

CHROM. 8603

Note

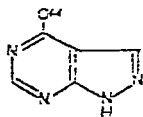
Hochdruckflüssigchromatographische Bestimmung von Allopurinol und Oxipurinol in Serum

R. ENDELE und G. LETTENBAUER

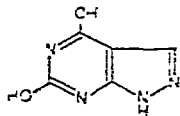
Forschungslaboratorien, Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim (B.R.D.)

(Eingegangen am 5. Juni 1975)

Sowohl Allopurinol als auch das als Hauptmetabolit daraus entstehende Oxipurinol hemmen kompetitiv das Enzym Xanthinoxidase und blockieren also die Harnsäuresynthese aus den Vorstufen Hypoxanthin bzw. Xanthin. Allopurinol wirkt deshalb harnsäuresenkend und findet ausgedehnte Anwendung zur Therapie der Hyperurikämie bzw. Gicht¹.



Allopurinol



Oxipurinol

In der Literatur^{2,3} sind papier- und säulenchromatographische Trennverfahren beschrieben. Die quantitative Bestimmung von Allopurinol bzw. Oxipurinol erfolgt dabei durch Messung der Radioaktivität bzw. der UV-Absorption. Diese Verfahren sind zeitraubend und wenig routinefreundlich.

Zwei neuere Arbeiten^{4,5} berichten u.a. über eine hochdruckflüssigchromatographische Trennung und Bestimmung von Allopurinol und Oxipurinol unter Verwendung einer Gradientelution⁴, bzw. erhöhter Temperatur der mobilen Phase⁵. Beide Methoden sind jedoch apparativ aufwendiger und stör anfälliger als die hier beschriebene.

EXPERIMENTELLES

Apparatur

Die Analysen wurden an einem aus folgenden Einzelteilen zusammengesetzten Hochdruckflüssigchromatographen durchgeführt: Pumpe: Modell 6000 solvent delivery system (Waters Ass., Milford, Mass., U.S.A.). Probenaufgabe: UGK universal liquid chromatograph injector (Waters Ass.). Detektor: Photometer PM2DLC mit Durchflusssküvette, Zellvolumen 8 μ l (Zeiss, Oberkochen, B.R.D.). Die Messung erfolgte bei 250 nm. Säule: Edelstahlrohr, 15 cm lang, 2.5 mm I.D., $\frac{1}{8}$ in. (0.32 mm) O.D. Schreiber: Siemens-Kompensograph.

Chromatographie

Als stationäre Phase dient der sphärische Anionenaustauscher Aminex A-28 (Bio-Rad, München, B.R.D.). mittlere Korngrösse (d_p : 9 μm). Der Austauscher, der zunächst in der Cl^- -Form vorliegt, wird vor seiner Verwendung in der später als mobile Phase verwendeten Pufferlösung dispergiert. Nach Sedimentation des Harzes wird abdekantiert und der Vorgang noch zweimal wiederholt.

Die Packung der Säulen erfolgt nach der "slurry"-Methode, wobei die mobile Phase als Dispergiertflüssigkeit dient. Ansatz: 1 ml Harz auf 10 ml mobile Phase.

Mobile Phase ist eine 0.33 M Ammoniumacetatlösung die mit konzentrierter Essigsäure auf pH 6.45 eingestellt wird. Auf exakte Einhaltung des pH-Wertes ist besonders zu achten, da bereits geringe pH-Änderungen die Trennung stark beeinflussen.

Enteiuweissung

Prinzipiell ist vor der chromatographischen Bestimmung eine Enteiuweissung des Serums vorzunehmen. Diese kann geschehen (a) durch Fällung mit Säuren, wie z.B. Trichloressigsäure oder Perchlorsäure; (b) durch Ultrafiltration mittels geeigneter Membranfilter (Centriflo-Membranfilterkegel der Fa. Amicon, Lexington, Mass., U.S.A.).

Methode b ist anwendbar, weil die Eiweissbindung von Allopurinol bzw. Oxipurinol zu vernachlässigen ist.

Arbeitsvorschrift

Methode a. 1 ml Serum wird mit 2 ml 5%iger Trichloressigsäure enteiuweisst. Nach Zentrifugieren wird der klare Überstand vier mal mit je 5 ml Diäthyläther extrahiert um überschüssige Trichloressigsäure zu entfernen. Die Diäthylätherphasen werden verworfen. Man entnimmt 1.5 ml der wässrigen Phase, versetzt mit 200 μl einer Barbitursäurelösung (2 mg/100 ml) (innerer Standard) und lässt gefriertrocknen. Der Rückstand wird in 1 ml Wasser aufgenommen; 250 μl der Lösung werden eingespritzt.

Methode b. 1 ml Serum wird durch Ultrafiltration von Eiweiss befreit (25 min bei 4200 g zentrifugieren). 500 μl des klaren Filtrates werden entnommen, 100 μl einer Barbitursäurelösung (2 mg/ml) zugesetzt und 250 μl eingespritzt.

Beide Methoden sind gleich leistungsfähig. Methode b bietet sich jedoch wegen der denkbar einfachen Aufarbeitung für Routinebestimmungen an.

Auswertung

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte nach der Methode des inneren Standards, wobei nach relativen Peakhöhen oder -flächen ausgewertet werden kann. Beide Methoden liefern befriedigende Resultate. Die Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$C_x = f_x \cdot C_{std} \frac{S_x}{S_{std}}$$

wobei C_x = unbekannte Konzentration; f_x = Faktor; C_{std} = Konzentration des Standards; S_x = Signal der Komponente x; S_{std} = Signal der Standardsubstanz.

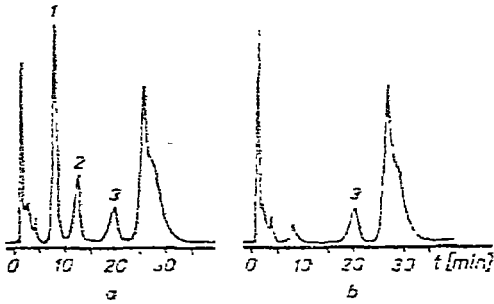


Fig. 1. a, Flüssigchromatographisches Chromatogramm eines Serums mit $10 \mu\text{g/ml}$ Allopurinol (1) bzw. Oxipurinol (2); innerer Standard war Barbitursäure (3). b, Entsprechender Leerwert. $\Delta p = 3.5$ bar; Durchflussgeschwindigkeit, 0.6 ml/min .

Für S kann die Peakhöhe bzw. Peakfläche gesetzt werden. Der Faktor f_x wird aus Seren mit bekanntem C_x bestimmt.

ERGEBNISSE

Fig. 1 zeigt zwei Chromatogramme wie sie von einem Serum mit $10 \mu\text{g/ml}$ Allopurinol und Oxipurinol und einem Leerserum erhalten wurden. Analysiert wurde nach Methode b.

Wie aus Fig. 1b zu erkennen ist, weist das Leerserum eine Verunreinigung gleicher Retentionszeit wie Allopurinol auf. Dies hat zur Folge, dass Allopurinol-Bestimmungen erst ab einem Serumspiegel von $0.5 \mu\text{g/ml}$ aussagekräftig sind.

Fig. 2 zeigt die Eichkurven wie sie durch Analyse von Seren gewonnen wurden, denen entsprechende Mengen an Allopurinol und Oxipurinol zugesetzt waren. Die Proben wurden nach Methode b analysiert.

Die Wiederfindung nach Methode b wurde durch Vergleich der relativen Peakgrößen einer wässrigen Lösung bekannten Gehaltes an Allopurinol und Oxipurinol mit Seren gleicher Konzentration berechnet. Es ergab sich eine durchschnittliche Wiederfindung von $74 \pm 5\%$.

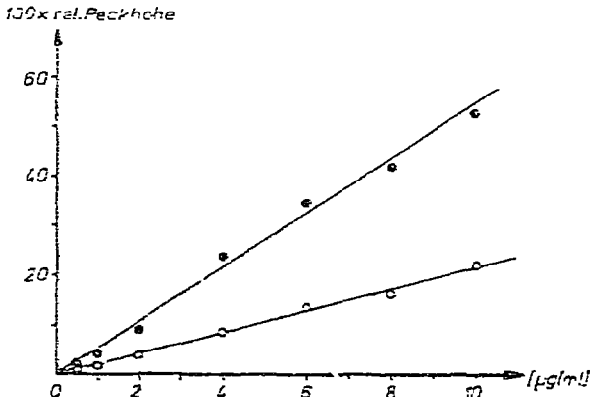


Fig. 2. Eichkurven für Allopurinol bzw. Oxipurinol; analysiert nach Methode b. ●—●, Allopurinol; ○—○, Oxipurinol.

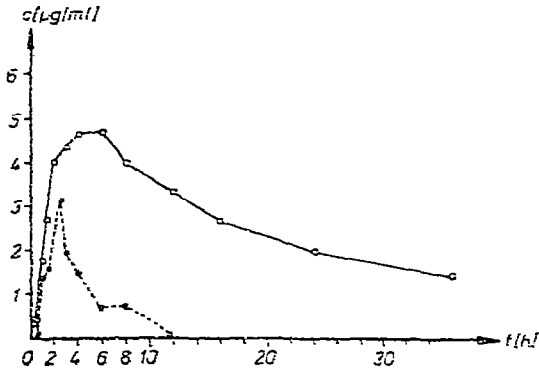


Fig. 3. Blutspiegelverlauf von Allopurinol bzw. Oxipurinol nach Gabe von 3×100 mg Allopurinol.

Die Nachweisgrenze, definiert als die doppelte Rauschbreite, liegt bei einem Serumspiegel von ca. $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$.

Fig. 3 zeigt einen typischen Blutspiegelverlauf, wie er nach Gabe von 300 mg Allopurinol erhalten wird.

LITERATUR

- 1 W. Gröbner und N. Zöllner, *Klin. Wochenschr.*, 53 (1975) 255.
- 2 E. Metz und R. W. Rundles, *Biochem. Pharmacol.*, 15 (1966) 863.
- 3 G. B. Elion und Ts'ai-Fan Yü, *Amer. J. Med.*, 45 (1968) 69.
- 4 G. P. Rodnan, J. A. Robin, S. F. Tolchin und G. B. Elion, *J. Amer. Med. Ass.*, 231 (1975) 1143.
- 5 D. J. Nelson, C. J. L. Buggé, H. C. Kransky und G. B. Elion, *Biochem. Pharmacol.*, 22 (1973) 2003.