

STANOVENÍ PARACETAMOLU V LIDSKÉM SÉRU POMOCÍ HPLC

DANA PROCHÁZKOVÁ^a, PAVEL DRAŠAR^b
a JOSEF VÁCHA^a

^aIKEM, Vídeňská 800, 146 22 Praha 4 Krč, ^b Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6

Došlo dne 10. X. 1996

Obsah

1. Úvod
2. Experimentální podmínky
 - 2.1. Reagencie
 - 2.2. Aparatura
 - 2.3. Chromatografické podmínky
 - 2.4. Příprava vzorku
 - 2.5. Vlastní chromatografické stanovení
3. Závěr

1. Úvod

Paracetamol (Acetaminophen, N-Acetyl-*p*-aminofenol) patří mezi často používaná antipyretická analgetika. Na jeho stanovení byla vyvinuta celá řada analytických postupů. Nejjednodušší je přímá spektrometrie v UV oblasti¹ a metody kolorimetrické². Plynová chromatografie je sice přesnější a citlivější^{3,7}, ale je bohužel časově náročná. Snad proto je nejčastěji používanou technikou při stanovení paracetamolu, jeho metabolitů, ale i současné stanovení více léčiv HPLC s detekcí UV^{8,24} a elektrochemickou^{25,29}. Modifikace metody, která je použita v naší studii, je založena na zrychlení analytického postupu a vyšší ekonomice rutinní analýzy vzhledem k publikovaným metodám a spočívá zejména na změně složek mobilní fáze a vypracování maximálně jednoduché přípravy vzorku. Použitý izokratický režim umožňuje rychlejší analýzy a zkracuje cyklus použití ekonomicky nákladného přístroje pro HPLC. Novým uspořádáním analýzy

bylo dosaženo analogického detekčního limitu i lineárního dynamického rozsahu jako u většiny citovaných metod. Vnitřní standard (teofylin) byl použit především pro svůj retenční čas, který je velmi podobný retenčnímu času paracetamolu. Navržená metoda plně vyhovuje kritériím inovace, která byla stanovena. Důraz je třeba dát i na fakt, že při stanovení paracetamolu v séru nebyly zjištěny žádné interference ať ze strany metabolitů paracetamolu či různých nečistot. Jednoduchost metody i vlastní provedení analýzy vynikne např. při srovnání s postupem, který využil propojení autosampleru ASTED s dialyzačním blokem²⁴, námi navržená metoda dosahuje ve srovnání s uvedenou studií²⁴ také kvalitnější separace vlastního analytu od nečistot samotného vzorku sera, přestože metoda používá extrémně zjednodušenou přípravu vzorku.

Další informace o stanovení paracetamolu a jeho metabolitů je možné získat v příslušných citovaných publikacích, ve kterých jsou popsány i další způsoby přípravy vzorků před vlastní analýzou (extrakce pevnou fází)¹⁷⁻³⁰ a nebo automatické stanovení³¹.

2. Experimentální podmínky

2.1. Reagencie

Referenční substance paracetamol a interní standard teofylin byly získány od SIGMA Chemical Company (USA). Zásobní roztoky byly připraveny v koncentraci $5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ v methanolu p.a. (destilovaný a filtrovaný - LACHEMA, Česká republika). Kyselina *ortho*-fosforečná (LACHEMA, Česká republika) byla použita na úpravu pH mobilní fáze na hodnotu 2,9. K deproteinaci séra byl použit 70 %-ní vodný roztok kyseliny chloristé (E. MERCK, Německo). Pro křížovou farmakokinetickou studii byly použity tablety Paracetamolu K s obsahem 500 mg paracetamolu (KRKA, Slovinská republika) a jako referenční preparát Paralen, tablety s 500 mg paracetamolu (Léčiva Praha, Česká republika).

2.2. Aparatura

Analýzy byly provedeny na kapalinovém chromatografu Spectra-Physics SP 8100 s autosamplrem SP 8110 a detektorem s proměnnou vlnovou délkou SP 8440 XR UV/VIS. Měření byla prováděna při vlnové délce 258 nm

(Spectra-Physics, nyní Thermo Separation Products, CA, USA).

2. 3. Chromatografické podmínky

Pro separaci byla použita kolona LiChrospher 100 CH18/2 250 x 4,0 mm I.D. 5 μm (E. Merck, Německo) a vlastní plocha píku byla stanovena integrátorem Spectra-Physics SP 4200. Složení mobilní fáze bylo voda - methanol (80:20, v/v), okyseleno kyselinou *orto*-fosforečnou na pH 2,9. Průtoková rychlost byla 1,0 ml.min⁻¹ v izokratickém režimu.

2. 4. Příprava vzorků

Ve stanovených časových intervalech po podání paracetamolu byla zdravým dobrovolníkům odebírána krev, která byla odcentrifugována (3500 ot.min⁻¹). Získané sérum bylo skladováno při - 20 °C. Před zpracování bylo sérum ohřáto na pokojovou teplotu. Do 0,5 ml séra bylo přidáno 50 μl theofylinu jako interního standardu (0,5 mg.ml⁻¹). Následovala precipitace 70 % kyselinou chloristou. Směs byla intenzivně promíchána na vortexovém míchadle a centrifugována (5000 ot.min⁻¹) po dobu 10 minut. 10 μl čirého supernatantu bylo dávkováno přímo na kolonu.

Kalibrační křivka byla připravena přidáním roztoku paracetamolu do směsného séra. Jako kalibrační křivka byla vynesena závislost poměru ploch paracetamolu a interního standardu na koncentraci paracetamolu.

2. 5. Vlastní chromatografické stanovení

Uvedená metoda je poměrně rychlá a účinná. Jednoduchá precipitace proteinů je dostačující pro odstranění proteinů ze vzorku, což je dobře vidět na obr. 1, ze kterého je patrné, že pík paracetamolu je dobře oddělen jak od zbývajících plazmových proteinů, (viz. obr. 1a - nástřík slepého vzorku), tak i od interního standardu (viz. obr. 1b). Vlastní chromatografická analýza netrvá déle než 15 minut. Všechny vzorky byly stanovovány ve tripletech, průměry a směrodatné odchylky byly vypočteny z deseti měření. Všechny výsledky byly získány metodou s použitím vnitřního standardu na základě poměru ploch píků stanovované látky a interního standardu. Přesnost a správnost byla stanovena na třech koncentračních hladinách 40, 10 a 2,5 mg.l⁻¹, (viz. tabulka I). Nejvyšší dosažená koncentrace v séru zdravého dobrovolníka byla 25,26 mg.l⁻¹ (viz tabulka II).

Bylo ověřeno, že kalibrační křivka je lineární v koncentračním rozmezí 1-80 mg.l⁻¹ a pomocí lineární regresní metody byl pro ni vypočten vztah

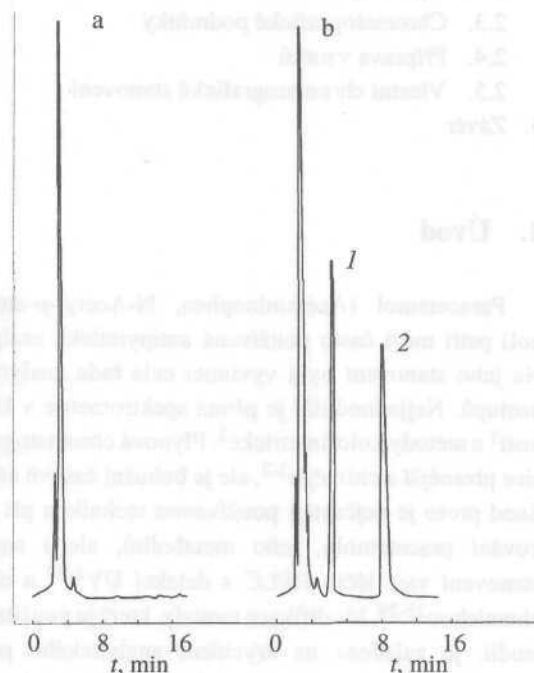
$$y = 0,029786 x - 0,041358 \text{ (korelační koeficient } 0,99881)$$

Tabulka I

Přesnost a správnost stanovení paracetamolu

Konc.připravená [mg.l ⁻¹]	Konc.nalezená ^a [mg.l ⁻¹]	Výtěžnost [%]
40,00	36,82±0,76	92,06
10,00	9,35±0,42	93,45
2,50	2,64±0,15	105,44

^a Průměr ± směrodatná odchylka (vypočtená z 10 stanovení)



Obr. 1, Chromatogram čistého séra bez paracetamolu (a) a chromatogram séra zdravého dobrovolníka 30 min. po podání preparátu (b).

1 - paracetamol (17,29 mg.l⁻¹), 2 - theofyllin (50 mg.l⁻¹)

Tabulka II
Průměrné koncentrace paracetamolu (mg.l^{-1}) v séru zdravých dobrovolníků po podání 1000 mg (2 tablet) PARACETAMOLU K (výrobce Krka, Slovinská republika (PC)) a PARALENU (výrobce Léčiva Praha, Česká republika (PL)). Standardní odchylka (SD) byla vypočtena z dvanácti měření

Doba po podání [min]	Lék	Konc. [mg.l^{-1}]	SD [mg.l^{-1}]	Mini- mum [mg.l^{-1}]	Maxi- mum [mg.l^{-1}]	Rozsah [mg.l^{-1}]
15	PC	7,44	0,81	0,00	24,05	24,05
	PL	6,87	5,48	0,00	18,04	18,04
30	PC	9,76	8,70	0,00	25,26	25,26
	PL	9,93	4,79	4,28	17,74	13,46
45	PC	10,98	5,07	3,79	16,82	13,03
	PL	10,32	3,94	4,58	17,75	13,17
60	PC	10,12	4,05	2,20	15,34	13,14
	PL	10,64	3,40	6,18	15,64	9,46
90	PC	9,73	3,09	3,07	13,09	10,02
	PL	10,00	2,53	6,57	14,72	8,15
150	PC	7,79	1,98	4,81	12,06	7,25
	PL	7,84	2,61	4,39	13,82	9,43
240	PC	5,34	1,56	3,00	8,39	5,39
	PL	5,35	1,54	2,54	8,26	5,72
480	PC	2,27	1,13	0,00	3,60	3,60
	PL	2,21	0,88	0,00	3,13	3,13
1440	PC	0,18	0,60	0,00	1,98	1,98
	PL	0,32	0,76	0,00	2,05	2,05

Výtěžnost, zjišťovaná na třech koncentračních hladinách, je uvedena v tab. I. Mez metody $0,91 \text{ mg.l}^{-1}$ paracetamolu byla vypočtena jako koncentrace, pro kterou je dolní mez 95 %ního intervalu spolehlivosti predikce signálu z kalibračního modelu rovna jeho kritické úrovni, t.j. hodnotě signálu nad níž lze odlišit signál od šumu. S empirickými hodnotami publikovanými v některých podobných pracích (srovnej např. ²⁴)ji lze srovnat obtížně. Mez plně vyhověla požadavku srovnávací studie.

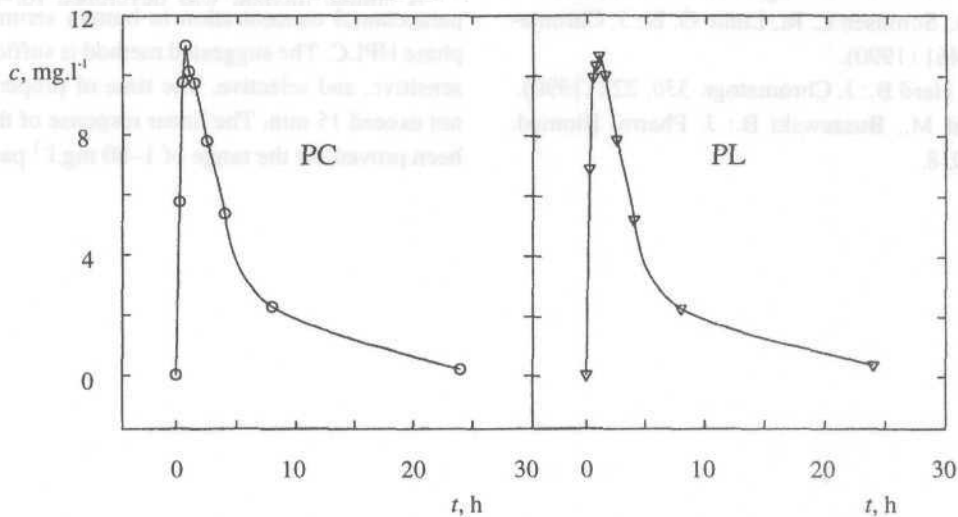
Popsaná metoda byla použita pro srovnání biologické dostupnosti dvou preparátů se stejným obsahem účinné látky (Každá tableta obsahovala 500 mg paracetamolu.) Hodnoceným preparátem byl Paracetamol K, tablety s 500 mg paracetamolu (výrobce KRKA) a jako referenční preparát byl použit Paralen, tablety s 500 mg paracetamolu (výrobce Léčiva).

Jednalo se o křížovou (cross-over) farmakokinetickou studii na dvanácti zdravých dobrovolnících, mužů a žen (věk: 18-50 let, přičemž jejich hmotnost nesmí být odlišná o více než 15 % od ideální hmotnosti a nesmí užívat žádné další léky). Po podání tablet byla zdravým dobrovolníků odebírána krev v následujících časových intervalech: 0, 15, 30, 45, 60, 90, 150, 240, 480, 1440 min.

V tabulce II jsou uvedeny průměrné koncentrace v séru zdravých dobrovolníků ve stanovených časových intervalech. Obr. 2 ukazuje podobnost závislosti koncentrací paracetamolu na čase v séru zdravých dobrovolníků.

3. Závěr

Uvedená metoda je velmi jednoduchá a je dostatečně rychlá při stanovování paracetamolu v séru. Byla vyvinuta



Obr. 2. Sérová koncentrace paracetamolu jako funkce času po podání dvou tablet Paracetamolu K (PC), případně Paralenu (PL)

a použita pro srovnávací farmakokinetickou studii, která se stala jejím zavedením podstatně ekonomičtější, zejména vzhledem k drahým spotřebním materiálům a strojovému času.

LITERATURA

1. Elsayed M. A.-H., Belal S. F., Elwalily F. M., Abdine H.: *Analyst* 104, 620 (1979).
2. Murfin J. W.: *Analyst* 97, 663 (1972).
3. Prescott L. E.: *J. Pharm. Pharmacol.* 23, 111 (1971).
4. Evans M. A., Harbison R. D.: *J. Pharm. Sci.* 66, 1628 (1977).
5. Dechtiaruk W. A., Johnson G. F., Solomon H. M.: *Clin. Chem.* 22, 879 (1976).
6. Huggett A., Andrews P., Flanagan R. J.: *J. Chromatogr.* 209, 67 (1981).
7. Murray S., Roobis A. R.: *J. Chromatogr.* 568, 341 (1991).
8. Pang K. S., Taburet A. M., Hinson J. A., Gillett J. A.: *J. Chromatogr.* 174, 165 (1979).
9. Jung D., Zafar U. N.: *J. Chromatogr.* 339, 198 (1985).
10. Tebbett I. R., Omile C. I., Danesh B.: *J. Chromatogr.* 329, 9196 (1985).
11. Sisco W. R., Rittenhouse C. T., Everhart L. A.: *J. Chromatogr.* 348, 253 (1985).
12. Bhargava V. O., Emodi S., Hirate J.: *J. Chromatogr.* 426, 212 (1988).
13. Kotal P., Perlík F., Vlachová E., Kordač V.: *Českoslov. Farm.* 38, 195 (1989).
14. Rustum A. M.: *J. Chromatogr. Sci.* 27, 18 (1989).
15. Scott D. O., Sorensen L. R., Lunte G. E.: *J. Chromatogr.* 506, 461 (1990).
16. Kamali F., Herd B.: *J. Chromatogr.* 530, 222 (1990).
17. El Movelhi M., Buszewski B.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 7990, 8.
18. Esteban A., Graells M., Satorre J., Perez-Mateo M.: *J. Chromatogr.* 573, 121 (1992).
19. Das Gupta V.: *J. Pharm. Sci.* 69, 110 (1980).
20. Meatherall R., Ford D.: *Ther. Drug Monit.* 10, 101 (1988).
21. Mamolo M. G., Vio L., Maurich V.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 3, 157 (1985).
22. Avramova J.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 7, 1221 (1989).
23. Indrayanto G., Sunarto A., Adriani Y.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13, 1555 (1995).
24. Gilar M.: *Chem. listy* 89, 246 (1995).
25. Palmer J. L.: *J. Chromatogr.* 382, 338 (1986).
26. Kinney C. D., Kelly J. G.: *J. Chromatogr.* 419, 433 (1987).
27. Roston D. A., Kissinger P. T.: *Anal. Chem.* 54, 429 (1982).
28. Hamilton M., Kissinger P. T.: *Anal. Biochem.* 125, 143 (1982).
29. Wilson J. M., Slattery J. T., Forte A. J., Nelson S. D.: *J. Chromatogr.* 227, 453 (1982).
30. Procházková D., Štambergová A., Drašar P.: *Chem. Listy* 89, 634 (1995).
31. Ladds G., Wilson K., Burnett D.: *J. Chromatogr.* 414, 355 (1987).

D. Procházková^a, P. Drašar^b and J. Vácha^a (^a*Institute of Clinical and Experimental Medicine, Prague*, ^b*Institute of Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **HPLC Determination of Paracetamol in Human Serum**

A simple method was developed for measuring the paracetamol concentration in human serum by reversed-phase HPLC. The suggested method is sufficiently precise, sensitive, and selective. The time of proper analysis does not exceed 15 min. The linear response of the detector has been proved for the range of 1-80 mg.l⁻¹ paracetamol.