

Journal of Chromatography, 341 (1985) 391–399

Biomedical Applications

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

CHROMBIO. 2585

DOSAGE DU SULPIRIDE ET DU SULTOPRIDE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE EN VUE DE LEUR ÉTUDE PHARMACOCINÉTIQUE

F. BRESSOLLE* et J. BRES

Groupe de Recherche en Pharmacocinétique, Laboratoire de Chimie Analytique, Faculté de Pharmacie, Avenue Charles Flahault, 34060 Montpellier Cédex (France)

(Reçu le 14 novembre 1984; manuscrit modifié reçu le 30 janvier 1985)

SUMMARY

Quantitative analysis of sulpiride and sultopride by high-performance liquid chromatography for pharmacokinetic studies

A high-performance liquid chromatographic method with UV detection (226 nm) for the analysis of sulpiride and sultopride in body fluids has been developed. Plasma, red blood cell (RBC) and urine samples were extracted by chloroform at pH 10. Internal standards were a new substituted benzamide {N-[(ethyl-1-pyrrolidiny-2)methyl] methoxy-2-ethylsulphonyl-5-benzamide, DAN} for the sulpiride assay and sulpiride for the sultopride assay. The detection limit in plasma and RBC was 10 ng/ml for sulpiride and 15 ng/ml for sultopride. The proposed techniques were selective, reliable and sensitive enough to be used for pharmacokinetic studies and drug monitoring. Some plasma and RBC data from pharmacokinetic studies in healthy volunteers (sulpiride) or patients (sultopride) are presented. Half-lives determined from either plasma or RBC concentrations were similar (7 h for sulpiride and 5 h for sultopride).

INTRODUCTION

Contrairement aux neuroleptiques des autres classes, les benzamides substituées dont le sulpiride et le sultopride montrent un très haut degré d'affinité pour les récepteurs dopaminergiques centraux (sites D₂). C'est cette sélectivité d'action qui pourrait expliquer leurs capacités relativement faible à induire des troubles extrapyramidaux, à la différence des neuroleptiques typiques comme l'halopéridol [1–3].

De nombreuses méthodes de dosage du sulpiride en milieux biologiques sont décrites dans la littérature; les dosages étant effectués soit par colorimétrie [4], soit par spectrophotométrie [4], soit par spectrofluorimétrie [5]. Cependant

ces méthodes manquent de spécificités et prennent le risque de doser avec le sulpiride des métabolites; de plus la méthode spectrofluorimétrique donne des blancs élevés (constituants endogènes) [5].

Au cours de travaux antérieurs une méthode de dosage du sulpiride par spectrophotométrie in situ des chromatogrammes sur couche mince et détection dans l'ultraviolet (UV) avait été décrite [6, 7]. Cette méthode, plus sensible (2 µg/ml de plasma) que celle de Segura et al. [8] par chromatographie sur couche mince quantitative (TLC) et inhibition de fluorescence, avait permis de réaliser l'étude pharmacocinétique du sulpiride après son administration en clinique à la dose de 400 mg [9]. Le sulpiride est prescrit couramment aux doses de 50–100 mg [2, 10], aussi la limite de détection de la méthode précédente ne permettait pas son utilisation pour la réalisation d'études pharmacocinétiques à ces posologies.

Frigerio et Pantarotto [11] décrivent une méthode par chromatographie en phase gazeuse (GC) après dérivatisation dont la sensibilité de l'ordre du µg/ml paraît insuffisante. Lorsque la GC est couplée à la spectrométrie de masse, le seuil de détection est abaissé considérablement mais l'appareillage est particulièrement coûteux et complexe. Mizuchi et al. [12] proposent une méthode de dosage par radioimmunoassay d'une très grande sensibilité.

Peu de méthodes de dosage du sulpiride par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), suffisamment sensibles pour permettre le suivi des concentrations plasmatiques pendant quatre à cinq demi-vies, sont publiées [13, 14]. Seuls Alfredsson et al. [13] rapportent une méthode permettant de doser 10 ng de sulpiride par ml de plasma; la détection est faite en fluorescence. La méthode de dosage du sulpiride par HPLC et détection dans l'UV proposée est d'une sensibilité équivalente.

Les méthodes de dosage du sultopride rapportées dans la littérature sont variées. Les dosages sont effectués soit par spectrofluorimétrie [5, 15, 16], soit par HPLC [17, 18].

Lors de la réalisation de l'étude pharmacocinétique du sultopride en psychiatrie, la TLC avait été utilisée comme méthode de dosage [19]. La sensibilité était de 1 µg/ml de plasma, les cinétiques plasmatiques et urinaires étant suivies pendant 10 et 24 h, respectivement. Cette sensibilité s'est révélée être insuffisante pour un suivi cinétique sur 48 h; une méthode de dosage du sultopride plus sensible par HPLC a été développée.

Ce travail montre que les méthodes employées pour le dosage du sulpiride et du sultopride peuvent être appliquées à des études pharmacocinétiques par leurs sélectivités, leurs reproductibilités et leurs sensibilités.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Appareillage

L'appareil utilisé est un chromatographe liquide à haute performance SP 8100 Spectra-Physics (Les Ulis, France). Ce système est équipé d'une vanne à boucle Valco de 50 µl, d'un four et d'un passeur automatique d'échantillon SP 8110. Cet appareil est relié à un détecteur à longueur d'onde variable (Schoeffel SF 770) et à un miniordinateur intégrateur (SP 4100). La colonne est une LiChrosorb RP8 Merck (10 µm; 250 × 4.6 mm I.D.).

Produits de référence

Le sulpiride ou N-[(éthyl-1-pyrrolidinyl-2)méthyl]méthoxy-2-sulfamoyl-5-benzamide, le sultopride ou N-[(éthyl-1-pyrrolidinyl-2)méthyl]méthoxy-2-éthylsulfonyl-5-benzamide et le produit DAN ou N-[(éthyl-1-pyrrolidinyl-2)-méthyl]méthoxy-2-amino-4-éthylsulfonyl-5-benzamide, nous ont été gracieusement fournis par les Laboratoires Delagrangé (Paris, France).

Réactifs

Sulpiride, solution à 0.1 g/l dans l'eau distillée, à diluer au 1:10 et au 1:100 extemporanément. Sultopride, étalon interne pour le dosage du sultopride, solution à 0.1 g/l dans le méthanol. Sultopride, solution à 0.1 g/l dans l'eau distillée. Produit DAN, étalon interne pour le dosage du sulpiride, solution à 0.1 g/l dans le méthanol, à diluer au 1:10 extemporanément. Phase mobile: 0.1 M acétate d'ammonium—méthanol (10:90). Tampon pH 10: 0.1 M glyocolle (dans 0.1 M chlorure de sodium)—0.1 M hydroxyde de sodium (51:49). Acide trichloracétique à 20%; 1 M acide sulfurique, 2 M et 0.5 M hydroxyde de sodium.

L'eau ainsi que les solvants utilisés ont été bidistillés par nos soins et filtrés sur Millipore (0.45 μ m). Tous les produits chimiques utilisés sont des produits purs pour analyse.

Conditions chromatographiques

Débit de la phase mobile: 1 ml/min. Température du four: 50°C. Sensibilité du détecteur: 0.02 ou 0.04. Atténuation: 2, 4, 8 ou 16. Vitesse de déroulement du papier de l'enregistreur: 1 cm/min. Pression: 43 bars.

Dosage du sulpiride dans le plasma, les érythrocytes et les urines

Dans des tubes à extraction introduire: plasma (4 ml), érythrocytes (2, 3 ou 4 g), urine (0.5, 1, 2 ou 4 ml), de l'eau distillée q.s.p. 4 ml. Ajouter pour les érythrocytes uniquement 0.5 ml de 1 M acide sulfurique, laisser en contact 5 min puis ajouter 0.5 ml de 2 M hydroxyde de sodium. Pour le plasma et les urines ajouter 0.2 ml de 0.5 M hydroxyde de sodium. Ajouter ensuite 1 ml de tampon pH 10. Vérifier le pH. L'ajuster à 10 avec 0.5 M hydroxyde de sodium si nécessaire. Extraire par deux fois 20 ml de chloroforme. Centrifuger. Congeler. Prélever deux fois 15 ml de phase organique et les introduire dans une capsule contenant l'étalon interne (0.2 ml pour le plasma et les érythrocytes, 0.8 ml pour les urines). Laisser le solvant s'évaporer à température ambiante (2 h environ). Reprendre le résidu par trois fois 1 ml de chloroforme et transvaser dans de petits tubes à hémolyse en verre. Laisser à nouveau le solvant s'évaporer. Reprendre le résidu par la phase mobile (0.4 ml pour le plasma et les érythrocytes; 1 ml pour les urines). Injecter 50 μ l de cette solution préalablement filtrée sur millipore 0.2 μ m.

Pour l'établissement des gammes d'étalonnage, ajouter: à six échantillons de 4 ml de plasma ou de 4 g d'érythrocytes, prélevés avant administration du médicament, 0.2 et 0.5 ml d'une solution de sulpiride à 0.001 g/l, puis 0.3, 0.5, 1 et 2 ml d'une solution à 0.01 g/l; à quatre échantillons d'urine (4 ml) prélevée avant administration du médicament: 0.5, 0.75, 1 et 2 ml d'une solution de sulpiride à 0.1 g/l. Suivre ensuite le mode opératoire adopté pour les échantillons à doser.

Dosage du sultopride dans le plasma, les érythrocytes et les urines

Dans des tubes à extraction, introduire: plasma (2, 3 ou 4 ml), érythrocytes (2, 3 ou 4 g), urines (0.5, 1, 2, 4 ou 10 ml), de l'eau distillée q.s.p. 5 ml (plasma, érythrocytes) ou 10 ml (urines). Ajouter pour le plasma et les érythrocytes 1.5 ml d'acide trichloracétique; agiter, laisser en contact 5 min, puis ajouter 1.5 ml de 2 M hydroxyde de sodium et laisser en contact 2 min. Pour les urines, ajouter 0.2 ml de 0.5 M hydroxyde de sodium. Dans les trois cas, vérifier le pH, ce dernier devant être de 10. Ajuster si nécessaire. Ajouter 20 ml de chloroforme. Agiter durant 20 min. Centrifuger. Congeler. Prélever 15 ml de phase chloroformique et les introduire dans une capsule contenant l'étalon interne (0.3 ml pour le plasma et les érythrocytes, 0.8 ml pour les urines). Abandonner à la température ambiante jusqu'à évaporation (1 h environ). Reprendre le résidu par trois fois 1 ml de chloroforme et transvaser dans des tubes à hémolyse en verre. Laisser le solvant s'évaporer. Reprendre le résidu par la phase mobile (0.4 ml pour le plasma et les érythrocytes, 1 ml pour les urines). Injecter 50 μ l de cette solution préalablement filtrée sur Millipore 0.2 μ m.

Pour l'établissement des gammes d'étalonnage, ajouter: à cinq échantillons de 4 ml de plasma et de 4 g d'érythrocytes prélevés avant administration du médicament: 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 et 0.4 ml d'une solution de sultopride à 0.1 g/l; à quatre échantillons de 4 ml d'urine prélevée avant administration du médicament: 0.25, 0.5, 1 et 2 ml d'une solution de sultopride à 0.1 g/l. Suivre ensuite le mode opératoire adopté pour les échantillons à doser.

Mode de calcul

Les pics sont intégrés et les rapports des surfaces des pics, produit à doser sur l'étalon interne, sont exprimés en fonction de la concentration théorique.

Calcul de la concentration des échantillons à analyser

Les rapports des surfaces permettent d'obtenir par l'équation de la droite d'étalonnage la concentration en principe actif de l'échantillon.

RESULTATS

Dosage du sulpiride

Temps de rétention. La Fig. 1 représente les tracés obtenus avec des érythrocytes surchargés de sulpiride (0.125 μ g/g et 0.75 μ g/g) traités selon le protocole proposé. Le temps de rétention du sulpiride est de 4.4 min, celui de l'étalon interne de 6.3 min. Aucune interférence de substances endogènes du plasma, des érythrocytes ou de l'urine n'est observée.

Linéarité. Les coefficients de corrélation pour différentes gammes d'étalonnage dans le plasma, les érythrocytes et les urines sont de: 0.9980 ± 0.00047 ($n = 10$), 0.99986 ± 0.00015 ($n = 5$) et 0.9970 ± 0.002 ($n = 14$), respectivement, et les pentes correspondantes de: 0.821 ± 0.012 , 0.502 ± 0.006 et 0.209 ± 0.003 . L'ordonnée à l'origine est dans tous les cas très proche de zéro: 0.0242 ± 0.010 pour le plasma, 0.0154 ± 0.0147 pour les érythrocytes et 0.0492 ± 0.0373 pour les urines.

Répétabilité. La répétabilité de l'injection est déterminée sur quatre solutions titrant 0.050, 1.25, 2.5 et 5 μ g/ml de plasma; chaque solution étant injectée dix

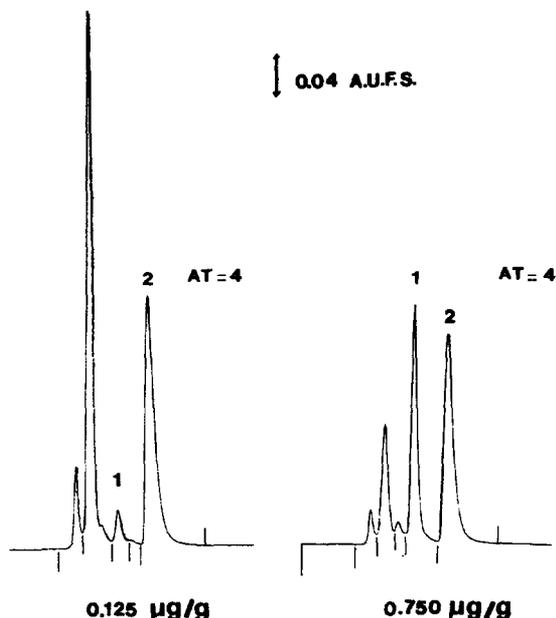


Fig. 1. Enregistrements dans l'ultraviolet de deux points d'une gamme d'étalonnage de sulpiride dans les érythrocytes. Pics: 1 = sulpiride (4.4 min); 2 = produit DAN (étalon interne) (6.3 min).

fois. Les coefficients de variation sont de 2.1, 1.3, 1.0 et 0.90% respectivement. La répétabilité entre gammes d'étalonnage préparées dans du plasma, des érythrocytes et de l'urine de différents sujets est évaluée pour chaque concentration. Les résultats sont rapportés Tableau I.

Coefficient d'extraction. Le coefficient d'extraction est de 98% [2].

Sensibilité. La limite de détection de la méthode est de 10 ng par ml de plasma.

Dosage du sultopride

Temps de rétention. La Fig. 2 représente les tracés obtenus avec des plasmas surchargés de sultopride (0.5 µg/ml et 2.5 µg/ml). Le temps de rétention du sultopride est de 5.40 min, celui de l'étalon interne de 4.40 min. Aucune interférence de substances endogènes du plasma, des érythrocytes ou de l'urine n'est observée.

Linéarité. Le rapport, R , surface intégrée du pic correspondant au sultopride/surface intégrée du pic correspondant à l'étalon interne varie linéairement avec la concentration comme le montrent les coefficients de corrélation obtenus par ajustement linéaire des données (méthode des moindres carrés). Ces derniers sont de: 0.998294 ± 0.001278 ($n = 10$) pour le plasma, 0.998016 ± 0.001064 ($n = 10$) pour les érythrocytes et 0.994496 ± 0.002451 ($n = 14$) pour les urines et les pentes de: 0.154 ± 0.002 , 0.133 ± 0.001 et 0.057 ± 0.001 , respectivement. L'ordonnée à l'origine est dans tous les cas très proche de zéro: -0.0025 ± 0.0032 pour le plasma, -0.0058 ± 0.00922 pour les érythrocytes et -0.00986 ± 0.0198 pour les urines.

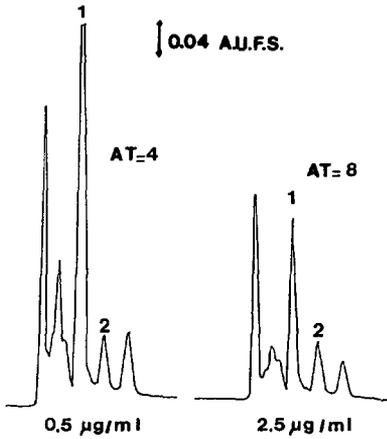


Fig. 2. Enregistrements dans l'ultraviolet de deux points d'une gamme d'étalonnage de sultopride dans le plasma. Pics: 1 = sulpiride (étalon interne) (4.4 min); 2 = sultopride (5.4 min).

Répétabilité. La répétabilité de l'injection est déterminée sur deux solutions titrant 6.25 et 25 µg/ml d'urine; chaque solution étant injectée dix fois. Les coefficients de variation sont de 0.23% et 0.785%, respectivement. La répétabilité entre gammes d'étalonnage préparées dans du plasma, des érythrocytes et de l'urine de différents sujets est calculée pour chaque concentration. Ces résultats sont rapportés Tableau I.

Coefficient d'extraction. Le coefficient d'extraction est de 98%.

Sensibilité. La limite de détection de la méthode est de 15 ng par ml de plasma.

TABLEAU I

COEFFICIENTS DE VARIATION POUR DIFFÉRENTES GAMMES D'ÉTALONNAGE EXTRAITES SELON LE PROTOCOLE ADOPTÉ

Concentration (mg l ⁻¹)	Coefficients de variation (%)					
	Sulpiride			Sultopride		
	Plasma (n = 10)	Erythrocytes (n = 5)	Urine (n = 14)	Plasma (n = 10)	Erythrocytes (n = 10)	Urine (n = 14)
0.050	4.14	3.02				
0.125	3.52	7.68				
0.500				3.18	2.33	
0.750		0.592				
1.25	2.52			1.55	4.50	
2.50	2.02	1.06		0.56	1.08	
5.00	1.50	1.24		0.50	2.39	
6.25						1.98
10.00				1.31	0.57	
12.50			1.60			0.71
18.75			1.21			
25.00			1.53			2.28
50.00			1.43			1.01

DISCUSSION ET CONCLUSION

Lors de l'étude pharmacocinétique du sulpiride après administration intramusculaire de trois doses (50, 100 et 200 mg), les concentrations en sulpiride dans le plasma et l'urine étaient déterminées par HPLC avec détection dans l'UV à 197 nm. L'étalon interne utilisé était la nicotinamide et la durée de l'analyse de 14 min [2].

Les conditions chromatographiques sont modifiées de façon à réduire le temps d'analyse. L'étalon interne retenu est de la même série chimique que le sulpiride. La méthode proposée est donc mieux adaptée à la réalisation d'études pharmacocinétiques ou à des dosages de routine permettant d'assurer une bonne surveillance thérapeutique.

La sensibilité de notre méthode est identique à celle décrite par Alfredsson et al. [13] qui utilisent un système de détection en fluorescence. Par contre le temps d'analyse est considérablement raccourci 8 min au lieu de 20 min.

Cette méthode de dosage est plus sensible que celle décrite par Frigerio et Pantarotto [11] par GC et détection par ionisation de flamme; le sulpiride étant dosé après méthylation. La limite de détection est de 3.5 ng injectés au lieu de 20 ng dans la méthode de Frigerio et Pantarotto [11].

Des échantillons de plasma, d'érythrocytes et d'urine prélevés après administration de sulpiride à l'homme par voies intraveineuse et orale ont été dosés par cette méthode. Un exemple de cinétiques plasmatique et érythrocytaire est donné Fig. 3. Le coefficient de distribution du sulpiride entre érythrocytes et plasma est voisin de 1. Les cinétiques d'absorption et d'élimination du sulpiride

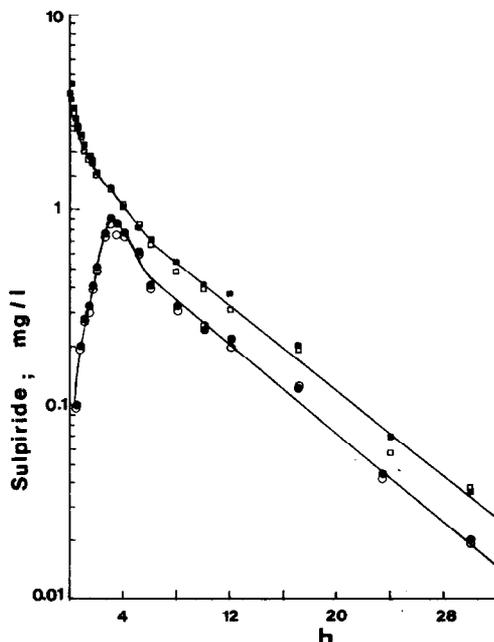


Fig. 3. Variations du logarithme de la concentration en sulpiride dans le plasma (■ et ●) et dans les érythrocytes (□ et ○), en fonction du temps, après administration de 100 mg par voie intraveineuse (■ et □) et de 200 mg par voie orale (● et ○).

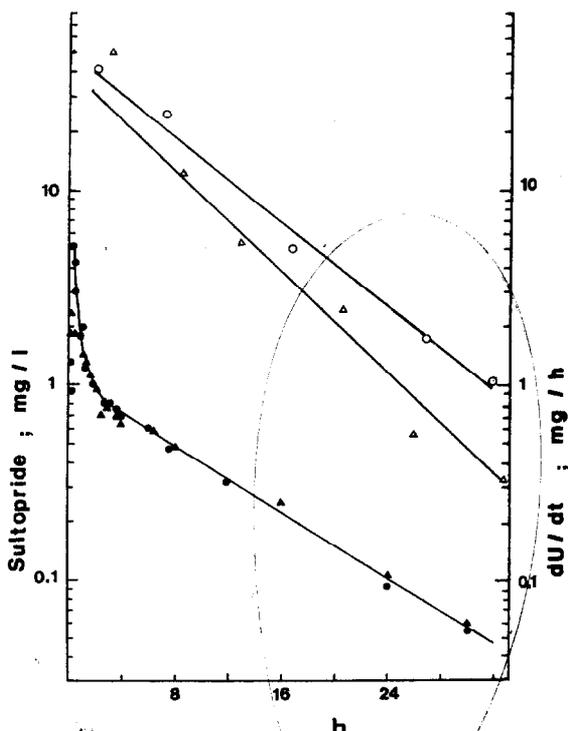


Fig. 4. Variations du logarithme de la concentration en sultopride dans le plasma (● et ▲) et de la vitesse d'élimination urinaire, dU/dt , (○ et △), en fonction du temps, après administration de 445.74 mg par voie intramusculaire (● et ○) et de 375.96 mg par voie orale (gouttes buvables) (▲ et △).

ainsi que la biodisponibilité des formes orales peuvent être évaluées aussi bien à partir des données érythrocytaires qu'à partir de l'évaluation des concentrations dans le plasma. Elles peuvent également être évaluées à partir des données urinaires.

Pour le dosage du sultopride, nous avons développé une méthode plus sensible que celles décrites dans la littérature [5, 15-19]. Cette méthode de dosage nous a permis de réaliser l'étude pharmacocinétique du sultopride chez des patients hospitalisés pour désordres psychiatriques après son administration par voies intramusculaire et orale (gouttes buvables) à la dose de 400 mg [1]. Un exemple des cinétiques obtenues est donné Fig. 4.

RESUME

ab) Le dosage du sulpiride et du sultopride est effectué par chromatographie liquide à haute performance avec détection dans l'ultraviolet (226 nm). Les échantillons de plasma, d'érythrocytes et d'urine sont extraits par le chloroforme à pH 10. L'étalon interne utilisé est une nouvelle benzamide substituée, le produit N-{(éthyl-1-pyrrolidiny-2)méthyl] méthoxy-2-amino-4-éthylsulfonyl-5-benzamide (DAN) pour le dosage du sulpiride et le sulpiride pour le dosage du sultopride. La limite de détection dans le plasma et les érythrocytes est de

10 ng/ml pour le sulpiride et 15 ng/ml pour le sultopride. Les méthodes proposées, sélectives, reproductibles et sensibles peuvent être utilisées pour la réalisation d'études pharmacocinétiques et pour la surveillance thérapeutique. Des exemples de cinétiques plasmatiques et érythrocytaires chez des sujets sains (sulpiride) ou des patients (sultopride) sont donnés. Les temps de demi-vie déterminés à partir des données plasmatiques et érythrocytaires sont identiques (7 h pour le sulpiride et 5 h pour le sultopride).

BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. Bres et F. Bressolle, *Thérapie*, (1985) sous presse. *cmj*
- 2 F. Bressolle, J. Bres, M.D. Blanchin et R. Gomeni, *J. Pharm. Sci.*, 73 (1984) 1128.
- 3 M. Lecuyer, *Sem. Hop. Paris*, 26 (1984) 1872.
- 4 G. Pitel et T.H. Luce, *Ann. Pharm. Fr.*, 28 (1970) 409.
- 5 T. Kleimola, O. Leppänen, J. Kanto, R. Mäntylä et E. Syvälahti, *Ann. Clin. Res.*, 8 (1976) 104.
- 6 F. Bressolle, J. Bres et S. Brun, *J. Chromatogr.*, 174 (1979) 421.
- 7 F. Bressolle, J. Bres, E. Fuseau et A.M. Siouffi, *J. Pharm. Clin.*, 2 (1982) 141.
- 8 J. Segura, L. Borgia et O.M. Bakke, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 223 (1976) 88.
- 9 J. Bres, F. Bressolle, M.D. Blanchin, E. Rechencq et L. Monnier, Congrès Hispano Français de Biopharmacie et de Pharmacocinétique, Barcelone, 2-6 Avril 1979, Vol. III, Coop. COIMOFF, Madrid, 1979, pp. 25-38. *cmj*
- 10 F. Bressolle, A. Faure et J. Bres, dans J.M. Aiache et J. Hirtz (Rédacteurs), 2ème Congrès Européen de Biopharmacie et Pharmacocinétique, Salamanque, 24-27 Avril 1984, Vol. III, 1984, pp. 287-296. *cmj*
- 11 A. Frigerio et C. Pantarotto, *J. Chromatogr.*, 130 (1977) 361.
- 12 A. Mizuchi, S. Saruta, N. Kitagawa et Y. Miyachi, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 254 (1981) 317.
- 13 G. Alfredsson, G. Sedvall et F.-A. Wiesel, *J. Chromatogr.*, 164 (1979) 187.
- 14 N. Verbiese-Genard, M. Hanocq et L. Molle, *J. Pharm. Belg.*, 35 (1980) 24.
- 15 O. Denisoff et L. Molle, *Arzneim.-Forsch.*, 28 (1978) 2156.
- 16 M. Murasaki, S. Yamazumi, K. Okamoto, A. Takahashi et S. Miura, *Clin. Eval. (Jpn.)*, 9 (1981) 577.
- 17 K. Nishihara, Y. Konda et Z. Tamura, *Chem. Pharm. Bull.*, 31 (1983) 4144.
- 18 N. Verbiese-Genard, M. Hanocq et L. Molle, dans A. Frigerio et L. Renoz (Rédacteurs), Recent Developments in Chromatography and Electrophoresis, Elsevier, Amsterdam, 1979, pp. 79-86.
- 19 J. Bres, A.F. Gaillot, D. Monsoncles, J.C. Penochet et G. Vidal, Progress in Clinical Pharmacy, Vol. III, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1981.