

Journal of Chromatography, 422 (1987) 217-225
Biomedical Applications
Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 3874

MICRODÉTERMINATION DU PYRAZINAMIDE ET DE SES MÉTABOLITES (ACIDE PYRAZINOÏQUE, ACIDE HYDROXY-5-PYRAZINOÏQUE, HYDROXY-5-PYRAZINAMIDE, ACIDE PYRAZINURIQUE) PLASMATIQUES ET URINAIRES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE

C. LACROIX*, P. PONCET, G. LAINE, C. GUYONNAUD et M. RAY

Unités de Pharmacocinétique et de Pneumologie, Centre Hospitalier Général, 55 Bis, Rue Gustave Flaubert, 76600 Le Havre (France)*

et

S. MENAGER et O. LAFONT

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

(Reçu le 22 avril 1987; manuscrit modifié reçu le 9 juillet 1987)

SUMMARY

Microdetermination of pyrazinamide and its metabolites (2-pyrazinoic acid, 5-hydroxypyrazinoic acid, 5-hydroxypyrazinamide and pyrazinuric acid) in plasma and urine by liquid chromatography

The method reported here for determining pyrazinamide and its metabolites (2-pyrazinoic acid, 5-hydroxypyrazinamide, 5-hydroxypyrazinoic acid and pyrazinuric acid) consists of diluting urine or acid deproteinisation of serum followed by chromatography on a cation-exchange column. The column length and the detection system (ultraviolet or fluorimetry) allow for a very good separation of the different compounds; the sensitivity of the method makes it suitable for pharmacokinetic studies.

INTRODUCTION

Les propriétés antituberculeuses du pyrazinamide (PZA) ont été mises en évidence par Kushner et al. en 1952 [1] et appliquées au traitement de la tuberculose pulmonaire humaine par Yeager et al. [2]. Le PZA, actif sur les bacilles intracellulaires, est fréquemment associé aux trois autres antituberculeux majeurs (isoniazide, rifampicine et éthambutol) dans le cadre d'un traitement court de

six mois, tel qu'il est défini par la Société de Pneumologie de Langue Française [3]. Ce schéma thérapeutique s'oriente, actuellement, vers la suppression de l'éthambutol pour aboutir à une trithérapie isoniazide, rifampicine et pyrazinamide [4].

Les principales étapes du métabolisme du PZA, décrites par Weiner et Tinker [5], font intervenir dans un premier temps une désamidase microsomale entraînant la formation d'acide pyrazinoïque (PA), qui constituerait la forme active du PZA [6], puis l'action de la xanthine-oxydase pour aboutir à l'acide hydroxy-5-pyrazinoïque (5-OH-PA). Mais déjà en 1972, Weiner et Tinker [5] démontraient l'existence d'un autre métabolite possédant des caractéristiques polarographiques identiques à celles du 5-OH-PA, avec une mobilité électrophorétique différente. Cette hypothèse fut confirmée par Auscher et al. [7] qui isolèrent un composé présentant un coefficient d'absorption molaire égal à celui du 5-OH-PA. La nature de ce produit fut élucidée *in vitro* par Pitre et al. [8] sur des cellules de foie de rat et *in vivo* chez l'homme par Yamamoto et al. [9]: il s'agit de l'hydroxy-5-pyrazinamide (5-OH-PZA) résultant de l'action de la xanthine-oxydase sur le PZA. Le 5-OH-PA est donc issu du 5-OH-PZA et du PA.

Une voie mineure consiste en la formation d'acide pyrazinurique (PZU) après conjugaison du PA avec la glycine. Ces différentes considérations permettent de proposer le schéma métabolique illustré par la Fig. 1.

Parmi les effets secondaires du PZA, l'apparition d'arthralgies est imputée à PA qui augmente la concentration d'acide urique par inhibition de sa sécrétion tubulaire rénale [5].

La surveillance du traitement nécessite une individualisation de ces différents composés, c'est pourquoi nous proposons une méthode analytique qui permet le dosage du PZA et de tous ses métabolites avec un minimum de manipulations de l'échantillon et une résolution satisfaisante.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

L'appareillage utilisé comprend une pompe haute pression (Beckman, Gagny, France), une vanne d'injection (Rhéodyne Modèle 7125, Berkeley, CA, États-

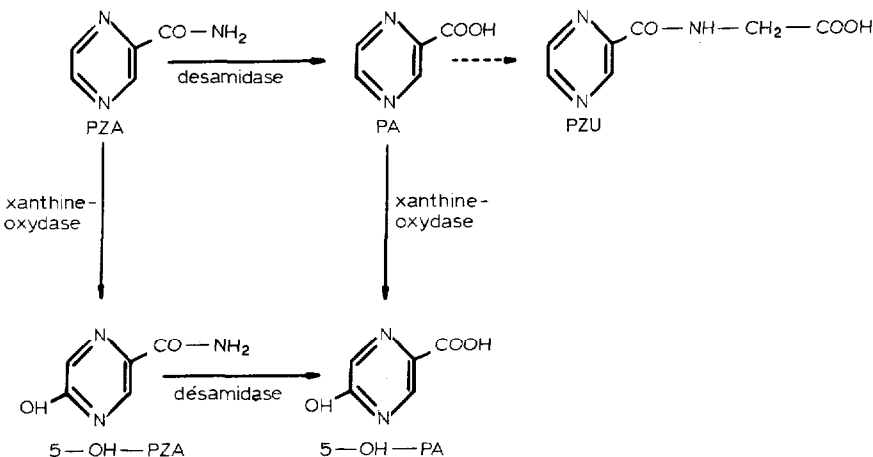


Fig. 1. Métabolisme du PZA.

Unis) équipée d'une boucle de 20 μl , un spectrophotomètre Uvikon 740 LC (Kontron, Vélizy, France), un spectrofluorimètre RF 530, raccordés à un enregistreur de type BD 40 et à un intégrateur C-R3A (Shimadzu, Touzard et Matignon, Vitry-sur-Seine, France). La colonne analytique et la cartouche de garde sont thermostatées à 62°C. Les colonnes sont des résines échangeuses de cations de type styrène-divinylbenzène sulfoné sous forme H^+ (colonnes Aminex HPX-87H, 300 \times 7,8 mm, ou "Fast Acid Analysis", 100 \times 7,8 mm), précédées d'une cartouche de garde (40 \times 4,6 mm, Bio-Rad, Touzard et Matignon). Le solvant d'élution est une solution 0,005 M d'acide sulfurique circulant à un débit de 0,8 ml/min. La détection se fait à 254 nm en UV et à 265 nm pour l'excitation, 410 nm pour l'émission en fluorescence. La quantification est basée sur la hauteur des pics ou leur surface.

Reactifs

PZA et PA sont fournis par Aldrich (Strasbourg, France). 5-OH-PZA est obtenu par l'action de la xanthine-oxydase [9] (activité 25 U/0,5 ml, Sigma, St. Louis, MO, États-Unis) sur le PZA. 5-OH-PA nous a été aimablement fourni par Weiner et Tinker (State University of New York, Syracuse, NY, États-Unis). La synthèse de PZU ou N-pyrazinolglycine est réalisée à partir de PA qui est transformé en anhydride mixte par action du chloroformiate d'éthyle, en présence de triéthylamine puis condensé avec la glycine selon la méthode décrite par Weiner et Tinker [5]. L'identité du produit est établie par mesure du point de fusion (*F*) au banc de Kofler (non corrigé), microanalyse CHN sur appareil Perkin-Elmer 240 et ¹H RMN sur spectrographe Varian T 60 (référence interne triméthylsilane): *F*: 237°C; analyse calculée: C = 46,41%, H = 3,89%, N = 23,20%; analyse trouvée: C = 46,18%, H = 3,86%, N = 23,07%; ¹H RMN diméthyl sulfoxyde-d₆: δ (ppm): 4, d, 2H (+²H₂O \rightarrow s), CH₂; 8,6–9,3, m, 4H (+²H₂O \rightarrow m, 3H), 3 aromatiques et NH.

Préparation de l'échantillon

Plasma. Plasma (50 μl) est déprotéinisé par 50 μl d'acide perchlorique 1,5 M. Après centrifugation, 20 μl du surnageant sont injectés dans le chromatographe.

Urines. Les recueils urinaires sont dilués au quart à l'aide d'eau distillée, puis filtrés sur Millex HV4 (0,45 μm , Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France) et 20 μl sont finalement injectés.

Étalonnage

Plasma. L'étalonnage est réalisé par surcharge de plasmas témoins de façon à obtenir une gamme de 3–70 mg/l (PZA), 0,5–10 mg/l (PA) et 0,2–5 mg/l (5-OH-PA et 5-OH-PZA). Ces standards sont traités de la même façon que les prélèvements.

Urines. L'étalonnage consiste en des solutions aqueuses de concentrations 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000, 10000, 20000, 40000, 60000, 80000, 100000 mg/l (5-OH-PA, 5-OH-PZA et PA), 10, 100, 1000 mg/l (PZA) et 2, 10 mg/l

RÉSULTATS

La Fig. 2 illustre ces différents exemples, notamment celui d'un plasma de patient 2 h après la prise de PZA. Ce même prélèvement est analysé sur la colonne de 300 mm et celle de 100 mm, avec en série le spectrophotomètre UV (254 nm) et le fluorimètre. La résolution est satisfaisante sur la colonne la plus longue, ainsi que sur la colonne courte couplée au fluorimètre. La linéarité est vérifiée dans le plasma jusqu'à 100 mg/l (PZA et PA) et 4 mg/l (5-OH-PZA et 5-OH-PA), et les équations des droites de régression sont les suivantes: PZA: $y=0,75x-1,19$ ($r=0,999$); PA: $y=1,14x-1,18$ ($r=0,999$); 5-OH-PA: $y=2,32x-1,20$ ($r=1,00$); 5-OH-PZA: $y=2,10x-0,90$ ($r=0,999$). Dans les urines, l'étalonnage est linéaire jusqu'à des concentrations de 400 mg/l (PZA, PA, 5-OH-PZA et 5-OH-PA) et de 25 mg/l (PZU). Le recouvrement est calculé en rapportant les quantités plasmatiques ajoutées aux quantités équivalentes en solution aqueuse, injectées directement dans l'appareil. Les résultats figurent, ainsi que la reproductibilité et les limites de détection (compte tenu d'un rapport signal sur bruit égal à 3) dans le Tableau I.

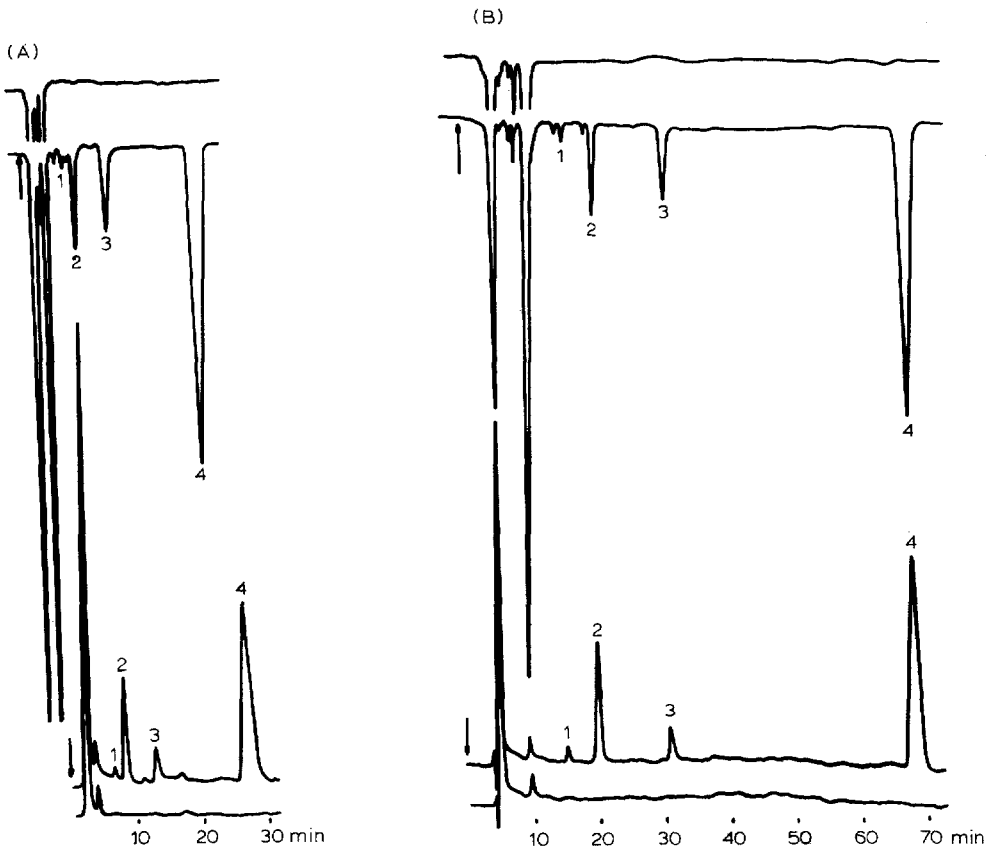


Fig. 2.

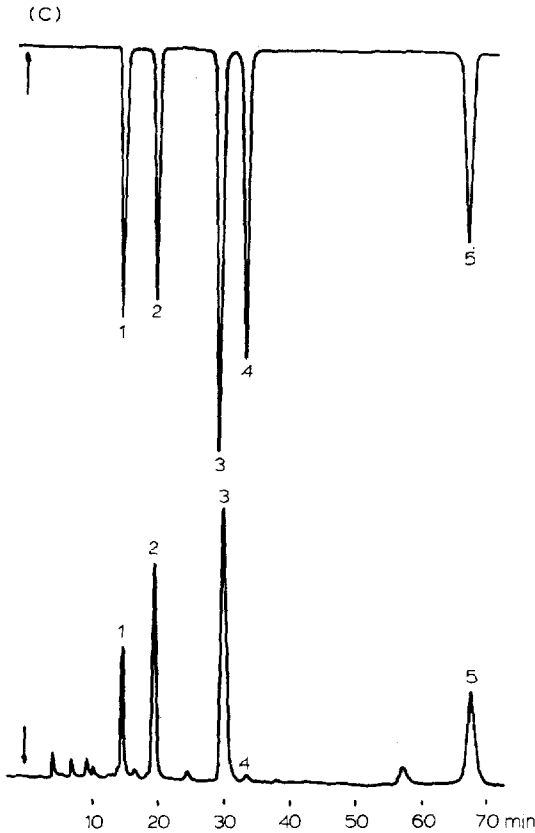


Fig. 2. (A, B) Chromatogrammes obtenus à partir du plasma d'un patient 2 h après l'ingestion de 2 g de PZA. Détections UV (tracé supérieur) et fluorimétrique (tracé inférieur) placées en série. (A) Colonne de 100 mm; (B) colonne de 300 mm. Pics: 1 = acide hydroxy-5-pyrazinoïque (0,33 mg/l); 2 = hydroxy-5-pyrazinamide (1,62 mg/l); 3 = acide pyrazinoïque (4,8 mg/l); 4 = pyrazinamide (37,2 mg/l). (C) Tracé inférieur: chromatogrammes obtenus à partir d'un recueil urinaire chez le même patient (colonne 300 mm et détection à 254 nm). Pics: 1 = acide hydroxy-5-pyrazinoïque (46,4 mg/l); 2 = hydroxy-5-pyrazinamide (78,9 mg/l); 3 = acide pyrazinoïque (135,7 mg/l); 4 = acide pyrazinurique (1,8 mg/l); 5 = pyrazinamide (43,7 mg/l). Tracé supérieur: solution aqueuse contenant les différents composés.

Un plasma, analysé sept jours consécutifs, a donné les valeurs suivantes: PZA: $49,1 \pm 1,6$ mg/l (coefficient de variation, C.V. 3,3%); PA: $5,6 \pm 0,6$ mg/l (C.V. 11%); 5-OH-PA: $0,38 \pm 0,04$ mg/l (C.V. 11%); 5-OH-PZA: $2,0 \pm 0,1$ mg/l (C.V. 6%).

Les prélèvements plasmatiques et urinaires se sont avérés stables après trois mois de conservation à -20°C .

Cette technique a été appliquée à trois patients après ingestion de 2 g de PZA à jeûn. Les prélèvements sanguins ont eu lieu à 1, 2, 4, 8, 12, 24 et 36 h, et les urines recueillies de 0-2, 2-4, 4-6, 6-8, 8-12, 12-24 et 24-36 h.

Les différentes données expérimentales sont illustrées par la Fig. 3 et leurs interprétations suivant les équations d'un modèle linéaire monocompartimental

TABLEAU I

ÉTUDE DE LA RÉPRODUCTIBILITÉ DU RECOUVREMENT ET DE LA LIMITE DE DÉTECTION PLASMATIQUE ET URINAIRE

Cinq déterminations par niveau.

Composé	Quantité ajoutée (mg/l)	Quantité retrouvée (moyenne \pm E.T.) (mg/l)	Recouvrement (%)	Coefficient de variation (%)	Limite de détection (mg/l)
<i>Plasma</i>					
PZA	100	101,1 \pm 0,4	101	0,4	1,5
	50	51,2 \pm 0,3	102	0,6	
	25	25,7 \pm 0,3	103	1,2	
	12,5	12,2 \pm 0,3	98	2,5	
	6,2	6,2 \pm 0,5	100	8,0	
PA	100	100 \pm 0,6	100	0,6	1
	50	50,5 \pm 0,3	101	0,6	
	25	25,2 \pm 0,9	101	3,6	
	12,5	12,5 \pm 0,8	100	6,5	
	6,2	6,2 \pm 0,6	100	9,6	
5-OH-PZA	5	5,04 \pm 0,08	101	1,6	0,07
	2,50	2,45 \pm 0,06	98	2,5	
	1,25	1,23 \pm 0,04	98	3,6	
5-OH-PA	5	5,03 \pm 0,07	101	1,4	0,07
	2,50	2,51 \pm 0,07	101	2,8	
	1,25	1,28 \pm 0,03	102	2,4	
<i>Urine</i>					
PZA	400	410 \pm 4	103	1,0	3
	200	199 \pm 5	99	2,5	
	100	104 \pm 4	104	3,9	
	50	51 \pm 2	102	3,9	
	400	405 \pm 5	101	1,2	
PA	200	203 \pm 3	101	1,5	2
	100	103 \pm 4	103	3,9	
	50	50 \pm 3	100	6,0	
PZU	25	24,8 \pm 0,6	99	2,4	0,25
	12,5	12,4 \pm 0,3	98	2,5	
	6,2	6,2 \pm 0,1	100	1,6	
5-OH-PZA	400	408 \pm 6	102	1,5	3
	200	201 \pm 5	101	2,5	
	100	104 \pm 3	104	2,9	
	50	50 \pm 2	100	4,0	
	400	400 \pm 5	100	1,3	
5-OH-PA	200	202 \pm 4	101	2,0	3
	100	101 \pm 3	101	3,0	
	50	50 \pm 2	100	4,0	

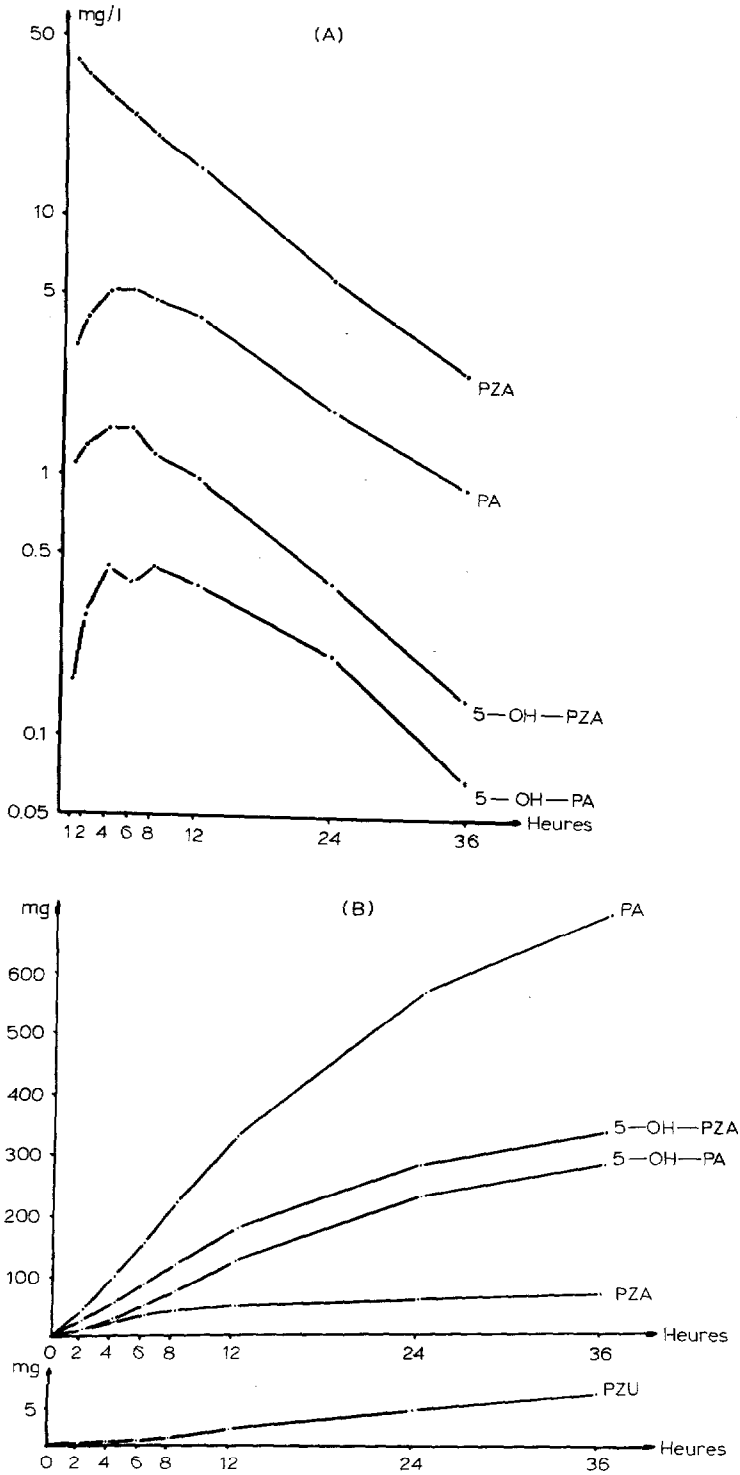


Fig. 3. (A) Concentrations plasmatiques moyennes obtenues chez trois patients après ingestion de 2 g de pyrazinamide. (B) Eliminations urinaires cumulées sur 36 h.

donnent pour le PZA une demi vie de $9,0 \pm 1,1$ h avec une constante d'élimination K_e de $0,079 \pm 0,010$ h⁻¹ et un volume de distribution de $0,7 \pm 0,1$ l/kg. Par rapport à la quantité ingérée (2 g), 63,7% du PZA sont éliminés dans les urines au bout de 36 h dont 3,2% inchangés et 60,5% sous forme de métabolites.

Les différents antituberculeux utilisés en association (rifampicine, isoniazide et éthambutol) ne présentent aucune interférence.

DISCUSSION

Conditions opératoires

Les analyses sont effectuées en utilisant deux colonnes de longueurs différentes (300 ou 100 mm) mais les phases stationnaires et mobiles sont identiques. Le choix est guidé par deux facteurs: (i) le système de détection employé: UV (254 nm) ou fluorimétrique (excitation 265 nm, émission 410 nm); (ii) la nature du liquide biologique injecté: plasma ou urine.

Echantillons urinaires

La longueur de la colonne employée est obligatoirement de 300 mm. Les composés urinaires étant très nombreux, seul ce type de colonne permet de séparer le PZA et ses métabolites des autres composants. La durée de l'analyse peut sembler longue (69 min). Toutefois, cette solution supprime tout traitement préalable de l'urine sur des colonnes échangeuses d'ions [7], évite l'emploi éventuel d'un étalon interne délicat à trouver et améliore la qualité des résultats par l'absence de manipulations de l'échantillon. Dans ce cas, le système de détection UV ou fluorimétrique n'a qu'une faible incidence.

Echantillons plasmatiques

Deux solutions sont possibles: (i) l'utilisation de la colonne de 300 mm couplée indifféremment à la détection UV ou fluorimétrique; (ii) choix d'une colonne plus courte (100 mm): dans ce cas, l'emploi d'un spectrofluorimètre est préférable. En outre, le temps d'analyse est réduit de 69 à 27 min.

Les premières méthodes de dosage du PZA proposées par Caccia [10] et Björnesjö [11] reposent sur une réaction colorimétrique avec le nitroprussiate de sodium mais ne différencient le PZA de ses métabolites. Cette technique a été améliorée par Ellard [12] qui fait précéder la coloration d'une extraction par des solvants organiques ou par Gurusurthy et al. [13] par l'utilisation de résines anioniques. La méthode polarographique de Weiner et Tinker [5] ou celle de Auscher et al. [7] par extraction sélective sur résines échangeuses d'ions, plus spécifiques, ne permettent que difficilement des analyses de routine. La première méthode par chromatographie en phase gazeuse décrite par Roboz et al. [14] nécessite un spectromètre de masse et les différentes méthodes en chromatographie liquide sont assez incomplètes: la technique proposée par Ratti et al. [15] permet la quantification du PA et du 5-OH-PA, mais pas celle du PZA et celle de Brouard et al. [16] et de Chan et al. [17] en ne dosant que le PZA, ne présentent qu'un intérêt limité. Seul Yamamoto et al. [9] donne des conditions chromatographiques permettant la séparation des différents métabolites plasmatiques, avec

toutefois une résolution discutable du 5-OH-PA et de plus ne propose aucune application aux échantillons urinaires.

En fait, ces composés ont des polarités très différentes et les conditions chromatographiques favorables à l'élution du PZA ne le sont pas pour ses métabolites. Ces auteurs ont employé des colonnes de silices différemment greffées ($-\text{NH}_2$, C_8 , C_{18}) sur lesquelles les métabolites acides sont élués sous forme de pics dissymétriques et traînants; une bonne résolution de l'ensemble des composés nécessite alors d'augmenter les temps de rétention, mais accentue la dissymétrie des métabolites acides. D'après notre expérience, les autres procédés (recul d'ionisation, appariement d'ions) ne donnent guère de résultats plus satisfaisants. Il était donc nécessaire de s'affranchir de la silice pour utiliser un copolymère.

RÉSUMÉ

La méthode proposée pour le dosage du pyrazinamide et de ses métabolites (acide pyrazinoïque, acide hydroxy-5-pyrazinoïque, hydroxy-5-pyrazinamide et acide pyrazinurique) consiste en une dilution de l'urine ou une déprotéinisation acide du plasma, suivie d'une chromatographie sur colonne de résine échangeuse de cations. La longueur de la colonne et le choix du système de détection (UV ou fluorimétrique) permettent une excellente séparation des différents composés et les limites de détection sont compatibles avec les concentrations atteintes en thérapeutique.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 S. Kushner, H. Dalalian, J.L. Sanjurjo, F.L. Bach, S.R. Safir, V.K. Smith et J.H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 3617.
- 2 R.L. Yeager, W.G. Munroe et F.L. Dessau, *Am. Rev. Tuberc.*, 65 (1952) 523.
- 3 Recommandations de la Société de Pneumologie de Langue Française, *Traitement de la Tuberculose en France*, *Rev. Fr. Mal. Respir.*, 1 (1984) 59.
- 4 B. Dautzenberg, C. Gallinari, G. Aeberhardt, A. Levy, J. Berheim, J. Grosset et Ch. Sors, *Presse Med.*, 15 (1986) 2151.
- 5 I.M. Weiner et J.P. Tinker, *Exp. Ther.*, 180 (1972) 411.
- 6 K. Konno, F.M. Feldmann et W. McDermott, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 95 (1967) 461.
- 7 C. Auscher, C. Pasquier, P. Pehuet et F. Delbarre, *Biomédecine*, 28 (1978) 129.
- 8 D. Pitre, R.M. Facino, M. Carini et A. Carlo, *Pharmacol. Res. Commun.*, 13 (1981) 351.
- 9 T. Yamamoto, Y. Moriwaki, S. Takahashi, T. Hada et K. Higashino, *J. Chromatogr.*, 413 (1987) 342.
- 10 P.A. Caccia, *Am. Rev. Tuberc.*, 75 (1957) 105.
- 11 K.B. Björnesjö, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 13 (1961) 332.
- 12 G.A. Ellard, *Tubercle*, 50 (1969) 144.
- 13 P. Gurumurthy, N.G.K. Nair et G.R. Sarma, *Ind. J. Med. Res.*, 71 (1980) 129.
- 14 J. Roboz, R. Suzuki et T.F. Yü, *J. Chromatogr.*, 147 (1978) 337.
- 15 R. Ratti, A. Toselli, E. Beretta et A. Bernareggi, *Farmaco, Ed. Prat.*, 37 (1982) 226.
- 16 A. Brouard, H. Barreateau, H. Merdjan, M. Paillet, G. Fredj et M. Micoud, *J. Chromatogr.*, 345 (1985) 453.
- 17 K. Chan, C.L. Wong et S. Lok, *J. Chromatogr.*, 380 (1986) 367.