

CHROM. 11,769

## DOSAGE DES MÉDICAMENTS PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE *IN SITU* DES CHROMATOGRAMMES EN VUE DE LEUR ÉTUDE PHARMACOCINÉTIQUE

### I. SULPIRIDE ET AUTRES BENZAMIDES, VINCAMINE, NAFTAZONE

F. BRESSOLLE, J. BRES et S. BRUN

*Laboratoire de Chimie Analytique, Faculté de Pharmacie, Avenue Charles-Flahault, 34060 Montpellier (France)*

et

E. RECHENCQ

*Laboratoire de Pharmacodynamie, Faculté de Pharmacie, Avenue Charles-Flahault, 34060 Montpellier (France)*

(Reçu le 25 juillet 1978; manuscrit modifié reçu le 22 janvier 1979)

---

#### SUMMARY

*Quantitative determination of drugs by in situ spectrophotometry of chromatograms for pharmacokinetic studies. I. Sulpiride and other benzamides, vincamine, naftazone.*

Assays are proposed for sulpiride and other benzamides, vincamine and naftazone in plasma (or blood) and urine with direct UV reflectance spectrophotometry on thin-layer chromatography (TLC) at 293, 280 and 270 nm respectively. Urine samples are applied directly on TLC along with a calibration curve on each plate. Plasma (or total blood) samples are extracted, and an internal standard is added before application; slopes of the obtained calibration curves do not change significantly from plate to plate, thus allowing several determinations on the same plate.

The sensitivity is 2  $\mu\text{g}$  in a 1-ml sample (amount applied 30 ng) for sulpiride and related compounds and about the same for vincamine. Naftazone is determined in plasma with simultaneous reflectance and transmittance spectrophotometric measurements at 520 nm on chromatoplates sprayed with lead acetate, the sensitivity reached is 10 ng in a 1-ml sample (amount applied 0.5 ng).

For all drugs studied, the proposed techniques are specific, reliable and sensitive enough and can be used to perform pharmacokinetic studies in human or in animal after administration of doses in the therapeutic range.

---

#### INTRODUCTION

L'interprétation des données expérimentales acquises au cours d'une étude pharmacocinétique: variations de la concentration en médicament dans le plasma en fonction du temps et du pourcentage de la dose administrée, retrouvé dans les urines soit sous forme inchangée, soit sous forme de métabolites, n'est en toute rigueur

possible que si l'on peut disposer d'une technique analytique permettant de doser sélectivement le médicament sous forme inchangée. Les propriétés physio-chimiques des métabolites formés étant souvent proches de celles du médicament administré, la technique utilisée pour le dosage devra comporter une phase de séparation avec un haut pouvoir de résolution. Cette séparation préalable permet en outre d'éliminer des produits se trouvant naturellement dans les milieux biologiques, qui peuvent soit interférer avec les produits à doser, soit donner des blancs élevés.

Les moyens de séparation actuellement utilisés sont pour la plupart des procédés chromatographiques: chromatographie sur colonne de type gaz-liquide (GLC), ou de type liquide-liquide (LC ou HPLC) et chromatographie sur couche mince (TLC).

En GLC ou en HPLC les séparations sont suivies d'une détermination quantitative, la sensibilité de la méthode, dépendant principalement du système de détection utilisé, en TLC ces déterminations quantitatives peuvent être faites soit après élution, soit par spectrophotométrie directe des chromatogrammes.

Cette dernière méthode se prête bien au dosage des médicaments en milieu biologique<sup>1-14</sup>, elle a l'avantage de permettre de doser certains métabolites et le médicament inchangé sur une même plaque chromatographique<sup>2,3,6,11,13,14</sup> en utilisant soit un système de détection différent<sup>14</sup> soit pour la migration des mélanges de solvants de polarités différentes lorsque les métabolites formés sont pas trop différents du produit administré<sup>11</sup>.

La reproductibilité des dosages est nettement améliorée par l'utilisation d'un étalon interne<sup>5,6,11,12,15</sup> qui n'est cependant pas encore aussi systématique qu'en GLC.

Nous avons étudié les possibilités apportées par la spectrophotométrie *in situ* des chromatogrammes au dosage du sulpiride et de molécules appartenant également à la série des benzamides, de la vincamine et de la naftazone, et éventuellement de leurs métabolites, en milieu biologique. La séparation par chromatographie sur couche mince semblait particulièrement bien adaptée à ces molécules<sup>10,16</sup> dont nous devions réaliser l'étude pharmacocinétique et la détermination de la biodisponibilité après leur administration au chien ou à l'homme à des doses aussi proches que possible de celles utilisées en thérapeutique.

Le dosage du sulpiride en milieu biologique a été fait jusqu'ici soit par colorimétrie<sup>16</sup>, soit par spectrophotométrie<sup>16</sup>, soit par spectrofluorimétrie<sup>17</sup>; toutes ces méthodes présentent le risque de doser simultanément le sulpiride et des métabolites du sulpiride, la méthode spectrofluorimétrique donne quant à elle des blancs élevés<sup>17</sup>; une étude récente a montré que la spectrophotométrie par réflexion en inhibition de fluorescence après séparation chromatographique sur couche mince permettait d'atteindre la sensibilité requise pour la réalisation d'une étude pharmacocinétique<sup>10</sup>. Des essais préliminaires nous ayant montré d'une part que la spectrophotométrie par réflexion dans l'ultraviolet (UV) conduit à une meilleure sensibilité que la technique par inhibition de fluorescence, et d'autre part que l'interférence des substances normalement présentes dans les milieux biologiques est moindre dans ce cas, nous avons retenu cette méthode pour le dosage du sulpiride et des molécules appartenant également à la série des benzamides.

La vincamine est dosée dans le plasma par chromatographie en phase gazeuse après extraction et dérivation<sup>18-20</sup> avec une très bonne sensibilité, bien que moins

sensible nous avons pu employer la spectrophotométrie par réflexion dans l'UV pour le dosage de la vincamine dans le sang total.

Pour le dosage de la naftazone nous aurions pu utiliser comme précédemment pour le sulpiride et la vincamine, la spectrophotométrie par réflexion dans l'UV, mais en raison de la présence dans l'extrait obtenu à partir du plasma d'une substance migrant avec le même  $R_f$  dans tous les mélanges solvants étudiés<sup>11</sup> et absorbant à la même longueur d'onde, nous avons été amené à préconiser une technique par spectrophotométrie des chromatogrammes dans le visible après révélation par l'acétate neutre de plomb et formation d'un complexe coloré de type chélate.

Dans ce travail nous décrivons les méthodes employées pour le dosage de chacune des molécules étudiées et nous montrons qu'elles peuvent être appliquées à des études pharmacocinétiques par leur spécificité, leur reproductibilité et leur sensibilité.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Réactifs et produits de référence*

Le sulpiride ou N-[(éthyl-1-pyrrolidinyl-2) méthyl]-méthoxy-2-sulfamoyl-5-benzamide, et les produits apparentés: TER 1546 ou N-[(méthyl-1-pyrrolidinyl-2)-méthyl]-méthoxy-2-sulfamoyl-5-benzamide et GRI 1665 ou N-[(propyl-1 pyrrolidinyl-2)méthyl]-méthoxy-2-sulfamoyl-5-benzamide, nous ont été gracieusement fournis par le laboratoire Delagrangé (Paris, France).

La naftazone, ou semicarbazone de la naphthoquinone-1,2, nous a été gracieusement fournie par la Société S.E.R.E.S.C.I. (Bruxelles, Belgique).

La théophylline et la strychnine qui seront utilisées comme étalons internes, ainsi que tous les produits chimiques utilisés, sont des produits purs pour analyse. Tous les solvants utilisés ont été redistillés avant leur emploi.

Ne disposant pas de matière première, la mise au point du dosage de la vincamine ou 14,15-dihydro-14- $\beta$ -hydroxy-14- $\beta$ -acétoxy(3 $\alpha$ , 16 $\alpha$ )éburnaménine, a été effectué en utilisant comme produit de référence le soluté injectable de Pervincamine®, titrant 15 mg pour 3 ml, des laboratoires Dausse (Paris, France).

### *Matériel divers*

Spectrophotomètre chromatographique Zeiss PMQ II, les conditions d'enregistrement des spots pour chacune des molécules étudiées sont les suivantes: sensibilité 10 pour les mesures en réflexion diffuse, 1 pour les mesures en réflexion transmission simultanées; atténuation II; stabilité III; vitesse de la plaque 50 mm/min; vitesse de déroulement du papier de l'enregistreur: 60 mm/min. Les longueurs d'onde de mesure sont données sous les tableaux de résultats correspondants à chacune des molécules étudiées.

Intégrateur de pic, Minigrator, Intersmat; l'intégrateur déclenché au même moment que l'enregistreur nous donne directement la surface intégrée de chacun des pics enregistrés.

Plaques Merck (20  $\times$  20 cm) (Réf. 5721) recouvertes de gel de silice G de 0.25 mm d'épaisseur sur support de verre, sans indicateur de fluorescence.

Microseringues Hamilton de 10  $\mu$ l gradués par 0.1  $\mu$ l.

### *Dosage du sulpiride et du produit TER 1546 dans le plasma*

Dans des tubes à centrifuger en verre, introduire 2, 3 ou 4 ml de plasma à doser, de l'eau distillée q.s.p. 4 ml, 2 g de sulfate d'ammonium et 0.8 ml d'un tampon pH 10 (Tampon Jensen: 3.754 g glycocolle, 37 ml 1 N NaOH, eau q.s.p. 1 l). Agiter. Laisser en contact 3 min, extraire par 20 ml de chloroforme. Centrifuger. Prélever 15 ml de phase organique, porter dans une "capsule antigrimpante" contenant 0.5 ml d'une solution de produit GRI 1665, étalon interne, à 0.02 mg/ml préparée extemporanément à partir d'une solution mère à 1 mg/ml dans l'éthanol absolu.

Abandonner à la température ambiante jusqu'à réduction du volume à 2 ml environ. Transvaser dans des tubes à hémolyse en verre et laisser le solvant s'évaporer à sec. Reprendre le résidu par environ 0.3 ml de chloroforme et déposer sur la plaque Merck 10  $\mu$ l de cette solution.

Introduire la plaque dans une cuve à chromatographie saturée (2 h) par le mélange acétone-n-butanol-eau distillée-ammoniacque (66:30:3:1).

Après développement du chromatogramme, sécher la plaque et procéder à l'enregistrement photodensitométrique, en réflexion diffuse à 293 nm, des spots correspondant au médicament et à l'étalon interne.

Établir le rapport *R* des surfaces intégrées relatives à ces spots.

*Droite d'étalonnage.* À quatre échantillons de 2 ml d'un plasma témoin, ajouter respectivement 0.1, 0.2, 0.4 et 0.6 ml d'une solution de sulpiride (ou de produit TER 1546) à 0.1 mg/ml préparée extemporanément à partir d'une solution mère à 1 mg/ml dans l'eau distillée, et suivre le mode opératoire adopté pour le plasma à doser. Les éléments de la gamme d'étalonnage sont déposés simultanément sur la plaque avec les échantillons de plasma à doser.

### *Dosage de la vincamine dans le sang total*

Dans des tubes à centrifuger en verre, introduire 1, 2, 3, 4 ou 5 ml de sang à doser, 2 ml d'acide trichloracétique à 50% (v/v); laisser en contact 5 min. Ajouter 2 ml de 4 N NaOH. Extraire par 20 ml de chloroforme. Centrifuger. Prélever 15 ml de phase organique, porter dans une "capsule antigrimpante" contenant 0.2 ml de solution de strychnine, étalon interne, à 0.1 g/l dans le chloroforme. Abandonner à la température ambiante jusqu'à réduction du volume à 2 ml environ. Transvaser dans des tubes à hémolyse en verre et laisser le solvant s'évaporer à sec. Reprendre le résidu par environ 0.3 ml de chloroforme et déposer sur plaque Merck 10  $\mu$ l de solution chloroformique. Introduire la plaque dans une cuve à chromatographie saturée (2 h) par le mélange chloroforme-méthanol (90:10). Après développement du chromatogramme, sécher la plaque et procéder à l'enregistrement photodensitométrique en réflexion diffuse à 280 nm, des spots correspondant à la vincamine et à l'étalon interne.

Établir le rapport *R* des surfaces intégrées relatives à ces spots.

*Droite d'étalonnage.* À trois échantillons de 2 ml d'un sang témoin, ajouter respectivement 0.05, 0.1 et 0.15 ml de solution de vincamine à 0.1 g/l préparée extemporanément à partir d'une solution mère à 5 mg/ml dans l'eau distillée et suivre le mode opératoire adopté pour le sang à doser. Ces trois échantillons étalons sont déposés sur la plaque en même temps que les échantillons à doser.

### *Dosage de la naftazone dans le plasma*

Dans des tubes à centrifuger en verre, introduire 2, 4, 5 ou 7 ml de plasma

à doser, de l'eau distillée q.s.p. 7 ml et 5 g de sulfate d'ammonium. Laisser en contact 5 min. Extraire en agitant durant 5 min par 20 ml d'acétate d'éthyle. Centrifuger. Prélever 15 ml de phase organique, porter dans une "capsule antigrimpante" contenant 0.1 ml d'une solution de théophylline, étalon interne, à 4  $\mu\text{g/ml}$  dans l'éthanol à 95%. Évaporer l'acétate d'éthyle au bain d'eau thermostaté à 80°. Reprendre le résidu par l'éthanol à 95%, transvaser dans des tubes à hémolyse en verre. Évaporer la solution alcoolique. Reprendre le résidu par environ 0.2 ml d'éthanol à 95% et déposer sur plaque Merck 10  $\mu\text{l}$  de cette solution.

Introduire la plaque dans une cuve à chromatographie saturée (2 h) par le mélange chloroforme-méthanol (90:10). Après développement du chromatogramme, sécher la plaque et procéder à l'enregistrement photodensitométrique en réflexion diffuse à la longueur d'onde 270 nm du spot correspondant à la théophylline. Révéler par une solution aqueuse saturée d'acétate neutre de plomb et procéder à l'enregistrement photodensitométrique à 520 nm par réflexion et transmission simultanées du spot correspondant à la naftazone.

Établir le rapport  $R$  des surfaces\* relatives au spot de la naftazone et à celui de l'étalon interne.

*Droite d'étalonnage.* À trois échantillons de 2 ml d'un plasma témoin, ajouter respectivement 0.1, 0.2 et 0.4 ml d'une solution de naftazone à 1  $\mu\text{g/ml}$  dans l'éthanol à 95% et suivre le mode opératoire adopté pour le plasma à doser. Les éléments de la gamme d'étalonnage sont déposés simultanément sur la plaque avec les échantillons de plasma à doser.

#### *Dosage dans les urines*

Les différents échantillons d'urine recueillis sont directement déposés sur la plaque chromatographique. On dépose sur chaque plaque 2  $\mu\text{l}$  de solutions étalons du médicament étudié préparées dans une urine témoin et titrant: (i) pour le sulpiride et le produit TER 1546: 250, 500 et 750  $\mu\text{g/ml}$ ; (ii) pour la vincamine: 125, 250 et 500  $\mu\text{g/ml}$ ; (iii) pour la naftazone: 2, 4, 8 et 10  $\mu\text{g/ml}$ .

Les différents échantillons d'urine à analyser sont dilués ou concentrés\*\* sous vide à 30° pour avoir une concentration finale comprise dans la gamme étalon.

Après migration, les plaques sont séchées et les spots correspondant au médicament étudié sont enregistrés au spectrophotomètre chromatographique dans les mêmes conditions que pour les échantillons de plasma.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### *Interprétation quantitative des enregistrements*

Les méthodes les plus fréquemment utilisées pour un traitement mathématique rigoureux des données obtenues en photodensitométrie font appel aux théories classiques de la spectrophotométrie et plus spécialement à la loi de Lambert-Beer (milieux infiniment transparents) ainsi qu'à un cas particulier de la théorie de

\* Ne disposant pas encore d'un intégrateur de pic au moment de la réalisation de ces dosages, les surfaces ont été calculées par le produit de la hauteur du pic par sa base à mi-hauteur.

\*\* Des essais préliminaires ont montré que la teneur en médicament de l'urine n'est pas modifiée par évaporation.

Kubelka et Munk (milieux très réfléchissants et d'une épaisseur pouvant être considérée comme infinie<sup>7,21-23</sup>). Le domaine de linéarité des équations obtenues en fonction de la concentration des solutions déposées est meilleur pour les faibles concentrations dans le premier cas et pour les fortes concentrations dans le second cas. Treiber<sup>7,22</sup> a développé des équations tenant compte de ces deux théories classiques et qui présentent un domaine de linéarité, en fonction de la quantité déposée, plus important.

Le maniement de ces différents types d'équations est peu aisé et nécessite de nombreux calculs, aussi recherche-t-on en pratique d'autres paramètres plus facilement mesurables et dont les variations en fonction de la concentration de la solution déposée puissent être considérées comme linéaires dans un domaine de concentration aussi grand que possible.

Ces paramètres sont le plus souvent reliés au pic correspondant à l'enregistrement d'un spot à son maximum d'absorption, c'est-à-dire à l'absorbance maximale du spot; ce sont soit la hauteur de ce pic<sup>3,4,6,9</sup>, soit sa surface<sup>1,2,5,8,11,14</sup>, soit encore sa surface au carré<sup>5</sup>.

Nous nous sommes toujours placés dans un domaine de concentration pour lequel la surface intégrée du pic correspondant au médicament étudié varie linéairement en fonction de la concentration de la solution déposée (plus exactement de la quantité déposée, les volumes déposés étant toujours identiques).

#### *Dosage direct dans les urines*

La surface intégrée du pic correspondant au sulpiride est proportionnelle à sa concentration dans les échantillons d'urine, dans le domaine de concentrations allant de 100 à 750  $\mu\text{g/ml}$  d'urine (soit des quantités allant de 200 à 1500 ng dans le dépôt) comme l'indique la valeur du coefficient de corrélation obtenu par ajustement linéaire des données (méthode des moindres carrés) (Tableau I). La grande variabilité de la pente  $m$  et de l'ordonnée à l'origine  $y_0$  souligne la nécessité de déposer une gamme d'étalonnage sur chaque plaque. Il en est de même pour le produit TER 1546.

Après administration à l'homme par voie orale de sulpiride à la dose de 6 mg/kg, nous avons observé, chez certains sujets la présence d'un métabolite qui n'a pas encore pu être identifié et qui peut être dosé par la technique employée pour le sulpiride (Fig. 1).

Pour la vincamine, le domaine de linéarité s'étend de 75 à 500  $\mu\text{g/ml}$  d'urine (soit des quantités allant de 150 à 1000 ng dans le dépôt).

En ce qui concerne la naftazone, le produit inchangé n'est pas détecté dans les urines après administration de 1 ou 2 mg/kg au chien par voie intraveineuse ou orale. On le retrouve après hydrolyse chlorhydrique ou enzymatique<sup>11</sup>.

Dans chacun des cas étudiés, nous n'avons pas observé de pic interférant avec celui du médicament.

#### *Dosage dans le plasma ou le sang après extraction, utilisation d'un étalon interne*

Les différents produits étudiés sont dosés dans le plasma après extraction à l'aide d'un solvant organique approprié. Malgré l'utilisation de microseringues de précision, l'erreur sur les volumes déposés, lorsqu'on dépose des solutions alcooliques ou chloroformiques de tension de vapeur élevée, est loin d'être négligeable. Afin de compenser cette erreur, nous avons eu recours à l'addition d'un étalon interne, procédé

TABLEAU I

ÉQUATION DE LA DROITE DE RÉGRESSION LINÉAIRE  $y = mx + y_0$  OBTENUE EN UTILISANT LA MÉTHODE DES MOINDRES CARRÉS SUR LES DONNÉES ( $x_1, y_1$ )

$x_1$  = Concentration en sulpiride ou en produit TER 1546 dans les urines en  $\mu\text{g/ml}$  (250, 500 et 750);  $y_1$  = surface intégrée des pics correspondant aux différentes concentrations (valeurs extrêmes 1500 à 6000 unités d'intégration). Mesures en réflexion diffuse à 293 nm.

Sulpiride					Produit TER 1546				
Urines	Plaques	Coefficient de corrélation	Pente $m$	Ordonnée à l'origine, $y_0$	Urines	Plaques	Coefficient de corrélation	Pente $m$	Ordonnée à l'origine, $y_0$
Sujet A	1	0.9957	9.24	-361	Sujet A	1	0.9999	6.94	+ 11
	2	0.9996	7.69	+267		2	0.9995	7.60	+ 99
	3	0.9999	8.72	-235		Sujet B	1	0.9996	6.40
Sujet B	1	0.9995	9.92	-188	Sujet C	1	0.9999	6.88	+ 24
	2	0.9991	6.68	+406	Sujet D	1	0.9982	7.09	+241
	3	0.9997	6.97	+587	2	0.9999	7.16	-161	
Sujet C	4	0.9997	9.55	-382	Sujet E	1	0.9976	6.73	+ 75
	1	0.9878	5.75	+348	2	0.9994	6.03	+202	
	2	0.9999	8.71	+758	Sujet F	1	0.9995	6.97	+309
	3	0.9997	6.05	+ 26	2	0.9996	7.13	+516	
Sujet D	4	0.9962	8.43	-305	Sujet G	1	0.9998	6.08	+ 63
					2	0.9999	6.71	+368	
					Sujet H	1	0.9999	7.79	+242
					Sujet I	1	0.9996	6.97	+222
Chien A	1	0.9997	7.10	+404	2	0.9999	7.43	+224	
	2	0.9999	7.68	+281	Chien A	1	0.9996	7.04	-133
	3	0.9999	8.02	+274	2	0.9999	7.04	+136	
	4	0.9999	8.22	+484	3	0.9998	6.67	+147	
	5	0.9924	5.91	+493	4	0.9998	6.44	+126	
	6	0.9997	8.12	+229	Chien B	1	0.9998	6.99	-100
	7	0.9978	6.66	+130	2	0.9999	7.53	+266	
Chien B	1	0.9999	7.03	+ 54	3	0.9992	6.26	+161	
	2	0.9976	7.42	-146	4	0.9999	7.32	- 81	
	3	0.9995	7.49	- 38	Chien C	1	0.9999	6.79	+354
Chien C	1	0.9996	7.72	+147	2	0.9999	6.91	+262	
	2	0.9999	7.94	+102	Chien D	1	0.9999	6.70	+373
	3	0.9998	7.96	+512	2	0.9999	6.77	+261	
	4	0.9999	8.33	+ 54	3	0.9999	5.73	+452	
	5	0.9999	7.39	+219	Chien E	1	0.9983	7.99	+ 27
				2	0.9992	7.82	+ 55		
				3	0.9999	7.65	+182		

qui a également l'avantage de compenser les pertes intervenant au cours des transvasements et qui, de plus, permet de pallier le manque de reproductibilité d'une plaque à l'autre, comme nous allons le souligner à l'aide des résultats que nous avons obtenus.

*Choix de l'étalon interne.* Le produit servant d'étalon doit avoir un  $R_F$  nettement distinct de celui de la substance à doser (et éventuellement de ses métabolites), il doit présenter si possible un coefficient d'extinction spécifique élevé à la longueur d'onde d'absorbance maximale du médicament à doser. Si ce n'est pas le cas, la plaque peut être enregistrée à deux longueurs d'onde différentes.

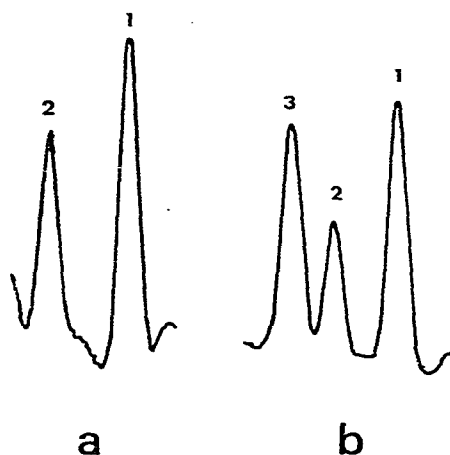


Fig. 1. Enregistrements au spectrophotomètre Zeiss PMQ II, en réflexion à 293 nm d'un échantillon d'urine (a) et d'un échantillon de plasma extrait selon le protocole adopté (b) prélevés chez l'homme après administration orale unique de deux comprimés de sulpiride dosés à 200 mg (a) ou répétés pendant plusieurs jours de quatre comprimés par jour (b). 1 = Sulpiride; 2 = métabolite du sulpiride; 3 = étalon interne. Amplification  $\times 4$ . Quantités déposées: 2  $\mu\text{l}$  pour l'échantillon d'urine, 10  $\mu\text{l}$  pour l'échantillon de plasma.

(1). Pour le dosage du sulpiride et du produit TER 1546, nous avons choisi un dérivé de la même série chimique, le produit GRI 1665. Ces trois composés ont une absorbance maximale vers 293 nm<sup>16</sup> et des  $R_F$  nettement distincts avec la phase mobile utilisée (acétone-*n*-butanol-ammoniaque-eau, 66:30:1:3) (Fig. 1 et 2).  $R_F$  produit GRI 1665: 0.65;  $R_F$  métabolite du sulpiride (non identifié): 0.55;  $R_F$  sulpiride: 0.45;  $R_F$  produit TER 1546: 0.30.

(2). Pour le dosage de la vincamine, nous avons choisi un autre alcaloïde, la strychnine qui a un coefficient d'extinction très élevé à 280 nm, longueur d'onde

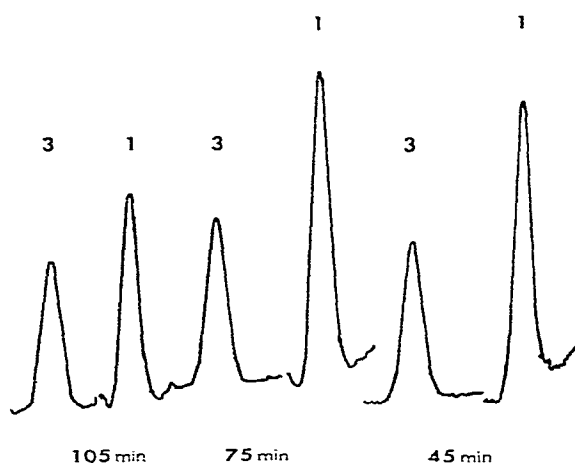


Fig. 2. Enregistrements au spectrophotomètre chromatographique Zeiss PMQ II, en réflexion à 293 nm, de trois échantillons de plasma humain extraits selon le protocole adopté, et prélevés 45 min, 75 min et 105 min après administration orale de deux comprimés de sulpiride dosés à 200 mg. 1 = Sulpiride, amplification  $\times 10$ ; 3 = étalon interne, amplification  $\times 4$ . Quantités déposées: 10  $\mu\text{l}$ .



d'absorbance maximale de la vincamine. Les  $R_F$  de ces deux composés sont distincts avec la phase mobile utilisée (chloroforme-méthanol, 90:10).  $R_F$  vincamine: 0.53,  $R_F$  strychnine: 0.25.

Nous n'avons pas observé de pic interférant avec celui du sulpiride, du produit TER 1546 dans les extraits obtenus à partir des échantillons de plasma prélevés avant leur administration; de plus, dans ces derniers, nous n'avons pas observé de pic interférant avec l'étalon interne. Il en est de même pour la vincamine.

(3). Pour le dosage de la naftazone, nous avons choisi comme étalon interne la théophylline qui présente une absorbance maximale à 270 nm, longueur d'onde identique à celle du maximum d'absorption de la naftazone dans l'UV<sup>5,11,12</sup>. Les  $R_F$  de ces deux composés sont distincts avec la phase mobile utilisée (chloroforme-méthanol, 90:10) (Fig. 3).  $R_F$  naftazone: 0.63,  $R_F$  théophylline: 0.29.

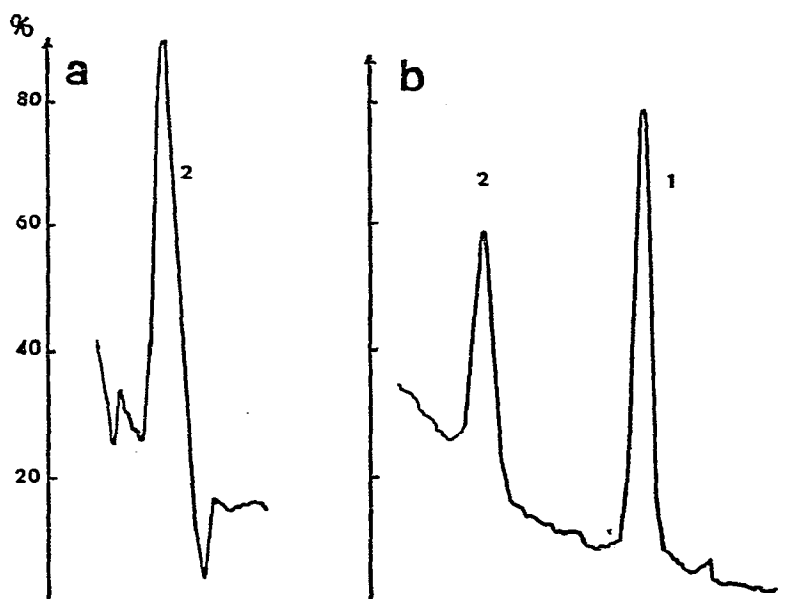


Fig. 3. Enregistrements au spectrophotomètre chromatographique Zeiss PMQ II en réflexion et transmission simultanées à 520 nm (a) et en réflexion diffuse à 270 nm (b) d'une solution alcoolique titrant 7.5 ng par  $\mu$ l en naftazone (2) et 20 ng par  $\mu$ l en théophylline (1). Dépôt 5  $\mu$ l, amplification  $\times 10$ .

Le dosage de la naftazone dans le plasma par absorption dans l'UV s'étant avéré inapplicable par suite de la présence d'une substance interférante de même  $R_F$  dans tous les mélanges solvants étudiés<sup>11</sup>, nous avons néanmoins gardé comme étalon interne la théophylline ce qui nous a obligé à travailler successivement à 270 nm puis à 520 nm après révélation par l'acétate neutre de plomb.

*Dosage du sulpiride et du produit TER 1546 dans le plasma.* Afin d'évaluer les possibilités de la méthode envisagée différents échantillons de plasma surchargés en sulpiride ou en produit TER 1546 ont été extraits selon le protocole adopté et déposés sur différentes plaques.

TABLEAU II

ÉQUATION DE LA DROITE DE RÉGRESSION LINÉAIRE  $y = mx + y_0$  OBTENUE EN UTILISANT LA MÉTHODE DES MOINDRES CARRÉS SUR LES DONNÉES ( $x_1, y_1$ )

$x_1$  = Concentration en sulpiride ou en produit TER 1546 dans le plasma en  $\mu\text{g/ml}$  (5, 10, 20 et 30).  $y_1 = R = \text{SM/SE}$ , rapport des surfaces intégrées des pics correspondant au sulpiride ou au produit TER 1546, SM, et à l'étalon interne, SE. Mesures en réflexion diffuse à 293 nm.

Sulpiride					Produit TER 1546				
Plasmas	Plaques	Coefficient de corrélation	Pente $m$	Ordonnée à l'origine, $y_0$	Plasmas	Plaques	Coefficient de corrélation	Pente $m$	Ordonnée à l'origine, $y_0$
Sujet A	3	0.9999	0.0899	+0.062	Sujet A	1	0.9999	0.0547	-0.034
Sujet B	5	0.9999	0.0899	+0.056	Sujet D	5	0.9987	0.0541	-0.016
Sujet C	7	0.9999	0.0893	+0.064	Sujet F	7	0.9990	0.0547	-0.024
Sujet D	8	0.9999	0.0895	+0.066					
Sujet E	10	0.9997	0.0895	+0.069					
	11	0.9999	0.0895	+0.063					
Chien A	1	0.9985	0.0958	+0.015	Chien A	1	0.9987	0.0619	+0.022
	2	0.9994	0.0965	+0.024	Chien E	9	0.9987	0.0621	+0.024
Chien B	3	0.9990	0.0970	+0.062	Chien F	11	0.9999	0.0664	-0.044
	4	0.9988	0.0969	+0.018	Chien H	15	0.9994	0.0622	+0.002
Chien C	5	0.9986	0.0970	+0.055					
Chien D	6	0.9999	0.0978	+0.025					
Chien E	9	0.9988	0.0985	-0.003					
Chien F	12	0.9996	0.0989	+0.024					
	13	0.9997	0.0986	+0.012					
Chien G	15	1.0000	0.0990	+0.015					
	16	0.9999	0.0984	+0.013					

Le rapport  $R$  de la surface intégrée du pic correspondant au sulpiride (ou au produit TER 1546), SM, à celle du pic correspondant à l'étalon interne, SE, varie linéairement en fonction de la concentration en sulpiride ou en produit TER 1546 pour un domaine de concentrations allant de 5 à 30  $\mu\text{g/ml}$  (soit des quantités déposées allant de 125 à 750 ng) comme le montrent les valeurs des coefficients de corrélation obtenus par ajustement linéaire des données (méthode des moindres carrés) (Tableau II). La sensibilité de la méthode est de 2  $\mu\text{g}$  pour une prise d'essai de 1 ml.

La très bonne reproductibilité des valeurs obtenues pour la pente  $m$  des différentes droites d'étalonnage, l'ordonnée à l'origine  $y_0$  étant dans tous les cas très proche de zéro, montre que l'emploi d'un étalon interne permet de pallier aux variations entre plaques et éventuellement d'éviter de déposer une gamme d'étalonnage sur chaque plaque. Les valeurs de  $m$  sont plus fortes pour le sulpiride que pour le produit TER 1546 ce qui est dû principalement à son coefficient d'extinction spécifique plus élevé ( $\epsilon_{\text{sulpiride}} = 8.58 \text{ g}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$ ;  $\epsilon_{\text{TER 1546}} = 6.63 \text{ g}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$ ). D'autre part, on peut remarquer que pour chacun de ces produits, les valeurs de  $m$  obtenues pour les plasmas de chiens sont plus élevées que celles obtenues pour les plasmas humains, en raison d'un coefficient d'extraction différent (99% et 85% pour le produit TER 1546 et le sulpiride respectivement à partir de plasma de chien, 79.2% et 80.4% pour ces deux produits à partir de plasma humain) ce qui pourrait être attribuée à un pourcentage de liaison aux protéines différent.

Après administrations orales répétées de sulpiride, (800 mg répartis en trois prises par jour), nous avons observé, chez certains sujets la présence dans l'extrait obtenu à partir du plasma d'un métabolite non identifié qui semble cependant être le même que celui que nous avons trouvé dans les urines (Fig. 1).

*Dosage de la vincamine dans le sang total.* Après administration intraveineuse de 20 mg de vincamine au chien, sa concentration dans le plasma devient rapidement très faible, inférieure à 300 ng/ml<sup>18</sup>; d'autre part nous avons constaté par des expériences de distribution réalisées *in vitro* et dont les résultats seront publiés par ailleurs que la vincamine présente un coefficient de partage très élevé en faveur des globules rouges; c'est pourquoi pour augmenter la sensibilité de notre méthode nous avons dosé la vincamine dans le sang total. La validité de la méthode proposée a été évaluée après extraction selon le protocole adopté de différents échantillons de sang surchargés en vincamine.

Pour une concentration donnée, le rapport  $R$  de la surface intégrée du pic correspondant à la vincamine, SM, à celle du pic correspondant à l'étalon interne, SE, est très reproductible. Ses variations en fonction de la concentration sont linéaires dans le domaine de concentrations allant de 2.5 à 7.5  $\mu\text{g/ml}$  (soit des quantités allant de 63 à 188 ng dans le dépôt) (Tableau III).

TABLEAU III

ÉQUATION DE LA DROITE DE RÉGRESSION LINÉAIRE  $y = mx + y_0$  OBTENUE EN UTILISANT LA MÉTHODE DES MOINDRES CARRÉS SUR LES DONNÉES ( $x_i, y_i$ )

$x_i$  = Concentration en vincamine dans le sang en  $\mu\text{g/ml}$  (2.5, 5 et 7.5);  $y_i = R = \text{SM/SE}$ , rapport des surfaces intégrées des pics correspondant à la vincamine, SM, et à l'étalon interne, SE. Mesures en réflexion diffuse à 280 nm.

Sangs (échantillons)	Plaques	Coefficient de corrélacion	Pente $m$	Ordonnée à l'origine, $y_0$
Chien A	1	1.0000	0.160	0.000
	2	1.0000	0.150	+0.057
Chien B	3	0.9996	0.160	+0.033
	4	0.9999	0.156	+0.027
Chien C	5	0.9996	0.160	+0.027
	6	0.9998	0.158	0.000
Chien D	7	0.9999	0.160	+0.003
	8	1.0000	0.162	+0.017

La sensibilité de la méthode est de 1.5  $\mu\text{g}$  pour une prise d'essai de 1 ml.

*Dosage de la naftazone dans le plasma.* La validité de la méthode envisagée a été évaluée après extraction, selon le protocole adopté de différents échantillons de plasma surchargés en naftazone. Le pourcentage d'extraction de la naftazone est de 7% et son coefficient d'extinction spécifique à 520 nm de 60  $\text{g}^{-1}\text{l cm}^{-1}$ .

Les variations du rapport  $R$  en fonction de la concentration en naftazone sont linéaires dans le domaine de concentrations allant de 50 à 200 ng/ml (soit des quantités déposées allant de 1.88 à 7.5 ng) (Tableau IV). La reproductibilité est un peu moins bonne que lors des exemples précédents. Dans ce cas, en effet, les surfaces et pics ont été calculées et non intégrées, de plus l'étalon interne est enregistré dans

TABLEAU IV

ÉQUATION DE LA DROITE DE RÉGRESSION LINÉAIRE,  $y = mx + y_0$  OBTENUE EN UTILISANT LA MÉTHODE DES MOINDRES CARRÉS SUR LES DONNÉES ( $x_i, y_i$ )

$x_i$  = Concentration en naftazone dans le plasma en ng/ml (50, 100 et 200),  $y_i = R = SM^*/SE^{**}$ , rapport des surfaces intégrées des pics correspondant à la naftazone,  $SM^*$ , et à l'étalon interne,  $SE^{**}$ .

Plasmas (échantillons)	Plaques	Coefficient de corrélacion	Pente $m$	Ordonnée à l'origine, $y_0$
Chien A	1	0.9998	0.0066	-0.065
	2	0.9986	0.0052	+0.075
Chien B	3	0.9999	0.0054	+0.045
Chien C	4	0.9992	0.0061	-0.030
Chien E	6	0.9998	0.0060	-0.025

\* Mesures en reflexion transmission simultanées à 520 nm.

\*\* Mesures en reflexion diffuse à 270 nm.

l'UV à 270 nm alors que la naftazone est enregistrée dans le visible à 520 nm après révélation.

Étant donné le volume de la prise d'essai sur laquelle nous travaillons (qui peut aller jusqu'à 5 ml) nous voyons que cette méthode nous permet d'atteindre une sensibilité de l'ordre du nanogramme.

## CONCLUSION

Dans tous les cas étudiés la sensibilité obtenue liée à une bonne reproductibilité et à une grande spécificité permet de retenir la spectrophotométrie par transmission après séparation chromatographique sur couche mince pour le dosage des médicaments en milieu biologique, en vue de leur étude pharmacocinétique.

Pour le sulpiride, nous obtenons une sensibilité équivalente à celle de la méthode fluorimétrique: 0.1  $\mu\text{g/ml}$ , avec l'avantage de pouvoir séparer et doser l'un de ses métabolites, et également de diminuer l'influence de substances se trouvant naturellement dans les milieux biologiques et pouvant interférer avec le produit à doser.

La méthode que nous décrivons nous a permis de réaliser l'étude pharmacocinétique de cette molécule ainsi que celle du produit TER 1546 chez le chien après administration par voie intraveineuse, intramusculaire ou orale de doses comprises entre 7.5 et 60 mg/kg. Elle nous a permis également de déterminer la biodisponibilité de comprimés dosés à 200 mg en sulpiride ou en produit TER 1546 chez l'homme. Les résultats de ces études feront l'objet de publications ultérieures.

Pour la vincamine la sensibilité (15  $\mu\text{g/ml}$ ) est loin d'atteindre celle obtenue par chromatographie en phase gazeuse après extraction et dérivation (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ), cependant la méthode que nous décrivons à l'avantage d'être rapide et de se prêter à des analyses de routine, elle nous a permis de déterminer la biodisponibilité de comprimés dosés à 20 mg chez le chien.

La très bonne sensibilité obtenue pour la naftazone de l'ordre du nanogramme nous a permis de réaliser son étude pharmacocinétique après administration au chien<sup>12</sup>. Dans ce cas, la séparation chromatographique sur couche mince ne nous a pas permis

d'éviter l'interférence d'un produit gênant. Cette difficulté a pu être surmontée par l'utilisation d'une révélation spécifique.

## RÉSUMÉ

Le dosage du sulpiride et des autres benzamides, de la vincamine et de la naftazone dans le plasma (ou le sang) et les urines peut être effectué par spectrophotométrie en réflexion diffuse des chromatogrammes à 293, 280 et 270 nm respectivement. Les échantillons d'urine sont déposés directement sur couche mince avec une gamme d'étalonnage sur chaque plaque. Les échantillons de plasma ou de sang sont extraits; par addition d'un étalon interne aux extraits avant leur dépôt, on obtient des droites d'étalonnage reproductibles d'une plaque à l'autre, ce qui permet de réaliser un plus grand nombre de dosages sur la même plaque. La sensibilité est de 2  $\mu\text{g}$  pour une prise d'essai de 1 ml (30 ng déposés) pour le sulpiride, les molécules qui lui sont apparentées et la vincamine. La naftazone est dosée dans le plasma en réflexion et transmission simultanées à 520 nm après révélation à l'acétate de plomb, la sensibilité obtenue est de 10 ng pour une prise d'essai de 1 ml (0.5 ng déposés).

Pour toutes les molécules étudiées, les méthodes proposées, spécifiques, reproductibles et assez sensibles peuvent permettre la réalisation d'études pharmacocinétiques après administration de doses thérapeutiques à l'homme ou à l'animal.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 D. B. Faber et W. A. Man in 't Veld, *J. Chromatogr.*, 93 (1974) 238.
- 2 J. A. F. de Silva, I. Bekersky et C. V. Puglisi, *J. Pharm. Sci.*, 63 (1974) 1837.
- 3 H. K. L. Hundt et E. C. Clark, *J. Chromatogr.*, 107 (1975) 149.
- 4 J. M. Steyn et H. K. L. Hundt, *J. Chromatogr.*, 111 (1975) 463.
- 5 J. Bres et F. Bressolle, *Trav. Soc. Pharm. Montpellier*, 35 (1975) 381.
- 6 J. M. Steyn, *J. Chromatogr.*, 120 (1976) 465.
- 7 L. R. Treiber, *J. Chromatogr.*, 123 (1976) 23.
- 8 J. Christiansen, *J. Chromatogr.*, 123 (1976) 57.
- 9 P. Haefelfinger, *J. Chromatogr.*, 124 (1976) 351.
- 10 J. Segura, L. Borja et O. M. Bakke, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 223 (1976) 88.
- 11 F. Bressolle, *Thèse Doct. Pharmacie*, Montpellier, 1976.
- 12 F. Bressolle et J. Bres, *Trav. Soc. Pharm. Montpellier*, 37 (1977) 113.
- 13 B. Wesley-Hadzija et A. M. Mattocks, *J. Chromatogr.*, 143 (1977) 307.
- 14 N. Strojny, K. Bratin, M. A. Brooks et J. A. F. de Silva, *J. Chromatogr.*, 143 (1977) 363.
- 15 S. Ebel et G. Herold, *Chromatographia*, 8 (1975) 569.
- 16 G. Pitel et Th. Luce, *Ann. Pharm. Fr.*, 28 (1970) 409.
- 17 T. Kleimola, O. Leppänen, J. Kanto, R. Mäntylä et E. Syvälahti, *Ann. Clin. Res.*, 8 (1976) 104.
- 18 V. H. Laufen, W. Juhran, W. Fleissig, R. Götz, F. Scharpf et G. Bartsch, *Arzneim.-Forsch.*, 27 (1977) 1255.
- 19 V. C. P. Siegers, H. Iven et O. Strubelt, *Arzneim.-Forsch.*, 27 (1977) 1271.
- 20 V. C. P. Siegers, W. D. Heib et K. Kohlmeyer, *Arzneim.-Forsch.*, 27 (1977) 1274.
- 21 S. Ebel et H. Kubmaul, *Chromatographia*, 7 (1974) 197.
- 22 L. R. Treiber, *J. Chromatogr.*, 100 (1974) 123.
- 23 S. Ebel et J. Hocke, *Z. Anal. Chem.*, 277 (1975) 105.