

CHROM. 10,967

## Note

### Dosage en chromatographie en phase gazeuse d'anticoagulants du groupe des phénylindanediones dans le plasma

JEAN-JACQUES DRILLAU, JEAN-PIERRE PAUBEL et PIERRE NIVIERE

Laboratoire de Chimie Organique Thérapeutique, U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques, 2 bis, Boulevard Tonnele, 37032 Tours Cedex (France)

(Reçu le 9 février 1978)

Les anticoagulants inhibiteurs des vitamines K constituent un groupe thérapeutique très utilisé. Les dérivés coumariniques (par exemple, acénocoumarine, warfarine, biscoumacétate d'éthyle) sont les plus étudiés. Plusieurs méthodes de dosage applicables *in vivo* de ces différents composés sont décrites: chromatographie en phase gazeuse<sup>1-5</sup>, chromatographie liquide à haute pression<sup>6</sup> et chromatographie sur couche mince<sup>7</sup>.

Les analogues structuraux des coumarines, les phénylindanediones, ont été l'objet d'investigations moins nombreuses. Plusieurs méthodes de dosage sont néanmoins décrites: spectrophotométrie<sup>8</sup>, chromatographie liquide-liquide<sup>9</sup> et polarographie<sup>10</sup>.

Il est intéressant de mettre au point une méthode de dosage rapide et précise permettant un dosage dans le plasma à des fins toxicologiques ou pharmacologiques. Nous proposons ici un dosage en chromatographie en phase gazeuse de la Pindione (phényl-2-indanedione-1,3) et du Previscan [(fluoro-4-phényl)-2-indanedione-1,3]. Un composé voisin, la (bromo-4-phényl)-2-indanedione-1,3 est utilisé comme étalon interne.

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE

On a recours à une technique de chromatographie de partage gaz-liquide.

##### *Technique chromatographique*

Les dosages sont réalisés sur un chromatographe Varian Aérograph série 1200 équipé d'un enregistreur potentiométrique Honeywell Elektronik 15.

La colonne (longueur 3.50 m; diamètre  $\frac{1}{8}$  de pouce) est remplie de Chromosorb W NAW HMDS (60-80 mesh) et imprégné de SE-30 (10%, w/w). Le conditionnement est réalisé 12 h avant l'emploi. Le gaz vecteur est l'azote, au débit de 35 ml/min.

La température de travail dans la colonne est 270°, dans l'injecteur, 280° et dans le détecteur (à ionisation de flamme), 300°. Le volume des échantillons injectés est de 3  $\mu$ l. On utilise la technique de l'étalon interne pour quantifier les résultats.

##### *Préparation des échantillons*

Les prélèvements, effectués sur mélange anticoagulants de Wintrobe, sont

aussitôt centrifugés à 3500 g pendant 5 min. Le plasma surnageant est transféré dans un tube à hémolyse en verre et conservé à  $-18^{\circ}$  en attendant l'extraction et le dosage. L'étude de reproductibilité de la technique a été effectuée à partir de plasma additionné d'anticoagulant de façon à aboutir à une concentration exactement connue (l'anticoagulant est dissous dans de l'eau légèrement alcaline et ajouté au plasma).

Les prélèvements effectués *in vivo* et les échantillons de plasma additionnés d'anticoagulants sont ensuite traités de la façon suivante. Après décongélation totale, si nécessaire, on introduit dans un tube à centrifuger 1 ml de plasma et 4 ml d'acétone. Les protéines précipitent immédiatement. Le mélange est ensuite agité vigoureusement pendant 10 min. On centrifuge pendant 5 min à 3000 rpm.

On recueille quantitativement le surnageant dans une capsule antigrippante. Le culot de centrifugation est à nouveau extrait par 4 ml d'acétone, agité pendant 10 min et centrifugé. On renouvelle l'opération deux fois, les surnageants sont réunis. La solution hydro-acétonique obtenue est ensuite évaporée à sec au bain-marie. L'extrait sec obtenu est additionné de 2 ml d'acétone anhydre, l'insoluble résultant est éliminé par centrifugation. La solution obtenue est transvasée dans un tube à hémolyse en verre. L'extraction est répétée deux fois, les surnageants sont réunis. Le contenu du tube est évaporé à sec au bain-marie. On reprend le résidu par 0.1 ml exactement mesuré de solution d'étalon interne, la dissolution est immédiate. On injecte la prise d'essai de 3  $\mu$ l.

## RÉSULTATS

La Fig. 1 représente le chromatogramme d'un plasma contenant de la Pindione et le chromatogramme d'un plasma témoin.

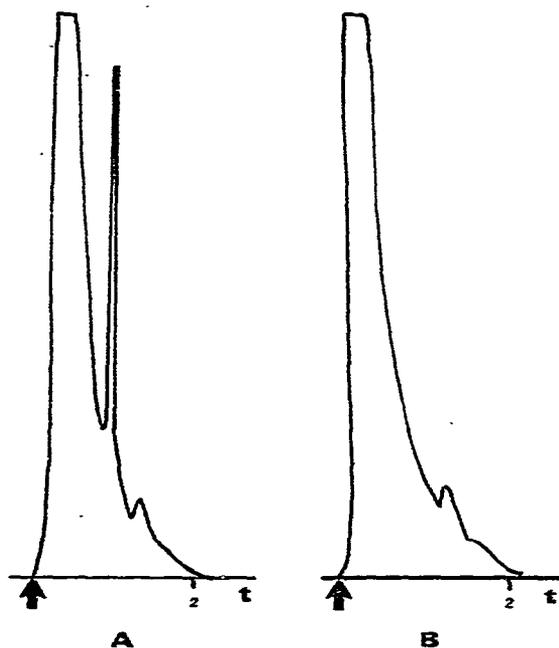


Fig. 1. Chromatogrammes de plasmas: A, Contenant de la Pindione; B, témoin.

TABLEAU I

## RÉSULTATS DE L'ÉTUDE DE REPRODUCTIBILITÉ

$A_x$  = Aire du pic de l'échantillon à doser;  $A_E$  = aire du pic de l'échantillon interne.

	$A_x$						$A_E$
	Pindione (mg/l)			Fluorindione (mg/l)			
	5	10	15	5	10	15	
Moyenne	0.25	0.45	0.78	0.27	0.47	0.78	10.18
Ecart-type	$9.18 \cdot 10^{-2}$	$1.21 \cdot 10^{-2}$	$8.23 \cdot 10^{-2}$	$8.26 \cdot 10^{-2}$	$1.63 \cdot 10^{-2}$	$1.49 \cdot 10^{-2}$	$6.8 \cdot 10^{-2}$

Le Tableau I représente les résultats de 30 dosages effectués sur trois solutions de concentrations différentes. La même solution d'étalon interne a été utilisée, la reproductibilité apparaît satisfaisante.

Les temps de rétention respectifs de la Pindione, de la Fluorindione et de l'étalon interne sont respectivement de 1 min, 1½ min et 2 min.

L'étude de la précision et de la validité du dosage après extraction à partir du plasma a été effectuée à partir de trois plasmas additionnés de quantités croissantes d'anticoagulant. Les Tableaux II et III présentent les résultats obtenus. La reproductibilité est là aussi satisfaisante. Le rendement moyen de l'extraction de la Pindione est de 81.8%, celui de la Fluorindione de 80.6%. Ces résultats sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus lors du dosage de coumariniques dans des conditions similaires<sup>2</sup>.

La validité de cette technique a ensuite été étudiée *in vivo* sur l'animal, afin de s'assurer de son utilité lors d'études cliniques ou pharmacocinétiques. L'activité du médicament a été déterminée parallèlement par mesure du temps de Quick. La Fig. 2 présente les résultats obtenus sur un porc ayant reçu 150 mg de Pindione en IV.

Ces derniers résultats prouvent la validité de cette technique *in vivo*.

TABLEAU II

## DOSAGE DE LA PINDIONE DANS LE PLASMA

$C_i$  = Concentration initiale;  $C_e$  = concentration après extraction;  $R$  = rendement de l'extraction.

$C_i$ (mg/l)	$A_x/A_E$	Ecart-type	$C_e$ (mg/l)	Ecart-type	$R$ (%)
10	0.400	$6.85 \cdot 10^{-3}$	8.14	0.14	81.4
20	0.809	$8.75 \cdot 10^{-3}$	16.58	0.17	82.9
30	1.190	$1.64 \cdot 10^{-3}$	24.33	0.29	81.1

TABLEAU III

## DOSAGE DE LA FLUORINDIONE DANS LE PLASMA

$C_i$  = Concentration initiale;  $C_e$  = concentration après extraction;  $R$  = rendement de l'extraction.

$C_i$ (mg/l)	$A_x/A_E$	Ecart-type	$C_e$ (mg/l)	Ecart-type	$R$ (%)
10	0.270	$1.26 \cdot 10^{-2}$	7.98	0.27	79.8
20	0.470	$1.63 \cdot 10^{-2}$	16.31	0.18	81.55
30	0.780	$1.44 \cdot 10^{-2}$	24.10	0.30	80.33

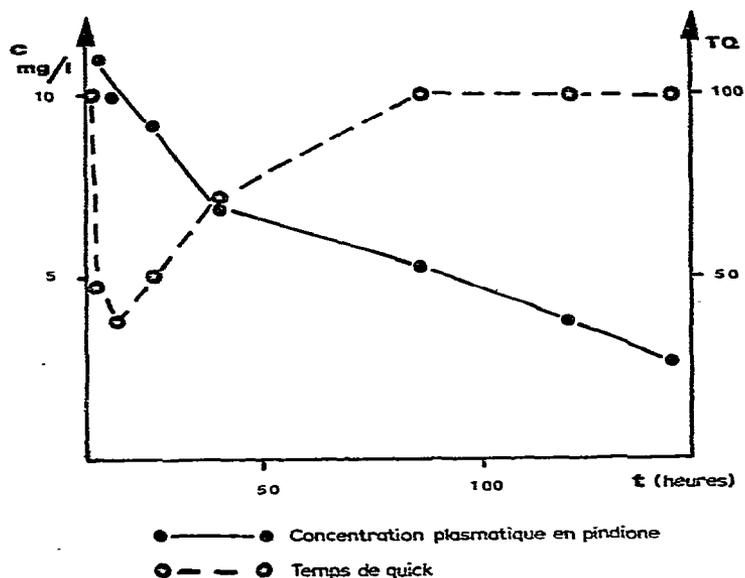


Fig. 2. Evolution de la concentration sanguine en Pindione d'un porc après injection IV de 150 mg de médicament.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 K. K. Midha, J. W. Hubbard, J. K. Cooper et I. J. McGilveray, *J. Pharm. Sci.*, 65 (1976) 387.
- 2 D. G. Kaiser et R. S. Martin, *J. Pharm. Sci.*, 63 (1974) 1579.
- 3 F. W. Deckert, *J. Chromatogr.*, 64 (1972) 355.
- 4 F. W. Deckert, *J. Chromatogr.*, 69 (1972) 201.
- 5 H. Henri et P. Glogner, *Arch. Pharmacol.*, 293 (1976) 183.
- 6 D. E. Mundy, M. P. Quick et A. F. Machin, *J. Chromatogr.*, 121 (1976) 335.
- 7 A. Yacobi, Chi-Ming Lai et G. Levy, *J. Pharm. Sci.*, 64 (1975) 1995.
- 8 B. C. Bosse et R. Vijayvagiya, *J. Pharm. Pharmacol.*, 14 (1962) 58.
- 9 J. A. Schmidt, dans *Application of high-speed liquid chromatography using CSP support*, Wiley, New York, 1971, p. 160.
- 10 E. Jacobsen et K. H. Klevnan, *Anal. Chim. Acta*, 2 (1972) 62.