

CHROM. 11,907

## Note

### Pré-concentration sur Tenax GC® et dosage par chromatographie liquide haute-performance d'anticoagulants dans l'urine et le plasma humains

NADINE THONNART\*

*Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine de l'Université Libre de Bruxelles, 1000 Bruxelles (Belgique)*

et

MAURICE VANHAELEN et RENÉE VANHAELEN-FASTRÉ

*Institut de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles, Campus Plaine, B 205-4, 1050 Bruxelles (Belgique)*

(Reçu le 20 décembre 1978; manuscrit modifié reçu le 4 avril 1979)

La warfarine (Coumadine®,  $\alpha$ -acétyl benzyl-3-hydroxy-4-coumarine) et la phenprocoumone (Marcoumar®,  $\alpha$ -éthyl benzyl-3-hydroxy-4-coumarine) sont des anticoagulants de type antivitamine K, couramment utilisés en thérapeutique humaine pour traiter les maladies thrombo-emboliques. Leur dosage dans les milieux biologiques est indispensable, aussi bien en cours d'un traitement que pour des études pharmacocinétiques.

De nombreuses méthodes ont été décrites pour effectuer de tels dosages: récemment, des techniques par spectrophotométrie<sup>1,2</sup>, par fluorométrie<sup>3,4</sup>, par chromatographie sur couche mince<sup>5,6</sup> et par chromatographie en phase gazeuse<sup>7-9</sup> ont été proposées.

Certaines de ces méthodes sont peu sensibles ou peu spécifiques ou bien impliquent un long processus d'extraction, ou encore nécessitent une transformation préalable des anticoagulants en dérivés méthylés ou silylés.

Il semble établi que la méthode de séparation et de dosage par chromatographie liquide haute-performance constitue une méthode de choix<sup>10-12</sup>. Le présent travail décrit une méthode de dosage sensible, spécifique et rapide pouvant s'appliquer à plusieurs anticoagulants de structure différente et permettant un dosage en routine à des fins pharmacologiques et toxicologiques.

Cette méthode exploite le caractère hydrophobe d'un polymère poreux, le Tenax GC®, de manière à pré-concentrer les anticoagulants présents dans le plasma ou l'urine.

Bien qu'une technique de pré-concentration semblable ait déjà été décrite pour l'extraction de pesticides et d'hydrocarbures présents dans l'eau<sup>13,14</sup> et pour celle de phénols dissous dans les effluents industriels<sup>15</sup>, c'est cependant la première fois que le Tenax GC est utilisé en tant qu'agent d'extraction de substances non volatiles à partir de milieux biologiques.

\* Adresse pour tirés à part.

Les anticoagulants isolés sont ensuite, après élution, dosés par chromatographie liquide haute-performance<sup>16</sup>.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

### *Appareillage et produits*

Le Tenax GC (60–80 mesh) a été fourni par Applied Sciences Labs. (State College, Pa., U.S.A.). Tous les solvants sont purifiés par bidistillation. La warfarine (Sigma, St. Louis, Mo., U.S.A.) et la phenprocoumone (Roche, Bâle, Suisse) sont exemptes de toute impureté détectable dans les conditions chromatographiques décrites ci-dessous.

Le chromatographe liquide Waters Assoc. est équipé d'une pompe (modèle 6000 A), d'un détecteur UV modèle 440 (filtre: 254 nm), d'un injecteur sans septum (modèle U6K) et d'une colonne en acier inoxydable de 30 cm × 1/4 in., remplie de  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> (dimension des particules: 10  $\mu$ m). La phase mobile utilisée est un mélange d'eau (contenant 0.1 % d'acide acétique à 99.8 %) et d'éthanol, dans un rapport 1:1 (v/v). Le débit est maintenu constant à 1.5 ml/min (pression résultante: environ 3000 p.s.i.).

### *Méthode*

Les échantillons de plasma (citraté à 3.8 %) et d'urine sont enrichis en warfarine ou en phenprocoumone et acidifiés jusqu'à un pH de 4, par addition d'acide acétique à 99.8 %. Ils sont injectés à l'aide d'une vanne d'injection (valve Pharmacia SRV-4) munie d'une boucle calibrée de 5 ml et amenés sur une colonne (50 cm × 10 mm D.I., Pharmacia SR 10/50), garnie de Tenax GC (approximativement 3 g, introduit en suspension dans l'éthanol), par une pompe à piston (FMI modèle RP-SY-csc). Le débit est maintenu constant à 2 ml/min.

Les substances solubles dans l'eau et non fixées par le Tenax GC, sont éliminées en lavant la colonne par 50 ml d'eau. L'élution des produits fixés par le polymère est obtenue par passage de 50 ml d'éthanol. La phase éthanolique est recueillie et évaporée sous pression réduite à une température inférieure à 40°. Le résidu est ensuite repris par un volume adéquat d'éthanol. La colonne, lavée par 50 ml d'eau, est à nouveau prête à l'emploi.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

La Fig. 1 représente les chromatogrammes d'un échantillon de plasma contenant 1  $\mu$ g/ml de warfarine traité d'une part, suivant la méthode conventionnelle (extraction par le chloroforme en milieu acide) et d'autre part, purifié sur Tenax GC.

Un chromatogramme d'un plasma blanc, traité dans les mêmes conditions, est superposé à chacun de ces chromatogrammes. Au temps de rétention de la warfarine ( $t_R = 5.5$  min) et uniquement dans le cas des échantillons traités par le Tenax GC, aucune interférence n'est observée. Il en est de même pour la phenprocoumone ( $t_R = 7.5$  min).

De plus, l'absence d'interférence provenant de substances extraites du plasma est confirmée par la concordance des résultats obtenus par lecture du chromatogramme à deux longueurs d'onde différentes (254 et 313 nm). L'extraction conventionnelle

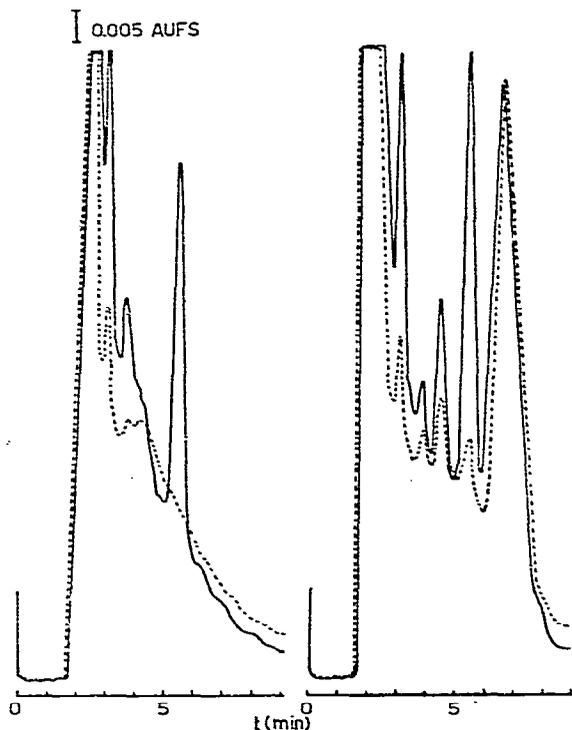


Fig. 1. Chromatogrammes d'un échantillon de plasma humain traité par le Tenax GC (à gauche) et extrait par le chloroforme (à droite). —, Échantillon de plasma contenant 1  $\mu\text{g/ml}$  de warfarine; ---, échantillon de plasma blanc.

ne comporte pas de passage en milieu alcalin de façon à éviter une dégradation possible de certains métabolites de l'anticoagulant<sup>17</sup>.

La détection est opérée en UV avec un filtre à 254 nm, équipant de façon standard les appareillages de chromatographie liquide haute-performance. Toutefois, l'utilisation d'un filtre à 280 ou 313 nm offre une sensibilité approximativement trois fois plus grande pour la warfarine; dans ces conditions, des quantités injectées aussi faibles que 4 ng peuvent être dosées. L'addition d'acide acétique dans la phase mobile permet de rendre les pics plus symétriques par diminution de l'ionisation de l'anticoagulant.

Les courbes de calibration de la warfarine et de la phenprocoumone ont été obtenues en ajoutant des quantités connues d'anticoagulant à une solution de NaCl 0.9%, de façon à obtenir des échantillons contenant 0.25, 0.50, 1.00 et 2.00  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 2). Ces concentrations ont été choisies en fonction des quantités normalement retrouvées au cours d'un traitement par la warfarine ou la phenprocoumone<sup>18,19</sup>. Ces courbes, calculées à partir de la hauteur des pics, sont linéaires dans la zone des concentrations étudiées; les coefficients de régression sont très voisins de 1 ( $r = 0.998$  pour la warfarine;  $r = 0.999$  pour la phenprocoumone).

Les résultats des dosages dans le plasma et l'urine sont représentés dans le Tableau I.

Pour chaque anticoagulant, 4 solutions de concentration différente ont été

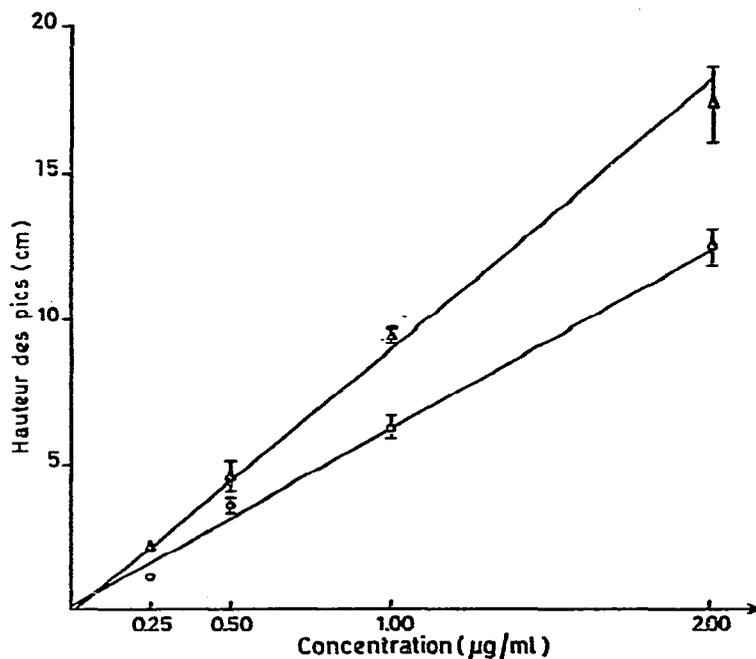


Fig. 2. Courbes de calibration de la warfarine (O) et de la phenprocoumone (Δ).

réalisées; pour chacune d'elles, la récupération à partir du milieu biologique, est supérieure à 90%.

Les avantages de l'utilisation du Tenax GC résultent:

(1) d'une meilleure purification des milieux biologiques par élimination des substances interférant aux temps de rétention des anticoagulants étudiés;

(2) de la suppression des inconvénients liés à l'extraction conventionnelle par solvants organiques (émulsions, artéfacts);

TABLEAU I

RENDEMENTS DE LA PURIFICATION SUR TENAX GC D'ÉCHANTILLONS D'URINE ET DE PLASMA HUMAINS CONTENANT DE LA WARFARINE OU DE LA PHENPROCOUMONE

*n* = Nombre d'échantillons.

	Concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ )							
	0.25		0.50		1.00		2.00	
	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>
<i>Plasma</i>								
Phenprocoumone	97.95	6	96.70	4	93.42	5	95.42	6
Warfarine	94.41	6	95.56	10	92.53	6	91.86	5
<i>Urine</i>								
Phenprocoumone	94.87	6	90.84	6	99.59	6	98.53	6
Warfarine	95.63	4	99.31	6	94.40	6	99.04	5

(3) de la possibilité de réutiliser la colonne pour plus de cent dosages successifs;

(4) de la simplicité de la méthode.

Enfin, l'utilisation du Tenax GC pourrait être étendue à d'autres médicaments et s'appliquer à des analyses d'anticoagulants en routine.

#### REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier Mr M. Hermann pour son aide technique ainsi que Seresci pour nous avoir fourni le clocoumarol.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 E. C. Cole et F. Bachmann, *Arch. Intern. Med.*, 136 (1976) 474.
- 2 K. Seiler et F. Duckert, *Thromb. Diath. Haemorrh.*, 21 (1969) 320.
- 3 M. Corn et R. Berberich, *Clin. Med.*, 13 (1967) 126.
- 4 R. Nagashima et G. Levy, *J. Pharm. Sci.*, 58 (1969) 845.
- 5 J. Lewis et P. Ilnicki, *Clin. Res.*, 17 (1969) 332.
- 6 F. A. de Wolff et M. J. van Kempen, *Clin. Chem.*, 22 (1976) 1575.
- 7 K. K. Midka, I. J. McGilveray et J. K. Cooper, *J. Pharm. Sci.*, 63 (1974) 1725.
- 8 N. Heni et P. Glogner, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 293 (1976) 183.
- 9 K.-F. Schmitt et E. Jähnchen, *J. Chromatogr.*, 130 (1977) 418.
- 10 L. T. Wong, G. Solomonraj et B. H. Thomas, *J. Chromatogr.*, 135 (1977) 149.
- 11 T. D. Bjornsson, T. F. Blaschke et P. J. Meffin, *J. Pharm. Sci.*, 66 (1977) 142.
- 12 W. B. Forman et J. Shlaes, *J. Chromatogr.*, 146 (1978) 522.
- 13 V. Leoni, G. Puccetti et A. Grella, *J. Chromatogr.*, 106 (1975) 119.
- 14 V. Leoni, G. Puccetti, R. J. Colombo et A. M. d'Ovidio, *J. Chromatogr.*, 125 (1976) 399.
- 15 K. D. Bartle, J. Elstub, M. Novotny et R. J. Robinson, *J. Chromatogr.*, 135 (1977) 351.
- 16 R. Vanhaelen-Fastré et M. Vanhaelen, *J. Chromatogr.*, 129 (1976) 397.
- 17 N. Thonnart, M. Vanhaelen et R. Vanhaelen-Fastré, *J. Med. Chem.*, 20 (1977) 604.
- 18 W. Schmidt et J. Jähnchen, *J. Pharm. Pharmacol.*, 29 (1977) 266.
- 19 E. S. Vesell et C. A. Shively, *Science*, 184 (1974) 466.