll, Nr. 576) filtrierten Extraktionsflüssigkeit wurden in ein Spitzkölbchen pipettiert und am Rotationsverdampfer i. Vak. bei 30–35° Badtemp. abgedampft; der Rückstand wurde mit ca. 0,5 ml Äthanol von den Wandungen in die Kolbenspitze gespült und im Trockenschrank bei ca. 80° C getrocknet. Anschließend fügten wir 120 μl Nitriersäure hinzu; die Mischung wurde 3 min auf dem Vortex-Mixer (Stufe 8) geschüttelt und danach 30–45 min bei Zimmertemp. stehen gelassen.

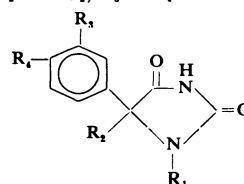
Da die polarographische Bestimmung entsprechend unseren Bedingungen unempfindlicher ist als die photometrische Methode, mußten wir größere Mengen chromatographieren als Huisman [4]. Wir trugen mit Konstruktionspipetten 50 μl in Strichen von ca. 4 cm Länge auf und konnten so aus jeder Blutprobe 2 Bestimmungen durchführen. Nach dem Auftragen blieb die Platte 5 min an der Luft liegen und wurde anschließend für ca. 20 min in eine oben offene Ammoniak-Kammer gestellt (Startflecken nach oben). Sobald keine Nebelbildung mehr zu beobachten war und die vorher durchscheinenden Startflecken weiß-trübe geworden waren, wurde die Platte in frisch vorbereitetem Fließmittel entwickelt. Die polarographische Auswertung des Chromatogramms erfolgte entsprechend den Angaben in Abschnitt 2.3.2.

2.5. Bestimmung der Extraktionsrate aus Plasma

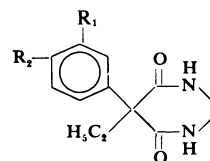
Wir nitrirten direkt zwischen 10 und 100 μg Substanz mit je 120 μl Nitriersäure, trugen je $2 \times 50 \mu\text{l}$ auf und verfahren weiter nach 2.3.2. Durch Vergleich der Geraden nach Abschnitt 2.4. und Abschnitt 2.5. ließ sich die Extraktionsrate berechnen. Bei der Nitrirung von Phenobarbital (I), Phenytoin (IV), Mephentoin (VII), Methylphenobarbital (X) und Primidon (XIII) entstehen die in Formelbild 1 dargestellten Produkte [10].



- I: $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$
 II: $R_1 = R_2 = R_3 = H$; $R_4 = NO_2$
 III: $R_1 = R_2 = R_3 = H$; $R_4 = NO_2$
 X: $R_1 = CH_3$; $R_2 = R_3 = R_4 = H$
 XI: $R_1 = CH_3$; $R_2 = R_3 = H$; $R_4 = NO_2$
 XII: $R_1 = CH_3$; $R_2 = NO_2$; $R_3 = R_4 = H$



- IV: $R_1 = R_2 = R_3 = H$, $R_4 = C_6H_5$
 V: $R_1 = R_3 = H$, $R_2 = C_6H_4-NO_2$ (meta), $R_4 = NO_2$
 VI: $R_1 = R_3 = H$, $R_2 = C_6H_4-NO_2$ (ortho), $R_4 = NO_2$
 VII: $R_1 = CH_3$, $R_2 = C_6H_5$, $R_3 = R_4 = H$
 VIII: $R_1 = CH_3$, $R_2 = C_6H_5$, $R_3 = H$, $R_4 = NO_2$
 IX: $R_1 = CH_3$, $R_2 = C_6H_5$, $R_3 = NO_2$, $R_4 = H$

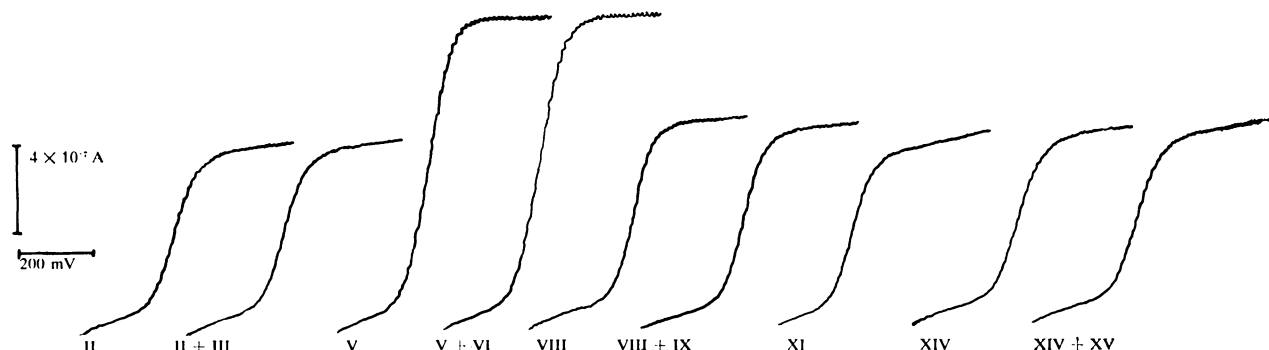


- XIII: $R_1 = R_2 = H$
 XIV: $R_1 = NO_2$, $R_2 = H$
 XV: $R_1 = H$, $R_2 = NO_2$

Formelbild 1

Tab. 1: Konzentration: 1×10^{-4} molar; Stromempfindlichkeit: 2×10^{-4} A/mm; Ladestromkompensation: 0. Alle Kurven ab $-0,120$ V.

	Phenobarbital		Phenytoin		Mephentoin		Methylphenobarbital	Primidon	
	II	II + III	V	V + VI	VIII	VIII + IX	XI	XIV	XIV + XV
E _{1/2} [V]	-0,392	-0,392	-0,378	-0,378	-0,402	-0,406	-0,335	-0,408	-0,408
Stufenhöhe [μ A]	0,65	0,64	1,26	1,26	0,75	0,76	0,64	0,66	0,66



3. Ergebnisse

Eine dünn-schicht-chromatographische Trennung der Nitroprodukte vor der Polarographie ist notwendig, da diese sehr nahe beieinanderliegende Halbstufenpotentiale besitzen und daher nicht gemeinsam in einer Probe bestimmt werden können (Tab. 1).

Die Halbstufenpotentiale sinken einerseits mit zunehmender Konzentration des Depolarisators bei sonst gleichen Bedingungen in negativere Bereiche. Dieses Phänomen fanden wir bei Březina und Zuman [11] für aromatische Nitroverbindungen bestätigt. Wir untersuchten ferner das Verhalten der Nitroprodukte in Grundlösungen mit BR-Puffern verschiedener pH-Werte zwischen pH 3,5 und 10,8. Bei allen Substanzen sinken die Halbstufenpotentiale außerdem mit zunehmendem pH-Wert.

Im alkalischen Bereich entsteht ein Polarogramm mit 2 Stufen, von denen die zweite ca. 2,5mal größer ist als die erste. Im annähernd neutralen Bereich erscheinen zwei angeordnete Stufen, die nicht auswertbar sind. Im sauren Medium erfolgt die Reduktion in einer Stufe, die größer ist als die Summe der Stufen des alkalischen Bereiches. Wir sind diesen Erscheinungen nicht nachgegangen, da entsprechende Arbeiten außerhalb unserer Zielsetzung gelegen hätten.

3.1. Phenobarbital

Da m- und p-Nitrophenobarbital (II bzw. III) in unserem DC-System nicht zu trennen sind, müssen als Voraussetzungen einer gemeinsamen polarographischen Bestimmung annähernd gleiche Halbstufenpotentiale und gleiche Stufenhöhen gegeben sein, letztere jedoch nur, wenn m- und p-Produkt nicht stets im gleichen Mengenverhältnis entstehen. Aus Gründen, die an anderer Stelle erläutert werden [10], konnten wir III nur sehr schwer rein erhalten. Wir verglichen daher das polarographische Verhalten von II mit dem des Rohproduktes (II + III) unter denselben Bedingungen. Starke Abweichungen bei III hätten sich auch beim Rohprodukt bemerkbar machen müssen.

Aus Tab. 1 ist folgendes ersichtlich:

Die Ergebnisse für reines II und für das Gemisch II + III sind gleich. Nitrophenobarbital-Rohprodukt braucht also vor der polarographischen Bestimmung nicht in seine Isomeren getrennt zu werden.

3.1.1.1. Direkte Polarographie von II

Bei Tab. 2 und den nachfolgenden Tabellen sind jeweils Mittelwerte aus 3–5 Versuchsreihen angegeben. 1 mm Stufenhöhe entspricht $5 \times 10^{-3} \mu\text{A}$; 0,5 mm sind ablesbar.

Tab. 2

II [μg]	Stufenhöhe [μA]
20	0,0855
40	0,1745
60	0,2640
80	0,3515
100	0,4355

3.1.1.2. Polarographie nach Chromatographie

Mol.-Masse I = 232,2;

Mol.-Masse II bzw. III = 277,2 (Tab. 3).

Tab. 3

I [μg] → II + III [μg]	Stufenhöhe [μA]
5	5,97
10	11,94
20	23,88
30	35,82
40	47,76
50	59,7
60	71,64
70	83,58

Aus Abb. 1 ist ersichtlich, daß das Gemisch II + III vollständig vom Kieselgel eluierbar ist. Wir machten wie Oelschläger et al. [5] die Erfahrung, daß eine quantitative Elution nur innerhalb von 6 h nach dem Chromatographieren möglich ist, das Polarographieren selbst jedoch noch einige Tage später geschehen kann, da eine erneute Adsorption

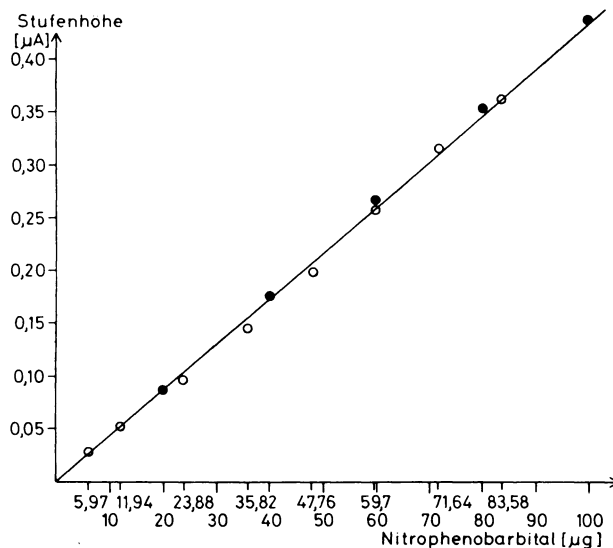


Abb. 1: Phenobarbital; ● s. Tab. 2, ○ s. Tab. 3.

von II und III an das Kieselgel nicht stattfindet. Das gleiche gilt für die anderen von uns untersuchten Substanzen. Die untere Bestimmungsgrenze bei unseren Versuchsbedingungen liegt bei $4 \mu\text{g}/5 \text{ ml}$ ($\approx 2,9 \times 10^{-6} \text{ mol. Lösung}$).

3.1.2. Extraktion von Plasmen

Siehe hierzu Tab. 4.

Tab. 4

Eingesetztes I in 3 ml Plasma [μg]	Stufenhöhe [μA]	Stufenhöhe [μA] $\times \frac{3}{2}$ *)
30	0,0345	0,0515
60	0,0575	0,0860
90	0,0895	0,1340
120	0,1250	0,1875
150	0,1630	0,2440

*) Multiplikation mit $3/2$, da von 30 ml Extraktionsflüssigkeit 20 ml für die Bestimmung verwendet wurden.

Tab. 5

I [μg]/120 μl Nitriersäure	Stufenhöhe [μA]
20	0,0375
30	0,0550
40	0,0730
50	0,0900
60	0,1125
80	0,1515
100	0,1880

3.1.3. Bestimmung der Extraktionsrate

Siehe hierzu Tab. 5.

Aus Abb. 2 wurde die Extraktionsausbeute mit 81–82% bestimmt.

Die untere Nachweisgrenze für die Polarographie von II bzw. II + III liegt nach unseren Bedingungen bei $4 \mu\text{g}$. Daraus errechneten wir für die Phenobarbitalbestimmung aus Plasma eine untere Nachweisgrenze von $5 \mu\text{g l/ml}^2$). In der Praxis konnten wir ebenfalls $5 \mu\text{g l/ml}$ Plasma bestimmen.

*) $4 \mu\text{g}$ II + III sind in 5 ml Polarographie-Flüssigkeit nachweisbar. Diese Menge muß folglich in 50 μl Nitriergemisch enthalten sein, so daß für das Gesamtvolumen (120 μl) $9,6 \mu\text{g}$ II + III errechnet werden, die $8,1 \mu\text{g}$ I entsprechen. Das für die Untersuchung eingesetzte Aliquot (20 ml) der Gesamt-Extraktionsflüssigkeit (30 ml) muß diese $8,1 \mu\text{g}$ I enthalten, so daß in der Gesamt-Extraktionsflüssigkeit $12,2 \mu\text{g}$ enthalten sein müssen. Unter Berücksichtigung der Extraktionsrate von 81% ergibt das $15,0 \mu\text{g}$ I in 3 ml Plasma, entsprechend einem Gehalt von $5 \mu\text{g l/ml}$.

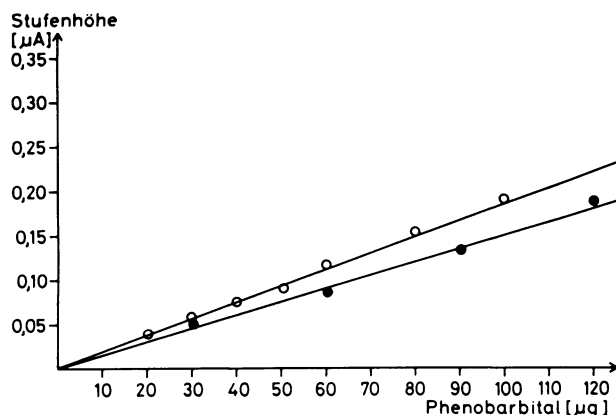


Abb. 2: Phenobarbital; ● s. Tab. 4, ○ s. Tab. 5. Extraktionsrate: 81%.

3.2. Phenytoin (DPH)

Wir hatten festgestellt [10], daß beim Nitrieren von DPH (IV) zwei Dinitro-Produkte in unterschiedlichen Mengen entstehen, die verschiedene R_f -Werte besitzen. Das Hauptprodukt V hat das gleiche Halbstufenpotential und ergibt die gleiche Stufenhöhe wie dieselbe Menge eines Gemisches aus Haupt- und Nebenprodukt (V + VI) (s. Tab. 1). Wir verfahren mit DPH wie mit Phenobarbital (s. 3.1.).

3.2.1.1. Direkte Polarographie von V

Siehe hierzu Tab. 6.

Tab. 6

V [µg]	Stufenhöhe [µA]
10	0,065
20	0,145
40	0,290
60	0,435
80	0,595
100	0,740

3.2.1.2. Polarographie nach Chromatographie

Mol.-Masse IV: 252,3;

Mol.-Masse V bzw. VI: 342,3 (Tab. 7).

Tab. 7

IV [µg] → V + VI [µg]	Stufenhöhe [µA] (für V + VI)
20 27,2	0,190
40 54,4	0,390
60 81,6	0,590
80 108,8	0,770
100 136,0	0,945

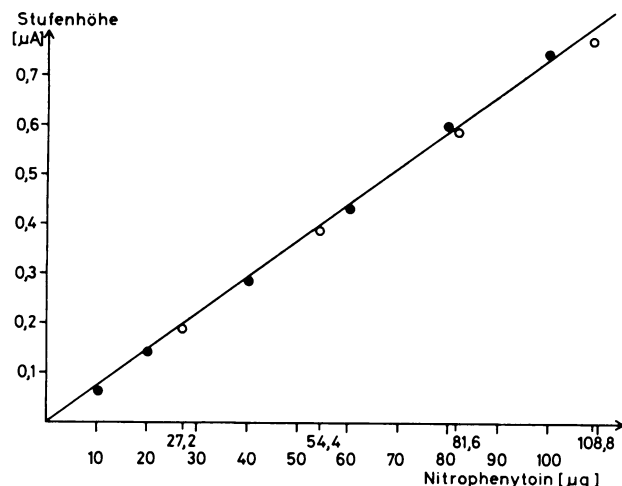


Abb. 3: Phenytoin; ● s. Tab. 6, ○ s. Tab. 7.

Aus Abb. 3 folgt, daß die Nitrierung quantitativ verläuft und daß V und VI quantitativ vom Kieselgel eluierbar sind. Untere Nachweisgrenze: 2,5 µg/5 ml ($\approx 1,5 \times 10^{-6}$ mol. Lösung).

3.2.2. Extraktion von Plasmen

Nur V wird ausgewertet, Begründung s. 3.2.3. Unter dieser Voraussetzung ergeben sich für das aus IV entstehende V die in Tab. 8 aufgeführten Stufenhöhen.

Tab. 8

Eingesetztes IV in 3 ml Plasma [µg]	Stufenhöhe [µA]	Stufenhöhe $\times \frac{3}{2}$ *) [µA]
15	0,0265	0,0400
30	0,0555	0,0835
45	0,0800	0,1200
60	0,1040	0,1560
90	0,1630	0,2440
120	0,2285	0,3425
150	0,2905	0,4355

*) S. Fußnote zu Tab. 4.

3.2.3. Bestimmung der Extraktionsrate

Siehe hierzu Tab. 9.

Tab. 9

IV [µg]/120 µl Nitriersäure	Stufenhöhe [µA] (für V)	Stufenhöhe [µA] (für V + VI)
10	0,0380	0,0460
20	0,0670	0,0820
30	0,1030	0,1210
40	0,1375	0,1555
50	0,1710	0,1960
60	0,2100	0,2560
80	0,2700	0,3255
100	0,3370	0,4060

Die Extraktionsrate für DPH aus Plasma beträgt 79%. Aus Tab. 9 und Abb. 4 ist ersichtlich, daß V und VI stets im gleichen Mengenverhältnis 83% zu 17% entstehen. Für die Bestimmung von DPH ist es deshalb ausreichend, nur V auszuwerten (dieser Gesichtspunkt ist für die Bestimmungen Phenobarbital neben DPH und umgekehrt entscheidend). Aus der so erarbeiteten Eichgeraden kann man direkt die DPH-Plasmaspiegel ablesen.

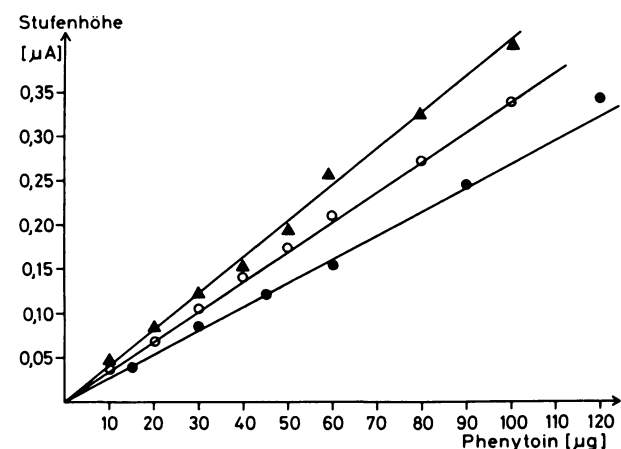


Abb. 4: Phenytoin; ● s. Tab. 8, ○ und ▲ s. Tab. 9. Extraktionsrate: 79%, Entstehungsrate V: VI = 83: 17%.

Wenn nur V bestimmt wird, liegt die untere Nachweisgrenze für DPH bei 4 µg/ml Plasma (theoretisch: 3,4 µg; s. Fußnote Abschnitt 3.1.3., Phenobarbital).

3.3. Polarographische Bestimmung von Phenobarbital (I) und DPH (IV) nebeneinander

I und IV werden in der Therapie der Epilepsien häufig kombiniert. Deshalb müssen die Blutspiegel beider Medikamente oft nebeneinander bestimmt werden.

Die DPH-Bestimmung nach unserer Methode wird beim gleichzeitigen Vorliegen von Phenobarbital nicht beeinträchtigt, da wir nur V auswerten. Anders liegt der Fall bei der Bestimmung von Phenobarbital in Anwesenheit von DPH. Wie wir festgestellt hatten [10], besitzt das Nitro-DPH-Nebenprodukt (VI) denselben R_f -Wert wie Nitro-Phenobarbital (II + III) und wird mit diesem gemeinsam erfaßt. Wir erhalten dementsprechend zu hohe Phenobarbitalwerte. Da VI zudem zwei Nitrogruppen besitzt, die eine Verdoppelung der Stufenhöhe bewirken, ist eine Korrektur der Phenobarbitalwerte unbedingt erforderlich.

Weil Huisman [4] diesem Phänomen keine Beachtung schenkte, arbeiteten wir seine Vorschrift einschließlich der spektrophotometrischen Bestimmung nach. Wir blieben im Bereich $< 10 \mu\text{g}$ und nitrierten Phenobarbital (I) und DPH (IV) einzeln und im Gemisch. Auch bei diesen geringen Mengen war auf dem DC der Fleck für VI zu erkennen. Die Auswertung ergab die in Tab. 10 u. 11 zusammengefaßten Daten (vgl. auch Abb. 5 u. 6).

Addiert man horizontal die Werte der Spalten II und III in Tab. 10 und 11 für gleiche Mengen Antikonvulsiva, so erhält man entsprechend unserer Theorie Werte, die innerhalb der Fehlergrenze übereinstimmen (Spalten IV in beiden Tabellen).

Es zeigt sich, daß Phenobarbital auch nach der Originalvorschrift von Huisman [4] zu hoch gefunden wird. Die Abweichung beträgt 17% wie bei unserer polarographischen Methode.

Tab. 10: I und IV wurden einzeln nitriert und spektrophotometrisch ausgewertet.

Spalte I	Spalte II	Spalte III	Spalte IV
Substanz [μg]	E_{550} Phenobarbital (Azofarbstoffe aus II + III)	E_{550} DPH (Azofarbstoffe aus V + VI)	
2	0,033	0,037	0,070
3	0,049	0,059	0,108
4	0,073	0,071	0,144
5	0,088	0,095	0,183

Tab. 11: Nitrierung und Bestimmung eines Gemisches gleicher Mengen I und IV.

Spalte I	Spalte II	Spalte III	Spalte IV
Substanz [μg]	E_{550} Phenobarbital (Azofarbstoffe aus II + III + VI)	E_{550} DPH (Azofarbstoff aus V)	
1	0,018	0,013	0,031
2	0,038	0,031	0,069
3	0,059	0,048	0,107
4	0,083	0,063	0,146
5	0,106	0,077	0,183

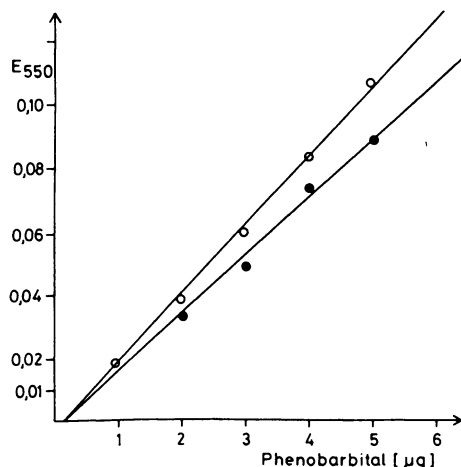


Abb. 5: Phenobarbital; ● s. Tab. 10 → Spalte II, ○ s. Tab. 11 → Spalte II.

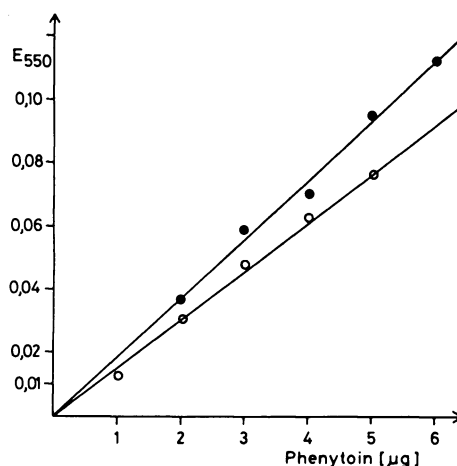


Abb. 6: Phenytoin; ● s. Tab. 10 → Spalte III, ○ s. Tab. 11 → Spalte III.

Durch gleichzeitige Auswertung von Standards ist der Fehler nicht zu kompensieren, da die 17%ige Abweichung immer in bezug auf die jeweils vorhandene Menge DPH berechnet werden muß. Deswegen kann man auch keine Eichkurve für die Bestimmung von DPH und Phenobarbital nebeneinander aufstellen.

Der Phenobarbital-Wert wird nach folgender Formel ermittelt:

$$x[\mu\text{A}] = m - \frac{100 a}{83} + a$$

x = korr. Stufenhöhe Nitrophenobarbital (II + III);

m = gemessene Stufenhöhe „Nitrophenobarbital“ (II + III + VI);

a = Stufenhöhe V.

Ableitung:

a = Stufenhöhe V = 83% von V + VI

b = Stufenhöhe V + VI = 100%

$b - a$ = Stufenhöhe VI

$$b = \frac{100 a}{83}$$

$$b - a = \frac{100 a}{83} - a$$

$$x = m - \left(\frac{100 a}{83} - a \right)$$

3.4. Mephenytoin

Im Gegensatz zu den Mononitro-Verbindungen der anderen von uns untersuchten Antikonvulsiva zeigen die Nitromephenytoine (VIII und IX) eine ca. 17% höhere Stufe.

3.4.1.1. Direkte Polarographie von VIII

Siehe hierzu Tab. 12.

Tab. 12

VIII [μg]	Stufenhöhe [μA]
10	0,050
20	0,107
40	0,216
60	0,326
80	0,431
100	0,530

3.4.1.2. Polarographie nach Chromatographie

VIII und IX wandern im Fließmittelsystem Isopropanol/ $\text{CHCl}_3/\text{NH}_3$ bis zur Front, ebenso die nicht identifizierte Komponente aus der Nitriersäure [4].

Wir machten die Erfahrung, daß eine Auswertung von VIII und IX in Gegenwart dieser Nitriersäure-Komponente nicht möglich ist (schlechte Ausbildung der Polarogrammstufen, Streuungen der Werte bis 300%). Bei der Suche nach einem anderen Fließmittel fanden wir, daß die Nitro-Mephenytoine in weniger polaren bzw. nicht oder schwächer basischen Laufmitteln nicht quantitativ aus dem Startflecken herauswandern.

Wir lösten das Problem folgendermaßen:

Das Chromatogramm wurde nach unseren üblichen Bedingungen (s. Experimentelle Angaben) 2×45 min entwickelt (VIII + IX + Nitriersäure-Komponente in der Front). Nach gründlichem Trocknen der Platte (es darf kein NH_3 -Geruch mehr wahrnehmbar sein), wurde im Fließmittel Benzol/Methanol 95 + 5 (Vol.-T.) ca. 0,5 h in entgegengesetzter Richtung entwickelt. Der Nitriersäurefleck wanderte bis zur neuen Front, während VIII und IX diesmal nur einen R_f -Wert von ca. 0,75 hatten.

Die Auswertung des Chromatogramms erfolgte darnach wie üblich.

Mol.-Masse VII = 218,3;

Mol.-Masse VIII bzw. IX = 263,3 (Tab. 13).

Tab. 13

VII [μg] \rightarrow VIII + IX [μg]*	Stufenhöhe [μA]
10	12,05
20	24,1
30	36,15
40	48,2
60	72,3
80	96,4

*) Diese Mengen wären zu erwarten, wenn aus VII nur VIII u. IX entstünden.

Abb. 7 zeigt, daß VIII u. IX quantitativ vom Kieselgel eluierbar sind und zu 83% entstehen. Ein nicht identifiziertes Zersetzungsprodukt, das den R_f -Wert der Nitro-Phenobarbitale besitzt, ist polarographisch inaktiv und stört somit nicht deren Bestimmung.

Untere Nachweisgrenze für VIII u. IX: $3,5 \mu\text{g}/5 \text{ ml}$ ($\approx 2,7 \times 10^{-6}$ mol. Lösung).

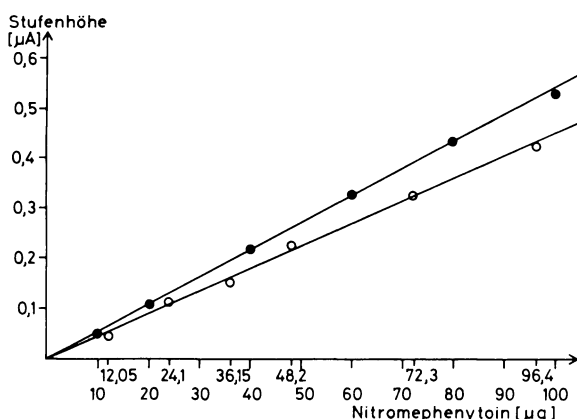


Abb. 7: Mephenytoin; ● s. Tab. 12, ○ = Tab. 13. Entstehungsrate VIII + IX: 83%.

3.4.2. Extraktion von Plasmen

Siehe hierzu Tab. 14.

Tab. 14

Eingesetztes VII in 3 ml Plasma [μg]	Stufenhöhe [μA]	Stufenhöhe [μA] $\times \frac{3}{2}$ *)
30	0,0320	0,0480
60	0,0665	0,0995
90	0,1035	0,1550
120	0,1440	0,2160
150	0,1860	0,2790

*) S. Fußnote zu Tab. 4.

3.4.3. Bestimmung der Extraktionsrate

Siehe hierzu Tab. 15 und Abb. 8.

Die Extraktionsrate für Mephenytoin aus Plasma beträgt 80%.

Als untere Nachweisgrenze errechneten wir $5,2 \mu\text{g}$ Mephenytoin/ml Plasma (s. Phenobarbital, Fußnote Abschnitt 3.1.3.). Wir fanden $5,5 \mu\text{g}/\text{ml}$.

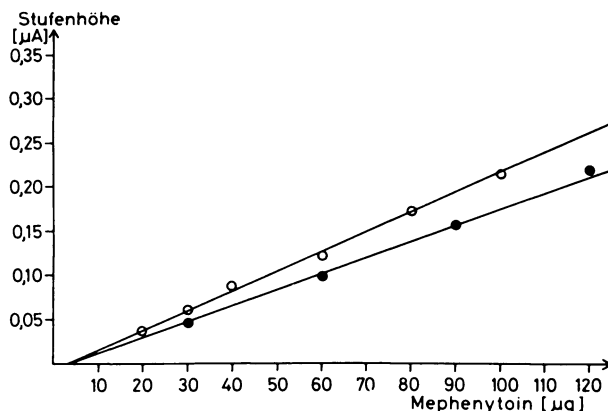


Abb. 8: Mephenytoin; ● s. Tab. 14, ○ s. Tab. 15. Extraktionsrate: 80%.

Tab. 15

VII [μg]/120 μl Nitriersäure	Stufenhöhe [μA]
20	0,0360
30	0,0595
40	0,0865
60	0,1210
80	0,1715
100	0,2125

3.5. Mephenytoin neben Phenobarbital

In der Therapie werden gelegentlich Phenobarbital und Mephenytoin kombiniert. Beide Stoffe lassen sich problemlos nebeneinander in der von uns für sie beschriebenen Weise bestimmen: nur muß man bei der DC in umgekehrter Richtung mit Benzol/Methanol darauf achten, daß II + III bei diesem zusätzlichen Chromatographievorgang nicht vom neuen Fließmittel erfaßt werden. Die neue Front mit der Nitriersäure-Komponente sollte sich etwa 1–2 cm unterhalb des Nitrophenobarbital-Flecken befinden.

3.6. Methylphenobarbital

Beim Nitrieren von Methylphenobarbital (X) entstehen p-Nitromethylphenobarbital (XI), m-Nitromethylphenobarbital (II) und o-Nitromethylphenobarbital (XII) [10]. Da XII sich von den Nebenprodukten gut durch DC trennen läßt, werteten wir nur XI aus.

3.6.1.1. Direkte Polarographie von XI

Siehe hierzu Tab. 16.

Tab. 16

XI [μg]	Stufenhöhe [μA]
20	0,095
40	0,192
60	0,286
80	0,392
100	0,484

3.6.1.2. Polarographie nach Chromatographie

Mol.-Masse X: 246,3;

Mol.-Masse XI: 291,3.

Tab. 17

X [μg] \rightarrow XI [μg]*	Stufenhöhe [μA]
20	23,7
30	35,6
40	47,4
60	71,1
80	94,8
100	118,5

*) Diese Mengen wären zu erwarten, wenn aus X ausschließlich XI entstünde.

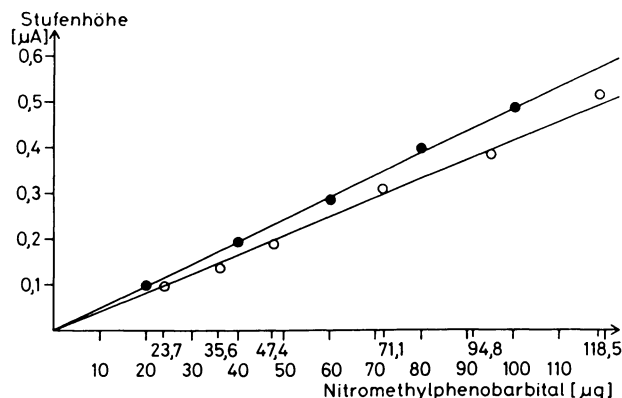


Abb. 9: Methylphenobarbital; ● s. Tab. 16, ○ s. Tab. 17. Entstehungsrate XI: 86%.

Aus Abb. 9 geht hervor, daß XI quantitativ eluierbar ist und zu 86% entsteht.

Untere Nachweisgrenze für XI: 4 µg/5 ml ($\approx 2,7 \times 10^{-6}$ mol. Lösung).

3.6.2. Extraktion von Plasmen

Siehe hierzu Tab. 18.

Tab. 18

Eingesetztes X in 3 ml Plasma [µg]	Stufenhöhe [µA] (für XI)	Stufenhöhe [µA] $\times \frac{3}{2}$ *)
30	0,0375	0,0565
60	0,0740	0,1110
90	0,1100	0,1650
120	0,1450	0,2175

*) s. Fußnote Tabelle 4.

3.6.3. Bestimmung der Extraktionsrate

Siehe hierzu Tab. 19 und Abb. 10.

Extraktionsrate für Methylphenobarbital aus Plasma: 86%. Die untere Nachweisgrenze berechneten wir mit 5,5 µg Methylphenobarbital/ml Plasma.

Tab. 19

X [µg] / 120 µl Nitriersäure	Stufenhöhe [µA]
20	0,0375
40	0,0805
60	0,1245
80	0,1685

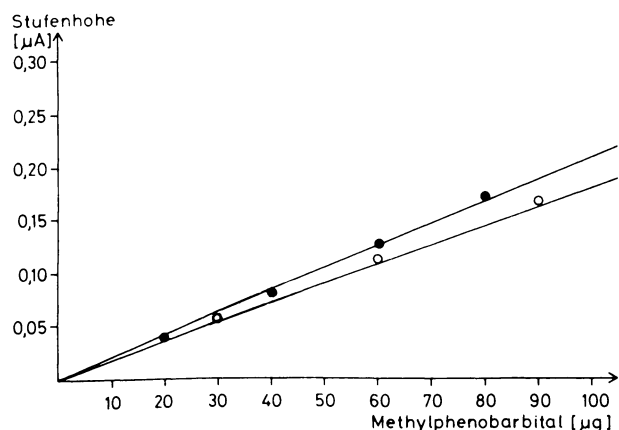


Abb. 10: Methylphenobarbital; ● s. Tab. 19, ○ s. Tab. 19. Extraktionsrate: 86%.

3.7. Primidon

m- und p-Nitroprimidon (XIV bzw. XV) werden in unserem DC-System nicht getrennt. Sie können gemeinsam polaro-

graphisch bestimmt werden, da XIV und das Gemisch XIV + XV gleiche Halbstufenpotentiale und gleiche Stufenhöhen ergeben (s. Tab. 1).

3.7.1.1. Direkte Polarographie von XIV

Siehe hierzu Tab. 20.

Tab. 20

XIV [µg]	Stufenhöhe [µA]
20	0,0890
40	0,1725
60	0,2640
80	0,3515
100	0,4350

3.7.1.2. Polarographie nach Chromatographie

Mol.-Masse XIII = 218,3;

Mol.-Masse XIV bzw. XV = 263,3 (Tab. 21).

Tab. 21

XIII [µg] → XIV + XV [µg]	Stufenhöhe [µA]
10	0,0540
20	0,1090
30	0,1625
40	0,2110
50	0,2680
60	0,3240
70	0,3585
80	0,4225

Aus Abb. 11 folgt, daß auch XIV + XV nach der Chromatographie quantitativ erfaßt werden.

Die untere Nachweisgrenze für XIV + XV beträgt 4 µg/5 ml Lösung ($\approx 3 \times 10^{-6}$ mol. Lösung).

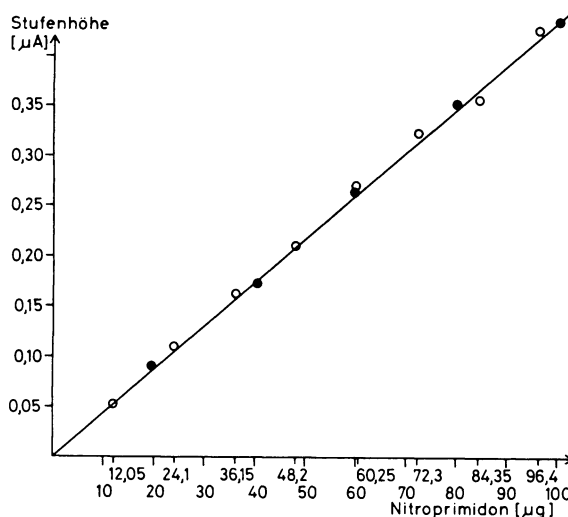


Abb. 11: Primidon; ● s. Tab. 20, ○ s. Tab. 21.

3.7.2. Extraktion von Plasmen

Siehe hierzu Tab. 22.

Tab. 22

Eingesetztes XIII in 3 ml Plasma [µg]	Stufenhöhe [µA]	Stufenhöhe [µA] $\times \frac{3}{2}$ *)
30	0,0435	0,0650
45	0,0665	0,1000
60	0,0840	0,1260
75	0,0995	0,1495
90	0,1280	0,1920
120	0,1700	0,2550

*) S. Fußnote zu Tab. 4.

3.7.3. Bestimmung der Extraktionsrate

Siehe hierzu Tab. 23 und Abb. 12.

Tab. 23

XIII [μ g] / 120 μ l Nitriersäure	Stufenhöhe [μ A]
10	0,0300
20	0,0485
30	0,0720
40	0,1005
50	0,1325
70	0,1820

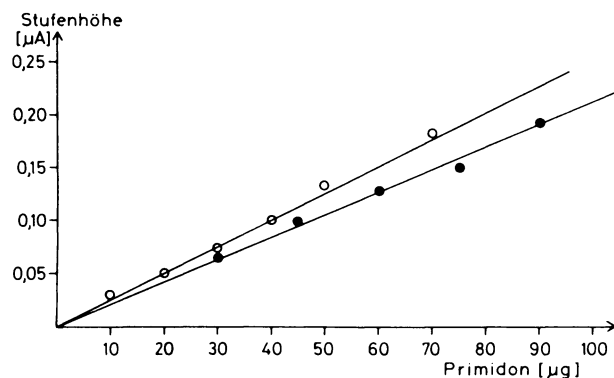


Abb. 12: Primidon; ● s. Tab. 22, ○ s. Tab. 23. Extraktionsrate: 84%.

Die Extraktionsrate für Primidon aus Plasma beträgt 84%.

Danksagung

Der Gesellschaft für Epilepsieforschung e. V., Bethel bei Bielefeld, danken wir verbindlich für die uns als Leihgabe zur Verfügung gestellte Polarographie-Ausrüstung. Herrn Prof. Dr. Karbowski und Herrn Dr. G. Jenzer, Inselspital Bern, sind wir für kooperative Zusammenarbeit zu Dank verpflichtet, dem Schweizerischen Serum- und Impfinstitut, Bern, für Humanplasmen. Herrn Doz. Dr. K. Butkiewicz, Warschau, danken wir für wesentliche Diskussionen; sein Besuch wurde freundlicherweise durch das Rektorat der Universität Bern finanziert.

4. Zusammenfassung

Es wird eine Methode zur Bestimmung der Antikonvulsiva Phenobarbital, Phenytoin, Mephentyoin, Methylphenobarbital und Primidon beschrieben, die auf der Nitrierung eines Serumextraktes mit nachfolgender dünnschichtchromatographischer Trennung und polarographischer Bestimmung beruht. Die Extraktionsausbeuten aus Plasma betragen: Phenobarbital 81%, Phenytoin 79%, Mephentyoin 80%, Methylphenobarbital 86% und Primidon 84%. Die Empfindlichkeitsgrenzen liegen zwischen 3,5 μ g/ml Plasma für Pheny-

toin und 5,5 μ g/ml für Mephentyoin und Methylphenobarbital. Diese Methode ist für die Bestimmung therapeutischer Blutspiegel geeignet. Der relativ geringe Arbeits- und Zeitaufwand gestattet es, sie in der Toxikologie ebenfalls anzuwenden. Die mittlere Abweichung liegt für die Antiepileptika, die mononitriert werden, zwischen $\pm 2,8\%$ bei 50 μ g/ml und $\pm 11,6\%$ bei 10 μ g/ml, für Phenytoin, das dinitriert wird, zwischen $\pm 0,6\%$ und $\pm 7,5\%$ bei 50 bis bzw. 5 μ g/ml. Von uns untersuchte Blutproben ambulanter Patienten enthielten neben anderen Substanzen Phenobarbital und Phenytoin. Nach Aufstellen von Eichkurven kann ohne inneren und äußeren Standard gearbeitet werden.

5. Summary

Polarographic Determination of Some Phenyl-substituted Anticonvulsive Drugs

A method is described to determine the anticonvulsive drugs phenobarbital, phenytoin, mephentyoin, methylphenobarbital and primidone. A serum extract is nitrated, separated by thin-layer chromatography, and the nitro compounds are determined by polarography. The rates of recovery are: phenobarbital 81%, phenytoin 79%, mephentyoin 80%, methylphenobarbital 86% and primidone 84%. The sensitivity limits range from 3.5 μ g/ml plasma for phenytoin to 5.5 μ g/ml for mephentyoin and methylphenobarbital. This method might be useful not only for determination of therapeutic blood levels but also for toxicology because it saves time and the expenditure of work is small. The mean deviation for mononitrated anticonvulsive drugs is $\pm 2.8\%$ (for 50 μ g/ml) and $\pm 11.6\%$ (for 10 μ g/ml). For phenytoin being dinitrated, the values are $\pm 0.6\%$ and $\pm 7.5\%$ for 50 μ g and 5 μ g, respectively). We determined blood levels of out-patients containing phenobarbital and phenytoin besides other substances. Having once established calibrating curves internal or external standards are not required.

6. Literatur

- [1] Woodbury, D. M., Penry, J. K., Schmidt, R. P., Antiepileptic Drugs, Raven Press, New York (1972) — [2] Kalvoda, R., Zýka, J., Čs. farmacie **2**, 154 (1953); zit. nach M. Březina u. P. Zuman, Die Polarographie in der Medizin, Biochemie und Pharmazie, S. 467, Akad. Verlagsgesellschaft Geest und Portig, Leipzig (1956) — [3] Brooks, M. A., De Silva, J. A. F., Hackman, M. R., Analytica Chimica Acta **64**, 165 (1973) — [4] Huisman, J. W., Clin. Chim. Acta **13**, 323 (1966) — [5] Oelschläger, H., Volke, J., Lim, G. T., Arch. Pharmaz. **298**, 213 (1965) — [6] Deininger, R., Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) **5**, 472 (1955) — [7] Rauen, M. H., Biochemisches Taschenbuch, 2. Teil, Springer-Verlag, Berlin, S. 93 (1964) — [8] Oelschläger, H., Oehr, H.-P., Lim, G. T., Pharm. acta Helv. **48**, 662 (1973) — [9] Fürst, W., Lauterbach, H., Daute, K.-H., Klust, E., Pharmaz. Zentralh. Deutschland **108**, 313 (1969) — [10] Wiegreb, W., Wehrhahn, L., Schlunegger, U. P., im Druck — [11] Březina, M., Zuman, P., vergl. [2], S. 695

Für die Verf.: Prof. Dr. W. Wiegreb, Pharmazeutisches Institut der Universität Bern, Hermann-Sahlí-Strasse 10, CH-3012 Bern (Schweiz)