

CHROMBIO. 1418

Note

---

**Fluorimetrische Bestimmung von Amilorid in Humanplasma mittels Dünnschichtchromatographie**

KAROLA REUTER, H. KNAUF und ERNST MUTSCHLER\*

*Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Theodor-Stern-Kai 7, Gebäude 75A, D-6000 Frankfurt am Main 70 (B.R.D.)*

(Eingegangen am 19. April 1982)

Obwohl das kaliumretinierende Diuretikum Amilorid (N-Amidino-3,5-diamino-6-chloropyrazin-carboxamid) schon lange therapeutisch eingesetzt wird, liegen nur wenige pharmakokinetische Untersuchungen vor. Noch 1979 wurde von der Herstellerfirma in dem Informationsprospekt zu Moduretik<sup>®</sup> angegeben, dass bei üblicher Dosierung der Serumspiegel von Amilorid zu niedrig sei, um fluorimetrisch erfasst werden zu können. Quantitative Bestimmungen von Amilorid in Humanplasma wurden daher mit <sup>14</sup>C-markiertem Amilorid durchgeführt [1–4]. Für pharmakokinetische Untersuchungen am Tier wurde ausserdem von Baer et al. [5] eine photometrische Bestimmungsmethode beschrieben. Der Wirkstoff wird dabei aus alkalisiertem Plasma mit Ethylacetat extrahiert und vor der spektralphotometrischen Bestimmung in eine saure, wässrige Lösung rückextrahiert. Die verwendeten Dosen von 4 mg/kg lagen jedoch wesentlich höher als die therapeutische Gabe beim Menschen (Einzeldosis 5–20 mg Amilorid-HCl). Metaboliten von Amilorid wurden bisher nicht gefunden [3, 4, 6].

Wegen der zunehmenden Bedeutung, die kaliumretinierende Diuretika insbesondere in Kombination mit Thiaziden zur Hypertoniebehandlung in den letzten Jahren gewonnen haben, erschien es uns sinnvoll, die Kinetik von Amilorid genauer zu untersuchen und dazu eine Bestimmungsmethode zu entwickeln, die empfindlich genug ist, um Amilorid-Plasmaspiegel beim Menschen ohne Verwendung von radioaktiv markiertem Material zu bestimmen. Bei dem im folgenden näher beschriebenen Verfahren wird der Wirkstoff aus alkalisiertem Plasma mit einem *n*-Butanol-Diisopropylether-Gemisch extrahiert und der Amiloridgehalt nach chromatographischer Trennung durch direkte Messung der Nativfluoreszenz auf der Dünnschichtplatte bestimmt.

## EXPERIMENTELLER TEIL

### Geräte

Chromatogramm-Spektralphotometer KM3 mit Quecksilberdampf-Mittel-druck-Lampe ST41 der Firma Carl Zeiss; Perkin-Elmer-Recorder Modell 56; Perkin-Elmer-Integrator Modell M3B; Linomat III der Firma Camag mit 100- $\mu$ l Hamilton-Spritze; Tecam-Heizblock mit Stickstoffbegasung.

### Chemikalien

Amilorid-HCl-Dihydrat stellte die Firma MSD (München, B.R.D.) zur Verfügung. Die Lösungsmittel (p.a.-Qualität) sowie die Dünnschichtchromatographie (DC)-Platten (Kieselgel 60 HPTLC, ohne Fluoreszenzindikator) wurden von der Firma Merck (Darmstadt, B.R.D.) bezogen. Die Glasgeräte wurden mit Silikonimprägnierer der Firma Roth behandelt.

### Extraktion

In einem silikonisierten Sovirel<sup>®</sup>-Glas werden 1.0 ml Plasma mit 0.2 ml 1 N Natronlauge und 5.0 ml eines Gemisches aus *n*-Butanol und Diisopropylether (1:1, v/v) versetzt. Nach 60-min Schütteln wird 10 min scharf zentrifugiert. 2.0 ml der Oberphase werden bei 80°C unter Stickstoffbegasung bis zur Trockene eingengt; die Glaswände werden dabei mit 0.2 ml Methanol-Diisopropylether-Gemisch (3:2, v/v) abgespült.

### Chromatographie

Der Rückstand wird in 50  $\mu$ l dieses Lösungsmittelgemisches aufgenommen und 20  $\mu$ l werden bandförmig (6 mm) auf die DC-Platte aufgetragen. Bei der Bestimmung von Plasmaproben werden pro Platte drei Plasmastandards aufgetragen, die ebenso aufgearbeitet werden. Zunächst wird in Ethylacetat chromatographiert (Laufstrecke 8 cm,  $hR_F = 0$ ). Anschliessend wird die Platte in 2-Propanol-Diisopropylether-Ammoniak 25% (70:30:10, v/v/v; nach Kammer-sättigung) entwickelt (Laufstrecke 8 cm,  $hR_F = 34$ ). Nach dem Trocknen wird in Paraffin-Cyclohexan (1:2, v/v) getaucht und erneut getrocknet.

### Messbedingungen

Zur Fluoreszenzanregung wird die Platte mit Licht der Wellenlänge 365 nm bestrahlt (Spalt 0.5  $\times$  8 mm). Die Emission durch den M436-Monochromatfilter wird gemessen (Fig. 1). Die Auswertung erfolgt über das Flächenintegral der Fluoreszenzortskurve.

### Präzision und Richtigkeit

Zur Untersuchung der Linearität des Verfahrens wurden je drei Plasmastandards mit folgenden Amilorid-Konzentrationen aufgearbeitet: 0.5 ng/ml, 1.0 ng/ml, 2.0 ng/ml, 5.0 ng/ml, 10.0 ng/ml und 50.0 ng/ml. Die Standardabweichung wurde mit jeweils acht Plasmastandards gleicher Konzentration bestimmt. Die Wiederfindungsrate wurde durch den Vergleich einer Lösung der Amilorid-Base in Methanol-Diisopropylether (3:2, v/v) mit aufgearbeiteten Plasmastandards verschiedener Konzentrationen berechnet.

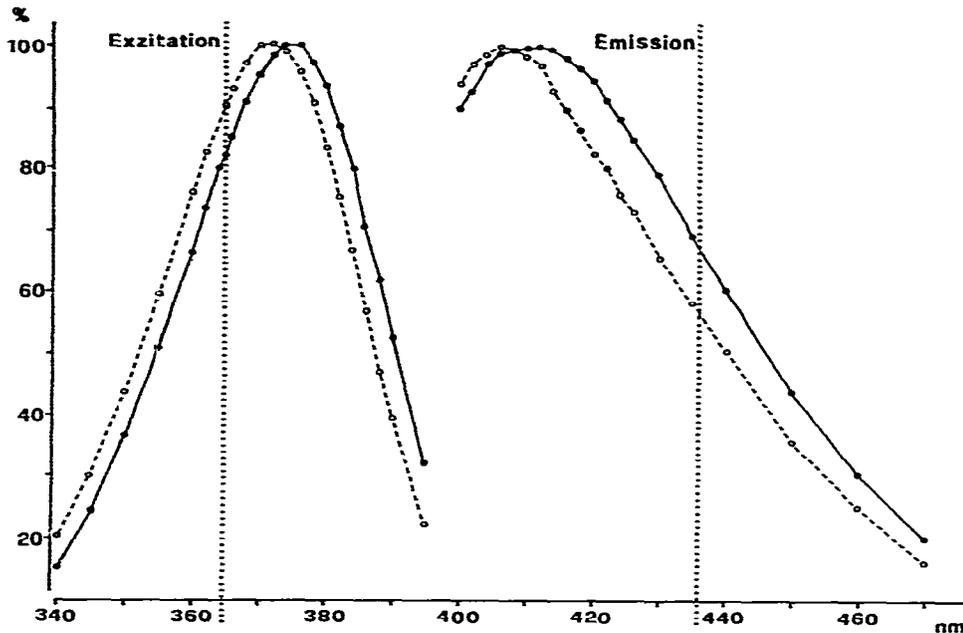


Fig. 1. Exzitations- und Emissionsspektren von Amilorid auf einer DC-Platte nach Chromatographie. Abszisse: Wellenlänge in nm; Ordinate: relative Fluoreszenzintensität in %.  $\circ - - - \circ$ , vor dem Tauchvorgang;  $\bullet - \bullet$ , nach dem Tauchen in Paraffin-Cyclohexan.

#### Anwendung der Methode

Zwei Personen wurden vor dem Frühstück zwei Tabletten zu je 5 mg Amilorid-HCl appliziert. Venenblut wurde nach 0, 1 bzw. 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24, 48 h entnommen. Das erhaltene Citratplasma wurde bis zur Bestimmung bei  $-18^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### ERGEBNISSE

Die Flächen unter den Fluoreszenzortskurven sind den vorhandenen Substanzkonzentrationen im Bereich von 0–50 ng/ml direkt proportional. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0.999, die Gerade verläuft annähernd durch den Nullpunkt. Die Ergebnisse der Untersuchung der Standardabweichung sind in Tabelle I angegeben. Die Grenze der quantitativen Erfassung in Plasma liegt bei 0.2 ng/

TABELLE I

RELATIVE STANDARDABWEICHUNG ( $n=8$ ) IN ABHÄNGIGKEIT VON DER AMILORIDKONZENTRATION

Amilorid-Base (ng/ml)	Standardabweichung ( $SD_{n-1}$ ) (%)
2	3.3
5	3.0
10	2.5
20	2.4

ml. Die Wiederfindungsrate beträgt ca. 62%.

Die gemessenen Plasmaspiegel eines Probanden und eines Patienten mit Niereninsuffizienz sind in Fig. 2 dargestellt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus mindestens zwei getrennten Bestimmungen [7].

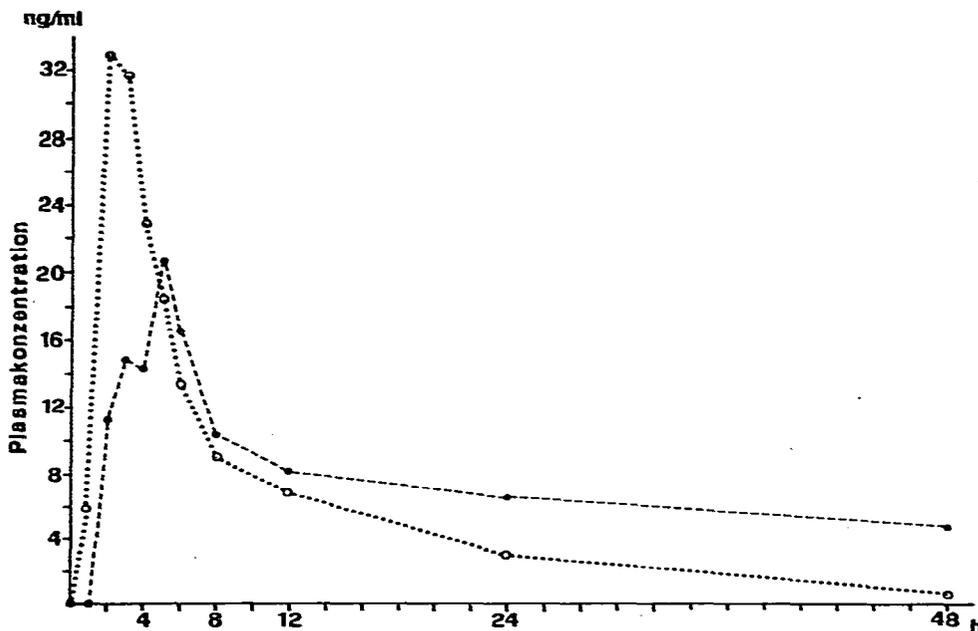


Fig. 2. Plasmaspiegelkurve von Amilorid nach Applikation von 10 mg Amilorid-HCl an (○·····○) einen Probanden und (● — — — ●) einen Patienten mit Niereninsuffizienz.

## DISKUSSION

Das vorliegende Verfahren erlaubt es, nicht radioaktiv markiertes Amilorid in Humanplasma nach einmaliger, therapeutischer Dosierung schnell und einfach zu bestimmen. Die Linearität der Bestimmungsmethode erstreckt sich über einen Bereich von mehr als zwei Zehnerpotenzen. Mitextrahierte Plasmabestandteile, die die eigentliche Chromatographie und die anschließende Auswertung stören, werden durch Vorentwickeln der DC-Platte mit reinem Ethylacetat abgetrennt. Insgesamt ermöglicht das Verfahren eine selektive Bestimmung des Wirkstoffes (Fig. 3).

Das Tauchen der DC-Platte in Cyclohexan-Paraffin erhöht die Fluoreszenzintensität um ca. 80% bei gleichbleibendem Grundrauschen. Auf diese Weise wird der Messfehler erheblich reduziert und die Empfindlichkeit der Methode verbessert. Ausserdem bleibt die Grösse des Mess-signal über längere Zeit erhalten. Als Nebeneffekt des Tauchvorganges werden das Exzitations- und das Emissionsmaximum geringfügig in den längerwelligen Bereich verschoben (Fig. 1). Um eine optimale Reproduzierbarkeit beim Arbeiten mit sehr kleinen Mengen Amilorid zu erhalten, sollte unbedingt darauf geachtet werden, dass die Glasgeräte silikonisiert sind, andernfalls kann die Standardabweichung erheblich zunehmen. Durch das Arbeiten mit Dünnschichtplatten

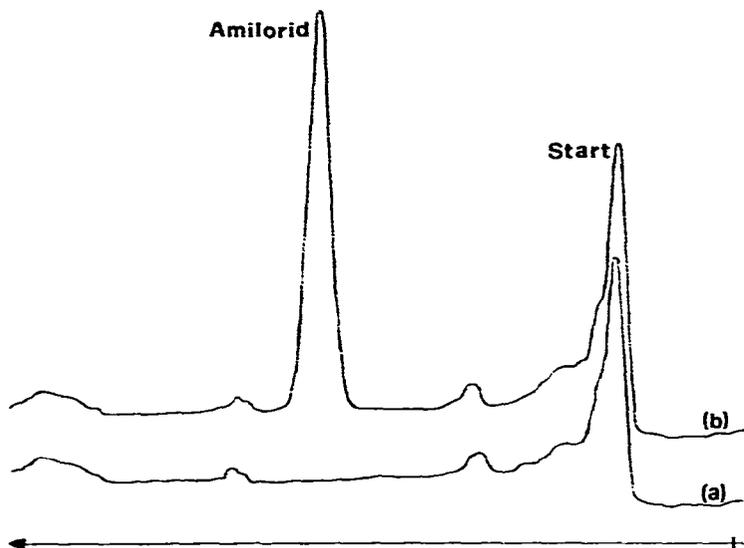


Fig. 3. Fluoreszenzortskurve eines entwickelten Chromatogramms. (a) Leerplasma, (b) Plasma mit 10 ng/ml Amilorid-Base.

als chromatographischem System ist die Methode auch gut für halbquantitative Untersuchungen ohne genaue densitometrische Auswertung geeignet.

DANK

Der Dr.-Robert-Pfleger-Stiftung danken wir für eine Sachbeihilfe.

#### LITERATUR

- 1 P. Weiss, R.M. Hersey, C.A. Dujovne und I.R. Bianchine, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 10 (1969) 401.
- 2 C.F. George, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 9 (1980) 94.
- 3 M.F. Grayson, A.J. Smith und R.N. Smith, *Br. J. Pharmacol.*, 43 (1971) 473.
- 4 A.J. Smith und R.N. Smith, *Br. J. Pharmacol.*, 48 (1973) 646.
- 5 J.E. Baer, C.B. Jones, S.A. Spitzer und H.F. Russo, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 157 (1967) 472.
- 6 E. Schmid und G. Fricke, in K. Thureau und H. Jahrmarker (Herausgeber), *Renal Transport and Diuretics, International Symposium in Feldafing, 1968*, Springer, New York, Berlin, 1969, S. 301.
- 7 K. Reuter, Dissertation, Frankfurt/Main, in Vorbereitung.