

## 11. Die Bestimmung von Sulfonamiden in biologischem Material

### Vergleichende Untersuchungen der kolorimetrischen und der radiochemischen Methode an $^{35}\text{S}$ -Sulfaphenazol<sup>1)</sup>

von W. Padowetz, K. Schmid und J. Druey

(15. XI. 60)

**1. Einleitung** – Sulfonamide lassen sich auf Grund ihrer aromatischen Aminogruppe leicht in einen Azofarbstoff überführen. Auf dieser Reaktion beruht die zur Bestimmung in biologischem Material meist angewandte kolorimetrische Methode. Vor der Ausführung der Farbreaktion ist bei eiweisshaltigen Proben eine Ausfällung der Eiweisskörper notwendig. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass Sulfonamide im Organismus teilweise an der aromatischen Aminogruppe acetyliert werden. Der Bestimmung der Gesamt-Sulfonamidkonzentration muss daher eine Hydrolyse dieses Anteils vorangehen.

Eine erste ausführliche Methode wurde von BRATTON & MARSHALL<sup>2)</sup> speziell für Sulfanilamid beschrieben und in der Folgezeit auch für die Bestimmung anderer Sulfonamide übernommen. Schon BRATTON & MARSHALL stellten jedoch fest, dass bei der Enteiweissung der biologischen Proben Verluste an Sulfonamid auftreten. Diese Verluste sind bei den verschiedenen Sulfonamiden und bei verschiedenen Tierarten unterschiedlich, und es ist daher verständlich, dass bei Anwendung der bekannten Methode auf neue Sulfonamide oft nur unbefriedigende Resultate erhalten wurden. Wohl konnten in speziellen Fällen durch Variation der Fällungsbedingungen, wie Fällung in der Hitze<sup>3)</sup> bzw. in grösserer Verdünnung<sup>4)</sup>, sowie durch Änderungen der Reaktionsbedingungen<sup>5)</sup> gewisse Verbesserungen erzielt werden. Nach wie vor bieten jedoch die Sulfonamidverluste bei der Eiweissfällung die Hauptschwierigkeit der Bestimmung in biologischem Material, und vielfach wird die Bestimmung auf Serum oder Plasma<sup>6)</sup> beschränkt, wo die Verluste geringer sind und daher zuverlässigere Werte erhalten werden.

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit über die Bestimmung einer Reihe von Sulfonamiden (Sulfisoxazol, Sulfadimethoxin, Sulfathiazol u. a. m.) stellten ROSENTHAL & JUD<sup>7)</sup> sowohl bei Vollblut als auch bei Serum beträchtliche Sulfonamidverluste fest (bis zu 27%). Die Berücksichtigung von Korrekturfaktoren ist daher nach diesen Autoren zur Bestimmung von Sulfonamiden unbedingt erforderlich.

<sup>1)</sup> Sulfaphenazol, 3-(p-Aminobenzolsulfonamido)-2-phenyl-pyrazol, Orisul® (CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel).

<sup>2)</sup> C. A. BRATTON & E. K. MARSHALL, JR., *J. biol. Chemistry* **128**, 537 (1939).

<sup>3)</sup> J. DRUEY & G. OESTERHELD, *Helv.* **25**, 753 (1942).

<sup>4)</sup> J. V. SCUDI & H. J. ROBINSON, *J. Lab. clin. Med.* **25**, 409 (1950).

<sup>5)</sup> S. W. LEE, N. B. HANNAY & W. C. HAND, *Ind. Engng. Chemistry, analyt. Ed.* **15**, 403 (1943).

<sup>6)</sup> F. W. SUNDERMAN & D. S. PEPPER, *Amer. J. med. Sci.* **200**, 790 (1940); F. PORTWICH & A. BÜTTNER, *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* **229**, 75 (1956).

<sup>7)</sup> H. L. ROSENTHAL & L. JUD, *J. Lab. clin. Med.* **54**, 461 (1959).

In den letzten Jahren wurden in unserem Laboratorium Bestimmungen verschiedener Sulfonamide in biologischen Proben ausgeführt<sup>8)</sup> 9). Auch dabei zeigte sich, dass befriedigende Resultate nur unter Berücksichtigung von Korrekturfaktoren erhalten werden konnten. Am speziellen Beispiel des Sulfaphenazols untersuchten wir mit Hilfe eines <sup>35</sup>S-markierten Präparates im Vergleich mit radiochemischen Messungen die kolorimetrische Methode, um über ihre Genauigkeit und Leistungsfähigkeit ein eindeutiges Bild zu erhalten.

**2. Kolorimetrische Methode.** – Die Farbreaktion wurde zunächst mit reinen, wässrigen Sulfaphenazol-Lösungen überprüft. Im Bereich von 0 bis 20 mg/100 ml ist die Eichkurve linear und folgt dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz. Die Diazotierungsreaktion ist temperaturabhängig (im Bereich von 20 bis 25°–0,4% pro 1°) und wird daher im Wasserbad bei 25° ausgeführt. Da die Natriumnitritlösung und die Lösung der Kupplungskomponente nur wenig stabil sind, ist es anzuraten, stets mit frisch bereiteten Reagentien zu arbeiten.

Die Verseifungsbedingungen zur Bestimmung der Gesamt-Sulfonamidkonzentration wurden kontrolliert und sind auch für reines Acetylsulfaphenazol voll ausreichend. Der Vollständigkeit halber geben wir die genaue Arbeitsvorschrift wieder.

2.1. *Bestimmung in Vollblut.* 1 ml Blut wird in 5 ml dest. Wasser hämolysiert; man fällt das Eiweiss mit 10 ml Säuregemisch, schüttelt gut durch und filtriert nach kurzem Stehen.

Freies Sulfonamid: 5 ml des klaren Filtrates werden in ein 10-ml-Masskölbchen pipettiert und mit 1 ml Natriumnitritlösung versetzt. Nach 5 Min. wird das überschüssige Nitrit durch Zugabe von 1 ml Sulfaminsäurelösung zerstört. Nach kräftigem Schütteln zur Entfernung des freigesetzten Stickstoffes versetzt man mit 1 ml Lösung der Kupplungskomponente. Nach 10 Min. ist das Maximum der Farbintensität erreicht; man füllt mit Alkohol auf 10,0 ml auf und misst nach gutem Durchmischen die Extinktion bei 546  $\mu$  und einer Schichtdicke von 10 mm.

Gesamtes Sulfonamid: 5 ml des Blutfiltrates werden in ein 10-ml-Masskölbchen pipettiert und 1 Std. im kochenden Wasserbad hydrolysiert. Nach dem Abkühlen wird die Farbreaktion wie oben beschrieben ausgeführt.

Koagulation der Blutproben kann ohne Störung der Bestimmung durch Oxalatzusatz verhindert werden. Koagulierte Proben sind unbedingt zu homogenisieren. Es erscheint ausserdem wichtig, die Proben in möglichst frischem Zustand zu verarbeiten.

2.2. *Bestimmung im Harn und anderem biologischem Material.* Da Harnproben teilweise hohe Sulfonamidgehalte aufweisen, sind vor der Bestimmung in diesem Fall entsprechende Verdünnungen vorzunehmen. Von der so vorbereiteten Probe wird 1 ml mit 5 ml Wasser und 10 ml Säuregemisch versetzt. In den meisten Fällen liegt eine klare Lösung vor, so dass die Filtration entfallen kann. Je 5 ml der Lösung werden wie bei der Bestimmung im Blut weiterverarbeitet.

Die Bestimmung im Plasma, Serum bzw. Erythrozyten erfolgt wie beim Blut beschrieben. Von Organ- bzw. Gewebeproben wird 1 g mit ca. 1 g ausgeglühtem Quarzsand verrieben. Der homogenisierte Brei wird mit Anteilen einer Mischung aus 10 ml Säuregemisch und 5 ml Wasser verrieben und auf ein Filter gespült. Das klare Filtrat wird wie üblich weiterverarbeitet.

2.3. *Reagentien.* – Säuregemisch: 120 ml 10-proz. Trichloressigsäure und 100 ml 1N Salzsäure werden kurz vor Gebrauch gemischt. – Natriumnitrit: 0,1-proz. wässrige Lösung. – Sulfaminsäure: 0,5-proz. wässrige Lösung. – Kupplungskomponente:  $\alpha$ -Naphthyl-äthylendiamin-dihydrochlorid, 0,1-proz. wässrige Lösung.

**3. Radiochemische Methode.** – Für die radiochemischen Untersuchungen der Sulfonamidgehalte in biologischem Material wurde <sup>35</sup>S-markiertes Sulfaphenazol verwendet. Zur Bestimmung der Radioaktivität der Proben wird wie folgt verfahren<sup>10)</sup>:

<sup>8)</sup> L. NEIPP, W. PADOWETZ, W. SACKMANN & J. TRIPOD, Schweiz. med. Wschr. 88, 835, 858 (1958).

<sup>9)</sup> K. SCHMID, J. TRIPOD & F. GROSS, Klin. Wschr. 38, 862 (1960).

<sup>10)</sup> Ausführliche Angaben über die Darstellung des markierten Präparates sowie die Bestimmungsmethode finden sich in der vorangehenden Arbeit; K. SCHMID, Helv. 44, 84 (1961).

Eine abgewogene bzw. abpipettierte Probe des biologischen Materials wird nach Ausfrieren im Vakuum zur Trockne gebracht. Der Trockenrückstand wird mit Natriumperoxyd aufgeschlossen und das erhaltene Sulfat als Bariumsalz isoliert. Zur Radioaktivitätsmessung werden von dem so erhaltenen Bariumsulfat Plättchen «unendlich» dicker Schicht hergestellt und unter einem Methan-Durchfluss-Zählrohr (Mod. FRIESEKE & HÖPFNER) auf eine vorgewählte Impulszahl ausgezählt, so dass der einzelne Messwert einen mittleren statistischen Fehler von  $\pm 1\%$  aufweist.

Bei Blut-, Plasma- und Gewebeproben wurde in manchen Fällen die Arbeitstechnik vereinfacht: Von fein pulverisierten bzw. lyophilisierten Trockenproben wurden direkt Plättchen «unendlich» dicker Schicht gepresst und ausgezählt.

Die nach beiden Methoden erhaltenen Messergebnisse wurden unter Berücksichtigung der für die Versuche eingesetzten Radioaktivität in die entsprechenden Mengen Sulfaphenazol umgerechnet.

Radiochromatographie: 1–2 ml Blut wurden 20 Min. mit 10 ml Essigester kräftig geschüttelt. Aliquote Teile der organischen Phase wurden nach Filtration eingedampft, mit Alkohol quantitativ auf Papier (WHATMAN Nr. 1) aufgetragen und im System BUSH C chromatographiert. Zur Radioaktivitätsbestimmung wurden aus dem getrockneten Chromatogramm kleine Streifen herausgeschnitten, auf Aluminiumplättchen aufgeklebt und wie oben ausgezählt. Sulfaphenazol:  $R_f = 0,54$ ; Acetylsulfaphenazol:  $R_f = 0,31$ .

**4. Versuchsergebnisse und Diskussion.** – Die einfachsten Verhältnisse bei der kolorimetrischen Bestimmung von Sulfonamiden in biologischem Material ergeben sich bei *Harnproben*, da diese sich annähernd wie rein wässrige Lösungen verhalten. Bei Zusatz von freiem wie auch von acetyliertem Sulfaphenazol wurden die zuge-

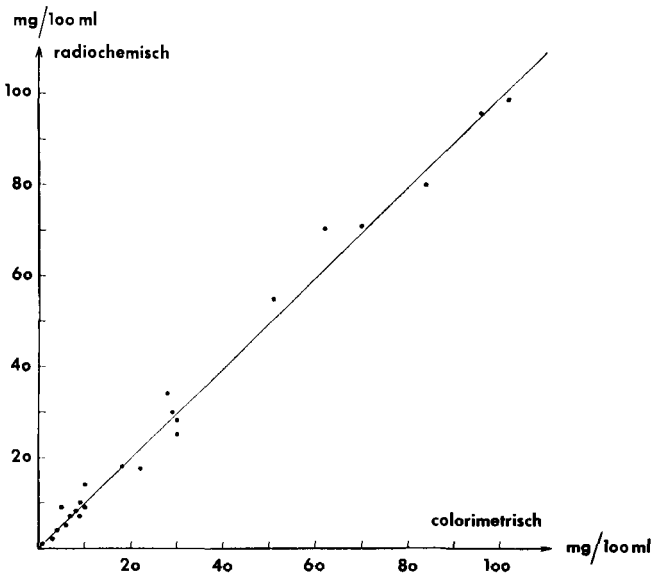


Fig. 1. Kolorimetrisch und radiochemisch gefundene Sulfaphenazol-Konzentrationen in Kaninchenharnproben

setzten Mengen quantitativ wiedergefunden. Die Eigenfärbung der Harnproben stört praktisch nicht, dagegen wurde bei den meisten Normalharnen ein geringer Blindwert festgestellt, der auf nicht näher bekannte diazotierbare Substanzen im Harn zurückgeführt werden muss. Jedoch fällt dieser Blindwert nur ins Gewicht, wenn unverdünnte Proben zur Analyse gelangen, was in der Regel nicht der Fall ist.

Fig. 1 zeigt eine Gegenüberstellung kolorimetrisch und radiochemisch gefundener Resultate an Harnproben von Kaninchen nach peroraler bzw. intravenöser Gabe von  $^{35}\text{S}$ -Sulfaphenazol. Jeder aufgezeichnete Punkt repräsentiert die an der gleichen Harnprobe sowohl kolorimetrisch als auch radiochemisch gefundene Gesamt-Sulfonamidkonzentration. Die Punkte liegen innerhalb tolerierbarer Streuungen auf der theoretisch zu erwartenden Geraden. Bei Harnproben sind also die kolorimetrische und radiochemische Bestimmung von Sulfaphenazol gleichwertig. Damit ist auch erwiesen, dass Sulfaphenazol im Harn von Kaninchen nicht in Form eines Metaboliten ausgeschieden wird, der durch die kolorimetrische Bestimmung nicht erfasst wird.

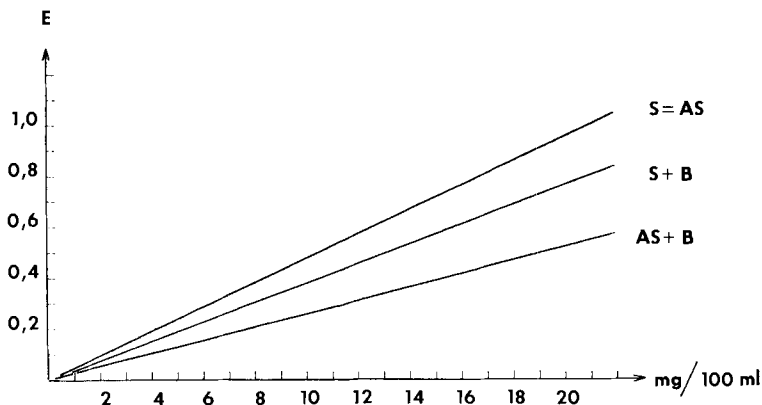


Fig. 2. Eichkurve von Sulfaphenazol (S) bzw. Acetylsulfaphenazol (AS) und Eichkurven mit Blutzusatz

Bei *Blutproben* ist vor der kolorimetrischen Bestimmung eine Eiweissfällung erforderlich. Die dabei auftretenden Verhältnisse werden durch Fig. 2 wiedergegeben. Die Gerade S stellt die Eichkurve dar, die mit reinen wässrigen Sulfaphenazol-Lösungen erhalten wird. Bei Zusatz-Versuchen, d. h. bei Ausführung der Eichkurve unter Zusatz von Normalblut, ergibt sich die Gerade S + B. Die Unterschiede der beiden Geraden veranschaulichen die durch die Eiweissfällung bedingten Sulfonamidverluste. Dasselbe gilt für die unter Blutzusatz aufgenommene Eichkurve des Acetylsulfaphenazols AS + B. Bei radiochemischer Überprüfung liessen sich im ausgefällten Eiweiss die den Sulfonamidverlusten entsprechenden Mengen  $^{35}\text{S}$  nachweisen. Andererseits ergaben kolorimetrische Untersuchungen, dass die Farbreaktion durch eiweissfreie Blutfiltrate nicht beeinflusst wird.

Versuche, die Adsorption des Sulfonamids am ausgefällten Eiweiss zu vermindern, schlugen fehl. Änderungen der Fällungsbedingungen, Ersatz der Trichloressigsäure durch andere Eiweissfällungsmittel, Zusätze von Lösungsmitteln und oberflächenaktiven Stoffen bewirkten nur unmerkliche Verbesserungen. In all diesen Versuchen enthielten die Eiweissfällungen radiochemisch nachweisbare Mengen von Sulfonamid. Allein durch Verdünnung der Proben im Verhältnis 1:100 bis 1:150 wird die Adsorption soweit zurückgedrängt, dass sie vernachlässigt werden kann. Jedoch kommen solch grosse Verdünnungen der Extrakte für die Praxis nicht in Frage. Die Ergebnisse der Verdünnungsversuche entsprechen in guter Annäherung einer FREUNDLICH'schen Adsorptionsisotherme.

Die in Zusatz-Versuchen erhaltenen Ergebnisse wurden an nativen Blutproben überprüft. Zwei Kaninchen wurden *i. v.* 100 mg/kg <sup>35</sup>S-Sulfaphenazol als Natriumsalz-Lösung injiziert. Nach 15 Minuten wurde das gesamte Blut entnommen und mit Normalblut in verschiedenen Verhältnissen exakt verdünnt. Die so erhaltenen Proben wurden nach den unter 2.1. bzw. 3 angegebenen Arbeitsvorschriften jeweils in Doppelbestimmungen sowohl kolorimetrisch wie radiochemisch untersucht und führten zu den in Tab. 1 aufgeführten Resultaten.

Tabelle 1. *Ergebnisse der <sup>35</sup>S-Sulfaphenazol-Bestimmung in Kaninchen-Vollblut*

Ver-such	Verdün-nungsfaktor	mg/100 ml radio-chemisch  gesamt	mg/100 ml kolorimetrisch			
			unkorr. <sup>a)</sup>		einf. korr. <sup>b)</sup>	doppelt korr. <sup>c)</sup>
			frei	gesamt	gesamt	gesamt
1	2	3		4	5	
A	1,00	21,5	9,0	14,6	18,1	21,4
	1,21	18,1	7,3	12,3	15,3	18,1
	1,53	14,2	5,9	10,2	12,7	15,1
	2,00	10,8	4,6	7,7	9,5	11,3
	2,99	7,6	3,2	5,2	6,4	7,6
	5,80	3,8	1,6	2,7	3,4	4,0
B	1,00	26,5	16,6	19,5	24,2	25,9
	1,21	21,9	13,2	15,9	19,8	21,3
	1,50	17,9	11,0	13,1	16,2	17,4
	2,01	13,6	8,0	9,6	12,0	12,9
	2,96	9,7	5,6	6,7	8,3	8,9
	5,81	5,0	3,0	3,5	4,3	4,6

a) Unkorrigierte Werte:  $E_f/f_S = \text{mg}/100 \text{ ml}$  freies Sulfonamid;  $E_g/f_S = \text{mg}/100 \text{ ml}$  gesamtes Sulfonamid.  
 b) Einfach korrigierte Werte:  $E_g/f_{S+B} = \text{mg}/100 \text{ ml}$  gesamtes Sulfonamid.  
 c) Doppelt korrigierte Werte:  $E_g - E_f = E_a$ ;  $E_a/f_{AS+B} = \text{mg}/100 \text{ ml}$  acetyliertes Sulfonamid;  $E_f/f_{S+B} = \text{mg}/100 \text{ ml}$  freies Sulfonamid.  
 $E_f =$  gefundene Extinktion für freies Sulfonamid;  $E_g =$  gefundene Extinktion für gesamtes Sulfonamid;  $E_a =$  als Differenz berechnete Extinktion für acetyliertes Sulfonamid.  
 $f_S =$  Steigung der Geraden S in Fig. 2;  $f_{S+B} =$  Steigung der Geraden S+B in Fig. 2;  $f_{AS+B} =$  Steigung der Geraden AS+B in Fig. 2.

Kolonne 1 gibt die jeweils angewandten Verdünnungen an, Kolonne 2 die radiochemisch gefundenen Werte. Für Kolonne 3 wurden die Extinktionswerte nach der Eichkurve S (Fig. 2), also ohne jede Korrektur ausgewertet. In der Kolonne 4 sind die Werte allein mittels der in Zusatz-Versuchen erhaltenen Korrekturfaktoren für freies Sulfaphenazol (Gerade S + B) berechnet. Mit dieser einfachen Korrektur liegen die Werte jedoch im Mittel um 12,4% tiefer als die radiochemischen. Eine analytisch befriedigende Übereinstimmung ergibt sich erst bei einer doppelten Korrektur (Kolonne 5), d. h. wenn sowohl der Korrekturfaktor für freies Sulfonamid als auch der davon stark unterschiedliche Faktor für acetyliertes Sulfonamid (siehe Fig. 2, Gerade A + B) berücksichtigt wird.

Auf Grund der Resultate dieser speziellen Versuche kann Sulfaphenazol im Blut bei entsprechendem analytischem Aufwand exakt bestimmt werden. Im Hinblick auf die praktische Ausführung von Routinebestimmungen ist jedoch zu bemerken, dass der Effekt der doppelten Korrekturen nur bei höherem Acetylierungsgrad besonders deutlich in Erscheinung tritt. Zudem darf bei kritischer Betrachtung nicht übersehen werden, dass die Korrekturfaktoren nicht mit beliebiger Genauigkeit bestimmt werden können. Dies liegt daran, dass die Sulfonamidverluste bei der Eiweissfällung vom Eiweissgehalt der Proben abhängig sind, der auch innerhalb der gleichen Art von Probenmaterial gewissen Schwankungen unterworfen ist. Für die in Tabelle 1 aufgeführten Resultate wurden die Korrekturfaktoren jeweils am gleichen Blut bestimmt. Weiterhin ergibt sich der für die zweite Korrektur notwendige acetylierte Anteil als Differenz zweier Bestimmungen und ist somit mit einer grösseren Ungenauigkeit behaftet. Dies trat bei der rechnerischen Auswertung von über 180 Blutproben, die routinemässig sowohl kolorimetrisch als auch radiochemisch untersucht wurden, deutlich zu Tage. Die einfache Korrektur der Resultate ergab im Mittel  $88,6 \pm 8,5\%$ , die doppelte Korrektur im Mittel  $102,4 \pm 19,2\%$  der entsprechenden radiochemischen Mittelwerte.

Das Vorliegen von Metaboliten, die durch die kolorimetrische Farbreaktion nicht erfasst werden, kann auch für Blut auf Grund der Übereinstimmung der beiden analytischen Methoden praktisch ausgeschlossen werden. Zum gleichen Resultat führten ebenfalls radiochromatographische Untersuchungen von Blutextrakten, die lediglich das Vorhandensein von freiem und acetyliertem Sulfaphenazol anzeigten. Die radiochromatographische Arbeitsweise erlaubt auch die getrennte radiochemische Bestimmung des freien und des acetylierten Anteils.

Bei Serum und Plasma treten ebenfalls Verluste bei der Eiweissfällung auf, die zwar geringer sind als bei Blutproben, aber dennoch die Anwendung von Korrekturfaktoren erfordern. Andere biologische Proben<sup>9)</sup> (Organe, Gewebe) bieten grössere Schwierigkeiten bei der Extraktion und der genauen Bestimmung der Korrekturfaktoren, so dass in diesen Fällen mit der radiochemischen Methode zuverlässigere Werte erhalten werden.

#### SUMMARY

A known colorimetric method for the determination of sulfonamides in biological media has been modified and checked by means of radio-assay using a <sup>35</sup>S labelled sulfonamide. Attention is drawn to the loss of sulfonamides during precipitation of proteins. It is shown that an accurate evaluation of results is only possible by using a calibration curve plotted on the basis of relevant recovery experiments.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,  
Pharmazeutische Abteilung

---