

CHROMBIO. 577**Note****Fluorimetrische Bestimmung von Xipamid in biologischem Material mit einem neuen Fluoreszenzreagens****MARKUS SOBEL* und ERNST MUTSCHLER****Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Theodor-Stern-Kai 7, 6000 Frankfurt/Main (B.R.D.)*

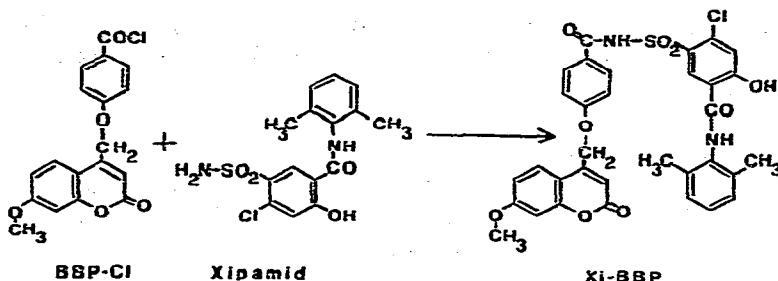
(Eingegangen am 1. Februar 1980)

Für die Bestimmung von Xipamid (4-Chlor-5-sulfamoyl-2,6-salicyloxylidid), einem Saluretikum mit thiazidartiger Wirkung aus der Sulfonamidreihe, in biologischem Material setzten Hempelmann und Dieker [1] bei pharmakokinetischen Untersuchungen ^{35}S -markiertes Xipamid ein. Da nur die Aktivität des ^{35}S -Schwefels gemessen wird, ist eine sorgfältige und aufwendige Abtrennung der Metaboliten notwendig.

Andere Verfahren für die Xipamid-Bestimmung sind in der Literatur bisher nicht beschrieben. Da die oben genannte Methode bezüglich ihrer Anwendbarkeit nicht voll befriedigt und die Verwendung von radioaktivem Material nur in der Einführungsphase eines Arzneistoffs möglich ist, versuchten wir eine neue Bestimmungsmethode für Xipamid zu entwickeln. Dazu wurde ein neues, von uns synthetisiertes Fluoreszenzreagens [4-(7-Methoxy-2-oxo-2H-benzopyran-4-ylmethoxy)-benzoylchlorid] verwendet, über dessen Synthese und Eigenschaften an anderer Stelle [2] berichtet wird. Dieses bildet mit Xipamid ein Benzoesäure-benzolsulfonylamid, dessen Struktur durch NMR-Untersuchung gesichert wurde. Die Reaktion in Aceton-Kaliumcarbonat führt zu einem fluoreszierenden Produkt, welches nach dünnenschichtchromatographischer Abtrennung quantitativ direkt auf der Platte gemessen wird. Das Verfahren lässt sich sowohl bei Plasma als auch Urin anwenden.

Die Vorteile der Methode liegen in einem geringen Verbrauch an Analysenmaterial (0.1-1 ml), einer niedrigen Nachweisgrenze (< 10 ng/ml), der chromatographischen Abtrennung störender Bestandteile sowie in der einfachen Handhabung.

*Teilergebnisse der Dissertation M. Sobel, in Vorbereitung.



METHODIK

Geräte

Chromatogramm-Spektralfotometer KM 3 (Carl Zeiss, Oberkochen, B.R.D.), mit Perkin-Elmer-Recorder 56 und Perkin-Elmer-Integrator M3-B; Linomat III Camag; NMR-Perkin-Elmer R 32 90 MHz; IR Acculab 2, Beckmann, KBr; Schmelzpunkt-Bestimmungsapparat Büchi.

Chemikalien

Xipamid stellte freundlicherweise die Fa. Beiersdorf, Hamburg, B.R.D., zur Verfügung. Das Reagenz [4-(7-Methoxy-2-oxo-2H-benzopyran-4-ylmethoxy)benzoylchlorid; BBP-Cl] wurde wie in Lit. 2 beschrieben synthetisiert. Die restlichen Chemikalien einschliesslich der Dünnschicht-Fertigplatten (Kieselgel 60, 20 × 20 cm, ohne Fluoreszenzindikator) wurden von E. Merck, Darmstadt, B.R.D., bezogen. Als Lösungsmittel für die Reagenzlösung wurden Toluol Uvasol^R und Aceton Uvasol^R verwendet. Die anderen Chemikalien hatten den Reinheitsgrad p.a.

Synthese des Xipamidderivates (Xi-BBP)

200 mg Xipamid (M.G. 354.83), 100 mg BBP-Cl (M.G. 344.8) und 500 mg NaHCO₃ werden in 100 ml trockenem Aceton bei Raumtemperatur bis zur völligen Umsetzung des Säurechlorids gerührt [3]. Wenn die Reaktion beendet ist, wird zum Sieden erhitzt, abgesaugt, mit heissem Aceton nachgewaschen und bis zur ersten Trübung eingeengt. Die entstehenden weissen Kristalle werden mehrmals aus Aceton, Toluol und Methanol-Wasser (7:3) umkristallisiert.

Fließmittel: Toluol-Essigsäureethylester (1:1, v/v) $R_F = 0.45$. F.P. = 226°C. C₃₃H₂₇N₂O₉ClS: Ber.: C 59.7, H 4.1, N 4.2; Gef.: C 59.85, H 4.36, N 4.4%.

¹H-NMR: DMSO-d6, δ ppm, TSP; 2.18 (s, 6H, (-CH₃)₂); 3.90 (s, 3H, -O-CH₃); 5.42 (m, 2H, -CH₂-); 6.40 (s, 1H, -CO-NH-); 6.46 (m, 1H, =CH-); 6.76 (m, 1H, Xipa.-C-3); 6.90–7.32 (m, 7H, -C₆H₄-, -C₆H₃); 7.75–8.03 (m, 3H, Benzopyran 5-, 6-, 8-H); 8.48 (s, 1H, Xipa.C-6); 13.25 (s, 1H, -OH).

IR (cm⁻¹): 3290 (-OH); 1725 (-CO-O-C); 1650 (-CO-NH-); 1165 (-SO₂-N).

Reagenzlösung

Stammlösung: 5 mg BBP-Cl werden in 50 ml Toluol gelöst. Die Lösung ist im Kühlschrank vier Wochen haltbar. Diese Lösung wird zur Anwendung 1:5 mit Aceton verdünnt. Liegt der Gehalt der Probe unter 100 ng, wird diese

Lösung nochmals 1:5 mit Aceton verdünnt. Die verdünnte Lösung ist jeweils frisch zu bereiten. Die Konzentration beträgt 20 bzw. 4 μg Säurechlorid (gleich 58 bzw. 11.6 nmol) pro ml.

Probenaufarbeitung für Plasma und Urin

In einem verschliessbaren Zentrifugenglas werden 1 (0.1) ml Plasma oder Urin mit 1 ml Pufferlösung pH 5 (Citrat-Natronlauge-Puffer, Merck) und 4 ml Essigester [4] versetzt, 1 h maschinell geschüttelt und scharf zentrifugiert. Mit einer Pipette werden von der organischen Phase 1.0–3.0 ml abgenommen und in einem zweiten verschliessbaren Glas unter Stickstoffbegasung zur Trockne eingedampft.

Der Rückstand wird in 1.0 ml Reagenzlösung gelöst, mit einer Spatelspitze wasserfreiem Na_2CO_3 versetzt und 3 h unter Vermeidung von direktem Lichteinfall bei Raumtemperatur geschüttelt. Liegt der Gehalt der Probe über 1000 ng, so ist entsprechend zu verdünnen.

Wiederfindungsgerate

Um Fehler bei unterschiedlicher Raumtemperatur durch die Flüchtigkeit des Essigesters auszugleichen, wird bei jeder Probenserie die Wiederfindungsrate bestimmt. Zu 1 ml gepooltem Leerplasma (Leerurin) wird 1 μg Xipamid (0.1 ml einer Lösung 1 mg auf 100 ml Wasser) zugesetzt. Die Bestimmung erfolgt wie oben beschrieben.

Chromatographie

Mit dem Linomat III werden 30 μl der Probe strichförmig (10 mm) auf eine DC-Platte aufgetragen. Pro Platte werden acht Proben und, als Standard, dreimal 30 ng Xi-BBP (= 16.05 ng Xipamid), in Aceton gelöst, aufgetragen. Die Chromatographie erfolgt mit dem Fliessmittel Toluol-Essigester (1:1, v/v) unter Kammersättigung bei einer Laufstrecke von 12 cm. Die entwickelten Chromatogramme werden mit Warmluft getrocknet. Der R_F -Wert beträgt 0.45. Fluoreszierende Begleitstoffe, überschüssiges Reagenz und die teilweise entstandene Carbonsäure sind vollkommen abgetrennt.

Messung

Die Fluoreszenzmessung erfolgt in der Anordnung: Lampe-Monochromator-Probe-Sekundärfilter-Empfänger.

Exzitation: Linie 313 nm der Hg-Mitteldrucklampe ST 41; Spaltgrösse 1.5 \times 8 mm.

Emission: Monochromatfilter M 405 als Falschlicht-Filter; Verstärkung 10–100, Hochspannung am Fotoelektronenvervielfacher 1.

Bei hoher Verstärkung muss das Ausgangssignal für den Integrator 1:2 oder 1:4 abgeschwächt werden. Die Messung erfolgt in Fliessrichtung des Chromatogramms bei einer Tischgeschwindigkeit von 50 mm/min, die Aufnahme der Fluoreszenzintensitäts-Ortskurve mit einem Papiervorschub von 120 mm/min. Die Bestimmung der slope-sensitivity des Integrators wird auf einem Leerfleck im unteren Teil des Chromatogramms 30 sec lang durchgeführt. Fig. 1 zeigt die Fluoreszenzintensitäts-Ortskurven der Chromatogramme eines Plasmas (A) mit 100 ng Xipamid pro ml und eines Plasmas (B) ohne Xipamid.

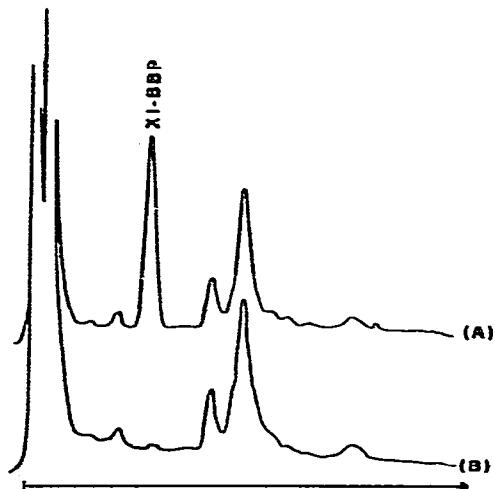


Fig. 1. Fluoreszenzintensitäts-Ortskurven der Chromatogramme eines Plasmas (A) mit 100 ng Xipamid pro ml und eines Plasmas (B) ohne Xipamid.

Auswertung

Die Auswertung erfolgt über die Flächen der Fluoreszenz-Ortskurven. Zwischen den Flächen unter den Kurven und den aufgetragenen Substanzmengen Xipamidumsetzungsprodukt besteht Linearität von 1 bis 500 ng pro Fleck. Die sich ergebende Gerade geht durch den Nullpunkt des Koordinatensystems. Um zu zeigen, dass diese Aussage auch für Plasma bzw. Urin richtig ist, wurden je dreimal 100 ng, 500 ng und 1000 ng Xipamid pro ml Plasma bzw. Urin bestimmt. Die neun Proben wurden auf einer DC-Platte bestimmt. Der Mittelwert aus drei Bestimmungen ergab eine durch den Ursprung des Koordinatensystems gehende Gerade. Daraus ergibt sich, dass die Eichgerade zur Bestimmung des Gehaltes und der Wiederfindungsrate aus dem Nullpunkt und einem einzigen Kurvenpunkt erstellt werden kann. Dieser wird zur Erhöhung der Genauigkeit aus drei Messwerten gemittelt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Der Strukturbeweis für eine Bildung des Benzoesäure-benzolsulfonylamids wurde durch NMR-Untersuchung erbracht: Nach Zusatz von $^2\text{H}_2\text{O}$ liessen sich die Signale zweier austauschbarer Protonen (6.40; 13.25) nachweisen. Das dritte bewegliche Proton war infolge Überlagerung durch andere Signale nicht identifizierbar. Die Flächenintegrale verhalten sich wie 1:1. Bei freier Sulfonamidgruppe müsste aber ein Verhältnis von 2:1 auftreten. Der Vergleich der Spektren von Xipamid und Xipamidmethylether zeigte, dass das Signal bei 13.25 ppm dem Proton der freien phenolischen Hydroxylgruppe von Xi-BBP zuzuordnen war. Ein weiterer Hinweis für die Substitution an der Sulfonamidgruppe und damit für das Vorliegen der unsubstituierten phenolischen OH-Gruppe war die Lage des Signals für das Proton an C-3 des Xipamidfragmentes. Dieses Proton erscheint bei ähnlicher Lage ($d = 6.76$ ppm) wie beim Xipamid selbst ($d = 6.54$ ppm). Eine Substitution der freien phenolischen Hydroxyl-

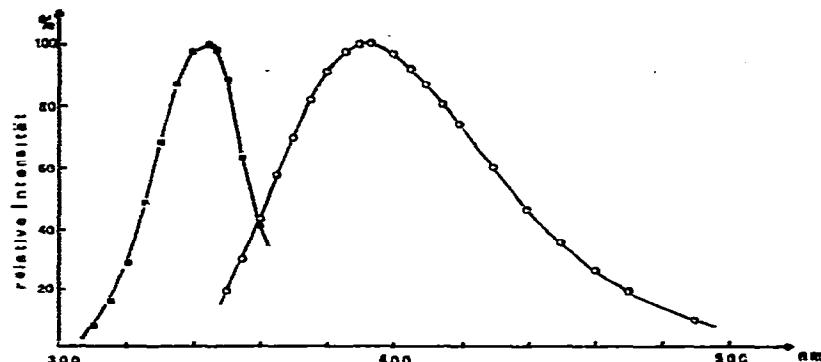


Fig. 2. Exzitations- (■) und Emissionsspektrum (○) des Umsetzungsproduktes Xi-BBP.

gruppe des Xipamids zum entsprechenden Methylether verschiebt das Signal des Protons an C-3 zu wesentlich tieferem Feld ($d = 7.50$ ppm).

Zur Bestimmung der Präzision des Verfahrens wurden verschiedene Konzentrationen Xipamid gepooltem Leerplasma zugesetzt. Bei einer Konzentration von 1000 ng Xipamid pro ml Testplasma war die relative Standardabweichung 0.7%, bei 100 ng/ml 2.1% und bei 20 ng/ml 6.5% (jeweils $n = 8$). Die Wiederfindungsrate liegt bei 100%. Geringe Schwankungen ergeben sich durch die Flüchtigkeit des Essigesters. Deshalb sollte bei jeder Bestimmungsreihe die Wiederfindungsrate mitbestimmt werden. Der Gehalt der Proben wird dann darauf bezogen.

Die Nachweisgrenze in dem beschriebenen Verfahren liegt bei < 10 ng/ml Plasma, wenn die Bestimmung mit maximal 1 ml Plasma ausgeführt wird. Um tiefer liegende Werte zu erfassen, ist Xipamid aus entsprechend mehr Plasma zu extrahieren.

Fig. 2. zeigt das Exzitations- und Emissionsspektrum des Umsetzungsproduktes (Xi-BBP). Die Maxima liegen bei 342 nm und 394 nm. Die Anregung mit der 313-nm-Linie liegt in einem relativ ungünstigen Bereich. Durch Einsatz eines Falschlichtfilters mit einer sehr steilen Flanke könnte auch mit der 365-nm-Linie der ST 41 Lampe angeregt und dadurch eine höhere Fluoreszenzausbeute erreicht werden.

Eine Überprüfung der Bestimmungsmethode wurde durch Analyse von Plasma und Urin zweier gesunder Probanden durchgeführt.

Nach einer Venenblutentnahme (Leerwert) erhielten die Probanden 80 mg Xipamid (2 Tabletten Aquaphor^R) oral. In den darauffolgenden 48 Stunden wurden 10 Blutproben entnommen. Das heparinisierte Blut wurde unter Zusatz von "Trennmittel Merck" zentrifugiert, das Plasma abgenommen, bei -18°C eingefroren und unmittelbar vor der Bestimmung aufgetaut. Daneben wurde über 48 Stunden Urin gesammelt.

Fig. 3 zeigt die Plasmaspiegelverläufe der beiden Probanden. Der maximale Plasmaspiegel war in 30–60 min erreicht. Fig. 4 gibt die kumulative Urinausscheidungskurve der Probanden wieder. Nach 48 Stunden (Ende der Beobachtungsdauer) sind 39% bzw. 49.8% der Dosis als unverändertes Xipamid ausgeschieden. Das gleichzeitig als Hauptmetabolit [1] ausgeschiedene Glukuronid wird bei dieser Bestimmung nicht erfasst.

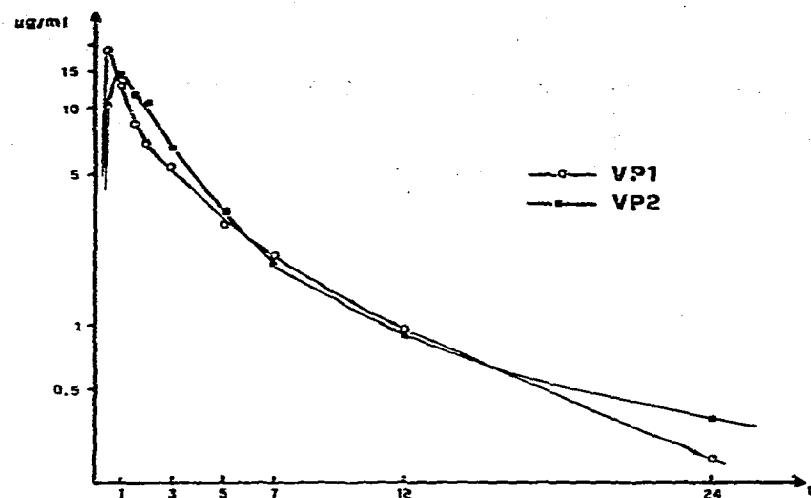


Fig. 3. Plasmaspiegelkurven nach oraler Gabe von 80 mg Xipamid; Zeit in Stunden in linearer Darstellung und Konzentration in $\mu\text{g}/\text{ml}$ in logarithmischer Darstellung.

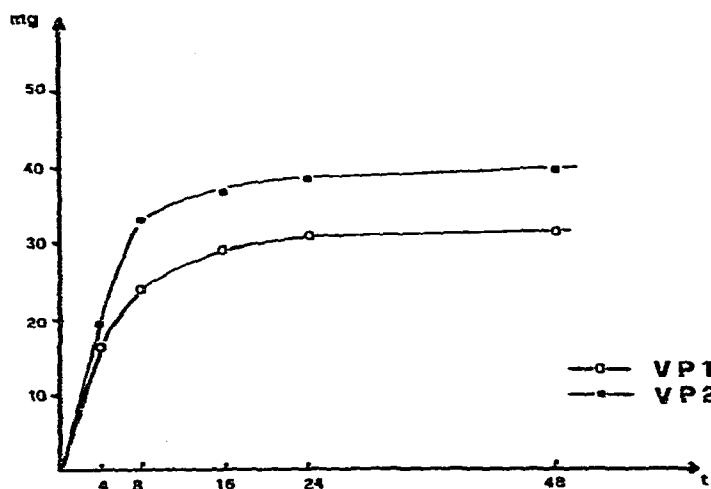


Fig. 4. Kumulierte renale Ausscheidung von Xipamid nach oraler Gabe von 80 mg; Zeit in Stunden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Methode geeignet ist, die Plasma- und Urinkonzentration auf einfache Weise zu bestimmen. Die Nachweisgrenze von 10 ng/ml lässt auch bei geringer Dosierung eine sichere Bestimmung zu.

DANK

H. Knauf, Freiburg, B.R.D., danken wir für die Überlassung der Proben.

PUBLISHER'S NOTE

The new United States Copyright Law came into effect on January 1st, 1978. In order to conform with the provisions of this law, users of this journal should note the following:

- Authors resident in the U.S.A. will be asked to transfer copyright in writing on a form provided by the Editor.
- Readers will notice that most papers carry a multi-digit code at the foot of the first page. This code signifies that Elsevier Scientific Publishing Company participates in the non-profit Copyright Clearance Center. The Center will approve copying beyond that legally permitted in the U.S.A. providing details of the material copied and the fee established by the publisher are sent to the Center. The fee for each copy of all or part of a paper is stated in the final digits of the code. The address of the Copyright Clearance Center, to which the fee is to be paid, is mentioned on the inside cover of the journal.

From Vol. 183 onwards, for articles written by more than one author the name of the author to whom correspondence should be addressed will be indicated by an asterisk (*).

LITERATUR

- 1 F.W. Hempelmann und P. Dieker, *Arzneim.-Forsch.*, 27 (1977) 2143-2151.
- 2 M. Sobel und E. Mutschler, *J. Pharm. Sci.*, im Druck.
- 3 N.O.V. Sonntag, *Chem. Rev.*, 52 (1953) 309.
- 4 F.W. Hempelmann, *Arzneim.-Forsch.*, 27 (1977) 2140-2143.