

Journal of Chromatography, 146 (1978) 533—537

Biomedical Applications

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

CHROMBIO. 203

Note

Dünnschichtchromatographische Bestimmung von Acylaminoäthyl-arylsulfonylharnstoffen im Serum nach Hydrolyse und Dansylierung

H. HUCK

Institut für Medizinische und Klinische Chemie der Universität Innsbruck, Innsbruck (Österreich)

(Eingegangen am 24. Februar 1978; geänderte Fassung eingegangen am 10. Mai 1978)

Zu den wirksamsten oralen Antidiabetika gehören die Acylaminoäthyl-Derivate von Arylsulfonylharnstoffen wie Glipizid (Glibenese®), Glibenclamid (Euglucon®), Glisoxepid (Pro-Diaban®) und Glurenorm®. Wegen ihrer niedrigen Dosis mit maximalen Serumkonzentrationen von etwa 500 ng/ml pro Tablette ist eine direkte dünnschichtchromatographische (DC) Bestimmung durch Messung der UV-Absorption bzw. der Fluoreszenzlöschung von Leuchtstoffschichten wie beim Chlorpropamid [1] nicht mehr möglich. Eine gaschromatographische (GC) Bestimmung mit Elektroneneinfangdetektion der Methyltrifluoracetyl- oder Methylheptafluorbutyryl-Derivate wie beim Chlorpropamid und Tolbutamid [2] würde wegen des grösseren Molekulargewichts und einer zusätzlichen polaren Gruppe der Acylaminoäthyl-Derivate höhere Säulentemperaturen erfordern, sodass sich Probleme hinsichtlich der thermischen Stabilität ergeben könnten. Als weitere, geeignete Methoden bieten sich an: Die Pyrolyse-GC (Tolbutamid [3], Tolazamid [4]), die Massenspektrometrie unter Verwendung eines stabilen Isotops als innerem Standard (Tolbutamid und seine Metabolite [5]) und schliesslich die radioimmunologische Methode (Glisoxepid [6]).

Die vorliegende Methode, die sich durch geringen apparativen Aufwand auszeichnet, geht davon aus, dass sich die Acylreste der Acylaminoäthyl-sulfonylharnstoffe selektiv durch alkalische Hydrolyse abspalten lassen, ohne dass dabei die Sulfonylharnstoffgruppe angegriffen wird. Nach Neutralisation der Lösung wird das freigesetzte Amin entsprechend der bewährten Methode zur Bestimmung biogener Amine aus biologischem Material [7—12] in ein fluoreszierendes Dansylderivat übergeführt und nach zwei-dimensionalen

DC-Trennung auf Kieselgel im Nanogrammbereich mittels eines Chromatogramm-Spektralphotometers ausgewertet.

Auch eine saure Hydrolyse kann durchgeführt werden, bei welcher gleichzeitig die Acylamino- und die Harnstoffgruppe gespalten werden. Da wegen der grösseren Beständigkeit der Harnstoffgruppe längere Reaktionszeiten erforderlich sind, wird die alkalische Spaltung bevorzugt. Ein Nachteil der sauren Hydrolyse ist auch, dass ev. vorhandene aliphatische Hydroxylgruppen, z.B. bei den Metaboliten, unter Bildung isomerer Olefine eliminiert werden.

Die Verhältnisse der alkalischen und sauren Spaltung werden in Fig. 1 am Beispiel von Glipizid dargestellt. Bei der sauren Spaltung entsteht als Zwischenprodukt N-(4-Aminoäthylbenzolsulfonyl)-N'-cyclohexyl-harnstoff, als Endprodukte Cyclohexylamin und 4-Aminoäthylbenzolsulfonamid. Bei der alkalischen Spaltung tritt nur der N-(4-Aminoäthylbenzolsulfonyl)-N'-cyclohexyl-harnstoff auf.

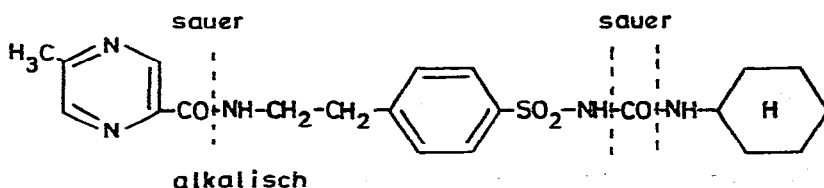


Fig. 1. Spaltung von Glipizid durch saure und alkalische Hydrolyse.

MATERIAL

Geräte

Zeiss-Spektralphotometer PMQ II, Camag-Z-Scanner, Goerz-Schreiber RE 541.

Lösungen

1 M Acetatpuffer von pH 4.3, hergestellt aus 1 M NaAc und Essigsäure; 1 M Carbonat-Bicarbonatpuffer von pH 9.5, hergestellt aus 1 M NaHCO₃ und 5 N NaOH; Dansylchloridlösung: 100 mg Dansylchlorid (Merck, Darmstadt, B.R.D.) in 50 ml Aceton.

Glipizid-Standard. 5 mg Glipizid (Pfizer Austria, Wien, Österreich) werden in 100 ml Äthanol gelöst. 1 ml dieser Lösung wird zur Trockene abgedampft. Der Abdampfrückstand wird nach (b₁) und (c) des methodischen Teils hydrolysiert und dansyliert. Der Trockenrückstand des Dansylderivates wird in 1 ml Äthanol gelöst.

Mafenid-Standard. 5 mg Mafenid (4-Aminomethylbenzolsulfonamid, Bayer-Leverkusen) werden in 100 ml Äthanol gelöst. 1 ml dieser Lösung wird zur Trockene abgedampft und der Rückstand nach (c) des methodischen Teils dansyliert. Der Trockenrückstand des Dansylderivats wird in 1 ml Äthanol gelöst.

Alle genannten Chemikalien haben p.a. Reinheitsgrad.

Laufmittel

Als Laufmittel wurden verwendet: Cyclohexan-Essigsäureäthylester-Es-

sigsäure (60:40:2); (B) Chloroform–Methanol–Essigsäure (100:3:1); (C) Cyclohexan–Essigsäureäthylester (70:30). Alle genannten Laufmittel werden nach einmaligen Gebrauch verworfen.

Sprühmittel

Als Sprühmittel wurde verwendet Isopropanol–Triäthanolamin (80:20).

METHODE

(a) Extraktion

1 ml Serum wird in einem Schütteltrichter mit 1 ml Wasser, 0,2 ml Acetatpuffer von pH 4,3 und 5 μ l der Mafenid-Standardlösung versetzt, mit 1 \times 10 ml und 1 \times 5 ml Chloroform–Isopropanol (100:8) extrahiert, die organische Phase durch einen Faltenfilter (Selecta Nr. 595-1/2- \emptyset 9 cm) filtriert, das Lösungsmittel im Luftstrom abgedampft, die Gefäßwand mit 1 ml Aceton nachgespült und das Aceton ebenfalls abgedampft.

(b₁) Alkalische Hydrolyse

Der Extraktionsrückstand wird in 1 ml 5 N NaOH aufgenommen und im offenem Röhrchen während 2 h auf 100° erhitzt. Die gut abgekühlte Lösung wird mit einem durch Titration gegen Phenolphthalein im Blindversuch ermittelten Volumen HCl 1:1 neutralisiert (0,84 ml).

(b₂) Saure Hydrolyse

Diese wurde durchgeführt mit 0,5 ml 50% (v/v) H₂SO₄, wobei 6 h auf 100° erhitzt wird. Die gut abgekühlte Lösung wird mit einem in Blindversuch ermittelten Volumen 5 N NaOH neutralisiert (1,85 ml).

(c) Dansylierung

Da unter den hier vorliegenden Reaktionsbedingungen, die durch relativ hohe Salzkonzentrationen gekennzeichnet sind, die Dansylierung mit NaHCO₃-Puffer unvollständig verlief und sich mit Na₂CO₃-Puffer wegen des Vorhandenseins der schwach aciden Sulfonamidgruppe bereits ein Na-Salz bildet, war es notwendig, ein NaHCO₃–Na₂CO₃-Puffer einzusetzen: Die neutralisierten Lösungen werden mit 2 ml NaHCO₃–Na₂CO₃-Puffer von pH 9,5 und 2 ml Dansylchloridlösung versetzt und 30 min auf 45° erwärmt. Nach dem Abkühlen wird mit 1 \times 2 ml und 1 \times 1 ml Chloroform extrahiert, die untere Phase mittels einer Pipette abgehoben und durch einen Faltenfilter (Selecta Nr. 595-1/2- \emptyset 5,5 cm) in ein spitzen Röhrchen filtriert. Das Lösungsmittel wird im Luftstrom abgeblasen.

(d) DC-Trennung

Die Dansylderivate werden in 50 μ l Chloroform gelöst und in Anteilen zu 5 μ l unter Zwischentrocknung auf eine DC-Platte (10 \times 20 cm, Kieselgel 60, Merck) unter Einhaltung von 2 cm Abstand von den Plattenrändern aufgetragen. Im Abstand von 5 cm zur Probe werden auf dieselbe Stelle je 5 μ l Glipezid- und Mafenid-Standardlösung mit je 250 ng nicht dansylierter Substanz aufgetragen. Die Trennung erfolgt durch zweidimensionale DC im Dunkeln zunächst mit dem Laufmittel A bis zum Plattenrand. Zum Trocknen wird die Platte 15 min im Dunkeln stehen gelassen, anschließend wird mit dem Lauf-

mittel B ebenfalls bis zum Plattenrand entwickelt, getrocknet und kräftig mit Isopropanol-Triäthanolamin bis zur beginnenden Transparenz besprüht. Zum Nachtrocknen wird die Platte 30 min im Dunkeln gelagert.

(e) *Fluoreszenzmessung*

Anregung bei 366 nm, Emission bei 510 nm, ausgeleuchtete Fläche: 4 mm × 6 mm, Monochromatorblende ganz geöffnet, maximale Verstärkung (3000 ×). Zur Erhöhung der Empfindlichkeit und zur Unterdrückung von 0-Linienschwankungen wird eine zweite Kieselgelplatte unterlegt. Probe, Glipizid, äusserer Mafenid- und innerer Mafenidstandard werden unter der UV-Lampe markiert und durch Scannen in der zweiten Eluierungsrichtung aufgenommen. Die Peakhöhen sind der Reihe nach h_x , h_{st} , H_m und h_m . m_{st} sei die aufgetragene Menge an Glipizidstandard (250 ng).

(f) *Berechnung*

Die Glipizidmenge m_x /ml Serum wird wie folgt berechnet

$$m_x = \frac{h_x \cdot H_m}{h_{st} \cdot h_m} \cdot m_{st}$$

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Wegen der starken Konzentrierung des Serumextraktes treten bei eindimensionaler DC störende Überlagerungen auf. Eine vollständige Trennung wird durch zweidimensionale DC erreicht*. Eine zusätzliche Reinigung der Serumextrakte durch eine extraktive Methylierung [13–15] scheidet zumindest bei der Glipizid-Bestimmung aus, da Pyrazin mit Methyljodid ein quartäres Ammoniumsalz bildet, welches sich nicht extrahieren lässt.

Überlagerungen im Chromatogramm können auch bei benachbarten, vollständig getrennten Substanzen auftreten, wenn zur Erzielung einer grossen Empfindlichkeit die DC-Platte mit einem breiten Lichtbündel ausgewertet wird. Solche, durch eine unvollständige optische Auflösung hervorgerufene Überlagerungen werden vermieden, wenn störende Substanzen unter der UV-Lampe abgekratzt werden. Voraussetzung ist, dass fehlende Streulichtanteile durch eine unterlegte zweite DC-Platte wieder ergänzt werden können.

Die mit den Laufmitteln A, B und C erhaltenen R_F -Werte der drei Glipizid-Spaltprodukte und des Mafenid-Standards sind in Tabelle I aufgeführt, ebenso die in Frage kommenden mengenmässig bedeutsamsten Metabolite, das 4-*trans*-hydroxy-cyclohexyl- und das 3-*cis*-hydroxy-cyclohexyl-Derivat, die bei der alkalischen Spaltung in die entsprechenden Hydroxyderivate des N-(4-Aminoäthylbenzolsulfonyl)-N'-cyclohexyl-harnstoffs übergehen.

Zur Überprüfung der Linearität und der Streuung wurden Messungen im Bereich von 10–500 ng pro Fleck durchgeführt, wobei jede Probe für sich hydrolysiert und dansyliert wurde. Die Auftragung Peakhöhe-Menge ergibt eine lineare Beziehung. Der Variationskoeffizient der Methode ab der Extraktion beträgt ± 4.3% (9 Bestimmungen im Bereich von 25–500 ng), die Nachweisgrenze 1 ng/ml Serum und die Wiederfindung $83 \pm 3.2\%$ (5 Proben zu je

*Inzwischen konnte auf eindimensionale DC übergegangen werden, wobei Kieselgelplatten mit Konzentrierungszone (Merck, Darmstadt, B.R.D.) und Äther (max. 0.2% Wasser!) oder Äther-Essigsäureäthylester-Cyclohexan (50:25:25) als Laufmittel eingesetzt wurden.

TABELLE I

R_F-WERTE VON DANSYLDERIVATEN DER SPALTPRODUKTE VON GLIPIZID UND SEINER METABOLITE

Amin	Laufmittel		
	A	B*	C
N-(4-Aminoäthylbenzolsulfonyl)-N'-(4-trans-hydroxycyclohexyl)-harnstoff	0.03	0.07	
N-(4-Aminoäthylbenzolsulfonyl)-N'-(3-cis-hydroxycyclohexyl)-harnstoff	0.04	0.09	
4-Aminomethylbenzolsulfonamid (Standard)	0.18	0.22	
4-Aminoäthylbenzolsulfonamid	0.19	0.29	0.01
N-(4-Aminoäthylbenzolsulfonyl)-N'-cyclohexyl-harnstoff	0.36	0.40	0.02
Ammoniak	0.43	0.38	0.19
Cyclohexylamin	0.69	0.83	0.49
Dansylchlorid	0.78	0.89	0.63

*Die R_F-Werte gelten bei zweidimensionaler DC, wenn zuvor mit dem Laufmittel A entwickelt wurde, oder bei eindimensionaler DC mit erhöhten Methanolanteil des Laufmittels (Chloroform—Methanol—Essigsäure, 100:5:1).

250 ng Glipizid pro ml Serum).

Die vorliegende Methode eignet sich nicht nur für Routinebestimmungen, sondern auch für pharmakokinetische Untersuchungen, die bereits nach der radio-tracer Methode mit C¹⁴-markiertes Glipizid durchgeführt wurden [16, 17].

DANK

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Grunicke, Vorstand des Instituts für Medizinische Chemie, für die Förderung der Arbeit und Herrn Prof. Dr. G. Wick, Vorstand des Instituts für Allg. und Exp. Pathologie, für die Bereitstellung des Chromatogramm-Spektralphotometers.

LITERATUR

- 1 A.M. Monro und P.G. Welling, *Europ. J. Clin. Pharmacol.*, 7 (1974) 47.
- 2 W.E. Braselton, E.D. Bransome und Th. A. Huff, *Diabetes*, 26 (1977) 50.
- 3 D.L. Simmons, R.J. Ranz und P. Picotte, *J. Chromatogr.*, 71 (1972) 421.
- 4 J.A.F. Wickramasinghe und S.R. Shaw, *J. Pharm. Sci.*, 60 (1971) 1669.
- 5 S.B. Martin und J.B. Knight, *Biomed. Mass. Spectrom.*, 1 (1974) 323.
- 6 B. Nieuweboer, D. Gabriel und K. Lübke, *Arzneim.-Forsch.*, 26 (1976) 1633.
- 7 N. Seiler und M. Wiechmann, *Experientia*, 21 (1965) 203.
- 8 N. Seiler und M. Wiechmann, *Z. Anal. Chem.*, 220 (1966) 109.
- 9 N. Seiler und M. Wiechmann, *J. Chromatogr.*, 28 (1967) 351.
- 10 N. Seiler, *Methods Biochem. Anal.*, 18 (1970) 259.
- 11 N. Seiler, *J. Chromatogr.*, 63 (1971) 97.
- 12 N. Seiler, *J. Chromatogr.*, 143 (1977) 221.
- 13 M. Garle und I. Petters, *J. Chromatogr.*, 140 (1977) 165.
- 14 P. Hartvig und Chr. Fagerlund, *J. Chromatogr.*, 140 (1977) 170.
- 15 A. Arbin, *J. Chromatogr.*, 144 (1977) 85.
- 16 H.A.E. Schmidt, M. Schoog, K.H. Schweer und E. Winkler, *Diabetologia*, 9 (1973) 320.
- 17 L. Balant, G. Zahnd, A. Gorgia, R. Schwarz und J. Farbre, *Diabetologia*, 9 (1973) 331.