

Journal of Chromatography, 307 (1984) 137–144

Biomedical Applications

Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 2004

MICRODOSAGE DE L'ISONIAZIDE ET DE L'ACETYLISONIAZIDE PLASMATIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE

C. LACROIX*, G. LAINE et J.P. GOULLE

*Laboratoire de Biochimie, Centre Hospitalier Général, 55 bis, rue Gustave Flaubert, B.P. 24,
76083 Le Havre Cedex (France)*

et

J. NOUVEAU

Service de Pneumologie, Hôpital Calmette, 76083 Le Havre Cedex (France)

(Reçu le 20 juin 1983; manuscrit modifié reçu le 15 novembre 1983)

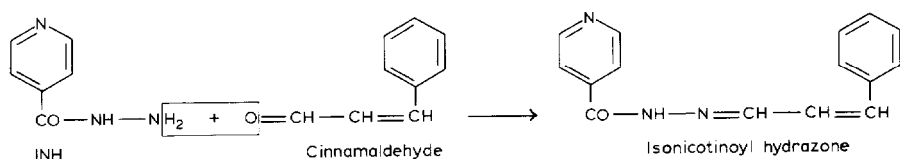
SUMMARY

*Determination of isoniazid and acetylisoniazid in plasma or serum by
high-performance liquid chromatography*

A method for the analysis of isoniazid and acetylisoniazid in plasma or serum has been developed. This report describes a simple, quick and economically optimized reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay using a small sample size without solvent extraction step. Isoniazid was condensed with cinnamic aldehyde after trichloroacetic acid deproteinisation. The method correlated well with a fluorimetric procedure. Precision, sensibility and accuracy were good. Common antituberculous drugs did not interfere.

INTRODUCTION

Largement utilisé depuis de nombreuses années dans la chimiothérapie anti-tuberculeuse, l'isoniazide (INH) a fait la preuve de son efficacité et acquis ainsi une place prépondérante. Sa dégradation hépatique, génétiquement déterminée, donne naissance à différents métabolites dont le plus important est représenté par l'acétylisoniazide (Ac-INH). La connaissance de leurs taux plasmatiques permet d'ajuster la posologie quotidienne en fonction de la vitesse d'inactiva-



tion du sujet [1], diminuant ainsi le risque d'effets secondaires de types neuro-psychiques, hépatiques, ou l'instauration d'un traitement inefficace.

Diverses méthodes de dosage ont été proposées: microbiologique utilisant différentes souches de *Mycobacterium* [2, 3], spectrophotométrique [4-7], spectrofluorométrique [8, 9], par chromatographie en phase gazeuse [10], par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) [11-13].

La technique proposée s'attache au dosage HPLC de l'INH après formation d'un hydrazone par condensation à l'aldéhyde cinnamique (AC) [6, 7] sans extraction préalable.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Appareillage

L'appareil utilisé est un chromatographe liquide à haute performance Du Pont de Nemours (Orsay, France). Ce système comprend une pompe 870 équipée d'une vanne à boucle de 20 μ l (Rhéodyne 71-25; Berkeley, CA, É.U.), un four thermostaté à 50°C, un spectrophotomètre UV à longueur d'onde variable (réglé à 330 nm) raccordé à unregistreur Omniscrite (1 mV; Houston Instruments). La colonne est une Zorbax CN Du Pont de Nemours (6 μ m; 250 \times 4.6 mm I.D.).

Prélèvements étalonnage

L'INH et l'Ac-INH sont fournies gracieusement par le laboratoire Roche (Neuilly-sur-Seine, France). Les prélèvements sanguins (3 ml) sont recueillis dans des tubes de verre héparinés (Vacutainers; 5 ml), immédiatement centrifugés à 1000 *g* pendant 10 min. La fraction plasmatique est congelée à -20°C jusqu'au dosage. L'étalonnage est réalisé en surchargeant des plasmas par des solutions d'INH fraîchement préparées à différentes concentrations.

Réactifs

Aldéhyde cinnamique, méthanol qualité HPLC (Carlo Erba, St. Cloud, France). Acide trichloracétique, acide acétique, acétate de sodium (3H₂O), acide chlorhydrique (tous de chez E. Merck, Darmstadt, R.F.A.). Ces produits sont utilisés sans autres purifications.

Méthode

Dosage de l'INH. Le plasma (50 μ l) est déprotéinisé par 50 μ l d'acide trichloracétique à 10% dans des microtubes à usage pédiatrique et centrifugé pendant 5 min à 10,000 *g* (microtubes, microcentrifugeuse; Beckman, Gagny, France). Prélever 50 μ l de surnageant, ajouter 5 μ l d'AC (10 g/l de méthanol). Mélanger. Après un délai de 2 min injecter 20 μ l dans le chromatographe. La phase mobile est constituée d'un mélange méthanol-eau-acide acétique (400:590:10)

contenant 3 mmol/l d'acétate de sodium trihydraté. Avant l'usage, la phase mobile est passée sur filtre Millipore (0.45 μm) et dégazée par un courant d'hélium. Le débit est de 2 ml/min soit une pression d'environ 14 MPa; la colonne est thermostatée à 50°C. La détection se fait à 330 nm et la quantification est basée sur la hauteur des pics.

Dosage de l'Ac-INH. L'Ac-INH est hydrolysé à chaud en milieu acide en INH. La valeur mesurée représente donc la somme de l'INH déterminé auparavant et de l'Ac-INH. Pour ceci, ajouter 5 μl d'acide chlorhydrique 6 mol/l à 50 μl de surnageant trichloracétique et chauffer 1 h à 80°C. Après refroidissement, mélanger 5 μl d'AC et opérer comme précédemment. La gamme d'étalonnage et son blanc sont traités de la même façon. La concentration de l'Ac-INH correspond donc à:

$$[\text{Ac-INH}] = [\text{INH (après hydrolyse)}] - [\text{INH (avant hydrolyse)}]$$

Pour exprimer cette valeur en Ac-INH vrai, il suffit de la multiplier par 1.3 (1.3 mg d'Ac-INH = 1 mg d'INH).

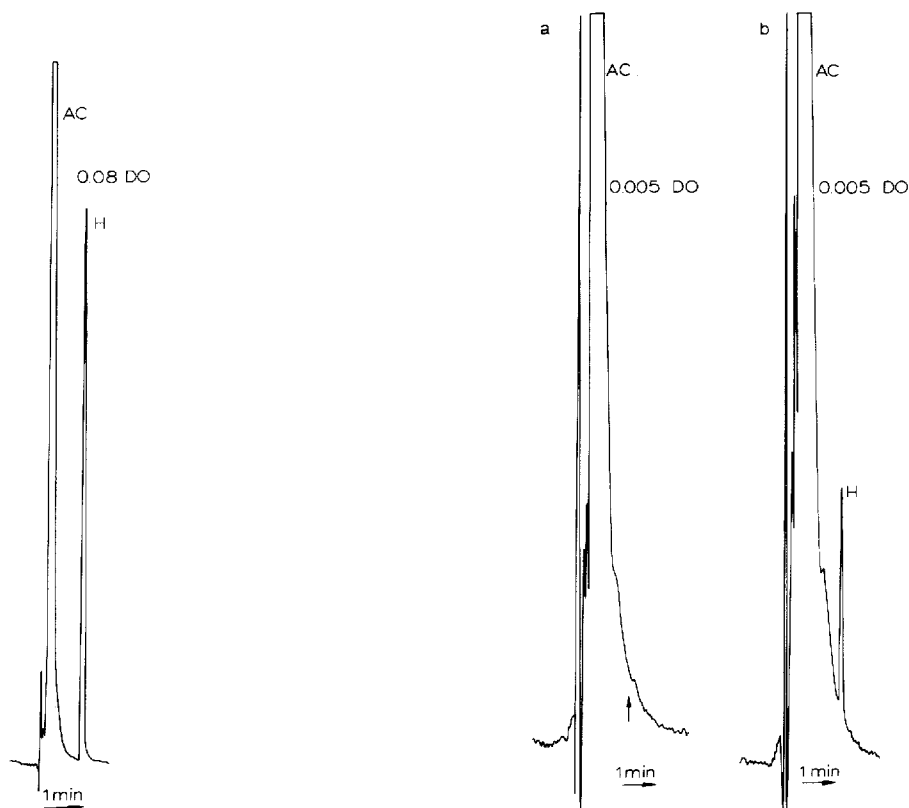


Fig. 1. Chromatogramme obtenu après injection d'un plasma contenant 5 $\mu\text{g/ml}$. H = isonicotinyl hydrazone de l'aldéhyde cinnamique; AC = aldéhyde cinnamique.

Fig. 2. Chromatogrammes de (a) blanc plasma à 0.005 densité optique pleine échelle; et (b) plasma contenant 0.1 $\mu\text{g/ml}$ à 0.005 densité optique pleine échelle.

RÉSULTATS

La Fig. 1 représente un tracé obtenu avec un plasma surchargé d'INH (5 $\mu\text{g/ml}$). Le temps de rétention dans les conditions indiquées est de 3 min. La linéarité a été évaluée à deux sensibilités différentes:

(1) 0.08 densité optique (DO) pleine échelle pour des concentrations de 0.5, 1, 2.5, 5 et 10 $\mu\text{g/ml}$ atteintes en thérapeutique.

(2) 0.005 DO pleine échelle pour des valeurs de 0.025, 0.05 et 0.1 $\mu\text{g/ml}$ pour une étude plus fine de la cinétique du produit (Fig. 2).

La répétabilité a été évaluée à six concentrations différentes et figure dans le Tableau I. L'exactitude a été vérifiée à l'aide de plasmas surchargés de 0.1 à 10 $\mu\text{g/ml}$ (Tableau II). L'équation de la droite de régression linéaire des ajouts

TABLEAU I

ÉTUDE DE LA RÉPÉTABILITÉ

Dix déterminations par niveau.

	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Écart-type ($\mu\text{g/ml}$)	Coefficient de variation (%)
INH	0.025	0.0013	5
	0.05	0.0015	3.1
	0.1	0.0032	3.2
	0.5	0.002	3.5
	2	0.05	2.4
	4	0.11	2.9
AC-INH	0.125	0.015	2.4
	0.25	0.010	1.3
	0.5	0.05	2.4
	1	0.027	1.3
	2	0.13	3.3
	4	0.071	1.0

TABLEAU II

EXACTITUDE DE LA MÉTHODE

Cinq déterminations par niveau.

Concentration théorique des plasmas surchargés ($\mu\text{g/ml}$)	Moyenne des concentrations mesurées ($\mu\text{g/ml}$)
0.1	0.095
0.5	0.50
1	0.97
2.5	2.40
5	4.91
7.5	7.68
10	9.90

mesurés (X) par rapport à la valeur théorique (Y) est la suivante:

$$Y = 1.00X + 0.03; r = 0.999$$

La limite de détection est de 17 ng/ml pour l'INH et de 50 ng/ml pour l'Ac-INH.

DISCUSSION

Corrélation avec une technique fluorimétrique

La méthode proposée a fait l'objet d'une comparaison avec la méthode fluorimétrique (Fig. 3) de Bourdon et al. [9]. La droite de régression est de la forme:

$$Y = 1.07X + 0.13; r = 0.992$$

Toutefois, le test t sur couples appariés indique une différence significative ($P < 0.001$) entre les deux techniques. En effet, la défécation trichloroacétique libère l'INH des hydrazones labiles formées avec l'acide pyruvique et l'acide α -cétoglutarique [14] dont les activités antibactériennes ont été démontrées [15, 16]. La méthode fluorimétrique employée comporte une défécation du plasma par l'acétate de cadmium à pH 8. Ce procédé n'entraîne pas la libération de l'INH de ses hydrazones labiles mais sous-estime la concentration d'INH active. Dans le Tableau III figurent les résultats obtenus par les deux méthodes.

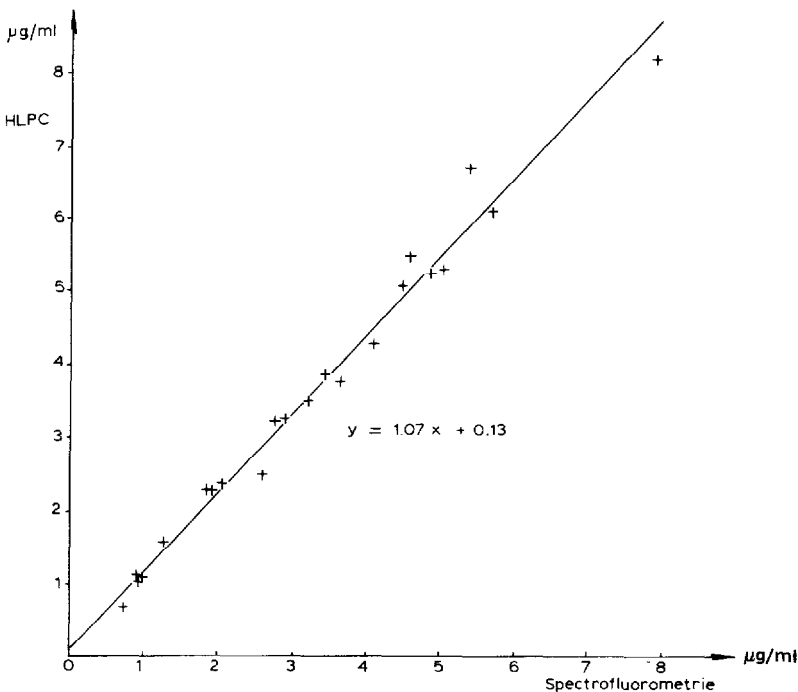


Fig. 3. Comparaison HPLC et spectrofluorimétrie.

TABLEAU III

VALEUR DE L'INH LABILE APRÈS DÉFÉCATION ACIDE

	INH ($\mu\text{g/ml}$)											
Défécation trichloracétique HPLC	2.30	1	3.25	3.85	1.10	0.7	8.20	3.80	4.3	5.30	1.05	1.55
Défécation cadmique pH 8 fluorimétrie	1.90	0.9	2.75	3.45	0.95	0.7	7.95	3.65	4.1	5.05	0.90	1.25
"INH labile"	0.40	0.10	0.50	0.40	0.15	0	0.25	0.15	0.20	0.25	0.15	0.30

Concentration en aldehyde cinnamique

Le volume d'aldehyde cinnamique a été fixé volontairement à $5 \mu\text{l}$ afin de ne pas diminuer la sensibilité de la technique par une dilution supplémentaire. Nous avons recherché la réponse optimale en comparant les hauteurs de pic d'hydrazone formée à partir de solutions d'INH ($5 \mu\text{g/ml}$), en fonction de concentrations différentes d'AC. La réponse ne varie plus au-delà d'une valeur de 10 g/l d'AC dans le méthanol (Fig. 4).

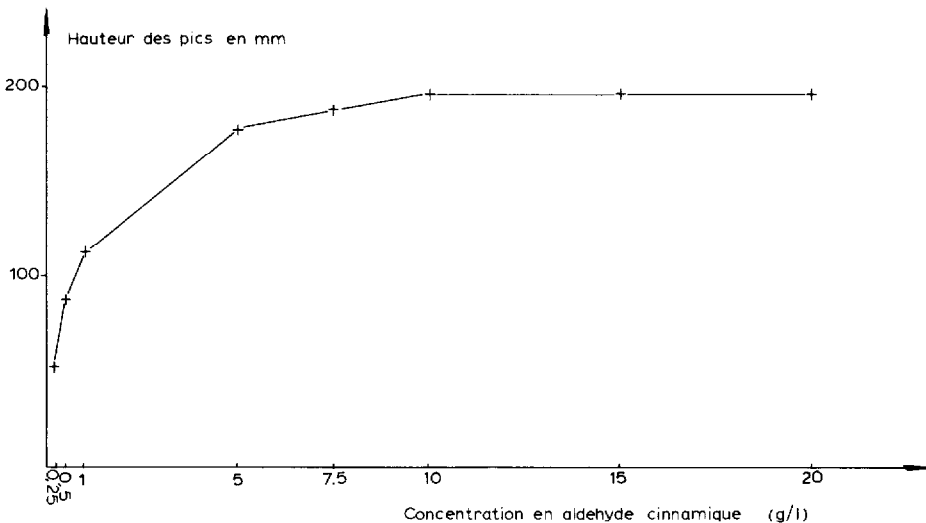


Fig. 4. Evolution de la hauteur des pics d'hydrazone déterminée avec une solution à $5 \mu\text{g/ml}$ d'INH et des concentrations croissantes d'aldehyde cinnamique.

Temps de contact aldehyde—INH

La formation du produit de condensation est très rapide au pH du défécate trichloracétique. Elle n'évolue plus à partir d'une minute. Nous avons fixé le temps de réaction à 2 min avant l'injection dans un souci de reproductibilité.

Conservation des prélèvements

Cette étude a été réalisée sur deux pools de plasma (1.70 et $4.45 \mu\text{g/ml}$). Après fractionnement, chaque échantillon a été conservé de trois façons: à 4°C , à 4°C après défécation trichloroacétique et congelés à -20°C . Des dosages

ont été effectués chaque jour pendant une semaine. Les meilleures conditions de conservation sont obtenues par une congélation à -20°C en accord avec les travaux de Ellard et al. [17].

Les méthodes décrites en HPLC sont fondées sur l'extraction de l'INH et de l'Ac-INH par un solvant organique ou un dosage direct après défécation et lecture à 254 ou 265 nm. Toutefois, le rendement de cette extraction est faible, compte tenu de la polarité de la molécule et nécessite une prise d'essai importante (0.5 à 1 ml) avec une limite de détection insuffisante. Un dosage direct après simple défécation du plasma implique une sensibilité de détection élevée et le risque non négligeable d'interférences. La formation préalable d'une hydrazone procure plusieurs avantages: une limite de détection exceptionnelle, la possibilité d'une prise d'essai réduite et un tracé sans pics parasites par une lecture à 330 nm. La détermination de l'Ac-INH après action du nitrite de sodium, de sulfamate d'ammonium et hydrolyse par acide chlorhydrique [17] fait apparaître deux problèmes: un élargissement notable du pic sur le chromatogramme et la présence de blancs plasmatiques élevés et très variables. C'est

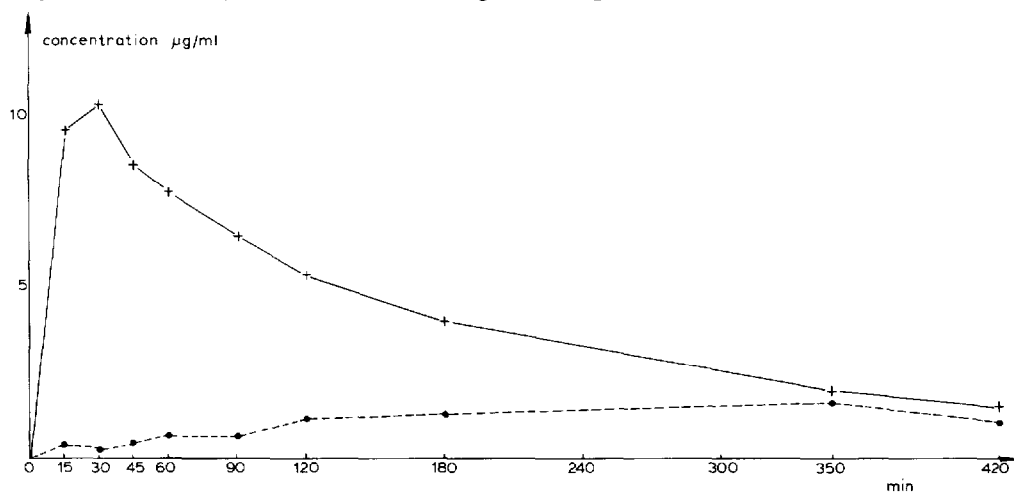


Fig. 5. Cinétique après prise orale unique de 5.2 mg/kg. —, INH; - - -, Ac-INH.

TABLEAU IV

CONCENTRATION D'INH ET Ac-INH 3 h ET 6 h APRÈS PRISE ORALE DE 300 mg D'INH

		INH ($\mu\text{g/ml}$)	Ac-INH ($\mu\text{g/ml}$)
H.	3 h	2.25	3.44
	6 h	0.71	2.45
L.	3 h	3.59	2.77
	6 h	0.89	2.73
F.	3 h	4.88	1.38
	6 h	3.00	1.66
L.	3 h	6.20	3.05
	6 h	3.45	2.73

pourquoi, nous avons préféré une hydrolyse directe par l'acide chlorhydrique à chaud suivie d'un dosage différentiel de l'Ac-INH. Dans ces conditions, la transformation de l'Ac-INH en INH est complète, l'intégrité du pic est respectée, les blancs témoins sont plus faibles et surtout de valeur constante pour une même série de dosages (vérifiée sur 30 plasmas différents). La Fig. 5 illustre une étude de cinétique effectuée chez un malade après prise unique d'INH per os (5.2 mg/kg). Dans le Tableau IV sont regroupées les valeurs d'INH et d'Ac-INH obtenues 3 h et 6 h après prise orale de 300 mg d'INH chez des patients traités depuis un mois. Les autres antituberculeux employés en association (rifampicine, pyrazinamide, streptomycine, ethambutol) ne provoquent aucune interférence.

Par son extrême rapidité et sa simplicité de mise en oeuvre, cette technique peut avantageusement remplacer les méthodes spectrofluorimétriques qui, bien que précises, sont longues d'exécution. La grande sensibilité atteinte pour un temps de manipulation réduit et un volume de prélèvement très faible permet d'envisager son application à des études cinétiques après dose unique.

RÉSUMÉ

La technique chromatographie liquide à haute performance proposée pour le dosage de l'isoniazide et de l'acétylisoniazide ne nécessite qu'une prise d'essai réduite. La méthode est très rapide car ne comporte pas de phase d'extraction. L'isoniazide plasmatique est condensé avec l'aldéhyde cinnamique après défécation trichloracétique. La technique a été corrélée de façon satisfaisante avec une méthode fluorimétrique. L'exactitude, la sensibilité et la précision sont excellentes. Les autres antituberculeux fréquemment utilisés en association n'interfèrent pas.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 J.N. Vivien, R. Thibier et A. Lepeuple, *Rev. Mal. Resp.*, 1 (1973) 753.
- 2 J. Grosset et G. Carnetti, *Rev. Tuberc. Pneumol. (Paris)*, 26 (1962) 1077.
- 3 M. Le Lirzin, J.N. Vivien, A. Lepeuple et R. Thibier, *Rev. Tuberc. Pneumol. (Paris)*, 26 (1962) 350.
- 4 J.R. Maher, J.M. Whitney, J.S. Chambers et J.D. Stotonis, *Amer. Rev. Tuberc.*, 76 (1957) 852.
- 5 L. Eidus et E. Little, *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 85 (1962) 278.
- 6 L. Eidus et A. Harnanansingh, *Clin. Chem.*, 17 (1971) 492.
- 7 E. Delacoux, M. Bresard, T. Evstigneff, D. Chansel et L. Noel, *Thérapie*, 34 (1979) 327.
- 8 E.M. Scott et R.C. Wright, *J. Clin. Lab. Med.*, 70 (1967) 355.
- 9 R. Bourdon, J. Pollet et A.M. Nicaise, *Ann. Biol. Clin.*, 34 (1976) 127.
- 10 B.H. Lauterburg, C.V. Smith et J.R. Mitchell, *J. Chromatogr.*, 224 (1981) 431.
- 11 M. Galliot, R. Bourdon, G. Jotic, A. Funes et H. Sarmini, *Ann. Biol. Clin.*, 40 (1982)
- 12 M. Guillaumont, M. Leclercq, Y. Frobert et B. Guise, *J. Chromatogr.*, 232 (1982) 369.
- 13 M.A. Moulin, F. Albessard, J. Lacotte et R. Camsonne, *J. Chromatogr.*, 226 (1981) 250.
- 14 D.W. Russel, *Clin. Chim. Acta*, 41 (1972) 163.
- 15 J.H. Peters et V.E. Hayes, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 159 (1966) 328.
- 16 W. Wenner, *J. Org. Chem.*, 18 (1953) 1333.
- 17 G.A. Ellard, P.T. Gammon et S.M. Willan, *Biochem. J.*, 126 (1972) 449.