

ETUDE PAR FRAGMENTOGRAPHIE DE MASSE DE LA CINETIQUE SANGUINE D'UN ANTI-INFLAMMATOIRE DU F-1594

Par: A. Hanafiah WS*, Badruzzaman S. **

SARI

Telah dilakukan penetapan kadar plasmatik dari senyawa p-bifenil-4, okso-4, metil-2-butirat (F-1594) sebagai salah satu obat anti inflamasi dengan teknik kombinasi kromatografi gas - spektrometri massa.

F-1594 dengan 'internal standard' p-bifenil-4-chloro 2' asetat diekstraksi dari plasma, dipisahkan melalui kromatografi gas yang dilengkapi dengan kolom kapiler kemudian dianalisa secara fragmentografi massa.

Dengan menggunakan sedikit cuplikan, cara ini mampu mendeteksi suatu sediaan dengan konsentrasi yang sangat kecil.

ABSTRACT

The determination of p-biphenyl-4, oxo-4, methyl-2-butyric acid (F-1594) as an anti-inflammatory agent in the human plasma by using gas chromatography-mass spectrometry is described.

Quantitation was achieved after extraction from the plasma, F-1594 and p-biphenyl-4-chloro 2'-acetic acid as an internal standard, separated by gas chromatography with the capillary column and analysed by mass fragmentography.

This process requires only a very little sample and it enables the detection of very low concentration.

* Agence Nationale de l'Energie Atomique (PPTN-BATAN)

** Section de Pharmacie - Institut de Technologie de Bandung

FRAGMENTOGRAPHIE DE MASSE

L'essentiel des travaux en ce domaine concerne le couplage chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse CG/SM. Cette technique est actuellement la seule méthode d'analyse capable de fournir des informations structurales précises sur des composés non isolables à l'état pur.

Dans la technique de dosage en CG/SM, on compare les intensités de deux ou plusieurs signaux correspondant les uns à la substance dont on désire connaître la concentration, les autres au standard dont la concentration est connue. Le dosage par cette méthode de l'étalon interne implique la détection de plusieurs ions.

Cette méthode largement utilisée et est connue sous le nom "fragmentographie de masse".

Un schéma du couplage CG/SM utilisé pour la fragmentographie est présenté dans la figure 1.

Le fragmentogramme est obtenu au cours de l'éluion chromatographique et ressemble très exactement à un chromatogramme gazeux.

En conséquence, si la spécificité de la fragmentographie de masse est fonction du choix des ions fragments choisis, il est évident que cette spécificité est également fonction du pouvoir de séparation du dispositif chromatographique.

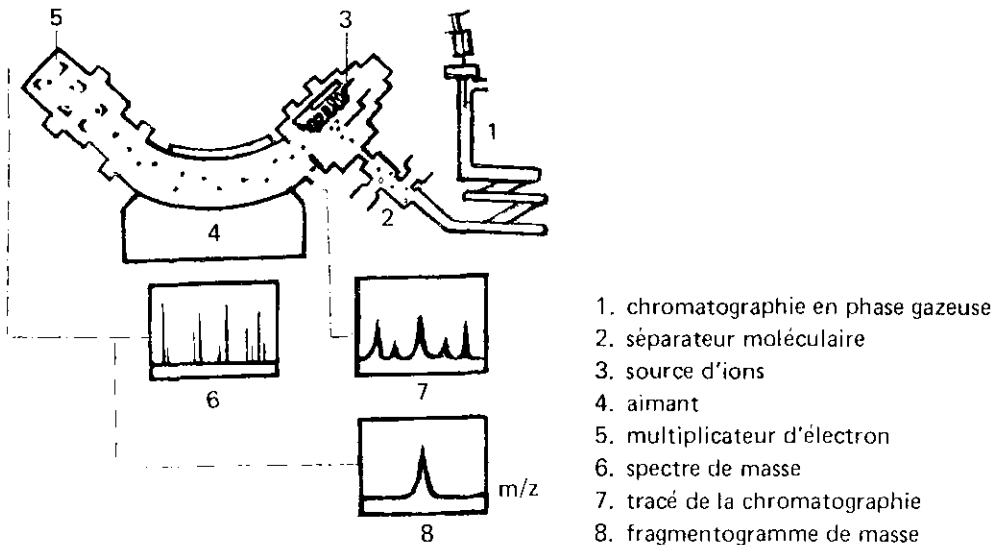


Fig. 1 Schéma du couplage CG/SM

En général une étude par fragmentographie se déroule selon le schéma suivant:

- * mise au point de la technique d'ext action et d'isolation du médicament à partir des liquides biologiques.
- * dérivation du composé pour améliorer sa stabilité et son comportement en chromatographie en phase gazeuse.
- * choix de la meilleure colonne et des meilleures conditions pour une séparation optimum. A ce sujet, les colonnes capillaires de verre sont celles qui fournissent les meilleurs résultats.
- * choix d'un étalon interne adéquat pour le dosage.

Le succès d'une étude par fragmentographie de masse réside en partie dans le choix des ions sélectionnés.

Ces ions doivent être caractéristiques des composés et doivent être de préférences des ions intenses.

En principe donc, l'ion à sélectionner en priorité sera celui donnant le pic de base. Malheureusement pour des composés de poids moléculaires élevés cet ion se situe vers les faibles masses et n'est pas caractéristique du composé. On choisira dans ce cas un ion moins intense mais de masse plus élevée.

Etalonnage

Le dosage du composé nécessite l'établissement préalable d'une courbe d'étalonnage. Cette courbe donne le rapport de la surface ou de la hauteur en fonction de la substance à doser. Cette courbe est construite à partir de solutions dans lesquelles la concentration en étalon interne est constante et celle de la substance à doser variable.

Etalon interne

Lorsqu'on utilise l'étalon externe dans la mesure, la précision peut se trouver diminuée du fait de la non reproductibilité des conditions opératoires. Ce n'est pas le cas lors de l'utilisation d'un étalon interne.

L'étalon interne idéal sera celui dont:

- la structure ou le comportement chromatographique sera voisin de celui du composé étudié.
- les propriétés physicochimiques et le modèle de fragmentation se rapprocheront le plus de ceux du produit à doser.

Il apparaît ainsi que cet étalon interne idéal est le produit marqué par des isotopes stables. L'utilisation de molécules marquées non radioactifs, de l'hydrogène, du carbone, de l'azote de l'oxygène et du soufre pour des études biomédicales connaît une importance croissante qui va de pair avec l'existence de l'équi-

pement nécessaire à leur détection et leur mesure CG/SM dans un nombre de laboratoires.

Pour cela il doit remplir deux conditions:

- être d'une pureté isotopique élevée
- posséder un nombre d'atomes de deuterium, de carbone 13 ou d'azote 15 supérieur à deux afin d'éviter les interférences avec le produit naturel qui présente un amas isotopique à M, M+1, M+2.

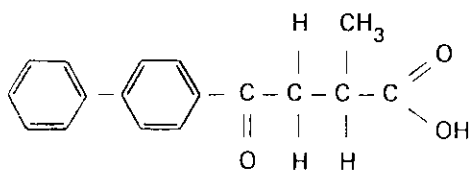
PRESENTATION DU F-1594

Le F-1594 est un produit synthétisé au sein du centre de Recherche Pierre Fabre qui a une action anti inflammatoire et possède des propriétés antalgiques et antipyrétiques supérieures à celles de l'acide acétyl salicylique. Cette molécule est connue sous le nom "METBUFEN".

Des mises au point récentes (BRET 1980) exposent en détail l'étude pharmacocinétique en utilisant le molécule marquée du F-1594 au carbone-14. Les cinétiques d'élimination ont été suivies par des comptages de radioactivité au niveau de sang, urines et fèces à l'aide de la spectrométrie en scintillation liquide.

Cette expérience montre que le taux maximum de radioactivité est atteint rapidement au bout de 2 à 4 heures après l'administration du produit.

Formule:



Acide-p-biphenyl-4, oxo-4, méthyl-2-butérique.

ETUDE DU SPECTRE DE MASSE DU F-1594

Le spectre de masse du F-1594 (fig. 2) présente un ion moléculaire à m/z 268 relativement abondant. Le pic de base du spectre se situe à m/z 181. Malheureusement, le F-1594 présentant une fonction acide ne peut être détecté en chromatographie en phase gazeuse.

Une dérivation préalable est nécessaire.

Nous avons essayé une dérivation en estérifiant par le diazométhane. Cette technique permet d'estérifier rapidement les fonctions acides libres sous forme d'esters méthyliques.

La technique de dérivation proposée, nous a permis de doser facilement le F-1594, mais il faut signaler que dans l'étude de la cinétique sanguine chez l'homme, le bruit de fond du plasma humain est différent de celui du plasma de rat et nous avons constaté qu'il y avait dans le plasma humain des composés donnant des ions aux masses m/z 282 et 260, ces composés ayant en outre le même temps de rétention que le F-1594 et que l'étalon interne; ce qui peut entraîner des interférences surtout pour les concentrations faibles en F-1594 en particulier pour les temps longs.

En conséquence, nous avons essayé un autre dérivé pour éviter les interférences avec ces impuretés; il s'agit du dérivé éthyloxy. (fig. 2). La préparation de ce réactif est très simple, en plus, il est moins toxique que le diazométhane.

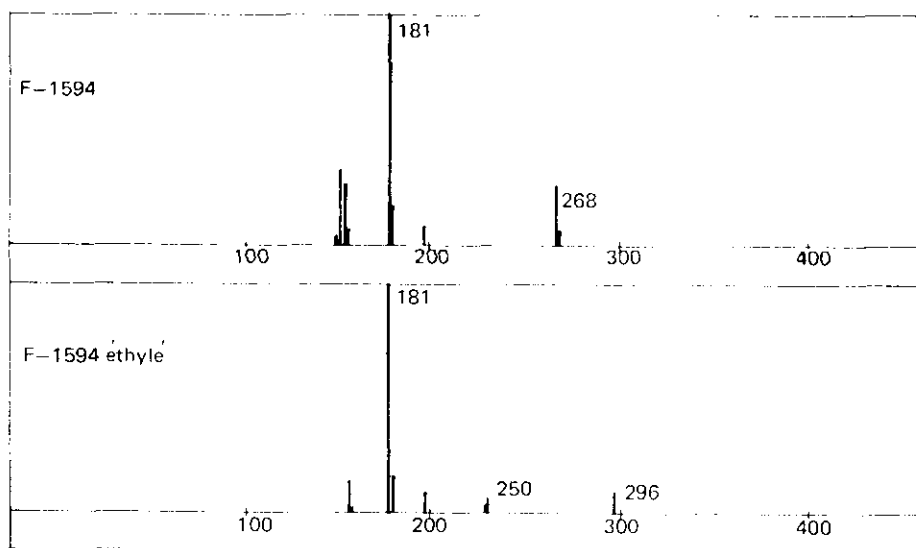
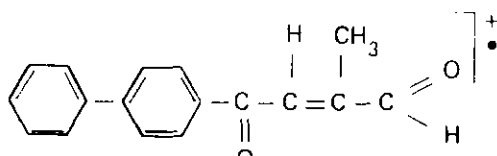


Fig. 2 Spectre de masse du F-1594 et du F-1594 éthyloxy

En fragmentographie de masse, bien que la purification soit poussée, nous n'avons pas retenu l'ion moléculaire à m/z 296, car il est toujours présent dans l'extrait plasmatique, de même que les ions à m/z 251 et m/z 181.

Nous avons donc choisi de détecter sélectivement l'ion fragment de masse 250 de ce composé.

Cet ion de masse à m/z 250 correspond à l'ion:



Choix de l'étalon interne:

Nous disposions, pour ce dosage, du F-1594 bideutérié.

Malheureusement ce composé n'a pu être utilisé pour l'analyse quantitative car c'était un mélange de F-1594 bideutérié, monodéutérié et non marqué comme le montre son spectre de masse dans la figure 3.

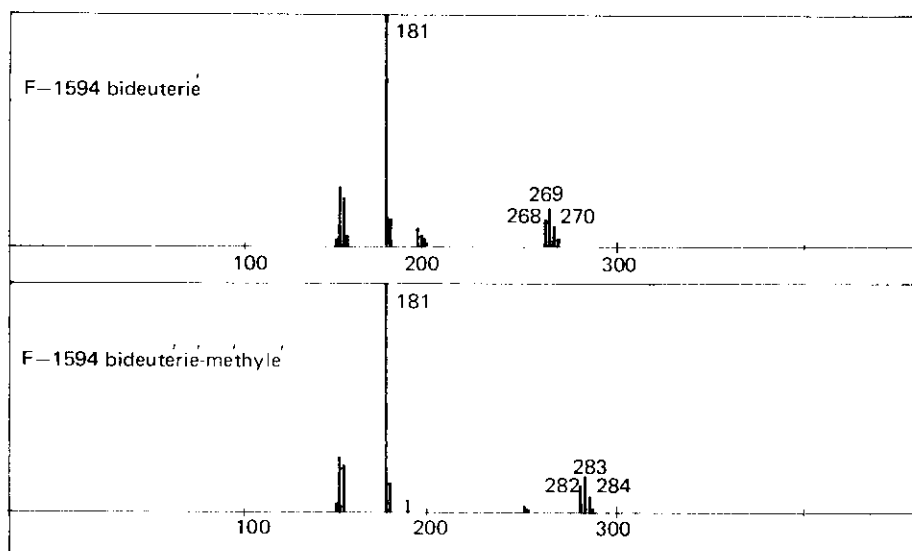


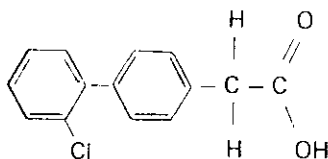
Fig. 3 Spectre de masse du F-1594 bideutérié et du F-1594 bideutérié méthylé.

Dans un tel cas, la courbe d'étalonnage ne passe pas par l'origine des coordonnées (fig. 4).

En outre, il s'agit là de l'inconvénient majeur, on ne peut détecter de très faibles quantités du produit à doser à cause du recouvrement du pic à m/z 282 par l'impureté.

Nous avons donc du choisir un autre étalon interne.

Notre choix s'est porté sur une molécule voisine du F-1594 possédant également diphenyle: le R-III-222 (l'acide p-biphényl-4-chloro 2'-acétique).



P.M.246,5

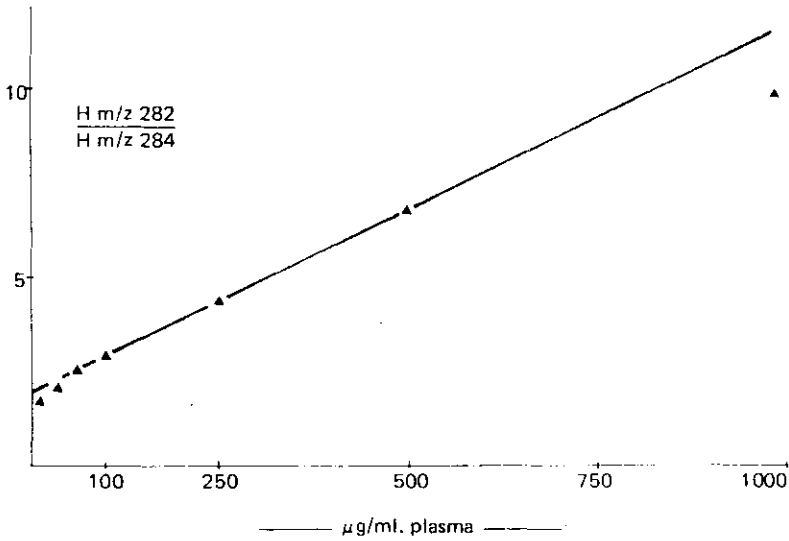


Fig. 4 Courbe d'étalonnage du F-1594 in vitro (e.i. F-1594-Dz)

Le spectre de masse de ce composé et celui de son dérivé éthylo utilisé dans le cas de l'étude pharmacocinétique chez l'homme sont présentés dans la figure 5.

Le pic moléculaire de ce composé à m/z 274 a été retenu pour l'analyse en fragmentographie de masse.

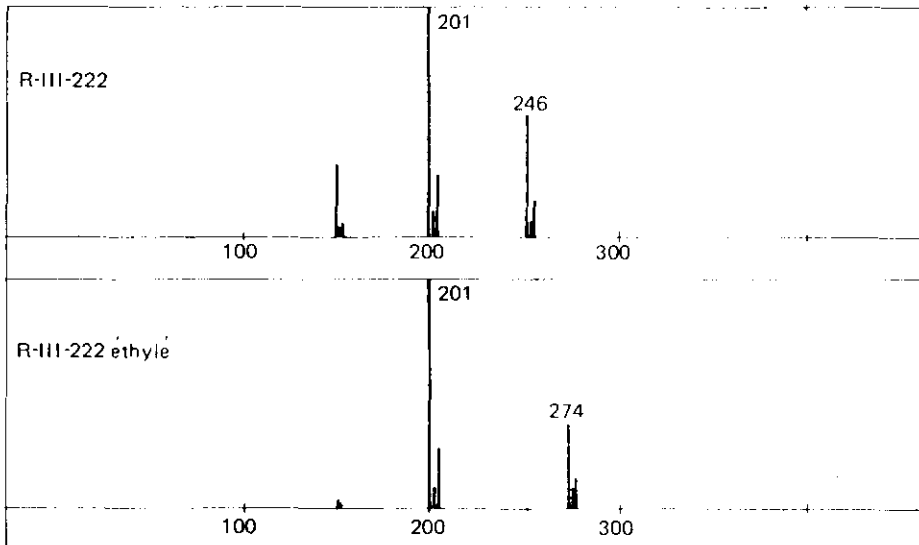


Fig. 5 Spectre de masse du R-III-222 et du R-III-222 éthylo

Le comportement en chromatographie gazeuse du F-1594 et du R-III-222, tous deux sous forme de dérivés éthylés a été étudié. Un chromatogramme est présenté dans la figure 6.

La colonne utilisée est une colonne capillaire de verre type SE 30 de 25 m de long et 0,23 mm de diamètre.

La température du four était de 223° C.

L'étude d'extraction du F-1594.:

Nous avons dans un premier temps essayé une méthode d'extraction à l'aide du produit F-1594 marqué au C-14.

Le rendement d'extraction est constant sur l'intervalle de concentration étudié et égal à 90 %.

Le schéma de l'extraction est présenté sur le tableau 1.

Etablissement des courbes d'étalonnage.

Le dosage d'un composé par fragmentographie de masse implique l'établissement préalable d'une courbe d'étalonnage.

En toute rigueur, ces solutions étalons doivent être préparées à partir du milieu biologique dans lequel on doit doser le médicament.

Ainsi dans le cas de notre étude, la courbe d'étalonnage présentée ci-après (figure 7) a été effectuée après extraction à partir du plasma humain de quantités connues et variables de substance à doser et de quantités connues et constante d'étalon interne.

Le fragmentogramme représentant les pics des ions du composé à doser et de l'étalon interne sélectionnés pour l'analyse est présenté dans la figure 8.

ETUDE CINETIQUE DU F-1594 CHEZ L'HOMME

L'étude pharmacocinétique du F-1594 chez l'homme a été réalisée après administration par voie orale en prise unique de 200 mg.

Les prélèvements sont faits à partir d'une demi heure, puis après 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3, 5; 4; 6; 8; 24; et 48 heures.

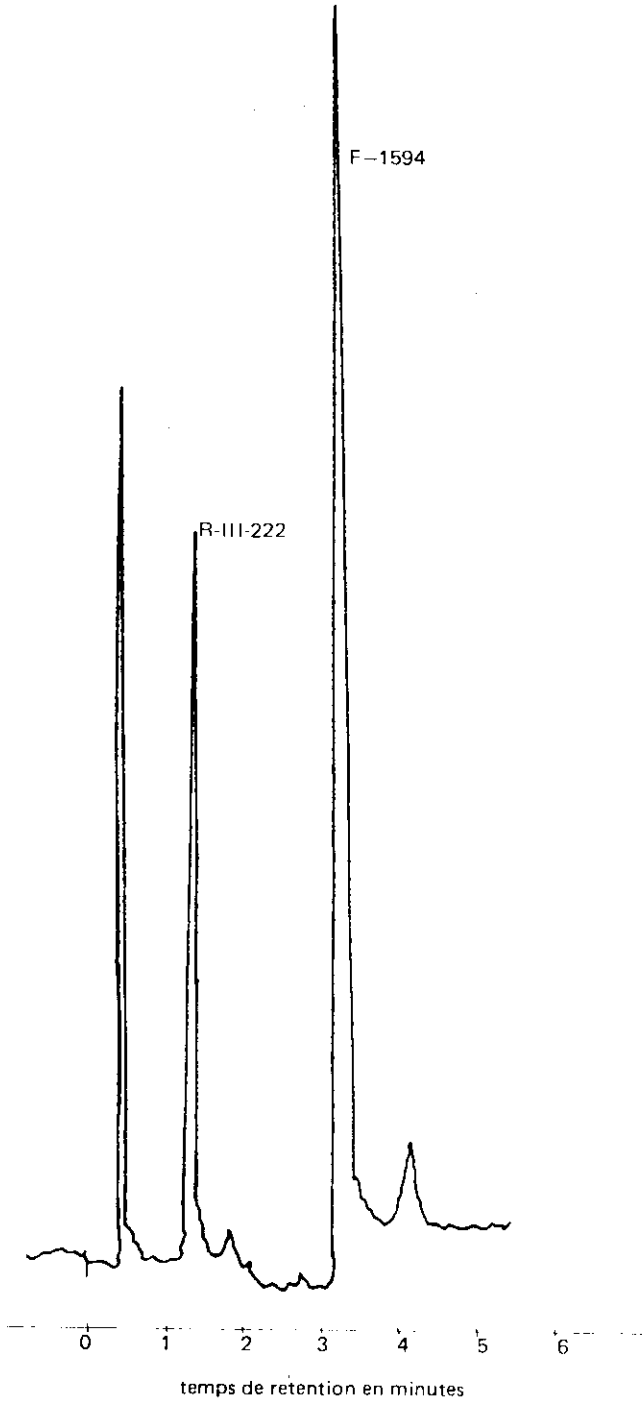


Fig. 6 Le comportement chromatographique du F-1594 et du R-III-222 éthylés

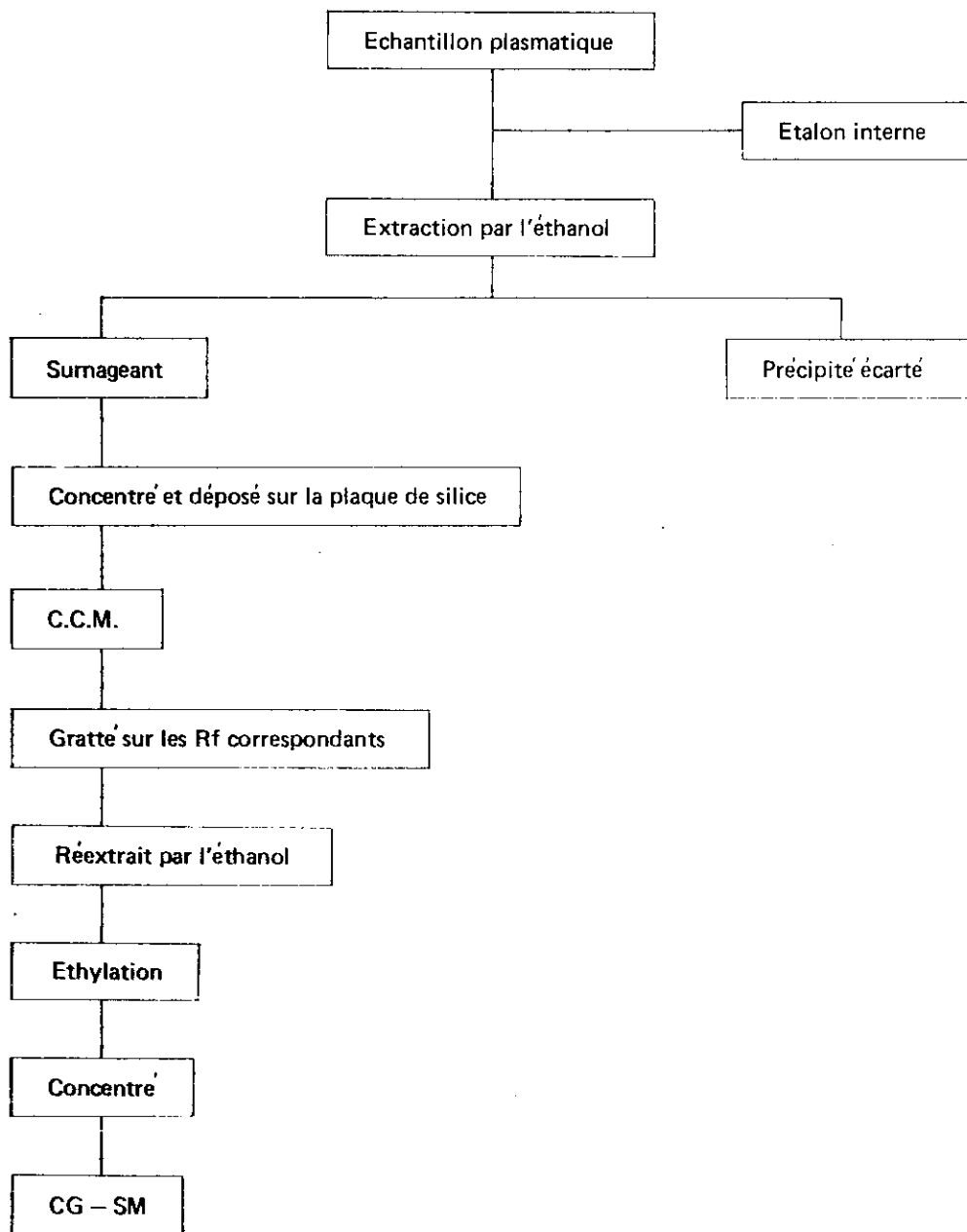


Tableau 1 Schema d'extraction du F-1594 par l'éthanol

Les échantillons de sang sont recueillis sur héparine et centrifugés le plus rapidement possible après les prélèvements.

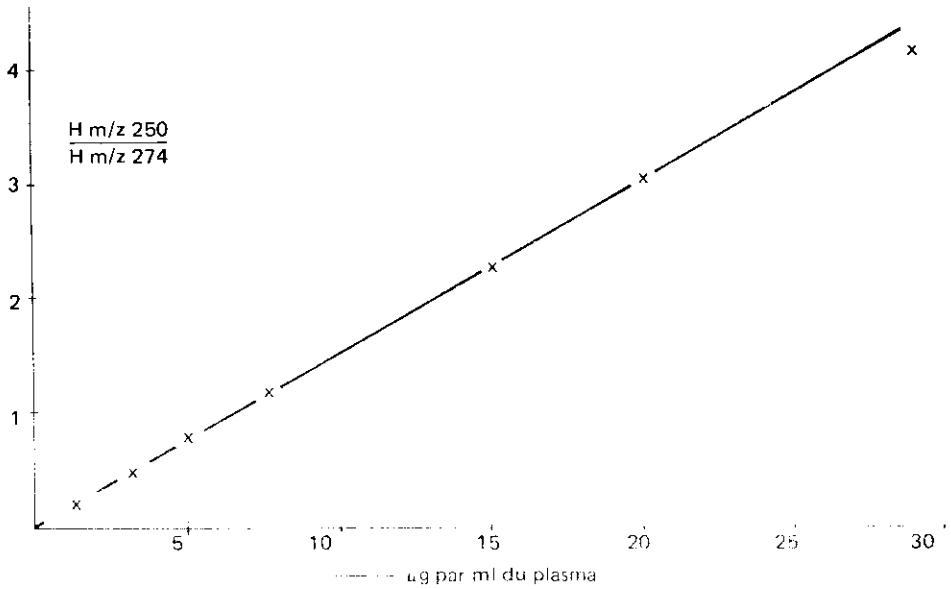


Fig. 7 Courbe d'étalonnage du F-1594

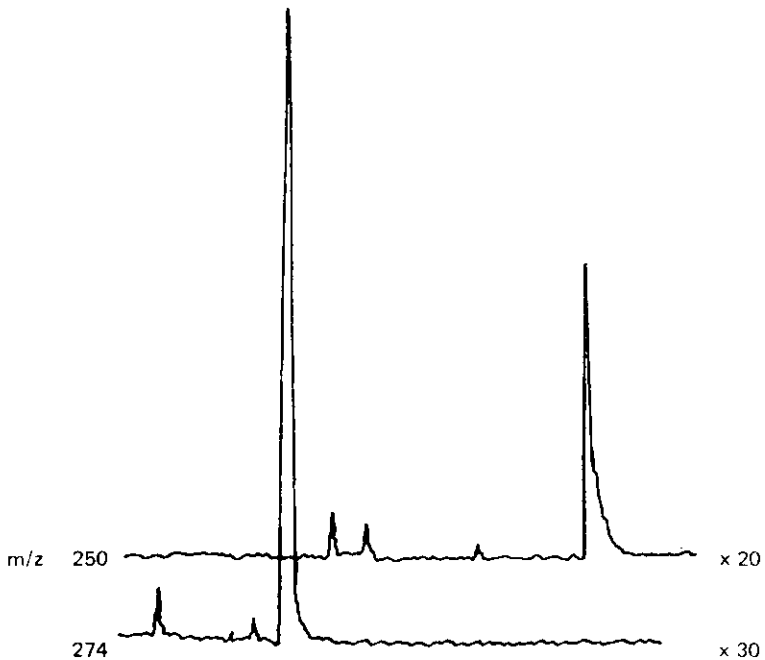


Fig. 8 Fragmentogramme du F-1594 et du R-III:222

RESULTATS

Après extraction par l'éthanol, éthylation et prépurification en CCM, les échantillons sont analysés en fragmentographie de masse.

Les ions retenus sont ceux à m/z 250 pour le F-1594 et m/z 274 pour l'étalon.

Le calcul de la concentration du produit à doser dans chaque échantillon est effectué en faisant le rapport de la hauteur de ces pics et en se rapportant à la courbe d'étalonnage.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 2 et les courbes cinétiques sanguines à la figure 9.

La concentration maximale qui varie de 7,25 à 12,20/ $\mu\text{g/ml}$ est atteinte entre 2,5 et 3,5 heures après l'administration.

Les paramètres pharmacocinétiques sont regroupés dans le tableau 3.

Selon le calcul, la valeur moyenne de la demie vie biologique est de l'ordre de 23,5 heures; le volume de distribution est de 97,6 litres et la clairance plasmatique totale est de 2,78 L.h^{-1} . en supposant totale la resorption du F-1594.

Tableau 2 Etude de la cinétique sanguine du F-1594 après administration par voie orale

Prélevement	Concentration en $\mu\text{g/ml}$ de plasma				
	BRE	SA	CO	BR	LU
0,5 H	2,72	2,75	1,60	2,10	2,50
1 H	2,88	3,08	—	—	1,65
1,5 H	2,92	3,40	1,40	2,10	3,50
2 H	4,76	4,75	—	—	11,35
2,5 H	—	7,50*	4,10	3,90	12,20*
3 H	7,25*	6,32	8,10*	4,75	10,00
3,5 H	6,12	5,12	6,00	7,95*	9,20
4 H	4,64	3,48	7,90	6,15	7,80
6 H	3,64	2,44	5,10	4,30	6,60
8 H	2,24	2,25	2,20	2,25	4,20
24 H	0,80	0,76	0,30	0,40	0,55
48 H	0,36	0,37	0,15	0,25	0,175

Note: *) Concentrations maximales dans le plasma ($\mu\text{g/ml}$)

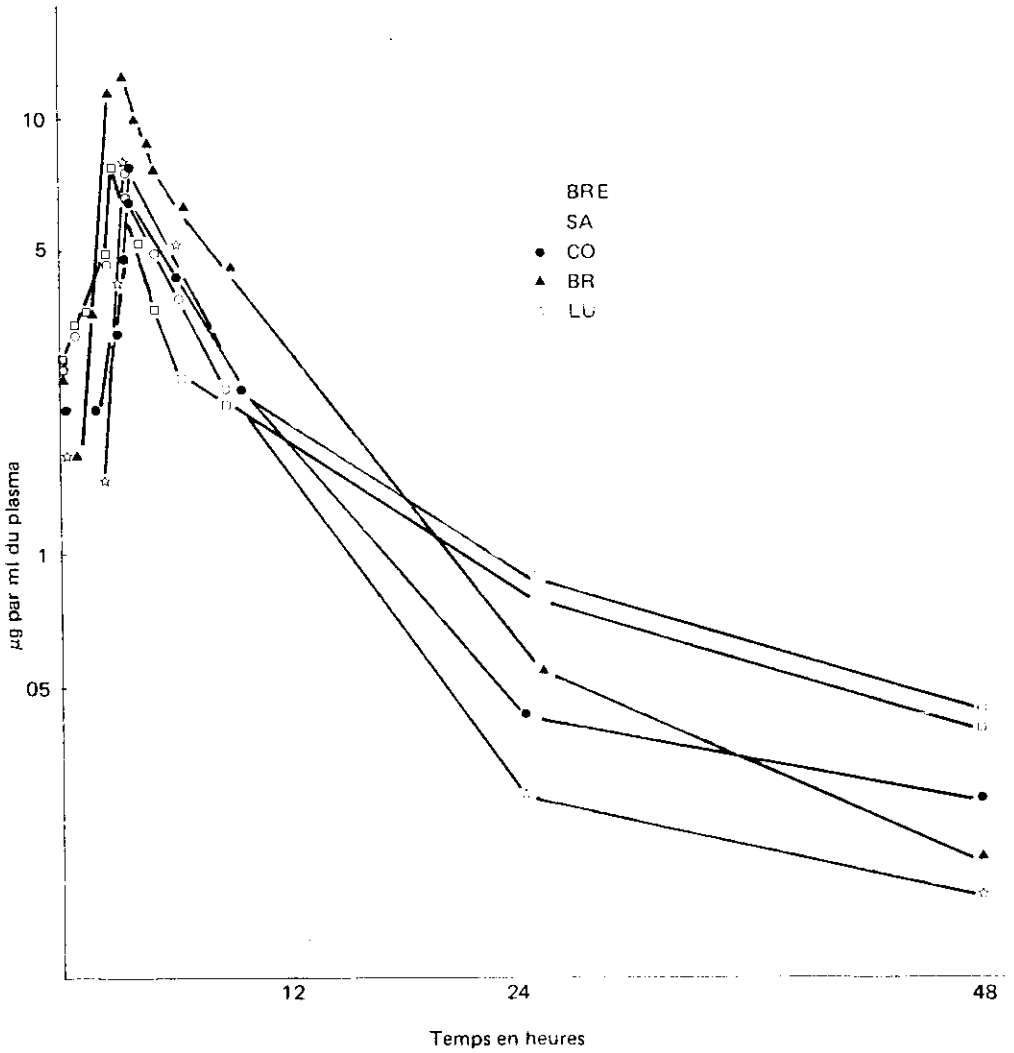


Fig. 9 Courbe de la cinetique sanguine du F-1594 (methode ethylation)

Tableau 3 Parametres pharmacocinetiques du F-1594

Sujet	k_a (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	V_D (litre)	Cl. (L/h)	ASC ($\mu g \cdot h \cdot L^{-1}$)
1. BRE	0,59	20,5	92	3	65,1
2. SA	0,73	24	111	3,2	62,4
3. CO	0,48	24	105	3	62,4
4. BR	0,67	35	139	2,7	73,2
5. LU	0,32	14,3	41	2	102,7
Moyenne	0,558	23,56	97,6	2,78	73,8

k_a = constante d'absorption
 $t_{1/2}$ = demi vie biologique
 V_D = volume de distribution

Cl = clairance
 ASC = aire sous la courbe

CONCLUSION

Nous avons au cours de ce travail appliqué la technique de fragmentographie de masse au dosage chez l'homme de molécule médicamenteuse le F-1594.

Cette méthode très spécifique et très sensible nécessite une extraction et une séparation préalable des composés à analyser.

Le choix de la méthode d'extraction est un facteur important dans cette méthode de dosage. Cette extraction doit être reproductible, la plus spécifique possible afin de minimiser les risques d'interférences avec d'autres composés, et si possible d'une réalisation assez facile pour permettre des analyses de routine.

La séparation des composés, autre facteur important de cette technique de dosage, a été réalisé en chromatographie gazeuse sur colonne capillaire.

Malheureusement cette excellente technique de séparation nécessite souvent une dérivation préalable des composés soit pour augmenter leur volatilité soit pour accroître leur stabilité thermique.

Une dérivation a été nécessaire pour permettre le dosage du F-1594.

La dosage par fragmentographie de masse fait appel à l'utilisation d'un étalon interne, ce dernier devant être extrait et chromatographié dans des conditions aussi proches que possible du produit à doser.

Les analogues marquées avec un isotope stable dont nous disposions, ne présentant pas une pureté suffisante, nous avons dû chercher des molécules voisines de celles à doser.

Le dernier facteur important dans la mise en oeuvre de cette technique est le choix des ions devant être enregistrés. Ces ions, nous l'avons vu, doivent être aussi intenses que possibles afin d'obtenir une grande sensibilité et spécifiques.

La sensibilité et la spécificité de la fragmentographie de masse en ont fait une méthode particulièrement adaptée aux études pharmacocinétiques chez l'homme.

Cette technique, si elle n'est pas encore routinière est en pleine expansion et le progrès réalisé dans le couplage HPLC - SM d'une part, et l'utilisation croissante des isotopes stables dans le domaine biopharmaceutique d'autre part vont encore accroître le champ de ses applications.

Remerciement

Que messieurs le Professeur J. L. CHANAU, le Professeur R. MARIGNAN et monsieur M. AUDRAN, Maître-Assistant au Laboratoire de Physique de la Faculté de Pharmacie (Université de Montpellier I, France) qui ont collaboré ce travail, trouve, ici, l'expression de nos vifs remerciements.

BIBLIOGRAPHIE:

1. BEYNON, Mass Spectrometry and its Application to Organic Chemistry, Elsevier publishing et Cie, Amsterdam - London - New York, Prenceton, 1960.
2. BRET M.C., Thèse de Doctorat es Science Pharmaceutiques de Montpellier, France, 1980.
3. CAMISHI Me., European Journal of Mass Spectrometry in Biochemistry medicine and environmental research, 1980, vol 1, no. 1, 7 - 31.
4. WANGSAATMADJA H., Thèse de Doctorat de 3^{ème} cycle, Fac. de Pharmacie de Montpellier, France, 1981.