

CHROM. 19 033

Note

Dosage de la bromadiolone (rodenticide anticoagulant) dans le plasma, le foie et le rein du rat

KAMIL NAHAS

Laboratoire d'Ecotoxicologie I.N.R.A. — E.N.V.L., Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, B.P. 31, 69752 Charbonnières Cedex (France)

(Reçu le 2 juillet 1986; manuscrit modifié reçu le 23 août 1986)

La bromadiolone, 3 - {3 - [4' - bromo(1,1' - biphenyl) - 4 - yl] - 3 - hydroxy - 1 - phenylpropyl} - 4 - hydroxy - 2H - 1 - benzopyran - 2 - one, est un rodenticide anticoagulant dérivé de l'hydroxy-4-coumarine et synthétisé par la société Liphà (France) en 1975. Son efficacité contre les rongeurs sauvages ainsi que sa toxicité pour les différentes espèces ont été largement étudiées¹⁻⁵. Aucun travail n'a jusqu'à présent fait état de sa cinétique.

Hunter^{6,7} a décrit deux méthodes analytiques pour la détermination des rodenticides anticoagulants, dont la bromadiolone, dans des tissus animaux en vue du diagnostic toxicologique. La première méthode emploie la réaction acide-base en post-colonne tandis que la seconde utilise l'appariement d'ion. Offrant une grande sensibilité, ces techniques sont difficilement applicables pour un grand nombre d'analyses, car la purification préalable se fait à l'aide d'une chromatographie liquide nécessitant un collecteur de fraction. Cette dernière méthode a été améliorée par le même auteur⁸ pour la détermination toxicologique de sept rodenticides anticoagulants en utilisant différentes méthodes de purification dont l'usage des cartouches Sep-Pak Si-60 après la chromatographie sur colonne.

Une méthode rapide, utilisant les cartouches Sep-Pak Si-60, pour la détermination des rodenticides anticoagulants autre que la bromadiolone dans les tissus animaux, a été décrite par Mundy et Machin en 1982⁹. Fasco *et al.*¹⁰ ont employé les cartouches Sep-Pak C₁₈ pour la quantification du coumafène et ses métabolites dans le plasma.

Dans le présent travail, nous décrivons une méthode pour la quantification de la bromadiolone dans le plasma, le foie et le rein de rat, par utilisation des cartouches Sep-Pak C₁₈ pour la purification et la chromatographie phase inverse avec appariement d'ion et une détection fluorimétrique.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les animaux

Rattus norvegicus souche sauvage capturé en milieu naturel. Après anesthésie à l'éther le sang est prélevé par ponction intracardiaque dans un tube de 5 ml contenant 0,1 ml de citrate de sodium. Le foie et reins sont prélevés sur le même animal.

Matériel et produits

Les solvants, acétonitrile, acétate d'éthyle, hexane, chloroforme, acétone, sont de qualité "Spectrosol" (S.D.S., Villeurbanne, France). Les cartouches Sep-Pak C₁₈ ont été fournies par Millipore (St. Quentin en Yvelines, France). L'hydroxyde de tétrabutylammonium (40%, p/v) a été fourni par Aldrich Chimie (Strasbourg, France). Tous les autres réactifs sont de qualité analytique.

La bromadiolone, mélange de deux diastéréoisomères, a été fournie par la société Lipla (Lyon, France).

Appareillage:

Le chromatographe est un appareil Hewlett-Packard HP 1080 équipé d'un injecteur automatique à volume variable et d'une colonne analytique, LiChrosorb C₁₈, 250 × 4,6 mm, granulométrie 10 µm (Merck). Le détecteur est un spectrofluorimètre Jobin-Yvon JY 3D avec une cuve à quartz de 20 µl à fente horizontale reliée à la sortie de la colonne.

Extraction et purification

Plasma. 1 ml de plasma est extrait trois fois avec 3 ml d'acétate d'éthyle. Les extraits sont regroupés et évaporés à sec sous courant d'azote à 40°C.

Le résidu sec est repris par 3 ml d'acétonitrile et 3 ml d'hexane. Après agitation et centrifugation, l'hexane est éliminé. L'acétonitrile est lavé une deuxième fois avec 3 ml d'hexane qui sont à nouveau éliminés après centrifugation. L'acétonitrile est évaporé à sec sous azote. L'extrait sec est repris dans 0,5 ml de la phase mobile.

Foie et rein. 1-2 g de tissu sont homogénéisés avec 5 g de sulfate de sodium anhydre et 30 ml du mélange acétone-chloroforme (1:1, v/v) à l'aide d'un Ultra Turrax. L'extrait est filtré sur un filtre en papier. Le résidu est reextrait avec 30 ml de mélange acétone-chloroforme. Les extraits sont regroupés et évaporés à sec sous vide avec un évaporateur rotatif. Le résidu sec est dissous dans 1 ml d'acétone et 5 ml d'un tampon phosphate 0,025 M, pH 7,4 (par passage dans une cuve à ultrason),

TABLEAU I

RENDEMENT D'EXTRACTION DANS LE PLASMA, LE FOIE ET LE REIN DE *RATTUS NORVEGICUS* SUPPLÉMENTÉS AVEC DIFFÉRENTES QUANTITÉS DE BROMADIOLONE ($m \pm$ S.D.; $n = 4$)

	Niveau de supplémentation (ppm)	Recuperation (%)
Plasma	0,02	102 ± 8
	0,2	92 ± 12
	2,0	87 ± 3
Foie	0,05	76 ± 2
	0,50	85 ± 6
	5,00	84 ± 4
Rein	0,05	93 ± 3
	0,50	89 ± 6
	5,00	93 ± 5

puis purifié sur une cartouche Sep-Pak C₁₈, préalablement rincée avec 4 ml de méthanol et 4 ml du tampon phosphate, à raison de 5 ml/min. La bromadiolone est éluée avec 1 ml du méthanol.

Analyse chromatographique

La phase mobile contient 75% de méthanol et 25% du tampon phosphate 0,025 M, pH 7,4. 0,32% de l'hydroxide de tétrabutylammonium sont ajoutés au mélange et le pH est ajusté à 7,5 avec HCl 6 N.

Pour un débit de 1 ml/min, le temps de rétention de la bromadiolone est de 7,2 min.

La détection fluorimétrique se fait à 320 nm (excitation) et 390 nm (émission).

RESULTAT ET DISCUSSION

Le rendement d'extraction de la bromadiolone dans le plasma, le foie et le rein de rat, supplémentés avec des quantités de 0,02–2 µg/ml pour le plasma et 0,05–5 µg/g pour le foie et le rein est de 76–101% (Tableau I).

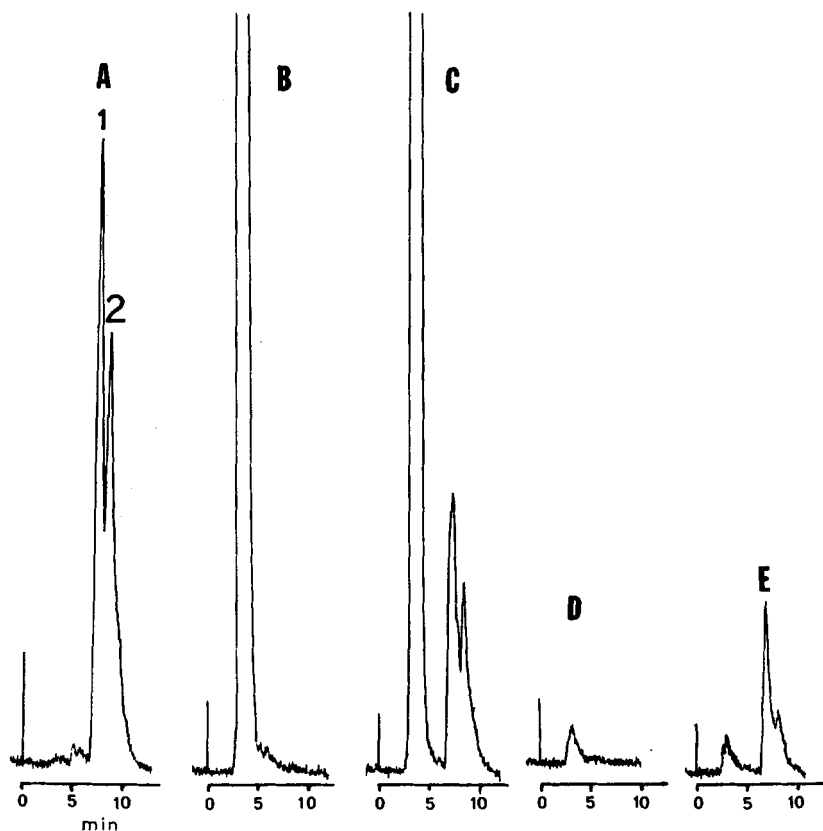


Fig. 1. Exemples de chromatogrammes chromatographie liquide à haute performance. (A) Étalon de bromadiolone 0,4 ppm 20 ng injectés: (1) isomère majoritaire, (2) isomère minoritaire. (B) Extrait de foie témoin. (C) Extrait de foie supplémenté à 0,2 ppm (10 ng injectés). (D) Extrait de plasma témoin. (E) Extrait de plasma supplémenté à 0,05 ppm (5 ng injectés).

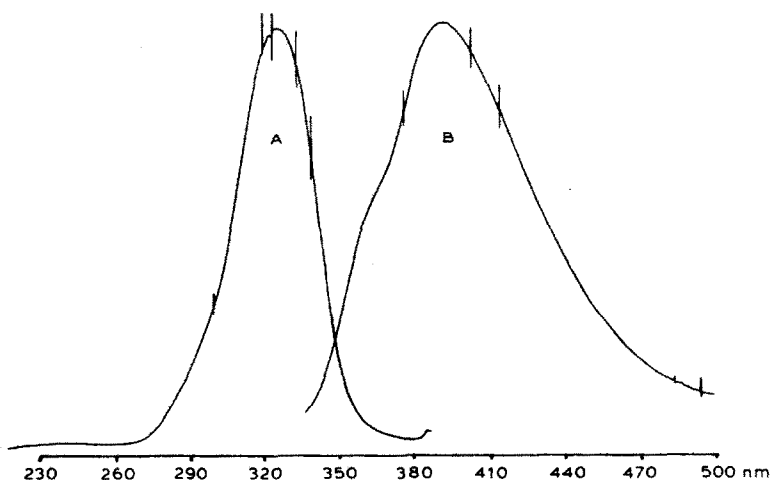


Fig. 2. Spectre de fluorescence de la bromadiolone. (A) Spectre d'excitation (émission à 390 nm); (B) spectre d'émission (excitation à 320 nm).

Le choix de longueurs d'onde d'excitation et d'émission (320 et 390 nm respectivement) correspond à la sensibilité maximale (Fig. 2). Hunter⁶ rapporte que l'excitation de la bromadiolone à 310 nm donne une réponse peu satisfaisante par rapport à celle obtenue à 250 nm.

L'utilisation du partage acétonitrile-hexane pour la purification des extraits plasmatiques permet d'éliminer un grand nombre de composés lipophiles, qui dans nos conditions chromatographiques, ne présentent pas d'interférence avec la bromadiolone, mais leur élimination permet de préserver la colonne analytique. Ce système de partage, utilisé pour purifier les extraits hépatiques et rénaux a donné peu de satisfaction au niveau du rendement d'extraction. L'emploi des cartouches Sep-Pak C₁₈ a permis d'éliminer des composés co-extraits avec la bromadiolone et qui sont susceptibles de se fixer de façon irréversible sur la colonne analytique et aussi de réaliser un grand nombre d'analyses avec rapidité et sans recourir à des appareils de chromatographie pour la purification.

Cette méthode a été utilisée pour l'étude de la cinétique plasmatique, hépatique et rénale de la bromadiolone chez *Rattus norvegicus* sauvage, et par la suite, pour la quantification plus précise des deux diastéréoisomères de la bromadiolone.

REFERENCES

- 1 M. Grand, *Phytiatr. Phytopharm.*, 25 (1976) 69.
- 2 G. Lorgue, Ch. Mally et K. Nahas, *Rec. Med. Vet.*, 4 (1985) 329.
- 3 G. Lorgue, K. Nahas, G. Keck et M. Rampaud, *12th Vertebrate Pest Conference, San Diego, CA, March 1986*.
- 4 R. E. Marsh, W. G. Howard et W. B. Jackson, *Pest Control*, 48 (1980) 22.
- 5 C. G. J. Richards, *J. Hyg.*, 86 (1981) 363.
- 6 K. Hunter, *J. Chromatogr.*, 270 (1983) 267.
- 7 K. Hunter, *J. Chromatogr.*, 270 (1983) 277.
- 8 K. Hunter, *J. Chromatogr.*, 321 (1985) 255.
- 9 D. E. Mundy et A. F. Machin, *J. Chromatogr.*, 234 (1982) 427.
- 10 M. J. Fasco, M. J. Cashin et L. S. Kaminsky, *J. Liq. Chromatogr.*, 2 (1979) 565.