

Journal of Chromatography, 434 (1988) 157-167

Biomedical Applications

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

CHROMBIO. 4440

DOSAGE SIMULTANÉ DE LA VINBURNINE ET DE LA 6-HYDROXYVINBURNINE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE

P.A. SADO*, D. GIBASSIER et R. LEVERGE

Laboratoire de Pharmacie Galénique et Biopharmacie, Faculté de Médecine et Pharmacie, Avenue Pr. L. Bernard, 35000 Rennes (France)

(Reçu le 2 juin 1988; manuscrit modifié reçu le 12 août 1988)

SUMMARY

Simultaneous determination of vinburnine and 6-hydroxyvinburnine in human plasma by high-performance liquid chromatography

An isocratic high-performance liquid chromatographic method has been developed to allow the simple and rapid determination of both vinburnine (I) and its main metabolite, 6-hydroxyvinburnine (II), in heparinized human plasma (0.5 ml). Compounds I and II and *p*-chloridisopyramide (internal standard) were first extracted with alkalinized ethyl acetate and then with sulphuric acid. Separation was achieved on a reversed-phase μ Bondapak C₁₈ column with a mobile phase of acetonitrile-water-0.1 M heptanesulphonate in acetic acid and with detection at 254 nm. Each run required 20 min. The within-day coefficients of variation for identical samples (20 ng/ml) were 7 and 6% and between-day coefficients of variation 8 and 26% for I and II, respectively. The detection limit was 5 ng/ml (normal therapeutic concentration, 10-300 ng/ml). The application of the method to drug monitoring was compared to that of a thin-layer chromatographic procedure.

INTRODUCTION

La vinburnine (I) est un alcaloïde indolique de structure apparentée [1] à celle de la vincamine (III) (Fig. 1), présent en faible quantité dans *Vinca minor* et préparé par héli-synthèse [2,3] ou synthèse totale [4,5]. L'ensemble des travaux pharmacologiques réalisés sur cette molécule a démontré qu'elle améliore, de façon plus intense et prolongée que la vincamine, la circulation et le métabolisme cérébral [6,7] et qu'elle s'oppose, contrairement à la vincamine, aux effets amnésiants de l'hypoxie expérimentale [8]. En outre, des études pharmacocinétiques cliniques ont montré que cet alcaloïde subit un très fort métabolisme hépatique, conduisant notamment à un dérivé hydroxylé (Fig. 1), la 6-hydroxy-

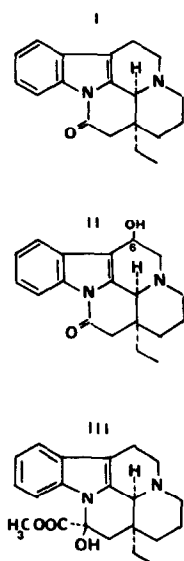


Fig. 1. Structure comparée des composés vinburnine (I), 6-hydroxyvinburnine (II) et vincamine (III).

vinburnine (II), principal métabolite humain [9]. Enfin, l'hypothèse existe que, comme la vincamine, cet alcaloïde ne soit pas dépourvu d'une certaine toxicité cardiaque [10,11].

Si l'on considère que les traitements à base de vinburnine peuvent concerner généralement des sujets âgés susceptibles de présenter simultanément des troubles aussi bien hépatiques que cardiaques, il peut apparaître opportun de disposer d'une méthodologie applicable au suivi thérapeutique d'un tel alcaloïde.

Cette méthodologie devra reposer sur un protocole analytique performant, utilisable en routine. Ses qualités de fidélité et de sensibilité devront être compatibles avec les objectifs fixés aux études cliniques concernées et notamment avec les taux plasmatiques qui, au cours de traitement oral chronique, évoluent en moyenne entre 10 et 300 ng/ml pour ce qui concerne le principe actif inchangé.

Bien qu'une seule méthode analytique, reposant sur la chromatographie sur couche mince (CCM) [9], ait donné initialement toutes les garanties indispensables à l'étude pharmacocinétique du principe actif inchangé, l'application de la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) à ce type de dosage est apparue souhaitable, notamment en raison de son automatisation. Cette nouvelle méthode a été ensuite validée à l'occasion d'un traitement de vinburnine chez l'homme.

Principe

Après addition d'un étalon interne constitué de *p*-chlorodisopyramide (PCD, IV, Fig. 2), les composés I et II sont extraits du plasma par l'acétate d'éthyle en milieu basique. L'extrait organique est ensuite contre-extrait par une solution aqueuse sulfurique. Cette étape a pour but de purifier le principe actif et de con-

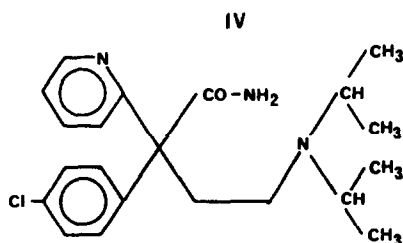


Fig. 2. Structure de l'étalon interne, *p*-chlorodisopyramide (PCD, IV).

centrer l'échantillon. L'extrait aqueux sulfurique est ensuite tamponné (sans dilution) par l'acétate de sodium, avant chromatographie.

I et son métabolite principal (II) sont alors séparés par CLHP et détectés par photométrie UV à 254 nm.

MÉTHODOLOGIE ANALYTIQUE

Le processus analytique peut être décrit en trois étapes: extraction, chromatographie et détection.

Extraction

L'étape d'extraction s'applique simultanément, et pour chaque opération de dosage, à une gamme d'étalonnage et aux échantillons plasmatiques à analyser.

Gamme d'étalonnage. Quatre échantillons de 500 μ l de plasma humain témoin sont chargés en I et en II, à raison de 10, 50, 200 et 400 ng/ml. Pour chaque dosage, chaque échantillon est traité comme un essai plasmatique.

Essais. Chaque échantillon plasmatique à analyser est traité comme suit. Le plasma (500 μ l) est introduit dans un tube à extraction de 8 ml à bouchage hermétique (joint de PTFE, Sovirel, Levallois Perret, France). A cet échantillon sont ajoutés 500 μ l d'une solution de PCD (IV), dosée à 0,5 μ g/ml dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 0,01 M. Sont ensuite ajoutés 100 μ l de solution aqueuse de hydrate de sodium 1 M. Ce mélange est homogénéisé par agitation pendant 10 s, puis lui sont additionnés 4 ml d'acétate d'éthyle (Merck pour analyse). Ce mélange est agité pendant 2 min à l'agitateur automatique (Agitelec, Ets Toutlemonde, Paris, France), puis centrifugé pendant 3 min à 2000 g.

Après centrifugation, 3,5 ml de l'extrait organique sont transvasés dans un tube à fond tronconique de 5 ml, à bouchage hermétique (joint de PTFE, Alltech, Ets Interchim, Paris, France), traités par 0,1 ml d'une solution aqueuse d'acide sulfurique 0,1 M, puis agité automatiquement pendant 1 min.

Après centrifugation pendant 3 min à 2000 g, la phase organique surnageante est éliminée par aspiration sous vide. L'extrait aqueux acide est alors transféré, à raison de 0,1 ml, dans un flacon d'échantillonnage pour injecteur automatique WISP (Waters, Paris, France) où aura été préalablement évaporé à sec 0,1 ml d'une solution méthanolique d'acétate de sodium 0,2 M. Le pH final de l'extrait aqueux

à injecter est alors voisin de 4 et compatible avec les conditions de stabilité de la colonne de chromatographie.

Chromatographie

La chromatographie de chaque échantillon plasmatique (étalon et/ou essai) est effectuée en mode isocratique sur colonne μ Bondapak C₁₈ (30 cm \times 3,9 mm, Waters). La phase mobile est constituée du mélange acétonitrile-eau-0,1 M d'heptane sulfonate de sodium dans l'acide acétique au 1:2 (33:65:2, v/v). Cette phase mobile est dégazée extemporanément par filtration sous vide (membrane FH, 0,5 μ m, Millipore, Molsheim, France). L'échantillon est injecté automatiquement (injecteur WISP, Waters) à raison de 80 μ l par essai. La chromatographie est effectuée à la température de 35°C pour un débit de la phase mobile de 1,0 ml/min.

Détection

La détection par photométrie UV est réalisée au moyen d'un détecteur UV à filtre (Modèle 440, Waters).

Un intégrateur (Enica 21, Delsi Instruments, Suresnes, France) permet l'enregistrement continu (vitesse d'enregistrement de 0,25 cm/min), et l'évaluation des surfaces sous les pics chromatographiques. A l'occasion de la mise au point de la méthode, les surfaces (S) des pics relatifs aux substances I et II ont été rapportées aux surfaces des pics de l'étalon interne (S_{IV}): $R_1 = S_I/S_{IV}$; $R_2 = S_{II}/S_{IV}$. En routine, la programmation de l'intégrateur a permis le calcul automatique de chaque concentration par calibration (interpolation) entre les deux points d'étalonnage (trois segments, quatre points) qui l'encadrent.

RÉSULTATS

Compte tenu des qualités requises pour les méthodes analytiques applicables aux études pharmacocinétiques et/ou au suivi thérapeutique [12], les résultats obtenus ont été contrôlés du point de vue de la sensibilité, de la linéarité, de la spécificité et de la reproductibilité.

Sensibilité

La sensibilité de cette méthode a été étudiée à partir de solutions pures. Dans ce cas il a été réalisé des solutions de I et II dosées à 2,5 ng par 100 μ l, en utilisant comme solvant une solution d'acétate de sodium (16,4 mg/ml) dans acide sulfurique 0,1 M. L'injection automatique de 80 μ l de cette solution, à dix reprises successives, a permis de montrer que, pour une masse injectée de 2 ng, les coefficients de variation des réponses sont de l'ordre de 10% pour le composé II et de 5% pour le composé I (Tableau I).

Linéarité

La linéarité de la méthode a été étudiée dans les deux cas de solutions pures et de plasma humain.

Pour ce qui concerne les solutions pures, une gamme étalon a été réalisé, dans

TABLEAU I

SENSIBILITÉ

Surfaces individuelles S_I et S_{II} sous les pics chromatographiques, moyennes et coefficients de variation, après injection automatique successive de dix échantillons de 2 ng de vinburnine (I) et de 6-hydroxyvinburnine (II) sous un volume de 80 μ l.

	S_I	S_{II}
	3514	3898
	3327	4238
	3702	3886
	3595	3971
	3656	4166
	3644	3580
	3526	4617
	3712	4331
	3947	3318
	3340	3677
Moyenne	3596	3968
Écart type	184	385
Coefficient de variation (%)	5,1	9,7

les mêmes conditions que ci-dessus, aux concentrations suivantes: 2, 4, 8, 20, 40, 80 et 200 ng par 80 μ l. La linéarité de la réponse est exprimée par les paramètres des droites obtenues par régression selon la méthode des moindres carrés. Elles se caractérisent par les équations $y = 2143x - 4015$ pour I et $y = 1814x - 288$ pour II et par des coefficients de régression $> 0,999$ dans chaque cas.

Pour ce qui concerne le plasma, la linéarité de la méthode a été contrôlée à partir de dix gammes d'étalonnage différentes effectuées avec des plasma chargés en I et II à raison de 10, 50, 200 et 400 ng/ml. Dans le cas du principe actif, les résultats ont conduit à un coefficient de régression moyen de 0,999 associé à un coefficient de variation moyen de 0.1%. Dans le cas du métabolite principal, le coefficient de régression moyen de 0,996 est associé à un coefficient de variation moyen de 0.53%.

Selectivité

La Fig. 3 illustre la selectivité de la méthode à partir d'un exemple de chromatogramme obtenu après traitement d'un échantillon plasmatique chargé en composés I et II à raison de 5 ng/ml. Par comparaison au chromatogramme d'un plasma témoin, dépourvu des produits I et II, ainsi que de l'étalon interne IV, il apparait que le plasma humain standard ne présente pas de pics susceptibles d'interférer avec les composés concernés; de plus, dans les conditions d'extraction, de chromatographie et d'enregistrement décrites, tout risque d'interférence entre ces trois produits est exclus.

Reproductibilité

La reproductibilité de la méthode a été étudiée d'une part au cours de la journée, d'autre part au jour le jour.

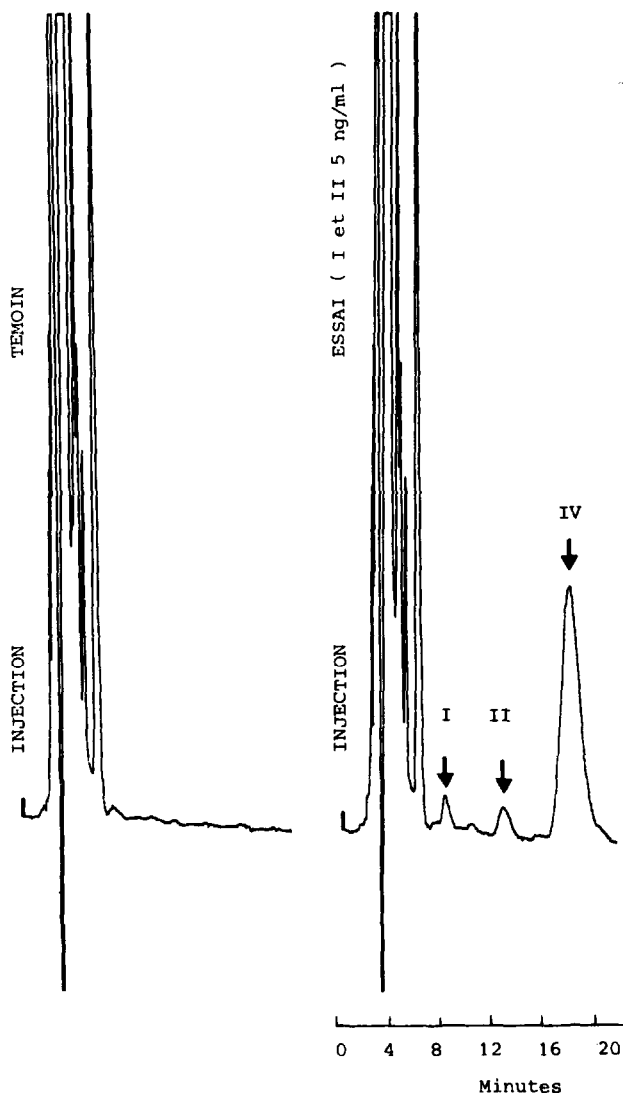


Fig. 3. Selectivité. Comparaison des chromatogrammes d'un plasma témoin et d'un plasma d'essai (chargé en I et II à raison de 5 ng/ml). Vitesse d'enregistrement de 0,25 cm/min. IV = étalon interne.

Au cours de la journée. Le contrôle de reproductibilité a porté sur trois plasma témoins chargés aux concentrations théoriques de 20, 100 et 200 ng/ml de I et II. Analysées dix fois de suite au cours d'une même journée, par comparaison aux gammes d'étalonnage décrites ci-dessus, les concentrations mesurées ont été, en moyenne, respectivement pour I et II de 20 et 19 ng/ml, de 102 et 97 ng/ml et de 199 et 205 ng/ml. Le Tableau II illustre l'ensemble des résultats caractérisés par des coefficients de variation très faibles.

Au jour le jour. La reproductibilité au jour le jour a porté sur deux plasma témoins chargés aux concentrations théoriques de 20 et 100 ng/ml de I et II.

TABLEAU II

REPRODUCTIBILITÉ AU COURS DE LA JOURNÉE

Concentrations mesurées individuelles et moyennes ($n=10$) comparées aux concentrations théoriques (C_t) de plasma témoins chargés à 20, 100 et 200 ng/ml en vinburnine (I) et 6-hydroxyvinburnine (II).

	Concentration mesurée (ng/ml)					
	$C_t=20$ ng/ml		$C_t=100$ ng/ml		$C_t=200$ ng/ml	
	I	II	I	II	I	II
1	20	17	103	87	207	189
2	20	20	103	92	200	206
3	23	20	102	113	207	211
4	18	18	104	95	200	212
5	20	19	102	105	203	204
6	21	17	100	103	191	213
7	20	19	100	105	198	190
8	19	20	105	—	193	221
9	18	18	98	86	193	211
10	21	19	101	91	194	194
Moyenne	20	19	102	97	199	205
Coefficient de variation (%)	7	6	2	10	3	5

Analysées dix fois séparément (dix jours différents) et évaluées à chaque fois par rapport à une gamme d'étalonnage, les concentrations mesurées ont été respectivement pour I and II de 22 et 19 ng/ml et de 102 et 105 ng/ml. Le Tableau III illustre l'ensemble de ces résultats caractérisés par des coefficients de variation relativement peu élevés.

Enfin, afin d'évaluer la stabilité des composés concernés, un plasma témoin a été chargé à raison de 100 ng/ml en I et II et divisé en dix échantillons. Congelés simultanément ces échantillons ont été analysés progressivement sur une durée de six mois. Les concentrations mesurées, illustrées dans le Tableau IV et la Fig. 4, d'une valeur moyenne respectivement de l'ordre de 104 ± 6 et 101 ± 9 ng/ml pour I et II, traduisent la bonne stabilité de I et II sur cette période et donc a fortiori dans les délais habituels de conservation des échantillons plasmatiques.

Application

A titre d'évaluation, cette méthode de dosage par CLHP a été comparée à la méthode de référence [9]. Cette comparaison a porté sur les échantillons plasmatiques obtenus après administration orale d'une dose de 60 mg de vinburnine base (Cervoxan, Laboratoires Beecham, Paris, France) chez un sujet volontaire sain. Huit prélèvements sanguins veineux ont été effectués aux temps 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6 et 8 h après l'administration. La méthode de référence est basée sur la séparation par CCM de la vinburnine et de ses métabolites, suivie d'un dosage par spectrofluorodensitométrie in situ.

TABLEAU III

REPRODUCTIBILITÉ AU JOUR LE JOUR

Concentrations mesurées individuelles et moyennes ($n=10$) comparées aux concentrations théoriques (C_t) de plasma témoins chargés à 20 et 100 ng/ml de vinburnine (I) et de 6-hydroxyvinburnine (II).

	Concentration mesurée (ng/ml)			
	$C_t=20$ ng/ml		$C_t=100$ ng/ml	
	I	II	I	II
1	24	19	108	99
2	21	14	98	101
3	24	25	102	126
4	18	18	108	89
5	21	26	96	117
6	23	26	99	96
7	21	19	103	114
8	22	14	104	104
9	21	15	100	100
10	21	15	99	105
Moyenne	22	19	102	105
Coefficient de variation (%)	8	26	4	11

TABLEAU IV

STABILITÉ

Evolution en fonction du temps des concentrations plasmatiques mesurées à partir d'un échantillon de plasma humain chargé à 100 ng/ml de vinburnine (I) et de 6-hydroxyvinburnine (II).

Temps (mois)	Concentration (ng/ml)	
	I	II
0	108	99
1,2	98	101
2	108	89
2,2	96	117
2,3	99	96
2,4	103	114
4	104	104
4,5	99	105
5,5	114	88
6	110	100
Moyenne	104	101
Écart type	6	9,4
Coefficient de variation (%)	5,7	9,3

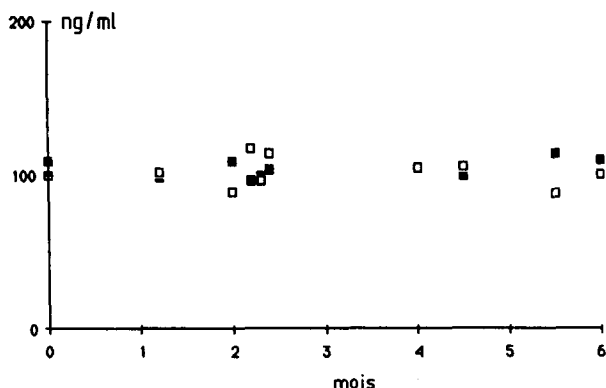


Fig. 4. Evolution en fonction du temps (six mois) de la concentration plasmatique d'un échantillon de plasma humain chargé à 100 ng/ml de vinburnine (■) et de 6-hydroxyvinburnine (□).

TABLEAU V

CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DE VINBURNINE (I) ET DE 6-HYDROXYVINBURNINE (II) MESURÉES SUR 8 h PAR CLHP ET CCM APRÈS ADMINISTRATION ORALE DE 60 mg DE VINBURNINE CHEZ L'HOMME

SSC = aires sous les courbes de concentration.

Temps (h)	Concentration (ng/ml)			
	CLHP		CCM	
	I	II	I	II
0,5	36	68	35	74
1	131	202	140	241
1,5	121	207	118	262
2	84	172	79	238
3	46	140	43	168
4	29	109	32	135
6	13	42	20	65
8	11	31	14	37
SSC (ng·h/ml)	334	786	351	1005

Les concentrations plasmatiques obtenues avec chaque méthode sont résumées dans le Tableau V et illustrées par la Fig. 5. Ces résultats ne montrent pas de différence importante dans l'évaluation des concentrations de vinburnine, mais ils font apparaître des différences sensibles dans l'estimation du principal métabolite circulant. D'un point de vue biopharmaceutique, les deux méthodes ne semblent pas apporter de différences dans l'évaluation de la biodisponibilité de la vinburnine. En effet les aires sous les courbes des concentrations plasmatiques, reflétant les quantités de principe actif disponibles, évaluées sur la durée expérimentale par la méthode des trapèzes, diffèrent de moins de 5% (Tableau V).

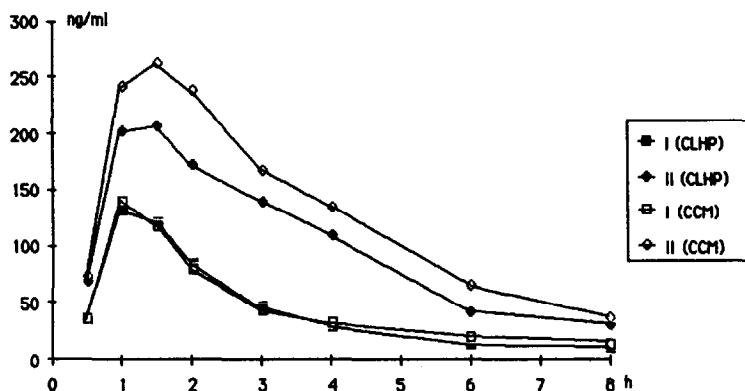


Fig. 5. Evolution des concentrations plasmatiques de vinburnine (I) et de 6-hydroxyvinburnine (II) après administration orale de 60 mg de I chez l'homme, et dosage comparatif par CLHP et CCM.

Toutefois les différences observables au niveau de la 6-hydroxyvinburnine laissent penser que, si la méthode de référence présentait les qualités de spécificité requises pour l'étude pharmacocinétique du principe actif inchangé, la nouvelle méthode améliore la spécificité du dosage de la 6-hydroxyvinburnine et autorise une meilleure étude ultérieure du métabolisme du principe actif.

CONCLUSION

La méthode de dosage par CLHP présente en général l'inconvénient d'un coût de mise en oeuvre élevé. En échange ses avantages sont multiples. Dans le cas présent, tout en préservant la sensibilité analytique vis-à-vis des deux composés, la méthode de dosage par CLHP permet de réduire très sensiblement le volume d'échantillon sanguin nécessaire (0,5 ml de plasma au lieu de 2 ml). Elle semble améliorer la spécificité en terme de métabolisme, notamment vis-à-vis du métabolite principal (6-hydroxyvinburnine). Enfin, l'automatisation de l'analyse accroît la rapidité d'obtention des données sanguines et la fiabilité des résultats, elle même traduite par la fidélité de la méthode.

Ces qualités présentent d'autant plus d'intérêt qu'elles accréditent les données plasmatiques concernant le principal métabolite humain et permettent d'envisager l'étude précise de l'important processus de biotransformation de la vinburnine.

RÉSUMÉ

Une méthode de chromatographie liquide à haute performance est proposée pour améliorer le dosage de la vinburnine (I) et de la 6-hydroxyvinburnine (II), son principal métabolite humain. Les composés I et II, ainsi que le *p*-chlorodisopyramide (étalon interne) sont extraits du plasma par de l'acétate d'éthyle en milieu alcalin, puis contre-extraits en milieu sulfurique. Leur séparation s'effectue sur colonne μ Bondapak C₁₈ en utilisant comme phase mobile le mélange acétonitrile-eau-0,1 M d'heptane sulfonate de sodium en milieu acétique. Leur

détection est réalisée par photométrie UV à 254 nm. Le délai d'obtention de résultats est de 20 min. Les coefficients de variation sont pour I et II respectivement de 7 et 6% (chaque jour) et de 8 et 26% (jour le jour, délai de 3,5 mois), pour la concentration de 20 ng/ml. La sensibilité est de 5 ng/ml pour des concentrations thérapeutiques usuelles comprises entre 10 et 300 ng/ml. Cette méthode permet la détermination rapide, sûre et fidèle de la vinburnine et de la 6-hydroxyvinburnine à partir de 0,5 ml de plasma hépariné. Elle est comparée à une méthode de référence (chromatographie sur couche mince) à propos d'une étude de suivi thérapeutique.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. Le Men et W.I. Taylor, *Experientia*, 21 (1965) 137.
- 2 Omnium-Chimique, Brevet Fr, 2 268 016 (1974).
- 3 Richter-Gedeon, Brevet Fr., 2 184 866 (1973).
- 4 D. Contier, S. Levy et J. Le Men, *Bull. Soc. Chim. (France)*, 11 (1976) 1961.
- 5 Roussel-Uclaff, Brevet Fr., 2 121 360 (1971).
- 6 P. Lacroix, M.J. Quiniou, P. Linee et J.B. Le Polles, *Arzneim.-Forsch.*, 29 (1979) 1094.
- 7 P. Linee, G. Perrault, J.B. Le Polles, P. Lacroix, M. Aourousseau et R. Boulu, *Ann. Pharm. Fr.*, 35 (1977) 97.
- 8 J. Van Den Driessche, P. Linee, J.B. Le Polles et P. Lacroix, *C.R. Soc. Biol.*, 171 (1977) 1081.
- 9 P.A. Sado, D. Gibassier, R. Leverage et J.P. Devissaguet, dans H. Turakka et E. van der Kleijn (Rédacteurs), *Progress in Clinical Pharmacy*, Vol. 111, Elsevier, Amsterdam, 1981, pp. 71-78.
- 10 F. Dany, L. Merle, F. Goudoud, F. Liozon, P. Blanc, J.C. Bouvot, G. Nicot et J. Dangoumau, *Thérapie*, 36 (1981) 55.
- 11 O. Von Strubelt, H. Iven, C.P. Siegers et A. Schutt, *Arzneim.-Forsch.*, 27 (1977) 1264.
- 12 J.M. Alexandre et J.P. Devissaguet, *INSERM*, 96 (1980) 427.