

*Journal of Chromatography*, 415 (1987) 85-94

*Biomedical Applications*

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

CHROMBIO. 3489

## DÉTERMINATION DE L'ÉTHAMBUTOL PLASMATIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE ET DÉTECTION SPECTROPHOTOMÉTRIQUE ULTRAVIOLETTE

C. LACROIX\* et F. CERUTTI

*Unité de Pharmacocinétique, Centre Hospitalier Général, 55 bis, Rue Gustave Flaubert, 76083 Le Havre Cédex (France)*

J. NOUVEAU

*Unité de Réanimation Respiratoire, Hôpital J. Monod, 76290 Montivilliers (France)*

et

S. MENAGER et O. LAFONT

*Laboratoire de Chimie Organique, Centre de Pharmacochimie du Madrillet, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rouen, Avenue de l'Université, 76800 Saint-Etienne du Rouvray (France)*

(Reçu le 24 septembre 1986; manuscrit modifié reçu le 27 octobre 1986)

---

### SUMMARY

#### *Determination of ethambutol in plasma by liquid chromatography and ultraviolet spectrophotometric detection*

The method presented here is based on the ability of ethambutol to give chelates with divalent cationic metals. With copper salts, the chelate presents a characteristic ultraviolet absorbance at 270 nm, making it possible to titrate ethambutol extracted from plasma with chloroform in alkaline medium. The column which was used contained silica (LiChrosorb Si 60, 5  $\mu\text{m}$ ) and the mobile phase was a mixture of equal parts of water and acetonitrile, containing copper sulphate and ammonia. The internal standard was a lower homologue of ethambutol with the same chelating ability. The detection limit was 0.15 mg/l. No interference with other antitubercular agents was observed.

---

### INTRODUCTION

Les règles modernes du traitement de la tuberculose pulmonaire sont actuellement bien codifiées [1] et leurs applications assurent une efficacité voisine de 100% lors d'une première atteinte. Le schéma recommandé comporte l'association d'isoniazide et de rifampicine tout au long du traitement, avec l'adjonction

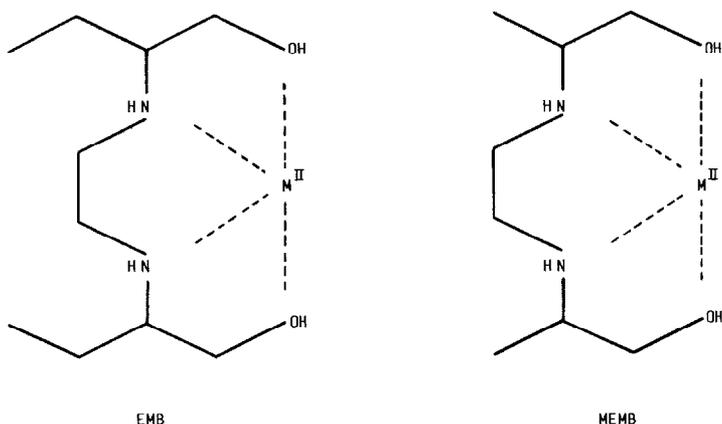


Fig. 1. Complexes de chélation formés par l'éthambutol (EMB) et l'étalon interne (MEMB) avec les cations métalliques divalents.

pendant les deux premiers mois d'un ou deux antibacillaires. L'éthambutol (EMB, Fig. 1) peut être associé seul, ses propriétés bactériostatiques prévenant une éventuelle résistance des bacilles tuberculeux à l'isoniazide. Une quadrithérapie inclut le pyrazinamide pour son activité bactéricide à l'égard des bacilles intracellulaires. A la différence des trois autres antituberculeux (rifampicine, isoniazide, pyrazinamide) qui ont un métabolisme essentiellement hépatique, l'EMB présente une élimination rénale. La fraction de la dose éliminée inchangée est de 0,79 et la clairance rénale (6,81 ml/min/kg) indique l'existence d'une sécrétion tubulaire active [2]. Toute insuffisance rénale majeure donc le risque d'effets secondaires notamment l'apparition d'une névrite optique rétrobulbaire.

Différentes techniques ont été proposées pour le dosage de l'EMB: (i) microbiologiques [3, 4] par diffusion en gélose ou dilution en milieu liquide, utilisant diverses souches de *Mycobacterium*; (ii) isotopique avec de l'EMB marqué au <sup>14</sup>C [5]; (iii) colorimétriques [6-8], mais manquant de spécificité; (iv) par chromatographie en phase gazeuse [9-14] nécessitant pour une bonne sensibilité un détecteur à capture d'électrons ou un spectromètre de masse.

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) n'est, à notre connaissance, que peu utilisée [15]. En effet, la difficulté consiste à résoudre un double problème: (i) l'élution du composé: ce dernier s'adsorbe très fortement sur la silice et les conditions nécessaires à sa sortie sont assez drastiques; (ii) sa détection: l'EMB ne présente qu'une absorption extrêmement faible dans l'UV, totalement inexploitable en regard des concentrations thérapeutiques. C'est pourquoi, afin d'éviter une dérivation de la molécule, toujours longue, la technique proposée se fonde sur la capacité de l'EMB de former, avec des cations métalliques divalents, des complexes de chélation [16]. Après avoir essayé différents sels de métaux, notre choix s'est fixé sur le sulfate de cuivre, le complexe ainsi formé présentant une absorption caractéristique à 270 nm. Toutefois, l'utilisation de cette propriété implique l'emploi d'un étalon interne capable lui aussi de complexer le cuivre. La nécessité de respecter la structure chimique fonda-

mentale de l'EMB nous a conduit à synthétiser un homologue dans lequel les deux groupements butanol terminaux sont remplacés par deux groupements propanol: le N,N'-bis(hydroxyméthyl-1-éthyl)éthylènediamine-(S,S) (MEMB).

## MATÉRIEL ET MÉTHODE

### Réactifs

Acétonitrile (qualité CLHP), sulfate de cuivre pentahydraté, chloroforme (qualité Uvasol) (Merck, Darmstadt, R.F.A.), ammoniacque à 28% (U.C.B., Drogenbos, Belgique), (+)-amino-2-propanol-1 et dibromo-1,2-éthane (Aldrich, Strasbourg, France). Le dichlorhydrate d'EMB, (+)-N,N'-bis(hydroxyméthyl-1-propyl)éthylènediamine nous a été fourni gracieusement par le Laboratoire Lederle (Oullins, France).

### Appareillage

L'appareil utilisé est un chromatographe liquide Du Pont de Nemours (Orsay, France). Ce système comprend une pompe 870, équipée d'une vanne à boucle de 50  $\mu\text{l}$  (Rhéodyne 71-25, Berkeley, CA, États-Unis), un spectrophotomètre UV calé à 270 nm raccordé à un enregistreur de type BD 40 (Touzard et Matignon, Vitry sur Seine, France).

### Préparation des colonnes

Deux types de colonnes sont utilisés, une colonne de pré-saturation et une colonne analytique. La colonne de pré-saturation (250  $\times$  4,6 mm) est garnie à l'aide d'une silice de granulométrie 50  $\mu\text{m}$  de grande porosité (Alltech, Paris, France). La colonne analytique (150  $\times$  4,6 mm) contient de la silice (LiChrosorb Si 60,5  $\mu\text{m}$ ) mise en suspension dans un mélange de méthanol-propanol-2-tétrachlorure de carbone-cyclohexanol-toluène (5:5:18:10,8:1,2) et ultrasonnée quelques minutes. Le remplissage s'effectue sous une pression de 450 bars (pompe Haskell, Touzard et Matignon) à l'aide de méthanol.

### Modification du gel de silice par le Cu(II)

La phase mobile de travail est constituée d'un mélange de sulfate de cuivre ammoniacal et d'acétonitrile. Le Cu(II) se fixant de façon irréversible sur la silice, il convient de saturer celle-ci en faisant percoler à travers les colonnes une solution de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ( $10^{-1}$  mol/l) et d'ammoniacque ( $5 \cdot 10^{-1}$  mol/l), jusqu'à obtention d'un effluent bleu.

### Synthèse de l'étalon interne (MEMB, Fig. 1)

Dans le but de disposer d'un étalon interne distinct de l'EMB mais susceptible de présenter des propriétés chromatographiques et complexantes voisines, la N,N'-bis(hydroxyméthyl-1-éthyl)éthylènediamine-(S,S) est synthétisée selon une technique voisine de celle décrite par Wilkinson et al. [17] pour l'EMB. Le dibromoéthane (0,005 mol) est chauffée au reflux, durant 25 min, vers 110°C, avec de l'amino-2-propanol-1 de configuration S (0,05 mol). Après refroidissement à 30°C, une solution de potasse (0,012 mol) dans 5 ml de propanol chaud est ajoutée. Le milieu est ensuite refroidi au bain de glace, ce qui provoque la

précipitation du bromure de potassium. Après filtration et concentration à l'évaporateur rotatif, une huile orange est obtenue, puis dissoute dans un mélange d'acétone-propanol (50:50). Cette solution, plongée dans un bain de glace, laisse précipiter le reste du bromure de potassium. Après filtration et concentration à l'évaporateur rotatif, une petite quantité (environ 1 ml) d'éthanol anhydre est ajoutée à la solution ce qui provoque la précipitation d'un produit séparé par filtration, puis séché. La pureté du composé obtenu avec un rendement de 58%, contrôlée par microanalyse CHN sur microanalyseur Perkin-Elmer 240, donne des résultats en accord avec la théorie à  $\pm 0,3\%$ .

#### *Prélèvements, étalonnage*

Les prélèvements sanguins sont recueillis dans des tubes héparinés (vacutainers, 5 ml), immédiatement centrifugés à 1000 g pendant 10 min. La fraction plasmatique est congelée jusqu'au dosage. L'étalonnage est réalisé en surchargeant des plasmas à différentes concentrations par des solutions de dichlorhydrate d'EMB fraîchement préparées. Tous les résultats sont exprimés en EMB base.

#### *Méthode*

Le procédé d'extraction est analogue à celui décrit par Lee et Benet [11]. Le plasma (1 ml) est extrait par 8 ml de chloroforme en présence de 2 ml de soude 4 mol/l et de 100  $\mu$ l d'une solution de MEMB (1 g/l). Après agitation de 20 min, les tubes sont centrifugés et la phase chloroformique évaporée sous un courant d'azote dans un tube conique. Le résidu sec est repris par 100  $\mu$ l d'acétonitrile et 50  $\mu$ l sont injectés dans le chromatographe. La phase mobile est constituée d'un mélange d'eau-acétonitrile (50:50) contenant du sulfate de cuivre pentahydraté ( $4 \cdot 10^{-2}$  mmol/l) et de l'ammoniaque (2 mol/l). Le débit est de 1,5 ml/min soit une pression d'environ 7 MPa. La détection se fait à 270 nm et la quantification est basée sur la hauteur des pics.

## RÉSULTATS

La Fig. 2 représente un tracé obtenu avec un plasma surchargé d'EMB (5 mg/l) ainsi que le chromatogramme d'un blanc sérique. Les temps de rétention dans les conditions indiquées sont de 5,7 min (EMB) et 7 min (MEMB). L'étude de la linéarité entre 0,625 et 20 mg/l conduit à l'équation de la droite de régression suivante:  $y = 10,03x + 0,36$  ( $y$  = concentration en EMB,  $x$  étant le rapport des pics EMB/MEMB) avec  $r = 1,00$ . Les résultats de la reproductibilité évaluée à six concentrations différentes, figurent dans les Tableau I. La limite de détection est égale à 0,15 mg/l pour un rapport signal sur bruit égal à 3.

## DISCUSSION

#### *Montage*

La colonne placée entre la pompe et la vanne d'injection ne participe pas à la chromatographie de l'échantillon mais permet de saturer par sa longueur et la

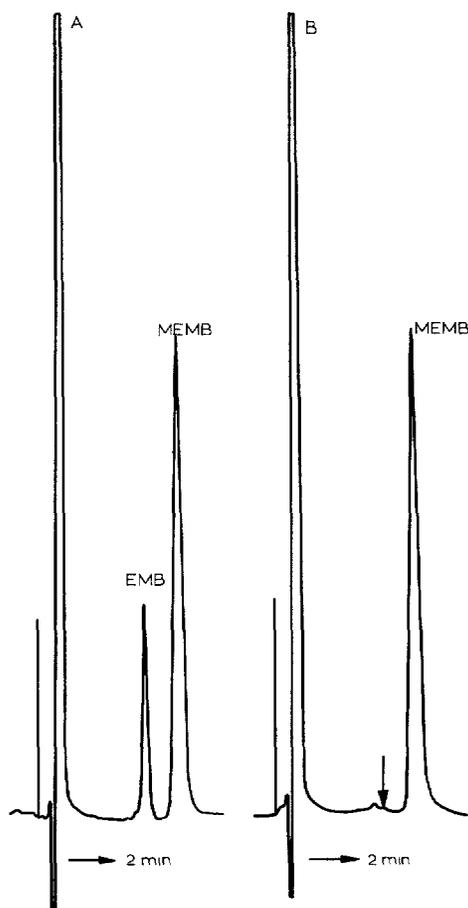


Fig. 2. Chromatogrammes obtenus avec un plasma surchargé à 5 mg/l en éthambutol (A) et un blanc plasmatique (B). Composition de la phase mobile: eau-acétonitrile (50:50) contenant  $4 \cdot 10^{-2}$  mmol/l de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  et 2 mol/l de  $\text{NH}_3$ . Détection à 270 nm; sensibilité 0,08 unité d'absorbance pleine échelle. Pics: EMB = éthambutol; MEMB = étalon interne.

porosité de la silice employée, la phase mobile en silicate d'ammonium, évitant ainsi la destruction prématurée de la colonne analytique. Pour compléter la saturation, la phase éluante sortant du spectrophotomètre est à nouveau utilisée

TABEAU I

ÉTUDE DE LA REPRODUCTIBILITÉ ( $n=5$ )

Concentration (mg/l)	Coefficient de variation (%)
20	6,3
10	6,2
5	7,8
2,5	5,7
1,25	10,5
0,625	9,1

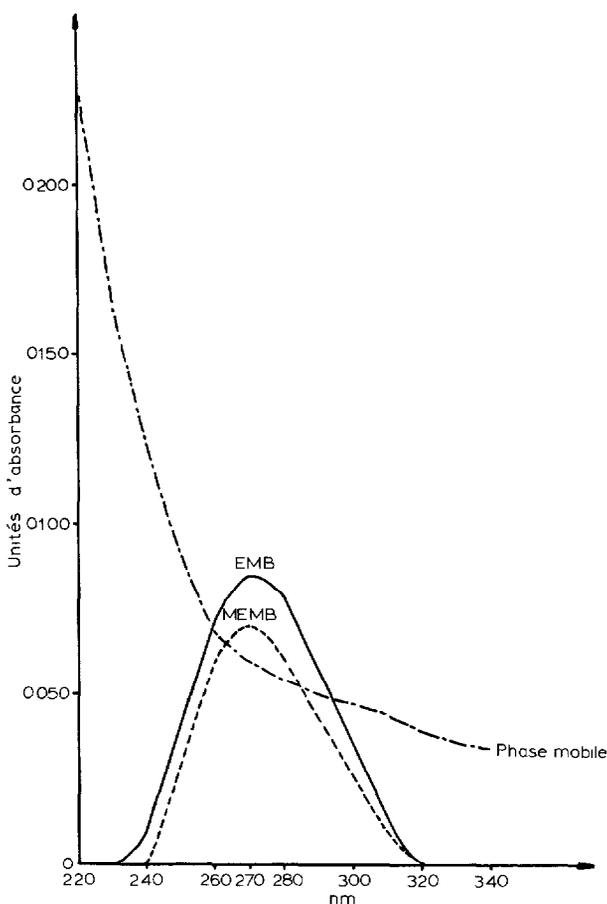


Fig. 3. Spectres d'absorption de la phase mobile seule, de l'éthambutol (EMB) et de l'étalon interne (MEMB).

pour l'alimentation de la pompe.

#### *Modification superficielle du gel de silice par formation de silicate de cuivre*

Deux possibilités sont offertes pour cuivrer la silice: avant ou après le remplissage de la colonne. La première solution consiste à une mise en suspension de la silice dans une solution ammoniacale de sulfate de cuivre suivie d'un rinçage à l'eau distillée et d'un séchage en étuve, procédé qui présente l'inconvénient de sa durée. La seconde technique, en faisant percoler la solution à travers une colonne préalablement remplie, a l'avantage de la rapidité et permet, éventuellement, l'emploi d'une colonne analytique commerciale. Pour avoir essayé les deux protocoles, nous n'avons pas remarqué de différences fondamentales de leurs propriétés chromatographiques vis à vis de l'EMB et de son étalon interne.

#### *Rôle du Cu(II) dans la phase mobile*

L'utilisation de cations métalliques [essentiellement ceux des métaux de transition: Cu(II), Zn(II), Cd(II), Ni(II)] a été proposée par différents auteurs

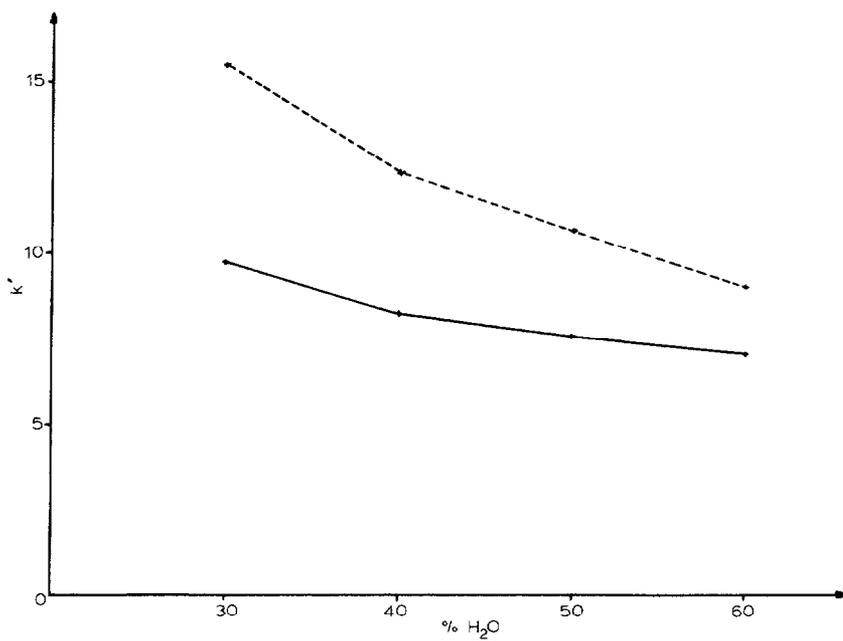


Fig. 4. Evolution des  $k'$  en fonction du pourcentage d'eau.

dans de multiples applications: séparation d'acides aminés [18], de petits peptides [19], d'alcaloïdes [20], etc. Le ligande développeur peut être soit de l'ammoniaque soit une amine aliphatique. A côté de son intérêt dans la résolution, le cation métallique peut aussi jouer un rôle dans la détection du soluté, procédé employé par Grimble et al. [21] pour le dosage des sucres physiologiques [ détec-

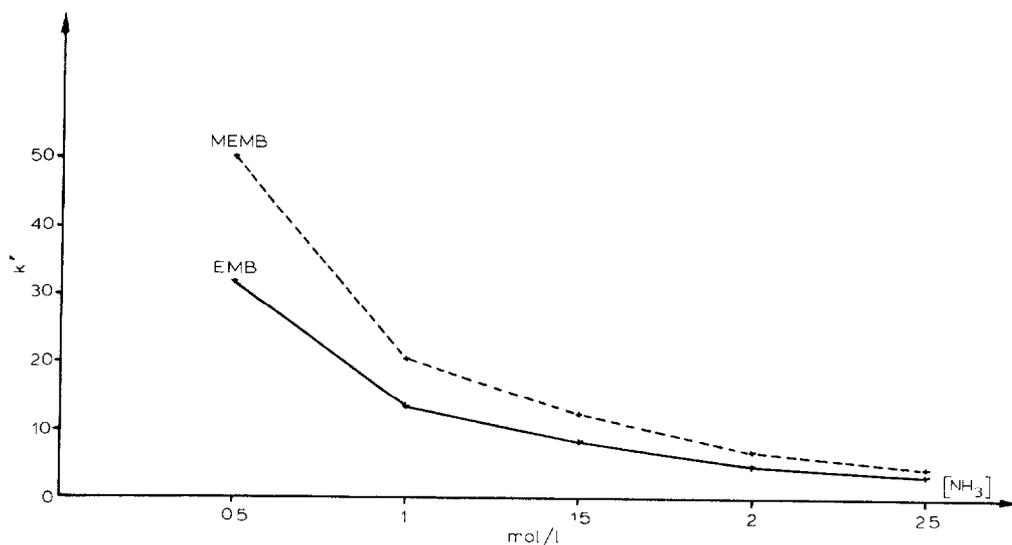


Fig. 5. Evolution des  $k'$  en fonction de  $[NH_3]$ .

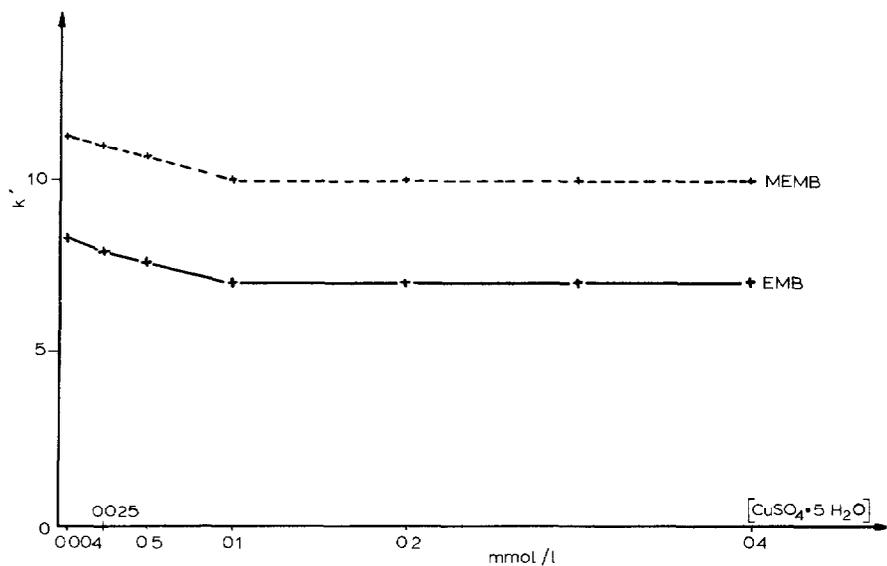


Fig. 6. Evolution des  $k'$  en fonction de  $[\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$ .

tion par le Cu(II) ajouté en post-colonne] et par Leonard et al. [22] [la phase mobile contenant le Cu(II) en solution]. Les spectres d'absorption de la phase éluante seule et des complexes Cu-EMB et Cu-MEMB sont illustrés par la Fig. 3. Le maximum d'absorption se situe à 270 nm mais autorise, sans baisse notable de la sensibilité, une lecture à 280 nm par un détecteur à filtre.

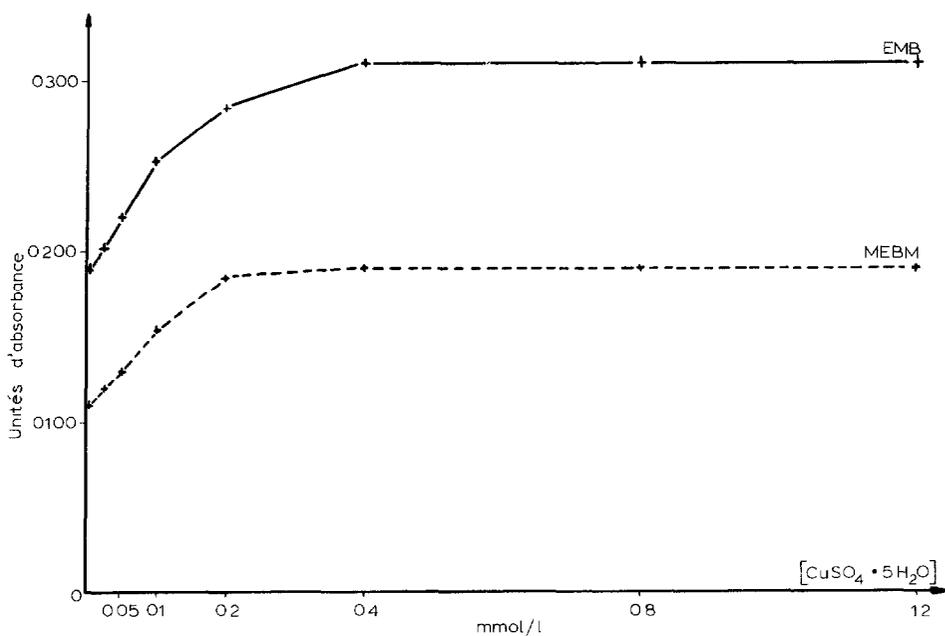


Fig. 7. Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration en Cu(II).

### *Variation des facteurs de capacité ( $k'$ ) en fonction de la quantité d'eau*

Dans cette étude, les concentrations en ammoniacque et sulfate de cuivre sont restées constantes et égales respectivement à 1,7 mol/l et  $8 \cdot 10^{-3}$  mmol/l. L'évolution du  $k'$  des complexes Cu-EMB et Cu-MEMB est illustrée dans la Fig. 4.

### *Variation des $k'$ en fonction de $[NH_3]$ (Fig. 5)*

Le pourcentage d'eau est fixé à 50% avec la même concentration en Cu(II) que précédemment: les concentrations en ammoniacque variant de 0,5 à 2,5 mol/l.

### *Variation des $k'$ en fonction de Cu(II) (Fig. 6)*

Les concentrations en sulfate de cuivre ont varié de  $4 \cdot 10^{-3}$  à  $4 \cdot 10^{-1}$  mmol/l sans influence sensible sur l'évolution des  $k'$ .

En fait, il ressort de cette étude que le paramètre dominant est représenté par la quantité d'ammoniacque contenue dans la phase mobile puisqu'une variation de 0,5 à 2,5 mol/l entraîne une diminution des  $k'$  de 32 à 3,5 (EMB) et de 50 à 4,5 (MEMB). Par contre, une augmentation du pourcentage d'eau de 30 à 60% ne modifie que faiblement les temps de rétention (9,7 à 7, EMB; 15,5 à 9, MEMB). Si le cuivre a une action à peu près nulle sur les facteurs de capacité, son incidence sur la réponse spectrophotométrique et la hauteur des pics, est plus importante (Fig. 7). La réponse évolue pour atteindre un plateau à 0,4 mmol/l, mais il n'est pas conseillé de travailler avec des concentrations trop élevées pour deux raisons: (i) à partir de 0,1 mmol la phase mobile devient colorée et l'augmentation de la réponse s'accompagne d'un accroissement important du bruit de fond; (ii) le risque de cristallisation du sulfate de cuivre sera majoré. Néanmoins, la forte quantité d'ammoniacque présente, assure une marge suffisante de sécurité compatible avec l'utilisation de concentration supérieure en sel de cuivre. C'est pourquoi les conditions d'élution consistent à choisir un compromis acceptable entre  $[NH_3]$ ,  $[Cu(II)]$  et  $[H_2O]$  et ont conduit aux conditions citées plus haut. Les différents antituberculeux (rifampicine, isoniazide, pyrazinamide) utilisés en association ne provoquent pas d'interférence sur le chromatogramme.

## CONCLUSION

La méthode CLHP présentée dans ce travail est adaptée à l'étude des concentrations d'EMB atteintes en thérapeutique humaine. La présence de sulfate de cuivre dans la phase éluante entraîne la formation instantanée d'un complexe dont l'absorption à 270 nm permet la détection et la quantification du composé. Cette chélation évite tout autre procédé nécessairement plus long, de dérivation de la molécule.

## RÉSUMÉ

La méthode proposée se fonde sur la capacité de l'éthambutol de former avec des cations métalliques divalents, des complexes de chélation. Celui obtenu avec les sels de cuivre, présente une absorption caractéristique à 270 nm, permettant un dosage de l'éthambutol plasmatique après extraction chloroformique en milieu

alcalin. La colonne utilisée contient de la silice (LiChrosorb Si 60, 5  $\mu\text{m}$ ) et la phase mobile consiste en un mélange d'eau-acétonitrile (50:50) contenant du sulfate de cuivre et de l'ammoniaque. L'étalon interne est un homologue inférieur de l'éthambutol présentant les mêmes propriétés complexantes. La limite de détection est de 0,15 mg/l et les autres antituberculeux employés en association ne donnent aucune interférence.

#### REMERCIEMENT

Les auteurs remercient vivement Madame C. Gosselin pour son aimable collaboration.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 Recommandations de la société de Pneumologie de Langue Française, Traitement de la Tuberculose en France, Rev. Fr. Mal. Resp., 1 (1984) 59.
- 2 C.S. Lee, D.C. Brater, J.G. Gambertoglio et L.Z. Benet, J. Pharmacokinet. Biopharm., 8 (1980) 335.
- 3 V.A. Place et J.P. Thomas, Am. Rev. Respir. Dis., 8 (1963) 901.
- 4 J.C. Pujet et C. Pujet, Bordeaux Med., 5 (1972) 1215.
- 5 V.A. Place, E.A. Peets, D.A. Buyske et R.R. Little, Ann. N.Y. Acad. Sci., 135 (1966) 775.
- 6 J. Kelly et J. De La Huerga, Monographie du Myambutol, Lederle Laboratories, New York, 1967.
- 7 I. Strausse et F. Erhardt, Chemotherapy, 15 (1970) 148.
- 8 G. Arnaud, M. Gavend, A. Roulet, B. Paramelle et G. Bessard, Ga. Med. Fr. (Suppl.), 79 (1972) 7321.
- 9 A. Calò, C. Cardini et V. Quercia, J. Chromatogr., 37 (1968) 194.
- 10 B.M. Richard, J.E. Manno et B.R. Manno, J. Chromatogr., 89 (1974) 80.
- 11 C.S. Lee et L.Z. Benet, J. Chromatogr., 128 (1976) 188.
- 12 A.D. Blair, A.W. Forrey, G. Christopher, B. Maxwell et R.E. Cutler, dans E.R. Klein et P.O. Klein (Rédacteurs), Proceedings of the 2nd International Conference on Stable Isotopes, Oct. 20-23, 1975, Oak Brook, IL, p. 208.
- 13 M.R. Holdiness, Z.H. Israili et J.B. Justice, J. Chromatogr., 224 (1981) 415.
- 14 A. Deom, S. Dogan et R. De Haller, Inf. Sci. Biol., 9 (1983) 96.
- 15 G. Gamberini, V. Ferioli, R. Camerini et M.T. Bernabei, Atti. Soc. Mat. Modena, 115 (1984) 15.
- 16 A. Lespagnol, Chimie des Médicaments, Tome 3, Entreprise Moderne d'Édition, Paris, 1975, p. 267.
- 17 R.G. Wilkinson, M.B. Cantrall et R.G. Shepherd, J. Med. Pharm. Chem., 5 (1962) 835.
- 18 M. Caude et A. Foucault, Anal. Chem., 51 (1979) 459.
- 19 F. Guyon, A. Foucault et M. Caude, J. Chromatogr., 186 (1979) 677.
- 20 H.F. Walton, J. Chromatogr., 102 (1974) 57.
- 21 G.K. Grimble, H.M. Barker et R.H. Taylor, Anal. Biochem., 125 (1983) 1.
- 22 J.L. Leonard, F. Guyon et P. Fabiani, Chromatographia, 11 (1984) 600.