

## Note

### **Analyse par chromatographie liquide haute performance ultra-rapide de la théophylline et de l'anisate de sodium (ou de potassium) dans différentes préparations pharmaceutiques**

J. THOMAS

*Laboratoire de chimie, Faculté des Sciences et Techniques, Parc de Grandmont, Tours 37200 (France)*

(Reçu le 7 mars 1989; manuscrit modifié reçu le 23 juin 1989)

L'analyse de la théophylline, bronchodilatateur traitant l'asthme<sup>1</sup>, peut être réalisée dans divers milieux selon certaines techniques<sup>2</sup>. De très nombreux travaux du domaine biomédical utilisent la chromatographie liquide haute performance (CLHP) pour la doser, ainsi par rapport à la méthode bien connue d'Orcutt *et al.*<sup>3</sup> certaines méthodes innovatrices<sup>4-14</sup> ont été décrites au cours de ces dix dernières années. Plutôt rares sont de telles applications dans le domaine pharmaceutique<sup>15-17</sup>, bien que la CLHP soit une technique pouvant être sûre et très rapide convenant alors aux analyses de médicaments réalisées en grandes séries.

Dans cette optique, nous avons eu à doser simultanément la théophylline avec l'anisate de sodium (ou de potassium) dans des formes pharmaceutiques variées et plus ou moins complexes. Une seule méthode<sup>18</sup>, du domaine biomédical, décrit l'analyse de ces deux composés. D'une part le temps d'analyse y est trop long: 6 min, et d'autre part elle n'offre pas de garantie de reproductibilité de sélectivité. En effet, le pH est tel que l'acide anisique est partiellement ionisé, or nous avons constaté que de petites erreurs de calibration du pH-mètre entraînent des variations de rétention de ce composé pouvant conduire à l'interférence, voire la coélution, avec la théophylline. Parmi les méthodes originales citées, celles utilisant le partage avec polarités de phases inversées en mode isocratique sont les plus aptes à procurer reproductibilité et gain de temps, or aucune d'elles n'est satisfaisante. En effet, dans certaines<sup>9,10,13,16</sup> le pH utilisé ionise partiellement l'un de nos composés à doser, et le temps d'analyse est en outre trop long. Du point de vue vitesse<sup>19</sup>, l'analyse peut être rapide<sup>14,17</sup>, à très grande vitesse<sup>6</sup>, voire à super vitesse<sup>7</sup>. Mais alors elle utilise un pH qui a l'inconvénient décrit précédemment avec, soit une phase mobile beaucoup trop éluante<sup>14,17</sup> s'accompagnant d'une traînée de pic<sup>17</sup> ou associée à une phase stationnaire trop faiblement sélective<sup>14</sup> vis-à-vis de nos composés, soit un matériel peu courant car spécifique à la micro-CLHP<sup>7</sup>. Si le pH est approprié<sup>11</sup>, l'analyse est trop longue. Enfin, la phase mobile peut être trop agressive rendant la méthode<sup>8,12,15</sup> difficilement utilisable en routine, avec en outre un temps d'analyse beaucoup trop long. Nous avons donc été conduits à présenter une nouvelle méthode isocratique ultra-rapide de dosage de la théophylline et de l'anisate dans diverses formes pharmaceutiques avec le souci d'offrir une excellente reproductibilité, de sélectivité notamment, obtenue dans des conditions très douces, excluant toute interférence avec les constituants des matrices, et utilisant du matériel courant.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Appareillage*

Le système comprend: une pompe (Beckman, San Ramon, CA, États-Unis) Modèle 114M, un détecteur UV (Merck, Darmstadt, R.F.A.) Modèle 655 A à longueur d'onde variable et équipé d'une cellule semi-micro de  $2,4 \mu\text{l}$ , un injecteur (Valco, Houston, TX, États-Unis) Modèle C6W avec une boucle à échantillon de  $5 \mu\text{l}$ , et un enregistreur (Kipp & Zonen, Delft, Hollande). La colonne en acier inox de  $4 \text{ cm} \times 0,46 \text{ cm I.D.}$ , est garnie de Spherisorb ODS 2,  $3 \mu\text{m}$  (Phase Separations, Norwalk, CT, États-Unis). En amont de cette colonne est placé un filtre (Rheodyne, Berkeley, CA, États-Unis) dont le fritté a pour porosité  $0,5 \mu\text{m}$ . Les tubes de connexion ont  $0,15 \text{ mm}$  ( $0,006 \text{ in.}$ ) pour diamètre interne et ils ont pour longueur:  $4 \text{ cm}$  entre l'injecteur et le filtre,  $4 \text{ cm}$  entre ce dernier et l'entrée de colonne, et  $10 \text{ cm}$  entre la sortie de colonne et le support de cellule. Le détecteur travaille avec un temps de réponse rapide:  $0,35 \text{ s}$  pour ne pas perdre l'efficacité<sup>20,21</sup> vis-à-vis du composé le moins retenu.

*Solvants, réactifs et éluant*

L'eau provient d'un système Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, États-Unis). L'acétonitrile (Carlo Erba, Milan, Italie) est de qualité CLHP. Le dihydrogénophosphate de potassium,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , et l'acide orthophosphorique ont la qualité "pour analyses". L'acide *n*-hexanoïque est distillé avant emploi. L'acide anisique (Aldrich, Steinheim, R.F.A.), la théophylline et la  $\beta$ -hydroxypropylthéophylline (Sigma, St. Louis, MO, États-Unis) ont été recristallisés avant emploi.

La phase aqueuse tamponnée contenant l'acide *n*-hexanoïque  $0,006 \text{ M}$  est préparée juste avant emploi: on mélange l'acide *n*-hexanoïque avec une solution aqueuse  $0,01 \text{ M}$  en  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; le pH est ensuite ajusté à  $6,60$  par addition de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  dilué, et cette phase aqueuse est filtrée à travers une membrane (Millipore) ayant une porosité de  $0,45 \mu\text{m}$ . L'acétonitrile est filtré sur membrane de  $0,2 \mu\text{m}$  par le fabricant.

L'éluant est ajusté à la composition: phase aqueuse précédente-acétonitrile ( $86:14, \text{v/v}$ ). Le dégazage se fait par un énergique barbotage d'hélium avant équilibration du système, puis en continu à un plus faible débit durant l'équilibration et les analyses.

*Préparation des échantillons*

Tout échantillon est amené à la même composition que celle de la phase mobile de façon à éliminer les artefacts du détecteur<sup>22</sup>, et est filtré avant l'injection à travers une membrane de cellulose régénérée (Sartorius, Göttingen, R.F.A.) de porosité  $0,2 \mu\text{m}$ .

*Solutions standards*

Chaque solution standard est préparée de façon à avoir, pour les constituants à doser, la même composition en poids que celle indiquée pour l'échantillon pratique correspondant.

*Echantillons pratiques (Théophylline Bruneau).*

*Ampoule injectable.* Le contenu d'une ampoule est versé dans une fiole jaugée de

1000 ml et l'on complète avec de l'eau pure. On prélève 1 ml que l'on mélange avec: 0,8 ml d'acétonitrile, 16,2 ml de phase aqueuse tamponnée contenant  $n\text{-C}_5\text{H}_{11}\text{COOH}$ , et 2 ml de solution à  $0,2 \text{ g l}^{-1}$  de  $\beta$ -hydroxypropylthéophylline dans l'acétonitrile. Temps total de préparation (échantillon prêt pour l'injection)  $t =$  moins de 2 min.

*Suppositoire.* Un suppositoire est introduit dans un erlen de 500 ml, puis fondu dans environ 100 ml d'eau pure à  $70^\circ\text{C}$ . Après agitation vigoureuse, refroidissement dans la glace et filtration sur Büchner, le filtrat est versé dans une fiole jaugée de 1000 ml (si le suppositoire est pour adultes), et l'on complète avec de l'eau pure. Sur 1 ml de cette solution, on effectue les mêmes opérations que celles décrites avec l'*Ampoule injectable*.  $t = 7$  min, dont 6 min pour l'extraction.

*Comprimés dragéifiés (avec et sans butobarbital).* Un comprimé dragéifié est écrasé, puis introduit dans un erlen de 250 ml. Après agitation avec de l'eau pure froide, on filtre sur Büchner. Après lavage du filtre, le filtrat est versé dans une fiole jaugée (respectivement de 500 et de 250 ml pour les comprimés sans et avec butobarbital), et on complète avec de l'eau. Avec 1 ml on procède ensuite comme avec l'*Ampoule injectable*.  $t = 7$  min, dont 6 min pour l'extraction.

*Sirap.* On mesure 10 ml de sirap que l'on introduit dans une fiole jaugée de 500 ml. On complète avec de l'eau pure. On prélève 1 ml et l'on procède comme avec l'*Ampoule injectable*.  $t =$  moins de 2 min.

Remarque: tous les prélèvements sont effectués à l'aide d'une batterie de Pipetman permettant, après éventuelle extraction, de préparer très rapidement l'échantillon pour l'injection dans le chromatographe.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Etant très répandue, bon marché, et existant en diverses tailles de granulométrie, la Spherisorb ODS-2 a été choisie comme phase stationnaire.

A pH 6,60 la théophylline ( $pK_a = 8,8$ ;  $pK_b = 13,7$ ) est sous forme neutre, tandis que l'acide anisique ( $pK_a = 4,5$ ) est pratiquement totalement ionisé. Ainsi, à cette valeur de pH nous avons vérifié que de petites erreurs de calibration du pH-mètre n'ont aucune influence sur les rétentions de ces composés, rendant invariante la résolution,  $R_s$ , notamment quand on donne à celle-ci des valeurs faibles.

Une phase mobile peu éluante [tampon aqueux, pH 6,60-acétonitrile (93:7)] parcourant une colonne (15 cm de long) remplie de Spherisorb ODS-2,  $5 \mu\text{m}$ , a d'abord été utilisée pour s'assurer qu'aucune interférence n'existe entre les composés à doser, l'étalon et les constituants des matrices des formulations les plus complexes. On a alors observé une traînée de pic ( $A_e = 4,0$ ) de l'anisate. Il a été montré que sur Spherisorb ODS-2 des interactions silanophiles se produisent avec les solutés basiques<sup>23</sup>. Avec l'ion anisate, l'échange d'ions ne peut intervenir. Quant à l'adsorption par liaison H sur des silanols résiduels acides, elle ne peut être la cause majeure de cette traînée. En effet, dans les mêmes conditions d'analyse une bien moindre traînée de pic ( $A_s = 2,0$ ) est obtenue avec l'aniline pratiquement à l'état neutre, sensiblement de même encombrement stérique que l'ion anisate et de même basicité ( $pK_b = 9,5$ ).

L'introduction dans la phase mobile d'acide hexanoïque ( $pK_a = 4,9$ ) essentiellement sous forme ionisée, procure à l'ion anisate une bonne symétrie de pic ( $A_s = 1,1$ ). En outre, la sélectivité avec la théophylline est augmentée car le temps de réten-

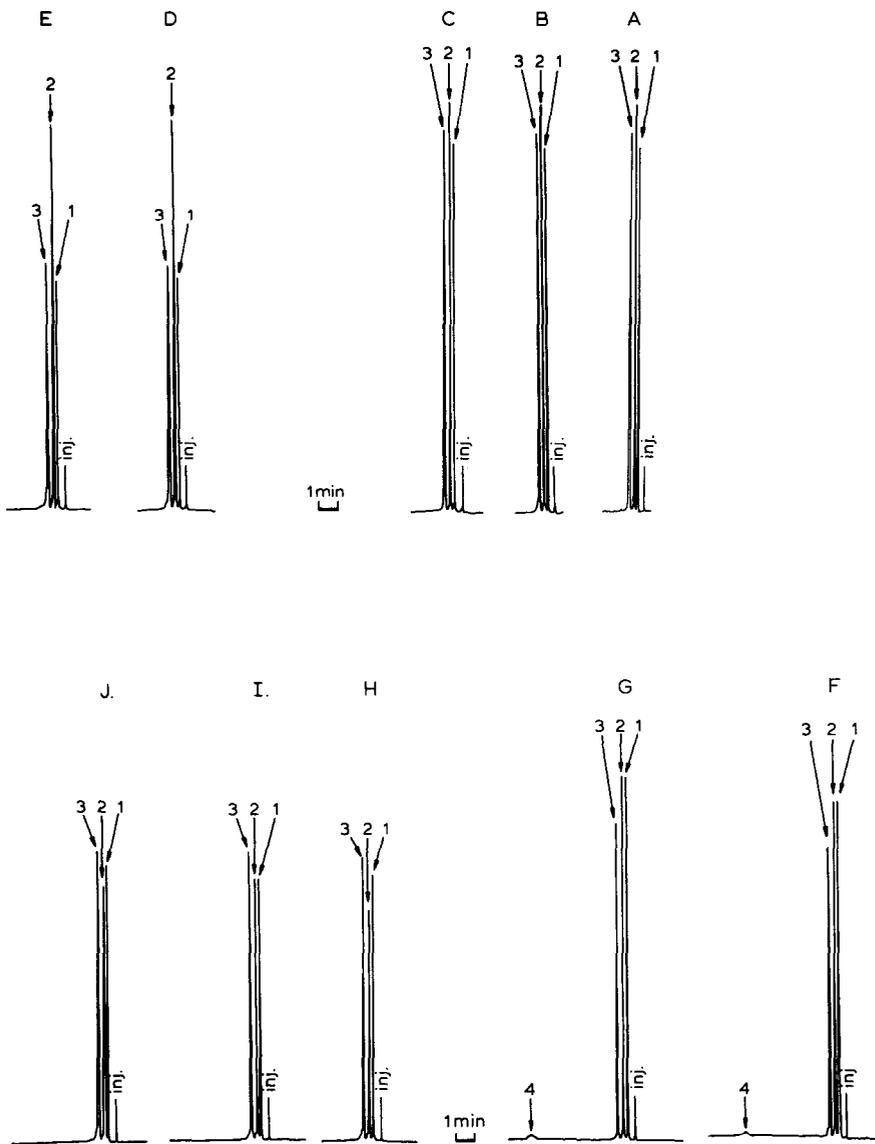


Fig. 1. Chromatogrammes types en CLHP ultra-rapide de solutions standards et d'échantillons pratiques. (A) une solution standard pour les ampoules injectables; (B) un échantillon d'ampoule pour injection par voie intraveineuse ou intramusculaire; (C) un échantillon comme le précédent, mais après 150 injections sur la même colonne; (D) une solution standard pour suppositoires; (E) un échantillon d'extrait de suppositoires pour adulte; (F) une solution standard pour sirop; (G) un échantillon de sirop; (H) une solution standard pour les comprimés dragéifiés; (I) un échantillon d'extrait de comprimé dragéifié; (J) un échantillon d'extrait de comprimé dragéifié contenant du butobarbital. Conditions: colonne, 4 cm  $\times$  0,46 cm I.D., remplie de Spherisorb ODS 2 (3  $\mu$ m); phase mobile, tampon aqueux (pH = 6,60) contenant l'acide *n*-hexanoïque (0,006 M)-acétonitrile (86:14, v/v); débit 1 ml min<sup>-1</sup>; pression, 41 bar; détection, A, B et C: 277,5 nm, D et E: 272 nm, F, G, H, I et J: 276 nm; sensibilité, 0,04 u.a.; vitesse de l'enregistreur, 5 nm min<sup>-1</sup>; température, 20  $\pm$  2°C; pics, 1 = anisate, 2 = théophylline, 3 =  $\beta$ -hydroxypropylthéophylline, 4 = hydroxy-4 benzoate de méthyle.

tion de l'anisate est diminué, devenant très proche du temps "mort". Ce qui nous fait dire qu'en présence de l'ion hexanoate un mécanisme s'apparentant à l'exclusion d'ions<sup>24,25</sup> est susceptible d'intervenir, au moins partiellement.

Notons que cet additif, moyennement hydrophobe, est éliminé facilement de la colonne en fin de manipulation.

Réalisée ensuite sur une colonne de 4 cm de long remplie de particules de 3  $\mu\text{m}$ , la séparation optimisée des composants des différents échantillons contenant l'étalon interne, est représentée sur la Fig. 1.

Sauf pour le sirop, les séparations sont réalisées en moins de 70 s en présence de l'étalon interne. Et comme nous avons, à dessein, sélectionné ce dernier notamment pour sa rétention supérieure à celles des composés à doser, l'analyse est achevée en moins de 50 s si la méthode de l'étalonnage externe est adoptée. Le comprimé contenant le butobarbital est ainsi très vite analysé (Fig. 1J) car, quand bien même ce barbiturique serait extrait, il ne peut être détecté dans nos conditions de travail. Par contre, la séparation complète des composants détectés du sirop (Fig. 1G) nécessite 6 min en raison du caractère hydrophobe de l'hydroxy-4 benzoate de méthyle.

La symétrie des pics est bonne. L'efficacité du système est de l'ordre de 1400 plateaux théoriques vis-à-vis de la théophylline conduisant à une résolution, entre cette dernière et l'anisate, légèrement inférieure à 3. Cela laisse une marge de manoeuvre

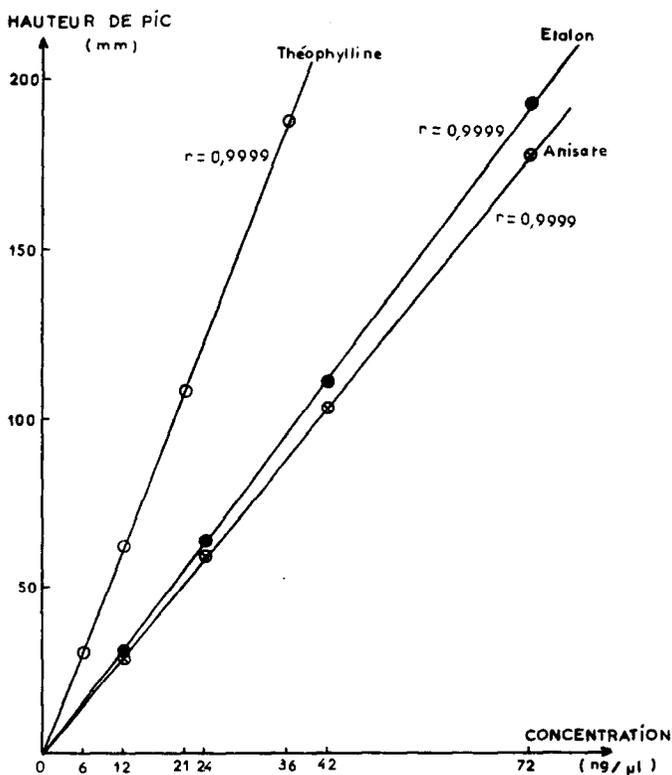


Fig. 2. Linéarité de la réponse du détecteur sur l'ensemble de la gamme des concentrations étudiées.

vre à l'utilisateur de la méthode. En effet, la faible pression (41 bar) d'une part, et la possibilité de diminuer encore  $R_s$  sans risque de recouvrement de pic d'autre part, font que l'utilisateur pourra encore gagner en temps d'analyse tout en respectant certaines exigences de résolution.

La Fig. 1C montre la séparation obtenue à partir d'un échantillon d'ampoule injectable, après 150 injections sur la même colonne, dix jours après le début des expériences, seul le fritté d'entrée de colonne ayant été changé. Au terme de cette période de tests, on constate que la résolution reste remarquablement constante. En outre, signalons que cette dernière ne subit pas de variation sensible avec de petits écarts de température autour de la normale.

Pour étudier les variations de hauteurs de pics, nous avons effectué dix injections successives d'un même échantillon issu d'une ampoule injectable. A des niveaux de concentration de  $12 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  pour la théophylline et de  $24 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  pour les autres composés, l'erreur sur la reproductibilité des hauteurs des pics est inférieure à  $\pm 1,8\%$ , la plus grande erreur affectant l'anisate élué en premier.

Concernant la courbe de réponse du détecteur, la Fig. 2 montre des relations linéaires entre les hauteurs des pics et les concentrations de solutions de théophylline, d'anisate de sodium et de  $\beta$ -hydroxypropylthéophylline, couvrant la gamme de 6–72  $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ .

La précision des résultats est calculée sur cinq échantillons préparés à partir de la même solution aqueuse (dilution à 1 l du contenu d'une ampoule injectable). L'erreur relative obtenue est inférieure à  $\pm 2\%$ .

## CONCLUSION

La méthode décrite, originale et souple, est donc applicable aux formes les plus complexes du médicament. Considérant à la fois les temps très courts, de préparation de l'échantillon, de la séparation, la méthode est cependant particulièrement appropriée pour analyser en grandes séries, avec beaucoup de sûreté, les ampoules injectables.

## RÉFÉRENCES

- 1 T. W. Rall, dans A. Goodman, L. Goodman et A. Gilman, (Rédacteurs), *Pharmacological Basis of Therapeutics*, Macmillan, New York, 6<sup>me</sup> éd., 1980, Ch. 25, p. 592.
- 2 W. J. Hurst, R. A. Martin et S. M. Tarka, *Prog. Clin. Biol. Res.*, 158 (1984) 17.
- 3 J. J. Orcutt, P. P. Kozak, Jr., S. A. Gillman et L. H. Cummins, *Clin. Chem.*, 23 (1977) 599.
- 4 K. T. Muir, J. H. G. Jonkman, D.-S. Tang, M. Kunitani et S. Riegelman, *J. Chromatogr.*, 221 (1980) 85.
- 5 P. van Aerde, E. Moerman, R. Van Seeveren et P. Braeckman, *J. Chromatogr.*, 222 (1981) 467.
- 6 P. M. Kabra et L. J. Marton, *Clin. Chem.*, 28 (1982) 687.
- 7 D. Dezaro, C. Horn et R. A. Hartwick, *Clin. Chem.*, 29 (1983) 1158.
- 8 G. Schumann, I. Isberner et M. Oellerich, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, 317 (1984) 677.
- 9 H. Ong et S. Marleau, *J. Liq. Chromatogr.*, 7 (1984) 779.
- 10 Y. H. Park, C. Goshorn et O. Hinsvark, *J. Chromatogr.*, 343 (1985) 359.
- 11 N. Grgurinovich, *J. Chromatogr.*, 380 (1986) 431.
- 12 J. J. Lauff, *J. Chromatogr.*, 417 (1987) 99.
- 13 R. Chiou, R. J. Stubbs et W. F. Bayne, *J. Chromatogr.*, 422 (1987) 281.
- 14 R. Meatherall et D. Ford, *Ther. Drug. Monit.*, 10 (1988) 101.
- 15 H. S. I. Tan, P. C. Booncong et S. L. Fine, *J. Pharm. Sci.*, 70 (1981) 783.

- 16 T.-M. Chen et L. Chafetz, *J. Pharm. Sci.*, 70 (1981) 804.
- 17 S. E. Roberts et M. F. Delaney, *J. Chromatogr.*, 242 (1982) 364.
- 18 A.-M. Brisson, D. Barthes et J.-B. Fourtillan, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 117 (1978) 115.
- 19 J. C. Gfeller, R. Haas, J. M. Troendlé et F. Erni, *J. Chromatogr.*, 294 (1984) 247.
- 20 J. L. DiCesare, M. W. Dong et L. S. Ettore, *Chromatographia*, 14 (1981) 257.
- 21 *Supelco Technical Note, HPLC Bulletin 819*, Supelco, Bellefonte, PA, 1985, p. 4.
- 22 D. A. Jowett, *Clin. Chem.*, 27 (1981) 1785.
- 23 E. Bayer et A. Paulus, *J. Chromatogr.*, 400 (1987) 1.
- 24 R. Rosset, M. Caude et A. Tardy, *Manuel pratique de chromatographie en phase liquide*, Masson, Paris, 2<sup>me</sup> éd., 1982, p. 192.
- 25 B. K. Glód, A. Piasecki et J. Stafiej, *J. Chromatogr.*, 457 (1988) 43.