

CHROMBIO. 072

Note

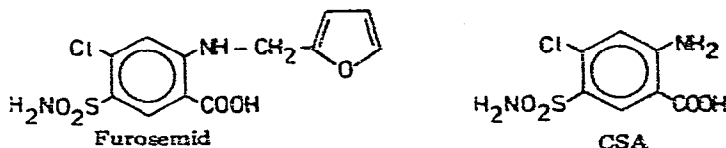
Fluorimetrische Bestimmung von Furosemid und 4-Chloro-5-sulfamoylanthranilsäure in Plasma durch direkte Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen \*

MONIKA SCHÄFER, HEINRICH E. GEISLER und ERNST MUTSCHLER

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

(Eingegangen am 14. März, 1977)

Furosemid (Lasix®) ist eines der am häufigsten verwendeten Diuretica. Jedoch ist bis heute keine Analysenmethode bekannt, die es erlaubt, Furosemid und seinen Metaboliten 4-Chloro-5-sulfamoylanthranilsäure (CSA) nebeneinander und mit ausreichender Empfindlichkeit in Plasma zu bestimmen bzw. zu zeigen, dass keine signifikanten Mengen an CSA im Plasma auftreten.



Die ersten Bestimmungsmethoden wurden von Hajdú und Häussler veröffentlicht [1, 2]. Nach Extraction aus Plasma oder Urin mit Äther wird Furosemid zu CSA hydrolysiert und nach Diazotierung und Kupplung kolorimetrisch bestimmt. Da sowohl Furosemid als auch CSA mit Äther extrahiert wird, ist es nicht möglich, mit dieser Methode den Gehalt des Plasmas an jedem der beiden Stoffe zu bestimmen. Ausserdem beschreiben Hajdú und Häussler noch eine fluorimetrische Mikrobestimmung von Furosemid, die auf der starken Eigenfluoreszenz des Anthranilsäurederivats beruht. Auch mit dieser Methode wird der Metabolit miterfasst [2]. Beide Methoden haben nicht die erforderliche Empfindlichkeit, um bei Gabe therapeutischer Dosen an menschlichen Versuchspersonen Blutspiegelkurven bestimmen zu können.

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

Für die Erzielung einer diuretischen Wirkung sind beim Menschen in der Regel 40 mg Furosemid ausreichend. Hajdú und Häussler messen mit den von ihnen entwickelten Verfahren die bei Tieren nach Gabe von 5 bis 25 mg/kg auftretenden Blutspiegel. Auch bei der Furosemidbestimmung in Urin, Kot, Galle und Milch sind solch hohe Dosen notwendig [2].

Ferner findet man bei diesen Analysenverfahren, insbesondere bei der fluorimetrischen Methode, hohe und schwankende Blindwerte ( $0.3 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ ), die sich nachteilig auswirken. Da bei Gabe von 80 mg Furosemid an nüchterne Versuchspersonen der maximale Blutspiegel nur  $2.2 \mu\text{g/ml}$  (Furosemid und Metabolit gemeinsam erfasst) beträgt [4], können bei Berücksichtigung einer Grundfluoreszenz der Leerprobe, die  $0.3 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$  entspricht, vor allem bei geringen Substanzmengen erhebliche Fehler entstehen.

Modifikationen der fluorimetrischen Methode wurden von Forrey et al. [3, 4] und Andreassen et al. [5] beschrieben. Sie führen zu nur noch schwach fluoreszierenden Leerwerten. Erfasst werden aber wiederum Furosemid und CSA zusammen. Forrey et al. führten auch die ersten pharmakokinetischen Untersuchungen am Menschen durch [4]. Der Furosemid-Gehalt des Serums konnte von ihnen nach oraler Gabe von 80 mg über 4 h gemessen werden. Ähnliche Ergebnisse erhielten sie bei Gaben von  $^{35}\text{S}$  markiertem Furosemid. In der Literatur sind ferner Bestimmungsmethoden beschrieben, welche die Gaschromatographie [6] oder die Hochdruckflüssigkeitschromatographie [7,8] verwenden. Die Nachweisgrenzen liegen bei  $0.1 \mu\text{g}$  [6] bzw.  $1 \mu\text{g/ml}$  [7]. Die von MacDougall entwickelte Methode [8] erlaubt die Bestimmung von Furosemid und CSA nebeneinander. Die Nachweisgrenze liegt allerdings mit  $0.2 \mu\text{g/ml}$  Plasma noch relativ hoch.

Das von uns entwickelte Verfahren ermöglicht es, Furosemid sowie seinen Metaboliten, ohne vorherige Reinigung des Plasmas, in einem Arbeitsgang zu bestimmen. Zur Trennung der beiden Stoffe verwenden wir die Dünnschichtchromatographie (DC). Die Messung erfolgt nach dem Besprühen der Platte mit einer Citronensäure-Lösung mit einem Chromatogrammspektralphotometer (Fig. 1). Das Emissionsmaximum liegt für beide Substanzen bei 420 nm.

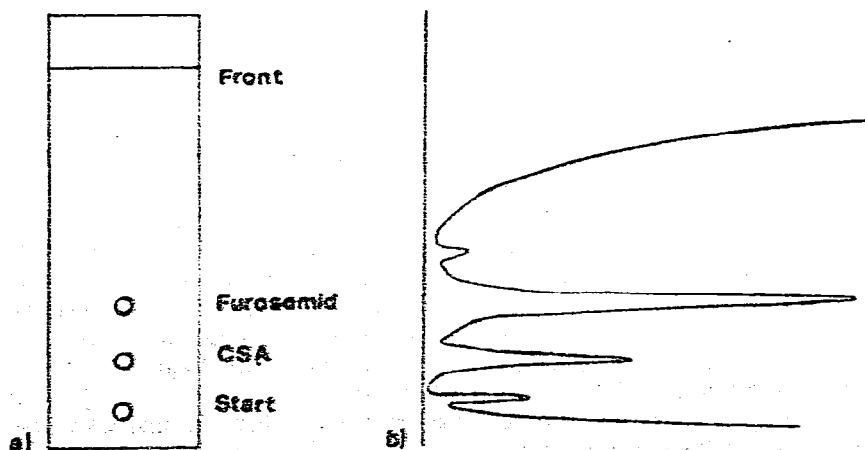


Fig. 1. Furosemid und CSA (200 ng/ml) aus Plasma: (a) Chromatogramm, (b) Auswertung.

## EXPERIMENTELLES

*Geräte*

Chromatogrammspektralphotometer KM 3 der Firma Carl Zeiss (Oberkochen, B.R.D.), mit Kompensationsschreiber Servogor Sb.

*Chemikalien*

Die verwendeten Chemikalien und Dünnschichtplatten (Kieselgel 60, ohne Fluoreszenzindikator, 20 × 20 cm) lieferte Firma Merck (Darmstadt, B.R.D.).

*Methodik*

*Probenvorbereitung und Chromatographie.* 0.50 ml Plasma werden mit 1.00 ml Methanol versetzt. Die gefällten Proteine werden abzentrifugiert und der Überstand filtriert. 50.0  $\mu$ l dieser Lösung werden mit einem Linomaten III (Camag, Muttenz, Schweiz) auf eine DC-Platte aufgetragen. Für die Eichgerade trägt man ausserdem 0.20, 0.50, 1.0, 2.0, 5.0 sowie 10.0 ng Furosemid und CSA (gelöst in Aceton) pro Fleck auf. Die Platte wird in Chloroform-Essigsäureäthylester-Ameisensäure (70:30:5) unter Standardbedingungen entwickelt (Fließmittel modifiziert nach Lit. 9):  $R_F$ -Wert von Furosemid: 0.3 und von CSA: 0.15.

*Messung und Auswertung.* Nach dem Entwickeln wird die Platte getrocknet, zum Äquilibrieren mindestens 3 h liegengelassen und mit einer 10%igen Lösung von Citronensäure in Wasser-Äthylenglycol (1:1) besprüht. Die Messung erfolgt anschliessend ohne erneutes Trocknen der Platte mit dem Chromatogrammspektralphotometer. Die Platte wird parallel zur Entwicklungsrichtung mit einer Geschwindigkeit von 100 mm/min bewegt.

Messanordnung: M-Pr (Monochromator-Probe); Exzitation: Hg-Linie von 365 nm der Quecksilber-Mitteldrucklampe ST 41; Emission: Monochromatfilter M 436; Quarzkondensator; Hochspannung: -400 V; Spaltbild: 1.0 × 8 mm; Verstärkung: 1-100fach. Die Auswertung erfolgt anhand der Eichgeraden unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Nach Entwicklung mit dem oben beschriebenen Fließmittel sind von den Reinsubstanzen noch 0.1 ng Furosemid und 0.5 ng CSA pro Fleck messbar. Die Eichgeraden verlaufen linear bis mindestens 1  $\mu$ g pro Fleck (lineare Regression 0.9993) und gehen durch den Ursprung des Koordinatensystems.

Trägt man 50  $\mu$ l des enteweißten Plasmas auf, so können noch 10 ng Furosemid/ml Plasma gemessen werden. Die Wiederfindungsrate für Furosemid aus Plasma ist unabhängig von dessen Furosemid-Gehalt. Sie beträgt 104% mit einer Standardabweichung von  $\pm 4.7\%$  (Zur Überprüfung wurden 8 Proben zu 0.5 ml mit 20-1000 ng Furosemid nach dem oben beschriebenen Verfahren aufgearbeitet.) Die untere Nachweisgrenze für den Metaboliten liegt bei 50 ng/ml. Die Wiederfindungsrate beträgt  $86.5 \pm 7.2\%$  ( $n = 8$ ).

Die Ergebnisse zeigen, dass die von uns entwickelte Methode zur Bestimmung von Furosemid in Plasma den bisher bekannten Verfahren überlegen ist. Sie erlaubt es, mit geringem Arbeitsaufwand Furosemid und seinen Metabo-

liten 4-Chloro-5-sulfamoylanthranilsäure in Plasma zu bestimmen. Die Nachweisgrenze liegt für Furosemid dabei um eine Zehnerpotenz niedriger als bei der von MacDougall beschriebenen Methode, bei der als einzige sowohl Furosemid als auch sein Metabolit in Plasma bestimmt werden kann. Bei der Bestimmung mit den anderen fluorimetrischen Verfahren werden immer Furosemid und CSA zusammen erfasst.

Es ist ausserdem von besonderer Bedeutung, dass durch die DC-Trennung alle durch Eigenfluoreszenz störenden Plasmabestandteile abgetrennt werden können. Leerproben (= Plasmaproben ohne zugesetztes Furosemid oder CSA) zeigen bei den Furosemid und CSA entsprechenden  $R_F$ -Werten keine Fluoreszenz. Veränderungen in der Zusammensetzung des Plasmas, wie sie z.B. durch eine Nahrungsaufnahme verursacht werden, können demnach nicht durch eine Schwankung in der Grundfluoreszenz stören. Der Analysenfehler ist daher geringer als bei den anderen Verfahren.

#### LITERATUR

- 1 P. Hajdú und A. Häussler, *Arzneim.-Forsch.*, 14 (1964) 709.
- 2 A. Häussler und P. Hajdú, *Arzneim.-Forsch.*, 14 (1964) 710.
- 3 A.W. Forrey, B. Kimpel, A.D. Blair und R.E. Cutler, *Clin. Chem.*, 20 (1974) 152.
- 4 M.R. Kelly, R.E. Cutler, A.W. Forrey und B. Kimpel, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 15 (1974) 178.
- 5 F. Andreassen und P. Jakobsen, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 35 (1974) 49.
- 6 B. Lindström und M. Melander, *J. Chromatogr.*, 101 (1974) 219.
- 7 B. Lindström, *J. Chromatogr.*, 100 (1974) 189.
- 8 M.L. MacDougall, D.W. Shoeman und D.L. Azarnoff, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 10 (1975) 285.
- 9 J. Prandota und A.W. Pruitt, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 17 (1975) 159.