

CHROM. 11,246

Note

Méthode sensible de dosage de l'acébutolol et de son métabolite N-acétylé dans les milieux biologiques par chromatographie liquide haute performance avec détection de fluorescence

A. ROUX et B. FLOUVAT

Département de Pharmacologie Clinique, Laboratoire de Toxicologie, Hôpital Ambroise Paré, 9 Avenue Charles de Gaulle, 92100 Boulogne (France)

(Reçu le 25 mai 1978)

L'acébutolol est un antagoniste des récepteurs bêta-adrénergiques, doué d'une relative cardiosélectivité^{1,2}. Il est utilisé comme antihypertenseur³, et se montre également efficace dans le traitement des arythmies⁴ et de l'angine de poitrine^{5,6}.

Nous avons précédemment décrit une méthode de dosage spectrofluorimétrique de l'acébutolol⁷, qui a l'inconvénient d'être relativement longue et de doser à la fois la molécule inchangée et certains de ses métabolites, dont le principal N-acétylé s'est révélé pharmacologiquement actif chez l'animal⁸ et existe chez l'homme en quantité supérieure à celle de l'acébutolol quand ce dernier est administré par voie orale^{9,10}.

Les techniques chromatographiques sur couche mince¹¹ ou en phase gazeuse⁹ ont l'inconvénient d'être longues. La technique par chromatographie liquide haute performance (CLHP) de Meffin *et al.*¹² ayant un seuil de détection de 50 ng par prise d'essai, il nous a semblé intéressant de développer une méthode par CLHP spécifique et plus sensible en utilisant les caractéristiques de fluorescence de l'acébutolol et de son métabolite N-acétylé.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Appareillage

Nous avons utilisé un chromatographe en phase liquide Touzart et Matignon (Paris, France) modèle Chromatem 38, équipé d'une pompe Orlita à membrane avec amortisseur de pulsations et d'un injecteur à septum.

La détection est assurée à l'aide d'un spectrofluorimètre (Jobin et Yvon, Paris, France) type JY3, équipé d'une microcuve à circulation de 8 μ l et relié à un enregistreur (Kipp, Emmen, Hollande) type BD 41. L'analyse quantitative est réalisée au moyen d'un intégrateur calculateur (LTT, Paris, France), type Icap 10.

L'extraction des échantillons biologiques est réalisée à l'aide d'un agitateur rectiligne alternatif (Realis, Paris, France), les tubes étant placés en position couchée parallèlement à l'axe d'agitation.

Phase stationnaire

Nous avons utilisé une colonne (15 cm \times 4.7 mm I.D.) remplie de LiChrosorb Si 60, de 5 μ m (Touzart et Matignon).

Réactifs

L'hydroxyde de sodium, l'ammoniaque et le méthanol étaient de qualité R.P. (No. 28 252, 21 188 et 20 847; Prolabo, Paris, France); l'éther diéthylique, le chloroforme et le toluène de qualité Uvasol (No. 930, 2 447 et 8 331; Merck, Darmstadt, R.F.A.); le sulfate de sodium anhydre était de qualité pour analyse (No. 6 649, Merck). Le toluène et le méthanol sont conservés sur sulfate de sodium anhydre. L'acébutolol, chlorhydrate de DL (acétyl-2 butyramido-4 phénoxy)-1 isopropylamino-3 propanol-2, le N-acétyl métabolite, DL (acétyl-2 acétamido-4 phénoxy)-1 isopropylamino-3 propanol-2, et l'étalon interne, DL (acétyl-2 décylamido-4 phénoxy)-1 isopropylamino-3 propanol-2, nous ont été aimablement fournis par les laboratoires Spécia (Paris, France) et May and Baker (Dagenham, Angleterre).

Méthode

Dans des tubes à extraction en verre de 20 ml à bouchon rôdé, on introduit 0.1 ml d'une solution méthanolique à 5 mg/l d'étalon interne, 10 ml d'un mélange chloroforme-éther diéthylique (4:1), 1 ou 2 ml de milieu biologique à doser (plasma ou urine) et 1 ml de NaOH 2 N. Les tubes sont agités pendant 20 min, à raison de 160 vagues/minute. Après centrifugation à 2500 tours /min pendant 15 min à 4°, on enlève le maximum de phase aqueuse à l'aide d'une pipette Pasteur branchée sur une trompe à vide; puis on déshydrate avec 0.5 g environ de sulfate de sodium anhydre; la phase organique est transvasée dans des tubes propres et évaporée à sec à 70° sous courant d'azote. Les parois du tube sont rincées avec 0.5 ml de mélange chloroforme-éther diéthylique (4:1) qui sont ensuite évaporés à sec dans les mêmes conditions.

Après reprise par 35 à 50 μ l de méthanol, on injecte 10 μ l en tête de colonne à l'aide d'une seringue de 25 μ l.

La phase mobile est constituée d'un mélange toluène-méthanol-ammoniaque diluée 1/2 (90:20:1.05), le débit est de 1 ml/min (ce qui correspond à une pression d'environ 45 bars).

La longueur d'onde d'excitation est de 342 nm, celle d'émission de 438 nm.

Pour chaque série de dosages, on extrait simultanément trois plasmas ou urines de sujets non traités auxquels on a ajouté une quantité connue d'acébutolol et de N-acétyl métabolite (0.5 μ g). Les échantillons servent à étalonner l'intégrateur.

L'expression des résultats en molarité s'effectue sachant que pour l'acébutolol 1 mg = 2.976 μ mol et pour le N-acétyl métabolite 1 mg = 3.247 μ mol.

RÉSULTATS

Linéarité

Nous avons ajouté des quantités connues d'acébutolol et de N-acétyl métabolite en solutions aqueuses à du plasma, de l'urine pure ou de l'urine diluée au 1/10ème provenant de sujets non traités. Pour chaque produit, on calcule le rapport *R* de la surface du pic avec celle de l'étalon interne. Si on ajoute à la prise d'essai 0.5 μ g d'étalon interne, il existe une relation linéaire entre la concentration et le rapport *R* jusqu'à 3 μ g extraits (Fig. 1).

En augmentant la quantité d'étalon interne (2.5 μ g), nous avons vérifié la linéarité jusqu'à 10 μ g extraits.

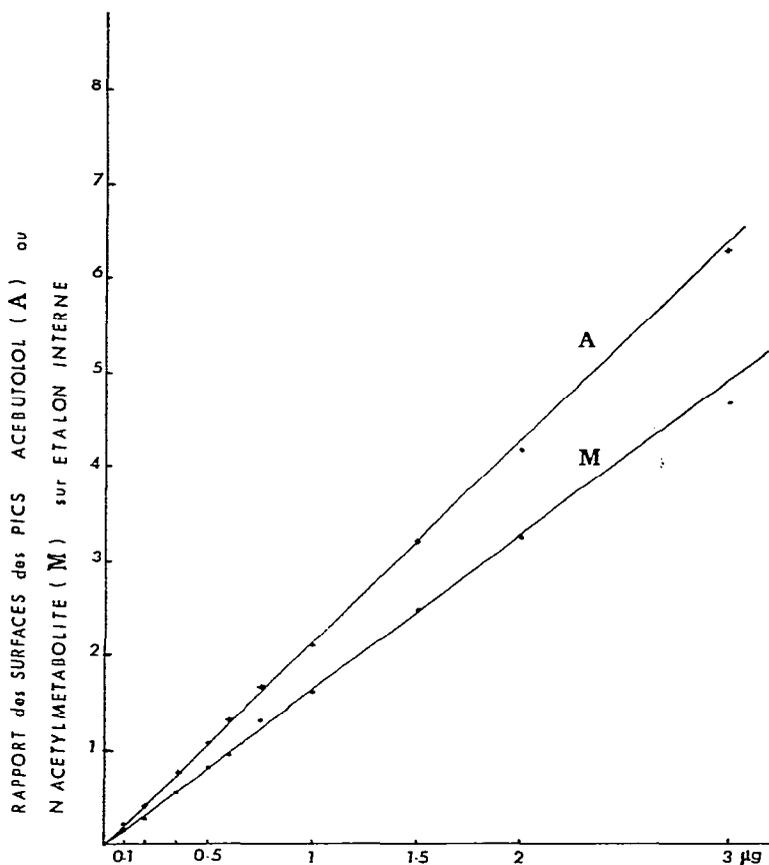


Fig. 1. Gamme d'étalonnage de plasma surchargé en acébutolol (A) et N-acétyl métabolite (M).

Répétabilité et reproductibilité

Répétabilité de l'injection. Nous avons injecté six fois 10 µl d'une solution renfermant 10 mg/l de chaque produit dans le méthanol, et trouvé des coefficients de variation de 1.51% pour l'acébutolol et de 1.36% pour son métabolite.

Répétabilité de la méthode. Des solutions plasmatiques à 0.1, 0.5 et 1 mg/l ont été extraites plusieurs fois le même jour; les coefficients de variation sont respectivement: 3.5% ($n = 5$), 3.6% ($n = 10$) et 2.4% ($n = 5$) pour l'acébutolol; 7.2% ($n = 6$), 5.6% ($n = 10$) et 7.2% ($n = 5$) pour son métabolite.

Reproductibilité. Des solutions plasmatiques à 0.1, 0.5 et 1 mg/l ont été extraites plusieurs jours de suite. Les résultats des quantités trouvées (moyenne, déviation standard et coefficient de variation) sont dans le Tableau I.

Limite de détection

La quantité extraite minimum détectable est de 10 ng. Quand la lampe du spectrofluorimètre est neuve, elle peut descendre à 5 ng.

TABLEAU I

REPRODUCTIBILITÉ DE L'EXTRACTION DE SOLUTION PLASMATIQUE, PLUSIEURS JOURS DE SUITE: RÉSULTATS DES QUANTITÉS RETROUVÉES

 \bar{m} = moyenne; S.D. = déviation standard; C.V. = coefficient de variation.

Quantité ajoutée (ng/ml)	Quantité mesurée (ng/ml)				N-acétyl métabolite			
	\bar{m}	S.D.	C.V. (%)	n	\bar{m}	S.D.	C.V. (%)	n
100	100	7.79	7.79	5	103.5	9.98	9.65	5
500	500.5	19.2	3.84	10	498.4	37.9	7.61	10
1000	980.4	27.7	2.83	5	992.8	55.5	5.59	5

Rendement

Le rendement de la méthode est de $93.4 \pm 3.4\%$ pour l'acébutolol et de $87.1 \pm 4.1\%$ pour son métabolite ($n = 10$).

Chromatogrammes

Sur la Fig. 2, nous présentons des chromatogrammes d'un plasma témoin, d'une urine témoin, d'un plasma témoin surchargé à $0.5 \mu\text{g}$ en acébutolol et N-acétyl métabolite, et d'un plasma d'un sujet traité par un comprimé à 200 mg d'acébutolol 12 h après l'absorption orale.

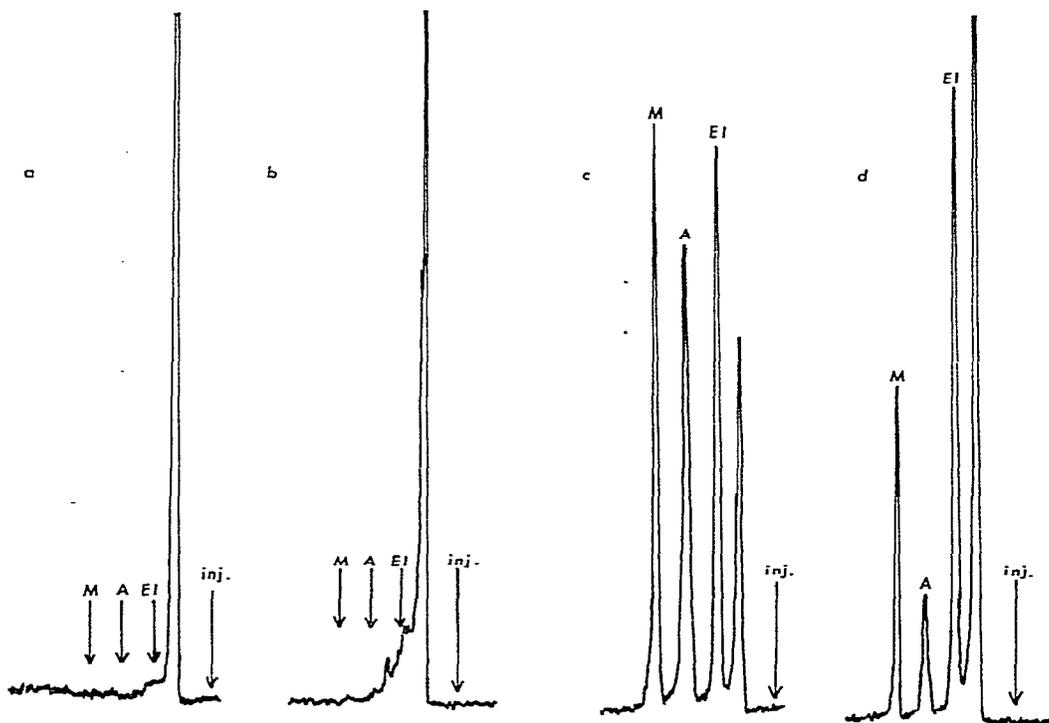


Fig. 2. Chromatogrammes (a) d'un plasma témoin, (b) d'une urine témoin, (c) d'un plasma témoin surchargé à $0.5 \mu\text{g}$ en acébutolol (A) et N-acétyl métabolite (M), (d) d'un plasma d'un sujet traité par un comprimé à 200 mg d'acébutolol (Sectral^o, Spécia, Paris, France) 12 h après la prise orale. Temps de rétention: EI = 190 sec, A = 290 sec, M = 390 sec.

DISCUSSION

La méthode par chromatographie sur couche mince de Steyn¹¹ avec lecture de la fluorescence des spots par comparaison avec la quinidine utilisée comme étalon interne, nécessite un appareillage très particulier; la lecture des chromatogrammes est longue et délicate. Elle présente une limite de détection de 100 ng et est inapplicable chez des malades soumis à un traitement associant l'acébutolol et la quinidine.

La méthode par chromatographie en phase gazeuse⁹ demande une extraction complexe et nécessite une double dérivation (triméthylsilylation et trifluoroacétylation), les procédés classiques utilisés pour d'autres bêta-bloquants (trifluoroacétylation simple) ne donnant pas de bons résultats avec l'acébutolol. De plus cette méthode présente une mauvaise reproductibilité pour le métabolite (C.V. = 6.2 à 20%).

La technique par chromatographie liquide décrite par Meffin *et al.*¹² utilise une double extraction et un chromatographe avec gradient d'éluion équipé d'une colonne à phase inverse et d'un détecteur UV. La limite de détection est de 50 ng extraits.

Le choix d'un spectrofluorimètre comme détecteur nous a permis d'atteindre une limite de détection de 5 ng extraits, tout en demeurant linéaire jusqu'à 3000 ng. L'utilisation d'une chromatographie d'adsorption et d'une simple extraction suivie de l'évaporation du solvant permet d'obtenir un excellent rendement (environ 90%) et une bonne répétabilité (3.6% pour l'acébutolol et 5.6% pour son métabolite).

À des plasmas de malades traités par l'acébutolol, nous avons appliqué simultanément la technique spectrofluorimétrique⁷ et celle décrite ici. On constate que la

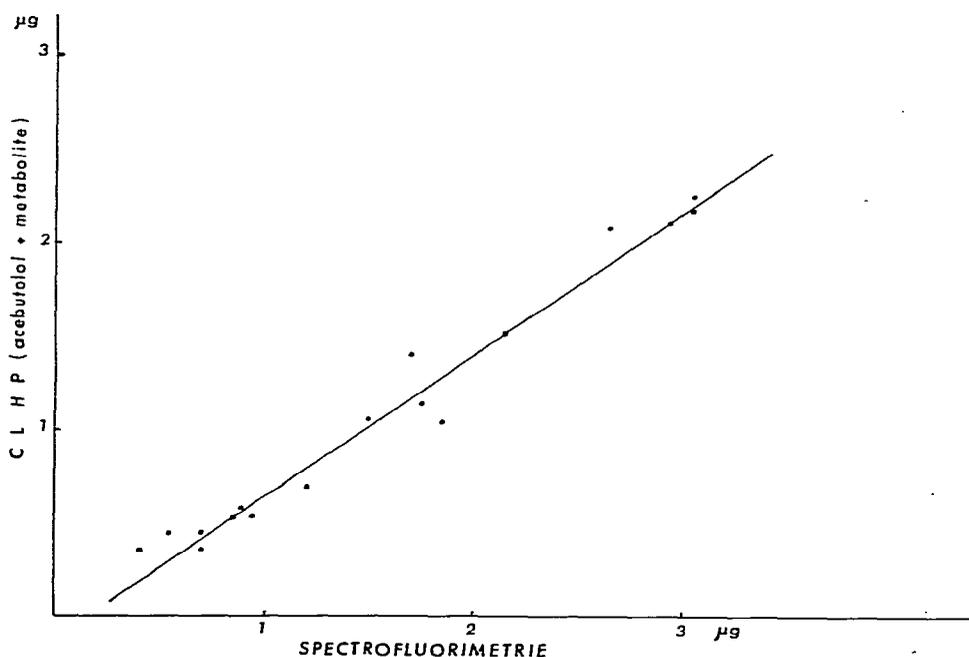


Fig. 3. Comparaison des résultats obtenus en pratiquant, sur les mêmes plasmas de sujets traités par l'acébutolol, la méthode spectrofluorimétrique non spécifique⁷ et celle par CLHP décrite ici. L'équation de la droite de régression est $Y = 0.758 X - 0.111$; $r^2 = 0.983$, $p < 0.001$.

méthode antérieurement décrite donne des résultats toujours plus élevés que la CLHP, pour laquelle les résultats sont exprimés en somme acébutolol + N-acétyl métabolite. Il existe toutefois une excellente corrélation entre les deux techniques ($r^2 = 0.983$, $p < 0.001$) (Fig. 3).

On peut supposer que d'autres métabolites conduisent par hydrolyse chlorhydrique au dérivé 4 aminé qui est condensé avec le *p*-nitrosonaphtol pour donner un dérivé fluorescent. Ceux-ci s'avèreraient alors présents dans le plasma.

La méthode que nous présentons ici, à la fois rapide et précise, nous a permis, à ce jour, de réaliser plus de 1500 dosages.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Docteur A. Morinière des Laboratoires Spécia (France) et le Docteur R. Templeton de May and Baker Ltd. (Angleterre) de nous avoir fourni les produits purs. Nous remercions également Madame A. Stheneur pour sa collaboration technique.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 R. H. Briant, C. T. Dollery, T. Fenyvesi et C. F. George, *Brit. J. Pharmacol.*, 49 (1973) 106.
- 2 W. P. Leary, A. J. Coleman et A. C. Asmal, *S. Afr. Med. J.*, 47 (1973) 1245.
- 3 M. Lucsko, M. Chaignon et J. Guedon, *Nouv. Presse Méd.*, 4 (1975) 21.
- 4 P. Biron, A. Proulx, L. Lapointe, R. Nadeau et G. Tremblay, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 8 (1975) 11.
- 5 B. S. Lewis, A. Bakst, D. Kitchiner et M. S. Gotsman, *S. Afr. Med. J.*, 47 (1973) 1455.
- 6 P. Biron et G. Tremblay, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 8 (1975) 15.
- 7 A. Roux, B. Flouvat et P. Delaveau, *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 33 (1975) 281.
- 8 R. F. Collins, *Nouv. Presse Méd.*, 4 (1975) 3223.
- 9 P. F. Meffin, S. A. Harapat et D. C. Harrison, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 15 (1976) 31.
- 10 A. H. Gradman, R. A. Winkle, J. W. Fitzgerald, P. F. Meffin, J. Stoner, P. A. Bell et D. C. Harrison, *Circulation*, 55 (1977) 785.
- 11 J. M. Steyn, *J. Chromatogr.*, 120 (1976) 465.
- 12 P. J. Meffin, S. R. Harapat, Y. G. Yee et D. C. Harrison, *J. Chromatogr.*, 183 (1977) 183.