

*Journal of Chromatography*, 143 (1977) 615–623

*Biomedical Applications*

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

CHROMBIO. 067

## FLUORIMETRISCHE BESTIMMUNG VON HYDROCHLOROTHIAZID IN KÖRPERFLÜSSIGKEITEN DURCH DIREKTE AUSWERTUNG VON DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAMMEN

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

*Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Robert-Mayer-Strasse 7–9, 6000 Frankfurt/Main (B.R.D.)*

(Eingegangen am 7. Dezember 1976; geänderte Fassung eingegangen am 17. März 1977)

### SUMMARY

*Fluorometric determination of hydrochlorothiazide in body fluids by direct measurement of thin-layer chromatographic plates*

Two fluorometric methods for analysis of hydrochlorothiazide (HCT) are described utilizing direct measurement of thin-layer plates. The first method employs a modification of the Bratton–Marshall reaction and is therefore applicable to all aromatic primary amines. Following diazotation and azocoupling of the HCT hydrolysis product, a fluorescent group is added to the compound. For this purpose *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine is first coupled with 4-chloro-7-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazole. In the second method, the intrinsic fluorescence of underivatized HCT, following its extraction from plasma, urine or saliva, is used. It is shown that the sensitivity of this method is sufficient for estimating the kinetics following oral administration of 25 mg HCT.

### EINLEITUNG

Die Bestimmung von (nicht radioaktiv markiertem) Hydrochlorothiazid (HCT) in Plasma bereitet ausserordentliche Schwierigkeiten. Bisher ist keine Methode bekannt, die empfindlich genug ist, Blutspiegel, wie sie nach Applikation therapeutischer Dosen auftreten, über einen ausreichend langen Zeitraum zu messen.

In den Jahren 1960 und 1961 wurden zwei Methoden veröffentlicht, welche die Verteilung von radioaktiv markiertem HCT im Organismus untersuchten. Dabei wurde [<sup>3</sup>H] HCT Ratten [1] bzw. [<sup>14</sup>C] HCT menschlichen Versuchspersonen [2] gegeben. Bei einer oralen Gabe von 65 mg [<sup>14</sup>C] HCT wurden bei gesunden Versuchspersonen maximale Serumspiegel von durchschnittlich 800 ng HCT/ml Serum gemessen. Der maximale Serumspiegel war nach 4 h erreicht.

\* Teilergebnisse der Dissertation M. Schäfer, in Vorbereitung.

\*\* An den Anforderungen von Sonderdrucken gerichtet werden sollen.

Eine chemische Bestimmungsmethode wurde von Baer et al. [3] für Chlorothiazid entwickelt und von Yü und Sung [4] für die Hydrochlorothiazid-Bestimmung modifiziert. Sie beruht auf der alkalischen Hydrolyse des Moleküls zu 5-Chloro-2,4-disulfamidoanilin und seiner Bestimmung nach der Bratton-Marshall-Reaktion. Nur im Tierversuch können jedoch so hohe Dosen gegeben werden, dass die Empfindlichkeit für die Bestimmung von Serumspiegeln ausreicht. Bei Humanversuchen wurde deshalb Urin fraktioniert gesammelt und die Kinetik anhand der Urinausscheidung bestimmt [5].

In letzter Zeit wurden weitere Methoden veröffentlicht, welche durch die Fortschritte in der Instrumentalanalyse ermöglicht wurden. Bei zwei Methoden wird zur Trennung und quantitativen Bestimmung die Gaschromatographie eingesetzt [6, 7]. Das Tetramethylderivat wird dabei mit einem Elektroneneinfangdetektor erfasst. Da jedoch HCT nur ein Halogenatom enthält, ist die Empfindlichkeit nicht höher als beim Arbeiten mit einem Flammenionisationsdetektor. Die Nachweisgrenze liegt daher auch mit 50 ng/ml Plasma noch relativ hoch. Der Einsatz der Hochdruckflüssigkeitschromatographie zur Reinigung und die anschließende Bestimmung mit einem UV-Detektor [8] ist nur arbeitsmässig einfacher. Bei Präparaten, die 25 mg HCT oder weniger pro Dosis enthalten\*, reicht aber die Empfindlichkeit ebenfalls nicht aus, um die Plasmaspiegel nach einer einmaligen Gabe der Einzeldosis zu bestimmen.

Wir stellten uns daher die Aufgabe, eine Methode zu entwickeln, die es erlaubt, die Kinetik von HCT nach einer einmaligen Gabe von 25 mg zu bestimmen. Eine ausreichende Empfindlichkeit erwarteten wir von der Anwendung fluorimetrischer Methoden; für Hydroflumethiazid wurde bereits ein empfindliches Verfahren beschrieben [9]. Zwei fluorimetrische Verfahren zur Bestimmung von HCT in Plasma sollen im folgenden beschrieben werden.

Methode A beruht auf der oben genannten Bratton-Marshall-Reaktion. Über die Diazotierung und Azokupplung des alkalisch hydrolysierten Hydrochlorothiazids führen wir eine fluoreszierende Gruppe ein, indem wir die Kupplungs-komponente in einer vorgelagerten Reaktion mit 4-Chloro-7-nitrobenzo-2,1,3-

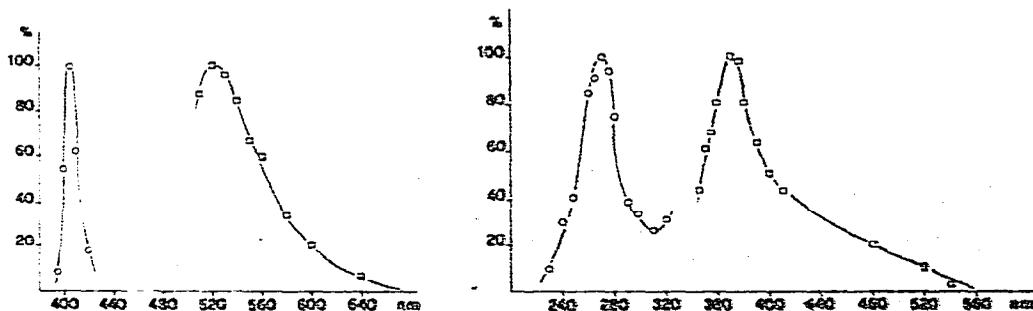


Fig. 1. Exzitations- (o) und Emissionsspektrum (□) HCT-Umsetzungsprodukt nach Methode A.

Fig. 2. Exzitations- (o) und Emissionsspektrum (□) von HCT.

\* Adelphan-Esidrix® (Ciba), Dytide® H (Röhm-Pharma), Esimil® (Geigy), Moduretik® (Sharp & Dohme), Resaltex® (Röhm-Pharma).

oxadiazol (NBD-Cl) umsetzen. Ein Teil des Reaktionsgemisches wird durch Dünnschichtchromatographie gereinigt und die Fluoreszenz des Azofarbstoffs mit einem Chromatogrammspektralphotometer bei seinem Emissionsmaximum von 520 nm bestimmt (Fig. 1).

Nach Methode B wird die native Fluoreszenz des Hydrochlorothiazids nach dem Besprühen mit Triäthanolamin-Lösung ausgewertet. (Emissionsmaximum 370 nm; Fig. 2). Diese Methode erfordert einen höheren Reinheitsgrad der Plasmaextrakte. Da aber der gesamte Extrakt aus 0.5 ml Plasma auf die Platte aufgetragen werden kann, der Arbeitsaufwand für die Umsetzung entfällt und zudem die Streuung der Ergebnisse geringer ist, zogen wir diese Methode zur Bestimmung der Plasmaspiegel vor.

#### EXPERIMENTELLES

##### Geräte

Chromatogrammspektralphotometer KM 3 (Carl Zeiss) mit Kompensationschreiber Servogor Sb.

##### Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sowie die Dünnschichtplatten (Keisegel 60, ohne Fluoreszenzindikator, 20 × 20 cm) wurden von E. Merck (Darmstadt, B.R.D.) bezogen. Hydrochlorothiazid stellte freundlicherweise Röhm-Pharma (Darmstadt, B.R.D.) zur Verfügung.

Das für die Analysenmethode A benötigte Hydrolyseprodukt stellten wir selbst im präparativen Massstab durch achtstündiges Kochen von HCT in 5 N Natronlauge her. Die Lösung wurde nach beendeter Reaktion angesäuert und mit Essigsäureäthylester extrahiert. Durch Einengen und Auskristallisieren erhielten wir das reine Hydrolyseprodukt (Schmelzpunkt 251°; Literatur: 251–252° [10]). Seine Identität wurde durch Infrarotspektroskopie und Elementaranalyse gesichert.

Das Umsetzungsprodukt von NBD-Cl mit N-(1-Naphthyl)äthylendiamin, ebenfalls für Methode A, stellten wir nach Vorschrift 2 von Reisch et al. [11] her: 1 mMol des Aminsalzes wurde in 5 ml destilliertem Wasser gelöst und die Base mit 0.5 ml 2 N NaOH in Freiheit gesetzt. Nach Zugabe von 1 mMol NBD-Cl in 20 ml Äthylacetat wurde das Zweiphasengemisch 6 h geschüttelt. Die organische Phase wurde abgetrennt und über Nacht bei 4° aufbewahrt. Die Kristalle wurden abfiltriert und aus Aceton-Wasser umkristallisiert. (Schmelzpunkt: 198° unter Zersetzung; Strukturbeweis: IR, Massenspektrum, Elementaranalyse).

##### Methode A

###### Erstellung der Eichkurve

**Derivatisierung.** Hydrochlorothiazid (0.5–20 µg) in Aceton wird zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wird in 1 ml 0.25% NaNO<sub>2</sub> (gelöst in 0.2 N HCl) aufgenommen. Den Nitritüberschuss zerstört man durch Zugabe von 1 ml 2.5% Ammoniumsulfamidodisulfonat-Lösung. Die Azokupplung erfolgt dann in der sauren Lösung innerhalb von 5 min nach Zugabe von 1 ml der 0.1%igen

Lösung des fluoreszierenden Naphtylaminderivats in Aceton. In einem Messkolben wird mit Aceton auf ein Volumen von 10.0 ml aufgefüllt.

**Chromatographie.** Jeweils 30  $\mu$ l dieser Lösung werden mit einem Desaga-Microapplicator (10  $\mu$ l) für organische Lösungen auf Dünnschichtplatten aufgetragen. Die Platten werden sofort entwickelt. Fließmittel: Benzol-Methanol-Äthylacetat (20:30:100), Laufstrecke 10 cm, Kammersättigung,  $R_F = 0.41$ , überschüssiges Reagenz:  $R_F = 0.69$ . Nach dem Trocknen der Platte markiert man die Zone der roten Flecken und lässt die Platten 14 h liegen. Dabei zersetzt sich der rote Farbstoff und es entwickelt sich die gelbe Fluoreszenz. Diese wird mit dem Chromatogrammspektralphotometer gemessen.

**Messung.** Messanordnung Probe-Monochromator (Pr-M): Exzitation mit der Hg-Linie von 436 nm der Quecksilber-Mitteldrucklampe ST 41, mit Quarzkondensator; Emissionsmaximum: 520 nm; Spaltbild: 0.5  $\times$  14 mm; Verstärkung 10–100 fach; Hochspannung 2.

**Auswertung.** Die Flächen unter den Peaks, die in Integratoreinheiten angegeben werden, sind der 5-Chloro-2,4 disulfamidoanilin-Menge pro Fleck direkt proportional. Dabei sind sogar die erhaltenen Ergebnisse auf verschiedenen Platten gleich, wenn die Zersetzungszeit gleich ist.

#### *Bestimmung von HCT in Plasma*

**Extraktion.** Zu 1–4 ml Plasma, die 50–500 ng HCT enthalten, werden 0.5 ml 2 N HCl sowie eine Spatelspitze Kochsalz gegeben. Mit 25.0 ml Essigsäureäthylester wird 30 min geschüttelt. Zwanzig Milliliter der organischen Phase werden zur Trockne eingedampft.

**Hydrolyse.** Zum Rückstand gibt man 2 ml 5 N NaOH und hydrolysiert 30 min im siedenden Wasserbad. Nach Zugabe von 1.5 ml konzentrierter Salzsäure extrahiert man mit 10 ml Äthylacetat. Die organische Phase wird mit einer Pasteur-Pipette quantitativ abgetrennt und eingedampft.

**Derivatisierung.** Die Umsetzung erfolgt wie bei der Erstellung der Eichgeraden beschrieben, nur werden jeweils 0.1 ml Reagenzlösung zugefügt und nach beendigter Reaktion auf ein Volumen von 0.50 ml aufgefüllt.

**Chromatographie, Messung und Auswertung.** Mit einem Microapplicator (10  $\mu$ l) für organische Lösungen werden 30  $\mu$ l pro Fleck aufgetragen. Die Platten werden zusammen mit den Platten, welche die Eichgerade enthalten, entwickelt. Die Auswertung erfolgt anhand der Eichgeraden.

#### *Methode B*

Nach folgender Arbeitsvorschrift kann HCT in Plasma, Urin und Speichel bestimmt werden.

**Extraktion aus Speichel.** Drei Milliliter Speichel werden 10 min bei 2000 g zentrifugiert, wobei Glycoproteide sedimentieren. Zwei Milliliter der überstehenden klaren Lösung werden in ein verschliessbares Reagenzglas gegeben und 30 min mit 7 ml Essigsäureäthylester geschüttelt. Zur vollständigen Phasentrennung wird anschliessend 5 min zentrifugiert. Der Essigester wird mit einer Pasteur-Pipette abgetrennt und in ein 10-ml-Beherglas gegeben. Die Wände des Reagenzglases werden mit 0.5 ml Äthylacetat abgespült und die Waschflüssigkeit wird mit dem ersten Teil vereinigt. Der Extrakt wird bei geringer Wärmezufuhr und unter Stickstoffbegasung zur Trockne eingedampft.

**Extraktion aus Plasma.** Zu 0.5 ml Plasma gibt man 0.5 ml Wasser und schüttelt in einem verschliessbaren Reagenzglas 30 min mit 5 ml Toluol. Zur vollständigen Phasentrennung wird 5 min zentrifugiert. Die organische Phase wird mit einer Pasteur-Pipette abgenommen und verworfen. Das so gereinigte Plasma wird analog wie der zentrifugierte Speichel weiterverarbeitet.

**Extraktion aus Urin.** Urin wird 1:5 mit Wasser verdünnt. Zu 1 ml dieser Lösung werden 200 mg  $\text{NaHCO}_3$  gegeben. Die Aufarbeitung erfolgt dann wie es bei der Extraktion aus Speichel beschrieben wurde.

**Chromatographie.** Die Rückstände der Extrakte werden in zwei Tropfen Äthylacetat unter intensivem Schütteln (REAX I, Heidolph) gelöst. Die gesamte Flüssigkeit wird mit einem Fettschmelzpunktsröhrchen punktförmig auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen. Der gleiche Vorgang wird zweimal wiederholt. Für die Eichgerade trägt man 20, 50, 100 und 200 ng HCT — gelöst in Aceton — mit Konstriktionspipetten auf. Die Platte wird mit einem Fön sorgfältig getrocknet. Die Entwicklung erfolgt nacheinander in zwei verschiedenen Fließmitteln in derselben Richtung: Fließmittel I: Aceton 70 ml, Laufstrecke 1 (!) cm; Fließmittel II: Essigsäureäthylester 70 ml, Laufstrecke 10 cm. Um HCT von den mitextrahierten Plasmabestandteilen zu trennen, muss in Fließmittel II ohne Kammersättigung chromatographiert werden. Der  $R_F$ -Wert von HCT in diesem System ist 0.52.

**Messung und Auswertung.** Nach dem Entwickeln wird die Platte getrocknet und mit einer 20%igen Lösung von Triäthanolamin in Methanol besprüht. Anschliessend wird 45 min mit UV-Licht von 365 nm bestrahlt. Die Messung erfolgt wieder mit dem Chromatogrammspektralphotometer (Fig. 3). Messanordnung Monochromator—Probe (M—Pr): Exzitation mit der Hg-Linie von 365 nm der Quecksilber-Mitteldrucklampe ST 41; Spaltbild:  $0.3 \times 8$  mm; Hochspannung 2.

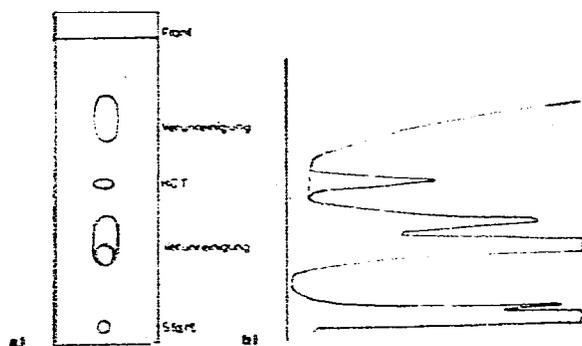


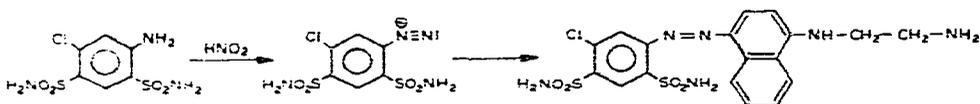
Fig. 3. Dünnschichtchromatogramm (a) und Fluoreszenzintensitäts-Ortskurve (b) von 50 ng HCT aus Plasma (Methode B).

Die Auswertung erfolgt anhand der Eichgeraden unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten für die verschiedenen Körperflüssigkeiten.

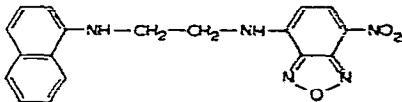
## ERGEBNISSE

## Methode A

Die von Bratton und Marshall [12] beschriebene Reaktion dient zum Nachweis primärer, aromatischer Amine. Die Aminogruppe wird mit salpetriger Säure diazotiert und das entstandene Diazoniumion mit N-(1-Naphthyl)äthylendiamin zu einem roten Farbstoff gekuppelt. Dabei entsteht quantitativ die *p*-Verbindung. Die Intensität der roten Farbe kann spektralphotometrisch in der Kuvette oder mittels eines Chromatogrammspektralphotometers auf einer Dünnschichtplatte gemessen werden. Bei der HCT-Bestimmung muss dieser Reaktion eine Spaltung des Moleküls vorausgehen, damit die erforderliche primäre, aromatische Aminogruppe entsteht. Dies erzielt man durch Erwärmen in Natronlauge.

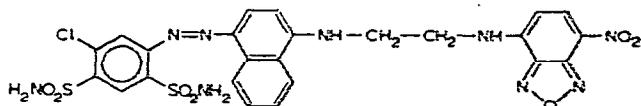


Ein entscheidender Fortschritt wird durch eine Variation der Kupplungskomponente erzielt, die so beschaffen sein muss, dass ein Azofarbstoff mit fluoreszierendem Molekülteil entsteht. Solch ein Reagenz stellen wir durch Umsetzung von N-(1-Naphthyl)äthylendiamin mit NBD-Cl her.



NBD-Cl dient als Reagenz zum Nachweis primärer und sekundärer aliphatischer Amine, mit denen es intensiv gelb fluoreszierende Produkte bildet. Die präparative Darstellung dieser Verbindungen wurde von Reisch et al. [13] beschrieben. Mit aromatischen Aminen reagiert NBD-Cl ebenfalls, die entstehenden Farbstoffe fluoreszieren allerdings nicht. Die Empfindlichkeit des Nachweises aromatischer Amine ist daher auch um eine Zehnerpotenz geringer als die Empfindlichkeit beim Nachweis aliphatischer Amine [11].

Kuppelt man das Diazoniumion des HCT-Hydrolyseprodukts mit dem modifizierten, fluoreszierenden Naphthylaminderivat, so erhält man folgendes Produkt:



Trägt man die Lösung, die das Kupplungsprodukt enthält, mit einer Konstruktionspipette punktförmig auf eine Dünnschichtplatte auf, so sind anhand der Fluoreszenz noch 0.6 ng HCT-Hydrolyseprodukt sichtbar. Das entspricht einer Empfindlichkeitssteigerung um das Achtefache gegenüber der klassischen Bratton-Marshall-Reaktion, da die Nachweisgrenze für den Azofarbstoff bei 5 ng pro Fleck liegt. Beim Auftragen mit einem Microapplicator können noch 3 ng

pro Fleck mit dem Chromatogrammspektralphotometer gemessen werden. Die Eichkurve verläuft linear im Bereich von 20–200 ng pro Fleck, die lineare Regression für die Eichgerade beträgt 0.9995 (Mittelwert aus zwei gleichzeitig durchgeführten Bestimmungen auf zwei Dünnschichtplatten).

#### Methode B

Bei der Auswertung der Eigenfluoreszenz des Hydrochlorothiazids nach der Messanordnung M–Pr können noch 2 ng HCT pro Fleck gemessen werden. Die Eichkurve verläuft dann linear bis ca. 500 ng pro Fleck (lineare Regression 0.9993). Durch längeres Liegen der Platte nimmt die Fluoreszenz ab. Sie kann jedoch durch erneutes Besprühen und Bestrahlen wieder erzeugt werden. Extrahiert man HCT aus 2 ml Speichel, so sind noch 5 ng/ml Speichel messbar. Die Wiederfindungsrate ist unabhängig vom HCT-Gehalt des Speichels, sie beträgt 99% mit einer Standardabweichung von  $\pm 8\%$  ( $n = 8$ ). Für die Bestimmung von HCT in Urin liegt die Wiederfindungsrate bei 90%, die Standardabweichung beträgt  $\pm 4\%$  ( $n = 8$ ).

Die Wiederfindungsrate für HCT aus Plasma ist ebenfalls vom HCT-Gehalt des Plasmas unabhängig. Sie liegt im Bereich von 20–500 ng/ml Plasma bei 90% mit einer Standardabweichung von  $\pm 7.2\%$  ( $n = 8$ ). Eine exakte Messung ist wegen mitextrahierter Plasmabestandteile, die ebenfalls fluoreszieren, erst ab 20 ng/ml im Plasma möglich. Die vor der eigentlichen chromatographischen Trennung vorausgehende Entwicklung mit Aceton führt zu einer Verringerung des Fleckdurchmessers von HCT und damit zu einer erhöhten Empfindlichkeit.

#### Bestimmung der Hydrochlorothiazid-Kinetik

Um die Analysenmethode B zu überprüfen, wurden im Selbstversuch 25 mg HCT-Substanz eingenommen. Vor der Einnahme sowie innerhalb der ersten 24 h wurden sieben Blutproben entnommen. Das heparinisierte Blut wurde unter Zusatz von "Trennmittel Merck" zentrifugiert, das Plasma abgenommen,

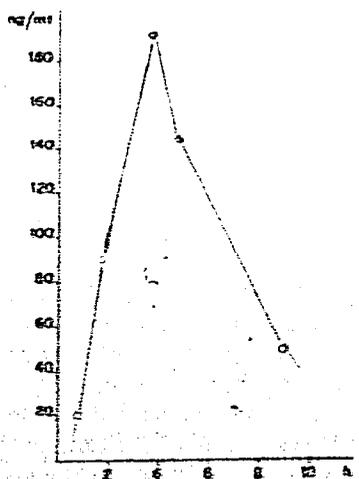


Fig. 4. HCT-Plasmaspiegel nach Einnahme von 25 mg HCT.

bei  $-18^{\circ}$  eingefroren und erst unmittelbar vor Versuchsbeginn aufgetaut. Der HCT-Gehalt des Plasmas konnte über 9 h gemessen werden. Nach 24 h wurde kein HCT mehr im Plasma gefunden. Der maximale Plasmaspiegel war nach 3.5 h erreicht und betrug 192 ng/ml Plasma (Fig. 4). Dies entspricht den Beobachtungen von Anderson et al. [2], die mit  $^{14}\text{C}$  markierten HCT gearbeitet hatten.

## DISKUSSION

Die Ergebnisse zeigen, dass die von uns entwickelte Analysenmethode B in bezug auf die Empfindlichkeit den bisher bekannten Methoden, sofern nicht radioaktives Material verwendet wurde, überlegen ist. Sowohl mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie als auch mit den beiden gaschromatographischen Methoden, die eine Nachweisgrenze von 50 ng HCT/ml Plasma haben, kann nicht über einen ausreichend langen Zeitraum gemessen werden.

Ein gewisses Problem dieser Bestimmungsmethode liegt darin, dass die stark polare Substanz mit unpolaren Extraktionsmitteln, die Extrakte mit wenig Begleitstoffen ergeben, nicht extrahiert werden kann, während polare Extraktionsmittel, wie z.B. Essigsäureäthylester oder 4-Methyl-2-pentanone, auch andere Plasmabestandteile extrahieren. Arbeitet man nach der angegebenen Vorschrift, so ist die Empfindlichkeit gross genug und die Messgenauigkeit ausreichend, da durch die Chromatographie störende Substanzen weitgehend abgetrennt werden.

Der Vorteil der Methode A besteht darin, dass Störungen durch Plasmabestandteile nicht beobachtet werden. Jedoch streuen die Ergebnisse für die Extraktion von HCT aus Plasma stärker als bei Methode B. Die Hydrolyse-Reaktion verläuft bei dem Einsatz nur weniger Nanogramme HCT nicht immer mit der gewünschten Reproduzierbarkeit. Es wird vermutet, dass sich Zwischenstufen ausbilden, die zu einem erneuten Ringschluss befähigt sind [14].

Obwohl sie der Methode B in bezug auf die HCT-Bestimmung unterlegen ist, wird die Methode A in dieser Arbeit beschrieben, da sie sich nicht nur zur Bestimmung allein dieser Substanz eignet: Alle Stoffe, die bereits eine primäre, aromatische Aminogruppe enthalten, oder auch solche, die durch einfache chemische Umwandlung in primäre, aromatische Amine überführt werden können, sind auf diese Weise bestimmbar. Die modifizierte Bratton-Marshall-Reaktion ermöglicht somit die quantitative Bestimmung einer grossen Zahl von Arzneistoffen in Plasma oder anderen Körperflüssigkeiten.

## ZUSAMMENFASSUNG

Zwei fluorimetrische Methoden zur Bestimmung von Hydrochlorothiazid (HCT) durch Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen werden beschrieben. Die erste Methode stellt eine modifizierte Bratton-Marshall-Reaktion dar und ist somit für alle primären, aromatischen Amine anwendbar. Über eine Diazotierung und Azokupplung des HCT-Hydrolysats wird eine fluoreszierende Gruppe angeknüpft. Dazu wird in einer vorgelagerten Reaktion N-(1-Naphthyl)-äthylendiamin mit 4-Chloro-7-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazol umgesetzt. Im zweiten Fall wird die Eigenfluoreszenz des nichtderivatisierten HCT nach seiner Ex-

traktion aus Plasma, Urin oder Speichel ausgewertet. Es wird gezeigt, dass die Empfindlichkeit dieser Methode zur Bestimmung der Kinetik nach oraler Gabe von 25 mg HCT ausreicht.

#### LITERATUR

- 1 H. Sheppard, T.F. Mowles, N. Bowen, A.A. Renzi und A.J. Plummer, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2 (1960) 188.
- 2 K.V. Anderson, H.R. Brettel und J.K. Aikawa, *Arch. Int. Med.*, 107 (1961) 168.
- 3 J.E. Baer, H.L. Leidy, A.V. Brooks und K.H. Beyer, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 125 (1959) 295.
- 4 Y.-W. Yü und C.-Y. Sung, *Acta. Biochim. Sinica*, 25 (1962) 215.
- 5 M.C. Meyer, A.K. Melikian, P.L. Whyatt und G.W.A. Slywka, *Curr. Ther. Res.*, 17 (1975) 570.
- 6 B. Lindström, M. Molander und M. Groschinsky, *J. Chromatogr.*, 114 (1975) 459.
- 7 W.J.A. VandenHeuvel, V.F. Gruber, R.W. Walker und F.J. Wolf, *J. Pharm. Sci.*, 64 (1975) 1309.
- 8 M.J. Cooper, A.R. Sinsiko, A.R. Anders und B.L. Murkin, *Anal. Chem.*, 48 (1976) 1110.
- 9 G.I. Davis und J. Hasegawa, *J. Pharm. Sci.*, 63 (1974) 1793.
- 10 F.C. Novello und S.M. Sprague, *J. Anal. Chem. Soc.*, 79 (1957) 2028.
- 11 J. Reisch, H. Alfes und H.-J. Kommert, *Z. Anal. Chem.*, 245 (1969) 390.
- 12 A.C. Bratton und E.K. Marshall, *J. Biol. Chem.*, 128 (1939) 537.
- 13 J. Reisch, H. Alfes, H.-J. Kommert, N. Jantos, H. Möllmann und D. Clasing, *Pharmazie*, 25 (1970) 333.
- 14 J.A. Mollica, C.R. Rehm, J.B. Smith und H.K. Govan, *J. Pharm. Sci.*, 60 (1971) 1380.