

Journal of Chromatography, 164 (1979) 195–203

Biomedical Applications

© Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 385

DOSAGE DE L'HÉMISUCCINATE DE BENFURODIL DANS LE SANG ET L'URINE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE HAUTE PRESSION

A. TURCANT

Laboratoire de Pharmacologie, C.H.U., 49036 Angers (France)

M. PATAY

Laboratoire Clin-Midy, Rennes (France)

et

P. ALLAIN

Laboratoire de Pharmacologie, C.H.U., 49036 Angers (France)

(Reçu le 14 mars 1979; manuscrit modifié reçu le 11 juin 1979)

SUMMARY

High-pressure liquid chromatographic determination of benfurodil hemisuccinate in blood and urine

A sensitive and reliable method for quantitative determination of benfurodil hemisuccinate and benfurodil in plasma by high-pressure liquid chromatography on a Zorbax SIL column with a mean particle size of 7 μm and UV detection at 254 nm is described.

Benfurodil hemisuccinate is stable in plasma but not in aqueous solutions. This is explained by its great fixation to plasma proteins which has been shown by equilibrium dialysis.

INTRODUCTION

L'hémisuccinate de benfurodil est un médicament commercialisé en France sous le nom d'Eucilat* comme vasodilatateur périphérique. En l'absence de méthode spécifique de dosage dans les liquides biologiques, aucun contrôle du taux sanguin n'a pu être fait au cours des traitements.

Nous nous proposons de décrire, dans cette note, la technique de dosage de

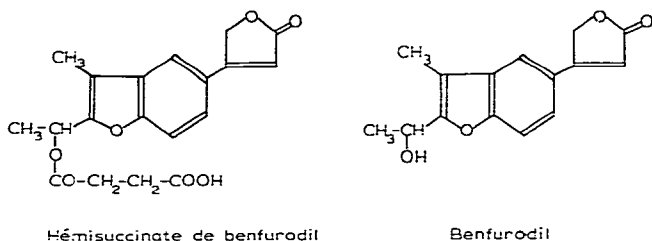


Fig. 1. Formules chimiques de l'hémisuccinate de benfurodil et du benfurodil.

l'hémisuccinate de benfurodil et du benfurodil (Fig. 1), que nous avons mis au point par chromatographie en phase liquide haute pression.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Appareils

Chromatographe en phase liquide Dupont modèle 841 avec détecteur UV à longueur d'onde fixe (254 nm), équipé d'une colonne de silice Zorbax SIL (Dupont, Wilmington, Del., É.U.) de longueur 25 cm et de diamètre intérieur 4.6 mm. Les microparticules de silice, de forme régulière sont totalement poreuses et de diamètre 6 à 8 μm . Pression 14 MPa (140 bars), vanne d'injection à six voies avec une boucle de 20 μl . Enregistreur Sefram Servotrace (déroulement 5 mm/min). Spectromètre de masse Riber (GCMS R 10-10) équipé d'une sonde d'introduction directe et d'une source à double ionisation (impact électronique et ionisation chimique) couplé à un chromatographe en phase gazeuse (Girdel série 30) équipé d'une colonne de verre SE30 (four 240°).

Dialyseur à l'équilibre Dianorm équipé de cellules de 1 ml et de membranes de cellulose "Spectrapor" (barrière moléculaire 12,000 à 14,000). Vitesse de rotation 16 tours/minute et température de dialyse à 37°.

Réactifs

Phase mobile: hexane, dichlorométhane, chloroforme, alcool isopropylique (Merck, Darmstadt, R.F.A., qualité pour analyses). acide acétique (Prolabo, Paris, France, Normapur) 64, 20, 10, 5, 1. Débit 0.6 ml/min à température ordinaire.

Tampon acétate 0.5 M (pH 4.8). Tampon phosphate 0.5 M (pH 6.4). Sulfate de sodium. Le N-butyryl *p*-aminophénol à 50 mg/l dans l'acétone est utilisé comme étalon interne.

Technique

Les dosages sont effectués par chromatographie en phase liquide haute pression.

Dosage dans le plasma. On mélange 500 μl de plasma obtenu par centrifugation et 100 μl de solution étalon, puis on ajoute 500 μl de tampon acétate 0.5 M (pH 4.8), 10 ml de chloroforme et on agite pendant 1 min. La phase aqueuse est éliminée et la phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée. Le résidu est repris par 200 μl de mélange d'élution et 20 μl de cette solution sont alors injectés sur la colonne du chromatographe.

Dosage dans l'eau et les urines. Le dosage est effectué selon un protocole très voisin en remplaçant le tampon acétate par un tampon phosphate 0.5 M (pH 6.4) afin d'éliminer des pics urinaires interférants avec les produits dosés.

Étude de la stabilité. Au cours des essais préliminaires, nous avons remarqué que l'hémisuccinate de benfurodil s'hydrolyse en benfurodil dans les urines même conservées à 4° alors qu'il est stable dans le plasma. Cette observation nous a conduit à étudier plus en détail la stabilité de ce médicament dans divers milieux (plasma, urines, eaux à différents pH) à 37° et en fonction du temps (0, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h).

Étude de la fixation aux protéines plasmatiques. Le plasma surchargé en hémisuccinate de benfurodil a été dialysé contre du liquide physiologique, dépourvu de protéines. Du liquide physiologique surchargé en hémisuccinate de benfurodil a été dialysé dans les mêmes conditions. Cinq prélèvements ont été effectués aux temps $t = 15$ min, 30 min, 45 min, 1 h, 1 h 30 min pour la détermination des taux de benfurodil et d'hémisuccinate de benfurodil de part et d'autre de la membrane.

RÉSULTATS

Séparation chromatographique

La chromatographie en phase liquide permet, comme le montre la Fig. 2, une

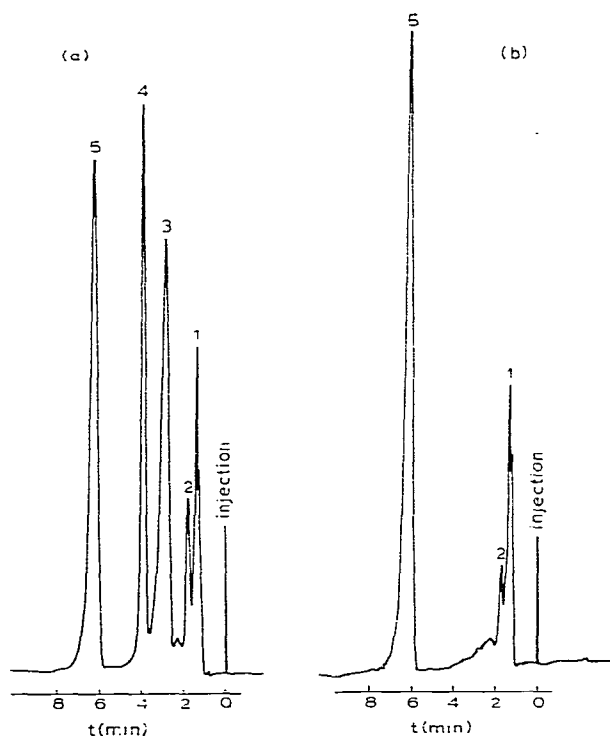


Fig. 2. Chromatogramme de l'hémisuccinate de benfurodil et du benfurodil après extraction plasmatique (a), et d'un blanc plasmatique (b). 1 et 2: pics plasmatiques non identifiés; 3: hémisuccinate de benfurodil 5 mg/l; 4: benfurodil 2 mg/l; 5: N-butryl *p*-aminophénol, étalon interne. Colonne Zorbax SIL.

bonne séparation de l'hémisuccinate de benfurodil et du benfurodil. La droite d'étalonnage est obtenue, après addition à un plasma témoin de quantités connues d'hémisuccinate de benfurodil (0–20 mg/l) et d'une quantité constante d'étalon interne (N-butyryl *p*-aminophénol), en calculant le rapport des hauteurs de pics respectifs. D'autre part, les chromatogrammes d'extraits plasmatiques ou urinaires de sujets non traités ne présentent pas de pic au niveau de l'étalon, ni au niveau des produits étudiés.

Sensibilité

La sensibilité de la méthode est pour l'hémisuccinate de benfurodil de 100 ng/ml dans le plasma et 300 ng/ml dans les urines et pour le benfurodil de 20 ng/ml dans le plasma et les urines.

Reproductibilité

La reproductibilité a été étudiée en effectuant huit dosages sur deux échantillons de plasma témoin, surchargé l'un par l'hémisuccinate de benfurodil à raison de 10 mg/l, l'autre par le benfurodil à raison de 2.5 mg/l. Nous avons trouvé 9.95 ± 0.32 mg/l pour le premier et 2.5 ± 0.1 mg/l pour le second.

Stabilité

Les résultats, rassemblés dans les Figs. 3 et 4, montrent que l'hémisuccinate de benfurodil est stable dans le plasma, alors qu'il s'hydrolyse en benfurodil dans l'urine et l'eau (environ 60% au bout de 4 h). L'augmentation du taux de benfurodil correspond à la décroissance du taux d'hémisuccinate de benfurodil et la vitesse d'hydrolyse, qui augmente avec l'acidité, devient très importante à

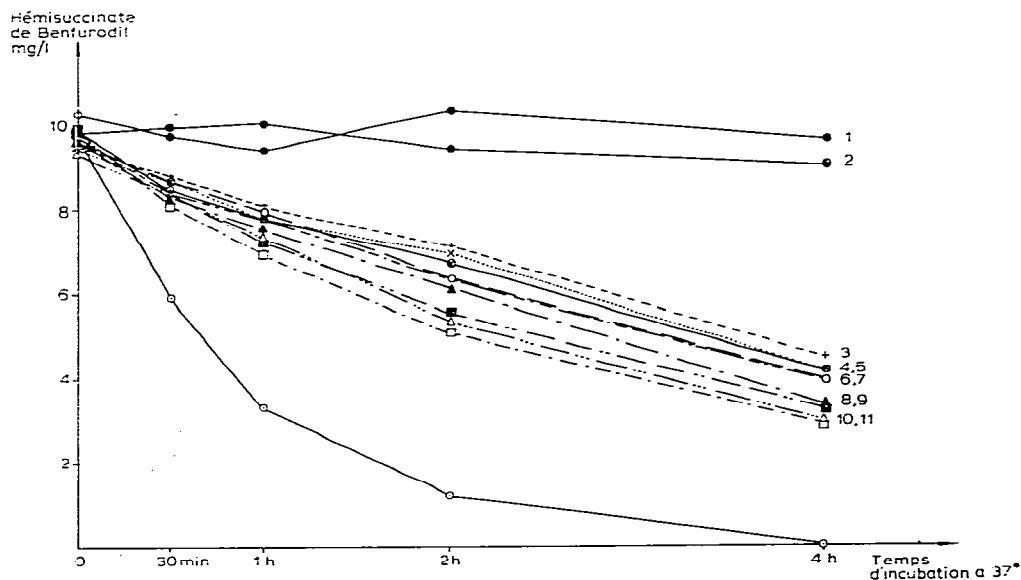


Fig. 3. Étude de la stabilité de l'hémisuccinate de benfurodil dans différents milieux en fonction du temps. 1, 2: plasma; 3: eau (pH 7.0); 4: eau (pH 6.0); 5: urines (pH 7.0); 6: eau (pH 7.4); 7: urines (pH 5.0); 8: eau (pH 5.0); 9: eau + glucose 5%; 10: eau; 11: eau + NaCl 0.9%; 12: eau (pH 1.5).

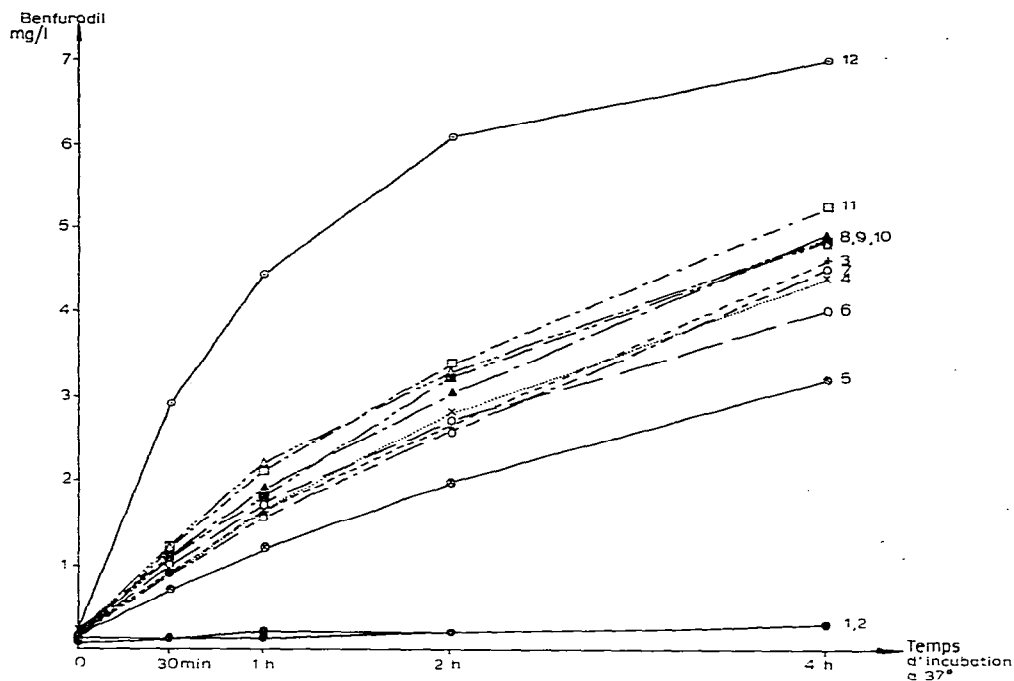


Fig. 4. Taux de benfurodil provenant de l'hydrolyse de l'hémisuccinate de benfurodil dans divers milieux en fonction du temps.

pH 1.5, pH voisin de celui du liquide gastrique.

Dans une expérience similaire, nous avons démontré la stabilité du benfurodil.

Fixation aux protéines

Le Tableau I montre que la fraction d'hémisuccinate de benfurodil introduit dans le plasma, qui dialyse en une heure, est voisine de 2% seulement, alors qu'elle atteint près de 50%, c'est-à-dire l'équilibre, après surcharge du liquide physiologique. Ces résultats peuvent s'expliquer par une fixation importante de ce médicament aux protéines.

TABLEAU I

ÉTUDE DE LA FIXATION AUX PROTÉINES PAR DIALYSE À L'ÉQUILIBRE EN FONCTION DU TEMPS

Temps	Plasma surchargé		Fraction dialysée	
	Hémisuccinate de benfurodil (mg/l)	Benfurodil (mg/l)	Hémisuccinate de benfurodil (mg/l)	Benfurodil (mg/l)
0	10.30	0.03		
15 min	9.70	0.04	0.15	<0.02
30 min	9.95	0.04	0.15	<0.02
45 min	9.75	0.06	0.15	<0.02
1 h	10.15	0.05	0.20	0.02
1 h 30 min	9.25	0.08	0.20	0.02

DISCUSSION

La chromatographie en phase liquide a été préférée à la chromatographie en phase gazeuse car, avec cette technique, les deux produits non dérivés trainent sur la colonne et la sensibilité n'est pas bonne. D'autre part, les essais de

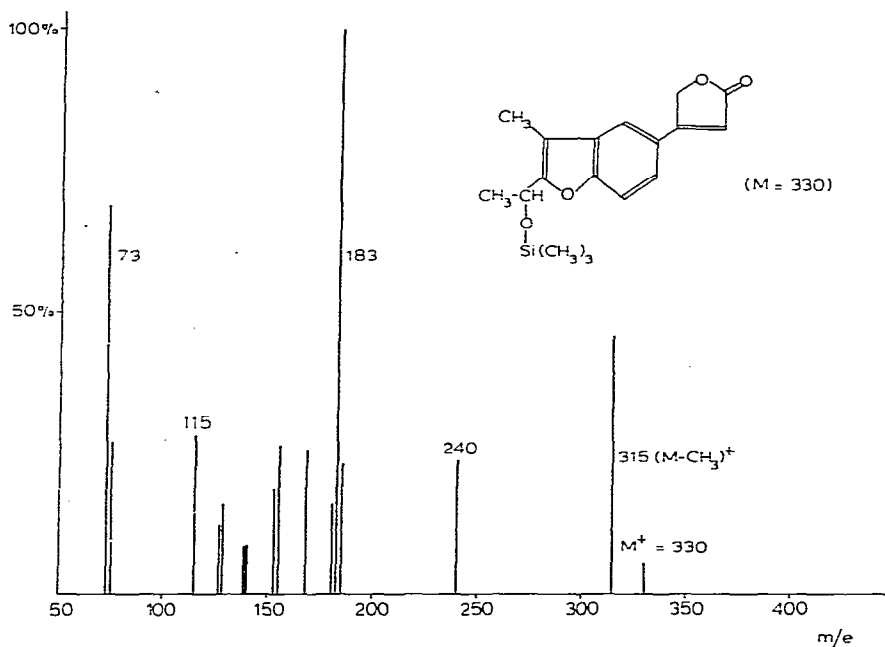


Fig. 5. Spectre de masse du benfurodil silylé obtenu par couplage-impact électronique.

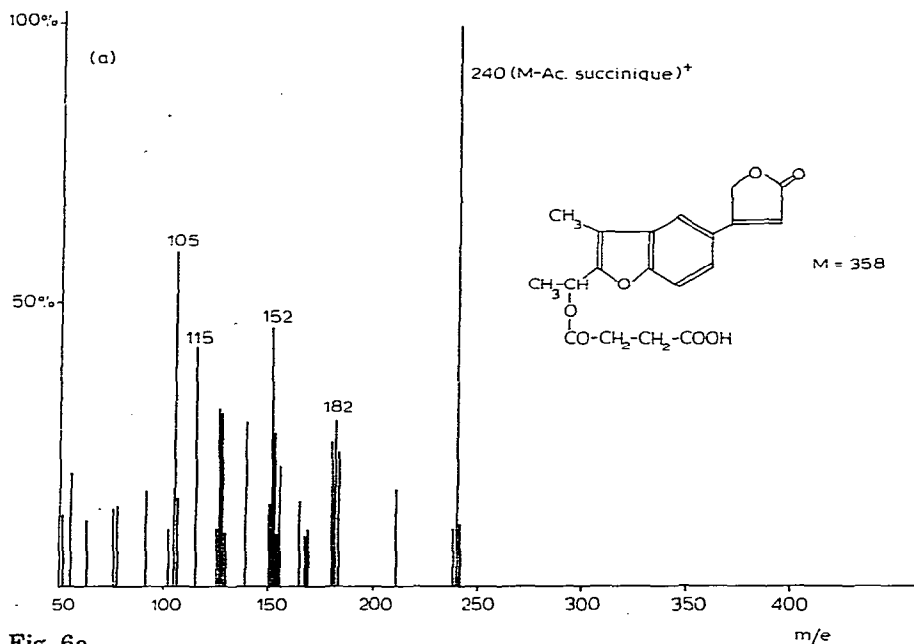


Fig. 6a.

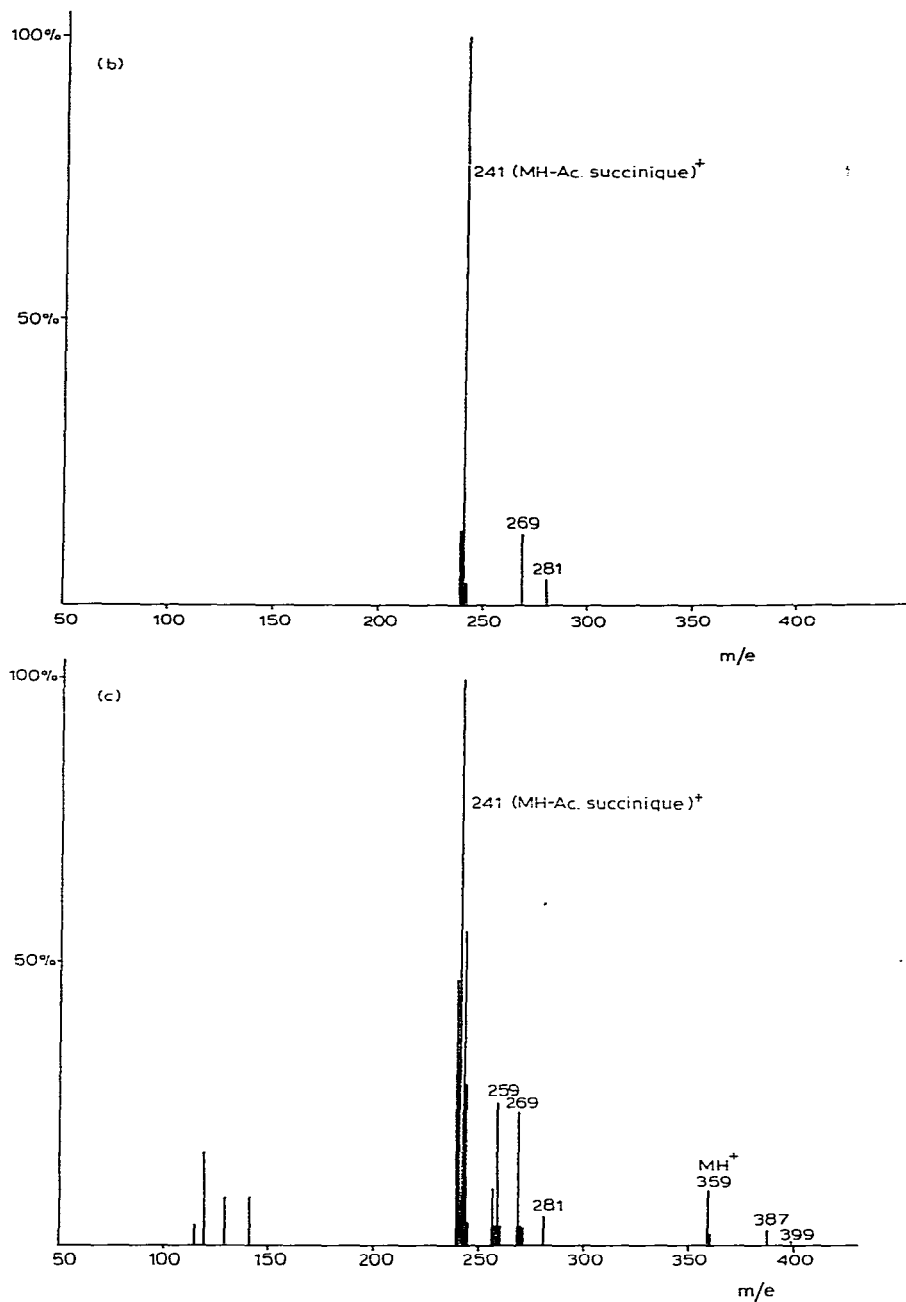


Fig. 6. Spectres de masse de l'hémisuccinate de benfurodil obtenus (a) par couplage-impact électronique; (b) par couplage-ionisation chimique méthane; (c) par introduction directe-ionisation chimique méthane.

dérivation ont montré une décomposition de l'hémisuccinate de benfurodil qui donne plusieurs pics. Toutefois, nous avons pu obtenir les spectres de masse des deux produits sans dérivation pour l'hémisuccinate de benfurodil et après silylation pour le benfurodil.

Le spectre de masse du benfurodil silylé (Fig. 5) présente bien l'ion moléculaire ($M^+ = 330$).

Les spectres de l'hémisuccinate de benfurodil, non dérivé, obtenus par introduction directe et par couplage chromatographie en phase gazeuse—spectrométrie de masse sont indiqués sur la Fig. 6.

En introduction directe, le pic moléculaire de l'hémisuccinate de benfurodil ($M^+ = 358$) n'est pas obtenu en ionisation par impact électronique ni en ionisation chimique par l'ammoniac, mais seulement en ionisation chimique par le méthane.

En couplage chromatographie—spectrométrie de masse, on n'obtient pas le pic moléculaire ($M^+ = 358$) ni en ionisation par impact électronique, ni en ionisation chimique, mais le spectre du produit extrait du plasma de deux sujets traités est absolument identique à celui de l'hémisuccinate de benfurodil pur, préparé dans les mêmes conditions.

L'hémisuccinate de benfurodil apparaît donc comme un produit instable qui s'hydrolyse en milieu aqueux et se décompose au cours des essais de séparation par chromatographie en phase gazeuse. La chromatographie en phase liquide se révèle donc la méthode de choix pour sa séparation et son dosage. Sa stabilité dans le plasma par rapport à l'eau s'explique très vraisemblablement par sa grande fixation aux protéines plasmatiques que nous avons pu mettre en évidence.

La Fig. 7 montre l'évolution des concentrations sanguines d'hémisuccinate de benfurodil après administration orale de 150 mg de ce produit chez un individu normal, le benfurodil n'apparaissant qu'à l'état de traces.

Les résultats de l'étude pharmacocinétique de l'hémisuccinate de benfurodil sont détaillés dans une autre publication [1].

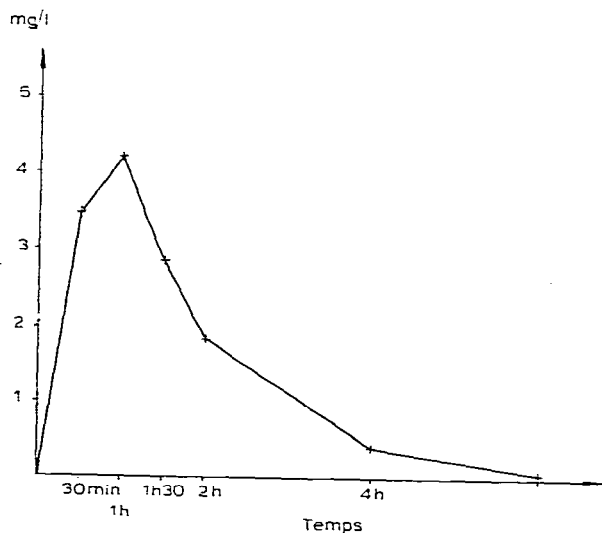


Fig. 7. Concentrations sanguines de l'hémisuccinate de benfurodil après administration orale de 150 mg.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Mademoiselle C. Laisné pour la dactylographie de ce texte.

RÉSUMÉ

Nous proposons une méthode simple et reproductible de dosage de l'hémisuccinate de benfurodil et du benfurodil par chromatographie en phase liquide haute pression sur colonne Zorbax SIL et détection UV à 254 nm.

L'hémisuccinate de benfurodil est stable dans le plasma alors qu'il s'hydrolyse en benfurodil en milieu aqueux. Cette stabilité peut s'expliquer par la fixation importante de ce médicament aux protéines plasmatiques.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 A. Turcant, J.L. Verret, B. Schubert, M. Patay et P. Allain, *Thérapie*, sous presse.