

Journal of Chromatography, 272 (1983) 385–391

Biomedical Applications

Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 1512

Note

Dosage du diltiazem plasmatique par chromatographie en phase gazeuse

R. CALAF

Laboratoire de Biochimie II, Groupe Hospitalier de la Timone, 27, Boulevard Jean Moulin, 13385-Marseille-Cedex 5 (France)

P. MARIE

Laboratoire de Biochimie, Centre Hospitalier Général, Avenue Colonel Picot, 83100-Toulon (France)

Cl. GHIGLIONE

Laboratoire de Chimie Organique, Faculté de Pharmacie, 27, Boulevard Jean Moulin, 13385-Marseille-Cedex 5 (France)

M. BORY

Service de Cardiologie, Groupe Hospitalier de la Timone, 27, Boulevard Jean Moulin, 13385-Marseille-Cedex 5 (France)

et

J. REYNAUD*

Laboratoire de Biochimie II, Groupe Hospitalier de la Timone, 27, Boulevard Jean Moulin, 13385-Marseille-Cedex 5 (France)

(Reçu le 13 juillet 1982; manuscrit modifié reçu le 22 septembre 1982)

Le diltiazem est utilisé dans le traitement de l'angor pour ses propriétés anticalciques [1]. La technique de chromatographie en phase gazeuse décrite par Rovei et al. [2] permet de le doser avec une sensibilité de 10 ng/ml dans le plasma des patients traités.

Nous avons tenté d'améliorer cette technique en la rendant plus rapide et plus sensible; les modalités d'extraction ont été simplifiées et un étalon interne de structure très voisine de celle du diltiazem a remplacé le cyclopam.

MATÉRIALS ET MÉTHODES

Standard et réactifs

Diltiazem (Tildiem[®]) (DTZ) et désacétyldiltiazem (DAD) ont été fournis par les Laboratoires Dausse, Paris, France; le prazépam (PZP) par le Laboratoire Substantia, Courbevoie, France; le propionyl-désacétyldiltiazem (PDAD) et le butyryl-désacétyldiltiazem (butyryl-DAD) ont été préparés par hémisynthèse selon les modalités évoquées plus loin.

Les réactifs utilisés sont: la pyridine, le chlorure de butyryle, le chlorure de propionyle, le bicarbonate de sodium, le *n*-hexane, l'acétate d'éthyle (tous de Merck, Darmstadt, R.F.A.), le N,O-bis(triméthylsilyl)acétamide (BSA) (de Pierce, Rockford, IL, E.U.) et une solution tampon NaH₂PO₄, K₂HPO₄ 0.1 M, pH 7.

Appareillage

L'appareil de chromatographie en phase gazeuse Perkin-Elmer F-30 équipé d'un détecteur azote-phosphore (NPD) a été utilisé avec une colonne de verre de 2 m × 4 mm (I.D.) contenant du Chromosorb W HP (100–120 mesh) imprégné de OV-17 à 1% (Alltech Assoc.). La colonne a été préalablement conditionnée durant 36 h à 300°C sous un débit d'azote de 40 ml/min.

Conditions opératoires

Les dosages ont été effectués en utilisant l'hélium comme gaz vecteur avec un débit de 40 ml/min à une température d'injection et de détection commune de 350°C. La température du four a été fixée à 280°C et la polarité du détecteur à -180 V avec des débits de 2 ml/min pour l'hydrogène et de 100 ml/min pour l'air.

Étalon interne

Le butyryl-désacétyldiltiazem (butyryl-DAD) a été choisi comme étalon interne. Il a été préparé au laboratoire par hémisynthèse selon Kugita et al. [3] à partir du désacétyldiltiazem (DAD). Après avoir mélangé pendant 1 h à 4°C 800 mg de DAD et 3 ml de pyridine, on met en contact ce mélange avec 0.28 ml de chlorure de butyryle pendant 20 h à la même température avant d'ajouter 10 ml d'eau glacée. Après 10 min, on extrait le butyryl-DAD formé en agitant le tout en présence de 15 ml de chloroforme dans une ampoule à décanter. Cette opération d'extraction est effectuée à quatre reprises avec la même quantité de chloroforme en laissant décanter chaque fois durant 10 min. Après trois lavages successifs de l'extrait chloroformique par un égal volume de bicarbonate à 5% et deux lavages par un égal volume d'eau, le pH doit être voisin de 7. On évapore alors sous vide la phase chloroformique. Le butyryl-DAD ainsi purifié se présente sous la forme d'une huile jaune; il est solubilisé dans la pyridine et conservé à 4°C. Le titre final de la solution est égal à 160 mg/l.

L'identification du butyryl-DAD a été effectuée par spectrophotométrie IR (Perkin-Elmer, 157 G), par spectrométrie RMN (Cameca, 250 MHz) et spectrométrie de masse (SM) (Ribermag). Les données expérimentales sont les suivantes:

IR: (pastille KBr) 1672 cm^{-1} (>=O , hétérocyclique; 1750 cm^{-1} (>=O , ester);
 NMR: (CDCl_3 - étalon interne TMS). Protons aromatiques: (7.60, doublet, H), (7.38, multiplet, 2H), (7.20, multiplet, 3H), (6.85, doublet, 2H). Protons hétérocycliques: (5.10, doublet dédoublé, 2H), $\text{CH}_3\text{-O-}$ (3.80, singulet, 3H) - $(\text{CH}_3)_2\text{N-}$ (2.24, singulet, 6H) - $\text{CH}_3\text{(c)-CH}_2\text{(b)-CH}_2\text{(a)-}$: $\text{CH}_3\text{(c)}$ - (0.94, triplet, 3H) - $\text{CH}_2\text{(b)}$ (1.48, quadruplet, 2H) - $\text{CH}_2\text{(a)}$: (2.12, quadruplet, 2H);
 SM: [ionisation électronique et ionisation chimique (NH_3)] : M^\ddagger : 442.

Étalons et échantillons plasmatiques

Un pool de plasmas a été constitué pour le contrôle des critères de qualité de la méthode. A partir de ce pool, une gamme de plasmas surchargés en DTZ a été préparée avec les titres suivants: 0 (blanc plasmatique), 25, 50, 100, 200

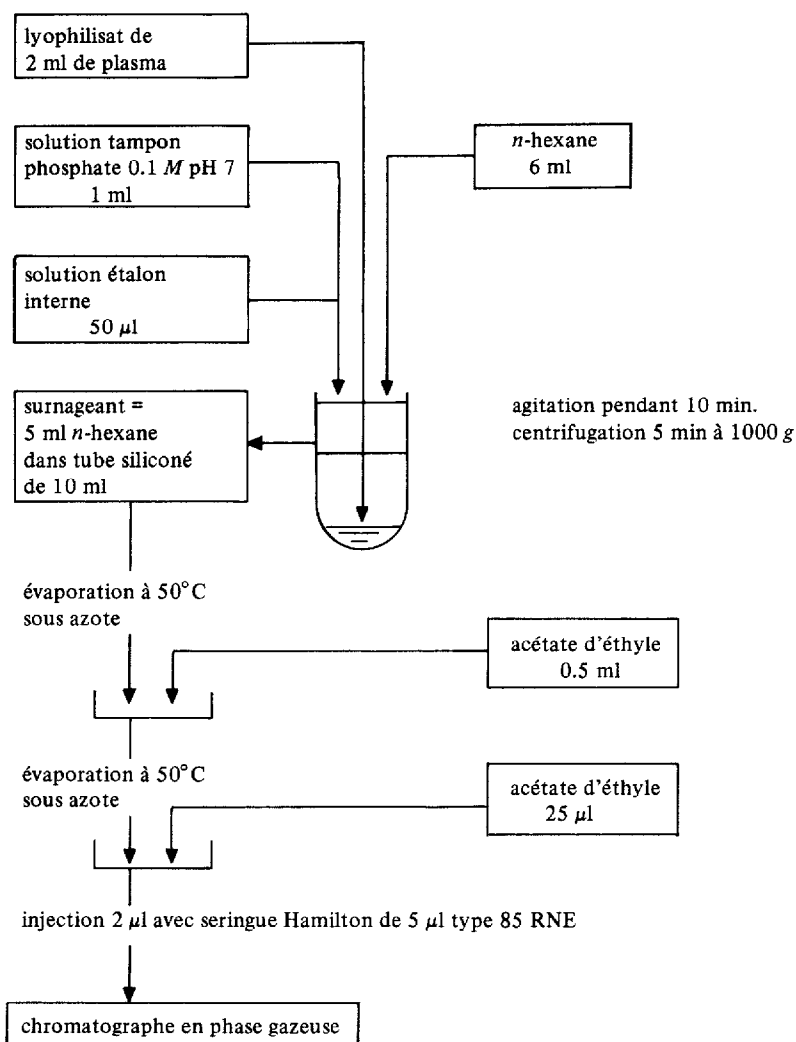


Fig. 1. Procédé d'extraction du diltiazem (DTZ) et butyryldésacétyldiltiazem (butyryl-DAD).

et 400 ng DTZ/ml. Chaque élément de cette gamme a fait l'objet de trois dosages selon le même protocole que celui auquel sont soumis les essais.

Deux ml de chaque étalon et échantillon plasmatiques sont lyophilisés dans un tube Sovirel de 10 ml (réf.: 732-01, diam. 15 mm).

Extraction et expression des résultats

Les lyophilisats sont traités d'après les indications mentionnées dans la Fig. 1.

Les concentrations sont calculées à partir de la droite d'étalonnage déterminée par les rapports des hauteurs de pics d'enregistrement DTZ/butyryl-DAD des étalons plasmatiques mesurés en fonction de la concentration en DTZ ou encore à partir du rapport des pics d'enregistrement DTZ/butyryl-DAD pour la valeur de 100 ng/ml (Fig. 2).

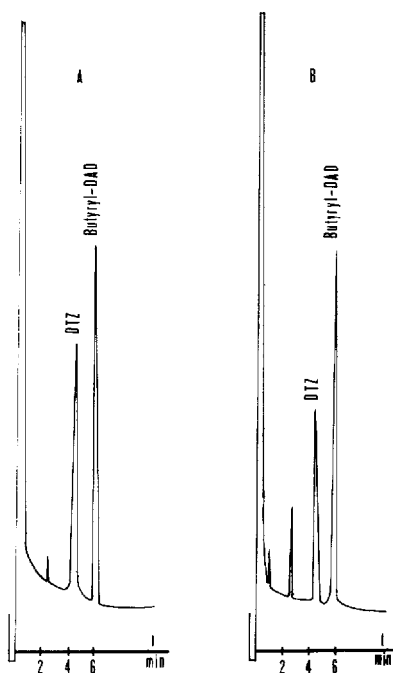


Fig. 2 (A) Chromatogramme d'un extrait plasmatique surchargé en diltiazem (DTZ) (100 ng/ml) et de son étalon interne butyryldésacétyldiltiazem (butyryl-DAD). (B) Chromatogramme de l'extrait plasmatique d'un patient traité au DTZ et de l'étalon interne butyryl-DAD; la concentration plasmatique est de 76 ng/ml 3 h après la dernière dose de DTZ administrée (3 doses de 60 mg/jour).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Afin de tester la fiabilité de notre technique (M_2) et ne disposant pas de l'étalon interne préconisé par Rovei et al. [2] (cycloпам), nous avons effectué une étude comparée en utilisant la technique de cet auteur (M_1) avec le butyryl-DAD comme étalon interne. De ce fait, notre discussion portera essentiellement sur les procédés de traitement du plasma et la technique d'extraction comparés.

Traitement des plasmas et procédé d'extraction

La méthode M_1 implique la congélation des échantillons de plasma si le laboratoire n'a pas mission d'effectuer une série de dosages chaque jour. Ce procédé de conservation a l'inconvénient de faire apparaître un insoluble après décongélation. Cet inconvénient se surajoute à celui d'une gélification qui se développe fréquemment en raison du rapport de phases important (phase aqueuse—phase organique, 3:6, v/v) lors de la première étape d'extraction.

La méthode M_2 évite ces deux inconvénients en préconisant la lyophilisation des plasmas. Les plasmas sont congelés au fur et à mesure de leur arrivée puis lyophilisés en série. La redissolution des constituants plasmatiques dans 1 ml de tampon est complète et le rapport de phases (1:6, v/v) est suffisamment faible pour éviter une gélification parasite.

En outre, l'efficacité de l'extraction qui résulte de ce rapport et de l'absence de cette gélification présente un gain de temps non négligeable en évitant de procéder à une deuxième extraction.

Étalon interne

Le butyryl-DAD est certainement préférable au cyclopam préconisé par la méthode M_1 en raison de sa similitude structurale avec le DTZ qui lui confert un comportement lors de l'extraction et un temps de rétention chromatographique (6 min) les plus proches de ce dernier (4 min).

Le butyryl-DAD a fait l'objet d'une étude comparée avec d'autres étalons internes tels que le prazépam (PZP) et le propionyl-désacétyldiltiazem (propionyl-DAD). Le PZP a été abandonné en raison de son temps de rétention inférieur à 2 min et de son éventuelle interférence lorsqu'il est utilisé en thérapeutique.

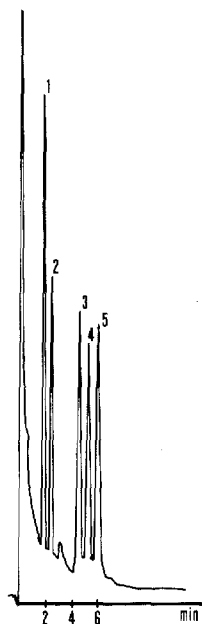


Fig. 3. Chromatogramme d'un mélange des cinq substances étalons utilisées: prazépam (1), désacétyldiltiazem (2), diltiazem (3), proprionyl-désacétyldiltiazem (4) et butyryl-désacétyldiltiazem (5).

Bien que comparable au butyryl-DAD par son inertie métabolique et son rendement d'extraction, le propionyl-DAD a été également abandonné pour son temps de rétention trop proche (5 min) de celui du DTZ le rendant ainsi presque confluent avec ce dernier lors de l'enregistrement (Fig. 3).

Le comportement du butyryl-DAD se révèle le même avec les deux méthodes M_1 et M_2 : les hauteurs des pics d'enregistrement qui lui correspondent suivent une loi normale (test de Kolmogorof), leurs variances sont comparables (test de Student, M_1 : 130 ± 44 mm, M_2 : 140 ± 26 mm).

Répétabilité

Le coefficient de variation de 9 dosages d'un même pool de plasmas renfermant 100 ng DTZ/ml est de 1.5%.

Reproductibilité

Le coefficient de variation de 13 dosages de ce même pool de plasmas effectués chacun dans une série différente est de 5.5%.

Précision

L'analyse de variance entre la variable (hauteur du pic DTZ/hauteur du pic butyryl-DAD \times conc. théorique) et ses facteurs méthode, concentration et interaction méthode—concentration, ne montre aucune différence significative entre elles dans la marge de concentration de 25–400 ng DTZ/ml de plasma.

Exactitude

Les concentrations déterminées avec les deux méthodes M_1 et M_2 sont corrélées avec un coefficient de régression $r = 0.999$.

Linéarité

Les courbes d'étalonnage couvrant les concentrations C thérapeutiques habituelles de 25–400 ng DTZ/ml sont linéaires pour les deux méthodes. Avec la méthode M_1 , le coefficient de régression r est de 0.999 avec une équation de droite: $Y = 0.552 C - 0.9$; avec la méthode M_2 , $r = 0.998$, $Y = 0.558 C + 0.36$, en posant $Y =$ hauteur du pic DTZ/hauteur du pic butyryl-DAD.

Sensibilité

La sensibilité "pratique", correspondant à la concentration minimum décelable (3 fois le bruit de fond de l'appareil dans nos conditions opératoires) est de 1 ng/ml.

Spécificité

En montrant la bonne individualisation des produits étudiés, la Fig. 3 reflète la bonne spécificité de la méthode M_2 .

Interférences

Nous avons procédé à deux types d'essais qui s'accordent pour confirmer la spécificité de la méthode M_2 par l'absence d'interférences avec d'autres substances:

- (1) L'étude comparée du comportement chromatographique de diverses

substances susceptibles d'interférer avec le DTZ sur la colonne OV-17, 1% démontre que les températures utilisées pour les éluer en moins de 10 min sont toutes inférieures à celle de 280°C préconisée dans notre méthode M₂ pour l'élution du DTZ et du butyryl-DAD:

200°C: théophylline, phénobarbital, heptabarbital,

220°C: diphénylhydantoïnes,

250°C: imipramine, amitriptyline,

250–270°C: diazépam, clobazam, clonazépam, prazépam.

(2) D'après l'étude faite sur 54 patients hospitalisés, les médicaments associés au DTZ n'introduisent aucune interférence.

CONCLUSION

Cette méthode, utilisée depuis deux ans dans notre laboratoire, se révèle être bien adaptée aux examens de routine hospitaliers et permet, une fois la lyophilisation effectuée (de nuit), de traiter 30 plasmas en une demi-journée.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 R.J. Bing (Editor), Diltiazem Hakone Symposium, 23–25 Sept. 1978, Hakone, Japan, Int. Congress Series, Excerpta Medica, Amsterdam, Vol. XIII, 1979, 257 pp.
- 2 V. Rovei, M. Mitchard et P.L. Morselli, *J. Chromatogr.*, 138 (1977) 391–398.
- 3 H. Kugita, M. Ikezaki, M. Konda and S. Takano, *Chem. Pharm. Bull.*, 19 (1971) 595–602.