

H.-D. Dell und R. Kamp

Bestimmung von Flufenaminsäure, deren Derivaten und analogen Verbindungen

Aus der Biochemischen Abteilung der Troponwerke, K.-Mülheim

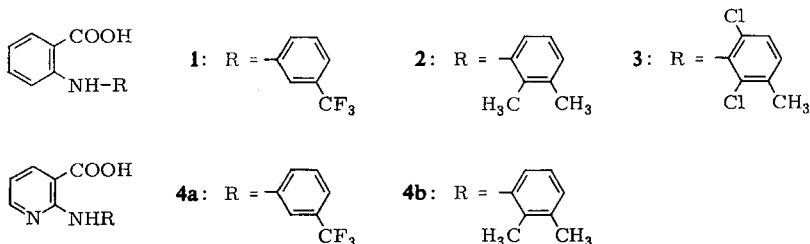
(Eingegangen am 19. Dezember 1969)

Flufenaminsäure ist UV-spektroskopisch bestimmbar. Empfindlicher und spezifischer ist der fluorimetrische Nachweis nach Überführung in Heterocyclen. Mit Formaldehyd wird 1-(m-Trifluormethyl-phenyl)-4-oxo-1,2-dihydro-3,1,4-benzoxazin, mit konz. H_2SO_4 (4) (2)-Trifluormethylacridon gebildet, die sich zur Analyse ($< 1 \gamma$) verwenden lassen. Der Einfluß von Substituenten wird am Beispiel von 16 Verbindungen untersucht. Bestimmungen aus biologischem Material werden angegeben.

Determination of Flufenamic Acid, Their Derivates and Analogous Compounds

Flufenamic acid is determined by UV-spectroscopic measurement. More sensitive and more specific are fluorimetric determinations after conversion of flufenamic acid to heterocyclic compounds. Reaction of flufenamic acid with formaldehyde or conc. H_2SO_4 gives 1-(m-trifluoromethylphenyl)-4-oxo-1,2-dihydro-3,1,4-benzoxazine, and (4)(2)-trifluoromethyl-acridone respectively, which can be used for analysis ($< 1 \gamma$). With 16 different compounds the influence of substituents is investigated. Determinations from biological material are presented.

Eine Reihe von N-Arylanthranilsäuren zeichnen sich durch antiinflammatorische Wirkung aus. So werden Flufenaminsäure*) (1), Mefenaminsäure (2), Meclofenamsäure (3) und die Pyridincarbonsäureanaloge von 1, die Niflumsäure (4a), sowie von 2, die Nixylinsäure (4b) therapeutisch eingesetzt oder klinisch erprobt.



Es gibt zahlreiche Publikationen über die pharmakologischen Wirkungen dieser Verbindungen, über den Stoffwechsel ist dagegen nur kurz referiert worden, so über

*) Hersteller: Troponwerke Köln-Mülheim.

die Flufenaminsäure¹⁾ und Mefenaminsäure²⁾ und den Einfluß des pH-Wertes auf die in vitro-Absorption von **1**³⁾. Experimentelle Daten über die Bestimmung dieser Verbindungen liegen nicht vor⁴⁾ 5). Im Zusammenhang mit biochem. Untersuchungen von Flufenaminsäurederivaten⁶⁾ benötigten wir empfindliche Bestimmungsmethoden. Über diese soll hier berichtet werden.

A) UV-spektroskopische Bestimmung

Flufenaminsäure ist gut löslich in Methanol, Äther und Chloroform. Sie kann bei 288 nm UV-spektroskopisch bestimmt werden:

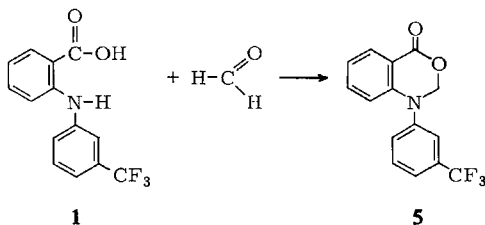
$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 545 \pm 20 \text{ (Lösung in 0,1 n NaOH).}$$

Zur Bestimmung in Harn genügt 3maliges Extrahieren mit dem doppelten Volumen Äther, Aufnehmen in 0,1 n NaOH und photometrischer Bestimmung bei 288 nm. Gegebenenfalls wird auf Kieselgel HF mit Benzol/Äthanol/Eisessig = 20/2/1 dc gereinigt, und es werden die betr. Plattenareale ausgewertet.

B) Fluorimetrische Bestimmung

Flufenaminsäure selbst besitzt keine starken Fluoreszenzeigenschaften. Solche können durch Überführen in Heterocyclus erhalten werden:

a) Cyclisierung von **1** mit Formaldehyd, z. B. durch Kochen alkoholischer Lösungen mit Formalin oder Formaldehyd-Begasung von **1** auf DC-Platten, führt zum fluoreszierenden 1-(m-Trifluormethyl-phenyl)-4-oxo-1,2-dihydro-3,1,4-benzoxazin (**5**).



Die Verbindung **5** besitzt in methanol. Lösung Anregungsmaxima bei 278 und 342 nm und ein Emissionsmaximum bei 440–450 nm. Mit dem Zeiss-Spektrophotometer MPQ II mit Fluoreszenzzusatz kann mit dem Filter 365 gearbeitet werden. Da sich **1** weder in Lösung noch auf der DC-Platte quantitativ zu **5** umsetzen läßt, ist eine bekannte **1**-Menge als Referenzsubstanz nötig, die man z. B. auf der DC-Platte neben den Analysenproben mit Formaldehyd begast. Im Bereich von 1–25 γ folgt **5** (bzw. das **5**-**1**-Gemisch) dem Lambert-Beerschen Gesetz.

¹⁾ H. Mathies und M. Eichhorn, Med. Mschr. 21, 510 (1967).

²⁾ Clin. Pharmacol. Therap. 9, 540 (1968).

³⁾ A. J. Aguiar und R. J. Fefelski, J. Pharmac. Sci. 55, 1387 (1966).

⁴⁾ A. J. Glazko und W. A. Dill, Bericht der Abtg. f. klinische Forschung, Parke Davis & Company (22. Mai 1964), ref. in ¹⁾.

⁵⁾ A. J. Glazko und W. A. Dill, to be published, ref. in ¹⁾.

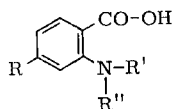
⁶⁾ H.-D. Dell und B. Kutschbach, in Vorbereitung.

Fluoreszenz nicht weiter zu steigern war. Der Einfluß der Säurekonzentration, bei konstanter Temperatur und Zeit, ergab, daß eine geringere Konzentration der Schwefelsäure nicht zur Cyclisierung ausreicht.

Der Einfluß von Substituenten auf die Fluoreszenz-Charakteristika

Da beim Abbau der Verbindungen im Körper u. a. mit der Einführung von Substituenten zu rechnen ist, interessierte der mögliche Einfluß von Substitutionen auf die Ausbildung der Excitations- und Emissionsmaxima. In Tab. 2 sind eine Reihe von N-Anthranilsäuren aufgeführt, die fluorimetrisch in konz. H_2SO_4 untersucht wurden.

Tabelle 2
Fluorimetrische Daten von Verbindungen der Formel



9

Nr.	R	R'	R''	$\lambda_{\max}$ (Excit.)	$\lambda_{\max}$ (Em.)	Empfindlichkeit/ Spaltbreite
9a	H		H	258 335 398 x xx xxx	456—462 (440)	2/8
b	H		H	266 342 398 xx xxx x	466—470	2/9
c	H		H	262 340 408 x xx xxx	478—480	2/9
d	Cl		H	266 350 398 xx xxx x 278 (384)	460—466	2/7
e	H		CO-CH ₃	262 342 398 x xx xxx	350 470	3/11
f	H		CO-C ₂ H ₅	264 340 398 x xx xxx	350 470	3/11
g	H		H	— — — (264 340 400) (x xx xxx)	— (348) (470—480)	2/11 4/11

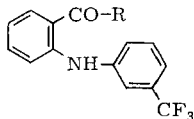
Zeichenerklärung: x, xx, xxx gibt nur die relative Stärke der drei Maxima zueinander an.

Aus der Tabelle geht hervor, daß die Verbindungen **9a-d**, je nach Stellung der Substituenten an den Phenylringen, eine unterschiedliche Reihenfolge der maximalen, mittleren oder minimalen Anregungsmaxima aufweisen. Die Bestimmung von 1 γ /ml Endlösung ist bei nur kleiner Geräteempfindlichkeit gut möglich, die Bestimmung N-substituierter Verbindungen dagegen nur bei größerer Geräteempfindlichkeit. Meclofenamsäure (**9g**) reagiert infolge besetzter o,o'-Stellung nicht. Die bei weit größerer Empfindlichkeit zu erfassende Verbindung könnte eine **9g**-Verunreinigung sein.

Der Einfluß der Carboxylgruppen-Substitution

Die Bildung fluoreszierender Verbindungen erfolgt durch Ringschluß, an der die Carboxylgruppe beteiligt ist. Daher werden Derivate mit veränderter Carboxylfunktion in die Untersuchung eingeschlossen (s. Tabelle 3).

Tabelle 3
Fluorimetrische Daten von Flufenaminsäurederivaten der Formel **10**



Nr.	Typ	R	$\lambda_{\max}$ (Excit.)	$\lambda_{\max}$ (Em.)	Empfindlichkeit/ Spaltbreite
10a	Säure	-OH	258 335 396-98 x xx xxx	460-466 (445-447)	2/7
b	Amid	-NH ₂	398 x	454-460	3/12
c	Amid	-N(CH ₂ -CH ₂ -OH) ₂	— — — (400)	— 460-465)	2/11 4/11
d	Ester	-O-CH ₂ -CH ₂ -OH	262 345 398 xx x xx	460-480	2/11
e	Ester	-O-CH ₂ -CH-CH ₂ OH OH	262 348 398-408 xxx xxx xxx	465-480	2/11
f	Ester-Säure	-O-CH ₂ -COOH	258 336 396 x xx xxx	356 (460-470)	3/11
g	Ester-Ester	-O-CH ₂ -CO-OC ₂ H ₅	258 336 398 x xx xxx	350-358 (450-470)	3/10
h	Ester-Nitril	-O-CH ₂ -C≡N	270 342 400 xx x xxx	350-355 (460-470)	3/11
i	Ester-Amid	-O-CH ₂ -CO-N(CH ₃) ₂	— — — 258 336 396	— 350 460-470)	2/11 4/11

Aus Tabelle 3 ist ersichtlich, daß Flufenaminsäure und ihre Ester gut cyclisierbar sind. Schwieriger verläuft die Cyclisierung, wenn am Esteralkylrest weitere funktionelle Carbonsäuregruppen (Carbonsäure, Ester, Amid oder Nitril) sitzen. Hierbei sind die Amidderivate am schwersten cyclisierbar. Man erkennt am Ester-Amid (**10i**), daß hier eine Umwandlung über die Ester-Säure (**10f**) erfolgt. Auch die einfachen Amide (**10b** und **10c**) sind schwer cyclisierbar.

Es ist also unter Einhaltung bestimmter Cyclisierungsbedingungen möglich, Flufenaminsäure und ihre Ester zu erfassen, während deren Derivate noch nicht cyclisiert werden. Ester und Säure sind durch Extraktion bei verschiedenem pH-Wert vorher zu trennen. Zur Untersuchung von Reaktionsansätzen und galenischen Präparaten usw. eignet sich die Extraktion mit Chloroform, Äther, Benzol u. a. Lösungsmitteln, Befreien vom Lösungsmittel am Rotavapor, Aufnehmen des Rückstandes in Schwefelsäure, Ringschluß durch 20 min. Erhitzen auf 100° und anschließende fluorimetrische Bestimmung.

Aus biologischen Flüssigkeiten und Organhomogenaten werden unter diesen Bedingungen zahlreiche Verbindungen mitextrahiert, welche durch Reaktion mit konz. Schwefelsäure stören. In diesen Fällen müssen die Extrakte, oder aliquote Teile davon, dünnschichtchromatographisch gereinigt werden. Die betr. Plattenbezirke werden abgeschabt, mit Schwefelsäure geschüttelt, erhitzt, zentrifugiert und die entstandenen Acridone fluorimetrisch bestimmt. Die Blindwerte sind bei dieser Arbeitsweise niedrig. Es lassen sich $< 1 \gamma/\text{ml}$ erfassen.

Die beiden Methoden der fluorimetrischen Bestimmungen ergänzen sich also und ermöglichen Untersuchungen in Konzentrationsbereichen, in denen die UV-Spektroskopie versagt.

Beschreibung der Versuche

Die untersuchten Verbindungen wurden uns von den Herren Dr. K.-H. Boltze und Dr. O. Brendler (Chemische Forschungsabteilung der Troponwerke) zur Verfügung gestellt.

Die fluorimetrischen Bestimmungen erfolgten mit dem Fluoreszenzspektrophotometer MPF-2A (Hitachi-Perkin-Elmer), die UV-Spektren wurden mit dem registrierenden Photometer DMR 21 (Carl Zeiss, Oberkochen) aufgenommen.

DC wurde in Normalkammern und Sandwichkammern auf selbstgestrichenen Platten mit Kieselgel HF (E. Merck), Schichtdicke 250 μ , durchgeführt.

Darstellung von 1-(m-Trifluormethyl-phenyl)-4-oxo-1,2-dihydro-3,1,4-benzoxazin (**5**)

10 g Flufenaminsäure wurden in 20 ml Alkohol gelöst, 11,8 g 37proz. Formalin-Lösung zugesetzt und 1 Std. unter Rückfluß gekocht, der Ansatz in 250 ml Wasser gegossen und das ausgeschiedene Rohprodukt abgesaugt. Es wurde in Essigester gelöst, mehrfach mit 2 n Na_2CO_3 zur Entfernung von Flufenaminsäure ausgeschüttelt, der Essigester mit Wasser neutral gewaschen, getrocknet, eingeeengt und **5** durch mehrfache Rekrist. aus Cyclohexan gereinigt. Ausbeute 5,4 g = 50% d. Th., farbl. Blättchen vom Schmp. 80°.

$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{NO}_2$ (295,3)	Ber.: C 61,40	H 3,44	N 4,78
	Gef.: C 61,45	H 3,51	N 4,74

Nachweis von Flufenaminsäure als **5** und Identitätsnachweis

5 ml Urin einer freiwilligen Versuchsperson, die mit Flufenaminsäureglycerinester (**10e**) behandelt war, wurden mit 5 ml Wasser und 1 ml 2 n NaOH versetzt und 3mal mit je 20 ml Äther extrahiert (Extrakt E). Der natronalkalische Urin wurde mit HCl angesäuert und ebenfalls mit Äther extrahiert (Extrakt S: = Säure). Nach Waschen des Extraktes S, Trocknen über Na_2SO_4 , Absaugen von Trockenmittel, Einengen zur Trockne, Aufnehmen in Methanol und Auftragen auf eine Kieselgel-HF-Platte wurde mit dem Fließmittelsystem Benzol/Äthanol/Eisessig = 20/2/1 entwickelt. Neben den Proben wurden 1–5 γ I aufgetragen. Danach wurde die trockene Platte in eine Kammer gestellt, auf deren Boden sich ein Wägegläschen mit Polyformaldehyd und einigen Tropfen konz. H_2SO_4 befand. Die geschlossene Kammer wurde in einen passenden Kunststofftrog gesetzt, dessen Ein- und Ausflußöffnung mit einem Thermostaten verbunden war. Nach 2stdg. Erwärmen auf 80° wurde die Platte aus der Kammer genommen, die stark fluoreszierenden Bereiche markiert, abgeschabt, in Schliffzentrifugengläser gegeben und mit 5 ml Methanol geschüttelt, danach zentrifugiert und die Lösungen fluorimetrisch untersucht.

Sowohl die Rf-Werte, als auch die Fluoreszenzspektren bewiesen, daß die fluoreszierenden Verbindungen mit dem Syntheseprodukt **5** identisch sind.

Prüfung der Cyclisierungsmöglichkeit von N-Arylanthranilsäuren mit Formaldehyd

Nach der oben beschriebenen Methode wurden der Extrakt E und die Extrakte von Mefenaminsäure (**2**), Meclofenamsäure (**3**), **9a**, **9b** und **9d** dc getrennt, in der Wärme mit Formaldehyd begast und untersucht. Während der Extrakt E (Ester) oder **10e** keine Reaktion gaben, wurden alle eingesetzten freien N-Arylanthranilsäuren in fluoreszierende Benzoxazine überführt. Dagegen gelingt die Cyclisierung in Lösung mit Meclofenamsäure analog **5** nicht.

4- und 2-Trifluormethylacridone (**6a** und **6b**)

Das Isomerengemisch wurde durch 20 Min. Erhitzen von Anthranilsäure in konz. H_2SO_4 auf 100° (Wasserbad), Abkühlen und Gießen auf Eis, Waschen des ausgefallenen Rohproduktes und Rekrist. aus wäßr. Pyridin bereitet. Die einzelnen Isomere wurden in mehrstufiger Synthese unter Einschluß von SC⁷) dargestellt.

Nachweis von Flufenaminsäure als **6a**—**6b**-Gemisch

a) 10 ml **1** haltiger Urin wurde mit 1 ml 2 n HCl versetzt, 3mal ausgeäthert, die vereinigten Ätherphasen über Na_2SO_4 getrocknet, vom Trocken- und Lösungsmittel befreit und der Rückstand in 1 ml Methanol aufgenommen. Aliquote Teile (z. B. 20 μl) wurden 1mal dc in der Sandwich-Kammer und 1mal in der Normal-Kammer getrennt (Kieselgel HF, Benzol/Äthanol/Eisessig = 20/2/1), danach 20 Min. bei 100° getrocknet und die betr. Bezirke von der Platte abgeschabt, mit konz. H_2SO_4 geschüttelt, 20 Min. bei 100° gehalten, zentrifugiert und der klare Überstand fluorimetrisch ausgewertet. Extraktion und Bestimmung verlaufen quantitativ (z. B. wurden von 5,0 γ I 5,06 γ bestimmt; Gehalt der Endlösung).

b) 5 ml **1**-haltiges Serum wird angesäuert, 3mal mit 25 ml Äther extrahiert und wie oben beschrieben verfahren.

c) 5 ml Vollblut werden entsprechend behandelt.

Serum wie Vollblut geben nicht die Gesamtmenge der Flufenaminsäure ab. Daher muß einer Probe eine bekannte Menge **1** zugesetzt werden, die als innerer Standard zur Berechnung notwendig ist.