

2m11.2382.8

Université de Montréal

Pharmacocinétique du mivacurium,  
un nouveau bloqueur neuromusculaire, chez le patient anesthésié

par

Monique Lacroix, B.Sc., B.Pharm.

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en Sciences Pharmaceutiques

Août, 1995

© Monique Lacroix, 1995



QV  
765  
458  
1996  
V.002

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Pharmacocinétique du mivacurium,  
un nouveau bloqueur neuromusculaire, chez le patient anesthésié

présenté par :

Monique Lacroix, B.Sc., B.Pharm.

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Gérard Sirois  
Directeur de recherche : France Varin  
Codirecteur : François Donati  
Membre du jury : Jean-Guy Besner

Mémoire accepté le : 20 novembre 1995

## SOMMAIRE

Le présent projet de recherche s'est proposé de déterminer les paramètres pharmacocinétiques des isomères du mivacurium suite à l'administration d'un bolus intraveineux (I.V.) et de caractériser la formation et l'élimination de ses métabolites esters et alcools.

Dans un premier temps, deux méthodes analytiques stéréosélectives par HPLC avec détection en fluorescence furent développées, afin de déterminer les concentrations plasmatiques ( $C_p$ ) des isomères du mivacurium et ses métabolites dans le plasma humain. Les deux méthodes analytiques se sont avérées sensibles (limite de quantification de 3.9-15.6 ng/ml), reproductibles (coefficient de variation  $< 15\%$ ) et précises ( $> 94\%$ ) aux concentrations thérapeutiques du mivacurium et ses métabolites.

Ces deux méthodes de dosage furent utilisées dans une étude de pharmacocinétique des isomères du mivacurium chez huit patients anesthésiés. Contrairement aux études précédentes, les paramètres cinétiques furent déterminés suite à l'administration d'un bolus I.V.; condition se rapprochant de la pratique clinique. Un échantillonnage artériel complet fut utilisé durant la phase de distribution intravasculaire du mivacurium; soit 12 échantillons au cours des deux premières minutes suivant l'administration I.V. du mivacurium. L'impact de cet échantillonnage sur la détermination des paramètres cinétiques du mivacurium fut étudié en comparant les résultats obtenus avec échantillonnage complet versus un échantillonnage limité standard; c'est-à-dire en ne tenant compte que des échantillons prélevés à 1 et 2 minutes post-injection. Les deux ensembles de résultats, obtenus suite à une analyse pharmacocinétique non compartimentale des données, se sont avérés significativement différents pour



les trois isomères du mivacurium; les différences étant plus marquées pour les isomères trans-trans (tt) et cis-trans (ct).

L'échantillonnage artériel complet s'est révélé nécessaire à l'analyse non compartimentale exacte des paramètres cinétiques du mivacurium étant donné la contribution importante de la surface sous la courbe entre zéro et deux minutes ( $AUC_{0-2}$ ) pour les isomères tt et ct. En effet, l' $AUC_{0-2}$  pour les isomères tt et ct représenta 75 et 86% respectivement de la surface sous la courbe totale ( $AUC_{0-inf}$ ). L'omission des premiers prélèvements en n'utilisant qu'un échantillonnage limité résulta en une sous-estimation de l'AUC totale. Par conséquent, une surestimation importante des paramètres cinétiques (MRT, Cl,  $V_{d_{ss}}$ ) ainsi qu'une description inexacte du profil initial de la courbe des  $C_p$  en fonction du temps furent observées. L'échantillonnage artériel complet s'est avéré également critique à une description adéquate de la formation des métabolites esters et alcools du mivacurium puisque ceux-ci atteignèrent leurs concentrations maximales 25 secondes (médiane) suivant l'administration du bolus I.V. de mivacurium.

En résumé, les résultats obtenus lors de ces travaux représentent les premières données cinétiques stéréosélectives des isomères du mivacurium, déterminées suite à l'administration d'un bolus I.V. Egalement, ces travaux ont permis de fournir les premières données concernant la formation et l'élimination des métabolites du mivacurium.

**MOTS-CLES**

Anesthésie

HPLC

Mivacurium

Pharmacocinétique

## TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE.....	i
TABLE DES MATIERES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES ABREVIATIONS.....	xii
REMERCIEMENTS.....	xiv
<u>CHAPITRE 1 - REVUE DE LA LITTERATURE</u> .....	1
<b>I. La transmission neuromusculaire</b> .....	2
1.1 La contraction et la paralysie musculaire.....	2
1.2 Monitoring de la fonction neuromusculaire.....	4
<b>II. Pharmacologie des bloqueurs neuromusculaires</b> .....	4
2.1 Relations structure-activité.....	4
2.2 Bloqueurs neuromusculaires dépolarisants.....	5
2.3 Bloqueurs neuromusculaires non dépolarisants.....	5
<b>III. Pharmacocinétique des bloqueurs neuromusculaires</b> .....	6
3.1 Distribution, métabolisme et élimination.....	6
3.2 Influence du site de prélèvement.....	9
3.3 Influence de la fréquence et de la précocité des prélèvements.....	11
3.4 Analyse pharmacocinétique compartimentale vs non compartimentale.....	13

<b>IV. Pharmacologie du mivacurium.....</b>	<b>14</b>
4.1 Chimie du mivacurium.....	14
4.2 Puissance et doses.....	15
4.3 Début et durée d'action.....	16
4.4 Antagonisme du bloc neuromusculaire.....	16
<b>V. Pharmacocinétique du mivacurium.....</b>	<b>17</b>
5.1 Métabolisme du mivacurium.....	17
5.2 Méthode de dosage par HPLC.....	19
5.3 Paramètres pharmacocinétiques.....	20
<b>VI. Objectifs du projet de recherche.....</b>	<b>23</b>
<b><u>CHAPITRE 2 - METHODE ANALYTIQUE.....</u></b>	<b>25</b>
<b>I. <u>Premier article</u> : High performance liquid chromatographic assays with fluorometric detection for mivacurium isomers and their metabolites in human plasma.....</b>	<b>26</b>
Abstract.....	27
Introduction.....	28
Experimental.....	29
Results and discussion.....	35
Conclusions.....	43
Acknowledgements.....	43
References.....	51



<b>CHAPITRE 3 - PROTOCOLE EXPERIMENTAL</b> .....	53
<b>I. <u>Deuxième article</u> : Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mivacurium isomers and their metabolites in healthy volunteers following an IV bolus administration</b> .....	54
Abstract.....	55
Introduction.....	57
Methods and materials.....	59
Results.....	63
Discussion.....	68
Conclusion.....	76
References.....	77
<b>CHAPITRE 4 - DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES</b> .....	81
<b>I. Discussion générale</b> .....	82
1.1 Détermination des isomères du mivacurium et ses métabolites dans le plasma par HPLC avec détection en fluorescence.....	82
1.2 Pharmacocinétique des isomères du mivacurium et ses métabolites suite à l'administration d'un bolus IV.....	84
<b>II. Conclusion générale</b> .....	88

BIBLIOGRAPHIE..... xv

ANNEXES..... xxvi

ANNEXE A : Equations de pharmacocinétique non  
compartimentale..... xxvii

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE 1

Tableau I	Paramètres pharmacocinétiques des BNM non dépolarisants.....	8
Tableau II	Paramètres pharmacocinétiques du mivacurium.....	22

### CHAPITRE 2

#### **Premier article**

Tableau I	Récupération des isomères du mivacurium et ses métabolites esters à partir du plasma humain et variabilité intra-journalière.....	37
Tableau II	Variabilité inter-journalière de la méthode pour les isomères du mivacurium.....	44
Tableau III	Variabilité inter-journalière de la méthode pour les métabolites esters.....	45
Tableau IV	Variabilité inter-journalière de la méthode pour les métabolites alcools.....	46
Tableau V	Exactitude de la méthode analytique pour les isomères du mivacurium.....	47
Tableau VI	Exactitude de la méthode analytique pour les métabolites esters.....	48
Tableau VII	Exactitude de la méthode analytique pour les métabolites alcools.....	49

## CHAPITRE 3

### **Deuxième article**

Tableau I	Caractéristiques générales des patients.....	64
Tableau II	Données de pharmacodynamie du mivacurium.....	65
Tableau III	Paramètres pharmacocinétiques des isomères du mivacurium suite à un échantillonnage complet vs échantillonnage limité.....	69
Tableau IV	Paramètres pharmacocinétiques des métabolites du mivacurium.....	70



## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE 1

Figure 1	La transmission neuromusculaire.....	2
Figure 2	Diagramme de la jonction neuromusculaire.....	3
Figure 3	La structure chimique du chlorure de mivacurium.....	15
Figure 4	Métabolisme enzymatique du mivacurium.....	18

### CHAPITRE 2

#### **Premier article**

Figure 1	Structures chimiques du chlorure de mivacurium et de deux standards internes : BW785U77 et la laudanosine.....	31
Figure 2	Chromatogrammes obtenus lors de l'analyse des isomères du mivacurium et de ses métabolites esters par HPLC.....	39
Figure 3	Chromatogrammes obtenus lors de l'analyse des métabolites alcools par HPLC.....	41
Figure 4	Courbes des concentrations plasmatiques des isomères du mivacurium et de ses métabolites esters et alcools en fonction du temps chez un patient ayant reçu un bolus I.V. de 0.15 mg/kg de chlorure de mivacurium.....	50

## CHAPITRE 3

### **Deuxième article**

Figure 1	Structure chimique du chlorure de mivacurium.....	58
Figure 2	Courbes des concentrations plasmatiques moyennes des isomères du mivacurium en fonction du temps suivant l'administration d'un bolus I.V. de 0.15 mg/kg de chlorure de mivacurium chez huit patients anesthésiés.....	66
Figure 3	Courbes des concentrations plasmatiques moyennes des métabolites esters et alcools en fonction du temps suivant l'administration d'un bolus I.V. de 0.15 mg/kg de chlorure de mivacurium chez huit patients anesthésiés.....	71

**LISTE DES ABREVIATIONS**

ACh	Acétylcholine
ASA	American Society of Anesthesiologists
ASA I	Sujet en bonne santé
ASA II	Sujet présentant une pathologie mineure
AUC	Surface sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps
AUC <sub>0-t</sub>	Surface sous la courbe de zéro à t
AUC <sub>0-inf</sub>	Surface sous la courbe de zéro à l'infini
AUMC <sub>0-t</sub>	Surface sous la courbe des moments de zéro à t
AUMC <sub>0-inf</sub>	Surface sous la courbe des moments de zéro à l'infini
BNM	Bloqueur neuromusculaire
cc	cis-cis
Cl	Clairance totale
C <sub>max</sub>	Concentration plasmatique maximale
C <sub>p</sub>	Concentration plasmatique
ct	cis-trans
CV	Coefficient de variation
ED <sub>95</sub>	Dose nécessaire pour atteindre 95% du bloc neuromusculaire
F	Femme
Fig	Figure
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
I.S.	Standard interne
I.V.	Intraveineux(se)
K <sub>eo</sub>	Constante d'élimination à partir du compartiment effet
LOQ	Limite de quantification

M	Homme
MRT	Temps de résidence moyen
n	Effectif
na	Non disponible
p	Probabilité
PD	Pharmacodynamie
PK	Pharmacocinétique
$r^2$	Coefficient de corrélation
rpm	Révolution par minute
SD	Ecart-type
SEM	Erreur-type
$t_{1/2}$	Temps de demi-vie d'élimination
Tmax	Temps nécessaire pour atteindre le Cmax
tt	trans-trans
$Vd_{\beta}$	Volume de distribution apparent
$Vd_{ss}$	Volume de distribution à l'équilibre
vs	Versus, par rapport à



## **REMERCIEMENTS**

Je remercie le docteur France Varin, directeur de recherche, pour son aide et support tout au long de mes travaux ainsi que pour son expertise et ses conseils judicieux lors de la rédaction des manuscrits.

Je remercie le docteur François Donati, codirecteur de recherche, pour son importante contribution à l'exécution de l'étude clinique et à la rédaction des manuscrits.

Merci à M. The-Minh Tu pour m'avoir initiée au monde de l'HPLC et des ordinateurs ainsi que pour sa patience et son sens de l'humour rafraîchissant.

J'exprime ma gratitude à Schering Canada pour sa participation active au programme de maîtrise et son aide financière. Egalement, merci à mes collègues de travail chez Schering Canada pour leur encouragement et soutien moral.

Merci à mes collègues de laboratoire pour leur amitié et leur bonne humeur.

Merci à Kurt pour son amour inconditionnel, son support constant et sa compréhension inouïe, surtout lors de la rédaction de ce mémoire. Je t'aime.

Finalement, merci à mes parents, pour m'avoir encouragée avec tant d'amour au cours de toutes ces années.

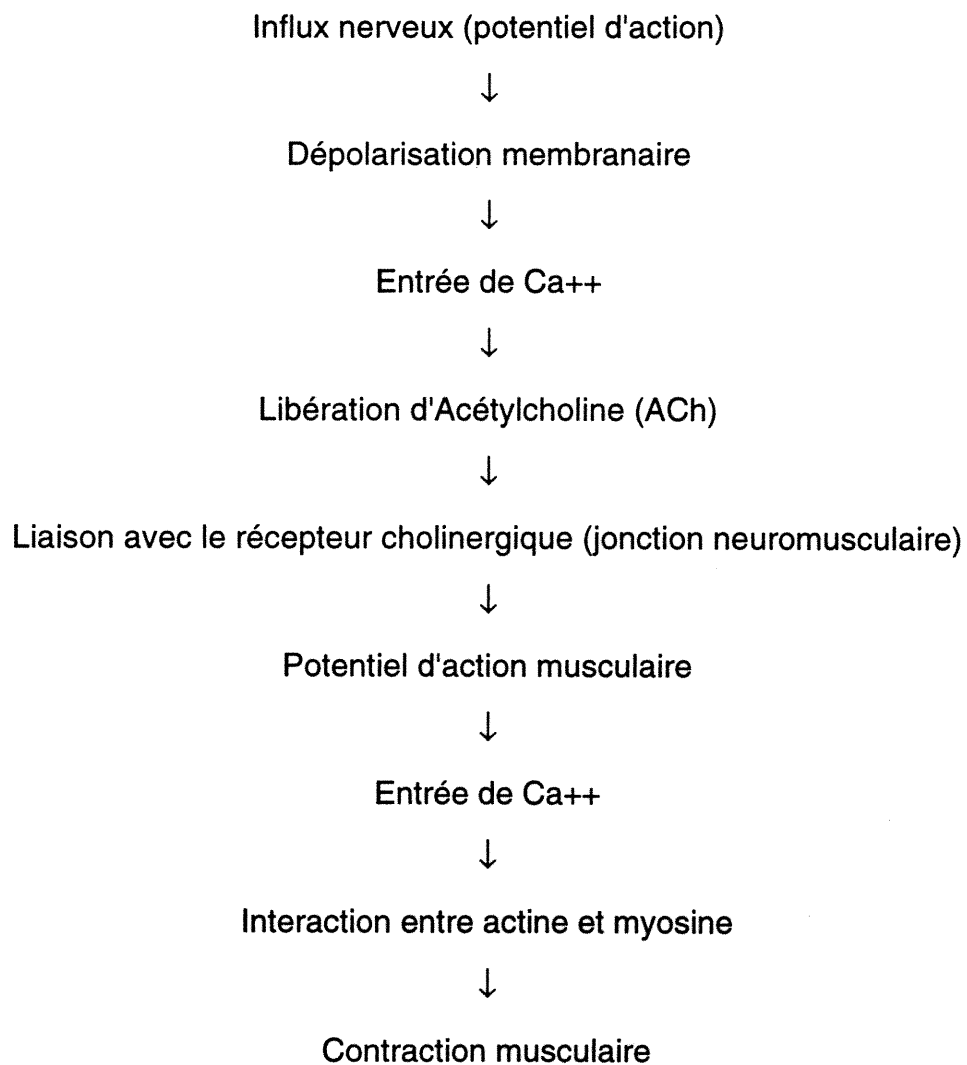
**CHAPITRE 1 - REVUE DE LA LITTERATURE**

## I. La transmission neuromusculaire

### 1.1 La contraction et la paralysie musculaire

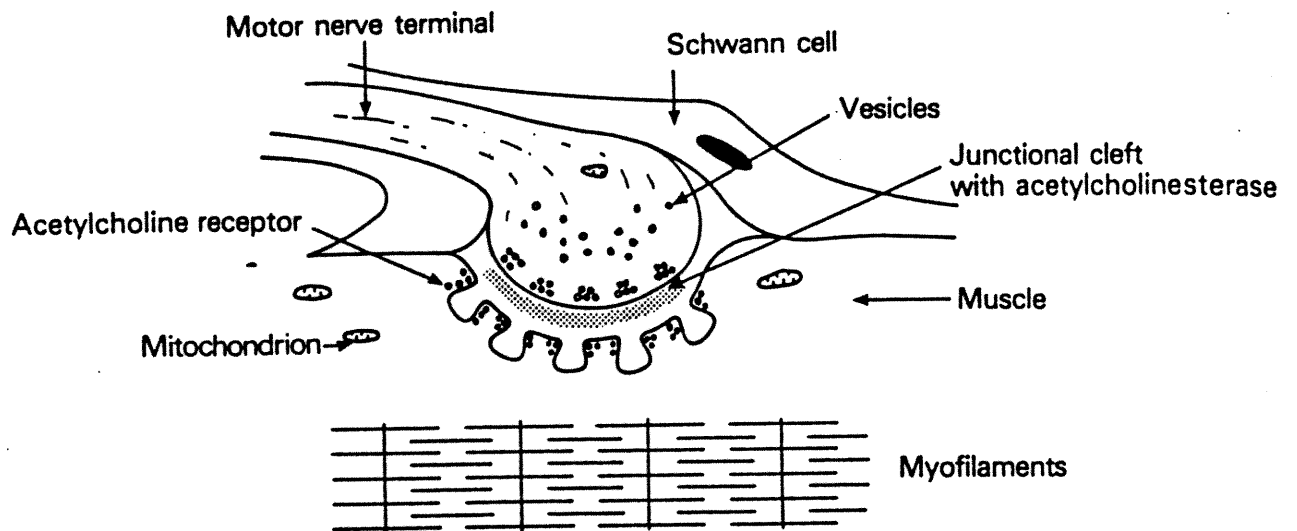
Les principales étapes impliquées dans la transmission neuromusculaire sont décrites ci-dessous à la figure 1.

Figure 1. La transmission neuromusculaire (Aitkenhead et Smith, 1990)



Les bloqueurs neuromusculaires (BNMs) agissent au niveau de la jonction myoneurale (figure 2) où ils interfèrent avec la transmission neuromusculaire et produisent ainsi une paralysie flasque; soit une des quatre composantes de l'anesthésie générale (Larijani et al, 1991; Taylor, 1990).

Figure 2. Diagramme de la jonction neuromusculaire (Aitkenhead et Smith, 1990)





## 1.2 Monitoring de la fonction neuromusculaire

L'intensité d'un bloc neuromusculaire causé par un BNM peut être objectivement évaluée, à l'aide d'un stimulateur de nerf périphérique, en mesurant la tension générée par un muscle squelettique en réponse à une stimulation nerveuse (Ali, 1989; Viby-Mogensen, 1990; Ali et Savarese, 1976). La réponse musculaire observée est enregistrée sur papier, ce qui permet de calculer le pourcentage du bloc neuromusculaire à un temps donné.

## II. Pharmacologie des bloqueurs neuromusculaires

Les BNMs se divisent en deux catégories selon leur mécanisme d'action primaire, soit les BNMs dépolarisants et les BNMs non dépolarisants (Taylor, 1990). Malgré un mécanisme d'action différent, ces agents sont utilisés en anesthésie afin de faciliter l'intubation trachéale et abolir les contractions musculaires qui pourraient interférer avec certaines interventions chirurgicales (Larijani et al, 1991; Taylor, 1990; Aitkenhead et Smith, 1990).

### 2.1 Relations structure-activité

Les BNMs sont caractérisés par la présence de centres cationiques; le plus souvent ce sont des sels d'ammonium quaternaires. Ces groupements positifs miment l'action de l'atome d'azote quaternaire de l'acétylcholine (ACh), ce qui explique l'affinité des BNMs pour les récepteurs cholinergiques (Savarese et al, 1994).

Les agents dépolarisants possèdent en général des structures flexibles permettant une rotation libre des liens chimiques, alors que les agents non dépolarisants sont plutôt des molécules rigides de hauts poids moléculaires (Taylor, 1990; Ali et Savarese, 1987).

## 2.2 Bloqueurs neuromusculaires dépolarisants

Les BNMs dépolarisants, ou agents agonistes, miment l'action de l'ACh au niveau du récepteur cholinergique situé à la jonction neuromusculaire des muscles squelettiques. Ceci résulte initialement en une brève contraction musculaire, cliniquement appelée fasciculation musculaire, suivie d'un bloc de la transmission neuromusculaire et d'une paralysie flasque (Larijani et al, 1991; Taylor, 1990; Aitkenhead et Smith, 1990; Durant et Katz, 1982). Le seul BNM dépolarisant largement utilisé en anesthésie est la succinylcholine étant donné son début d'action rapide et sa courte durée d'action (Durant et Katz, 1982). Cette courte durée d'action est le résultat de son hydrolyse rapide par les cholinestérases plasmatiques; enzymes du plasma synthétisés par le foie mais très peu présents au niveau de la jonction myoneurale (Savarese et al, 1994; Larijani et al, 1991).

## 2.3 Bloqueurs neuromusculaires non dépolarisants

Contrairement aux BNMs dépolarisants qui causent une dépolarisation de la membrane post-synaptique, les BNMs non dépolarisants antagonisent l'ACh en compétitionnant avec celle-ci pour les récepteurs cholinergiques situés à la jonction neuromusculaire des muscles squelettiques (Taylor, 1990). Ceci inhibe alors la contraction musculaire ce qui se traduit en une paralysie musculaire

(Aitkenhead et Smith, 1990; Savarese et al, 1994; Kienlen, 1984; Larijani et al, 1991; Taylor, 1990). Plusieurs BNMs non dépolarisants sont utilisés en clinique; ceux-ci peuvent être classifiés selon leur durée d'action (longue, intermédiaire, courte) ou leur classe chimique (stéroïdes vs benzyloisoquinolines) (Savarese et al, 1994).

### **III. Pharmacocinétique des bloqueurs neuromusculaires**

#### **3.1 Distribution, métabolisme et élimination**

Il existe peu d'information concernant la pharmacocinétique de la succinylcholine étant donné son hydrolyse enzymatique rapide et l'absence d'une méthode de dosage adéquate (Larijani et al, 1991). Toutefois, on sait qu'environ 70-80% d'une dose de succinylcholine est hydrolysée par les cholinestérases plasmatiques avant même que celle-ci n'atteigne la jonction neuromusculaire (Cook et al, 1977). Ceci explique sa courte durée d'action clinique de 5 minutes et son court temps de demi-vie d'environ 3 minutes (Holst-Larsen, 1976; Cook et al, 1977). Cette courte durée d'action peut toutefois être prolongée dans des conditions où les taux de cholinestérases plasmatiques sont diminués, telles que chez les patients souffrant de maladies hépatiques, chez les femmes enceintes et chez les nourrissons (Durant et Katz, 1982; Viby-Mogensen, 1980). De plus, chez certains individus possédant des anomalies génétiques pour le gène atypique de la cholinestérase plasmatique, le bloc neuromusculaire observé avec la succinylcholine peut durer plusieurs heures (Smith et al, 1989; Whittaker, 1980).

Les paramètres pharmacocinétiques de plusieurs BNMs non dépolarisants, obtenus chez des patients sains, sont présentés au tableau I. Les BNMs sont des molécules hautement ionisées au pH physiologique et solubles dans l'eau (Ali et Savarese, 1987; Savarese et al, 1994). Cette hydrophilicité leur confère en général de faibles volumes de distribution (Vd); ceux-ci correspondant approximativement au volume du liquide extracellulaire (Aitkenhead et Smith, 1990; Bevan et al, 1988), soit 150 à 450 ml/kg (tableau I). Certains agents auront un volume de distribution légèrement supérieur étant donné une liaison plus importante aux protéines et autres constituants plasmatiques (Aitkenhead et Smith, 1990).

Le caractère hautement hydrophilique des BNMs favorise une élimination dans l'urine via la filtration glomérulaire avec peu de réabsorption et/ou sécrétion glomérulaire (Larijani et al, 1991). Par conséquent, la clairance totale (Cl) des BNMs correspond en général à la filtration glomérulaire (Aitkenhead et Smith, 1990; Savarese et al, 1994), soit 1 à 2 ml/kg/min (tableau I). Toutefois, d'autres voies d'élimination peuvent venir s'ajouter à la filtration glomérulaire. Le vécuronium, molécule légèrement plus lipophile que le pancuronium, démontre une clairance plasmatique plus élevée étant donné la contribution importante de l'élimination hépatique. En effet, environ 30-40% du vécuronium est excrété dans la bile (Bencini et al, 1986; Fahey et al, 1981), ce qui explique la durée d'action intermédiaire de cet agent. L'atracurium est unique avec une élimination indépendante des fonctions rénales et hépatiques. En effet, seulement 6% d'une dose d'atracurium est excrétée inchangée dans l'urine (Ward et al, 1987) et c'est l'élimination d'Hofmann et l'hydrolyse enzymatique qui expliquent la clairance élevée observée avec cet agent (Fahey et al, 1984; Ward et al, 1987).

Tableau I : Paramètres pharmacocinétiques des BNM non dépolarisants

<b>BNM</b>	<b>t<sub>1/2e1</sub></b> <b>(min)</b>	<b>Cl</b> <b>(ml/min*kg)</b>	<b>Vd<sub>ss</sub></b> <b>(L/kg)</b>	<b>Références</b>
Pancuronium	97 - 132	0.74 - 1.7	0.15-0.26	McLeod et al, 1976; Somogyi et al, 1977
d-tubocurarine	84	2.4	0.25	Sheiner et al, 1979
Doxacurium	76 - 99	2.5 - 2.7	0.20-0.22	Gariépy et al, 1993; Cook et al, 1991
Pipécuronium	137	2.4	0.31	Caldwell et al, 1988
Atracurium	16 - 29	5.4 - 6.1	0.15-0.18	Ward et al, 1987; Fahey et al, 1984; Ducharme et al, 1995
Vécuronium	58 - 117	3.0 - 5.2	0.16-0.48	Bencini et al, 1986; Ducharme et al, 1993; Fahey et al, 1981; Lynam et al, 1988; Arden et al, 1988
Rocuronium	71	2.9	0.21	Szenohradsky et al, 1992

### 3.2 Influence du site de prélèvement

La pharmacocinétique de plusieurs médicaments sera influencée par le choix du site de prélèvement des échantillons sanguins; soit artériel ou veineux (Chiou, 1989). L'influence du site d'échantillonnage sur la cinétique et la dynamique de l'atracurium ainsi que sur la cinétique du midazolam, deux agents utilisés en anesthésie, a été évaluée (Donati et al, 1991; Mastey et al, 1995). Les résultats de ces études démontrent des concentrations artérielles d'atracurium et de midazolam systématiquement supérieures aux concentrations veineuses correspondantes. Les différences artérioveineuses sont d'autant plus marquées peu de temps après l'administration du bolus I.V.; ce phénomène étant dû à une captation tissulaire périphérique du médicament (Chiou, 1989). L'importance de cette captation dépend principalement des propriétés physicochimiques du médicament, de sa liaison aux protéines et de la nature du site de captation (Upton, 1990). Bien que le midazolam soit plus lipophile que l'atracurium, les différences artérioveineuses observées avec cette benzodiazépine ne sont pas plus prononcées qu'avec l'atracurium; sa liaison importante aux protéines, soit de 96% (Dundee et al, 1984), limitant de beaucoup sa captation tissulaire (Mastey et al, 1995).

Pour la plupart des médicaments, un état de pseudoéquilibre s'établit avec le temps entre les concentrations plasmatiques (Cp) et tissulaires; les Cp veineuses excédant même les Cp artérielles lors de la phase d'élimination (Chiou, 1989). Etant donné que les Cp artérielles et veineuses déclinent de façon parallèle durant la phase d'élimination, la détermination du temps de demi-vie d'élimination ( $t_{1/2}$ ) n'est aucunement influencée par le choix du site de prélèvement (Chiou, 1989). Egalement, le principe de "mass balance" permet

d'assumer que la surface sous la courbe (AUC) totale obtenue à partir des Cp artérielles ne diffèrera pas de celle obtenue à partir des Cp veineuses, peu importe la linéarité ou la non-linéarité de la cinétique de distribution et d'élimination (Chiou et Lam, 1982; Tozer, 1981).

Dans l'étude de cinétique et dynamique de l'atracurium, les Cp veineuses n'ont jamais excédé les Cp artérielles correspondantes, et ce jusqu'à 20 minutes post-injection (Donati et al, 1991). L'utilisation des Cp veineuses dans cette étude résulta en une sous-estimation de l'AUC<sub>0-2min</sub> et l'AUC<sub>0-15min</sub>; celles-ci ne représentant que 43 et 74% respectivement des AUC correspondantes obtenues avec les échantillons artériels. De plus, les concentrations maximales artérielles furent atteintes environ 30 secondes suivant l'injection de l'atracurium alors que les concentrations veineuses ne furent maximales qu'après 1 à 3 minutes post-injection.

Parallèlement, les concentrations artérielles maximales du midazolam, deux fois supérieures aux concentrations veineuses correspondantes, furent atteintes environ 1 minute avant les concentrations veineuses maximales. Par conséquent, les AUC veineuses (0-2min, 0-15min et 0-120min) n'ont représenté que 48, 66 et 75% respectivement de celles obtenues à partir des concentrations artérielles (Mastey et al, 1995).

Ces deux études permettent de conclure que le choix du site de prélèvement influence la détermination des paramètres pharmacocinétiques. Le profil initial de la courbe des Cp en fonction du temps est effectivement différent selon que l'on est dans l'artère où la veine; ceci étant le résultat du gradient artérioveineux important noté peu de temps après l'administration du bolus I.V. (Donati et al,

1991; Mastey et al, 1995). De plus, Donati et al (1991) concluent que les Cp veineuses d'atracurium ne reflètent pas adéquatement les concentrations du médicament présentes au site d'action, c'est-à-dire à la jonction neuromusculaire, et que puisque le muscle est perfusé par du sang artériel, ils suggèrent dans un but de standardisation que l'artère radiale soit utilisée comme site de prélèvement pour la détermination des paramètres cinétiques et dynamiques des BNMs en général.

### 3.3 Influence de la fréquence et de la précocité des prélèvements

Afin de bien modéliser la pharmacocinétique et la pharmacodynamie des médicaments et de décrire adéquatement le profil initial des Cp en fonction du temps (ie. distribution initiale du médicament), un nombre suffisant de données plasmatiques doit être disponible durant l'augmentation initiale des Cp et l'installation de l'effet du médicament (Henthorn et al, 1989). Pour les BNMs, l'installation du bloc neuromusculaire se produit en général dans les 2 à 3 minutes suivant l'injection I.V. Bien que l'utilisation d'une infusion continue permet de recueillir plusieurs points plasmatiques (Shanks et al, 1987), elle est contradictoire au mode d'administration habituel des BNMs en clinique, soit sous forme de bolus I.V.

L'importance de la fréquence et précocité de l'échantillonnage sanguin sur la détermination des paramètres cinétiques et dynamiques du vécuronium a été étudiée suite à l'injection d'un bolus I.V. de 0.1 mg/kg (Ducharme et al, 1993). Afin de reproduire les conditions observées en clinique et d'obtenir suffisamment de données plasmatiques immédiatement après l'administration du bolus I.V., un échantillonnage complet, soit 12 échantillons lors des 2 premières minutes, a été



effectué (Ducharme et al, 1993). Une analyse compartimentale de toutes les données recueillies n'étant pas possible à cause de la forme particulière de la courbe des Cp en fonction du temps, les auteurs ont procédé à une analyse non compartimentale des données. Les résultats se sont avérés similaires à ceux obtenus suite à une analyse compartimentale des données recueillies avec un échantillonnage limité standard (1 et 2 min post-dose), étant donné l'extrapolation de la courbe au temps zéro. Toutefois, une analyse non compartimentale des données obtenues avec échantillonnage limité résulta en une surestimation de 10 à 16% des paramètres pharmacocinétiques; conséquence d'une sous-estimation de l' $AUC_{0-2min}$  et de l'AUC totale.

Parallèlement, 12 échantillons artériels furent collectés au cours des 2 premières minutes suivant l'injection d'une dose I.V. bolus de 0.05 mg/kg de midazolam à des patients anesthésiés (Mastey et al, 1995). Contrairement aux résultats observés avec l'atracurium, les paramètres pharmacocinétiques déterminés à partir de l'échantillonnage complet n'étaient pas significativement différents de ceux obtenus avec échantillonnage limité; ce dernier ayant mené à une sous-estimation non-significative de l' $AUC_{0-2min}$  (Mastey et al, 1995).

Ces études révèlent qu'un échantillonnage limité standard ne permet pas de décrire de façon adéquate ce qui se produit initialement après l'administration d'un bolus I.V. (Ducharme et al, 1993; Mastey et al, 1995). Egalement, bien que l'impact d'un échantillonnage complet sur la détermination des paramètres cinétiques soit variable, il risque d'être important lors d'études pharmacocinétiques de médicaments éliminés rapidement étant donné la contribution importante de la portion initiale de l'AUC sur l'AUC totale (Ducharme et al, 1993).

### 3.4 Analyse pharmacocinétique compartimentale vs non compartimentale

Le principe de pharmacocinétique compartimentale repose sur le fait qu'un médicament est immédiatement et uniformément distribué dans le compartiment central, soit la circulation sanguine et les organes bien perfusés, suite à son administration sous forme de bolus I.V. (Chiou, 1989). Ceci implique qu'au temps zéro, la  $C_p$  correspondante obtenue par extrapolation de la courbe des  $C_p$ , est maximale.

Ducharme et al (1993) ainsi que Mastey et al (1995) ont étudié l'influence de la portion initiale de la courbe des  $C_p$  en fonction du temps sur la détermination des paramètres cinétiques du vécuronium et du midazolam. Les résultats de leurs travaux démontrent que la distribution intravasculaire du vécuronium nécessite 25 à 35 secondes avant d'être complète et homogène suite à l'administration d'un bolus I.V. de 0.1 mg/kg (Ducharme et al, 1993), alors que la distribution du midazolam injecté sous forme de bolus I.V. n'est complète qu'après 35 à 45 secondes (Mastey et al, 1995). Ces résultats viennent contredire le concept de distribution complète et instantanée des médicaments sur lequel s'appuie la pharmacocinétique compartimentale.

L'analyse non compartimentale évite de soumettre les données expérimentales à un modèle pré-déterminé et permet d'inclure toutes les données recueillies suite à un échantillonnage complet (Ducharme et al, 1993). Toutefois, l'intégrité de cette approche dépend fortement d'une description détaillée et précise des niveaux plasmatiques immédiatement après l'injection; d'où l'importance d'effectuer un échantillonnage complet au cours des premières minutes suivant l'injection du bolus.

## IV. Pharmacologie du mivacurium

Le chlorure de mivacurium (Mivacron®) est un nouveau BNM non dépolarisant de courte durée d'action, hydrolysé en métabolites inactifs par les cholinestérases plasmatiques (Savarese et al, 1988). Comme les autres BNMs non dépolarisants, le mivacurium produit une relaxation musculaire en se liant de façon compétitive aux récepteurs cholinergiques situés à la jonction neuromusculaire.

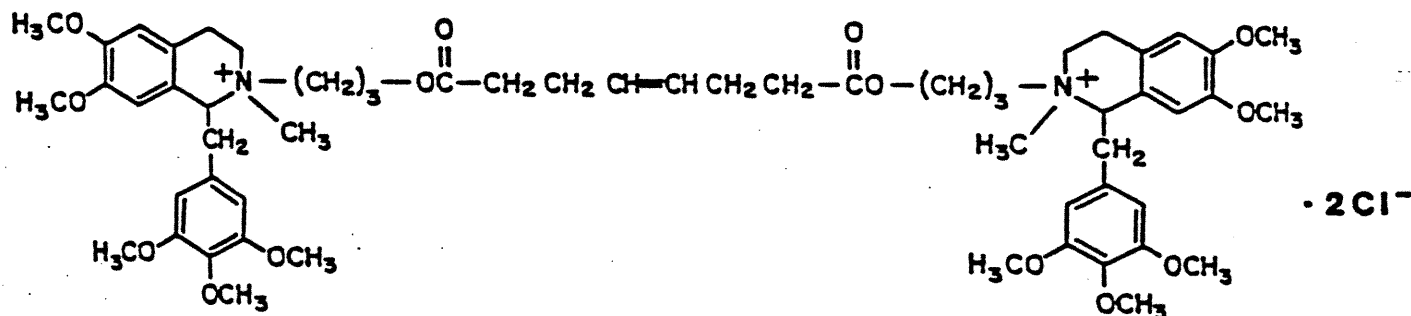
### 4.1 Chimie du mivacurium

Le mivacurium, dichlorure [R-[R\*,R\*-(E)] - 2, 2' - [(1,8 - dioxo - 4 - octène - 1,8 - diyl) bis (oxy - 3,1 - propanediyl)] bis [1,2,3,4 - tétrahydro - 6,7 - diméthoxy - 2 - méthyl - 1 - [(3,4,5 - triméthoxyphényl) méthyl] isoquinolinium], est membre de la famille des esters benzylisoquinolines (figure 3), tout comme l'atracurium et le doxacurium. Le mivacurium est une molécule chirale et consiste en un mélange de trois stéréoisomères : diester trans-trans (tt) (1R, 1'R, 2S, 2'S), diester cis-trans (ct) (1R, 1'R, 2R, 2'S) et diester cis-cis (cc) (1R, 1'R, 2R, 2'R), dans un rapport approximatif de 57:36:6 respectivement (Burroughs Wellcome - monographie du produit). Puisque les macromolécules biologiques peuvent faire la distinction entre les énantiomères, ces derniers démontrent fréquemment des différences au niveau de leur pharmacodynamie et leur pharmacocinétique. Ceci s'avère le cas pour le mivacurium où les isomères tt et ct possèdent des activités myorelaxantes équivalentes tandis que l'isomère cc ne possède qu'un dixième de l'activité des deux autres lorsqu'administré chez le chat et le singe (Belmont et al, 1991; Belmont et al, 1993; Maehr et al, 1991).

## 4.2 Puissance et doses

Des courbes doses-réponses ont établi que le ED<sub>95</sub> du mivacurium (ie. la dose requise pour atteindre 95% du bloc neuromusculaire) se situe entre 0.06 et 0.09 mg/kg chez l'adulte recevant une anesthésie par opioïde/N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub> (Choi et al, 1989; From et al, 1990; Pearson et al, 1990; Savarese et al, 1988; Weber et al, 1988; Diefenbach et al, 1992). La dose recommandée pour l'intubation endotrachéale est de 0.15 mg/kg, soit deux fois le ED<sub>95</sub>. Pour une relaxation musculaire prolongée, une infusion continue de 6 à 8 µg/kg/min maintient un bon bloc musculaire lors d'une anesthésie avec narcotique (Ali et al, 1988; Shanks et al, 1989).

Figure 3. La structure chimique du chlorure de mivacurium (Savarese et al, 1988)



### 4.3 Début et durée d'action

Les conditions d'intubation 2 à 3 minutes après l'administration du mivacurium (0.15 - 0.25 mg/kg) sont excellentes ou bonnes chez la plupart des patients (Shanks et al, 1989). Ceci se compare au début d'action observé avec l'atracurium et le vécuronium (Ali et al, 1988), mais est toutefois supérieur à celui observé suite à l'administration de 1.0 mg/kg de succinylcholine, qui demeure l'agent de choix pour les intubations d'urgence (Goldberg et al, 1989).

La durée d'action clinique du mivacurium est de 15 à 20 minutes; soit deux à trois fois plus courte que celle de l'atracurium et du vécuronium (Caldwell et al, 1989; Ali et al, 1988); deux agents de durée d'action intermédiaire. La vitesse de récupération de la fonction neuromusculaire avec le mivacurium est rapide et constante, soit 6 à 10 minutes, peu importe la dose bolus administrée ou la durée de l'infusion (Savarese et al, 1988; Diefenbach et al, 1992). Egalement, l'administration du mivacurium en doses bolus répétées ou en perfusion continue n'entraîne pas de tachyphylaxie ni d'effets inhibiteurs cumulatifs (Savarese et al, 1988; Caldwell et al, 1989).

### 4.4 Antagonisme du bloc neuromusculaire

Le bloc neuromusculaire produit par les BNMs non dépolarisants peut être renversé par des agents anticholinestérasiques qui augmentent les taux d'ACh au niveau de la jonction neuromusculaire. Toutefois, puisque le mivacurium est rapidement métabolisé et que la récupération spontanée de la fonction neuromusculaire est rapide, la nécessité de renverser le bloc est rarement requise (Savarese et al, 1988).

La possibilité d'une prolongation du bloc neuromusculaire suite à l'administration du mivacurium doit être considérée chez les patients ayant des taux de cholinestérases plasmatiques réduits. Tout comme la succinylcholine, le mivacurium doit être utilisé avec grande prudence chez les patients homozygotes pour le gène atypique de la cholinestérase plasmatique (Ostergaard et al, 1992).

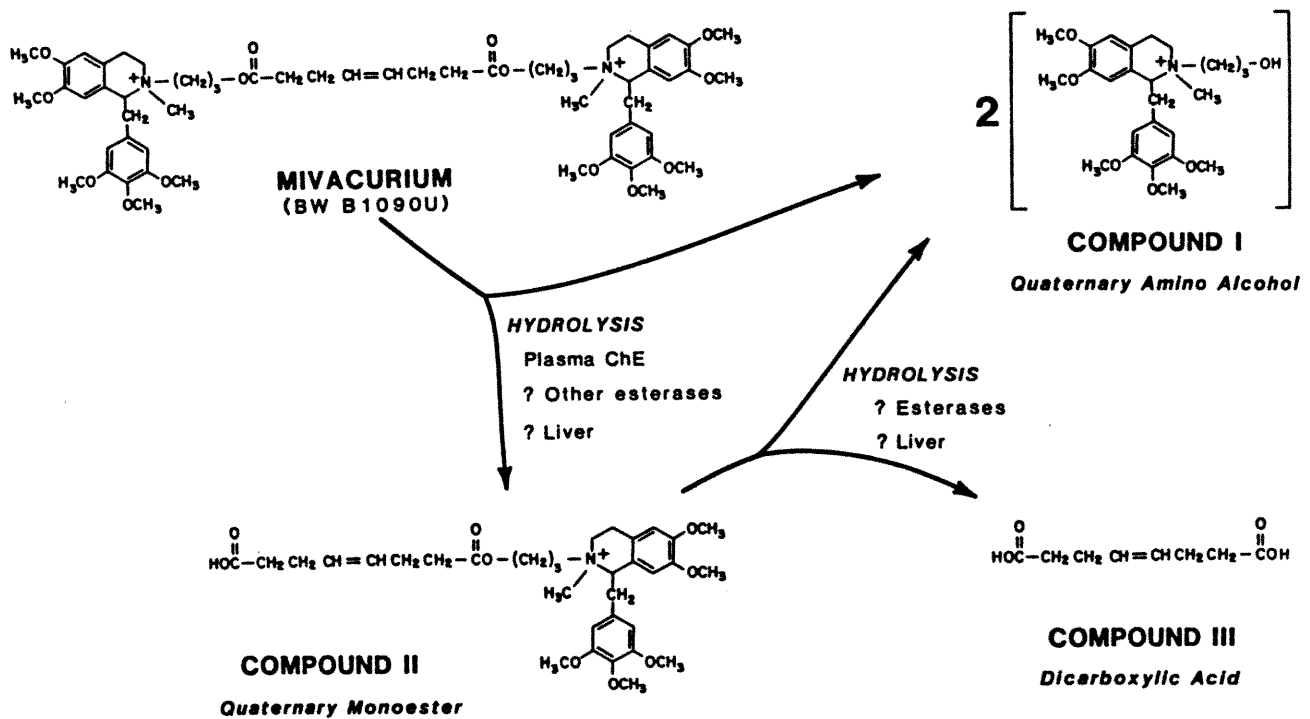
## **V. Pharmacocinétique du mivacurium**

### **5.1 Métabolisme du mivacurium**

Le mivacurium est principalement hydrolysé selon une réaction d'ordre premier par les cholinestérases plasmatiques, et très peu par les acétylcholinestérases présents au niveau de la jonction neuromusculaire (Cook et al, 1989). La vitesse d'hydrolyse du mivacurium ne représente que 70 à 88% celle de la succinylcholine (Cook et al, 1989; Savarese et al, 1988), ce qui explique en partie sa plus longue durée d'action. Contrairement aux autres BNMs, l'élimination par hydrolyse enzymatique plutôt que sa distribution dans les tissus est responsable de la diminution initiale des Cp du mivacurium (Savarese et al, 1994; Cook et al, 1992). L'hydrolyse du mivacurium par les cholinestérases plasmatiques résulte en la formation de métabolites esters (cis et trans) et alcools (cis et trans) et d'un acide dicarboxylique (figure 4). Seulement 7% de la dose de mivacurium est éliminée inchangée dans l'urine (Cook et al, 1992) alors que ses métabolites alcools et esters constituent environ 44 et 46% respectivement de la dose de mivacurium dans l'urine (Savarese et al, 1988). Les deux métabolites du mivacurium sont probablement inactifs étant donné qu'après une infusion de mivacurium de 5.5 heures, aucun changement dans la

récupération de la tension neuromusculaire n'est observé (Savarese et al, 1988).

Figure 4 : Métabolisme enzymatique du mivacurium (Savarese et al, 1988)



## 5.2 Méthode de dosage par HPLC

L'absence d'une méthode de dosage stéréosélective pour les isomères du mivacurium a longtemps limité la disponibilité des données cinétiques pour ces trois isomères. En fait, les premières données cinétiques furent obtenues à l'aide de méthodes de dosage non stéréosélectives (Cook et al 1992; De Bros et al, 1987; Basta et al, 1989); celles-ci étant tout simplement des variantes de méthodes analytiques déjà utilisées pour d'autres BNMs tels le doxacurium (DeAngelis et al, 1990).

Brown et al. (1992) ont été les premiers à développer une méthode de dosage stéréosélective pour les isomères du mivacurium. Cette méthode HPLC est réalisée en phase inverse avec détection en fluorescence. Les isomères du mivacurium sont isolés du plasma par une extraction sur une colonne C18 suivi d'une seconde extraction sur une colonne échangeuse d'anion. Par la suite, les échantillons sont séparés sur une colonne LiChrosphere 60 RP select B avec une phase mobile consistant d'un mélange d'acétonitrile et d'eau contenant 0.005M d'acide octanesulfonique (4:6). Les isomères sont par la suite détectés en fluorescence à des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de 202 et 320 nm respectivement. Bien que cette méthode offre une sensibilité raisonnable de 5ng/ml ainsi qu'une précision et exactitude adéquates (CV < 10%), la technique d'extraction utilisée donne des coefficients d'extraction des isomères du mivacurium relativement faibles (55%) et la méthode analytique ne réussit pas à doser les métabolites du mivacurium.



### 5.3 Paramètres pharmacocinétiques

Des résultats pharmacocinétiques préliminaires du mivacurium, déterminés à partir de méthodes analytiques non stéréosélectives, sont publiés suite à l'administration de bolus I.V. chez des patients sains (DeBros et al, 1987), des patients âgés (Basta et al, 1989) et des patients souffrant d'insuffisance hépatique et rénale (Cook et al, 1992). Les temps de demi-vie d'élimination ( $t_{1/2}$ ) observés dans ces études sont de beaucoup supérieurs à ce qu'on pourrait s'attendre compte tenu de la courte durée d'action clinique du mivacurium. Ce n'est qu'avec le développement d'une méthode de dosage stéréosélective que l'on réalise que la longue phase d'élimination terminale observée dans ces études est due en grande partie à l'élimination lente de l' isomère cc. Ceci fut en effet vérifié *in vitro* où on observa des temps de demi-vie d'élimination ( $t_{1/2}$ ) de 1.8, 1.4 et 22 min pour les isomères tt, ct et cc respectivement (Burroughs Wellcome - brochure de l'investigateur).

La détermination des paramètres cinétiques des isomères du mivacurium, à l'aide d'une méthode de dosage stéréosélective, fut effectuée chez des adultes ayant reçu une infusion continue (Lien et al, 1994; Head-Rapson et al, 1994). Dans l'étude de Lien et al (1994), 9 patients reçurent une infusion de mivacurium de 2 heures (0.005 mg/kg/min x 60 min suivi de 0.01 mg/kg/min x 60 min), alors que dans l'étude de Head-Rapson et al (1994), 10 patients sains et 11 patients cirrhotiques reçurent une infusion continue de 10 min (0.015 mg/kg/min). Les résultats pharmacocinétiques, dérivés à partir d'un échantillonnage veineux, sont présentés au tableau II.

Les clairances plasmatiques (Cl) très élevées des isomères tt et ct, supérieures au débit cardiaque, reflètent le métabolisme considérable par les cholinestérases plasmatiques. Les volumes de distribution (Vd) des trois isomères sont relativement restreints. Ceci est consistant avec une distribution tissulaire limitée, conséquence de la polarité et du haut poids moléculaire de ce BNM. Les taux élevés des clairances plasmatiques, combinés aux faibles volumes de distribution, se traduisent par des courts temps de demi-vie d'élimination pour les isomères tt et ct (Lien et al, 1994; Head-Rapson et al, 1994). Quant à l'isomère cc, les paramètres cinétiques obtenus correspondent mieux aux paramètres observés avec d'autres BNMs tels l'atracurium.

Tableau II : Paramètres pharmacocinétiques du mivacurium

Paramètres	Isomère tt	Isomère ct	Isomère cc	Références
$t_{1/2el}$ (min)	$1.9 \pm 0.7$	$1.8 \pm 1.1$	$52.9 \pm 19.8$	Lien et al, 1994 <sup>1</sup>
	2.3 (1.2-7.8)	1.5 (0.7-2.2)	50.3 (12.6-237)	Head-Rapson et al, 1994 <sup>2</sup>
Cl ( $ml \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$ )	$56 \pm 26$	$105 \pm 63$	$4.6 \pm 1.1$	Lien et al, 1994
	70 (34-101)	95 (57-213)	5.2 (2.9-8.9)	Head-Rapson et al, 1994
$Vd_{ss}$ (L/kg)	0.20 (0.10-0.31)	0.21 (0.15-0.32)	0.27 (0.11-1.02)	Head-Rapson et al, 1994
$Vd_{\beta}$ (L/kg)	$0.15 \pm 0.05$	$0.29 \pm 0.24$	$0.34 \pm 0.08$	Lien et al, 1994

<sup>1</sup> valeurs présentées : moyenne  $\pm$  SD

<sup>2</sup> valeurs présentées : médiane (étendue)

## VI. Objectifs du projet de recherche

Peu de données pharmacocinétiques existent pour les isomères du mivacurium; l'absence d'une méthode de dosage stéréosélective adéquate ayant longtemps limité leur disponibilité. Bien que sensible et spécifique, la méthode analytique stéréosélective développée par Brown et al (1992) ne permet pas le dosage des métabolites du mivacurium (esters et alcools) dont les processus de formation et d'élimination n'ont jamais été étudiés. De plus, les études pharmacocinétiques des isomères du mivacurium antérieures, présentent des paramètres cinétiques obtenus suite à l'administration d'infusions continues avec échantillonnage veineux.

Le présent projet de recherche s'est proposé d'étudier la pharmacocinétique stéréosélective du mivacurium après l'administration d'une dose I.V. bolus; condition se rapprochant de celle observée en clinique, et de caractériser la formation et l'élimination de ses métabolites alcools et esters dans le plasma humain. L'étude clinique fut effectuée à l'hôpital Royal Victoria de Montréal. Le protocole fut préalablement approuvé par le comité d'éthique du centre hospitalier et tous les participants à cette étude ont donné, par écrit, leur consentement éclairé.

Les objectifs spécifiques des présents travaux étaient les suivants :

- Développer et valider une (ou plusieurs) méthode de dosage stéréosélective, sensible, reproductible et précise, pour les trois isomères du mivacurium (tt, ct et cc) et ses métabolites (alcool trans, alcool cis, ester trans et ester cis).

- A l'aide d'un échantillonnage artériel complet, déterminer les paramètres pharmacocinétiques du mivacurium suite à l'administration d'un bolus I.V. de 0.15 mg/kg chez huit patients anesthésiés.
- Evaluer l'importance des premiers prélèvements sanguins sur la détermination des paramètres pharmacocinétiques du mivacurium.
- Caractériser la formation et l'élimination des métabolites esters et alcools du mivacurium.

## **CHAPITRE 2 - METHODE ANALYTIQUE**

HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC ASSAYS WITH  
FLUOROMETRIC DETECTION FOR MIVACURIUM ISOMERS AND THEIR  
METABOLITES IN HUMAN PLASMA

M. Lacroix<sup>1</sup>, T.M. Tu<sup>1</sup>, F. Donati<sup>2</sup>, and F. Varin<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>Faculté de Pharmacie,  
Université de Montréal  
Montréal, Québec

<sup>2</sup>Department of Anaesthesia  
McGill University  
Montréal, Québec

## ABSTRACT

Two high-performance liquid chromatographic assays coupled with fluorometric detection have been developed for the determination of mivacurium isomers (trans-trans, cis-trans and cis-cis) and their monoester and alcohol metabolites in human plasma. A novel solid-phase extraction procedure allowed good recovery of mivacurium isomers (mean 98%) and their monoester metabolites (mean 83%), whereas the alcohol metabolites were analyzed after direct precipitation of plasma proteins. For all analytes, these assays proved to be sensitive (LOQ : 3.9 - 15.6 ng/ml), reproducible (CV < 15%) and accurate (> 94%) over the therapeutic range of concentrations of mivacurium and its metabolites. These two methods were applied successfully to a pharmacokinetic study of mivacurium after a bolus dose of 0.15 mg/kg in anesthetized patients.



## INTRODUCTION

Mivacurium ((E) - (1R,1'R) - 2,2' - [4 - octenedioylbis (oxytrimethylene)] bis [1,2,3,4- tetrahydro - 6,7 - dimethoxy - 2 - methyl - 1 - (3,4,5 - trimethoxybenzyl)-isoquinolinium]-dichloride) is a new short-acting nondepolarizing neuromuscular blocking agent, member of the benzylisoquinolinium family (Fig. 1A). Mivacurium consists of a mixture of 3 stereoisomers : the two most active and equipotent are the **trans-trans** (tt) (1R 1'R 2S 2'S) and **cis-trans** (ct) (1R 1'R 2R 2'S) isomers (57 and 37% w / w, respectively) whereas the **cis-cis** (cc) (1R 1'R 2R 2'R) isomer (6% w / w) has only one tenth the activity of the others in cats and monkeys [ 1, 2 ]. Rapid hydrolysis of the two most active isomers by plasma cholinesterases explains the short clinical duration of action of mivacurium [ 3, 4 ]. Renal excretion is a minor elimination pathway; approximately 7% of an administered dose of mivacurium is recovered unchanged in human urine [ 4 ]. Hydrolysis of mivacurium by plasma cholinesterases produces two metabolites, namely the **alcohols** [(R,R) - and (R,S) - 1,2,3,4 - tetrahydro - 2 - (3 - hydroxypropyl) - 6,7 - dimethoxy - 2 -methyl - 1 - (3,4,5 - trimethoxybenzyl) isoquinolinium chloride] and the **monoesters** [(E) - (1R,2RS) - 2 - [3 - [(7 - carboxy - 4 - heptenoyl) oxy] - propyl -1,2,3,4 - tetrahydro - 6,7 - dimethoxy - 2 - methyl - 1 - (3,4,5 - trimethoxybenzyl) isoquinolinium chloride, which account respectively for 44 and 46% of the dose in urine [ 4 ]. These metabolites are unlikely to be active since after a 5.5 hour infusion the recovery times from the neuromuscular block was unchanged [ 5 ].

A stereoselective high-performance liquid chromatographic assay with fluorometric detection for mivacurium isomers in human plasma has been recently reported [ 6 ]. However this method requires a two-step extraction procedure and has low extraction efficiencies (55, 55 and 54%) for the tt, ct and

cc isomers respectively. To our knowledge, separation and quantitation of the cis and trans isomers of the monoester and alcohol metabolites have not been reported. To determine the plasma concentration - time profile of each individual mivacurium isomers and to follow the formation and elimination of their metabolites in humans, two stereoselective assays were developed and are the object of the present report.

## EXPERIMENTAL

### *Chemicals*

The three isomers of mivacurium chloride, the monoester and quaternary alcohol metabolites as well as an internal standard (I.S.) (BW785U77; bis - 3 - [trans - 1,2,3,4 -tetrahydro - 6,7 - dimethoxy - N - methyl - 1 - (3,4,5 - trimethoxybenzyl) isoquinolinium] propyl - 1,3 - phenylenedipropionate dichloride)) (Fig. 1B), which was further purified by repeated solid-phase extractions on PrepSep C18 cartridges (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA) were kindly supplied by Burroughs Wellcome Co. (Research Triangle Park, North Carolina). All analytes were supplied individually with the exception of the monoester metabolites standard which was supplied as a mixture of the cis and trans isomers. The relative proportion of the cis and trans monoester isomers in the mixture were reported to be 26.3 and 66.3% respectively by the supplier. All organic solvents were HPLC grade (Anachemia, Montréal, Canada) while environmental grade hydrochloric acid was used (Anachemia). PIC B-8 Reagent (low UV), which consists of a mixture of octanesulfonic acid in water, methyl alcohol and calcium acetate, was purchased from Waters Assoc. (Milford, MA, USA). Echothiophate iodide, a plasma cholinesterase inhibitor, was kindly supplied by Ayerst Laboratories (Montréal, Canada). Deionized water was

purified by a Milli-Q Plus system (Millipore, Bedford, MA, USA) and was filtered through a 0.2  $\mu\text{m}$  membrane (Type HVLP, Millipore) immediately before use.

#### *Standard solutions*

Stock solutions (1 mg/ml equivalent base) of each individual isomer, each alcohol metabolite and the monoester metabolites mixture (corresponding to 0.663 mg/ml and 0.263 mg/ml of the trans and cis monoesters respectively), were prepared in a 80 : 20 mixture of physiological saline (pH = 3, adjusted with 0.1 N HCl) and methanol, and stored at 4 °C. Working solutions of 10  $\mu\text{g/ml}$  containing all three isomers in the same medium were also prepared. For the determination of mivacurium isomers and their monoester metabolites, a stock solution of the internal standard (BW785U77) was prepared similarly but further diluted to give a working solution of 4  $\mu\text{g/ml}$ . Stock and working solutions of laudanosine (0.4  $\mu\text{g/ml}$ ) (Sigma Chemical, St-Louis, MO, USA) (Fig.1C) were prepared in 0.005 M sulfuric acid and used as the internal standard for the determination of the alcohol metabolites. All solutions were tested weekly for drug degradation.

#### *Sample preparation*

To isolate the three isomers and the cis and trans monoester metabolites from plasma samples, PrepSep C18 solid-phase extraction cartridges containing 300 mg of sorbent were used and conditioned with methanol (3 ml) and distilled water (3 ml). Plasma standard or sample (1 ml), internal standard working solution (100  $\mu\text{l}$ ) and water (1 ml) were combined in the reservoir and then aspirated through the sorbent. A vacuum of 50-80 kPa was applied to the manifold of the Vac-Elut chamber (Analytichem International) throughout the

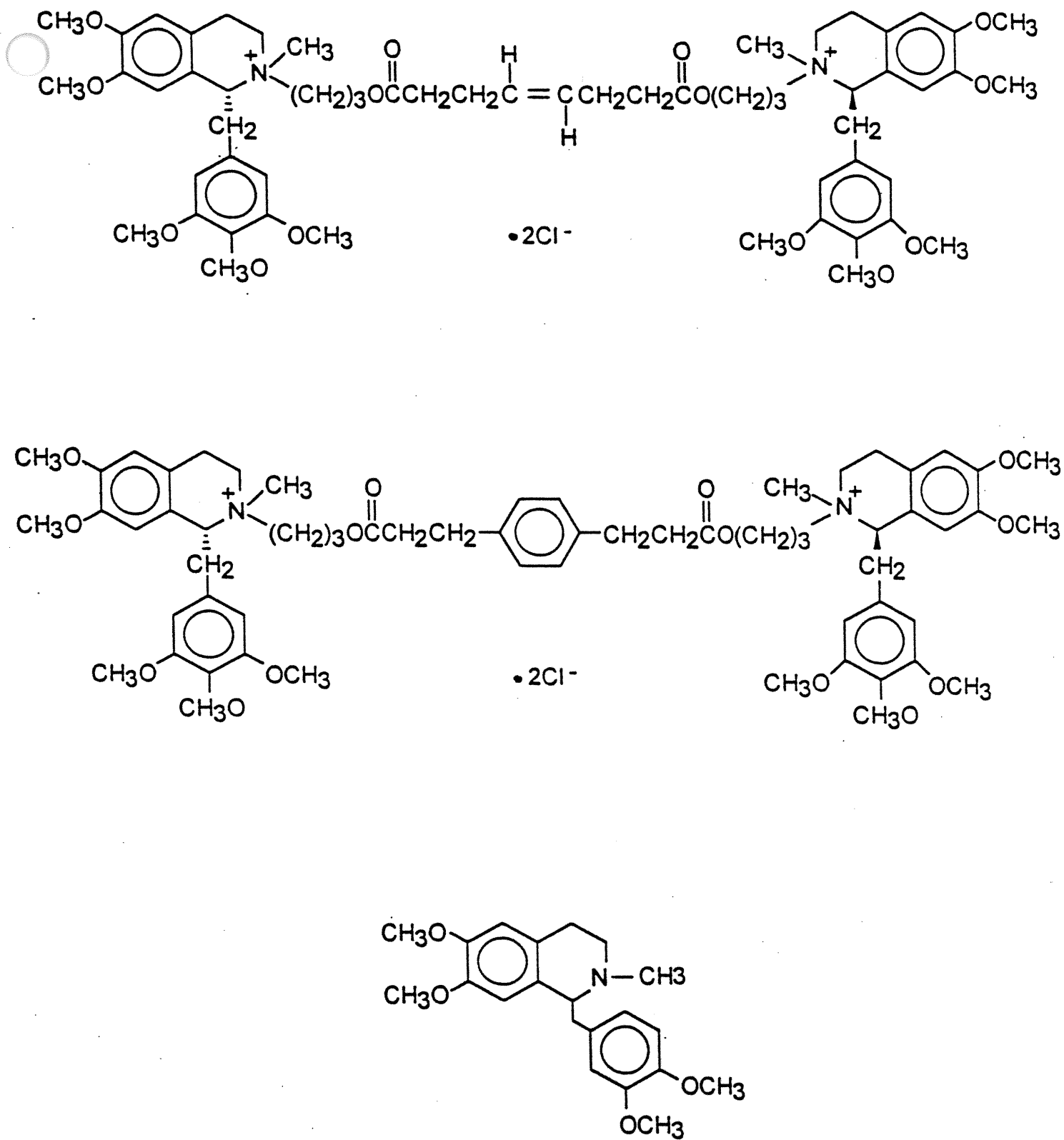


Figure 1. Chemical structures of mivacurium and two internal standards

extraction procedure. The cartridges were sequentially washed with water (3 ml), acetonitrile (3 ml) and water (3 ml) under vacuum. Analytes were eluted into glass tubes with 2 X 750  $\mu$ l of 0.05 M ammonium diphosphate (pH=3) in methanol (20:80), under a small vacuum ( $< 20$  kPa). The eluents were then evaporated to dryness using a Speed-Vac concentrator (Model SC210A, Savant Instruments, Farmingdale, NY, USA). The dry residues were dissolved in 300  $\mu$ l of mobile phase and a volume of 150  $\mu$ l was injected onto the analytical column. Smaller volumes were used when higher concentrations of mivacurium isomers and their monoester metabolites were injected in order to maintain proper linear detection and integration of the peaks.

For the isolation of the cis and trans alcohol metabolites from plasma, 250  $\mu$ l of plasma (sample or standard) and 100  $\mu$ l of internal standard (40 ng laudanosine) were added and mixed. Acetonitrile (650  $\mu$ l) was added, the sample was vortex-mixed for 1 minute and centrifuged for 10 minutes at 2000 g. The supernatant was then transferred to a glass tube and evaporated to dryness in the Speed-Vac concentrator. The dry residues were solubilized in 300  $\mu$ l of mobile phase and 150  $\mu$ l was injected onto the column.

#### *Chromatographic apparatus and conditions*

The chromatographic system for both assays consisted of a Constametric 4100 pump (LDC Analytical, Riviera Beach, FL, USA). Samples were injected with a Shimadzu SIL-9A auto-injector (Kyoto, Japan), the peaks were detected with a Kratos fluorescence detector (Ramsey, NJ, USA) at excitation and emission wavelengths of 202 nm and 290 nm respectively and integrated with a Shimadzu C-R3A integrator (Kyoto, Japan). Separation of mivacurium isomers and their monoester metabolites was performed on a 5  $\mu$ m LiChrosphere 60 RP

Select B column (125 mm x 4.6 mm) combined with a precolumn cartridge (4 mm) (EM Science, Gibbstown, NJ, USA). The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile and water (37.5 : 62.5) containing a final concentration of 0.0052 M octanesulfonic acid (PIC B-8 Reagent). The flow rate was 2.0 ml/min and the mobile phase was allowed to recirculate. For the separation of the alcohol metabolites, a 5 µm Spherisorb C1 column (125 mm x 4.6 mm) (Hichrom, Reading, UK) was used. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile and water (12.5 : 87.5) containing a final concentration of 0.007 M octanesulfonic acid (PIC B-8 Reagent), at a flow rate of 2.0 ml/min without recirculation. In both assays, the columns were maintained at 35 °C with an Eppendorf CH-30 column heater (Madison, WI, USA).

#### *Linearity and limit of quantitation*

Cholinesterases in plasma used for the preparation of standard and spiked samples were inhibited by adding 0.001 M of echothiophate iodide prior to the addition of the analytes. A pool of plasma containing 4000 ng/ml of the three isomers was serially diluted 1 in 2 with drug-free plasma to give standard plasma concentrations ranging from 3.9 to 2000 ng/ml. This procedure was repeated for the alcohol metabolites (15.6 to 2000 ng/ml). A pool of plasma consisting of 4000 ng/ml of the monoesters mixture (corresponding to 1052 ng/ml and 2652 ng/ml of the cis and trans monoesters respectively) was similarly diluted to give plasma concentrations ranging from 4.1 to 526 ng/ml and 10.4 to 1326 ng/ml for the cis and trans monoesters respectively. All biological standards were stored at -20 °C. Linearity was assessed by weighted least square regression ( $1/x^2$ ) of the analyte / I.S. peak height ratio against the corresponding concentration of the analyte in plasma. To be included in the calibration curve, the lowest concentration of standard had to yield a regression-

estimated value within 20% of the nominal concentration. This lowest concentration was considered as the lowest limit of quantitation (LOQ).

### *Recovery*

Recovery of mivacurium isomers and their monoester metabolites from human plasma was determined in quadruplicate at three different drug concentrations (31.25, 125, 1000 ng/ml; 41.44, 165.75, 663 ng/ml and 16.44, 65.75, 263 ng/ml for the isomers, the trans monoester and the cis monoester respectively). Blank plasma spiked with known amounts of analytes and 100  $\mu$ l of I.S. were extracted and compared with blank plasma and I.S. extracts subsequently spiked with the same amounts of analytes. The two sets of extracts were then evaporated to dryness using the Speed-Vac system and reconstituted in mobile phase. The recovery was assessed by comparing the peak-height ratios of analyte / I.S. for the two sets of extracts.

### *Precision and accuracy*

The intra-assay precision of the analytical method for the determination of the isomers and their monoester metabolites was determined by using replicate measurements (n=4) of three different concentrations; namely the same samples used for the recovery. For the alcohol metabolites, the intra-assay precision of the method was determined by replicate measurements (n=6) of three different concentrations (31.25, 125, 500 ng/ml). The inter-assay precision for both methods was assessed by using plasma samples from the calibration curve that were independently analyzed on four different days.

To evaluate accuracy, drug-free plasma was spiked with the three mivacurium isomers to give 10 different concentrations ranging from 3.9 to 2000

ng/ml. The samples were assayed blindly and concentrations derived from the calibration curves. Accuracy was evaluated by comparing the estimated concentration with the known concentration of the isomers. This procedure was repeated independently for both the monoester (n=10) and the alcohol (n=8) metabolites respectively.

#### *Clinical study*

These two analytical methods were used to determine the plasma concentrations of mivacurium isomers and their metabolites in patients undergoing elective surgery. An I.V. bolus dose of 0.15 mg/kg mivacurium chloride was administered and arterial blood samples were collected at frequent intervals for up to 4 hours. Blood samples were collected into tubes containing ethothiophate iodide, centrifuged for 5 minutes and the plasma was frozen at -20 °C until HPLC analysis. The plasma concentration-time profiles of each analyte for one patient are presented.

## RESULTS AND DISCUSSION

We have developed two sensitive and selective assays for the quantitation of mivacurium isomers (tt, ct and cc) as well as their monoester and alcohol metabolites. In the first assay, mivacurium isomers and their monoester metabolites are recovered after a single-step solid-phase extraction procedure and separated on a RP-Select B C8 column, whereas in the second assay, direct precipitation of plasma proteins is carried out before separation of the alcohol metabolites on a Spherisorb C1 column. An analytical method for dosing mivacurium isomers has been recently reported [ 6 ]. However it requires a two-



step solid-phase extraction procedure, involving extraction on reversed phase C18 followed by anion-exchange cartridges, in order to achieve adequate purification and could not be applied to the quantitation of mivacurium metabolites since they were eluted from the HPLC column in the solvent front.

By performing a one-step solid-phase extraction on Prep-Sep C18 cartridges, which have been found to be reliable for the extraction of other quaternary ammonium products such as doxacurium [ 7 ], we were able to efficiently recover mivacurium isomers as well as their monoester and alcohol metabolites. Washing with methanol during the extraction procedure caused the elution of approximately 25% of the metabolites. A similar observation was reported by Brown and al. [ 6 ] for mivacurium isomers in their first extraction step. Thus the methanol wash in our extraction procedure was replaced by a final wash with water. This final wash was deemed necessary to maintain a clean chromatographic separation and to avoid precipitation of the elution phase (ammonium diphosphate 20% in methanol 80%) with the acetonitrile used in the second wash. The mean extraction efficiencies were 101%, 99% and 96% for the tt, ct and cc isomers respectively (Table I) while for the trans and cis monoesters, the mean extraction efficiencies were 82% and 85% respectively (Table I). The lower limits of quantitation in plasma (LOQ) were 3.9, 4.1 and 10.4 ng/ml for mivacurium isomers, the cis monoester and the trans monoester respectively.

Extraction of a blank plasma sample from an anesthetized patient proved to be free of any interference from endogeneous compounds or perioperative drugs (Fig. 2A). The analysis of a plasma sample taken shortly after the administration of mivacurium chloride to the patient shows good resolution of the

TABLE I  
 RECOVERY OF MIVACURIUM ISOMERS AND THE MONOESTER  
 METABOLITES FROM HUMAN PLASMA, AND INTRA-ASSAY VARIABILITY

Concentration added (ng/ml)	% Recovery (mean $\pm$ SD, n=4)	Coefficient of variation (%)
<i>Mivacurium trans-trans</i>		
31.25	112 $\pm$ 2	1.5
125	99 $\pm$ 3	2.6
1000	91 $\pm$ 1	1.4
<i>Mivacurium cis-trans</i>		
31.25	110 $\pm$ 3	2.9
125	96 $\pm$ 2	1.6
1000	90 $\pm$ 1	1.1
<i>Mivacurium cis-cis</i>		
31.25	107 $\pm$ 4	4.0
125	94 $\pm$ 2	2.3
1000	88 $\pm$ 1	1.3
<i>Monoester trans</i>		
41.44	83 $\pm$ 5	6.4
165.75	78 $\pm$ 7	8.7
663	85 $\pm$ 3	3.9
<i>Monoester cis</i>		
16.44	87 $\pm$ 5	5.9
65.75	81 $\pm$ 7	9.1
263	86 $\pm$ 3	3.4
<i>Alcohol trans (n=6)</i>		
31.25	-	3.8
125	-	6.9
500	-	4.5
<i>Alcohol cis (n=6)</i>		
31.25	-	5.1
125	-	6.6
500	-	4.6

isomers and their monoester metabolites (Fig. 2B), corresponding to 381 ng/ml, 116 ng/ml and 75 ng/ml of the tt, ct and cc isomers, and 478 ng/ml and 440 ng/ml of the trans and cis monoesters respectively. Chromatograms of extracts of drug-free plasma spiked with mivacurium isomers and their monoester metabolites are shown in Fig. 2C and 2D. The retention times of the tt, ct and cc isomers were 7.1, 7.9 and 8.9 min respectively, whereas for the trans and cis monoester metabolites, the retention times were 2.4 and 2.7 min. The total time for the chromatographic run was less than 15 min with a retention time of 12 min for the I.S. It was however noted that, although resolution of the peaks was maintained, slight alterations in the percentage of acetonitrile in the mobile phase resulted in an important shift in the retention times.

Attempts were made, for economical reasons, to substitute the PIC B-8 reagent of the mobile phase with octanesulfonic acid at the same concentration (Fisher Scientific, Montreal, Canada). Although resolution of mivacurium isomers was good initially, it deteriorated with time. This lead us to believe that the calcium ions present in the PIC B-8 reagent are necessary and have an important counter ion effect, critical for proper separation of the peaks.

For the alcohol metabolites, although adequate recoveries were achieved following solid-phase extraction on PrepSep C18 cartridges, the trans and cis alcohols could not be resolved on the RP Select B C8 column used for the separation of the isomers and the monoesters. However, adequate resolution of the alcohol metabolites was achieved on a more polar column (Spherisorb C1). Limited equipment facilities and human resources did not allow us to run two HPLC setups (C8 and C1 columns) at the same time. Thus for practical and economical reasons, plasma protein precipitation was considered. This method,

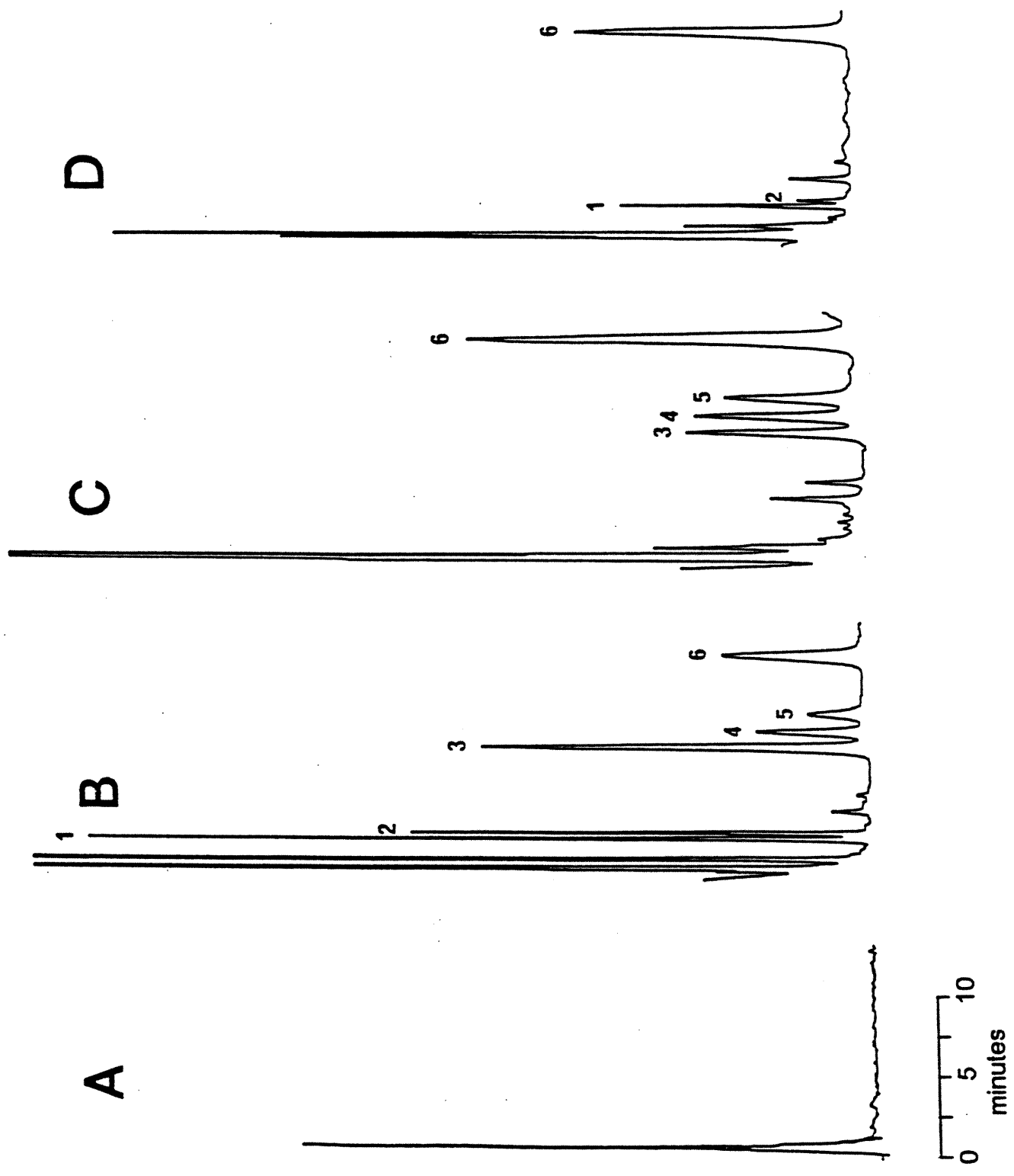
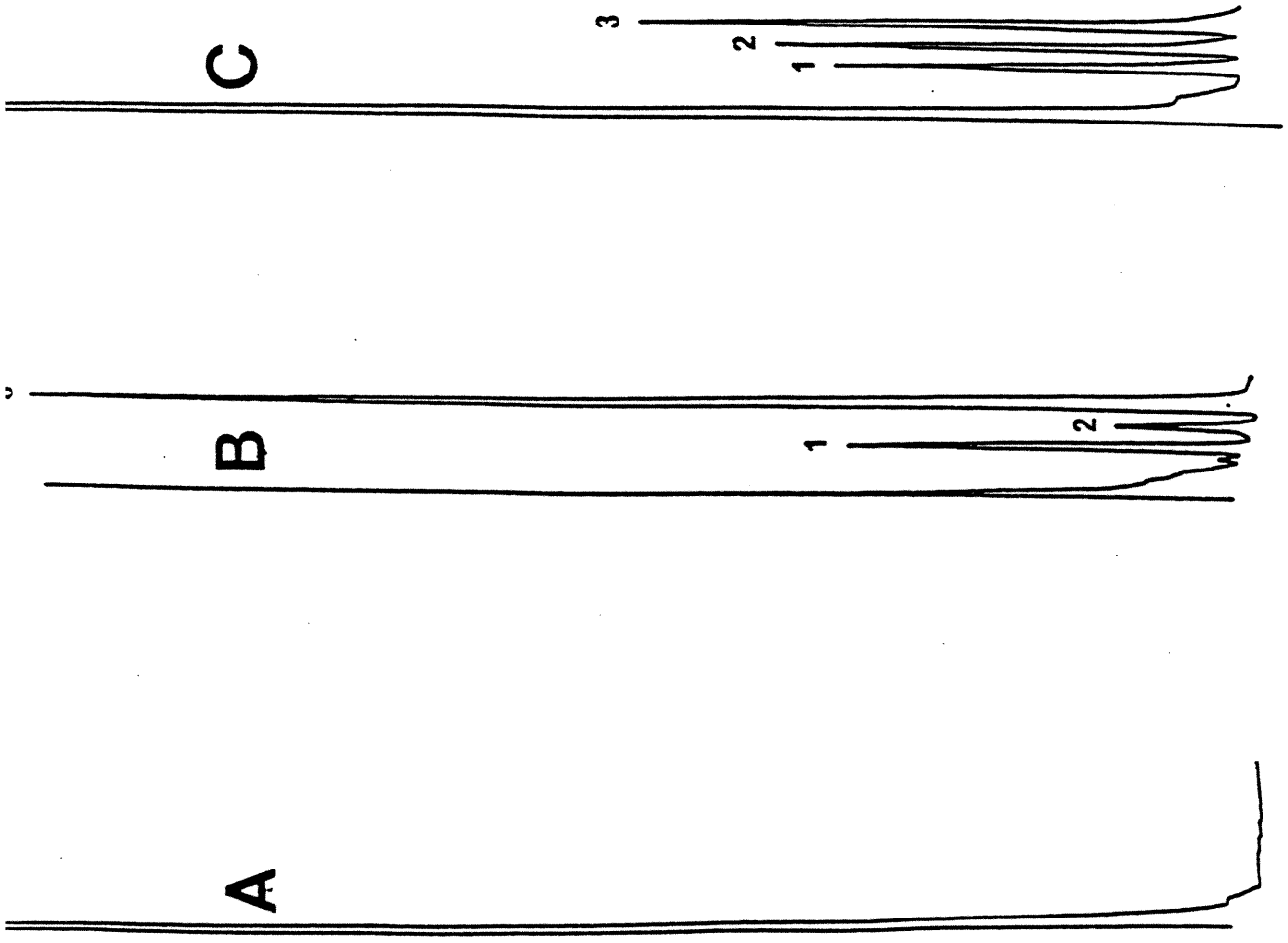


Figure 2. HPLC Chromatograms of mivacurium isomers and the ester metabolites.

which has been successfully used for atracurium in similar clinical conditions and concentration ranges [ 8 ], was found to be equally acceptable for the alcohol metabolites. Despite the 1 in 4 dilution factor, the method allowed good sensitivity with a lower limit of quantitation of 15.6 ng/ml.

Blank plasma obtained from one anesthetized patient before the administration of mivacurium showed no interfering peaks from endogeneous compounds or other drugs administered during anesthesia (Fig. 3A). The analysis of a plasma sample taken after the administration of mivacurium chloride to the patient shows good resolution of the cis and trans alcohol metabolites (Fig. 3B), corresponding to 167 ng/ml and 1122 ng/ml of the cis and trans alcohols respectively. A chromatogram of drug-free plasma spiked with the alcohol metabolites is shown in Fig 3C. The retention times of the cis and trans alcohol metabolites on the C1 column, were 5.4 and 6.4 min respectively, while the I.S. (laudanosine) had a retention time of 4.3 min.

All calibration curves for each analyte were linear over a wide concentration range. The regression equations for the tt, ct and cc isomers (3.9 to 2000 ng/ml) were  $y = 0.00721x + 0.00197$  ( $r^2 = 0.999$ );  $y = 0.00647x - 0.00096$  ( $r^2 = 0.997$ ); and  $y = 0.00500x + 0.00033$  ( $r^2 = 0.998$ ) respectively. For the trans and cis alcohol metabolites (15.6 to 2000 ng/ml), the equations were  $y = 0.00278x - 0.00041$  ( $r^2 = 0.998$ ) and  $y = 0.00207x - 0.00043$  ( $r^2 = 0.994$ ) respectively. For the trans monoester (10.4 to 1326 ng/ml), the regression equation was  $y = 0.0119x - 0.0305$  ( $r^2 = 0.998$ ), whereas for the cis monoester (4.1 to 526 ng/ml) the regression equation was  $y = 0.00741x + 0.00449$  ( $r^2 = 0.996$ ).



0 5 10  
minutes

Figure 3. HPLC Chromatograms of the alcohol metabolites.

Both analytical methods showed good precision with intra-assay variability less than 9% (Table I) and inter-assay variability less than 15% for all analytes (Tables II to IV). In addition, blindly assayed spiked samples of mivacurium isomers at concentrations covering the standard curves showed a mean accuracy of 93, 96 and 98% for the tt, ct and cc isomers respectively (Table V). The mean accuracies for the trans and cis monoester metabolites were 102 and 109% respectively (Table VI), while for the trans and cis alcohol metabolites they were 93 and 96% respectively (Table VII).

Both analytical methods were applied to determine the concentration - time profiles of mivacurium isomers and their metabolites in one patient after the administration of an I.V. bolus of 0.15 mg/kg mivacurium chloride. Arterial blood samples were collected at frequent intervals during 4 hours. Perioperative medications given to this patient included thiopental, fentanyl and one dose of cefazoline. The plasma concentration-time profile of the three isomers for this patient is shown in Fig. 4A. Rapid and almost parallel decrease in the concentration of the equipotent tt and ct isomers is the result of extensive metabolism by plasma cholinesterases, and explains the short clinical duration of action of this muscle relaxant. Plasma concentrations of the tt isomer declined rapidly from approximately 1000 ng/ml ( $C_{max}$  at 1 min) to 5 ng/ml 12 min after the bolus injection of the drug, while the concentration for the ct isomer declined from 400 ng/ml to 6 ng/ml 7 min post-injection. Plasma levels of the cc isomer ( $C_{max}=200$  ng/ml), which appears to be metabolised more slowly by plasma cholinesterases, could still be detected 90 minutes (5 ng/ml) following injection of the drug. Rapid hydrolysis of the tt and ct isomers gave rise to the formation of monoester and alcohol metabolites which reached peak concentrations within 1 min following the injection of mivacurium chloride and

were subsequently slowly eliminated (Fig 4B and 4C); one exception being the cis alcohol which was only negligibly and transiently present. All plasma concentrations for each analyte were within the limit of quantitation of our two assays.

#### CONCLUSIONS :

Two stereoselective HPLC assays with fluorescence detection have been developed for the determination of mivacurium isomers and their metabolites. Our one-step extraction procedure offers an improvement which translates into higher recovery efficiencies of the isomers and simultaneous extraction of the metabolites. In addition, our second method for the determination of the alcohol metabolites is simple and rapid, with no extraction procedure required. Both methods proved to be precise, specific and sensitive for the isomers as well as the metabolites of mivacurium and are readily applicable to pharmacokinetic studies in humans.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Medical Research Council of Canada and Burroughs Wellcome for funding this work.



TABLE II  
INTER-ASSAY VARIABILITY FOR MIVACURIUM ISOMERS

Conc. (ng/ml)	Peak-height ratio (mean $\pm$ SD, n=4)					
	trans-trans	CV%	cis-trans	CV%	cis-cis	CV%
3.9	0.03 $\pm$ 0.00	7.2	0.03 $\pm$ 0.00	7.9	0.02 $\pm$ 0.00	9.9
7.8	0.05 $\pm$ 0.00	7.6	0.05 $\pm$ 0.00	7.7	0.04 $\pm$ 0.00	9.8
15.6	0.10 $\pm$ 0.01	7.6	0.09 $\pm$ 0.00	2.7	0.07 $\pm$ 0.01	9.9
31.25	0.21 $\pm$ 0.00	1.6	0.20 $\pm$ 0.01	3.8	0.14 $\pm$ 0.01	5.2
62.5	0.43 $\pm$ 0.01	1.6	0.39 $\pm$ 0.01	2.0	0.29 $\pm$ 0.01	3.3
125	0.84 $\pm$ 0.07	8.7	0.76 $\pm$ 0.05	6.3	0.59 $\pm$ 0.03	5.8
250	1.81 $\pm$ 0.03	1.7	1.58 $\pm$ 0.09	5.5	1.20 $\pm$ 0.03	2.5
500	3.78 $\pm$ 0.11	2.8	3.29 $\pm$ 0.16	4.8	2.48 $\pm$ 0.12	5.1
1000	8.12 $\pm$ 0.81	9.9	6.58 $\pm$ 0.28	4.3	4.94 $\pm$ 0.25	5.0
2000	15.60 $\pm$ 0.31	2.0	13.52 $\pm$ 0.45	3.3	9.93 $\pm$ 0.24	2.5

TABLE III  
INTER-ASSAY VARIABILITY FOR THE MONOESTER METABOLITES

Conc. (ng/ml)	Peak-height ratio (mean $\pm$ SD, n=4)				
	trans	CV%	Conc. (ng/ml)	cis	CV%
10.36	0.10 $\pm$ 0.00	1.0	4.11	0.04 $\pm$ 0.00	3.6
20.72	0.22 $\pm$ 0.03	13.0	8.22	0.06 $\pm$ 0.00	3.4
41.44	0.41 $\pm$ 0.04	8.6	16.44	0.12 $\pm$ 0.01	12.0
82.88	0.83 $\pm$ 0.03	3.8	32.88	0.21 $\pm$ 0.01	5.3
165.75	1.90 $\pm$ 0.18	9.5	65.75	0.42 $\pm$ 0.04	8.4
331.5	4.02 $\pm$ 0.32	7.9	131.5	0.87 $\pm$ 0.07	8.4
663	9.34 $\pm$ 0.55	5.9	263	2.05 $\pm$ 0.17	8.4
1326	18.34 $\pm$ 0.45	2.4	526	4.03 $\pm$ 0.22	5.5

TABLE IV  
INTER-ASSAY VARIABILITY FOR THE ALCOHOL METABOLITES

Conc. (ng/ml)	Peak-height ratio (mean $\pm$ SD, n=4)			
	trans	CV%	cis	CV%
15.6	0.04 $\pm$ 0.00	3.1	0.03 $\pm$ 0.00	14.7
31.25	0.08 $\pm$ 0.00	1.6	0.07 $\pm$ 0.00	5.3
62.5	0.18 $\pm$ 0.00	1.4	0.12 $\pm$ 0.00	3.6
125	0.35 $\pm$ 0.00	1.0	0.26 $\pm$ 0.01	2.7
250	0.70 $\pm$ 0.01	1.4	0.52 $\pm$ 0.02	3.6
500	1.37 $\pm$ 0.04	2.8	1.02 $\pm$ 0.04	3.9
1000	2.52 $\pm$ 0.16	6.4	1.70 $\pm$ 0.12	7.2
2000	5.13 $\pm$ 0.15	2.9	4.11 $\pm$ 0.33	8.1

TABLE V  
ACCURACY OF THE ASSAY FOR MIVACURIUM ISOMERS

Spiked concentration (ng/ml)	Estimated concentration of Mivacurium (ng/ml)		
	trans-trans	cis-trans	cis-cis
0 (blank)	0.0	0.0	0.0
10	8.2	9.6	9.4
17.5	19.6	18.7	18.6
37.5	34.7	36.2	36.4
190	178.9	182.0	185.8
250	230.8	237.0	247.8
440	400.5	410.2	420.9
1200	1115.3	1149.2	1158.3
1250	1178.6	1228.2	1250.8
1800	1752.4	1806.8	1815.9
Mean Accuracy (%)	92.7	95.7	97.9
SD (%)	7.8	4.0	3.6

TABLE VI

## ACCURACY OF THE ASSAY FOR THE MONOESTER METABOLITES

Spiked conc. (ng/ml)	trans	Spiked conc. (ng/ml)	cis
	Estimated conc. (ng/ml)		Estimated conc. (ng/ml)
0 (blank)	0.0	0	0.0
14.6	16.0	5.8	7.0
29.2	27.5	11.6	10.4
56.4	53.4	22.4	21.9
285.1	267.6	113.1	107.2
580.1	641.5	230.1	278.7
613.3	682.8	243.3	295.8
961.4	1022.0	381.4	449.0
1094.0	1124.9	434.0	513.0
1259.7	1240.1	499.7	554.4
Mean Accuracy (%)	102.1		108.9
SD (%)	7.5		12.6

TABLE VII  
ACCURACY OF THE ASSAY FOR THE ALCOHOL METABOLITES

Spiked concentration (ng/ml)	Estimated concentration of the Alcohols (ng/ml)	
	trans	cis
0 (blank)	0.0	0.0
40	41.4	37.1
45	43.5	41.3
180	181.8	183.5
240	201.1	206.3
450	391.9	398.7
1250	1070.1	1111.0
1800	1499.0	1565.8
Mean Accuracy (%)	93.3	95.5
SD (%)	8.6	5.4

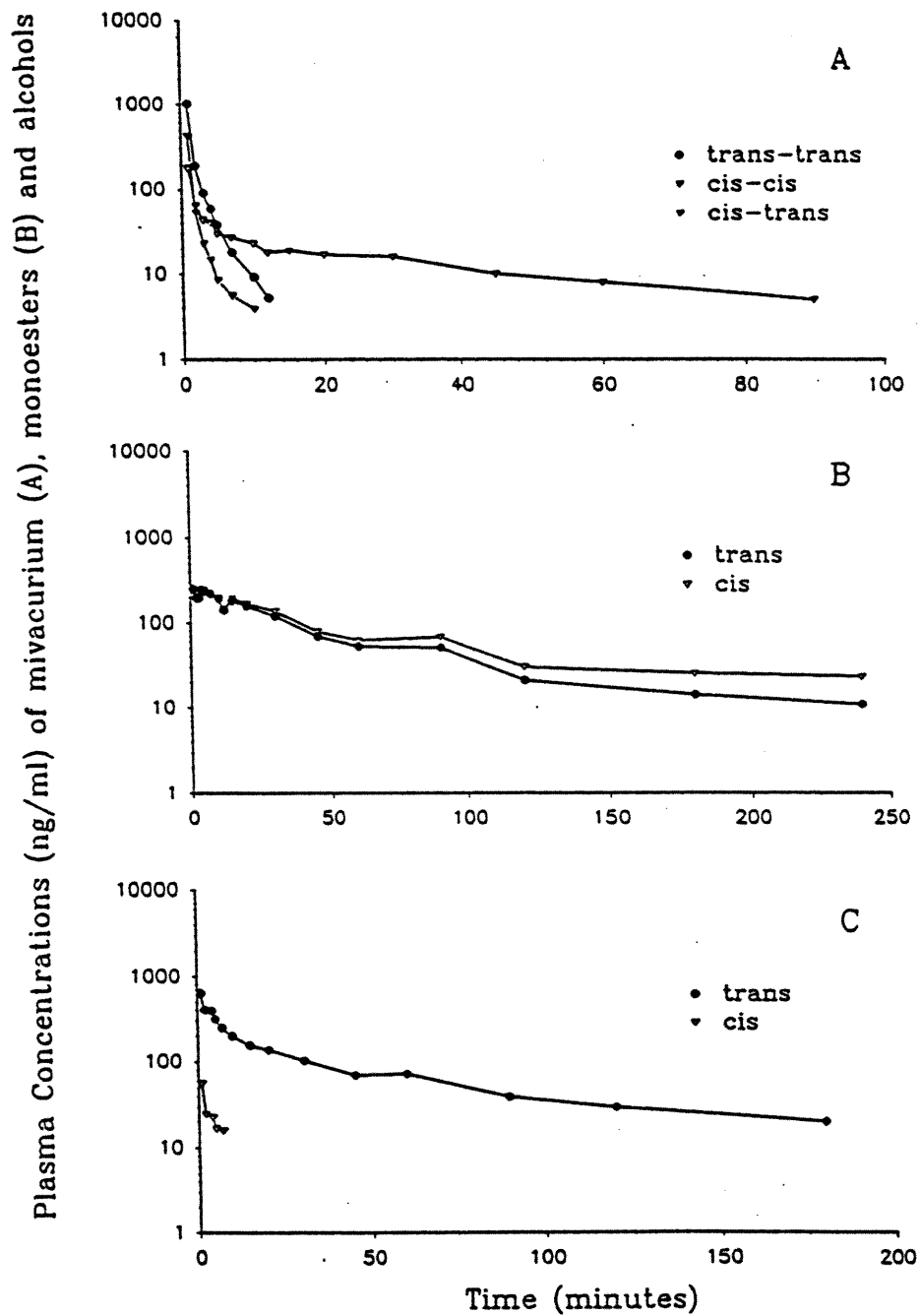


Figure 4. Concentration - time curves for mivacurium isomers and their metabolites

## REFERENCES

- 1 R.B. Maehr, M.R. Belmont, D.L. Wray, J.J. Savarese and W.B. Wastilla, *Anesthesiology*, 77 (1991) A772 [Abstract].
- 2 M.R. Belmont, G. Beemer, P. Bownes, J. Russo, J. Wisowaty and J.J. Savarese, *Anesth. Analg.*, 76 (1993) S18 [Abstract].
- 3 C.A. Lien, V.D. Schmith, W.A. Wargin, T.T. Kudlak and J.J. Savarese, *Anesthesiology*, 77 3A (1992) A910 [Abstract].
- 4 D.R. Cook, J.A. Freeman, A.A. Lai, Y. Kang, R.L. Stiller, S. Aggarwal, J.C. Harrelson, R.M. Welch and B. Samara, *Br. J. Anaesth.* 69 (1992) 580.
- 5 J.J. Savarese, H.H. Ali, S.J. Basta, P.B. Embree, R.P.F. Scott, N. Sunder, J.N. Weakly, W.B. Wastila and H.A. El-Sayad, *Anesthesiology*, 68 (1988) 723.
- 6 A.R. Brown, C.D. James, R.M. Welch and J.C. Harrelson, *J. Chromatogr.*, 578 (1992) 302.
- 7 L.P. Gariepy, F. Varin, F. Donati, Y. Salib and D.R. Bevan, *Clin Pharmacol Ther*, 53 (1993) 340.
- 8 F. Varin, J. Ducharme and J.G. Besner, *J Chromatogr.*, 529 (1990) 319.



**LEGENDS FOR FIGURES :**

- Figure 1. Chemical structures of (A) mivacurium chloride (B) BW785U77 (I.S.) and (C) laudanosine (I.S.)
- Figure 2. HPLC chromatograms for : (A) plasma sample collected from a patient before the injection of mivacurium and (B) shortly after an I.V. bolus injection of 0.15 mg/kg mivacurium chloride (50  $\mu$ l); (C) drug-free plasma spiked with 62.5 ng/ml of each isomers (150  $\mu$ l); and (D) drug-free plasma spiked with 82.88 and 32.88 ng/ml of the trans and cis monoester metabolites respectively (100  $\mu$ l).  
Peaks : 1 = monoester trans; 2 = monoester cis;  
3 = mivacurium trans-trans; 4 = mivacurium cis-trans;  
5 = mivacurium cis-cis; 6 = internal standard (I.S.).
- Figure 3. HPLC chromatograms for : (A) plasma sample collected from a patient before the injection of mivacurium and (B) shortly after an I.V. bolus injection of 0.15 mg/kg mivacurium chloride; and (C) drug-free plasma spiked with 500 ng/ml of alcohol metabolites.  
Peaks : 1 = laudanosine (I.S.); 2 = alcohol cis;  
3 = alcohol trans.
- Figure 4. Concentration-time curves for (A) mivacurium isomers; (B) monoester metabolites; and (C) alcohol metabolites in human plasma following the intravenous injection of 0.15 mg/kg mivacurium chloride in one anesthetized patient.

**CHAPITRE 3 - PROTOCOLE EXPERIMENTAL**

PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS OF MIVACURIUM  
ISOMERS AND THEIR METABOLITES IN HEALTHY VOLUNTEERS  
FOLLOWING AN IV BOLUS ADMINISTRATION

M. Lacroix<sup>1</sup>, F. Donati<sup>2</sup>, and F. Varin<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Faculté de Pharmacie,  
Université de Montréal  
Montréal, Québec

<sup>2</sup>Department of Anaesthesia  
McGill University,  
Montréal, Québec

**Manuscrit accepté pour publication dans Anesthesiology**

## ABSTRACT

*Background* : The objectives of the present study were threefold : to determine the pharmacokinetics of mivacurium isomers in healthy patients following an IV bolus administration using an intensive arterial blood sampling approach, to evaluate the importance of this blood sampling schedule on mivacurium pharmacokinetic parameter estimation, and finally to characterize the formation and elimination of mivacurium metabolites in human plasma.

*Methods* : Eight healthy patients (ASA I or II), scheduled to undergo low- to moderate- risk elective surgery under thiopental / nitrous oxide / oxygen / fentanyl anesthesia, participated in this study. The ulnar nerve was stimulated at 0.1 Hz, and the force of contraction of the adductor pollicis was measured. Each patient received 0.15 mg/kg mivacurium chloride as an IV bolus. Arterial blood samples were then collected every 10 seconds during the first 2 min. (n=12) and at frequent intervals during the subsequent 4 hours (n=16). Plasma levels of mivacurium isomers and their metabolites were determined by two stereoselective HPLC methods coupled with fluorometric detection. Non-compartmental pharmacokinetic parameters were derived for mivacurium isomers and their metabolites.

*Results* : Using the intensive sampling approach, the elimination half-lives of the trans-trans, cis-trans and cis-cis isomers were found to be (mean  $\pm$  SEM)  $2.4 \pm 0.2$ ,  $2.0 \pm 0.2$  and  $28.5 \pm 2.7$  min respectively with corresponding plasma clearances of  $29.2 \pm 2.9$ ,  $45.7 \pm 4.4$  and  $6.7 \pm 0.4$  ml\*min<sup>-1</sup>\*kg<sup>-1</sup>. The volumes of distribution at steady state of the trans-trans, cis-trans and cis-cis isomers were respectively  $0.047 \pm 0.003$ ,  $0.054 \pm 0.004$  and  $0.189 \pm 0.013$  L/kg. The area

under the curve (AUC) for the trans-trans and cis-trans isomers between 0 and 2 min accounted for 75 and 86 %, respectively, of the total AUC. Neglecting this portion by using limited sampling at 1 and 2 min only, led to an appreciable overestimation of MRT, Cl, and Vdss. Rapid hydrolysis of the isomers gave rise to the formation of monoester and alcohol metabolites, which peaked 25 sec (median) following mivacurium injection. The metabolites behaved similarly with half-lives in the range of 90 min, with the exception of the cis alcohol which was only negligibly ( $C_{max} = 140 \pm 9$  ng/ml) and transiently ( $t_{1/2} = 1.6 \pm 0.4$  min) formed.

*Conclusions* : In the determination of the pharmacokinetics of mivacurium, a rapidly eliminated drug, the intensive sampling method proved to be critical.

(Key words : blood sampling schedule, mivacurium isomers, mivacurium metabolites, pharmacokinetics)

## INTRODUCTION

Mivacurium chloride is a new short-acting nondepolarizing neuromuscular blocking agent member of the benzyliisoquinolinium family (fig. 1). It consists of a mixture of 3 stereoisomers : the two most active and equipotent are the trans-trans and cis-trans isomers (57% and 36% w/w, respectively) whereas the cis-cis isomer (6% w/w) has only one tenth the activity of the others in cats and monkeys<sup>1,2</sup>

Rapid hydrolysis of the trans-trans and cis-trans isomers by plasma cholinesterases explains the short half-lives of these active isomers and the short clinical duration of action of mivacurium chloride<sup>3,4</sup>. Renal excretion appears to be a minor elimination pathway; approximately 7% of an administered dose of mivacurium is recovered unchanged in human urine<sup>4</sup>. Hydrolysis of mivacurium by plasma cholinesterases produces two types of metabolites, namely the quaternary amino alcohols (cis and trans) and quaternary monoesters (cis and trans), which account respectively for 44 and 46% of the dose in urine<sup>4</sup>. These metabolites are however unlikely to be active since after a 5.5 hour infusion the recovery time from neuromuscular block remained unchanged<sup>5</sup>.

The lack of a stereoselective analytical method has limited the availability of pharmacokinetic data for mivacurium isomers, and to our knowledge no data have yet been published with respect to their metabolites. A stereoselective high-performance liquid chromatographic assay with fluorometric detection for mivacurium isomers in human plasma has been recently reported<sup>6</sup> and was used in a pharmacokinetic study by Lien et al<sup>3</sup> to determine the pharmacokinetic and

pharmacodynamic parameters of mivacurium isomers after a 2 step infusion. A subsequent study by Head-Rapson et al<sup>7</sup> reported the pharmacokinetic parameters of mivacurium isomers in healthy and cirrhotic patients following a 10 min infusion. These results represent the only pharmacokinetic data available for mivacurium isomers.

The present study was undertaken to describe the pharmacokinetics of mivacurium isomers as it is used clinically, that is following an IV bolus injection. In order to adequately describe the early concentration-time curve of mivacurium isomers and the rapid formation of their metabolites, frequent blood sampling during the first 2 minutes post-injection was performed. This study also attempts to evaluate the importance of this intensive blood sampling approach, which has been successfully employed in our laboratory for vecuronium and atracurium pharmacokinetic studies<sup>8,9</sup>, on the noncompartmental pharmacokinetic parameters of mivacurium isomers. Finally, this study investigates the formation and elimination of mivacurium metabolites.

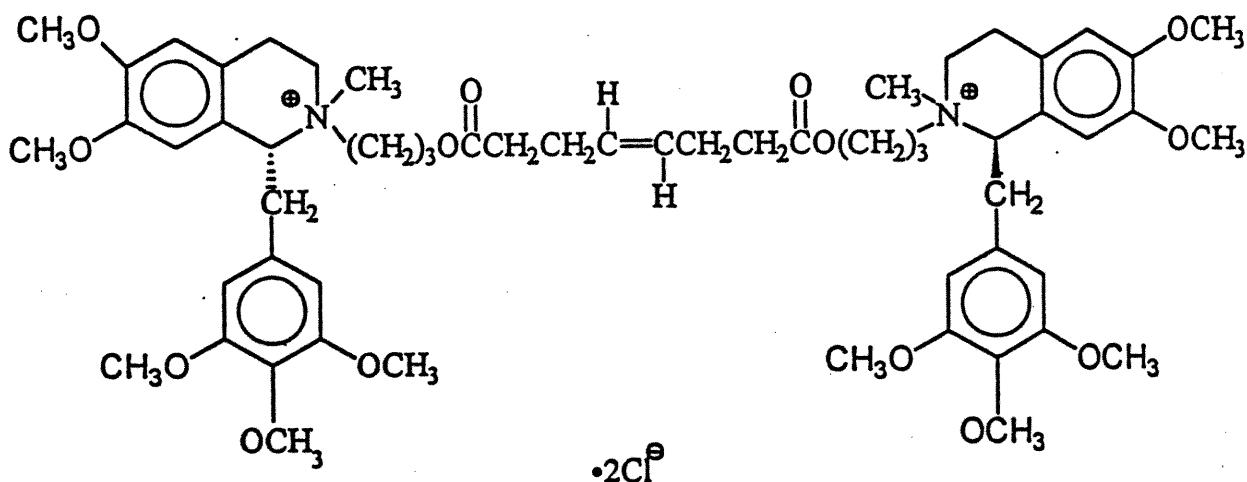


Figure 1. Chemical structure of mivacurium chloride

## METHODS AND MATERIALS

### *Patients*

The study protocol was approved by the Royal Victoria Hospital Ethics Committee and all participating patients gave written informed consent prior to entry in the study. Eight healthy adult patients, 18 to 40 years of age, classified ASA I or II, scheduled to undergo low- to moderate-risk elective surgery where the insertion of an arterial cannula was indicated, participated in this study (table 1). Patients showing any evidence of clinically significant psychiatric, neurological, neuromuscular, pulmonary or cardiovascular disease as well as any clinically significant impairment of hepatic or renal function were excluded. Similarly, subjects taking medications known or suspected to affect neuromuscular function were excluded from the study.

### *Anesthesia*

Patients were premedicated, if necessary, with either lorazepam (0.05 mg/kg intramuscular), diazepam (0.1 - 0.2 mg/kg oral) or midazolam (0.02 - 0.10 mg/kg intramuscular or intravenous). The radial artery was cannulated using local anesthesia before induction of general anesthesia. Blood pressure, heart rate, ECG, body temperature and end-tidal CO<sub>2</sub> were monitored continuously. General anesthesia was induced with thiopental 2 to 10 mg/kg and fentanyl 0.5 to 10 µg/kg administered intravenously. Additional doses of fentanyl or thiopental were given as needed to maintain adequate level of anesthesia. Isoflurane (0.5 - 1.0 % end tidal) was added after recovery from neuromuscular blockade. Patients were closely observed for signs of histamine release or other adverse experiences.



### *Neuromuscular monitoring*

The arm which did not have the arterial cannula was positioned, secured and used for neuromuscular function monitoring. The ulnar nerve was stimulated in single supramaximal twitches (0.2 msec at 0.1 Hz) via two surface electrodes. The resultant force of contraction of the adductor pollicis was measured using a force transducer (Grass FT-10, Grass Instrument Co., Quincy, Mass.), and the transducer output was recorded on a polygraph. After stabilization of anesthesia, each patient received an intravenous bolus dose of 0.15 mg/kg of mivacurium chloride (Mivacron®, Burroughs Wellcome). Tracheal intubation was performed when maximum blockade was obtained and mechanical ventilation was instituted. If and when additional muscle relaxation was needed, either vecuronium or pancuronium, neither of which would interfere with the assay, was administered. Neuromuscular block reversal was not routinely done in this study. However, if deemed necessary, reversal could be attempted with a mixture of edrophonium (0.25 - 1.00 mg/kg) and atropine (0.005 - 0.02 mg/kg).

### *Sampling*

Arterial blood samples were collected in heparinized Vacutainer tubes containing 0.1 mg of Echothiophate Iodide (a plasma cholinesterase inhibitor) via a 20-gauge cannula inserted in the radial artery of the arm not involved with neuromuscular measurements. The cannula was connected to a 3-way stopcock via a small extension tubing and dead space was minimized to 0.6 ml. The blood flow out of the cannula was approximately 3 ml every 10 sec at normal arterial pressure. The first arterial sample (5 ml) was collected prior to the administration of mivacurium chloride. Immediately following the injection of mivacurium, the stopcock was opened and blood was allowed to flow freely into twelve Vacutainer tubes during the first two minutes. Tubes were changed every

10 sec and the time assigned to these samples was the midpoint of the 10 sec interval over which the sample was drawn. Samples (3 ml) were then collected regularly at 3, 4, 5, 7, 10, 12, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180 and 240 min. Blood samples were kept on ice, centrifuged at 1600 g for 5 min, and the plasma collected was frozen in dry ice and stored at -20 °C until HPLC analysis.

#### *Mivacurium assay*

Plasma concentrations of mivacurium isomers and their metabolites were measured by use of two specific high-performance liquid chromatographic assays coupled with fluorometric detection developed in our laboratory<sup>10</sup>. A novel solid-phase extraction procedure allowed good recovery of mivacurium isomers (mean 98%) and their monoester metabolites (mean 83%), whereas the alcohol metabolites were analysed after direct precipitation of plasma proteins. For mivacurium isomers and their metabolites, these two assays proved to be sensitive (LOQ : 3.9 - 15.6 ng/ml), reproducible (CV  $\leq$  15%), accurate (>94%) and linear for concentrations in the therapeutic ranges. For concentrations greater than the standard curves upper limits, samples were diluted with blank plasma prior to plasma extraction.

#### *Pharmacokinetic analysis*

Two sets of pharmacokinetic parameters for mivacurium isomers were derived for each patient : one included all 12 blood samples collected over the first 2 min (intensive blood sampling) whereas one included only the 1- and 2- min samples (limited blood sampling). Noncompartmental pharmacokinetic analysis was performed for mivacurium isomers as well as for their monoester and alcohol metabolites. The plasma area under the curve concentration-time curve (AUC) and the area under the first moment curve (AUMC) were calculated according to

the trapezoidal rule<sup>11</sup> for mivacurium isomers and their metabolites. The elimination rate constant ( $k_{el}$ ) was obtained from linear regression through the last 4-5 data points. Subsequently, the elimination half-lives of mivacurium isomers and their metabolites were derived from the equation  $t_{1/2} = 0.693 / k_{el}$ . The mean residence time (MRT), which represents the time needed to eliminate 63.2% of the dose, was obtained for mivacurium isomers and their metabolites from the ratio  $AUMC / AUC$ . The plasma clearance (Cl) of each mivacurium isomer was obtained from dividing the dose administered by the AUC; this could not be done for mivacurium metabolites since urine measurements were not performed. The dose of each isomer administered was calculated by using the percentage of each isomer present in the mixture as described in the published product monograph. The actual relative proportions of each isomers present in the administered product were calculated and found to be in accordance with the published data with percentages of (mean  $\pm$  SD)  $59.8 \pm 0.3$ ,  $34.8 \pm 0.3$  and  $5.4 \pm 0.3$  % for the trans-trans, cis-trans and cis-cis isomer respectively. The volume of distribution at steady state ( $V_{dss}$ ) was derived from the product of MRT and Cl and the volume of distribution by area ( $V_{d\beta}$ ) was determined by dividing Cl by  $k_{el}$ . Also noted for mivacurium isomers and their metabolites were the maximum plasma concentration ( $C_{max}$ ) and the time from administration of mivacurium chloride to  $C_{max}$  ( $t_{max}$ ).

### *Statistical Analysis*

Results are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). The pharmacokinetic parameters derived from intensive blood sampling were compared to those obtained after limited blood sampling (1- and 2- min), which constitutes the more traditional approach. Since each patient was his/her own

control, pharmacokinetic parameters were compared using Student's t-test for paired data, with a level of statistical significance  $\alpha$  of 0.05.

## RESULTS

### *Intensive blood sampling pharmacokinetics*

Demographic data of the study population are shown in table 1 and pharmacodynamic data are summarized in table 2. The plasma concentration-time curves for all three mivacurium isomers are shown in fig. 2. Following the IV bolus administration of 0.15 mg/kg mivacurium chloride, maximal arterial concentrations ( $C_{max}$ ) of  $4486 \pm 403$ ,  $2198 \pm 208$  and  $504 \pm 40$  ng/ml for the trans-trans, cis-trans and cis-cis isomers respectively were observed after 25 sec ( $n=6$ ) and 35 sec ( $n=2$ ) ( $T_{max}$ ) (fig. 2). Plasma concentrations of the trans-trans and cis-trans isomers declined rapidly and were not detectable in plasma 10-20 minutes following injection. However, plasma levels of the cis-cis isomer decreased more slowly and could still be detected 45 min post-injection in 7 patients (mean 7.5 ng/ml).

The noncompartmental pharmacokinetic parameters of mivacurium isomers after intensive arterial sampling are summarized in table 3A. The trans-trans and cis-trans isomers behaved similarly with short half-lives less than 2.5 min and very rapid plasma clearances. Both isomers also demonstrated small volumes of distribution ( $V_{dss}$  and  $V_{d\beta}$ ) consistent with an extracellular distribution of this large ionized molecule. In contrast, a much slower plasma clearance and a longer half-life were found for the cis-cis isomer, as well as slightly larger volumes of distribution.

Table 1. Patient Characteristics :

Characteristics	Result*
Sex (M / F)	
M	6
F	2
Age (yr)	33 ± 2
Weight (kg)	70 ± 6
ASA Physical Status	
I	4
II	4
Surgical procedure	Low anterior resection Mandibular osteotomy Park's Pouch (4) T12 / L1 fusion L1 / L2 fusion

\* Results are presented as mean ± SEM

Table 2. Mivacurium pharmacodynamics.

---

Maximum block (%)	95 ± 2
Onset to :	
Maximum block (min)	5.6 ± 0.4
Recovery until :	
25 % baseline (min)	14.0 ± 1.5
50 % baseline (min)	17.3 ± 1.7
75 % baseline (min)	20.8 ± 2.1

---

Results are presented as mean ± SEM

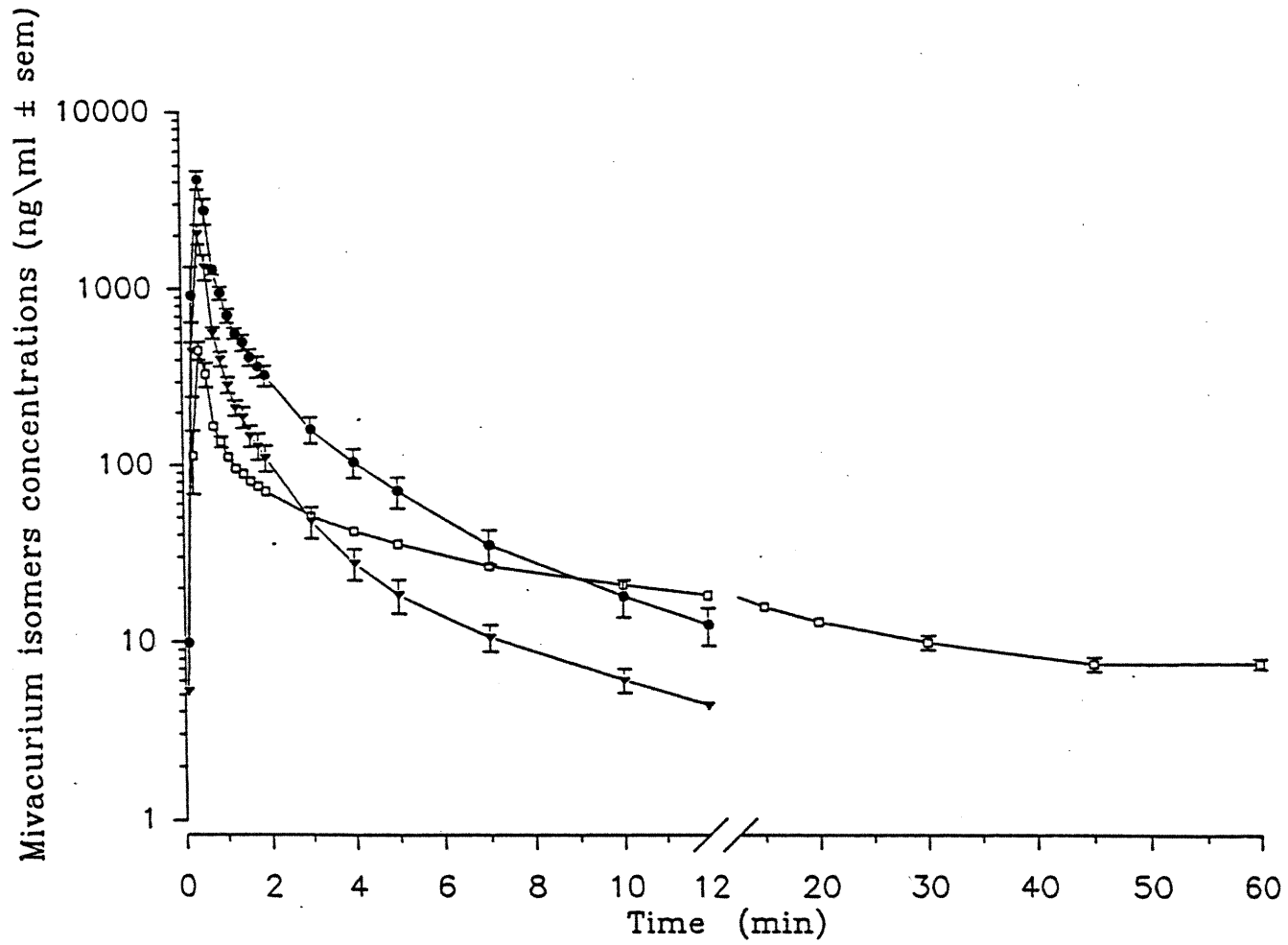


Figure 2. Concentration-time curves for mivacurium isomers

### *Intensive versus limited sampling pharmacokinetics*

The peak arterial concentrations mentioned above could not be detected by standard limited blood sampling scheduled at 1 and 2 min postdose. Mean peak arterial concentrations for mivacurium trans-trans, cis-trans and cis-cis after limited sampling corresponded to  $950 \pm 78$ ,  $405 \pm 39$  and  $137 \pm 10$  ng/ml, which were significantly lower ( $p < 0.05$ ) than those obtained with intensive sampling. Using the limited sampling data, the AUC covering the first 2 min (AUC<sub>0-2</sub>) was decreased by 51, 55 and 42% for the trans-trans, cis-trans and cis-cis isomers respectively, as compared with the intensive sampling results (table 3B). This led to an important underestimation of the AUC<sub>0-inf</sub> which was decreased by 38 and 45% for the trans-trans and cis-trans isomers and by 10.5% for the cis-cis isomer. Consequently, an important overestimation of the pharmacokinetic parameters (MRT, Cl, V<sub>dss</sub> and V<sub>dβ</sub>) was observed for the trans-trans and cis-trans isomers as summarized in table 3B. For the trans-trans isomer, the MRT was increased by 47%, the Cl by 66%, the V<sub>dss</sub> by 134% and the V<sub>dβ</sub> by 60%. In the case of the cis-trans isomer, the MRT was increased by 66%, the Cl by 90%, the V<sub>dss</sub> by 215% and the V<sub>dβ</sub> by 92%. Although significant, the effect of limited sampling was less pronounced on the pharmacokinetic parameters of the more slowly eliminated cis-cis isomer, where the MRT was overestimated by 10%, the Cl by 10%, the V<sub>dss</sub> by 22% and the V<sub>dβ</sub> by 7%.

### *Pharmacokinetic parameters of mivacurium metabolites*

Rapid hydrolysis of the trans-trans and cis-trans isomers gave rise to the formation of monoester and alcohol metabolites (fig. 3). Mean C<sub>max</sub> of  $140 \pm 9$  ng/ml and  $1027 \pm 121$  ng/ml were noted for the cis and trans alcohols respectively at 15 seconds (n=1), 25 sec (n=6) and 35 sec (n=1), whereas mean C<sub>max</sub> of  $658 \pm 95$  ng/ml and  $624 \pm 85$  ng/ml were observed at 25 seconds (n=5)



and 35 sec (n=3) for the cis and trans monoesters respectively. These metabolites were subsequently slowly eliminated; one exception being the cis alcohol which was only negligibly and transiently present, with a half-life less than 2 min (table 4). The trans alcohol, cis monoester and trans monoester behaved similarly with half-lives around 90 min.

## DISCUSSION

Using an intensive arterial sampling method, we have derived the pharmacokinetic parameters of mivacurium following an IV bolus administration. With a drug such as mivacurium which is eliminated very rapidly, intensive sampling becomes essential since the early part of the curve (AUC<sub>0-2min</sub>) contributes to a great extent to the total AUC.

This study was undertaken to characterize the pharmacokinetic of mivacurium isomers as it is used clinically, namely following an IV bolus injection. In order to properly describe the early time profile of each individual mivacurium isomers, an intensive sampling procedure was used. A similar methodology, which was used in our laboratory to characterize the pharmacokinetic and pharmacodynamic of vecuronium<sup>8</sup>, showed that plasma concentrations of vecuronium measured between 25 and 35 seconds after injection were critical for an adequate noncompartmental pharmacokinetic - pharmacodynamic modelling. Ignoring these early concentration points led to an overestimation of vecuronium pharmacokinetic parameters and to a significant delay in the pharmacodynamic parameter, keo. Similar findings were subsequently reported

Table 3. Pharmacokinetic parameters of Mivacurium isomers following (A) intensive blood sampling and (B) limited sampling.

	AUC0-2min (ng·min·ml <sup>-1</sup> )	AUC0-t (ng·min·ml <sup>-1</sup> )	AUC0-inf (ng·min·ml <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (min)	MRT (min)	CI (ml·min <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup> )	Vdss (L/kg)	Vdβ (L/kg)
<b>A)</b>								
Mivacurium tt	2193 ± 163	2908 ± 289	2932 ± 290	2.4 ± 0.2	1.7 ± 0.2	29.2 ± 2.9	0.047 ± 0.003	0.10 ± 0.01
Mivacurium ct	996 ± 80	1159 ± 112	1178 ± 112	2.0 ± 0.2	1.2 ± 0.1	45.7 ± 4.4	0.054 ± 0.004	0.13 ± 0.02
Mivacurium cc	288 ± 12	1024 ± 73	1295 ± 82	28.5 ± 2.7	29.6 ± 3.4	6.7 ± 0.4	0.189 ± 0.013	0.27 ± 0.01
<b>B)</b>								
Mivacurium tt	1075 ± 89	1790 ± 216	1813 ± 218	2.4 ± 0.2	2.5 ± 0.2	48.6 ± 5.6	0.11 ± 0.08	0.16 ± 0.01
Mivacurium ct	444 ± 80	627 ± 80	646 ± 80	2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.1	86.7 ± 10.8	0.17 ± 0.02	0.25 ± 0.03
Mivacurium cc	166 ± 9	903 ± 75	1174 ± 83	28.5 ± 2.7	32.6 ± 3.6	7.4 ± 0.5	0.23 ± 0.01	0.29 ± 0.02

Results are presented as mean ± SEM.

Comparison between intensive and limited sampling data yielded statistical significance ( $p < 0.05$ ) for all parameters

Table 4. Pharmacokinetic parameters of mivacurium metabolites

	AUC0-t (ng·min·ml <sup>-1</sup> )	AUC0-inf (ng·min·ml <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (min)	MRT (min)	C <sub>max</sub> (ng/ml)	t <sub>max</sub> (min)
Alcohol cis	117 ± 24	154 ± 32	1.6 ± 0.4	2.3 ± 0.6	140 ± 9	0.40 ± 0.05
Alcohol trans <sup>1</sup>	14164 ± 1747	17564 ± 2480	103.1 ± 12.3	112.1 ± 16.4	1027 ± 121	0.39 ± 0.06
Ester cis	14743 ± 1287	17939 ± 1858	100.4 ± 5.1	120.8 ± 6.5	658.4 ± 95.4	0.48 ± 0.03
Ester trans	12449 ± 1056	15589 ± 1610	86.3 ± 7.3	102.4 ± 9.5	624.8 ± 85.1	0.48 ± 0.03

Results are presented as mean ± SEM

<sup>1</sup>(n = 7 patients)

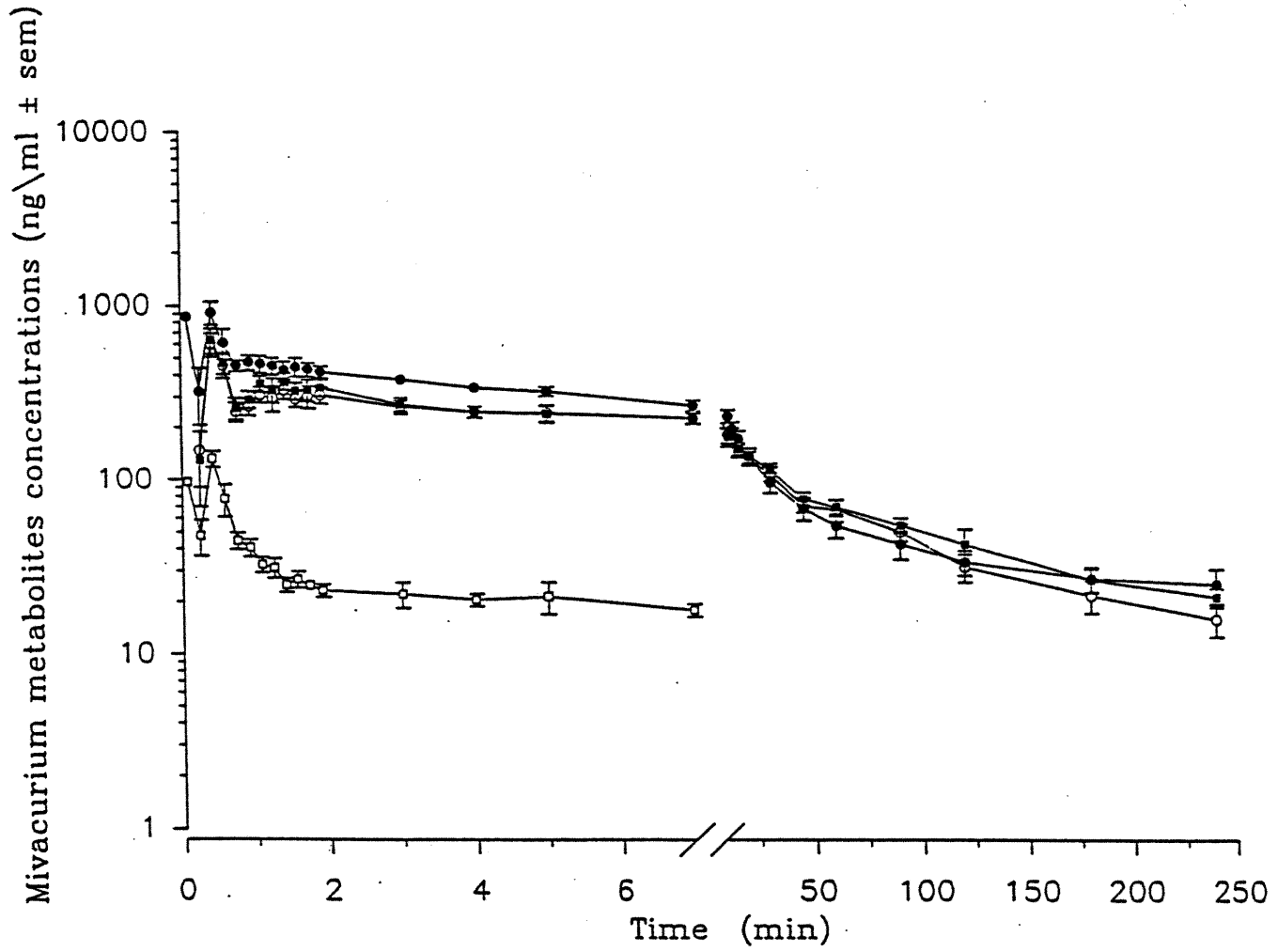


Figure 3. Concentration-time curves for mivacurium metabolites

when this approach was used to determine the pharmacokinetic - pharmacodynamic modelling of atracurium after the administration of 2 bolus doses of 0.5 mg/kg given 1 hour apart<sup>9</sup>. In addition, because arterial blood concentrations have been found to be more representative of what is actually delivered to the neuromuscular junction, especially after an intravenous bolus when the arteriovenous difference is significant<sup>12-14</sup>, we chose to use this sampling site.

Because of the particular features of the concentration-time curves (fig. 2) obtained following intensive sampling, no traditional compartmental intravenous model could be used to properly describe them. The early ascending phase and the initially very high concentrations ( $C_{max}$ ) could not be fitted to a multi-exponential absorption model. Consequently a noncompartmental approach, which allowed the inclusion of every plasma concentration points without any prior assumption about the pharmacokinetic model, was used to describe the pharmacokinetic of mivacurium isomers.

The lack of availability of stereoselective assays for the determination of mivacurium isomers in human plasma has limited the information on the selective pharmacokinetic of this new drug. However Brown et al.<sup>6</sup> recently reported on such a stereoselective method which was subsequently used in a study by Lien et al.<sup>3</sup> to describe the pharmacokinetic parameters of mivacurium isomers using venous blood measurements and a two-step infusion. The analytical method used could not quantitate mivacurium metabolites as these were eliminated in the washing step of the extraction procedure. Also using a stereoselective HPLC method, Head-Rapson et al. derived the pharmacokinetic of mivacurium isomers following a 10 min infusion<sup>7</sup>. In the present study, two

stereoselective assays, developed in our laboratory to determine the plasma concentration - time profiles of mivacurium isomers and their metabolites in human plasma, were used<sup>13</sup>.

Although slightly lower, the pharmacokinetic parameters (Cl, Vd<sub>ss</sub>, Vd<sub>β</sub>) of the trans-trans and cis-trans isomers derived from limited blood sampling (table 3B) are in agreement with those presented in previous studies involving mivacurium infusion<sup>3,7</sup>. Indeed, the results presented in this paper for both isomers are approximately 10-25% lower than those previously published; one exception being the Vd<sub>ss</sub> of the trans-trans isomer which appears 45% smaller than the one reported by Head-Rapson et al.<sup>7</sup>. Although the volumes of distribution of the cis-cis isomer obtained from limited sampling are consistent with those previously published, the plasma clearance of this isomer is approximately 50% faster than what has been reported previously; this in part explained the shorter half-life (by 45 %) observed in this study for the cis-cis isomer. The half-lives of the trans-trans and cis-trans isomers, which are independent of the sampling method, are slightly higher than the results reported earlier<sup>3,7</sup> with values surrounding 2.2 min.

The pharmacokinetic parameters of the trans-trans and cis-trans isomers derived from intensive sampling, differ significantly, however, from the results previously published<sup>3,7</sup>. Plasma clearances for both isomers are slower by 50% and the volumes of distribution are smaller by 40 to 75%. Similarly, the volume of distribution of the cis-cis isomer is approximately 25% smaller. Interestingly, the plasma clearance of the cis-cis isomer derived from intensive sampling correlates slightly better with previous published data, with differences of

approximately 38% as opposed to the 50% difference mentioned above with limited sampling.

The early pharmacokinetic events following a bolus dose which are characterized by a short period with no detectable drug in plasma (5-10 sec) followed by a sharp increase, are probably governed by circulatory factors. With a rapidly eliminated drug, such as mivacurium, intensive sampling is critical. Indeed, for the trans-trans and cis-trans isomers respectively, the AUC between 0 and 2 min represents 75 and 86% of the AUC<sub>0-inf</sub>; while the AUC<sub>0-2 min</sub> for the cis-cis isomer, which is more slowly eliminated, only constitutes 22% of the total AUC. Thus by limiting sampling to 1 and 2 min post-dose, an important portion of the total AUC is missed for the trans-trans and cis-trans isomers which leads to an important underestimation of the total AUC and subsequently to an important overestimation of the plasma clearances and volumes of distributions, which, as stated earlier, in closer agreement to previously published data. Understandably, this effect is less pronounced with the cis-cis isomer.

The importance of the AUC between 0 and 2 min for the trans-trans and cis-trans isomers also explains why the MRT (AUMC/AUC) was found to be less than the  $t_{1/2}$ . In the present study, elimination of the active isomers took place as their distribution was not yet completed. This situation, where the absorption process was slower than the elimination, led to a bias in the determination of the isomers half-lives. Consequently, although the MRT is shorter than the corresponding half-life, it is a more robust and exact measure of what is actually happening. Moreover, the MRT values for the trans-trans, cis-trans and cis-cis isomers derived from intensive sampling closely resemble the *in vitro* half-lives previously reported (1.8, 1.4 and 22 min respectively)<sup>15</sup>. The similarities observed between

the *in vitro* and our *in vivo* values further support the importance and predominance of the plasmatic metabolism of these isomers. This correlation between *in vitro* and *in vivo* results can also be seen with atracurium which similarly undergoes enzymatic degradation in plasma (Varin F., unpublished results).

It has been shown that peripheral venous concentrations, which were used to derive mivacurium concentrations in both previous studies<sup>3,7</sup>, are known to be markedly lower than corresponding arterial concentrations<sup>12-14</sup>, and that arterial concentrations are in fact much more representative of what is actually delivered to the neuromuscular junction. Thus, by using venous measurements, one could expect to obtain lower AUC and subsequently larger Cl and Vd as was the case when limited blood sampling was used. Consequently, the differences observed between the pharmacokinetic parameters presented in this study and those presented by Lien et al.<sup>3</sup> and Head-Rapson et al.<sup>7</sup> can be explained by the different sampling site and sampling frequency which were used, as well as with the different drug administration techniques (bolus vs infusion).

Mivacurium isomers are believed to be hydrolysed by plasma cholinesterases to monoester and alcohol metabolites<sup>5</sup>. All three isomers are not metabolized to the same extent, the cis-cis isomer being much more slowly metabolised as seen by its longer half-life. The C<sub>max</sub> of metabolites is generally reached soon after injection, within 35 sec, reemphasizing the very rapid hydrolysis of the parent compound. However, the actual pathway of metabolite formation remains to be elucidated, and this study offers the first insights as to how this may be happening. Surprisingly, the cis alcohol is minimally and transiently detected



compared with the other three metabolites which show higher AUC and slower half-lives in the range of 90 min.

#### CONCLUSION :

This study represents the first attempt to characterize the pharmacokinetic parameters of mivacurium isomers after an IV bolus injection, using an intensive arterial blood sampling approach. Moreover, it offers interesting insight into the formation and elimination of mivacurium metabolites.

## REFERENCES

1. Maehr RB, Belmont MR, Wray DL, Savarese JJ, Wastilla WB. Autonomic and neuromuscular effects of Mivacurium and isomers in cats [Abstract] : *Anesthesiology* 77 : A772, 1991.
2. Belmont MR, Beemer G, Bownes P, Russo J, Wisowaty J, Savarese JJ : Comparative pharmacology of Mivacurium and isomers in rhesus monkeys [Abstract]. *Anesth Analg* 76 : S18, 1993.
3. Lien CA, Schmith VD, Embree PB, Belmont MR, Wargin WA, Savarese JJ: The pharmacokinetics and pharmacodynamics of the stereoisomers of Mivacurium in patients receiving nitrous oxide / opioid / barbiturate anesthesia. *Anesthesiology* 80 : 1296-1302, 1994.
4. Cook DR, Freeman JA, Lai AA, Kang Y, Stiller RL, Aggarwal S, Harrelson JC, Welch RM, Samara B: Pharmacokinetics of Mivacurium in normal patients and in those with hepatic or renal failure. *Br J Anaesth* 69 : 580-585, 1992.
5. Savarese JJ, Ali HH, Basta SJ, Embree PB, Scott RPF, Sunder N, Weakly JN, Wastilla WB, El-Sayad HA: The Clinical Neuromuscular Pharmacology of Mivacurium Chloride. *Anesthesiology* 68 : 723-732, 1988.

6. Brown AR, James CD, Welch RM, Croft-Harrelson J: Stereoselective high-performance liquid chromatographic assay with fluorometric detection for the isomers of mivacurium in human plasma. *J Chromatogr Biomed Appl* 578 : 302-308, 1992.
7. Head-Rapson AG, Devlin JC, Parker CJR, Hunter JM : Pharmacokinetics of the three isomers of mivacurium and pharmacodynamics of the chiral mixture in hepatic cirrhosis. *Br J Anaesth* 73 : 613-618, 1994.
8. Ducharme J, Varin F, Bevan DR, Donati F: Importance of early blood sampling on Vecuronium pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. *Clin Pharmacokinet* 24 (6) : 507-518, 1993.
9. Ducharme J, Varin F, Donati F : Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of a second dose of atracurium in anaesthetised patients. *Clin Drug Invest* 9 (2) : 98-110, 1995.
10. Lacroix M, Tu T.M., Donati F, Varin F: High-performance liquid chromatographic assays with fluorometric detection for mivacurium isomers and their metabolites in human plasma. *J Chromatogr Biomed Appl* 663 : 297-307, 1995.
11. Gibaldi M. Perrier D. Pharmacokinetics. In *Drugs and the pharmaceutical sciences*, 2nd ed., Vol. 15, pp. 409-417, 445-449, Marcel Dekker Inc, New York, 1982.

12. Chiou WL: The phenomenon and rationale of marketed dependence of drug concentration on blood sampling site: implication in pharmacokinetics, pharmacodynamics, toxicology and therapeutics (Parts I and II). Clin Pharmacokinet 17 : 175-199, 277-290, 1989.
13. Donati F, Varin F, Ducharme J, Gill SS, Théorêt Y, Bevan DR: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of atracurium obtained with arterial and venous blood samples. Clin Pharmacol Ther 49 : 515-522, 1991.
14. Mastey V, Donati F, Varin F : Early pharmacokinetics of midazolam. Clin Drug Invest 9 (3) :131-140, 1995.
15. Burroughs Wellcome : Investigator's brochure




LEGENDS :

Fig 1. Chemical structure of mivacurium chloride

Fig 2. Concentration-time curves for mivacurium isomers : (●) mivacurium tt , (▼) mivacurium ct , (□) mivacurium cis-cis

Fig 3. Concentration-time curves for mivacurium monoester and alcohol metabolites : (●) alcohol trans , (□) alcohol cis , (■) ester cis , (○) ester trans



**CHAPITRE 4 - DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES**

## 1. Discussion générale

### 1.1 Détermination des isomères du mivacurium et ses métabolites dans le plasma par HPLC avec détection en fluorescence.

Plusieurs agents anesthésiants existent sous forme de mélange chiral. La détermination des paramètres pharmacocinétiques de ces agents présente certaines difficultés, surtout lorsque les différentes configurations de la molécule en question possèdent des propriétés biologiques différentes, telles qu'observées avec les isomères du mivacurium. L'étude de la pharmacocinétique des isomères du mivacurium fut longtemps limitée par l'absence d'une méthode de dosage stéréosélective. En effet, les premières méthodes analytiques utilisées étaient non stéréosélectives et ne dosaient que le mivacurium total (DeBros et al, 1987; Basta et al, 1989; Cook et al, 1992). Ce n'est que récemment qu'une méthode analytique stéréosélective pour les trois isomères du mivacurium fut développée (Brown et al, 1992). Cette méthode, bien que sensible et spécifique, nécessite toutefois deux étapes d'extraction et ne permet pas le dosage des métabolites du mivacurium; ces derniers étant éliminés au cours de l'extraction plasmatique.

Nous avons donc procédé, au cours de mes travaux de maîtrise, au développement de deux méthodes analytiques stéréosélectives; une pour le dosage des isomères du mivacurium (tt, ct et cc) et ses métabolites esters (cis et trans), l'autre pour la détermination des concentrations plasmatiques des métabolites alcools (cis et trans).

La première méthode de dosage développée offre une alternative pratique à l'extraction plasmatique en deux étapes décrite par Brown et al (1992). Les

isomères du mivacurium et ses métabolites subissent en effet une seule extraction plasmatique solide-liquide sur des colonnes Prep Sep C18; ces dernières ayant été utilisées avec succès dans l'extraction d'agents quaternaires tels le doxacurium (Gariépy et al, 1993). De plus, grâce à une modification de l'étape de lavage décrite par Brown et al (1992), cette méthode d'extraction permet la récupération des métabolites du mivacurium. Le lavage des cartouches C18 avec du méthanol résulta en l'élution d'environ 25% des métabolites. En remplaçant cette étape avec un lavage à l'eau, nous avons pu récupérer environ 83% des métabolites. Notre technique d'extraction plasmatique s'est avérée également très efficace pour les isomères tt, ct et cc, avec un coefficient d'extraction moyen de 98%; cette valeur étant largement supérieure à celle observée avec la méthode d'extraction en deux étapes de Brown et al, soit 55% en moyenne.

L'utilisation de la colonne chromatographique en phase inverse, RP-Select B C8, a permis la séparation des trois isomères du mivacurium (tt, ct et cc) et ses métabolites esters (cis et trans). Les métabolites alcools (cis et trans), bien qu'extraits au même titre que les métabolites esters sur les cartouches C18, ne pouvaient être séparés adéquatement sur la colonne C8. L'utilisation d'une colonne plus polaire, soit une Spherisorb C1, donna par contre une bonne résolution des métabolites alcools.

Pour des raisons pratiques et économiques, le fonctionnement de deux systèmes chromatographiques en parallèle (C8 et C1) ne fut pas possible. Par conséquent, étant donné la faible quantité de plasma disponible pour l'étude pharmacocinétique, nous avons mis au point une seconde technique "d'extraction" pour les métabolites alcools. Ceux-ci ont en effet été "extraits" du



plasma par simple précipitation des protéines plasmatiques; technique ayant été utilisée dans notre laboratoire pour l'atracurium (Varin et al, 1990). Malgré le facteur de dilution important (1:3) impliqué dans la précipitation des protéines, cette deuxième méthode analytique s'est avérée presque aussi sensible que la première avec une limite de détection de 15.6 ng/ml pour les métabolites alcools.

En résumé, les deux méthodes analytiques développées se sont avérées sensibles (limite de quantification 3.9-15.6 ng/ml), reproductibles (coefficient de variation < 15%) et précises (> 94%) aux concentrations thérapeutiques du mivacurium et ses métabolites. De plus, ces deux méthodes ont été utilisées avec succès dans une étude de pharmacocinétique des isomères du mivacurium suite à l'administration d'un bolus I.V. et ont permis de quantifier, pour la première fois dans le plasma humain, les deux métabolites du mivacurium.

## 1.2 Pharmacocinétique des isomères du mivacurium et ses métabolites suite à l'administration d'un bolus I.V.

Le protocole clinique fut entrepris afin de déterminer les paramètres pharmacocinétiques du mivacurium suite à l'administration d'un bolus I.V.; condition se rapprochant de la pratique clinique.

La détermination des paramètres pharmacocinétiques suite à l'injection d'un bolus I.V. dépend fortement de la portion initiale de la courbe des Cp en fonction du temps; période pendant laquelle les fluctuations des Cp sont maximales. Ceci prend encore plus d'importance avec un médicament rapidement éliminé,

tel le mivacurium, étant donné la contribution importante de la portion initiale de l'AUC sur l'AUC totale. Donc, afin de bien caractériser le profil initial de la courbe des Cp en fonction du temps immédiatement après l'administration d'un bolus I.V., on se doit de procéder à un échantillonnage fréquent et rapide.

Un échantillonnage complet, soit 12 échantillons au cours des 2 premières minutes suivant l'injection du bolus I.V. de mivacurium, fut utilisé. Egalement, un site de prélèvement artériel fut choisi afin d'obtenir des concentrations du mivacurium représentatives de celles présentes à la jonction neuromusculaire, surtout lors des premières secondes suivant l'administration du bolus I.V.; période où les différences artérioveineuses sont importantes (Mastey et al, 1995; Donati et al, 1991; Chiou, 1989) et pendant laquelle l'effet pharmacologique des BNMs s'installe. Les conditions expérimentales choisies diffèrent de celles utilisées dans les études pharmacocinétiques du mivacurium précédentes où les paramètres cinétiques furent déterminés suite à l'administration d'infusions continues avec échantillonnage veineux (Lien et al, 1994; Head-Rapson et al, 1994).

Afin d'évaluer l'impact de l'échantillonnage complet sur la description de la cinétique des isomères du mivacurium, deux ensembles de paramètres furent dérivés; un premier ensemble de paramètres déterminé à partir de tous les échantillons prélevés pendant les 2 minutes suivant l'administration du bolus I.V. (échantillonnage complet) et un deuxième ensemble ne tenant compte que des échantillons prélevés à 1 et 2 minutes post-injection (échantillonnage limité).

Aucun modèle compartimental traditionnel n'a pu être utilisé dans l'analyse pharmacocinétique du mivacurium étant donné la forme particulière des courbes

des Cp en fonction du temps obtenues suite à l'échantillonnage artériel complet. Par conséquent, une approche non compartimentale, permettant l'inclusion de toutes les données plasmatiques, fut utilisée. Bien que cette approche ne repose sur aucune pré-supposition concernant le modèle cinétique, elle dépend fortement de la qualité des données recueillies.

Les temps de demi-vie d'élimination ( $t_{1/2}$ ), dont la détermination est indépendante du site d'échantillonnage (Chiou, 1989), obtenus pour les isomères tt et ct (soit 2 min) sont consistants avec la courte durée d'action clinique du mivacurium et correspondent bien aux valeurs publiées antérieurement (Lien et al, 1994; Head-Rapson et al, 1994). Les autres paramètres cinétiques (MRT, CI,  $Vd_{ss}$ ,  $Vd_{\beta}$ ) pour les isomères tt et ct dérivés à partir de l'échantillonnage complet sont toutefois inférieurs de 40 à 75% aux résultats déjà publiés. Egalement, à l'exception des valeurs pour les volumes de distribution, les paramètres obtenus pour l'isomère cc diffèrent significativement de ceux préalablement publiés avec une clairance plasmatique (CI) deux fois plus rapide, et par conséquent un temps de demi-vie d'élimination ( $t_{1/2}$ ) deux fois plus court. Ce temps de demi-vie d'élimination de 29 min pour l'isomère cc correspond toutefois à celui obtenu *in vitro* (Burroughs Wellcome - Brochure de l'investigateur) et est consistant avec un métabolisme enzymatique plus lent.

A noter, les paramètres cinétiques obtenus (MRT, CI,  $Vd_{ss}$ ,  $Vd_{\beta}$ ) pour les isomères tt et ct suite à l'échantillonnage limité, bien que légèrement inférieurs de 10-25%, correspondent mieux à ceux obtenus précédemment lors d'infusions continues (Lien et al, 1994; Head-Rapson et al, 1994). Une exception étant le  $Vd_{ss}$  de l'isomère tt qui apparaît presque deux fois inférieur à celui déterminé par Head-Rapson et al (1994).

Les phénomènes pharmacocinétiques se produisant immédiatement après l'administration d'un bolus I.V., caractérisés par une période de 5-10 secondes où les Cp des médicaments ne sont pas quantifiables suivie d'une augmentation abrupte des Cp, sont probablement régis par des facteurs circulatoires. Avec un médicament rapidement éliminé, tel le mivacurium, un échantillonnage complet est critique pour une analyse pharmacocinétique adéquate. En effet, pour les isomères tt et ct, l' $AUC_{0-2}$  représenta 75 et 86% respectivement de l'AUC totale, alors que pour l'isomère cc, métabolisé plus lentement, l' $AUC_{0-2}$  ne constitua que 22% de l'AUC totale; cette dernière valeur se rapprochant de ce qui fut observé avec le vécuronium (Ducharme et al, 1993) et le midazolam (Mastey et al, 1995). L'omission des premières données plasmatiques en limitant l'échantillonnage à 1 et 2 min post-dose résulta premièrement en une représentation inexacte du profil initial des Cp du mivacurium en fonction du temps et deuxièmement en une sous-estimation importante de l'AUC totale; ce phénomène étant surtout marqué pour les isomères tt et ct. En effet, l'échantillonnage limité donna une sous-estimation de 51 et 55% de l' $AUC_{0-2}$  pour les isomères tt et ct respectivement avec comme conséquence une sous-estimation de 38 et 45% de l'AUC totale correspondante. Ceci résulta en une surestimation de 50 à 200% des paramètres cinétiques (MRT, CI,  $V_{d_{ss}}$ ). Bien que significatif, on observa une surestimation des paramètres cinétiques moins marquée avec l'isomère cc, soit de 9 à 20%, étant donné son élimination plus lente et la contribution moindre de l' $AUC_{0-2}$  sur l'AUC totale.

De la même façon, l'échantillonnage complet utilisé dans l'étude de PK-PD du vécuronium, démontra que les Cp de vécuronium mesurées entre 25 et 35 secondes post-I.V. bolus étaient critiques pour une modélisation PK-PD non compartimentale adéquate (Ducharme et al, 1993). En effet, l'omission des

premiers points plasmatiques suite à l'échantillonnage limité mena à une sous-estimation significative de l' $AUC_{0-2}$  (63%), avec une surestimation de 10 à 16% des paramètres cinétiques (MRT,  $V_{d_{ss}}$ , Cl) et en un délai dans le paramètre dynamique,  $K_{eo}$  (Ducharme et al, 1993). L'impact de l'échantillonnage complet fut moins marqué avec le midazolam où l' $AUC_{0-2}$  ne fut sous-estimé que de 17%. Par conséquent, les paramètres cinétiques (MRT,  $V_{d_{ss}}$ , Cl) déterminés à partir de l'échantillonnage complet et l'échantillonnage limité ne furent pas significativement différents (Mastey et al, 1995).

L'hydrolyse rapide des isomères du mivacurium par les cholinestérases plasmatiques donna lieu à la formation des métabolites esters et alcools. L'échantillonnage complet fut critique à une description adéquate de la formation des métabolites puisque ceux-ci atteignèrent leurs concentrations maximales 25 à 35 secondes suivant l'administration du bolus I.V. A l'exception de l'alcool cis, qui ne fut que très peu formé ( $C_{max}=140 \pm 9$  ng/ml) et rapidement éliminé ( $t_{1/2}=1.6 \pm 0.4$  min), les trois autres métabolites se comportèrent de la même façon avec des  $t_{1/2}$  d'élimination de l'ordre de 90 min.

## II. Conclusion générale

Les paramètres pharmacocinétiques dérivés au cours de ces travaux représentent les premières données cinétiques stéréosélectives des isomères du mivacurium obtenues suite à l'administration d'un bolus I.V. L'échantillonnage complet fut essentiel à une description détaillée des événements se produisant immédiatement suivant l'injection du bolus I.V. Cet échantillonnage artériel complet s'est révélé critique et nécessaire à l'analyse

non compartimentale exacte des paramètres pharmacocinétiques des isomères du mivacurium étant donné l'importante contribution de l' $AUC_{0-2}$ , pour les isomères actifs, sur l'AUC totale. L'omission des premiers prélèvements, en n'utilisant qu'un échantillonnage limité, résulta en une surestimation des paramètres cinétiques du mivacurium; ces valeurs correspondant toutefois mieux aux résultats déjà publiés.

Ces travaux ont permis également de fournir les premières informations concernant la formation et l'élimination des métabolites alcools et esters du mivacurium.

**BIBLIOGRAPHIE**

**BIBLIOGRAPHIE**

Aitkenhead AR et Smith G. Neuromuscular blockade. Dans: Textbook of Anaesthesia, 2nd edition, Aitkenhead AR et Smith G eds, Churchill Livingstone, Edimburg, 1990, 211-24.

Ali HH. Monitoring neuromuscular function. Seminars in Anesthesia 1989; VIII(2) : 158-68.

Ali HH et Savarese JJ. Neuromuscular blocking agents and antagonists. Dans: Practical Anesthetic Pharmacology, 2nd edition, Attia RR, Grogono AW et Domer FR eds, Appleton Century Crofts, Norwalk, Connecticut, 1987, p.79-105.

Ali HH, Savarese JJ, Embree PB, Basta SJ, Stout RG, Bottros LH et Weakly JN. Clinical pharmacology of mivacurium chloride (BW B10090U) infusion : comparison with vecuronium and atracurium. Br. J. Anaesth. 1988; 61: 541-6.

Ali HH et Savarese JJ. Monitoring of neuromuscular function. Anesthesiology 1976; 45: 216-49.

Anonyme. Monographie du Mivacurium (1994). Kirkland, Quebec : Burroughs Wellcome.

Anonyme. Brochure de l'investigateur du Mivacurium (1990). Kirkland, Quebec : Burroughs Wellcome.



Arden JR, Lynam DP, Castagnoli KP, Canfell PC, Cannon JC et Miller RD. Vecuronium in alcoholic liver disease: a pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis. Anesthesiology 1988; 68: 771-6.

Basta SJ, Dresner DL, Shaff LP, Lai AA et Welch R. Neuromuscular effects and pharmacokinetics of mivacurium in elderly patients under isoflurane anesthesia. [Abstract]. Anesth. Analg. 1989; 68: S18.

Belmont MR, Wray DL, Maehr RB, Savarese JJ et Wastila WB. Comparative pharmacology of mivacurium isomers in cats [Abstract] Anesthesiology 1991; 77: A773.

Belmont MR, Beemer G, Bownes P, Russo J, Wisowaty J et Savarese JJ. Comparative pharmacology of mivacurium and isomers in rhesus monkeys [Abstract] Anesth. Analg. 1993; 76: S18.

Bencini AF, Scaf AH, Sohn YJ, Kersten-Kleef UW et Agoston S. Hepatobiliary disposition of vecuronium bromide in man. Br. J. Anaesth. 1986, 58: 988-95.

Bevan DR, Bevan JC et Donati F. Pharmacokinetic principles. Dans: Muscle Relaxants in Clinical Anesthesia. Year Book Medical Publishers, Marshall DK ed., Chicago, 1988, p.100-23.

Brown AR, James CD, Welch RM et Croft-Harrelson J. Stereoselective high-performance liquid chromatographic assay with fluorometric detection for the isomers of mivacurium in human plasma. J. Chromatogr. 1992; 578: 302-8.

Caldwell JE, Heier T, Kitts JB, Lynam DP, Fahey MR et Miller RD. Comparison of the neuromuscular block induced by mivacurium, suxamethonium or atracurium during nitrous oxide-fentanyl anaesthesia. Br. J. Anaesth. 1989; 63: 393-9.

Caldwell JE, Canfell PC, Castagnoli KP, Lynam DP, Fahey MR, Fisher DM et Miller RD. The influence of renal failure on the pharmacokinetics and duration of action of pipecuronium bromide in patients anesthetized with halothane and nitrous oxide. Anesthesiology 1988; 70: 7-12

Chiou WL. The phenomenon and rationale of marked dependence of drug concentration on blood sampling site : implications in pharmacokinetics, pharmacodynamics, toxicology and therapeutics (parts I and II). Clin. Pharmacokinet. 1989; 17:175-99 & 275-90.

Chiou WL et Lam G. The significance of arterial-venous plasma concentration difference in clearance studies. Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol. 1982; 20: 197-203.

Choi WW, Metha MP, Murray DJ, Sokoll MD, Forbes RB, Gergis SD, Abou-Donia M et Kirchner J. Neuromuscular and cardiovascular effects of mivacurium chloride in surgical patients receiving nitrous oxide-narcotic or nitrous oxide-isoflurane anaesthesia. Can. J. Anaesth. 1989; 36: 641-50.

Cook DR, Stiller RL, Weakly JN, Chakravorti S, Brandom BW et Welch RM. In vitro metabolism of mivacurium chloride (BW B1090U) and succinylcholine. Anesth. Analg. 1989; 68: 452-6.

Cook DR, Freeman JA, Lai AA, Kang Y, Stiller RL, Aggarwal S, Harrelson JC, Welch RM et Samara B. Pharmacokinetics of Mivacurium in normal patients and those with hepatic or renal failure. Br. J. Anaesth. 1992; 69: 580-5.

Cook DR, Wingrad LB et Taylor FH. Pharmacokinetics of succinylcholine in infants, children and adults. Clin. Pharmacol. Ther. 1977, 20: 493-8.

Cook DR, Freeman JA, Lai AA, Robertson KA, Kang Y, Stiller RL, Aggarwal S, Abou-Donia MM et Welsh RM. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of doxacurium in normal patients and in those with hepatic or renal failure. Anesth. Analg. 1991; 72: 145-50

DeAngelis R, Loebbs P, Maehr RB, Savarese JJ et Welch RM. High-performance liquid chromatographic analysis of doxacurium, a new long-acting neuromuscular blocker. J. Chromatogr. 1990; 525: 389-400.

DeBros F, Basta SJ, Ali HH, Wargin W et Welch R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of BW B1090U in healthy surgical patients receiving N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub> isoflurane anaesthesia [Abstract]. Anesthesiology 1987; 67: A609.

Diefenbach C, Mellinghoff H, Lynch J et Buzello W. Mivacurium: dose-response relationship and administration by repeated injection or infusion. Anesth. Analg. 1992; 74: 420-3.

Donati F, Varin F, Ducharme J, Satwant GS, Théoret Y et Bevan DR. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of atracurium obtained with arterial and venous blood samples. Clin. Pharmacol. Ther. 1991; 49: 515-22.

Ducharme J, Varin F, Bevan DR et Donati F. Importance of early blood sampling on vecuronium pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. Clin. Pharmacokinet. 1993; 24: 507-18.

Ducharme J, Varin F et Donati F. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of a second dose of atracurium in anaesthetised patients. Clin. Drug. Invest. 1995; 9 (2): 98-110.

Dundee JW, Halliday NJ, Harper KW et Brogden RN. Midazolam: a review of its pharmacological properties and therapeutic use. Drugs 1984; 28: 519-43.

Durant NN et Katz RL. Suxamethonium. Br. J. Anaesth. 1982, 54: 195-208.

Fahey MR, Morris RB, Miller RD, Nguyen TL et Upton RA. Pharmacokinetics of ORG NC 45 (NORCURON) in patients with and without renal failure. Br. J. Anaesth. 1981; 53: 1049-53.

Fahey MR, Rupp SM, Fisher DM, Miller RD, Sharma M, Canfell C, Castagnoli K et Hennis PJ. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of atracurium in patients with and without renal failure. Anesthesiology 1984; 61: 699-702.

From RP, Pearson KS, Choi WW, Abou-Donia MM et Sokoll MD. Neuromuscular and cardiovascular effects of mivacurium chloride (BW B1090U) during nitrous oxide-fentanyl-thiopentone and nitrous oxide-halothane anaesthesia. Br. J. Anaesth. 1990; 64: 193-8.

Gariepy LP, Varin F, Donati F, Salib Y et Bevan DR. Influence of aging on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of doxacurium. Clin. Pharmacol. Ther. 1993; 53: 340-7.

Gibaldi M et Perrier D. Pharmacokinetics, 2nd rev. Ed., Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Vol 15, Marcel Dekker Inc, New York, 1982, p.409-17, 445-9.

Goldberg ME, Larijani GE, Azad SS, Sosis M, Seltzer JL, Ascher J et Weakly JN. Comparison of tracheal intubating conditions and neuromuscular blocking profiles after intubating doses of mivacurium chloride or succinylcholine in surgical outpatients. Anesth. Analg. 1989; 69: 93-9.

Head-Rapson AG, Devlin JC, Parker CJR et Hunter JM. Pharmacokinetics of the three isomers of mivacurium and pharmacodynamics of the chiral mixture in hepatic cirrhosis. Br. J. Anaesth. 1994; 73: 613-8.

Henthorn TK, Avram MJ et Krejcie TC. Intravascular mixing and drug distribution: the current disposition of thiopental and indocyanine green. Clin. Pharmacol. Ther. 1989; 45: 56-65.

Holst-Larsen H. The hydrolysis of suxamethonium in human blood. Br. J. Anaesth. 1976; 48: 887-92.

Kienlen J. Jonction neuromusculaire et mécanisme d'action des curares. Ann. Fr. Anesth. Réanim. 1984; 3: 116-28.

Lacroix M, Tu T.M., Donati F et Varin F. High-performance liquid chromatographic assays with fluorometric detection for mivacurium isomers and their metabolites in human plasma. J. Chromatogr. 1995; 663: 297-307.

Larijani GE, Gratz I, Silverberg M et Jacobi AG. Clinical pharmacology of the neuromuscular blocking agents. DICP Annals of Pharmacotherapy 1991; 25: 54-64.

Lien CA, Schmith VD, Embree PB, Belmont MR, Wargin WA et Savarese JJ. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of the stereoisomers of Mivacurium in patients receiving nitrous oxide / opioid / barbiturate anesthesia. Anesthesiology 1994; 80: 1296-1302.

Lynam DP, Cronnelly R, Castagnoli KP, Canfell PC, Caldwell J, Arder J et Miller RD. The pharmacodynamics and pharmacokinetics of vecuronium in patients anesthetized with isoflurane with normal renal function or with renal failure. Anesthesiology 1988; 69: 227-31.

Maehr RB, Belmont MR, Wray DL, Savarese JJ et Wastilla WB. Autonomic and neuromuscular effects of Mivacurium and isomers in cats [Abstract]. Anesthesiology 1991; 77: A772.

Mastey V, Donati F et Varin F. Early pharmacokinetics of midazolam: sampling site and schedule considerations. Clin. Drug Invest. 1995; 8: 131-40.

Mcleod K, Watson MJ et Rawlins MD. Pharmacokinetics of pancuronium in patients with normal and impaired renal function. Br. J. Anaesth. 1976; 48: 341-5.

Ostergaard D, Jensen FS, Jensen E, Skovgaard LT et Viby-Mogensen J. Influence of plasma cholinesterase activity on recovery from mivacurium-induced neuromuscular blockade in phenotypically normal patients. Acta Anaesthesiol. Scand. 1992; 36: 702-6.

Pearson KS, From RP, Choi WW, Abou-Donia M et Sokoll MD. Neuromuscular and cardiovascular effects of mivacurium chloride (BW B1090U) during nitrous oxide-narcotic, nitrous oxide-halothane and nitrous oxide-isoflurane anesthesia in surgical patients. Middle East J. of Anesthesiol. 1990; 10: 469-78.

Savarese JJ, Ali HH, Basta SJ, Embree PB, Scott RPF, Sunder N, Weakly JN, Wastilla WB et El-Sayad HA. The clinical neuromuscular pharmacology of mivacurium chloride. Anesthesiology 1988; 68: 723-32.

Savarese JJ, Miller RD, Lien CA et Caldwell JE. Pharmacology of muscle relaxants and their antagonists. Dans: Anesthesia. Miller RD ed., Churchill Livingston Inc, New York, 1994, p.417-87.

Shanks CA, Fragen RJ, Pemberton D, Katz JA et Risner ME. Mivacurium-induced neuromuscular blockade following single bolus doses and with continuous infusion during either balanced or enflurane anesthesia. Anesthesiology 1989, 71: 362-6.

Shanks CA, Avram MJ, Fragen RJ et O'Hara DA. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of vecuronium administered by bolus and infusion during halothane or balanced anesthesia. Clin. Pharmacol. Ther. 1987; 42: 459-64.

Sheiner LB, Stanski DR, Vozech S, Miller RD et Ham J. Simultaneous modeling of pharmacokinetics and pharmacodynamics: application to d-tubocurarine. Clin. Pharmacol. Ther. 1979; 25: 358-71.

Smith CE, Lewis G, Donati F et Bevan DR. Dose-response relationship for succinylcholine in a patient with genetically determined low plasma cholinesterase activity. Anesthesiology 1989; 70: 156-8.

Somogyi AA, Shanks CA et Triggs EJ. Disposition kinetics of pancuronium bromide in patients with total biliary obstruction. Br. J. Anaesth. 1977; 49: 1103-8.

Szenohradsky J, Fisher DM, Segredo V, Caldwell JE, Bragg P, Sharma ML, Gruenke LD et Miller RD. Pharmacokinetics of rocuronium bromide (ORG 9426) in patients with normal renal function or patients undergoing cadaver renal transplantation. Anesthesiology 1992; 77: 899-904.

Taylor P. Agents acting at the neuromuscular junction and autonomic ganglia. Dans : Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th edition, Goodman Gilman A, Rall TW, Nies AS and Taylor P eds., Pergamon Press, Elmsford, New York. 1990, p.166-86

Tozer TN. Concepts basis to pharmacokinetics. Pharmacol. Ther. 1981; 12: 109-31.

Upton RN. Regional pharmacokinetics I: Physiological and physicochemical basis. Biopharm. Drug Dispos. 1990; 11: 647-62.



Varin F, Ducharme J, Besner JG et Theoret Y. Determination of atracurium and laudanosine in human plasma by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 1990; 529: 319-327

Viby-Mogensen J. Monitoring of neuromuscular blockade : technology and clinical methods. Dans: Muscle Relaxants, Monographs in Anaesthesiology, Vol 19, Agoston S et Bowman WC eds, Elsevier Science Publishing Company, New York, 1990, p.141-62.

Viby-Mogensen J. Correlation of succinylcholine duration of action with plasma cholinesterase activity in subjects with the genotypically normal enzyme. Anesthesiology 1980; 53: 517-20.

Ward S, Boheimer N, Weatherley BC, Simmonds RJ et Dopson TA. Pharmacokinetics of atracurium and its metabolites in patients with normal renal function, and in patients in renal failure. Br. J. Anaesth. 1987; 59: 697-706.

Weber S, Brandom BW, Powers DM, Sarnier JB et Woelfel SK. Mivacurium blockade during nitrous oxide-isoflurane and nitrous oxide-narcotic anesthesia in adult surgical patients. Anesth. Analg. 1988; 67: 495-9.

Whittaker M. Plasma cholinesterase variants and the anesthetist. Anaesthesia 1980; 35: 174-97.

**ANNEXES**

**ANNEXE A**

**Equations de pharmacocinétique non compartimentale**

## Equations de pharmacocinétique non compartimentale

- Constante d'élimination ( $k_{el}$ ) :

$k_{el}$  = pente de la ligne de régression représentant la phase exponentielle de la courbe en fonction du temps.

- Temps de demi-vie d'élimination ( $t_{1/2\ el}$ ) :

$$t_{1/2\ el} = 0.693 / k_{el}$$

- Surface sous la courbe des  $C_p$  en fonction du temps ( $AUC_{0-t}$ ) et surface sous la courbe des moments ( $AUMC_{0-t}$ ) :

Estimées par la méthodes des trapézoides

- Temps de résidence moyen ( $MRT$ ) :

$$MRT = AUMC / AUC$$

- Clairance totale ( $Cl$ ) :

$$Cl = Dose / AUC$$

- Volume de distribution à l'équilibre ( $Vd_{ss}$ ) :

$$Vd_{ss} = MRT * Cl$$

- Volume de distribution de la phase d'élimination ( $Vd\beta$ ) :

$$Vd\beta = Cl / k_{el}$$