

CHROM 10,527

## MÉTHODE DE DOSAGE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DE LA DIÉTHYLCARBAMAZINE (HÉTRAZAN) DANS LE SERUM DE RONGEURS DE LABORATOIRE

M. C. PFAFF, Ph. GAYRAL et G. MAHUZIER

*Laboratoires de Chimie Analytique et de Parasitologie, U.E.R. Chimie Thérapeutique, Faculté des sciences pharmaceutiques, F 92290 Chatenay-Malabry (France)*

(Reçu le 20 juin 1977)

---

### SUMMARY

*Gas chromatographic determination of diethylcarbamazine (Hetrazan) in serum of laboratory rodents*

After chloroform extraction in an alkaline solution, diethylcarbamazine (DEC) is measured in the presence of dipropylacetamid (internal standard), treated in the same manner, by a gas chromatographic procedure using a nitrogen detector in a 10% BDS column.

Results can be easily reproduced for analysis of DEC in sera up to levels of 10 mg/l and sensibility allows determination of approximately 0.5 mg/l levels on 50- $\mu$ l samples of serum. This method is suitable for pharmacokinetic studies.

---

### INTRODUCTION

La diéthylcarbamazine (DEC; N,N-diethyl-4-méthyl-1-piperazinecarboxamide) est un anthelminthique très utilisé depuis longtemps en médecine vétérinaire et humaine; son activité antifilarienne en fait un médicament de référence dans ce domaine chez l'homme, bien qu'elle provoque des effets indésirables chez les individus en état d'hypersensibilité. Son mode d'action est inconnu mais doit pouvoir être étudié par l'étude de son métabolisme chez des Rongeurs, en particulier chez *Proechimys guyanensis*, hôte définitif dans un nouveau modèle expérimental de filarioses<sup>1</sup>.

Les méthodes de dosage de la DEC dans les liquides biologiques utilisées jusqu'à présent<sup>2</sup> font appel à la DEC marquée au <sup>14</sup>C ou à des techniques colorimétriques<sup>3–5</sup> nécessitant des prélèvements relativement importants, difficiles à pratiquer de manière répétée chez les rongeurs de laboratoire.

C'est pourquoi nous avons étudié et nous proposons une méthode de détermination de la DEC dans le sérum par chromatographie en phase gazeuse (CPG), qui permet un dosage sensible et spécifique sur des prélèvements de 0.3–0.4 ml de sang.

## MATÉRIEL ET MÉTHODE

*Principe de la méthode*

La DEC est extraite des sérums par le chloroforme en milieu alcalin. Le dipropylacétamide retenu comme étalon interne est ajouté aux sérums avant extraction. Les extraits évaporés sont repris par l'éthanol et injectés dans un chromatographe en phase gazeuse sans dérivation préalable. La chromatographie est effectuée sur colonne 10% de succinate de butanediol BDS dans un chromatographe équipé d'un détecteur thermoionique.

*Matériel*

*Appareillage.* Tubes à centrifuger bouchant émeris 3.5 ml; agitateur Vortex; centrifugeuse Jouan à refroidissement modèle E 95; dispositif d'évaporation sous azote; chromatographe Girdel 3.000 muni d'un détecteur thermoionique; enregistreur Servotrace de sensibilité 1 mV pour la totalité de l'échelle; colonne, 2 m de longueur et 1/8 de pouce de diamètre en acier inoxydable à 10% de BDS sur Gas-Chrom Q 80-100 mesh; microseringue Terumo UMSN de 10  $\mu$ l graduée au 1/10  $\mu$ l.

*Réactifs.* Chloroforme Prolabo; soude 0.01 N; éthanol absolu Prolabo; alcool isoamylique (Merck).

*Standards en solution éthanolique.* Solutions de DEC (Rhône-Poulenc-Specia, Paris, France): (1) solution mère à 125 mg/l: citrate de DEC (48.9 mg) et éthanol Q.S.P. 200 ml; cette solution est agitée au bain marie à 37° quelques minutes jusqu'à dissolution. (2) Solution de travail à 2.5 mg/l: solution mère de DEC (2 ml) et éthanol Q.S.P. 100 ml. Solutions de dipropylacétamide (Dépamide N.D., Labs. Berthier Dérol, Bordeaux, France): (1) solution mère à 1 g/l: dipropylacétamide (30 mg) et éthanol Q.S.P. 30 ml; (2) solution de travail à 10 mg/l: solution mère de dipropylacétamide (1 ml) et éthanol Q.S.P. 100 ml. Ces solutions standards sont conservées à 4°.

*Animaux.* Les animaux utilisés sont: *Proechimys guyanensis*, rongeur cavio-morphe, hôte définitif naturel d'une filaire *Dipetalonema dessetae*, adapté à ce titre au laboratoire; rat blanc souche Wistar; hamster syrien doré.

*Technique*

*Prélèvement.* Après légère anesthésie à l'éther 0.3-0.4 ml de sang sont prélevés aux sinus frontaux. Après coagulation le sérum est décanté et conservé à 4° jusqu'à l'extraction.

*Traitement des échantillons.* Dans des tubes rodés, lavés à l'acide chlorhydrique et rincés à l'eau distillée, on évapore sous azote 100  $\mu$ l de la solution de dipropylacétamide à 10 mg/l dans l'éthanol. On ajoute 50  $\mu$ l de sérum puis 100  $\mu$ l d'alcool isoamylique et 0.5 ml de soude 0.01 N. Ce mélange est ensuite traité 2 fois par 1.5 ml de chloroforme. L'agitation est réalisée mécaniquement (Vortex) pendant un temps standardisé d'une minute. Après centrifugation de 5 min à 4100 g, les phases organiques sont séparées de la phase aqueuse à l'aide de pipette pasteur, rassemblées dans des petits tubes et évaporées sous courant d'azote à température du laboratoire.

*Technique chromatographique.* Le résidu d'extraction est repris par 200  $\mu$ l d'éthanol et 1-6  $\mu$ l de cette solution sont injectés dans le chromatographe dans les conditions suivantes: température de la colonne, 180°; température de l'injecteur,

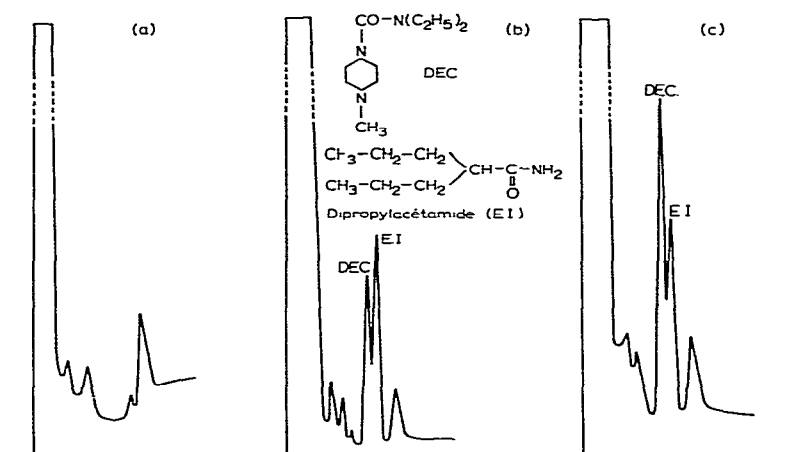


Fig. 1. (a) Sérum témoin de *Proechimys*; (b) sérum de *Proechimys* surchargé à 5 mg/l en DEC; (c) sérum de *Proechimys* après traitement; temps de rétention moyens: DEC, 2,9 min; dipropylacétamide (E.I.), 3,2 min.

225°; température du détecteur, 200°; azote perte de charge, 1,5 bar; air, 350 ml/min; hydrogène 25 ml/min; sensibilité, 1; atténuation, 1-4.

Les concentrations sériques en DEC sont calculées à partir du rapport des hauteurs des pics de la DEC et du dipropylacétamide en référence à la gamme d'étalonnage. Aucune interférence due aux constituants normaux des sérums des différentes espèces animales choisies n'apparaît dans les conditions que nous proposons.

Sur la Fig. 1 nous présentons des chromatogrammes (a) d'un sérum de *Proechimys* témoin; (b) d'un sérum de *Proechimys* surchargé à 5 mg/l en DEC; et (c) d'un sérum provenant d'un *Proechimys* traité par une dose de DEC de 50 mg/kg par voie intrapéritonéale, 15 min après l'injection et pour lequel nous avons trouvé un taux de 9,1 mg/l.

**Étalonnage.** L'étalonnage est obtenu en surchargeant des sérums témoins avec des quantités croissantes de DEC. Pour cela on évapore simultanément 100  $\mu$ l de solution d'étalon interne à 10 mg/l avec respectivement 25, 50, 100 et 200  $\mu$ l de la solution de DEC à 2,5 mg/l correspondant à des concentrations sériques en DEC de 1,25, 2,5, 5 et 10 mg/l après avoir ajouté au résidu 50  $\mu$ l de sérum. Ces sérums ainsi surchargés sont traités selon la technique décrite et permettent d'établir la courbe d'étalonnage.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### Caractéristiques de la méthode

La détermination de la courbe d'étalonnage (Fig. 2) montre que la linéarité est très satisfaisante dans les conditions opératoires proposées, jusqu'à des concentrations sériques de 10 mg/l en DEC. La sensibilité de la méthode permet d'atteindre 125 pg/ $\mu$ l d'échantillon injecté, ce qui permet de doser des sérums ayant moins de 0,5 mg/l de DEC. La précision de la méthode a été étudiée en répétant 11 fois le même dosage sur un sérum surchargé par 5 mg/l de DEC: moyenne du rapport DEC-étalon interne,

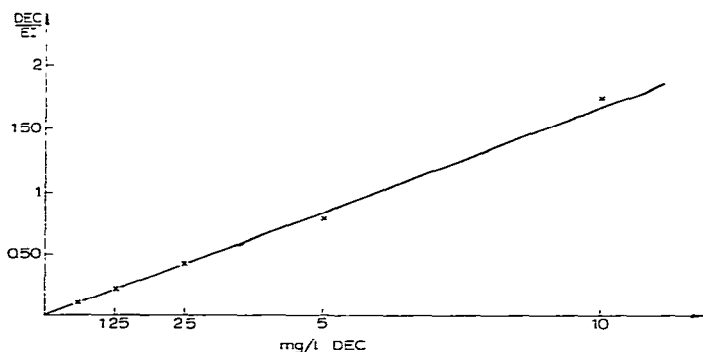


Fig. 2. Gamme d'étalonnage.

$\bar{m} = 0.78$ ; écart type  $\sigma$ , 0.033; coefficient de variation, 2.8%. Dans les conditions opératoires retenues, la DEC et le dipropylacétamide sont extraits avec un rendement voisin de 70%.

### Discussion

La mise au point de cette méthode s'est heurtée à deux difficultés: le choix de l'étalon interne et les irrégularités des extractions.

**Choix de l'étalon interne.** Nous avons tout d'abord recherché un étalon interne de structure chimique voisine de la DEC: pipérazine, N-2 amino éthylpipérazine ainsi que d'autres substances azotées susceptibles de répondre au détecteur thermoionique et d'être extraites de manière comparable à la DEC: bromhydrate d'arécoline, éphédrine, amidopyrine, caféine. Mais le temps de rétention de ces différentes molécules dans les conditions chromatographiques favorables à la DEC ne pouvait convenir. D'autre part leur caractère basique ainsi que celui de la DEC provoquaient un déplacement mutuel entraînant une mauvaise reproductibilité des extractions.

Nous nous sommes alors adressés à d'autres composés azotés. Le dipropylacétamide a été retenu. Il est stable, extractible en milieu acide et en milieu alcalin, n'entraîne pas la volatilisation de la DEC et présente une sensibilité de réponse au détecteur utilisé voisine de celle de la DEC.

**Conditions d'extraction.** Un certain nombre de solvants a été essayé: chloroforme, acétate d'éthyle, dichloroéthane et dichlorométhane. Le chloroforme nous a donné les résultats les plus satisfaisants pour la DEC tout en permettant également une bonne extraction du dipropylacétamide. D'autre part l'addition d'alcool isoamylique réduit l'émulsion provoquée par ce solvant. Un temps d'agitation standardisé à une minute permet une bonne extraction sans provoquer une émulsion trop importante. Le rendement d'extraction n'est pas amélioré en augmentant ce temps d'agitation au dessus d'une minute.

L'alcalinité du milieu aqueux interférant dans le rendement de l'extraction, nous avons été amenés à essayer différents systèmes tampons phosphate ou carbonate et différents degrés d'alcalinisation par la soude entre pH 8 et 13. Le meilleur rendement d'extraction de la DEC est obtenu à pH 12 avec de la soude 0.01 N (rendement 67%); à ce pH le dipropylacétamide est extrait avec un rendement de 73%.

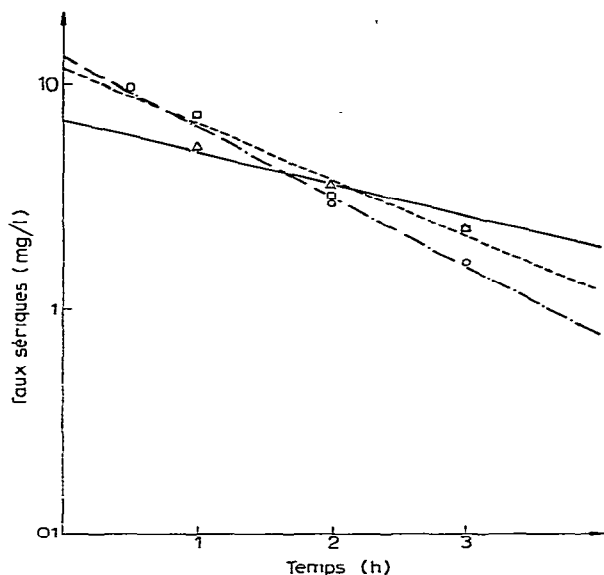


Fig. 3. Courbes d'élimination sérique de la DEC en coordonnées semilogarithmiques. *Proechimys* ( $\Delta$ — $\Delta$ ):  $r = -0.993$ ;  $y = -0.146x + 0.839$ . Hamster ( $\circ$ — $\circ$ ):  $r = -0.997$ ;  $y = -0.314x + 1.125$ . Rat blanc ( $\square$ — $\square$ ):  $r = -0.970$ ;  $y = -0.250x + 1.077$ .

**Choix de la technique chromatographique.** Le choix de la colonne a été motivé par plusieurs considérations: la recherche de symétrie du pic chromatographique difficile à obtenir avec une substance aussi polaire que la DEC, et l'abondance des pics parasites dûs aux sérums de rongeurs. Différentes colonnes ont été essayées: 7% OV-101 (2 m), 3% OV-17 (2 m et 3 m), 4% DEGS (3 m) et 10% BDS (2 m) pour laquelle nous avons finalement opté. En effet, sur cette colonne la DEC donne un pic parfaitement symétrique alors que sur les autres colonnes elle présente un pic légèrement trainant; de plus aucun pic parasite n'est observé au niveau de la DEC et du dipropylacétamide. Sur la colonne 7% OV-101 en particulier un petit pic au niveau de la DEC n'a pu être éliminé malgré différents lavages des extraits, notamment par des tampons borates à différents pH de 8-10.

Vu les faibles concentrations sériques en DEC observées chez les rongeurs et la composition de ces sérums, il était indispensable de faire appel à un détecteur suffisamment sensible et spécifique des molécules azotées. Le dosage de la DEC avec un détecteur thermoionique nous permet de travailler avec une sensibilité beaucoup plus grande que celle obtenue en détection ionisation de flamme. En outre, à des atténuations très faibles du signal, nous obtenons une ligne de base très correcte sans "crachement" de la colonne et sans trainée du front du solvant.

#### Application

A titre d'exemple nous présentons les résultats des dosages de DEC effectués chez un *Proechimys*, un rat blanc et un hamster traités oralement par 100 mg/kg. La DEC est rapidement assimilée et distribuée et n'est plus décelée dans le sang après

24 h. Les demies vies d'élimination évaluées sur les courbes correspondantes sont pour le hamster et le rat blanc de l'ordre de 1 h et pour le *Proechimys* de 2 h (Fig. 3).

Ces observations préliminaires sont en accord avec les données de la littérature indiquant une disparition rapide de la DEC du compartiment sanguin.

## CONCLUSION

En respectant les conditions opératoires décrites cette méthode se prête bien à la détermination de très faibles quantités de DEC telles que celles que l'on retrouve au cours des études cinétiques.

## REMERCIEMENT

Nous remercions L. Salemi pour sa collaboration technique.

## RÉSUMÉ

Après extraction en milieu alcalin par le chloroforme, la diéthylcarbamazine (DEC) est dosée en présence d'un étalon interne le dipropylacétamide, traité dans les mêmes conditions, par chromatographie en phase gazeuse avec détecteur thermoionique sur colonne 10% BDS.

La reproductibilité est très bonne jusqu'à 10 mg de DEC par litre de sérum et la sensibilité permet de déterminer des quantités de l'ordre de 0.5 mg/l sur des prises d'essais de 50  $\mu$ l de sérum. Cette méthode se prête bien à des études pharmacocinétiques.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 Ph. Gayral et M. Pommies, *C.R. Acad. Sci., Sér. D*, 283 (1976) 861.
- 2 H. W. Brown, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1 (1960) 87.
- 3 M. Lubran, *Brit. J. Pharmacol.*, 5 (1950) 210.
- 4 K. N. Rao et D. Subrahmanyam, *Indian J. Med. Res.*, 58 (1970) 746.
- 5 M. Ramachandran, *Indian J. Med. Res.*, 61 (1973) 864.