

Journal of Chromatography, 143 (1977) 607–613

Biomedical Applications

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

CHROMBIO. 066

FLUORIMETRISCHE BESTIMMUNG VON PROPRANOLOL UND SEINES METABOLITEN N-DESIISOPROPYLPROPRANOLOL IN PLASMA UND URIN DURCH DIREKTE AUSWERTUNG VON DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAMMEN

MONIKA SCHÄFER*, HEINRICH E. GEISLER und ERNST MUTSCHLER**

Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Robert-Mayer-Strasse 7–9, 6000 Frankfurt a.M. (F.R.G.)

(Eingegangen am 7. Dezember 1976)

(Revised manuscript eingegangen am 17. März 1977)

SUMMARY

Fluorometric determination of propranolol and its metabolite N-desisopropylpropranolol in plasma and urine by direct measurement of thin-layer chromatographic plates

The quantitative analysis of propranolol and its metabolite N-desisopropylpropranolol in plasma and urine is described. The drugs are extracted into 2-pentanol–heptane, and the solvent is concentrated. The whole residue is chromatographed on silica gel plates. The compounds are determined directly on the thin-layer plates without derivatization. The recovery of propranolol from plasma is 76%, with a standard deviation of $\pm 4\%$.

EINLEITUNG

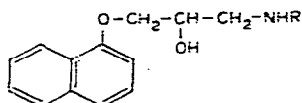
Die quantitative Analyse von Propranolol (Dociton[®], Inderal[®]) in Plasma ist nach verschiedenen Methoden möglich. Eine gaschromatographische Methode wurde von Di Salle et al. [1] entwickelt und von Walle modifiziert [2]. Propranolol wird dabei nach seiner Isolierung mit Heptafluorobuttersäureanhydrid [1], bzw. Trifluoressigsäureanhydrid [2] umgesetzt. Diese zuletzt genannte Methode ermöglicht auch eine gleichzeitige Bestimmung des Metaboliten N-Desisopropylpropranolol; mit Hilfe einer Variante dieser Methode kann der Hauptmetabolit 4-Hydroxy propranolol gemessen werden [3]. Die Verwendung eines Elektroneneinfangdetektors ermöglicht den Nachweis kleiner Substanzmengen. Der Nachteil der Methode liegt in dem grossen Zeitbedarf.

Eine fluorimetrische Methode wurde von Black et al. [4] erarbeitet und von Shand et al. [5] in grossem Umfang zur Bestimmung von Propranolol in Plasma

* Teilergebnisse der Dissertation M. Schäfer, in Vorbereitung.

** An den Anforderungen von Sonderdrucken gerichtet werden sollen.

herangezogen. Dabei wird die Eigenfluoreszenz des Naphthalinrings für die quantitative Analyse ausgenutzt.



R = $-C_3H_7$, Propranolol

R = $-H$, Desisopropylpropranolol

Propranolol wird aus alkalischer Lösung mit einem Alkohol-Heptan-Gemisch extrahiert und die Fluoreszenz nach einer Rückextraktion in verdünnte Salzsäure in der Küvette bestimmt. Der Nachteil dieser sehr einfachen und schnell durchführbaren Methode liegt in hohen Blindwerten und einer starken Störanfälligkeit [6]. Diese Methode ist ausserdem nicht sehr empfindlich. Vier Stunden nach Einnahme von 40 mg kann Propranolol nicht mehr mit Sicherheit im Plasma nachgewiesen werden [7].

Eine gewisse Verbesserung der Methode wurde durch Ambler erreicht [8], der durch Extraktion mit Pentylacetat die Wiederfindungsrate erhöhte und die Fluoreszenz in Citronensäure-Glycol bestimmte. Er berücksichtigt damit die pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz (Fluoreszenzmaximum bei pH 4-5 [9]). Allerdings beobachten andere Autoren bei der Messung der Fluoreszenz in Citronensäure einen starken Anstieg der Blindwerte [5].

In jüngster Zeit wurde eine Propranololbestimmung durch Radioimmunoassay publiziert, die eine selektive Bestimmung der beiden Enantiomeren ermöglicht [10].

Uns gelang es nun, die fluorimetrische Methode zu verbessern, d.h. die Empfindlichkeit zu erhöhen sowie die Störanfälligkeit zu vermindern. Dies ist durch dünnschichtchromatographische Auftrennung des Plasmaextraktes möglich. Die quantitative Bestimmung erfolgt durch direkte Auswertung der Platte nach dem Besprühen mit einer 10%-igen wässrigen Citronensäurelösung anhand einer Eichgeraden. Propranolol und Desisopropylpropranolol zeigen eine starke Fluoreszenzemission bei 340 nm. Das Exzitationsmaximum liegt bei 290 nm (Fig. 1). Beide Stoffe sind nach dem Ausschütteln mit einem Gemisch von 1.5% 2-Pentanol in Heptan nebeneinander auf derselben Platte bestimmbar, da sich ihre R_F -Werte in dem gewählten Fließmittel ausreichend unterscheiden (Fig. 2). Auf die Bestimmung von 4-Hydroxypropranolol wurde wegen der ausserordentlich grossen Oxidationsempfindlichkeit dieser Substanz verzichtet.

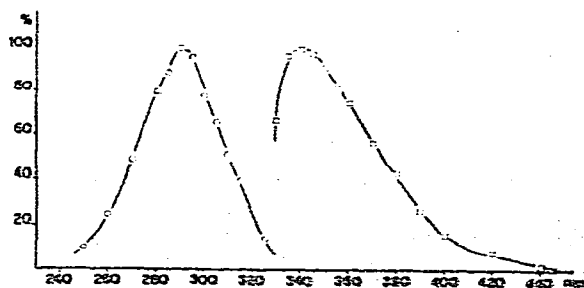


Fig. 1. Exzitations- (o) und Emissionsspektrum (□) von Propranolol und Desisopropylpropranolol.

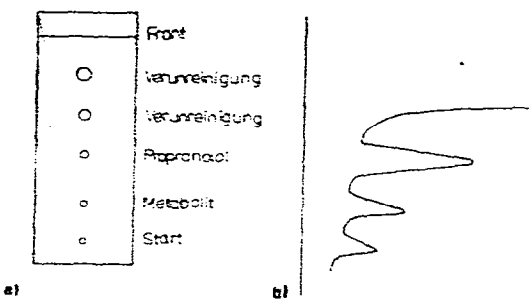


Fig. 2. Dünnschichtchromatogramm (a) und Fluoreszenzgrad-Ortskurve (b) von Propranolol und Desisopropylpropranolol aus Urin (50 ng/4 ml).

EXPERIMENTELLES

Geräte

Chromatogrammspektralphotometer KM3 (Carl Zeiss) mit Kompensations-schreiber Servogor Sb.

Chemikalien

Propranolol sowie sein Metabolit Desisopropylpropranolol wurden freundlicher Weise von ICI (Plankstadt, B.R.D.), zur Verfügung gestellt. Die Chemikalien sowie die Dünnschicht-Fertigplatten (Kieselgel 60, 20 x 20 cm, ohne Fluoreszenzindikator) wurden von E. Merck (Darmstadt, B.R.D.) bezogen. Für die Eichgerade benötigten wir Propranolol-Base, die wir aus dem Hydrochlorid herstellten. Als Vergleichslösung I für die Chromatographie wurden 10 mg Base in 100 ml 2-Pentanol-Heptan (1.5 : 98.5) gelöst. Diese Lösung wurde noch einmal 1:10 mit 2-Pentanol-Heptan (1.5 : 98.5) verdünnt (Vergleichslösung II).

Extraktion

Aus Plasma. Zu 1 ml Plasma gibt man in einem verschliessbaren Reagenzglas 1 ml 1 N NaOH und schüttelt 30 min mit 7 ml 2-Pentanol-Heptan (1.5:98.5). Nach 5 min Zentrifugieren trennt man die organische Phase mit einer Pasteur-Pipette ab und gibt sie in ein 10-ml-Becherglas. Die Wände des Reagenzglases werden mit 0.3 ml 2-Pentanol-Heptan abgespült und die Waschlösung mit dem ersten Teil vereinigt. Die Probe wird unter Stickstoffbegasung und bei geringer Wärmezufuhr (bis zu 60°) zur Trockne eingedampft.

Aus Urin. Zu 4 ml Urin gibt man in einem verschliessbaren Reagenzglas 0.1 ml 10 N NaOH und schüttelt 30 min mit 10 ml 2-Pentanol-Heptan (1.5: 98.5). Sobald die beiden Phasen sich getrennt haben, nimmt man 9 ml der organischen Phase ab und dampft sie in einem 10-ml-Becherglas unter Stickstoffbegasung zur Trockne ein.

Chromatographie

Auftragen. Der gesamte Rückstand des Plasma- oder Urinextraktes wird auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen, indem man ihn unter intensivem Schütteln (REAX I, Heidoiph) in zwei Tropfen 2-Pentanol-Heptan löst und mit einem

Fettschmelzpunktröhrchen die gesamte Flüssigkeit punktförmig aufträgt. Dieser Vorgang wird noch zweimal wiederholt. Auf einer Platte können acht Extrakte im Abstand von 1.2 cm aufgetragen werden. Ausserdem trägt man für die Eichgerade jeweils 1, 2 and 5 μ l der Vergleichslösung I sowie 5 μ l der Vergleichslösung II (entsprechend 50, 100, 200 und 500 ng Propranolol-Base) mit Konstriktionspipetten auf.

Entwickeln. Die Platte wird in einer Desaga-Trogkammer entwickelt. Fließmittel: Essigsäureäthylester-Benzol-Methanol (20:20:10) in Ammoniak-Atmosphäre. Die Entwicklung erfolgt bei Kammersättigung, die Laufstrecke beträgt 10 cm. Der R_F -Wert von Propranolol ist 0.42; der von Desisopropylpropranolol 0.17. Begleitfluoreszenzen aus Plasma oder Urin haben R_F -Werte > 0.6 .

Messung

Die Messung erfolgt unmittelbar nach dem Entwickeln der Platte, da Propranolol und sein Metabolit oxidationsempfindlich sind. Die Platte wird mit einer Lösung von 10 g Citronensäure in 90 g Wasser-Äthylenglycol(1:1) besprüht. Die Fluoreszenz wird auf der feuchten Platte bestimmt, da das Trocknen der Platte mit einer starken Abnahme der Fluoreszenz verbunden ist. Die Verdunstung des Wassers wird dabei durch den Zusatz von Äthylenglycol verlangsamt.

Die Auswertung kann in verschiedener Weise erfolgen. Methode Probe-Monochromator (Pr-M): Anregung mit der Hg-Linie 313 nm der Quecksilber-Mitteldrucklampe ST 41 mit Quarzkondensator; Emissionsmessung beim Emissionsmaximum von 340 nm; Spaltbild: 0.5 \times 8 mm; Hochspannung 2; Verstärkung 10-100 fach. Methode Monochromator-Probe (M-Pr): Anregung mit der Deuteriumlampe beim Exzitationsmaximum von 290 nm; Messung der Emissionsstrahlung nach dem Monochromatfilter M 365; Spaltbild: 10 \times 8 mm; Hochspannung (\sim 550V); Verstärkung etwa 5-50 fach.

In beiden Fällen wird die Platte auf einem Kreuztisch parallel zur Entwicklungsrichtung des Chromatogramms bewegt. Die Kreuztisch- und Schreibergeschwindigkeit beträgt dabei 120 mm/min. Man misst die Fluoreszenz des Propranolol-Standards (50, 100, 200, 500 ng) und die Fluoreszenz des aus Urin oder Plasma extrahierten Propranolols sowie die Fluoreszenz des Desisopropylpropranolols.

Auswertung

Die Flächen unter den Peaks, die in Integratoreinheiten erfasst werden, sind der Propranololmenge der Plasmaprobe direkt proportional. Die Auswertung erfolgt anhand einer Eichgeraden, die für jede Platte erstellt wird. Die Eichgerade verläuft linear im Bereich von 2 ng (Methode M-Pr) bzw. 4 ng (Methode Pr-M) bis ca. 1000 ng Propranolol-Base pro Fleck und geht durch den Ursprung des Koordinatensystems. Der Gehalt des Plasmas sowohl an Propranolol als auch an Desisopropylpropranolol wird auf die Propranolol-Base bezogen. Bei Einführung eines Korrekturfaktors von 1.11 (Mittelwert aus 4 Bestimmungen) entsprechen sich die Flächenintegrale von Propranolol-Base und Desisopropylpropranolol-Base bei gleichen Konzentrationen (in ng):

$$A_P = 1.11 A_D$$

mit A_P = Fläche des Propranolol-Peaks, A_D = Fläche des Desisopropylpropranolol-Peaks.

DISKUSSION

Die Nachweisgrenze für Propranolol-Base liegt für Methode Pr-M bei 4 ng pro Fleck. Der 4-ng-Peak ist etwa dreimal so hoch wie das Grundrauschen, das sich aus dem elektronischen Geräterauschen sowie aus den Störungen durch die ungleichmässige Beschaffenheit des Plattenuntergrundes zusammensetzt. Bei Auswertung nach Methode M-Pr sind sogar noch 2 ng Propranolol-Base pro Fleck messbar, die Nachweisgrenze liegt bei 1 ng pro Fleck; das Grundrauschen beträgt für 2 ng Propranolol-Base 1/10 der Peakhöhe (Fig. 3).

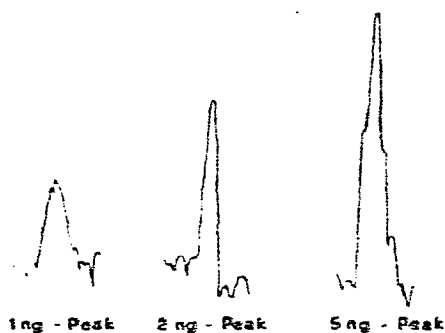


Fig. 3. Nachweis von Propranolol-Base bei verschiedenen Mengen pro Fleck.

Die Empfindlichkeit der fluorimetrischen Methode bei Auswertung mit dem Chromatogrammspektrophotometer ist vor allem dadurch bedingt, dass es gelingt, unter chromatographischer Abtrennung der mit dem Arzneistoff extrahierten Flasmabestandteile den gesamten Propranololgehalt von 1 ml Plasma auf einer sehr kleinen Fläche anzureichern. Auch kann bei dem pH-Optimum der Fluoreszenz gemessen werden, ohne dass es zu einer Erhöhung der Blindwerte kommt. Durch Besprühen mit Citronensäurelösung steigt die Empfindlichkeit der Methode etwa um das Achtfache. Die Fluoreszenzmessung muss unmittelbar nach dem Besprühen der Platte durchgeführt werden, da das Trocknen der Platte mit einem erheblichen Fluoreszenzverlust verbunden ist.

Die Extraktion mit 2-Pentanol-Heptan (1.5:98.5) liefert im Gegensatz zur Extraktion mit Diäthyläther oder Pentylacetat sehr reine Extrakte. Ausserdem hat Heptan einen niedrigeren Siedepunkt als Pentylacetat. Die thermische Belastung des labilen Arzneistoffes beim Eindampfen der Extrakte ist daher geringer. Um die Grösse der Verluste, die beim Eindampfen entstehen, abschätzen zu können, dampften wir eine Lösung von 500 ng Propranolol-Base in 7 ml Heptan-Alkohol ein. Durch Einengen und Auftragen auf die Dünnschichtplatte entstand ein Verlust von 14.5%.

Ein Vorteil der von uns entwickelten Methode liegt in der geringen Störanfälligkeit; eine besondere Behandlung der Glasgeräte (Einlegen in verdünnte Salzsäure), wie sie sowohl bei der gaschromatographischen als auch bei der fluorimetrischen Methode mit Messung in der Küvette unerlässlich ist, erfordert diese Methode nicht. Auch eine Störung durch Nahrungsaufnahme wurde nicht beobachtet.

Die Wiederfindungsrate des zu 1 ml Plasma zugesetzten Propranolols betrug 70% mit einer Standardabweichung von $\pm 4\%$. (Zur Überprüfung wurden zwölf Proben zu je 1 ml Plasma mit jeweils 50–500 ng Propranolol-Hydrochlorid versetzt und nach dem beschriebenen Verfahren analysiert.) Die Wiederfindungsrate des Metaboliten — seine Bestimmung erfolgt in einem Arbeitsgang mit der Propranololbestimmung — ist niedriger. Sie liegt bei 45% mit einer Standardabweichung von $\pm 4\%$ ($n = 8$, 50–500 ng nach dem oben beschriebenen Verfahren). Fig. 4 enthält die Eichkurve und die Messwerte der wiedergefundenen Mengen von Propranolol und Desisopropylpropranolol. Da die Messwerte für die wiedergefundenen Mengen auf einer Geraden liegen, folgt, dass die Wiederfindungsrate von der zu bestimmenden Konzentration unabhängig ist. Damit sind nach diesem Verfahren therapeutische Blutspiegel von Propranolol messbar (maximal 250 ng/ml nach oraler Gabe von 80 mg an menschliche Versuchspersonen [5]). Über die zu erwartenden Blutspiegel des Metaboliten N-Desisopropylpropranolol sind uns keine Einzelheiten bekannt. Die Wiederfindungsrate für Propranolol aus Urin liegt bei $77 \pm 3\%$ ($n = 8$), diejenige seines Metaboliten beträgt $57.5 \pm 4\%$. Da unverändertes Propranolol nur in Spuren ausgeschieden wird, sind 4 ml Urin zur Analyse notwendig. Über die Menge des im menschlichen Urin ausgeschiedenen N-Desisopropylpropranolols ist uns nichts bekannt. Eine Spaltung des konjugierten Propranolols durch Hydrolyse mit Sulfatase, Beta-Glucuronidase oder verdünnter Salzsäure wurde nicht versucht, da sie nach den Untersuchungen von Hayes und Cooper [11] und Paterson et al. [12] wenig aussichtsreich erschien.

Zusammenfassend ergibt sich, dass die von uns entwickelte Methode die Vorteile der fluorimetrischen Methode (geringer Arbeitsaufwand — eine Arbeits-

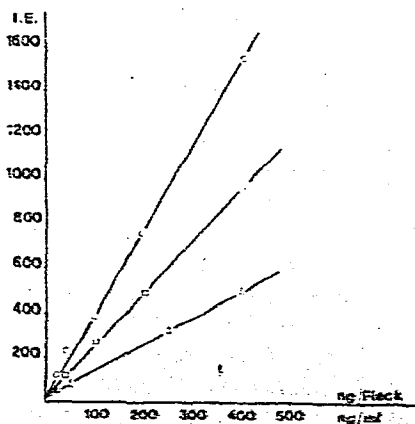


Fig. 4. Bestimmung von Propranolol und Desisopropylpropranolol aus Plasma. c, Eichgerade; o, Propranolol; und Δ, Desisopropylpropranolol. I.E. = Integratoreinheiten.

kraft kann ca. 40 Proben am Tag bestimmen) mit der hohen Empfindlichkeit der gaschromatographischen Methode (geringere Belastung des Patienten auch bei häufiger Blutentnahme) verbindet, wobei zudem die Genauigkeit dieser Methode wesentlich grösser ist.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird die quantitative Analyse von Propranolol und seinem Metaboliten N-Desisopropylpropranolol aus Plasma und Urin beschrieben. Beide Stoffe werden mit einem 2-Pentanol-Heptan-Gemisch extrahiert. Der zur Trockne eingedampfte Extrakt wird quantitativ auf Kieselgel-Platten aufgetragen und chromatographiert. Die Messung erfolgt auf der Dünnschichtplatte ohne Derivatisierung. Die Wiederfindungsrate von Propranolol aus Plasma liegt bei $70 \pm 4\%$.

LITERATUR

- 1 E. Di Salle, K.M. Baker, S.R. Bareggi, W.D. Watkins, C.A. Chidsey, A. Frigerio und P.L. Morselli, *J. Chromatogr.*, 84 (1973) 347.
- 2 T. Walle, *J. Pharm. Sci.*, 63 (1974) 1885.
- 3 T. Walle, J. Morrison, K. Walle und E. Conradi, *J. Chromatogr.*, 114 (1975) 351.
- 4 J.W. Black, W.A.M. Duncan und R.G. Shanks, *Brit. J. Pharmacol.*, 25 (1965) 577.
- 5 D.G. Shand, E.M. Nuckolls und J.A. Oates, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 11 (1970) 113.
- 6 Betablocker-Symposium (II), Rottach-Egern, Herbst 1975; *Selecta*, 17 (1976) 1629.
- 7 C.E. McLeane und B.C. Deane, *Angiology*, 21 (1970) 536.
- 8 P.K. Ambler, B.N. Sigh und M. Lever, *Clin. Chim. Acta*, 54 (1974) 373.
- 9 L.T. Potter, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 155 (1967) 517.
- 10 K. Kawashima, A. Levy und S. Spector, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 196 (1976) 517.
- 11 A. Hayes und R.G. Cooper, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 176 (1971) 302.
- 12 J.W. Paterson, M.E. Conolly und C.T. Dollery, *Pharmacol. Clin.*, 2 (1970) 127.