

CHROMBIO. 4504

## Note

---

### Dosage sérique de la perphénazine en chromatographie liquide

M. C. DESSALLES, B. VIENNE et G. MAHUZIER\*

*C.H.S. Villejuif, Laboratoire de Biologie 54, Avenue de la République, 94806 Villejuif Cédex (France)*

(Reçu le 1 juin 1988; manuscrit modifié reçu le 26 septembre 1988)

Le développement des études, cherchant à établir des relations entre les concentrations plasmatiques des psychotropes et les réponses thérapeutiques ou les effets secondaires observés, amène les psychiatres à avoir de plus en plus recours au dosage de ces médicaments.

Les méthodes immunologiques disponibles pour les antiépileptiques et les antidépresseurs rendent ces déterminations accessibles aux laboratoires non spécialisés. Par contre, en ce qui concerne les neuroleptiques, il est nécessaire de faire appel à des méthodes chromatographiques qui devront être adaptées aux molécules considérées.

Le dosage de la perphénazine, phénothiazine pipérazinée (PPZ), comme celui de l'ensemble des neuroleptiques, présente un certain nombre de difficultés: possibilité d'interférences dues aux correcteurs et autres médicaments associés, aux métabolites dont l'activité n'est pas clairement établie et à la grande variabilité interindividuelle des taux sériques. Ceci implique de disposer d'une méthode spécifique dont la linéarité de l'étalonnage soit suffisamment étendue. Les méthodes déjà proposées font appel à la chromatographie gazeuse [1] avec détection par capture d'électron, à la radioimmunologie [2] et à la chromatographie liquide [3,4]. Ces méthodes sont relativement complexes et difficiles à mettre en oeuvre pour les nombreux dosages nécessités par le suivi thérapeutique. C'est pourquoi nous proposons ici une méthode en chromatographie liquide dont le protocole d'extraction a été simplifié et qui permet cependant d'obtenir une bonne spécificité et de déterminer des concentrations voisines de  $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$ .

## MATÉRIEL ET MÉTHODE

*Matériel*

*Réactifs.* L'acétate d'ammonium RP Normapur, le méthanol RP Normapur, le méthanol pour spectrophotométrie dans l'UV, l'hydroxide de sodium 10 M RP Normapur proviennent de Prolabo (Paris, France). L'acétate d'éthyle et l'hexane UV sont de qualité HPLC spectro grade (Alltech Assoc., Applied Sciences Labs.). La perphénazine base et le sulfoxyde de perphénazine nous ont été fournis par les laboratoires Unicet (Levallois Perret, France).

Les solutions étalons de PPZ et d'halopéridol à 1 mg ml<sup>-1</sup> dans le méthanol UV sont conservées à 4 °C et stables pendant plusieurs mois. Ces solutions diluées au 1:1000 (solutions à 1 µg ml<sup>-1</sup>) dans le méthanol UV se conservent quinze jours à 4 °C.

*Appareillage.* Le système de chromatographie liquide est constitué d'une pompe Spectra Physics SP 8750, d'une colonne Brownlee Cyano Sphéri 5 µm, 250 mm × 4,6 mm (Touzart et Matignon, Vitry, France) et d'un spectrophotomètre Shimadzu SPD 2A. La phase mobile est dégazée en permanence sous hélium et distribuée par un système de distribution de solvants SP 8700 X R. L'enregistreur est un Servotrace (Séfram).

*Protocole opératoire*

*Extraction.* La gamme d'étalonnage est réalisée à partir de sérums témoins surchargés: à cinq prises d'essai de 2 ml de sérum sont ajoutés 5, 10, 20, 30 et 60 µl de solution méthanolique de PPZ à 1 µg ml<sup>-1</sup> et 100 µl de la solution d'halopéridol à 1 µg ml<sup>-1</sup> dans le méthanol, utilisée comme étalon interne. Le milieu est alcalinisé par 100 µl de l'hydroxide de sodium 1 M et extrait par 2 ml d'un mélange acétate d'éthyle hexane (4:2, v/v). Après agitation au vortex pendant 1 min et centrifugation 5 min à 4000 tours min<sup>-1</sup> (2350 g), la phase organique est prélevée. Cette phase est lavée par 200 µl de l'hydroxide de sodium 0,1 M. Après agitation au vortex pendant 1 min et centrifugation, la phase organique est desséchée sur sulfate de sodium puis évaporée sous azote et le résidu est repris par 100 µl de méthanol UV.

Les sérums de malades à doser sont extraits dans les mêmes conditions à partir d'une prise d'essai de 2 ml.

*Conditions chromatographiques.* L'extrait méthanolique (50 µl) est injecté sur une colonne Cyano Sphéri 5 µm. L'élution est réalisée par une phase mobile constituée de 90% de méthanol Normapur et 10% d'acétate d'ammonium 0,01 M, filtrée sur millipore et dégazée par un flux continu d'hélium. Le débit est de 2 ml min<sup>-1</sup>. La détection est effectuée en UV à 257 nm à une sensibilité de 0,005 a.u.f.s. et l'enregistrement sur Servotrace 8 mV pleine échelle avec un déroulement du papier de 0,5 cm min<sup>-1</sup>.

## RÉSULTATS

La Fig. 1 montre les tracés obtenus à partir d'un sérum témoin (a), de deux sérums de malades à 5 µg l<sup>-1</sup> (b) et à 0,6 µg l<sup>-1</sup> (c). Le temps de rétention de PPZ est d'environ 3,1 min et celui de l'halopéridol, 6,2 min.

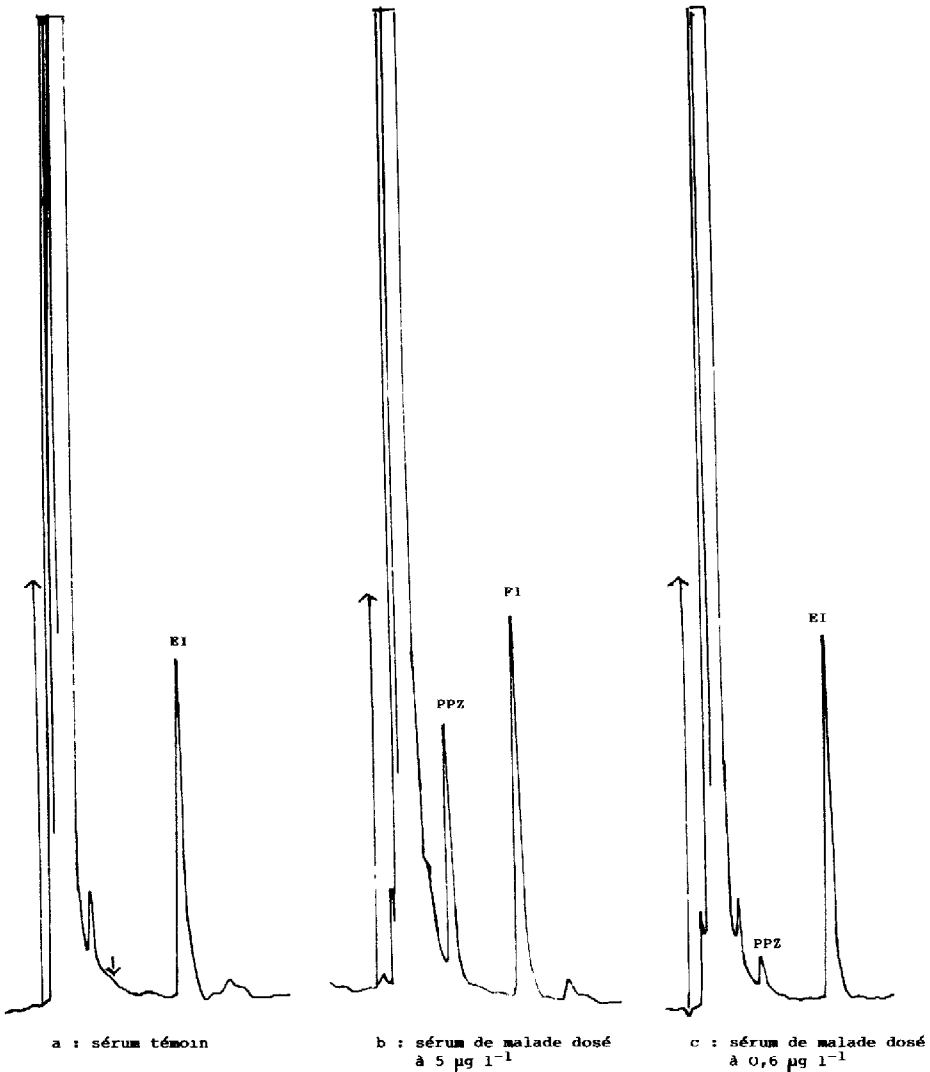


Fig. 1. Tracés obtenus à partir d'un sérum témoin (a), de deux sérums de malades à 5  $\mu\text{g l}^{-1}$  (b) et à 0,6  $\mu\text{g l}^{-1}$  (c). Pics: PPZ=perphénazine (3,1 min); EI=étalon interne, l'halopéridol (6,2 min).

La droite d'étalonnage établie à partir des rapports des hauteurs des pics de PPZ et d'étalon interne est linéaire pour des concentrations allant de 0 à 30  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Dix gammes d'étalonnage, préparées à des jours différents, sont exprimées par la droite moyenne de type  $y=ax+b$  avec  $y=(0,09125 \pm 0,017)x + (0,00053 \pm 0,0279)$ . Le coefficient de corrélation moyen ( $r$ ) est de  $0,99967 \pm 0,0003$ . L'exactitude a été calculée pour chaque point de concentration de ces gammes d'étalonnage (Tableau I).

La répétabilité de la méthode a été testée sur des pools de sérum surchargés à 5-10 et 30  $\mu\text{g l}^{-1}$  extraits le même jour. La reproductibilité a été réalisée sur des sérums surchargés aux mêmes concentrations, conservés, congelés et extraits sur dix jours. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau II.

TABLEAU I

## EXACTITUDE

Concentration ajoutée (ng/ml)	Nombre d'échantillons (n)	Concentration calculée (moyenne $\pm$ S.D.) (ng/ml)	C.V. (%)	Erreur (%)
2,5	10	2,36 $\pm$ 0,27	11,3	-5,6
5	10	5,08 $\pm$ 0,18	3,5	+1,6
10	10	9,99 $\pm$ 0,31	3,1	-0,1
15	10	15,17 $\pm$ 0,23	1,5	+1,1
30	10	29,93 $\pm$ 0,18	0,6	-0,2

TABLEAU II

## RÉPÉTABILITÉ ET REPRODUCTIBILITÉ

Serums surchargés en PPZ ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Répétabilité			Reproductibilité		
	n	$\bar{X}$ ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	C.V. (%)	n	$\bar{X}$ ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	C.V. (%)
5	10	5,04 $\pm$ 0,15	2,9	10	4,94 $\pm$ 0,27	5,4
15	10	14,89 $\pm$ 0,27	1,8	10	16,2 $\pm$ 1,01	6,2
30	10	27,71 $\pm$ 0,72	2,6	10	30,92 $\pm$ 1,53	5,0

TABLEAU III

## MÉDICAMENTS ASSOCIÉS AU TRAITEMENT PAR LA PPZ

Tranquillisants	Neuroleptiques	Antidépresseurs	Correcteurs
Diazépam	Alimémazine	Miansérine	Trihexyphénidyle
Lorazépam	Lévomépromazine	Maprotiline	Bipéridène
Clonazépam	Propériciazine	Amitriptyline	Tropatépine
Clorazépate dipotassique	Thioridazine		Etybenzatropine
Flunitrazépam	Cyamémazine*		
Triazolam			
Bromazépam			

\*La cyamémazine a un temps de rétention très voisin de celui de l'halopéridol.

Le rendement d'extraction est de l'ordre de 70%. En effet, les rendements d'extraction moyens, calculés par quatre évaluations sur les points de concentration 5, 15 et 30  $\mu\text{g l}^{-1}$  sont respectivement de 64,3  $\pm$  6,8, 74,3  $\pm$  5,7 et 65,2  $\pm$  1,4 avec des coefficients de variation (C.V.) de 10,5, 7,6 et 2,2%.

La limite de détection en se basant sur un rapport signal/bruit de fond  $\geq 2$  peut être estimée à 0,5  $\mu\text{g l}^{-1}$  pour une prise d'essai de 2 ml de sérum. La répétabilité de cette limite effectuée sur dix échantillons d'un pool surchargé à 0,5  $\mu\text{g l}^{-1}$  présente un coefficient de variation de 7%.

La spécificité de cette méthode a été établie vis-à-vis des médicaments les plus souvent associés au traitement par la PPZ ainsi que vis-à-vis de leurs métabolites (Tableau III). Nous avons également vérifié que le métabolite sulfoxyde de la PPZ ne provoquait pas d'interférence.

## DISCUSSION

L'extraction des phénothiazines se fait classiquement en milieu alcalin soit en une seule étape soit en trois étapes avec réextraction en milieu acide [5]. L'avantage du premier procédé est d'être rapide et d'obtenir un rendement maximum, cependant les tracés chromatographiques obtenus pour ces extraits sont souvent perturbés par des constituants sériques donnant lieu notamment à de larges fronts de solvants, ces impuretés sériques peuvent en outre contribuer à diminuer la durée de vie des colonnes utilisées. La seconde méthode en trois étapes est préférable pour obtenir des extraits purifiés mais le rendement d'extraction et donc la sensibilité de la technique en sont fortement diminués. L'intérêt du mode d'extraction présenté ici avec un seul lavage, en milieu alcalin plus faible, est d'obtenir un rendement d'extraction satisfaisant (70%), tout en éliminant un certain nombre de constituants biologiques élués dans le front de solvant.

Le mélange de solvants d'extraction retenu, acétate d'éthyle-hexane (4:2, v/v) est celui proposé par Larsen et al. [4].

Cette proportion d'acétate d'éthyle procure au mélange solvant une polarité suffisante pour éviter l'adsorption de la PPZ sur les parois de la verrerie, sans toutefois extraire beaucoup d'impuretés, comme nous avons pu le vérifier. Des essais pratiqués avec un mélange de solvant acétate d'éthyle-hexane (2:4, v/v) montrent un rendement d'extraction très nettement diminué. Avec l'hexane seul, le rendement d'extraction est presque nul. Avec l'acétate d'éthyle seul, un front de solvant extrêmement large est observé.

Le choix de la colonne et de la phase mobile ont été effectués en se référant à l'étude systématique de Curry et Brown [6] sur la séparation en chromatographie liquide de différents neuroleptiques phénothiaziniques. Comparée à une colonne C<sub>18</sub>, testée dans des essais préliminaires, la polarité d'une colonne cyano est plus grande et permet une meilleure séparation de la PPZ du front de solvant. De même, une granulométrie de 5  $\mu\text{m}$  pour cette colonne cyanée nous semble préférable à celle de 10  $\mu\text{m}$  pour des raisons d'efficacité. En effet, sur une colonne cyano de 10  $\mu\text{m}$ , nous avons observé un petit pic d'un constituant sérique, très proche de la PPZ, pouvant gêner l'exactitude des dosages aux faibles concentrations.

Par ailleurs, des sérums de malades traités par d'autres médicaments associés à la PPZ, rapportés dans le Tableau III, ont été extraits et chromatographiés selon le protocole décrit ci-dessus. Il n'a pas été observé d'interférence au niveau des pics d'élution de la PPZ et de l'halopéridol, ce qui permet d'affirmer la spécificité de cette méthode aussi bien vis-à-vis de ces médicaments que de leurs métabolites. Il est toutefois à noter que, lorsque les malades sont traités avec de la cyaméazine, une interférence peut éventuellement apparaître au niveau de l'élution de l'étalon interne.

La métabolite principal de la PPZ est le dérivé sulfoxyde. Son efficacité thérapeutique n'a pas été clairement prouvée et la plupart des méthodes de suivi thérapeutique proposée en chromatographie liquide haute performance ne le prennent pas en compte. Cependant, son temps de rétention étant proche de la PPZ dans nos conditions chromatographiques, nous avons voulu vérifier qu'il n'interférerait pas dans les dosages. En traitant des sérums surchargés en sulfoxyde, entre 12,5 et 50  $\mu\text{g l}^{-1}$ , selon le protocole de la PPZ, nous avons mis en évidence l'absence d'extraction du sulfoxyde dans les conditions décrites.

En conclusion, la méthode proposée ici permet le suivi thérapeutique de malades traités par la PPZ aussi bien par voie orale que par voie parentérale.

C'est ainsi que pour des posologies orales de 48 mg par jour (Trilifan<sup>®</sup>), on observe, à l'état d'équilibre avant la première prise matinale, des taux généralement compris entre 2 et 10  $\mu\text{g l}^{-1}$  (5 et 25  $\text{nmol l}^{-1}$ ) avec des valeurs extrêmes pouvant aller de 1 à 40  $\mu\text{g l}^{-1}$  (2,5 à 98  $\text{nmol l}^{-1}$ ). Avec l'énanthate de PPZ (Trilifan Retard<sup>®</sup>), forme retard injecté par voie intramusculaire tous les quinze jours aux posologies de 100 ou 150 mg, les concentrations sériques, à la fin de cette période, sont beaucoup plus basses et peuvent descendre en dessous d'un  $\mu\text{g l}^{-1}$ .

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 N.E. Larsen et J. Naestoft, *J. Chromatogr.*, 109 (1975) 259.
- 2 K.K. Midha, C. Mackonka, J.K. Cooper, J.W. Hubbard et P.K.F. Yeung, *Br. J. Clin. Pharm.*, 1 (1981) 85.
- 3 M. Larsson et A. Forsman, *Ther. Drug. Monit.*, 5 (1983) 225.
- 4 N.-E. Larsen, L.B. Hansen et P. Knudsen, *J. Chromatogr.*, 341 (1985) 244.
- 5 A.P. De Leenheer, J.A. Jonckheere, M.F. Lefevere, M.E. De Broe et G.A. Verpooten, *Biomed. Mass Spectrom.*, 12 (1985) 25.
- 6 S.H. Curry et E.A. Brown, *IRCS Med. Sci. Biochem.*, 9 (1981) 166.