

Arch. Pharm. (Weinheim) 313, 399–405 (1980)

## HPLC-Bestimmung von Paracetamol im Serum unter Verwendung der elektrochemischen Detektion.

Peter Surmann

Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg, Marbacher Weg 6, D 3550 Marburg/Lahn.

Eingegangen am 3. August 1979

Paracetamol im Serum wird mittels HPLC und elektrochemischer Detektion bestimmt. Zur Chromatographie an reversed phase (Rp8) Fertigsäulen gelangt enteiweißtes Serum. Der gesamte Arzneistoff wird erfaßt, auch das plasmaeweißgebundene Paracetamol. Die Bestimmungsgrenze liegt bei ca. 10ng/ml ( $S/N > 10$ ). Die relative Standardabweichung im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich (50ng/ml – 4,5 ng/ml) beträgt ca. 3 %. Auch im Langzeitversuch arbeitet die Methode reproduzierbar und zuverlässig, wenn die möglichen Fehlerquellen beachtet werden.

### HPLC-Determination of Paracetamol in Serum by Electrochemical Detection

A method is described to determine paracetamol (acetaminophen) in blood samples by HPLC and electrochemical detection. After precipitation of plasmaproteins the separation is done with manufactured columns containing reversed phase (Rp8) material. The detection limit is about 10 ng/ml ( $S/N > 10$ ) and the reproducibility is satisfactory ( $RSD < 3\%$  between 50 ng/ml and 4.5  $\mu\text{g/ml}$ ). The method works well even in long-time experiments.

Im Rahmen von Bioverfügbarkeitsstudien stellt sich das Problem, Paracetamol im Serum bis zu Konzentrationen von ca. 50ng/ml zu bestimmen. Während in der älteren Literatur<sup>1)</sup> kolorimetrische und gaschromatographische<sup>2-4)</sup> Verfahren beschrieben sind, die alle einen hohen Zeitaufwand benötigen, nutzt die neuere Literatur die Möglichkeiten der HPLC. Bei einem großen Teil der HPLC-Verfahren ist ein Extraktionsschritt vorgeschaltet, der neben dem Zeitaufwand erhebliche Mehrkosten verursacht<sup>5-10)</sup>. Eine direkte Serumaufnahme ist von Blair und Rumack<sup>11)</sup> und von Howie et. al.<sup>12)</sup> durchgeführt worden. Während erstere durch Verwendung von Kationenaustauschersäulen mit Vorsäule hohen Bedarf an Analysenzeit und geringe Empfindlichkeit haben, ist das von Howie weitgehend optimiert; ein gewisser Nachteil ihrer Methode ist jedoch, daß plasmaeweißgebundenes bzw. -assoziiertes Paracetamol nicht miterfaßt wird.

Um zeitsparend zu arbeiten, wurde als Säulenmaterial reversed phase Rp8 benutzt, das sich in Vorversuchen gegenüber Rp2 und Rp18 als am geeignetesten erwies. Zur Erhöhung der Lebensdauer der Säule wurde das Serum enteiweißt und dann direkt aufgegeben. Das Enteiweißen wurde so durchgeführt, daß auch plasmaeweißgebundenes Paracetamol miterfaßt wurde: Zu 2,0 ml Serum wird 1,0 ml Methanol gegeben, was zum

Bruch der Paracetamol-Eiweißbindung führt; durch Zugabe von 1,0 ml MeOH/HClO<sub>4</sub> 70proz. wird das Eiweiß präzipitiert und abzentrifugiert. Die Wiederfindungsrate beträgt 100 %, die Plasmaeiweißbindungsrate ca. 15 %<sup>13)</sup>.

Dem Fließmittel – MeOH/H<sub>2</sub>O Mischungen – wurde Phosphorsäure zugesetzt. Hierdurch wird einerseits die Leitfähigkeit des Eluens für die elektrochemische Detektion (ELCD) ausreichend, andererseits werden basische Serumbestandteile durch Protonierung hydrophiler, was zu einer Verkürzung der Retentionszeit führt. Als optimal in bezug auf Trennung von Serumbestandteilen und Salicylamid, das mit Paracetamol zusammen appliziert wurde, und Analysenzeit erwies sich Fließmittel I: MeOH/H<sub>2</sub>O/85proz. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: 33,3/66,6/0,1 Vol. T.

Der Paracetamol-Peak wird zwar von Serumbestandteilen überlagert, welche aber bei geeigneter Wahl der angelegten Zellspannung nicht detektiert werden. Vorteilhaft ist eine Spannung von +800mV, die im Bereich des Diffusionsgrenzstromes liegt, so daß kleine Schwankungen im anliegenden Potential nicht zu großen Fehlern führen können. Nichtdetektierte Serumbestandteile, die ähnliche Retentionszeiten wie Paracetamol haben, haben keinen Einfluß auf das Signal des ELCD: Gleiche aufgegebene Massen Paracetamol in Serum und Eluens führen zu identischen Peaks. Metabolite des Paracetamols (Sulfat und Glucuronid) und des Salicylamids<sup>14)</sup> stören die Bestimmung nicht, wie eine Variation des Potentials zeigt: Bei +800mV wird mittels einer Eichgeraden die Konzentration eines Serums bestimmt; gibt man bei verschiedenen Potentialen die äquivalente Masse Paracetamol als Vergleich auf, so erhält man Signale, deren Höhe mit den aus dem Serum erhaltenen identisch ist. Salicylamid und seine Metabolite haben andere Halbstufenpotentiale als Paracetamol, so daß dieses Experiment Störungen durch sie anzeigen müßte; ähnliches gilt für die Paracetamol-Metabolite. Da jedoch hier der Unterschied in den Halbstufenpotentialen nicht so deutlich ist, wurde Paracetamolsulfat überprüft: Die Retentionszeit ist wie erwartet erheblich kleiner als die von Paracetamol. Da das Glucuronid polarer als das Sulfat ist, erübrigte sich eine weitere Untersuchung.

Von einer anderen Arbeitsgruppe<sup>13)</sup> wurde eine Paracetamolbestimmung im Serum mittels UV-Detektion nach HPLC-Trennung durchgeführt. Hierbei wird ein erheblich höherer Wasseranteil im Eluens benötigt, um ausreichende Trennung des Paracetamols von den Serumbestandteilen zu erreichen. Das bedeutet etwa eine Verdoppelung der Analysenzeit und Einbuße an Empfindlichkeit.

Optimal war Fließmittel II: MeOH/H<sub>2</sub>O/85proz. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: 20/80/0,04 Vol. T.

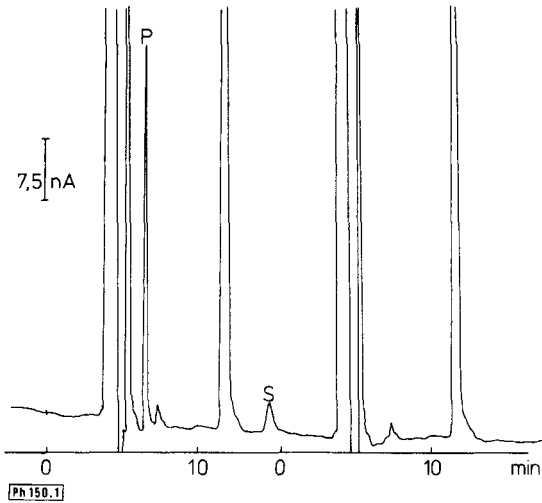
Um einen direkten Vergleich der Detektionsmethoden (ELCD-UV) zu ermöglichen, wurde dieses Fließmittel gewählt. Auch hierin stören die möglichen Metabolite nicht. Als Arbeitsspannung wurden +1,2V an die Elektroden gelegt, da bei diesem Potential auch Salicylamid oxidierbar und damit detektierbar ist. Obwohl bei den ersten Testseren die Abtrennung Salicylamid-Serumbestandteile einwandfrei war, ließ sich die Bestimmung nicht durchführen, da der Salicylamidpeak im Serum einiger Probanden von einem nicht identifizierten Serumbestandteil überlagert wurde.

Im Fließmittel scheinen – ausgelöst durch die o-Phosphorsäure – Veränderungen stattzufinden, die bei der UV-Detektion die Basislinie verzerren, so daß das Eluens ca. alle

6 Std. gewechselt werden muß. Diese Veränderungen haben jedoch keinen Einfluß auf die ELCD oder die Retentionszeit.

Die Reproduzierbarkeit von Peak- zu Peakhöhe war in Vorversuchen sehr gut (Abweichung 0,5 %), so daß auf einen internen Standard verzichtet werden kann. Die Bestimmungsgrenze liegt im Fließmittel I bei ca. 100pg Aufgabemasse ( $S/N > 10$ ), was bei einem Aufgabevolumen von 50 µl die Bestimmung von bis zu 4ng/ml gestattet; in Fließmittel II liegen die Werte um den Faktor 2,5 ungünstiger: 250pg bzw. 10ng/ml.

Ein typisches Serumchromatogramm, erhalten mit Fließmittel II, zeigt Abb. 1.

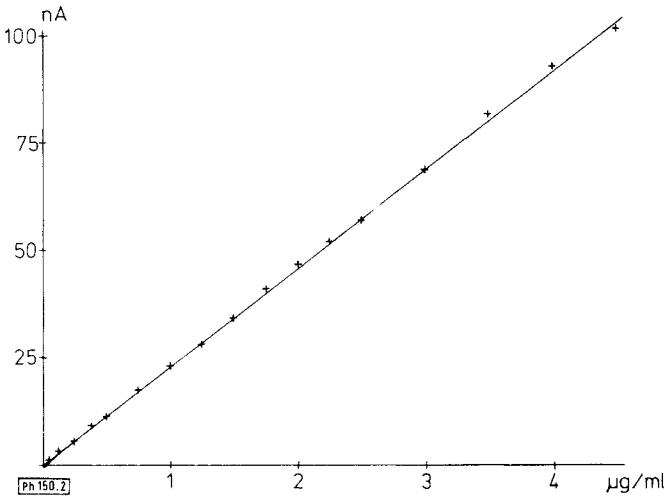


**Abb. 1:** Chromatogramm eines Serums, rechts „Leer“-Serum, links Serum, das je 2µg/ml Paracetamol (P) und Salicylamid (S) enthält. Flußrate 1,3 ml/min; Spannung + 1,2V vs. Ag/AgCl//3MKCl.

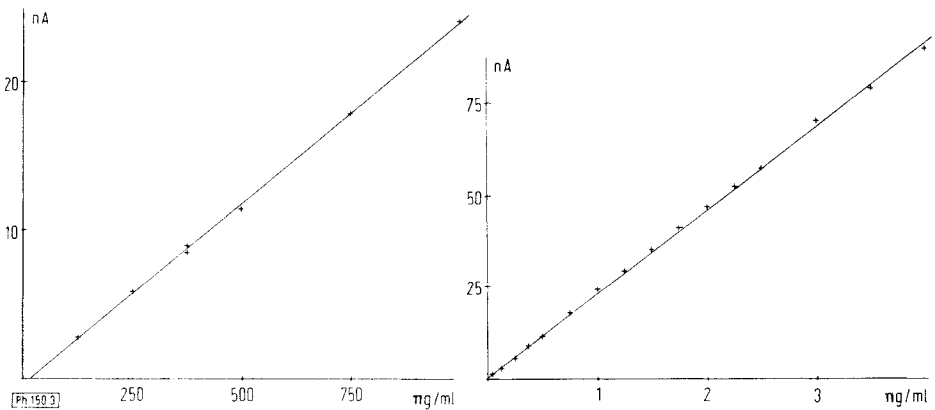
Vier Eichkurven wurden erstellt, indem zu einem Paracetamol-freien Serum definierte Massen Paracetamol gegeben wurden und die Aufarbeitung wie beim Probandenserum erfolgte. Es ergab sich Linearität zwischen Peakhöhe und Konzentration im Bereich 50ng/ml bis 4,5µ/ml (s. Abb. 2).

Geringe Abweichungen im linearen Verhalten können durch Erstellen zweier getrennter Eichgeraden – 50 ng/ml bis 1µg/ml und 500 ng/ml bis 4,5µg/ml – festgestellt und ausgeglichen werden (s. Abb. 3); das sollte generell bei einem so weiten Konzentrationsbereich getan werden<sup>15)</sup>.

Während der eigentlichen Routinemessung (ca. 300 Blutproben) wurden Vergleichswerte bestimmt, um die day to day precision festzustellen. Die Abweichungen liegen im gesamten Konzentrationsbereich bei ca. 3 %.



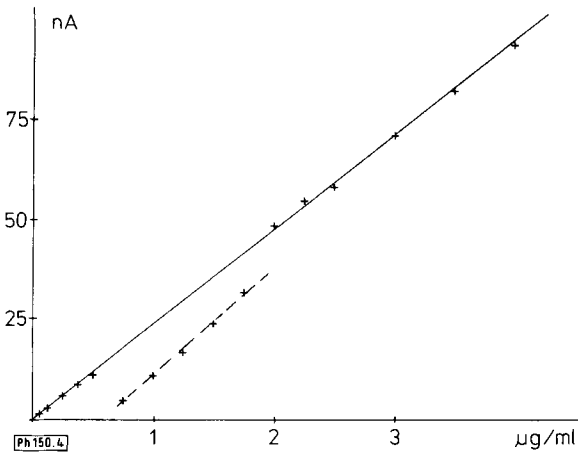
**Abb. 2:** Eichgerade ( $y=mx+b$ ) für Paracetamol aus Serum, gemittelt aus Eichgeraden 4 verschiedener Seren.  $\sigma = 0,8$ ,  $m = 23\text{nA}/\mu\text{g}$ ,  $\sigma_m = 0,3\text{nA}/\mu\text{g}$ ,  $b = -0,05\text{nA}$ ,  $\sigma_b = 0,15\text{nA}$ ; Flußrate 1,3 ml/min; Spannung + 1,2V vs. Ag/AgCl//3MKCl.



**Abb. 3:** Eichgeraden ( $y = mx+b$ ) für Paracetamol im Serum. Niedriger Konzentrationsbereich  $\sigma = 0,22\text{nA}$ ,  $m = 24,4\text{nA}/\mu\text{g}$ ,  $\sigma_m = 0,17\text{nA}/\mu\text{g}$ ,  $b = -0,39\text{nA}$ ,  $\sigma_b = 0,30\text{nA}$ . Gesamter Konzentrationsbereich:  $\sigma = 0,9\text{nA}$ ,  $m = 22,8\text{nA}/\mu\text{g}$ ,  $\sigma_m = 0,3\text{nA}/\mu\text{g}$ ,  $b = 0,55\text{nA}$ ,  $\sigma_b = 0,15\text{nA}$ .

Über die Fehlerquellen der ELCD und ihre Fehleranfälligkeit existieren in der Literatur so gut wie keine Angaben. Deshalb wurde hierauf besonders geachtet, insbesondere im Hinblick auf die Einsetzbarkeit der ELCD im Dauerbetrieb. Bei der

Aufnahme einer Eichgeraden wurde ein plötzlicher Einbruch festgestellt (s. Abb. 4). Verantwortlich hierfür war eine Dejustierung der Arbeitselektrode, die durch einen kurzzeitigen plötzlichen Druckanstieg im System hervorgerufen wurde.



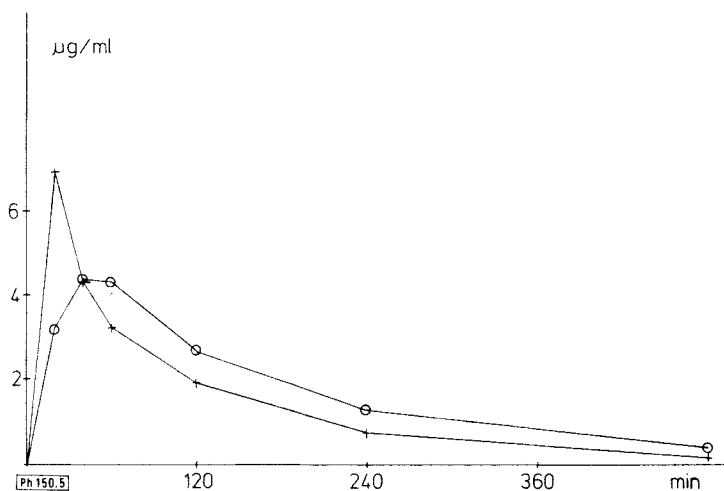
**Abb. 4:** Eichgerade für Paracetamol im Serum bei zwischenzeitlicher Dejustierung der Elektroden.

Bei einigen Fließmittelansätzen wurden mitunter ausgesprochene Ausreißer festgestellt, was mit einer sehr unruhigen Basislinie einherging. Dies ist zurückzuführen auf kleinste Luftbläschen, die sich im Detektor kurzzeitig festsetzen können.

Nach ca. 100 Betriebsstunden wurden große Schwankungen in den Meßergebnissen festgestellt; dies ging einher mit einer Teilablösung von AgCl vom Ag-Stab der Referenzelektrode, so daß für den Fehler Änderungen im Potential der Referenzelektrode und evtl. eine Teilverstopfung des Diaphragmas durch AgCl verantwortlich zu sein scheinen. Regeneration der Referenzelektrode (1 Std. Elektrolyse in 0,1 M HCl bei 0,1mA) behob diesen Mangel.

Es ergeben sich folgende Konsequenzen aus den Beobachtungen: Die Elektrodenjustierung muß überwacht werden bzw. es müssen kurzzeitige Druckschwankungen im System vermieden werden; das Eluens muß sehr sorgfältig entgast werden; der Stromschlüssel im Diaphragmagefaß sollte täglich (ca. 10 Betriebsstd.) gewechselt werden, was die Lebensdauer der Referenzelektrode deutlich erhöht; die Regeneration der Referenzelektrode wird mittels Elektrolyse in 0,1M HCl bei 0,1mA gegen eine Platinelektrode durchgeführt, die Dauer der Prozedur sollte ca. 1 Std. betragen; zur Sicherheit sollte das Potential der erneuerten Elektrode überprüft werden.

Die erhaltenen Blutspiegelkurven (s. Abb. 5) stimmen mit denen aus <sup>13)</sup> weitgehend überein, liefern jedoch im extrem niedrigen Konzentrationsbereich einheitlichere Werte. Über die Pharmakokinetik wird gesondert berichtet<sup>16)</sup>.



**Abb. 5:** Paracetamol-Blutspiegel zweier Probanden nach oraler Applikation vom 200 mg Paracetamol neben 300 mg Salicylamid. Die mit O gekennzeichnete Kurve gibt den für die meisten Probanden typischen Blutspiegel wieder.

### Experimenteller Teil

**Zentrifuge:** Kühlzentrifuge ZK4, Vetter KG, St. Leon-Rot. **HPLC:** Flüssigchromatograph Perkin Elmer 1220; Trennsäule Rp8, 7 $\mu$ , 25 cm, Knauer KG, Oberursel; Automatisches Schleifenaufgabesystem 225, Micrometrics, Coulter electronics, Krefeld; Aufgabevol. 10 $\mu$ l; Temp. 35°; Durchfluß 1,3 ml/min; Mobile Phase MeOH/H<sub>2</sub>O/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85proz. 20/80/0,04. **ELCD:** Alle Geräte der Firma Metrohm, Herisau, Schweiz; Durchflußzelle EA 1096/2; VA Detektor E611; Arbeits- und Hilfelektrode glassy carbon EA 286/1; Referenzelektrode Ag/AgCl//3MKCl EA 442. Chemikalien: p. A. E. Merck, Darmstadt; Paracetamol, Benechemie, München.

### Literatur

- 1 S. Ebel, Handbuch der Arzneimittel-Analytik, S. 305, Verlag Chemie, Weinheim 1977.
- 2 L. F. Prescott, J. Pharm. Pharmacol. 23, 111 (1971).
- 3 L. F. Prescott, J. Pharm. Pharmacol. 23, 807 (1971).
- 4 B. H. Thomas und B. B. Coldwell, J. Pharm. Pharmacol. 24, 243 (1972).
- 5 M. W. Anders und J. P. Latorre, J. Chromatogr. 55, 409 (1971).
- 6 J. E. Mrochek, S. Katz, W. H. Christie und S. R. Dinsmore, Clin. Chem. 20, 1086 (1974).
- 7 C. T. Wang, G. Solomonraj und B. Thomas, J. Pharm. Sci. 65, 1064 (1976).
- 8 G. R. Gotelli, P. M. Kabra und L. J. Morton, Clin. Chem. 23, 957 (1977).

- 9 J. W. Munsen, R. Weierstall und H. B. Kostenbänder, *J. Chromatogr.* 145, 328 (1978).
- 10 D. J. Miner und P. Kissinger, *J. Pharm. Sci.* 68, 96 (1979).
- 11 D. Blais und G. Rumack, *Clin. Chem.* 23, 743 (1977).
- 12 D. Howie, P. I. Adriaenssen und L. F. Prescott, *J. Pharm. Pharmacol.* 29, 235 (1977).
- 13 S. Ebel, R. Liedtke und B. Missler, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 313, 324 (1980).
- 14 G. Levy und T. Matsuzawa, *J. Pharm. Exp. Ther.* 156, 285 (1967).
- 15 Publikation in Vorbereitung.
- 16 R. Liedtke, S. Ebel, E. Glaser, B. Missler und L. Stein, *Therapiewoche*, im Druck.

[Ph 150]

---

Arch. Pharm. (Weinheim) 313, 405–416 (1980)

## Untersuchungen an 1,3-Dicarbonylverbindungen, 15. Mitt.<sup>1)</sup>

### 4,5-Dihydro-5-alkyl-4-oxo-pyrano[3,2-b]indole

Klaus Görlitzer\*)\*\*\*)\*\*\*\*) und Ekkehard Engler\*\*\*\*\*

Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin, Königin-Luise-Str. 2/4, 1000 Berlin 33  
Eingegangen am 3. August 1979

---

*N*-Alkyl-anthranilsäuren reagieren mit Chloraceton/ $K_2CO_3$  unter Bildung von 1-Alkyl-2-acetyl-3-hydroxy-indolen **3**. Die 1,3-Dicarbonylverbindungen **3** kondensieren mit Oxalsäureestern zu den 1,3,5,6-Tetracarbonylverbindungen **5**, die beim Erhitzen in mit HCl-gesättigten Alkoholen zu den 4-Pyron-2-carbonsäureestern **6** cyclisieren. Aus **6** erhält man die antiallergisch wirksamen Säuren **8**, die sich zu den Pyrono[3,2-*b*]indolen **9** decarboxylieren lassen. Kondensation von **5** mit Orthoameisensäureestern/Acetanhydrid ergibt die 4-Pyron-3-ketocarbonsäureester **7**, **6** und **9** werden in die Thiocarbonylverbindungen **11** und **12** überführt. Aus **6c** und Ammoniak erhält man das Säureamid **10**.

#### 1,3-Dicarbonyl Compounds, XV: 4,5-Dihydro-5-alkyl-4-oxopyrano[3,2-*b*]indoles

*N*-Alkylanthranilic acids react with chloroacetone/ $K_2CO_3$  to form the 1-alkyl-2-acetyl-3-hydroxy-indoles **3**. The 1,3-dicarbonyl compounds **3** condense with dialkyl oxalates to yield the 1,3,5,6-tetracarbonyl compounds **5**, which cyclize on heating with alcohols, saturated with HCl, to form the alkyl 4-pyrone-2-carboxylates **6**. The acids **8**, obtained from **6**, possess antiallergic activity. Decarboxylation of **8** affords the pyrono[3,2-*b*]indoles **9**. Condensation of **5** with triethyl orthoformate/acetic anhydride yield the alkyl 4-pyrone-3-ketocarboxylates **7**. Compounds **6** and **9** are converted to the thiocarbonyl compounds **11** and **12**. The amide **10** is obtained from **6c** by reaction with ammonia.

---

\*\* Herrn Prof. Dr. H. Auterhoff mit den besten Wünschen zum 65. Geburtstag gewidmet.

0365-6233/80/0505-0405 \$ 02.50/0

© Verlag Chemie, GmbH, Weinheim 1980