

Arch. Pharm. (Weinheim) 313, 324–329 (1980)

Quantitative Bestimmung von Paracetamol im Blutserum durch HPLC mit Direktinjektion

Siegfried Ebel*, Rainer Liedtke und Barbara Mißler

Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie der Philipps-Universität Marburg, Marbacher Weg 6, D 3550 Marburg/Lahn, und Klinische Forschung von Heyden GmbH, D 8400 Regensburg
Eingegangen am 3. Juli 1979

Es wird eine Bestimmung des Paracetamols durch HPLC mit fotometrischer Detektion beschrieben. Als einziger prächromatographischer Schritt wird eine Eiweißfällung so durchgeführt, daß keine Mitfällung des Arzneimittels erfolgt. Die Trennung erfolgt an reversed phase (RP8)-Fertigsäulen. Die Erfassungsgrenze liegt bei etwa 100 ng/ml, die Reproduzierbarkeit unter 3 % bei praktisch quantitativer Wiederfindungsrate. Etwa 15 % des Paracetamols liegen proteingebunden vor.

Determination of Paracetamol in Blood Samples by HPLC

A method is described for the determination of paracetamol (acetaminophen) in blood samples by HPLC and photometric detection. The only step before chromatography is the precipitation of plasma proteins without coprecipitation of the drug. For the separation reversed phase (RP8) material and ready made columns are used. The detection limit is about 100 ng/ml, the day to day precision is better than 3 %. Recovery is nearly quantitative. In blood serum, about 15 % of the paracetamol is bound to the plasma proteins.

Paracetamol wird außer in Monopräparaten vor allem in Kombination mit anderen Arzneisubstanzen wie z. B. Salicylamid, Coffein oder Pyrazolon-Derivaten arzneilich verwendet. Durch die Kombination mit anderen Arzneistoffen kann die Bioverfügbarkeit des Paracetamols z. B. durch Konkurrenzreaktionen bei der Biotransformation beeinflußt werden. Im Rahmen von Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit der Paracetamols ist deshalb ein schnelles und wenig arbeitsintensives Verfahren zur Bestimmung der Konzentration im Serum von großer Bedeutung. Während früher vorwiegend kolorimetrische Verfahren (Literatur vgl.¹⁾ angewendet wurden, wobei das auf *Brodie* und *Axelrod*^{2,3)} zurückgehende Verfahren lange Zeit als Standardmethode galt, standen in den letzten 10 Jahren chromatographische Methoden mehr im Vordergrund. Eine direkte fotometrische Methode wurde ebenfalls beschrieben⁴⁾, doch ist die Aufarbeitung der Proben sehr aufwendig, da bei der notwendigen kurzen Meßwellenlänge die Anzahl der störenden Begleitsubstanzen aus der Analysenmatrix beachtlich ist. In der Literatur wurde eine Reihe gaschromatographischer Verfahren zur Bestimmung von Paracetamol in Serum oder Urin beschrieben⁵⁻¹⁰⁾. Bei diesen Methoden ist jedoch die notwendige Acetylierung⁸⁾ bzw. Silylierung^{7,9)} problematisch, da hierdurch einmal eine weitere Fehlerquelle auftritt und zum anderen der notwendige Zeitaufwand einem größeren Probendurchsatz

im Wege steht. Fast alle in der Literatur beschriebenen HPLC-Methoden¹¹⁻¹⁶⁾ (weitere Lit. vgl. ¹⁾) schalten einen Extraktionsschritt ein. Eine direkte Einspritzung des Serums scheitert zunächst an der Erfassungsgrenze, so daß in diesem Falle die elektro-chemische Detektion von Vorteil ist^{17,18)}. Im folgenden soll eine direkte HPLC-Methode mit fotometrischer Detektion beschrieben werden.

Chromatographie

Im Hinblick auf den anfallenden hohen Probendurchsatz soll eine direkte Aufgabe des Serums angestrebt werden, da die HPLC nach einem vorgeschalteten Extraktionsschritt¹¹⁻¹⁶⁾ einmal zu zeitaufwendig erschien und zum anderen dieser zusätzliche Schritt auch eine mögliche Fehlerquelle darstellt. Die direkte Aufgabe des Serums wurde von *Blais* und *Rumack*¹⁹⁾ beschrieben. Sie verwendeten einen Kationenaustauscher als Trennmedium, doch ergaben sich durch die hohen Retentionszeiten hohe Analysenzeiten bei einer verringerten Empfindlichkeit. Eine weitere Fehlerquelle liegt weiterhin darin, daß eine Vorsäule verwendet werden muß, da die Proteine des Serums sonst die Trennung beeinflussen. Nach unseren Erfahrungen bringt die Verwendung einer Vorsäule einen negativen Einfluß auf die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit. *Howie*, *Adriaenssen* und *Prescott*²⁰⁾ präzipitierten die Serumproteine durch Säurezugabe. Ein Nachteil dieses Verfahrens liegt jedoch darin, daß an Plasmaproteine assoziiertes Paracetamol ebenfalls zum Teil mitgefällt wird²¹⁾ und somit ein systematischer Fehler auftritt. Im Hinblick auf die Bestimmung des Paracetamols neben anderen Arzneistoffen entschlossen wir uns für die Verwendung von reversed phase Säulenmaterial. Bei der Aufarbeitung der Serumproben ist deshalb zu beachten, daß nur enteiweißtes Serum direkt injiziert werden kann, da ansonsten wegen der in diesem Falle üblichen mobilen Phasen (Methanol/Wasser, Acetonitril/Wasser) eine Koagulation des Eiweiß auf der Säule erfolgt, was mit einer Veränderung der Säuleneigenschaften verbunden ist und zu einer schnellen Erschöpfung der Säule führen muß. Von den zur Verfügung stehenden reversed phase-Materialien (RP2, RP8, RP18) erwies sich das RP8-Material am leistungsfähigsten. Die mobile Phase wurde von *Surmann*¹⁸⁾ übernommen, sie ist im Hinblick auf die elektrochemische Detektion optimiert, aber auch für die fotometrische Detektion voll geeignet.

Aufarbeitung der Serumproben

Es wird angestrebt, das gesamte Paracetamol zu bestimmen, d.h. es muß auch der an Plasmaproteine gebundene Anteil miterfaßt werden. Es ist deshalb nötig, die Proteinbindungen vor der Eiweißkoagulation zu zerstören. Dies wird durch Zugabe einer bestimmten Menge Methanol erreicht, die ausreichend sein muß, die Bindung zu zerstören, jedoch nicht so groß sein darf, daß schon in dieser Phase Koagulation eintritt. Im nächsten Schritt erfolgt die Denaturierung. Durch Zugabe konzentrierter Säure tritt eine spontane

Präzipitation ein, die möglicherweise gelöstes Paracetamol einschließen und mitreißen könnte. Durch Verwendung einer Methanol/Säure-Mischung wird dies vermieden. Eine vollständige Abtrennung der feinen Fällung erreicht man anschließend durch Zentrifugieren.

Zur Vermeidung von Pipettierfehlern wurde von 2 ml Serum ausgegangen; verwendet man geeignete Dosiersysteme, so können auch kleinere Vol. völlig ausreichend sein. Nach Zugabe von 1 ml Methanol wird 1–2 Minuten geschüttelt. Zur Denaturierung werden anschließend 1 ml 70proz. HClO_4 /Methanol hinzugegeben und nochmals 1–2 Minuten geschüttelt. Nach Zentrifugation (1 h bei ca. 50 000 g und 0°) kann die überstehende Lösung direkt injiziert werden. Abb. 1 zeigt ein typisches Chromatogramm. Die Bestimmung des Salicylamids²²⁾ bei Applikation von entsprechenden Kombinationspräparaten oder des Paracetamolsulfats²²⁾ als Metabolit des Paracetamols kann aus derselben Analysenlösung bei Verwendung einer geeigneten mobilen Phase ebenfalls durchgeführt werden.

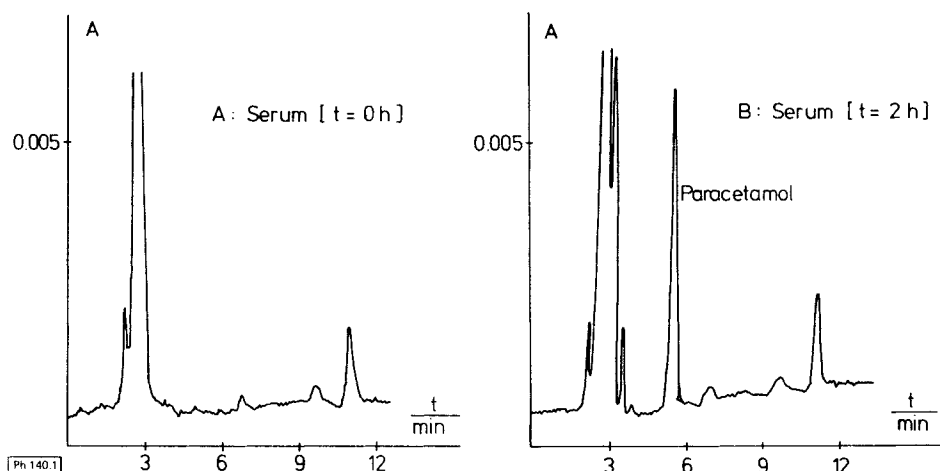


Abb. 1: Chromatogramm bei der HPLC-Bestimmung von Paracetamol aus Blutserum bei direkter Injektion

A: Blindserum zur Zeit $t=0$

B: Serum zur Zeit $t=2$ h; $c = 3.31 \mu\text{g/ml}$ Paracetamol

Erfassungsgrenze, Genauigkeit

Die Nachweisgrenze für Paracetamol unter den hier gegebenen Bedingungen liegt unter 100 ng/ml Analysenlösung. Die Erfassungsgrenze des Paracetamols in Blutserum liegt bei etwa 100 ng/ml. Die Eichgrade muß über einen relativ weiten Konzentrationsbereich

aufgestellt werden (125 ng/ml–4.5 µg/ml), da in diesem Bereich die zu erwartenden Meßwerte liegen. Insgesamt konnte die Linearität bis 20 µg/ml überprüft und bestätigt werden. Zur Aufnahme der Eichgeraden wird arzneistofffreies Serum mit Paracetamolösungen versetzt, wobei bei Konzentration von mehr als 1.5 µg/ml von vier verschiedenen, bei Konzentrationen von weniger als 1.5 µg von fünf verschiedenen Seren ausgegangen wird. Die Eichgerade mit einer Reihe der Meßpunkte ist in Abb. 2 wiedergegeben. Insgesamt wurden 71 Meßpunkte ausgewertet. Die genäherte relative Standardabweichung aller Meßpunkte von der statistisch ermittelten Ausgleichsgerade lag bei 3.97 %. Der Einspritzfehler des verwendeten automatischen Probeaufgabesystems lag bei etwa 0.5 %, so daß auf die Verwendung eines internen Standards verzichtet werden konnte. Während der eigentlichen Routinemessungen wurde die Reproduzierbarkeit als sog. day to day precision nach jeweils 7 Einzelanalysen ermittelt. Die Ergebnisse lagen je nach Analysenkonzentration (2–5 µg/ml) zwischen etwa 1.8 und 3.0 % (n=8). Zur Kontrolle der Analysen wurde in einer Reihe von Fällen bei unterschiedlichen Meßwellenlängen gearbeitet. Da sich die Verhältnisse der Peakhöhen nicht von denen des reinen Paracetamols unterscheiden, kann ausgeschlossen werden, daß andere Substanzen der Serum-Matrix das Ergebnis verfälschen.

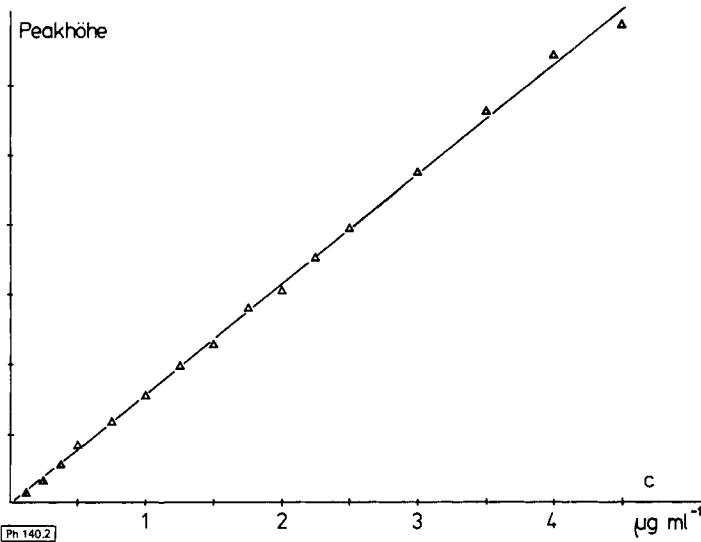


Abb. 2: Eichgerade für die Bestimmung von Paracetamol aus Blutserum aus 16 Einzeldaten. Ergebnisse der Fehlerrechnung (aus allen Daten, n=71):
 $m = 15.831 \pm 0.374 \text{ cm } \mu\text{g}^{-1} \text{ ml}$; $b = -0.159 \pm 0.165 \text{ cm } (\Delta -6 \text{ ng ml}^{-1})$; $r = 0.9992$.

Ergebnisse

Es wurden insgesamt jeweils 7 Sera, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Arzneimittelgabe entnommen waren, von insgesamt 40 freiwilligen Probanden untersucht. Der typische Verlauf der Blutspiegelwerte ist in Abb. 3 wiedergegeben. Auffallend war, daß die Sera von Patient zu Patient zum Teil erhebliche Unterschiede in den Chromatogrammen aufzeigten und, daß selbst die Sera desselben Probanden von Zeitpunkt zu Zeitpunkt beachtlich variierten. Der Paracetamolpeak war jedoch in jedem Falle einwandfrei auswertbar. Über die Pharmakokinetik soll gesondert berichtet werden²³⁾.

Das hier beschriebene Verfahren der Bestimmung von Paracetamol durch HPLC und Direktinjektion läßt sich auch zur Ermittlung der Proteinbindung des Paracetamols heranziehen. In diesem Falle wird das Serum ohne weitere Veränderung direkt ultrazentrifugiert (Beckmann Airfuge, 2 h bei 100 000 Upm) und der klare Überstand direkt injiziert. Die gefundenen Werte lagen bei einem untersuchten Serum bei $15.0 \pm 0.5\%$. Von *Lowenthal* wurde durch Dialyse eine Paracetamol/Protein-Assoziation von 5–10 % gefunden.

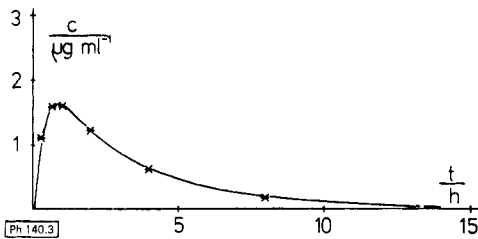


Abb. 3: Zeitliche Abhängigkeit der Konzentration von Paracetamol im Blutserum nach einmaliger oraler Gabe von 200 mg Paracetamol und 300 mg Salicylamid.

Dem Bundesminister für Forschung und Technologie danken wir für die großzügige Unterstützung dieser Arbeiten durch Sach- und Personalmittel; Frau *G. Zander* für die gewissenhafte Durchführung der Messungen.

Experimenteller Teil

Zentrifuge Kühlzentrifuge ZK 4, Vetter KG, St. Leon-Rot; Ultrazentrifuge Beckmann Airfuge.

HPLC Flüssigchromatograph: Perkin-Elmer 1220; Trennsäule RP8 (7 µm) 25 cm (Knauer KG, Oberursel); T=35°; mobile Phase: Methanol/Wasser/85proz. H₃PO₄ (20+80+0.4 v/v), 1.3 ml

min⁻¹; automatisches Schleifen – Aufgabesystem 225, Micrometrics (Coulter electronics, Krefeld), 10 µl; Detektor: LC 55 (Bodenseewerk Perkin Elmer, Überlingen), Meßwellenlänge 248 nm.

Chemikalien p.A.-Qualität (E. Merck, Darmstadt); Paracetamol (Benechemie GmbH, München).

Literatur

- 1 S. Ebel, Handbuch der Arzneimittel-Analytik, Verlag Chemie, Weinheim 1977.
- 2 B.B. Brodie und J. Axelrod, J. Pharmacol. Exp. Ther. 94, 22 (1948).
- 3 B.B. Brodie und J. Axelrod, J. Pharmacol. Exp. Ther. 97, 58 (1949); C.A. 44, 674 (1950).
- 4 J. Knepil, Clin. Chim. Acta 52, 369 (1974); Anal. Abstr. 28, 2D 37 (1975).
- 5 A. Klutch und M. Bordun, J. Pharm. Sci. 57, 524 (1968).
- 6 L. F. Prescott, R. F. Steel und W. R. Ferrier, Clin. Pharmacol. Ther. 11, 495 (1970).
- 7 L. F. Prescott, J. Pharm. Pharmacol. 23, 111 (1971).
- 8 L. F. Prescott, J. Pharm. Pharmacol. 23, 807 (1971).
- 9 B. H. Thomas und B. B. Coldwell, J. Pharm. Pharmacol. 24, 243 (1972).
- 10 M. A. Evans und R. D. Herbison, J. Pharm. Sci. 66, 1628 (1971).
- 11 M. W. Anders und J. P. Latorre, J. Chromatogr. 55, 409 (1971).
- 12 J. E. Mrochek, S. Katz, W. H. Christie und S. R. Dinsmore, Clin. Chem. N. Y. 20, 1086 (1974).
- 13 C. Shiveley und V. Elliot, Clin. Pharmacol. Ther. 18, 413 (1975).
- 14 L. T. Wong, G. Solomonraj und B. H. Thomas, J. Pharm. Sci. 65, 1064 (1976).
- 15 A. R. Buckpitt, D. E. Rollins, S. D. Nelson, R. B. Franklin und J. R. Mitchel, Anal. Biochem. 83, 168 (1977).
- 16 G. R. Gotelli, P. M. Kabra und L. J. Morton, Clin. Chem. N. Y. 23, 957 (1977).
- 17 R. M. Riggan, A. L. Schmidt und P. T. Kissinger, J. Pharm. Sci. 64, 680 (1975).
- 18 P. Surmann, Arch. Pharm. (Weinheim) 312, 734 (1979).
- 19 D. Blais und G. Rumack, Clin. Chem. N. Y. 23, 743 (1977).
- 20 D. Howie, P. I. Adriaenssen und L. F. Prescott, J. Pharm. Pharmacol. 29, 235 (1977).
- 21 Geplante Dissertation B. Mißler.
- 22 S. Ebel und B. Mißler, Veröffentlichung in Vorbereitung.
- 23 R. Liedtke, S. Ebel, E. Glaser, B. Mißler und L. Stein, Therapiewoche, im Druck.
- 24 D. T. Lowenthal, S. Qie, J. C. van Stone, G. A. Briggs und G. Levy, J. Pharmacol. Exp. Ther. 196, 570 (1976).

[Ph 140]