

CHROMBIO. 1594

Note**Dosage de l'antipyrine dans le plasma et la salive par chromatographie liquide haute-performance chez l'homme**

L. DOARE, C. COLIN et B. DIQUET*

Laboratoire de Pharmacocinétique Clinique (Pr. Pierre Simon), Hôpital Pitié-Salpêtrière, 47 Boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cédex 13 (France)

(Reçu le 11 août 1982; manuscrit modifié reçu le 25 novembre 1982)

L'antipyrine est souvent utilisée comme indicateur du métabolisme hépatique. En effet, à faible dose, elle n'a pas d'effet pharmacologique important. Elle est rapidement absorbée et se distribue dans l'eau totale sans liaison importante aux protéines. Elle n'est que faiblement extraite au niveau du foie et son oxydation se fait complètement au niveau de cet organe; l'excrétion rénale de l'antipyrine non transformée est négligeable; sa mesure est donc un paramètre fiable reflétant le métabolisme hépatique. En effet la clairance de l'antipyrine est augmentée après administration répétée d'un inducteur enzymatique. En postulant la constance du volume de distribution, la comparaison des constantes d'élimination de l'antipyrine avant et après traitement évaluera l'effet inducteur.

Par ailleurs, la mesure de la concentration d'antipyrine est réalisable sur des prélèvements salivaires [1], ce qui évite les prélèvements veineux [2]. Différentes techniques analytiques ont été proposées: colorimétrie [3,4], chromatographie en phase gazeuse [5–7], spectrodensitométrie [8], chromatographie en phase liquide haute-performance (CLHP) [9], radio-immunologie [10]. La méthode radio-immunologique permet une détection à partir de 10 ng/ml mais s'avère lourde car elle nécessite la réalisation d'anticorps spécifiques difficiles à obtenir et la méthode spectrodensitométrique quoique sensible reste très longue à mettre en oeuvre. La chromatographie en phase gazeuse quant à elle, permet une détection de 2 à 5 ng/ml mais nécessite un volume plasmatique d'au moins 1 ml.

La méthode de chromatographie en phase liquide haute performance décrite récemment par Danhof et al. [9] permet d'effectuer les dosages dans le plasma ou la salive. Cette méthode est sensible mais a cependant l'inconvénient

d'utiliser un tampon phosphate qui nécessite un rinçage prolongé pour la maintenance de l'appareillage.

La méthode proposée fait appel à la chromatographie liquide à haute performance en phase normale avec détection ultraviolette après extraction d'échantillons auxquels est ajouté un étalon interne.

MATERIELS ET METHODES

Réactifs et solvants

Antipyrine (Fig. 1) ou 2-3-diméthyl-1-phenyl-3-pyrazolin-5-one (Fluka, Buchs, Suisse), et étalon interne: déméthyl diazepam (Fig. 1) ou 7-chloro-1,3-dihydro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepine-2-one (Roche, Neuilly sur Seine, France) sont utilisés.

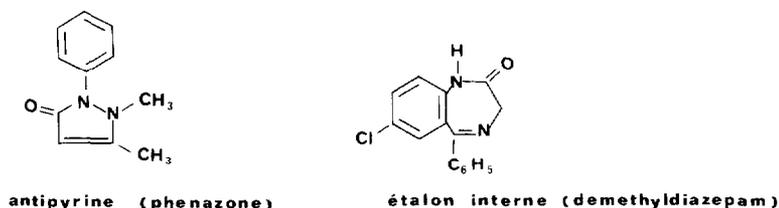


Fig. 1. Formules développées de l'antipyrine et de l'étalon interne.

La solution mère d'antipyrine est préparée dans le méthanol aux concentrations de 20 $\mu\text{g/ml}$ ou 200 $\mu\text{g/ml}$ et la solution mère de déméthyl diazepam est préparée dans le méthanol à la concentration de 125 $\mu\text{g/ml}$.

Les solvants utilisés sont de qualité pour analyse: chloroforme puriss. (Fluka), éthanol (Carlo-Erba, Italie), méthanol (Carlo-Erba), 1 M acide chlorhydrique (Prolabo, Paris, France), ammoniacque pure 20% (Merck, Darmstadt, R.F.A.), sulfate de sodium anhydre (Merck).

Conditions chromatographiques

Appareillage. Appareillage utilisé: Chromatographe liquide haute-performance Waters I 6000A muni d'un injecteur automatique Wisp 710 B (Waters Assoc., Milford, MA, U.S.A.) et d'un spectrophotomètre Lambda Max (Modèle 480, Waters), longueur d'onde 280 nm, sensibilité 0.02 unité D.O., pleine échelle relié à un enregistreur Omniscrite (Houston Instruments); déroulement du papier: 5 mm/min. La colonne est une LiChrosorb Si 60 de 5 μm (Merck), 15 cm \times 4.8 mm I.D. et la phase mobile un mélange éthanol-ammoniacque-chloroforme (1.6:0.05:98.35) dégazé aux ultrasons (appareil Bromsonic 52) utilisé à un débit de 4 ml/min soit une pression d'environ 150 bars.

Extraction. L'extraction se fait en milieu acide par le chloroforme d'échantillons salivaires ou plasmatiques. A 500 μl de salive ou de plasma (échantillon à doser ou étalon) sont ajoutés 100 μl de 1 M acide chlorhydrique, 50 μl d'une solution méthanolique à 125 $\mu\text{g/ml}$ de déméthyl diazepam, 500 μl de chloroforme; après agitation pendant 15 min au banc agitateur (Realis type 44-40), les tubes sont centrifugés à 1000 g pendant 10 min. La phase aqueuse surnageante est aspirée et rejetée. La phase organique inférieure est déshydratée

par du sulfate de sodium anhydre; 50 μ l de cette phase sont ensuite injectés dans le chromatographe.

Étalonnage. Les courbes d'étalonnage sont obtenues en traitant dans les mêmes conditions soit des plasmas témoins (provenant du centre de transfusion) soit des salives témoins (provenant d'un recueil de salives de volontaires sains) surchargés en antipyrine à des concentrations de 0, 0.5, 2, 5, 10, 20, 30 μ g/ml. On porte en ordonnée le rapport des hauteurs de pic d'antipyrine sur le pic d'étalon interne et en abscisse les concentrations d'antipyrine.

RESULTATS

Les chromatogrammes obtenus lors de cette étude sont représentés sur la Fig. 2. La substance précédant l'étalon interne sur le chromatogramme d n'a pu être identifiée.

Dans les conditions décrites les temps de rétention de l'étalon interne et de l'antipyrine sont respectivement de 1.2 min et 2.4 min (facteurs de capacité respectifs: 1 et 3.0).

La Fig. 3 montre les droites d'étalonnage obtenues dans la salive et le plasma pour des concentrations d'antipyrine de 0.5 μ g/ml à 30 μ g/ml.

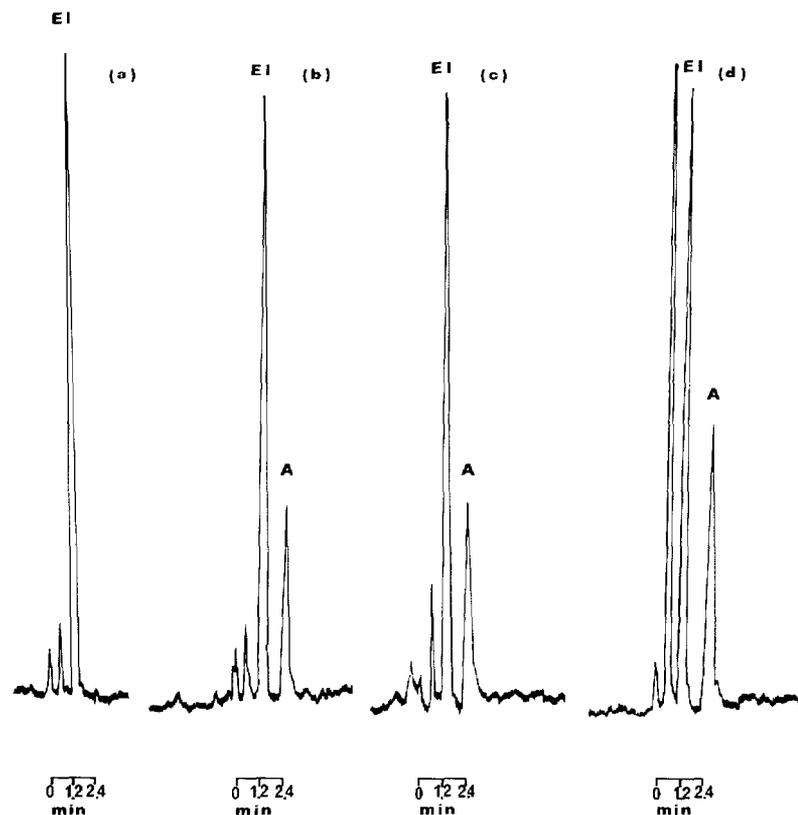


Fig. 2. Chromatogrammes obtenus après injection: (a) d'une solution plasmatique contenant uniquement l'étalon interne (EI); (b) d'un témoin plasmatique à 10 μ g/ml d'antipyrine; (c) d'un témoin salivaire à 10 μ g/ml d'antipyrine; (d) d'un échantillon salivaire prélevé chez un volontaire sain.

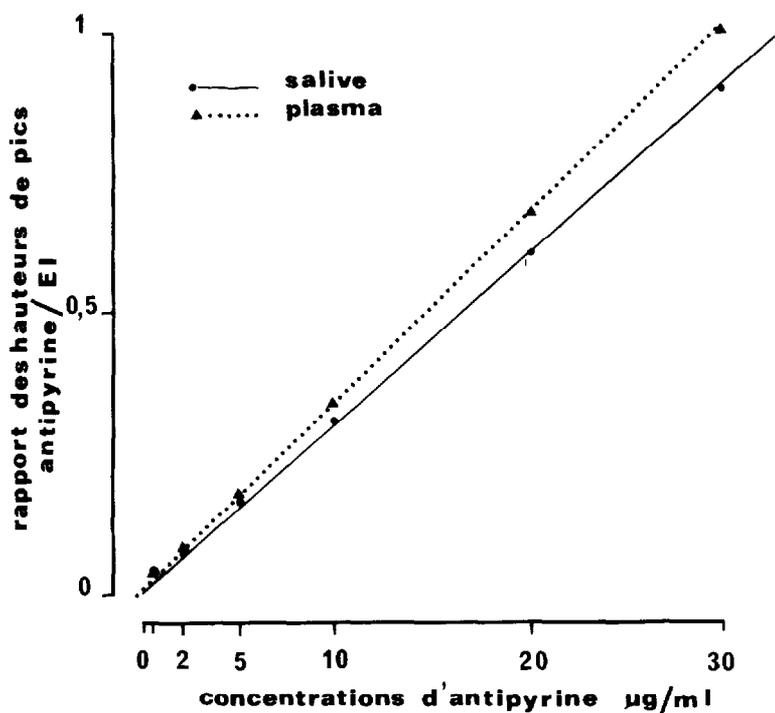


Fig. 3. Droite d'étalonnage: Rapport des hauteurs de pics d'antipyrine et d'étalon interne en fonction des concentrations plasmatiques ou salivaires d'antipyrine.

Précision

La reproductibilité de la méthode a été déterminée dans la salive et le plasma pour 3 concentrations 2, 5 et 10 µg/ml; chaque concentration ayant fait l'objet de 10 déterminations le même jour. Les coefficients de variation sont respectivement pour la salive de 5.1, 2.0 et 1.9% et pour le plasma de 4.2, 2.5 et 3.5% (Tableau I).

La répétabilité de la méthode a été contrôlée dans la salive et le plasma pour 3 concentrations 2, 5 et 10 µg/ml; chaque concentration ayant fait l'objet d'une détermination 6 jours de suite. Les coefficients de variation sont respectivement de 4.3, 5.9 et 6.3% pour la salive, de 5.3, 5.9 et 6.1% pour le plasma (Tableau I).

TABLEAU I

COEFFICIENTS DE VARIATION OBTENUS LORS DE LA REPRODUCTIBILITE ET DE LA REPETABILITE DES MESURES DANS LA SALIVE ET LE PLASMA

Antipyrine (µg/ml)	Coefficient de variation (%)			
	Reproductibilité		Répétabilité	
	Salive	Plasma	Salive	Plasma
2	5.1	4.2	4.3	5.3
5	2.0	2.5	5.9	5.9
10	1.9	3.5	6.3	6.1

Dans les conditions décrites la limite de détection est de 0.2 $\mu\text{g/ml}$. Il est possible d'abaisser cette limite soit en augmentant la sensibilité du détecteur (0.005 unité D.O., pleine échelle, le bruit de fond restant faible) soit en injectant la totalité de l'extractum. Dans ce cas, l'échantillon extrait sera congelé rapidement par immersion du tube dans l'azote liquide; la totalité de la phase organique est ainsi recueillie puis évaporée. Le résidu est repris par 50 μl de phase mobile qui sont injectés dans le chromatographe. La limite de détection est alors de 50 ng/ml.

Rendement

Le rendement de l'extraction a été calculé en comparant la hauteur du signal obtenu en injectant une quantité connue d'antipyrine à celle du signal obtenu après extraction d'échantillons salivaires ou plasmatiques surchargés de la même quantité d'antipyrine (Tableau II).

TABLEAU II
RENDEMENT D'EXTRACTION DE L'ANTIPYRINE DANS LA SALIVE ET LE PLASMA

Antipyrine ($\mu\text{g/ml}$)	Rendement en antipyrine (%)	
	Salive	Plasma
0.5	78	89
2	77	96
5	86	119
10	78	93
20	76	94
30	74	94
Moyenne	78.1	97.5

DISCUSSION

La méthode décrite a été utilisée pour déterminer les concentrations salivaires d'antipyrine après administration d'une dose de 1 g d'antipyrine per os chez des volontaires sains lors d'une étude d'induction enzymatique.

Cette méthode CLHP présente une limite de détection de 0.2 $\mu\text{g/ml}$ susceptible d'être portée à 50 ng/ml par la technique de congélation-évaporation, ces concentrations étant très inférieures à celles retrouvées lors des études pharmacocinétiques chez l'homme (environ 4 $\mu\text{g/ml}$, 24 h après une prise de 1 g d'antipyrine per os sous inducteur enzymatique). L'utilisation d'un étalon interne permet une amélioration notable de la reproductibilité, surtout dans les valeurs moyennes où se trouvent la plupart des patients après prise de 1 g.

La phase mobile, solvant organique simple évite les précipitations de sels obtenus avec l'utilisation des tampons phosphate donc la détérioration de l'appareillage et raccourci les délais de manipulation.

Cette technique rapide permet en outre, à la différence de la méthode de chromatographie en phase gazeuse qui utilise des échantillons plasmatiques, d'effectuer les dosages d'antipyrine indifféremment dans le plasma ou la salive

et de surcroît sur des échantillons de très faible volume; le dernier milieu étant d'accès bien plus aisé pour les études pharmacocinétiques.

La méthode proposée se caractérise donc par sa rapidité, sa simplicité sa sensibilité et sa facilité d'application aux études pharmacocinétiques chez l'homme.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 E.S. Vessel, G.T. Passananti, P.A. Glenwright et B.H. Dvorchick, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 18 (1975) 259.
- 2 P.M. Brooks, M.A. Bell et H. Burns, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 3 (1976) 945.
- 3 B.B. Brodie, J. Axelrod, R. Soberman et B.B. Levy, *J. Biol. Chem.*, 179 (1949) 25.
- 4 D. Mendelsohn et N.W. Levin, *S. Afr. J. Med. Sci.*, 25 (1960) 13.
- 5 D.H. Huffman, D.W. Shoeman et D.L. Azarnoff, *Biochem. Pharmacol.*, 23 (1974) 197.
- 6 S. Lindgren, P. Collste, B. Norlander et F. Sjoquist, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 7 (1974) 381.
- 7 L.F. Prescott, K.K. Adjepon-Yamoah et E. Roberts, *J. Pharm. Pharmacol.*, 25 (1973) 205.
- 8 R.M. Welch, R.L. De Angelis, M. Wingfield et T.W. Farmer, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 18 (1975) 249.
- 9 M. Danhof, E. de Groot van der Vis et D.D. Breimer, *Pharmacology*, 18 (1979) 210.
- 10 R.L. Chang, A.W. Wood, W.R. Dixon, A.H. Conney, K.E. Anderson, J. Eiseman et A.P. Alvares, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 20 (1976) 219.