

CHROM. 10,856

## NACHWEIS VON SULFAMETHOXAZOL UND N<sup>4</sup>-ACETYL-SULFAMETHOXAZOL IN BIOLOGISCHEN FLÜSSIGKEITEN DURCH HOCHDRUCK-FLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE IN UMGEKEHRTER PHASE\*

KLAUS HARZER

*Chemisches Untersuchungsamt der Landeshauptstadt Stuttgart, Staffenbergstrasse, 7000 Stuttgart 1 (B.R.D.)*

(Eingegangen am 30. September 1977; geänderte Fassung eingegangen am 6. Januar 1978)

---

### SUMMARY

*Detection of sulfamethoxazol and N<sup>4</sup>-acetylsulfamethoxazol in biological fluids by reversed-phase high-pressure liquid chromatography*

Sulfonamide drugs can be detected by reversed-phase high-pressure liquid chromatography. The possibilities of this method in the direct qualitative and quantitative analysis in blood or in urine without enrichment and derivatization are illustrated by the analysis of sulfamethoxazol and its metabolite N<sup>4</sup>-acetylsulfamethoxazol.

---

### EINFÜHRUNG

Eine Untersuchung auf Sulfonamide in Blut oder Urin kann nötig sein, um z.B. bei Kindern, die unbekannte Medikamente eingenommen haben, eine Vergiftung zu bestätigen oder auszuschliessen. Eine quantitative Bestimmung wird notwendig zur Kontrolle einer Therapie oder zur Bestimmung pharmakologischer Daten. Der Nachweis von Sulfonamiden kann qualitativ dünnschichtchromatographisch<sup>1</sup> oder gaschromatographisch<sup>2</sup> geführt werden. Eine quantitative Untersuchung ist UV-spektrophotometrisch nach Bratton und Marshall<sup>3</sup> und wiederum gaschromatographisch<sup>2</sup> möglich. Ausser bei der Dünnschichtchromatographie müssen bei den beiden anderen Methoden Derivatisierungsschritte durchgeführt werden. Dies ist bei der Hochdruckflüssigkeitschromatographie nicht nötig. Von den verschiedenen Arten der Hochdruckflüssigkeitschromatographie wurden für die Untersuchung auf Sulfonamide verwendet die Adsorptionschromatographie<sup>4,5</sup>, die Ionenaustauschchromatographie<sup>6-8</sup>, die Ionen-Paar-Chromatographie<sup>9</sup> sowie die Chromatographie in umgekehrter Phase<sup>10,11</sup>.

Für den Nachweis von Sulfonamiden, insbesondere von Sulfamethoxazol und

---

\* Auszugsweise vorgetragen auf der Hauptversammlung der Gesellschaft deutscher Chemiker in München 1977.

dessen bei der Körperpassage entstehenden Metaboliten N<sup>4</sup>-Acetyl-Sulfamethoxazol, verwendeten wir ebenfalls die Hochdruckflüssigkeitschromatographie in umgekehrter Phase, wobei zwei Säulen und zwei Laufmittel zur Anwendung kamen.

## EXPERIMENTELLES

### *Dünnschichtchromatographie*

Die Dünnschichtchromatographie wurde auf Fertigfolien Polygram Sil G/UV<sub>254</sub> der Fa. Macherey, Nagel & Co. (Düren, B.R.D.) durchgeführt. Die Entwicklung erfolgte mit Chloroform-Methanol (95:5) (modifiziert nach Gänshirt<sup>1</sup>). Sulfamethoxazol:  $R_F$ -Wert 0.6; Detektion mit Ehrlichs Reagenz (1 g *p*-Dimethylaminobenzaldehyd in 100 ml 6 M HCl)<sup>12</sup>. N<sup>4</sup>-Acetyl-Sulfamethoxazol:  $R_F$ -Wert 0.4; Detektion unter UV-Licht bei 254 nm.

### *UV-Spektrophotometrie*

Die Spektren zur Bestimmung der Maxima wurden mit einem Beckman Spektralphotometer DK-2A in Äthanol aufgenommen.

### *Hochdruckflüssigkeitschromatographie*

Gerät: Perkin-Elmer Hochdruckflüssigkeitschromatograph 1250 mit variablem UV-Detektor Perkin-Elmer LC 55. Säulen: (1) Stahlsäule 25 cm × 4 mm mit C<sub>18</sub>-Reversed-Phase-Material auf LiChrosorb Si 100 (Korngrösse 10 μm) (Merck, Darmstadt, B.R.D.); (2) Hibar<sup>®</sup>-Fertigstahlsäule 25 cm × 3 mm (Merck) mit C<sub>8</sub>-Reversed-Phase Material LiChrosorb (Korngrösse 7 μm). Einspritzteil: Rheodyne Modell 7105. Laufmittel: (1) Methanol-Wasser (3:7). (2) Acetonitril-Wasser (1:3).

Die Untersuchungen wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt; der Druck war 1200–1500 p.s.i.; die Durchflussgeschwindigkeit 0.4–0.6 ml/min; der Papiervorschub betrug 5 mm/min.

### *Untersuchungsmaterial*

Die Proben stammten von Personen, denen therapeutisch Bactrim<sup>®</sup> verabreicht worden war.

### *Zusatzversuche*

Zu 1 ml Urin wurden 150 μg Sulfamethoxazol und 190 μg N<sup>4</sup>-Acetyl-Sulfamethoxazol gelöst in 200 μl Äthanol gegeben.

## ERGEBNISSE

Die Retentionszeiten von Sulfamethoxazol und N<sup>4</sup>-Acetyl-Sulfamethoxazol neben anderen Sulfonamiden sind in Tabelle I angegeben. Es wurden dabei eine C<sub>8</sub> und eine C<sub>18</sub> Reversed-Phase-Säule und zwei verschiedene Laufmittel verwendet. Gleichzeitig sind die UV-Maxima in Äthanol angegeben. Wenn nur auf eine Substanz untersucht werden soll, kann deren Maximum eingestellt werden. Sonst empfiehlt es sich, die Detektion bei 270 nm durchzuführen. Diese Wellenlänge stellt etwa den Mittelwert dar und bei 270 nm wurden auch die weiteren Untersuchungen durchgeführt.

Die Figs. 1 und 2 zeigen die Auftrennung einiger ausgewählter Sulfonamied

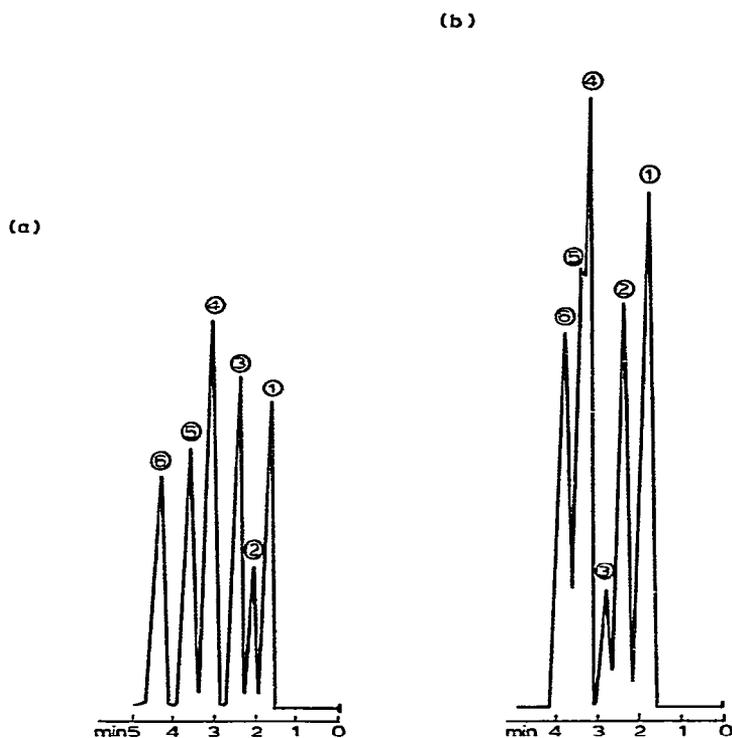


Fig. 1. Trennung von Sulfonamiden mit der  $C_{18}$ -Säule, Laufmittel: (a) Methanol-Wasser (3:7); (b) Acetonitril-Wasser (1:3). 1 = Sulfanilthiocarbamid; 2 =  $N^4$ -Acetyl-Sulfamethoxazol; 3 = Sulfamethoxazol; 4 = Sulfanilamidothiazol; 5 = Sulfamethoxydiazin; 6 = Sulfamoxal.

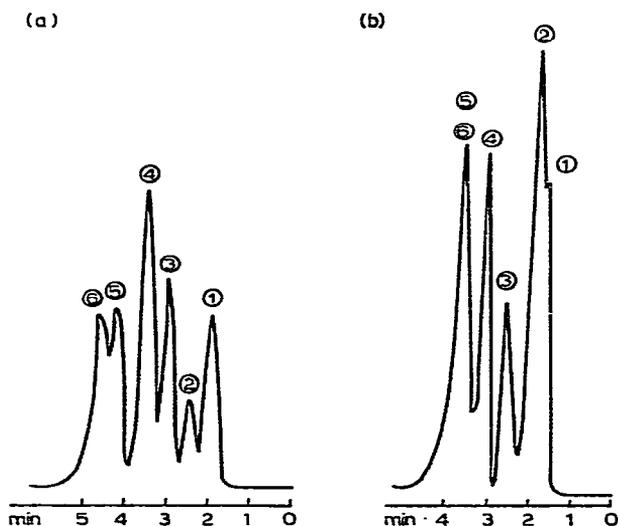


Fig. 2. Trennung von Sulfonamiden mit der  $C_8$ -Säule. Laufmittel: (a) Methanol-Wasser (3:7); (b) Acetonitril-Wasser (1:3). 1 = Sulfanilthiocarbamid; 2 =  $N^4$ -Acetyl-Sulfamethoxazol; 3 = Sulfamethoxazol; 4 = Sulfanilamidothiazol; 5 = Sulfamethoxydiazin; 6 = Sulfamoxal.

TABELLE I  
RETENTIONSZEITEN UND UV-MAXIMA VERSCHIEDENER SULFONAMIDE

Substanz	Handelsname	UV-Maxima in Äthanol (nm)	Retentionszeiten (min)		Säule C <sub>10</sub>		Säule C <sub>8</sub>	
			Methanol-Wasser (3:7)	Acetonitril-Wasser (1:3)	Methanol-Wasser (3:7)	Acetonitril-Wasser (1:3)	Methanol-Wasser (3:7)	Acetonitril-Wasser (1:3)
Phthalylsulfathiazol	Talendron	257/282	3,2	3,4	3,8	3,2	3,8	3,6
Sulfacetamid	Albucid	272	3,4	3,6	3,8	3,6	3,8	3,5
Sulfanilthiocarbamid	Bädional	260	3,5	3,6	3,8	3,6	3,8	3,6
Sulfafurazol	Gantrisin	261/282	3,5	3,8	4,2	3,8	4,2	3,8
N <sup>4</sup> -Acetyl-Sulfamethoxazol	—	263	4,1	4,2	4,4	3,8	4,4	3,8
Sulfamethoxazol	Gantanol	270	4,8	5,5	5,8	5,7	5,8	5,7
Sulfanilguanidin	Resulfon	262	5,0	5,8	5,4	5,6	5,4	5,6
Sulfanilamid	Prontalbin	262	5,4	6,6	5,6	6,2	5,6	6,2
Sulfanilamidothiazol	Eleudron	257/282	6,2	6,2	7,0	6,0	7,0	6,0
Sulfaphenazol	Orisul	267	6,4	6,2	8,8	6,2	8,8	6,2
Sulfamethoxydiazin	Durenat	270/230	7,2	7,0	8,4	7,2	8,4	7,2
Sulfamoxal	Sulfuno	268	8,8	7,8	9,2	7,4	9,2	7,4

bei den verschiedenen Bedingungen. Für den Nachweis von Sulfamethoxazol und N<sup>4</sup>-Acetyl-Sulfamethoxazol wird am besten das Laufmittel Acetonitril-Wasser (1:3) und die C<sub>8</sub>-Säule verwendet, da damit beide Substanzen am besten getrennt werden.

#### Erfassungsgrenze

Unter den zuletzt genannten Bedingungen ergab sich eine Erfassungsgrenze von 2 µg/ml, wenn 1 µl eingespritzt wird.

#### Linearität

Im Bereich von 50 µg–850 µg/ml ist die Korrelation zwischen Peakhöhe und Konzentration von N<sup>4</sup>-Acetyl-Sulfamethoxazol und Sulfamethoxazol linear.

#### Standardabweichung

Die Standardabweichung betrug für N<sup>4</sup>-Acetyl-Sulfamethoxazol 0.27 und für Sulfamethoxazol 0.18.

#### Wiederfindungsrate

Bei Zusatzversuchen zu Urin ergaben sich beim direkten Einspritzen für Sulfamethoxazol und N<sup>4</sup>-Acetyl-Sulfamethoxazol Wiederfindungsraten von 100 ± 3% (n = 7).

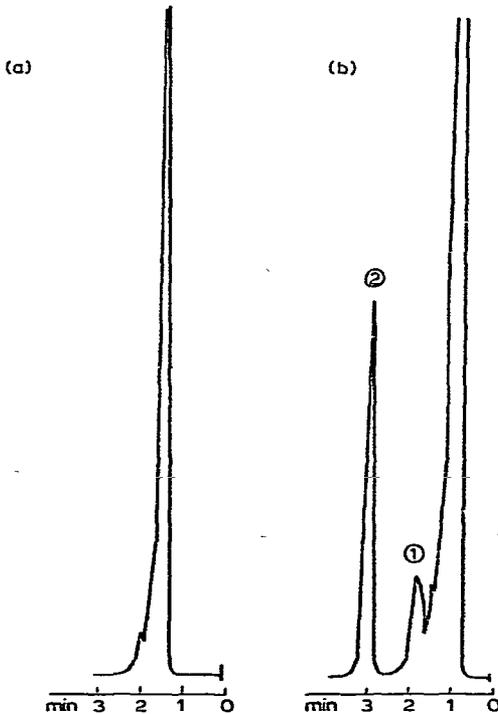


Fig. 3. Nachweis von Sulfamethoxazol und N<sup>4</sup>-Acetyl-Sulfamethoxazol im Blut durch Direkteinspritzung mit der C<sub>8</sub>-Säule. (a) Leerblut; (b) Blut A. Laufmittel: Acetonitril-Wasser (1:3). 1 = 18 µg/ml N<sup>4</sup>-Acetyl-Sulfamethoxazol; 2 = 95.7 µg/ml Sulfamethoxazol.

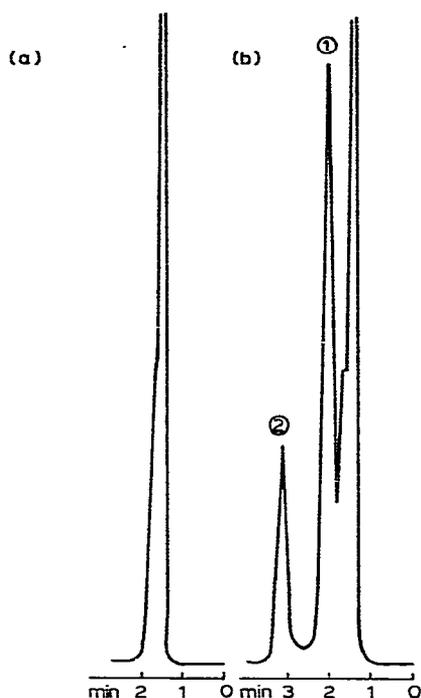


Fig. 4. Nachweis von Sulfamethoxazol und  $N^4$ -Acetyl-Sulfamethoxazol durch Direkteinspritzung mit der  $C_8$ -Säule. (a) Leerurin; (b) Urin A. Laufmittel: Acetonitril-Wasser (1:3). 1 = 855.6  $\mu\text{g/ml}$   $N^4$ -Acetyl-Sulfamethoxazol; 2 = 400.2  $\mu\text{g/ml}$  Sulfamethoxazol.

Die Übertragung der Methode auf die Untersuchung von Blut und Urin zeigen die Fig. 3 und 4. Es können Sulfamethoxazol und  $N^4$ -Acetyl-Sulfamethoxazol nebeneinander nachgewiesen werden, wenn man 1  $\mu\text{l}$  Urin oder 1–3  $\mu\text{l}$  Blut direkt einspritzt. Die Befunde wurden dünn-schichtchromatographisch nach Extraktion<sup>13</sup> abgesichert.

Die Werte der quantitativen Bestimmungen in verschiedenen Blut- und Urinproben zeigt Tabelle II. Die gleichen Buchstaben der Blut- und Urinproben gehören

TABELLE II

WERTE VON SULFAMETHOXAZOL UND  $N^4$ -ACETYL-SULFAMETHOXAZOL NACH THERAPEUTISCHER DOSIERUNG

Patient	Sulfamethoxazol ( $\mu\text{g/ml}$ )		$N^4$ -Acetyl-Sulfamethoxazol ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	Blut	Urin	Blut	Urin
A	95.7	400.2	18.0	855.6
B	64.1	80.6	41.5	1003.7
C	66.2	113.4	28.1	668.6
D	120.8	70.5	105.5	627.3
E		243.6		829.0
F		25.1		525.9
G		97.4		328.0

zu einem Patienten. Die Dosierung und der Einnahmezeitraum waren ausser beim Urinwert G nicht bekannt. Dieser Wert wurde erhalten nach Einnahme von 1 Dragee Bactrim forte® (Inhaltsstoffe 800 mg Sulfamethoxazol und 160 mg Trimethoprim) und Entnahme des Urins 14 h später.

## DISKUSSION

Die geschilderte Methode liefert schnell quantitative Werte, ohne dass Extraktions- oder Derivatisierungsschritte durchgeführt werden müssen, da Blut, Plasma, Serum oder Urin direkt eingespritzt werden können. Hierbei besteht die Gefahr, dass die Trennleistung der Säule nachlässt, und es empfiehlt sich deshalb nach fünf bis zehn Untersuchungen mit ca. 50 ml Methanol die Säule zu spülen. Bei den wenigen Untersuchungen auf Sulfonamide, die im toxikologischen Bereich anfallen, hat sich die Direkteinspritzung der Proben ohne weitere Aufarbeitung bewährt und innerhalb eines halben Jahres trat dabei keine Verschlechterung der Säulencharakteristik auf.

Bei häufigen Untersuchungen könnte ein Schutz der Trennsäule durch eine Vorsäule<sup>14</sup> erreicht werden. Eine weitere Möglichkeit unerwünschte Begleitstoffe aus dem biologischen Material zu entfernen besteht darin, dass man die Blut- oder Urinproben im Verhältnis 1:1 mit Acetonitril schüttelt, anschliessend zentrifugiert und dann die überstehende Lösung einspritzt<sup>15</sup>.

Die Erfassungsgrenze reicht aus, um sicher therapeutische Dosierungen von Sulfamethoxazol nachweisen zu können. Sollte der Nachweis geringer Konzentrationen nötig sein, können grössere Mengen Urin oder Blut eingespritzt werden (z.B. 10–20 µl). Der Nachweis kann gestört werden durch Diuretika, die ebenfalls eine Sulfonamidstruktur besitzen, wie z.B. Hydrochlorothiazid (Esidrix®) und Furosemid (Lasix®).

Barbiturate, Antiepileptika und Benzodiazepine<sup>16</sup> stören den Nachweis nicht.

## DANK

Wir danken dem Katharinenhospital Stuttgart, Urologische Klinik (Leiter Prof. Dr. Arnholdt) sowie Herrn Dr. Klas, Stuttgart für die Überlassung von Proben, der Fa. Hoffmann-La Roche für Vergleichssubstanzen.

## ZUSAMMENFASSUNG

Sulfonamide können durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie in umgekehrter Phase nachgewiesen werden. Am Beispiel von Sulfamethoxazol und dessen Metaboliten N<sup>4</sup>-Acetyl-Sulfamethoxazol wird gezeigt, dass eine qualitative und quantitative Bestimmung direkt in Blut und Urin ohne Anreicherung und Derivatisierung möglich ist.

## LITERATUR

- 1 H. Gänshirt, in E. Stahl (Herausgeber), *Synthetische Arzneistoffe in Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1967, S. 517.
- 2 E. Röder und W. Stuthe, *Z. Anal. Chem.*, 271 (1974) 281.
- 3 A. C. Bratton und E. K. Marshall, *J. Biol. Chem.*, 128 (1939) 573.

- 4 P. H. Cobb und G. T. Hill, *J. Chromatogr.*, 123 (1975) 444.
- 5 F. M. Rabel, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 957.
- 6 G. R. Gordon und D. C. Ghoul, *J. Pharm. Sci.*, 12 (1975) 1205.
- 7 T. Inaba, M. E. Besley und E. J. Chow, *J. Chromatogr.*, 104 (1975) 165.
- 8 B. C. Karger und S. C. Su, *J. Chromatogr. Sci.*, 12 (1974) 678.
- 9 S. C. Su, A. V. Hartkopf und B. L. Karger, *J. Chromatogr.*, 119 (1976) 523.
- 10 K. L. Johnson, D. T. Jeter und R. C. Claiborne, *J. Pharm. Sci.*, 64 (1975) 1657.
- 11 B. Fransson, K.-G. Wahlund, I. M. Johansson und G. Schill, *J. Chromatogr.*, 125 (1976) 327.
- 12 M. Geldmacher-von Mallinkrodt, in H. Breuer, H. Büttner, G. Hillmann und D. Stamm (Herausgeber), *Einfache Untersuchungen auf Gifte im klinisch-chemischen Laboratorium in Klinische Chemie in Einzeldarstellungen*, Georg Thieme, Stuttgart, 1976, S. 85.
- 13 E. G. C. Clarke, *Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals and Post Mortem Material*, Pharmaceutical Press, London, 1971, S. 552.
- 14 J. J. Kirkland, *Analyst (London)*, 99 (1974) 859.
- 15 P. M. Kabra, B. E. Stafford und L. J. Marton, *Clin. Chem.*, 23 (1977) 1284.
- 16 K. Harzer und R. Barchet, *J. Chromatogr.*, 132 (1977) 83.