

CHROM. 11,762

Note

Dosage dans les milieux biologiques d'un nouveau bêta-bloquant, l'aténolol, par chromatographie liquide haute performance

S. DECOURT et B. FLOUVAT*

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

(Reçu le 18 janvier 1979)

L'aténolol, (I.C.I. 66082, Tenormine*) ou 4-(2-hydroxy 3-isopropylamino-propoxy) phenylacetamine est un nouvel antagoniste des récepteurs β -adrénergiques, agissant préférentiellement au niveau des récepteurs β -adrénergiques cardiaques, sans bloquer les récepteurs vasculaires périphériques; il est dépourvu d'activité stabilisatrice de membrane et d'activité sympathomimétique intrinsèque¹⁻⁷. Il est plus particulièrement utilisé dans le traitement de l'hypertension artérielle⁸⁻¹¹.

Des méthodes par chromatographie en phase gazeuse^{12,13} et par chromatographie liquide haute performance¹⁴ ont été décrites dans les milieux biologiques ainsi qu'une méthode de spectrofluorimétrie¹⁵. Ces méthodes nécessitent de très nombreuses manipulations ou manquent de sensibilité.

Nous avons décrit une méthode spectrofluorimétrique¹⁶ sensible (limite de détection 10 ng/ml), il nous a semblé intéressant de développer une méthode par chromatographie liquide haute performance (CLHP) associant une bonne sensibilité à une grande spécificité.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Appareillage

Nous avons utilisé un chromatographe en phase liquide (Touzard et Matignon, Paris, France), modèle Chromatem 380, équipé d'une pompe à piston Altex, avec amortisseur de pulsations et d'une vanne d'injection Rhéodyne modèle 7120 munie d'une boucle de 100 μ l.

La détection est assurée à l'aide d'un spectrophotomètre Schoeffel (Cunow, Paris, France), type SF 770, équipé d'une microcuve à circulation de 5 μ l et relié à un enregistreur (Kipp, Hollande) type BD 41. L'analyse quantitative est réalisée au moyen d'un intégrateur calculeur (LTT, Paris, France) type Icap 10.

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

* À qui la correspondance doit être adressée.

* Adresse courrier: Laboratoire de Toxicologie, Hôpital A. Paré, 9 avenue Charles de Gaulle 92100 Boulogne, France.

Phase stationnaire

Nous avons utilisé une colonne (15 cm × 4.7 mm D.I.) remplie de LiChrosorb Si 60, de 5 µm (Touzard et Matignon).

Réactifs

L'hydroxyde de sodium, l'ammoniaque, le méthanol, le carbonate disodique et le carbonate monosodique étaient de qualité RP (no. 28252, 21188, 20847, 27768 et 27778, Prolabo, Paris, France). Le butanol-1, le dichlorométhane et le chloroforme de qualité Uvasol (no. 1993, 6048 et 2447, Merck, Darmstadt, R.F.A.); le sulfate de sodium anhydre était de qualité pour analyse (no. 6649 Merck). La solution tampon de pH 10.6 a été obtenue par mélange de 21.3 ml de solution de carbonate disodique 1 M et de 3.8 ml de solution de carbonate monosodique 1 M en complétant à 100 ml avec de l'eau distillée. Le méthanol et le chloroforme sont conservés sur sulfate de sodium anhydre. L'aténolol ou 4-(2-hydroxy-3-isopropylaminopropoxy) phenylacetamide et l'étalon interne le practolol ou 4(2-hydroxy-3-isopropylaminopropoxy) acétanilide nous ont été aimablement fournis par les Laboratoires I.C.I. Pharma (Enghien, France).

Méthode

Dans des tubes à extraction en verre de 45 ml à bouchon rôdé, on introduit 0.1 ml de solution aqueuse d'étalon interne à 2.5 mg/l, 1 ou 2 ml de milieu biologique à doser (plasma ou urine diluée au 1/10), 0.2 ml de NaOH 0.5 N, 1.5 ml de solution tampon de pH 10.6 et 15 ml d'un mélange dichlorométhane-butanol-1 (95:5). Les tubes sont agités pendant 20 min, à raison de 160 va-et-vient/min. Après centrifugation à 1500 g 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 1 g environ de sulfate de sodium anhydre; on centrifuge 2 min à 1500 g à 4°. La phase organique est transvasée dans des tubes en verre propres de 20 ml et évaporée à sec, en augmentant progressivement la température de 50° à 70°, sous courant d'azote. Les parois des tubes sont rincées avec 0.5 ml de dichlorométhane qui sont ensuite évaporés à sec sous courant d'azote. Après reprise par 125 µl de mélange chloroforme-méthanol (6:4), on injecte 100 µl en tête de colonne à l'aide d'une seringue de 250 µl. La phase mobile est constituée d'un mélange chloroforme-méthanol-ammoniaque diluée au 1/2 (60:40:2.08 ml), le débit est 0.9 ml/min (ce qui correspond à une pression d'environ 75 bars). La longueur d'onde est de 275 nm. Pour chaque série de dosages, on extrait simultanément 3 plasmas ou urines au 1/10 de sujets non traités auxquels on a ajouté une quantité connue d'aténolol (0.5 µg). Ces échantillons servent à étalonner l'intégrateur.

La Fig. 1 montre les chromatogrammes de plasma et d'urine témoins ainsi que de plasma additionné d'aténolol et de sujets traités. Le pic de l'aténolol est bien séparé de celui du practolol, étalon interne. Dans certains plasmas, on observe un pic non identifié ayant un temps de rétention de 16 min. L'expression des résultats en molarité s'effectue sachant que pour l'aténolol 1 mg = 3.759 µmol.

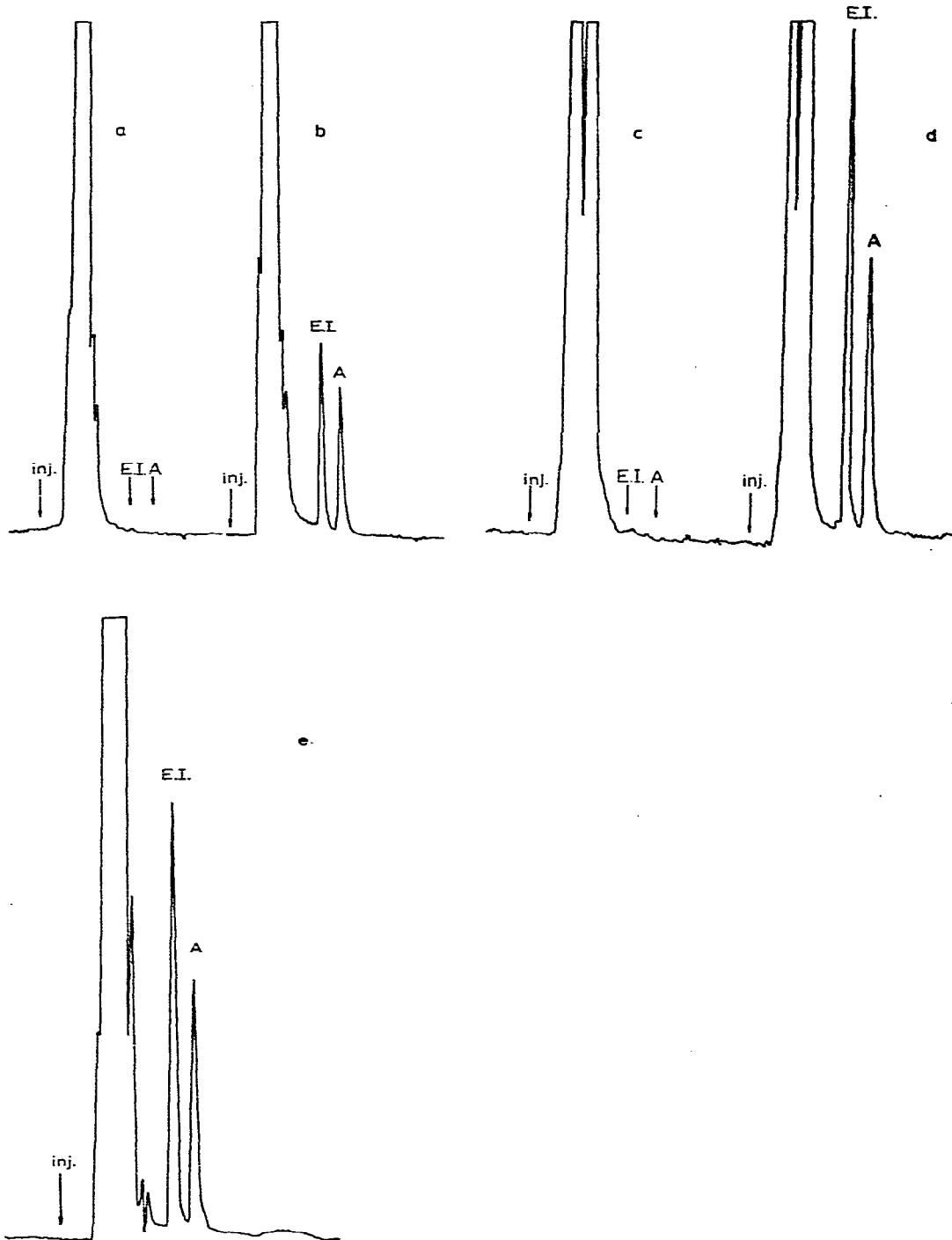


Fig. 1. Chromatogrammes (a) d'un plasma témoin, (b) d'un plasma témoin surchargé à $0.5 \mu\text{g}$ en aténolol (A), (c) d'une urine témoin au $1/10^{\text{e}}$, (d) d'une urine surchargée à $2 \mu\text{g}$ en aténolol, (e) d'un plasma de sujet traité par deux comprimés à 100 mg d'aténolol 4 h après la prise orale. Temps de rétention: E.I. = 348 sec, A = 425 sec.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Linéarité

Nous avons ajouté des quantités connues d'aténolol en solution aqueuse à du plasma ou de l'urine diluée au 1/10 provenant de sujets non traités.

On calcule le rapport R de la surface du pic de l'aténolol avec celle de l'étalon interne. L'analyse de 3 plasmas auxquels on a ajouté 25, 50, 100, 200, 250, 400, 500 $\mu\text{g/l}$ d'aténolol pour 250 ng d'étalon interne, montre qu'il existe une relation linéaire entre la concentration et le rapport R ($r = 0.9977$, $y = 1.5617x - 0.0084$). L'analyse de 3 plasmas additionnés de 0.5, 1, 2, 3. 4 et 5 mg/l d'aténolol pour 2 μg d'étalon interne montre qu'il existe également une relation linéaire entre la concentration et le rapport R jusqu'à 5 mg/l extraits ($r = 0.9981$, $y = 0.2246x - 0.0118$).

Répétabilité et reproductibilité

Répétabilité de l'injection. Nous avons injecté 6 fois 100 μl d'une solution renfermant 5 mg/l d'aténolol et 2.5 mg/l d'étalon interne dans le méthanol et trouvé le coefficient de variation de 2.2%.

Répétabilité de la méthode. 2 ml de solutions plasmatiques à 0.25, 0.5 et 1 mg/l ont été extraits plusieurs fois le même jour; les résultats sont représentés dans le Tableau I (moyenne, déviations standard, coefficient de variation).

TABLEAU I
RÉPÉTABILITÉ ET PRÉCISION DU DOSAGE DE L'ATÉNOLOL PAR CLHP

Quantités ajoutées (μg)	n	Quantités trouvées (μg)	S.D.	C.V.
0.500	10	0.500	0.017	3.50
1.000	10	1.000	0.024	2.40
2.000	10	1.999	0.087	4.35

Reproductibilité. Des solutions plasmatiques à 0.5 mg/l ont été extraites plusieurs jours de suite ($n = 15$), la valeur trouvée a été de 0.500 ± 0.027 mg/l, représentant un coefficient de variation de 5.58%.

Limite de détection

La quantité extraite minimale détectable est de 5 ng.

Rendement

Le rendement de la méthode est 76% ($n = 8$).

DISCUSSION

Les méthodes par chromatographie en phase gazeuse^{12,13} sont complexes et nécessitent une dérivation par l'anhydride heptafluorobutyrique pour permettre la détection de l'aténolol par capture d'électrons. Nous utilisons une simple extraction

à pH 10.6 suivie de l'évaporation du solvant. Nous avons antérieurement démontré que ce pH correspondait à l'optimum du rendement d'extraction¹⁶, le fait de n'avoir plus qu'une simple extraction, nous permet d'améliorer le rendement (76%) par rapport à celui observé lorsqu'il faut réextraire l'aténolol par une solution aqueuse acide (70%).

Weddle *et al.*¹⁴ utilisent une chromatographie sur colonne à phase inverse et un détecteur de fluorescence, ce qui nécessite ainsi une double extraction préalable de l'aténolol. En utilisant une chromatographie d'adsorption sur colonne de silice de 5 μm et un détecteur UV, nous obtenons une sensibilité comparable (limite de détection 5 ng extraits) et une bonne répétabilité (2.4% pour une concentration plasmatique de 0.5 mg/l). Cette méthode donne une relation linéaire jusqu'à 5 mg/l d'aténolol, ce qui permet d'effectuer les dosages plasmatiques même chez les sujets insuffisants rénaux.

À des plasmas de malades à fonction rénale normale ou insuffisants rénaux, traités par une dose unique d'aténolol, nous avons appliqué simultanément la technique spectrofluorimétrique¹⁶ et celle décrite ici. On constate qu'il existe une excellente corrélation entre les deux techniques ($r = 0.971$, $n = 27$, $p < 0.001$), Fig. 2. La méthode antérieurement décrite donne des résultats légèrement supérieurs à ceux obtenus par CLHP, en moyenne de 15%, cet écart peut être attribué à l'interférence d'un métabolite.

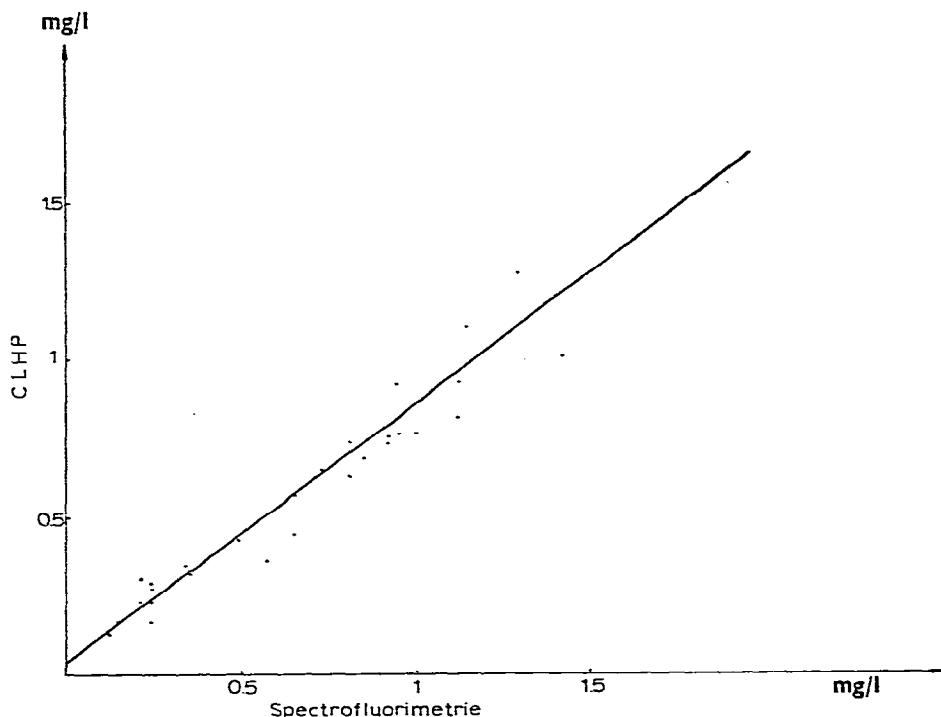


Fig. 2. Comparaison des résultats obtenus en pratiquant, sur les mêmes plasmas de sujets traités par l'aténolol, la méthode spectrofluorimétrique et celle par CLHP. L'équation de la droite de régression est: $y = 0.8195 x + 0.0363$; $r = 0.971$; $p < 0.001$; $n = 27$.

La méthode que nous présentons ici, à la fois rapide et précise, nous a permis à ce jour de réaliser plus de 1000 dosages, en particulier chez des sujets insuffisants rénaux hémodialysés.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 A. M. Barret, J. Carter, J. D. Fitzgerald, R. Hull et D. Le Count, *Brit. J. Pharmacol.*, 48 (1973) 340 P.
- 2 R. Hainsworth, F. Karim et J. B. Stoker, *Brit. J. Pharmacol.*, 48 (1973) 342 P.
- 3 J. D. Harry, M. F. Knapp et R. J. Linden, *Brit. J. Pharmacol.*, 48 (1973) 340 P.
- 4 R. Hainsworth, F. Karim et J. B. Stoker, *Brit. J. Pharmacol.*, 51 (1974) 161.
- 5 J. D. Harry, M. F. Knapp et R. J. Linden, *Brit. J. Pharmacol.*, 51 (1974) 169.
- 6 G. E. Marlin, C. R. Kumana, C. M. Kaye, D. M. Smith et P. Turner, *Brit. J. Clin. Pharmacol.*, 2 (1975) 151.
- 7 J. Conway, J. D. Fitzgerald, J. McAinsh, D. J. Rowlanas et W. T. Simpson, *Brit. J. Clin. Pharmacol.*, 3 (1976) 267.
- 8 M. G. Myers, G. R. J. Lewis, J. Steiner et C. T. Dollery, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 19 (1976) 502.
- 9 L. Hansson, H. Alberg, S. Jameson, B. Kariberg et R. Malmcrona, *Acta Med. Scand.*, 194 (1973) 549.
- 10 J. Sassard, N. Pozet, M. Vincent et P. Y. Zech, *N. Engl. J. Med.*, 294 (1976) 787.
- 11 A. Amery, L. Billiet, J. V. Joossens, J. Meekers, T. Reybrouk et W. van Miechen, *Acta Clin. Belg.*, 28 (1973) 358.
- 12 J. O. Malbica et K. R. Monson, *J. Pharm. Sci.*, 64 (1975) 1992.
- 13 B. Scales et P. B. Copsey, *J. Pharm. Pharmacol.*, 27 (1975) 430.
- 14 O. H. Weddle, E. N. Amick et W. D. Mason, *J. Pharm. Sci.*, 67 (1978) 1033.
- 15 C. M. Kaye, *Brit. J. Clin. Pharmacol.*, 1 (1974) 84.
- 16 B. Flouvat, M. Bazin, M. Luscko, A. Roux et J. Guedon, *Ann. Biol. Clin.*, 36 (1978) 339.