

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
8. Jg., S. 49—50, Januar 1970

Quantitative Bestimmung von Furosemid und seines Metaboliten in Harn mit Hilfe der Sephadex-Säulenchromatographie

Von P. HAJDÚ und I. HORNKE

Farbwerke Hoechst AG, vormals Meister Lucius & Brüning

(Eingegangen am 20. August 1969)

Es wird über die säulenchromatographische Trennung an Sephadex G 25 als weiteres Nachweisverfahren zur Untersuchung der Ausscheidungsprodukte und -mengen des Salidiureticums Furosemid (Lasix) in Harn berichtet.

Mit diesem einfachen Verfahren erreicht man eine Nachweisgrenze von maximal $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ für beide Substanzen bei Verwendung von UV-Durchflußmikroküvetten.

The quantitative determination of furosemide and its metabolites in urine with the aid of Sephadex column chromatography

Column chromatography on Sephadex G 25 was used to study further the nature and quantity of the urinary excretory products of the salidiuretic furosemide (Lasix).

With this simple method, the detection limit for both substances was $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$, with the use UV-flow-through microcuvettes.

In früheren Arbeiten unseres Laboratoriums (1, 2, 3), wurde eingehend über Nachweismethoden von 4-Chlor-N-(2-furylmethyl)-5-sulfamoyl-anthranilsäure (Furosemid)¹⁾ in Körperflüssigkeiten sowie über die papierchromatographische Trennung des Metaboliten 4-Chlor-5-sulfamoyl-anthranilsäure berichtet. In einer dieser Veröffentlichungen (2) ist eine kolorimetrische Methode beschrieben worden, mit der der kinetische Verlauf der Metabolisierung an Hunden (nach Gabe von 5—50 mg/kg) verfolgt werden konnte.

Die Untersuchung von Humanharn-Proben nach Verabreichung von 1—2 Tabletten (à 40 mg) oder Ampullen (à 20 mg), also $\leq 1 \text{ mg}/\text{kg}$ brachte methodische Schwierigkeiten (4). Um diese auszuschließen und die Kinetik der Metabolisierung auch an Menschen prüfen zu können, wurde von uns ein neues, für den Routine-Betrieb geeignetes Verfahren ausgearbeitet.

Es werden hierbei Humanharnextrakte (vgl. (2)) durch Säulenchromatographie an Sephadex G 25 mit NaCl-Lösung als Elutionsmittel getrennt und die Lichtdurchlässigkeit des Eluats bei 233 nm kontinuierlich aufgezeichnet. Die Harnkonzentrationen beider Verbindungen können aus den Flächen der aufgezeichneten Kurven errechnet werden.

Methodik

5 ml einer Harnprobe werden nach Ansäuern (0,25 ml konz. HCl) mit 50 ml Äther ausgeschüttelt. Die abgetrennte wäbr. Phase versetzt man nochmals mit 50 ml Äther und fügt unter Schütteln so lange wasserfreies Na_2SO_4 hinzu, bis die wäbr. Phase als Kristallwasser gebunden ist und das Trockenmittel im festen Zustand vorliegt. Anschließend wird die Ätherphase in einen Kolben filtriert und 2mal mit 5 ml Äther nachgespült. Die vereinigten Ätherauszüge werden dann am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht und der Rückstand mit 0,9proz. NaCl-Lösung aufgenommen. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl die wäbr. Eichwerte als auch die Versuche in Harn mit NaCl-Lösung auf 5 ml, das Ausgangsvolumen, aufgefüllt.

Zahlreiche Versuche zeigten, daß die Trennung ebenso sauber und die Kurvenfläche quantitativ auszuwerten ist, wenn die Trocken-

rückstände mit weniger NaCl-Lösung (z. B. 1,25 ml) aufgenommen werden. Somit kann eine bis zu 4mal höhere Nachweisgrenze ($0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ Harn) erreicht werden.

1 ml des Harnextraktes wird auf eine Sephadex G 25-Säule (Säulendurchmesser 1,5 cm, Säulenhöhe 30 cm; 9 g Sephadex G 25 werden in 100 ml 0,9proz. NaCl-Lösung gequollen) aufgetragen und mit physiol. NaCl-Lösung in diffusem Licht eluiert. Die Lichtdurchlässigkeit des Eluats wurde mit Hilfe der Mikrodurchflußküvette MR 1D in einem Zeiss PMQ II Spektralphotometer mit Mikroküvettenausrüstung kontinuierlich gemessen und mit einem Philips Kompensationsschreiber (0—100% Lichtdurchlässigkeit = 20 cm, Papiervorschub 1 mm/Min.) aufgezeichnet.

Ergebnisse und Diskussion

Wie aus Abbildung 1 ersichtlich, werden zunächst die bei der angegebenen Wellenlänge absorbierenden Kom-

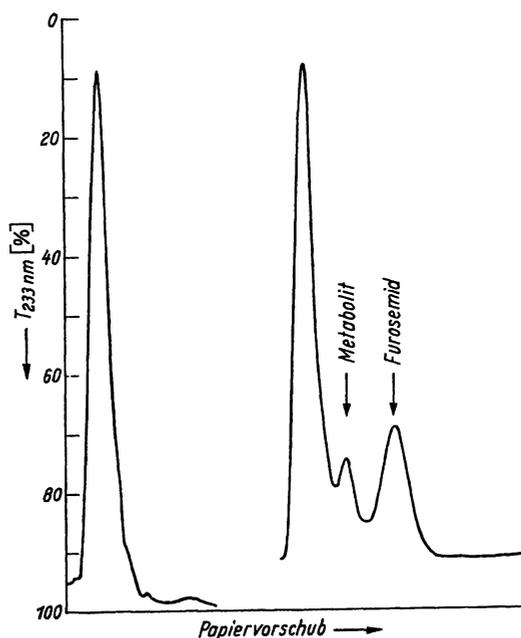


Abb. 1

Trennung von Furosemid und seines Metaboliten in Harn an einer Sephadex G25 Säule. Links: Leerharn; rechts: Harn mit Furosemid und seinem Metaboliten 4-Chlor-5-sulfamoyl-anthranilsäure versetzt

¹⁾ = Lasix, Farbwerke Hoechst AG.

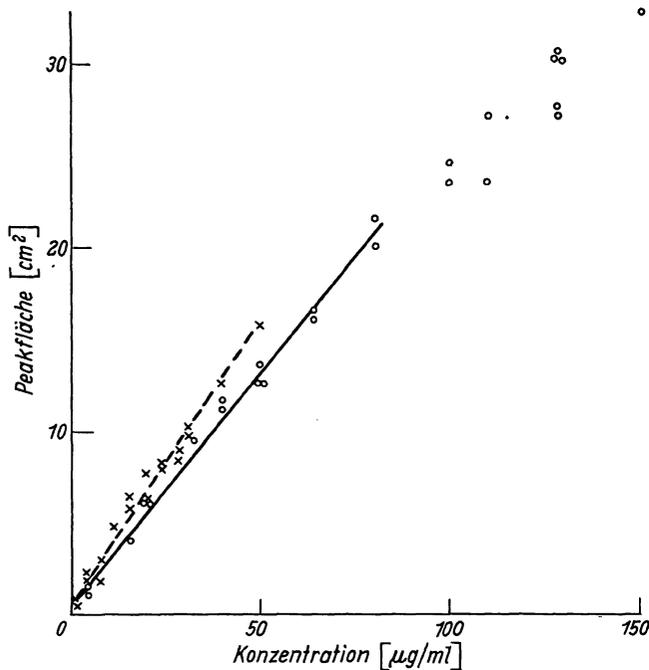


Abb. 2

Eichwerte wäßr. Lösungen von Furosemid (o-o) und 4-Chlor-5-sulfamoyl-anthranilsäure (x-x) als Peakflächen des Elutionsdiagramms (T_{233} nm)

ponenten des Urins von der Säule eluiert, denen dann der Metabolit und schließlich das Furosemid folgen.

Es fällt hierbei auf, daß das Furosemid nicht, wie bei der Gelfiltration zu erwarten, vor der 4-Chlor-5-sulfamoyl-anthranilsäure erscheint, sondern in umgekehrter Reihenfolge. Eine derartige Abweichung von den Regeln der Gelfiltration läßt den Schluß zu, daß es sich im vorliegenden Fall um eine reine adsorptionschromatographische Trennung an Sephadex handelt. Derartige Abweichungen von dem Prinzip der Gelfiltration an Sephadex konnten schon früher beobachtet werden (5, 6).

Wäßr. Lösungsgemische mit verschiedenen Furosemid (4—150 $\mu\text{g/ml}$) und 4-Chlor-5-sulfamoyl-anthranilsäure (1—50 $\mu\text{g/ml}$) Konzentrationen wurden angesetzt und wie oben beschrieben analysiert.

Die erhaltenen Ergebnisse — aus Abbildung 2 ersichtlich — zeigen, daß neben einer guten Trennung beider Verbindungen der lineare Zusammenhang zwischen den Flächen und den Konzentrationen (bis zu 80 bzw. 50 $\mu\text{g/ml}$) eine genaue (mittlerer Fehler $\pm 2,4$ bzw. 1,8 $\mu\text{g/ml}$ Extrakt) Möglichkeit zur quantitativen Er-

fassung von Furosemid und seines Metaboliten nebeneinander bietet.

Die Tabelle stellt die Analysenergebnisse von Human-Harn, dem bekannte Mengen Furosemid bzw. seines Metaboliten zugefügt worden waren, dar. Die Konzentrationen wurden aus Eichgeraden, die für wäßr. Lösungen erstellt worden waren, errechnet. Die wiedergefundenen Substanzmengen zeigen, daß mit dieser Tren- und Bestimmungsmethode eine Empfindlichkeit sowohl für den Metaboliten als auch für Furosemid von 1,5—2 $\mu\text{g/ml}$ Extrakt erreicht werden kann²⁾.

Diese Methode eröffnet durch ihre einfache und schnelle Durchführung die Möglichkeit größerer Kontrolluntersuchungen über die Ausscheidungsrate von Furosemid sowie dessen Metabolisierung im menschlichen Körper.

Tab. 1

Säulenchromatographische Analyse von Furosemid und seines Metaboliten in Harn (Mehrfachbestimmungen jeweils zugesetzter Substanz)

$\mu\text{g/ml}$ vorgelegt	Furosemid				
	$\mu\text{g/ml}$ gefunden				
2	1,6	1,2			
8	6,3				
10	10,3	11,5	11,9		
15	13,5	14,3			
16	18,2	15,1			
20	19,0	19,0			
30	29,3	30,5	30,9	29,0	29,0
32	33,7	35,7	31,7		
35	33,3	35,7	35,7		
40	43,2	43,6			
50	45,6	49,6			
60	57,5				
75	75,4				
80	77,4				

Mittlerer Fehler $\pm 1,9 \mu\text{g/ml}$

$\mu\text{g/ml}$ vorgelegt	4-Chlor-5-sulfamoyl-anthranilsäure				
	$\mu\text{g/ml}$ gefunden				
2	2,0	1,6			
8	7,7	6,8	10,6		
10	11,3	7,7			
12	12,6	12,1	13,9		13,9
15	17,1	15,5	17,4		13,9
16	12,9	13,5	14,8		
20	20,0	21,9	18,1		21,0
24	23,5				
25	25,5	24,8			
30	29,4	31,6	30,0		31,9
50	48,4	50,0			

Mittlere Fehler $\pm 1,5 \mu\text{g/ml}$

²⁾ Verwendet man ein Durchflußfluorometer, so kann die Empfindlichkeit noch weiter gesteigert werden.

Literatur

1. HAJDÚ, P. und A. HÄUSSLER, *Arzneimittel-Forsch.* Aulendorf 14, 709 (1964). — 2. HÄUSSLER, A. und P. HAJDÚ, *Arzneimittel-Forsch.* Aulendorf 14, 710 (1964). — 3. HÄUSSLER, A. und H. WICHA, *Arzneimittel-Forsch.* Aulendorf 15, 81 (1965). — 4. BÜTNER, H., Persönliche Mitteilung. — 5. „Sephadex: Eine kurze Einführung in das Verfahren der Gel-Filtration“. Pharmacia, Uppsala Schweden. — 6. GELOTTE, B., *J. Chromatog.* 3, 330 (1960).

Dipl.-Chem. P. Hajdú
Farbwerke Hoechst
6230 Frankfurt/M.-Hoechst
Physiolog.-Chem. Labor D 528