

CHROM. 16,864

## Note

### **Dosage du méthylthiouracile dans du plasma de bovin par chromatographie liquide haute performance sur phase inverse**

MARIE-FRANCE POCHARD\*, MARINA KARAGEORGIS et MIREILLE CHEVALIER

*Laboratoire Central d'Hygiène Alimentaire, Ministère de l'Agriculture, Direction de la Qualité, Services Vétérinaires, 43 rue de Dantzig, 75015 Paris (France)*

(Reçu le 3 mars 1984; manuscrit modifié reçu le 30 avril 1984)

Le méthylthiouracile (MTU) est une substance à action thyrostatique utilisée frauduleusement comme facteur de croissance dans les élevages bovins et interdite en France depuis la parution des arrêtés ministériels du 15 juillet 1982 (*Journal Officiel* du 30 juillet 1982) et du 21 septembre 1982 (*Journal Officiel* du 26 septembre 1982).

Un contrôle intensif a été mis en oeuvre sur les lieux d'abattage et au laboratoire pour enrayer cette pratique<sup>1</sup>. L'attitude offensive des Services Vétérinaires, vis à vis de l'usage abusif de cette substance chimique, a, semble-t-il, porté ses fruits, mais l'action de surveillance entreprise à ce sujet doit encore être maintenue.

La technique utilisée au laboratoire pour la détection des résidus de MTU dans la thyroïde et le muscle de bovin est la chromatographie sur couche mince haute performance (CCM-HP)<sup>2</sup>. Cette méthode simple, spécifique et sensible, s'est révélée applicable dans le cadre d'un contrôle de routine. Cependant, pour mieux cerner le problème des résidus de MTU chez les bovins, compte tenu du peu d'informations scientifiques disponibles sur ce sujet, nous avons entrepris une étude expérimentale sur des taurillons. Notre but est d'évaluer les teneurs résiduelles en MTU dans les fluides biologiques (plasma, urine) au cours du traitement, et de préciser les concentrations en MTU après abattage, dans la thyroïde, dans divers muscles et organes. Pour mener à bien une telle expérimentation, la maîtrise d'une technique analytique quantitative, sensible et spécifique est indispensable. C'est pourquoi, nous avons opté pour la chromatographie liquide haute performance (CLHP), technique déjà décrite dans la littérature pour la détermination du MTU<sup>3</sup> et du 2-thiouracile et ses dérivés<sup>4,5</sup> sur phase normale et pour la détermination du propylthiouracile (PTU) dans du plasma humain<sup>6,7</sup>, sur phase inverse.

Nous nous proposons de présenter ici, la méthode de dosage du MTU dans le plasma de bovin par CLHP sur phase inverse. Cette technique chromatographique s'est révélée applicable à la détermination du MTU dans la thyroïde, divers muscles et organes ainsi que dans l'urine où le MTU a été dosé après injection directe de l'urine. Ces travaux feront l'objet d'une publication ultérieure<sup>8</sup>.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

### *Matériel*

Nous avons utilisé un appareillage Waters: pompe 6000 A, injecteur U6K, détecteur UV M450 à longueur d'onde variable; une colonne prête à l'emploi Hibar LiChrosorb RP-18: granulométrie 10  $\mu\text{m}$ , 25 cm  $\times$  4 mm I.D. (Merck 50334); des seringues Hamilton adaptées à l'injecteur Waters avec aiguille interchangeable (réf. 801 RNE).

### *Réactifs*

Les réactifs suivants ont été utilisés: MTU (Fluka 69400), les solutions standard sont préparées dans le méthanol; solvants pour analyse (Merck); méthanol pour spectroscopie Uvasol (Merck); EDTA: sel disodique, dihydraté de l'acide tetra-acétique éthylène-diamine (Fluka 03680); réactif de silanisation Aquasil (Pierce 42799).

### *Conditions chromatographiques*

Les conditions opératoires étaient: éluant: mélange eau-méthanol (90/10, v/v); débit: 1.9 ml/min; pression: 3000 p.s.i.; longueur d'onde fixée à 280 nm; volume d'injection: 10  $\mu\text{l}$ . La chromatographie s'effectuait à température ambiante.

### *Préparation de l'échantillon plasmatique*

Le plasma (500  $\mu\text{l}$ ) est prélevé, déposé dans un tube silanisé et extrait en présence d'EDTA (100 mg) par 2 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique est évaporée à sec sous un courant d'azote. Le résidu sec est repris par 200  $\mu\text{l}$  de méthanol.

### *Préparation des échantillons de plasma standard*

Des quantités variables d'une solution standard de MTU sont déposées dans des tubes en verre silanisés, puis évaporées à sec sous azote. 500  $\mu\text{l}$  de plasma témoin sont ajoutés dans chaque tube. Après agitation au vortex pendant 1 min, les échantillons sont extraits comme décrit précédemment. Nous avons ajouté des quantités croissantes de MTU de façon à obtenir une échelle de concentrations finales variant de 0 à 8  $\mu\text{g/ml}$ . Pour chaque concentration, les échantillons ont été analysés en 6 exemplaires.

## RÉSULTATS

La courbe de calibration a été construite à partir des résultats du Tableau I en portant la quantité de MTU mesurée en  $\mu\text{g/ml}$  en fonction de la quantité de MTU ajoutée au plasma en  $\mu\text{g/ml}$ . Nous obtenons une très bonne linéarité pour des concentrations allant de 0 à 8  $\mu\text{g/ml}$ . Les coefficients de la droite de régression sont de 0.664 pour la pente et de 0.040 pour l'ordonnée à l'origine. Le coefficient de corrélation est égal à 0.997. La précision du dosage du MTU dans le plasma est estimée à partir des coefficients de variation indiqués dans le Tableau I. Le taux de récupération moyen du MTU est représenté par la pente de la droite de régression soit 66%.

La Fig. 1 illustre un chromatogramme typique de 50 ng de MTU standard et de 100 ng de méthyluracile (MU) standard, métabolite du MTU formé par désulfuration oxydative. Le temps de rétention du MTU dans les conditions opératoires décrites est de 3.8 min, celui du MU est de 2.8 min.

TABLEAU I

PRÉCISION DU DOSAGE DU MTU DANS LE PLASMA DE BOVIN PAR CLHP ET TAUX DE RÉCUPÉ-  
RATION

<i>Quantité de MTU ajoutée (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</i>	<i>Quantité de MTU mesurée (moyenne <math>\pm</math> écart type)* (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</i>	<i>Coefficient de variation (%)</i>	<i>Taux de récupération (moyenne <math>\pm</math> écart type) (%)</i>
1	$0.60 \pm 0.06$	10	$59.6 \pm 5.8$
2	$1.34 \pm 0.12$	8.9	$67.1 \pm 5.8$
4	$2.92 \pm 0.16$	5.4	$73.0 \pm 4.1$
8	$5.26 \pm 0.18^{**}$	3.4	$65.0 \pm 2.3$

\*  $n = 6$ .\*\*  $n = 4$ .

La Fig. 2 représente les chromatogrammes d'un échantillon de plasma témoin et du même échantillon supplémenté avec  $2 \mu\text{g/ml}$  de MTU. Il n'y a pas d'interférences gênantes au niveau du MTU.

La Fig. 3 représente le chromatogramme d'un échantillon de plasma contaminé naturellement contenant  $4.7 \mu\text{g/ml}$  de MTU.

Parmi les métabolites connus du MTU, seul le MU est détecté dans le plasma de bovin par la méthode décrite. La détection en UV a été faite à  $280 \text{ nm}$ , longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption du MTU dans le méthanol et dans

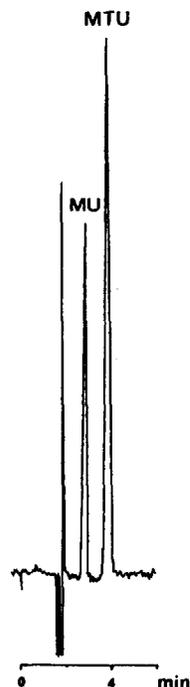


Fig. 1. Chromatogramme d'un standard MTU (50 ng) et d'un standard MU (100 ng).

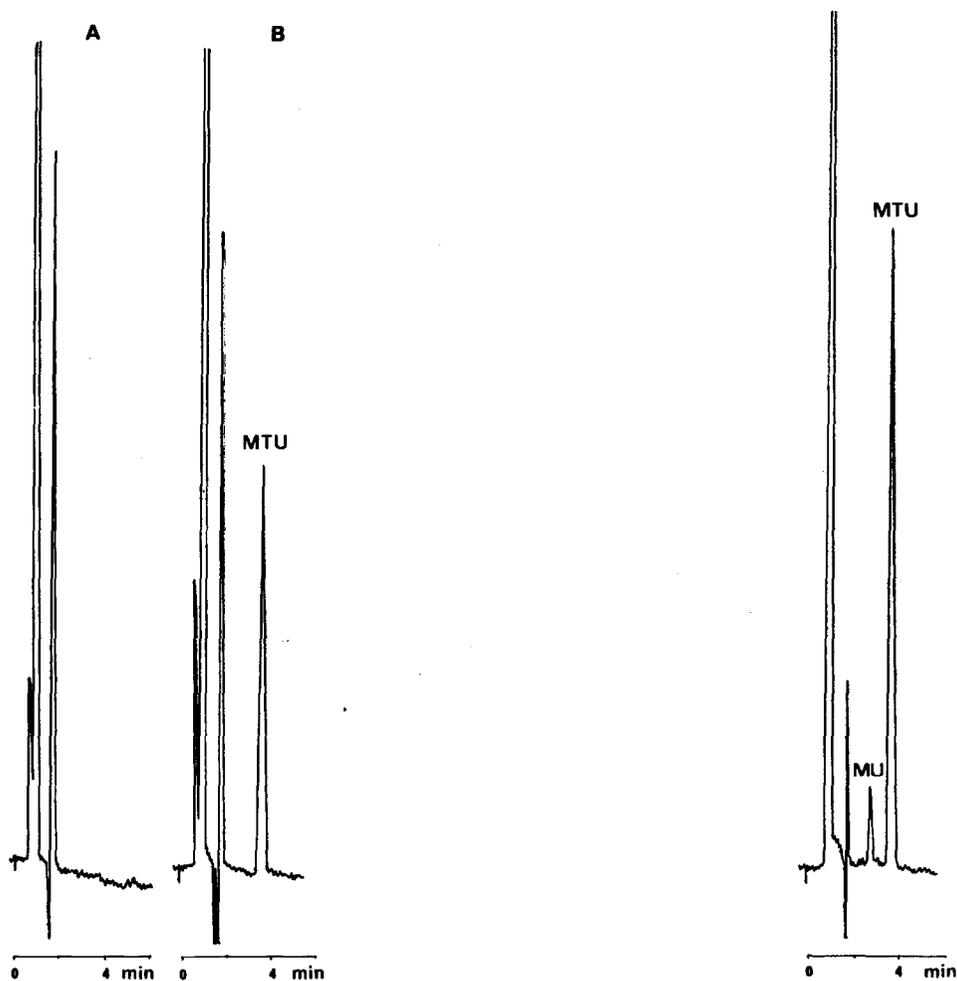


Fig. 2. Chromatogramme d'un échantillon de plasma témoin (A) et du même échantillon supplémenté avec du MTU (2  $\mu\text{g/ml}$ ) (B).

Fig. 3. Chromatogramme d'un plasma naturellement contaminé avec du MTU (4.7  $\mu\text{g/ml}$ ).

l'eau (le MU possède un maximum d'absorption à 260 nm dans les mêmes solvants et est moins bien détecté à la longueur d'onde utilisée). Le seuil de détection du MTU est voisin de 5 ng, la concentration minimale détectable dans le plasma se situe autour de 0.2 ppm sans tenir compte du taux de récupération.

#### DISCUSSION

Dans le cadre de notre expérimentation animale, notre objectif principal était de doser uniquement le MTU se trouvant sous forme libre, sachant qu'une partie du MTU n'est pas disponible. En effet, les études sur le métabolisme des thyrostatiques, en particulier du PTU et du méthimazole<sup>9,10</sup>, montrent qu'une quantité importante

de ces composés existe sous forme liée aux protéines plasmatiques (57% pour le PTU<sup>9</sup> et 40% pour le méthimazole<sup>10</sup>).

Des essais préliminaires de réaction avec le dithiotreitol qui maintient les groupements-SH dans un état réduit et qui rompt les liaisons disulfures) effectués sur des plasmas contaminés naturellement par le MTU nous donnent à penser qu'une quantité importante de MTU est liée sous forme de disulfure, probablement aux protéines plasmatiques, et se trouve libérée sous l'action du dithiotreitol (résultats non publiés). Il convenait donc de mettre au point une technique permettant de distinguer le MTU libre du MTU lié. Pour extraire le MTU libre du plasma, nous avons choisi l'acétate d'éthyle pour sa non-miscibilité à l'eau et pour son coefficient de partage vis à vis du MTU supérieur à celui d'autres solvants testés (ether, chloroforme).

Le coefficient de partage a été très nettement amélioré par l'addition d'EDTA dans le plasma. Le rendement final moyen obtenu est de 66%. De plus, l'EDTA, grâce à ces propriétés chélatantes, permet de protéger le MTU des phénomènes d'oxydation.

Pour tenter d'augmenter le taux de récupération du MTU libre, des essais d'extraction ont été effectués en milieu plasmatique tamponné (tampon phosphate ou tampon TRIS 0.1 M), à différents pH et avec ajouts de différents sels. Ces manipulations n'ont pas donné de meilleurs résultats.

Par ailleurs, il semblait aisé d'injecter directement en CLHP une partie aliquote des prélèvements plasmatiques, déprotéinisés par de l'acétonitrile. Cependant nous n'avons pas poursuivi dans cette voie pour plusieurs raisons: (a) Nous avons observé en CLHP un dédoublement du pic du MTU, fonction de la concentration en MTU et du rapport eau/acétonitrile de l'échantillon. (b) Les quelques essais d'injection directe, effectués à partir de plasmas naturellement contaminés en MTU nous ont donné des concentrations en MTU supérieures à celles obtenues par extraction à l'acétate d'éthyle en présence d'EDTA, compte tenu des taux de récupération. L'acétonitrile aurait-il une action sur certaines liaisons MTU-protéine? Ces observations demandent à être vérifiées et approfondies. (c) La durée de vie des colonnes est réduite dans ces conditions opératoires et l'utilisation de précolonnes s'impose.

Devant la complexité de ces problèmes, nous avons préféré la simplicité de l'extraction directe à l'acétate d'éthyle. Les chromatogrammes montrent que l'extrait obtenu par la méthode décrite, ne contient pas de composés susceptibles d'interférer avec le MTU ou le MU à la longueur d'onde utilisée.

Le seuil de détection du MTU, voisin de 5 ng, est tout à fait acceptable. Compte tenu du très faible bruit de fond, de la finesse des pics et de la très bonne séparation, la limite de détection de la technique peut être améliorée en augmentant la prise de l'échantillon ou en reprenant l'extrait dans un volume de méthanol plus petit.

La méthode décrite a été utilisée pour suivre l'évolution des teneurs plasmatiques en MTU chez un taurillon traité à raison de 5g/jour pendant 40 jours<sup>8</sup>. Les concentrations mesurées variaient de 0.2 à 9 µg/ml (la teneur maximale observée se situait vers le 17ème jour).

Les teneurs résiduelles en MTU dans la thyroïde, divers muscles et organes ont été déterminées par la même technique chromatographique. Les procédures d'extraction et de purification utilisées sont celles déjà décrites<sup>2</sup>. L'étape de la dérivation, nécessaire en CCM-HP dans le cas de prélèvements faiblement contaminés, est sup-

primée ici. En effet, le seuil de détection du MTU en CLHP est identique à celui obtenu, après dérivation, en CCM-HP<sup>2</sup>.

#### CONCLUSION

La détermination du MTU dans le plasma de bovin par chromatographie liquide haute performance sur phase inverse, s'est révélée être une technique d'analyse quantitative, simple et rapide, possédant une bonne sensibilité et une excellente spécificité à 280 nm. L'extraction à l'acétate d'éthyle en présence d'EDTA a permis, non seulement d'obtenir un meilleur rendement, mais aussi de protéger le MTU des phénomènes d'oxydation. Cette technique chromatographique est appliquée avec succès au contrôle de routine, la CCM-HP étant utilisée comme méthode de confirmation. Elle a permis: (a) De réduire considérablement le temps d'analyse, en supprimant l'étape de la dérivation, tout en conservant la même sensibilité et la même spécificité. (b) De quantifier les résultats. L'utilisation d'une phase inverse nous a offert la possibilité de doser le MTU dans l'urine de bovin par injection directe des prélèvements dilués.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 M. F. Pochard et M. Chevalier, *Bull. Acad. Vet. Fr.*, 56 (1983) 73.
- 2 M. F. Pochard, M. Karageorgis et M. Chevalier, *Analisis*, 11 (1983) 499.
- 3 M. Caude et Le Xuan Phan, *Chromatographia*, 9 (1976) 20.
- 4 W. Wildanger, *Chromatographia*, 8 (1975) 42.
- 5 W. Wildanger, *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, 158 (1975) 1.
- 6 H. G. Giles, R. Miller et E. M. Sellers, *J. Pharm. Sci.*, 68 (1979) 1459.
- 7 H. P. Ringhand et W. A. Ritschel, *J. Pharm. Sci.*, 68 (1979) 1461.
- 8 M. F. Pochard, M. Karageorgis et M. Chevalier, en préparation.
- 9 D. S. Sitar et D. P. Thornhill, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 183 (1972) 440.
- 10 B. Marchant et W. D. Alexander, *Endocrinology*, 91 (1972) 747.