

CHROM. 10,873

## DOSAGE DU KÉTOPROFÈNE\* DANS LE SANG PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

### COMPARAISON AVEC LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

A. BANNIER, J. L. BRAZIER et B. RIBON

Université Claude Bernard, Faculté de Pharmacie, Département de Chimie Analytique, Chimie Générale et Minérale et Bromatologie, Pr. Cl. Quincy 8, Av. Rockefeller, 69373 Lyon Cédex 2 (France)

(Reçu le 27 décembre 1977)

#### SUMMARY

*Determination of ketoprofen in plasma using high-performance liquid chromatography. Comparison with gas-liquid chromatography*

A new method of determination of ketoprofen 2-(3-benzoyl phenyl) propionic acid in plasma using high-performance liquid chromatography (HPLC) is described. After extraction by diethyl ether in acidic medium, ketoprofen and the internal standard, 2-(4-benzoyl phenyl) butyric acid, are methylated with gaseous diazomethane and their concentrations measured by HPLC using a LiChrosorb Si 60 (5  $\mu$ m) column and dichloromethane-hexane (60:40) as the mobile phase. The absolute retention times of the internal standard and ketoprofen are 11.6 and 12.8 min, respectively. The precision of the method is  $\pm 4\%$  and the lower detection limit ranges from 0.06 to 0.10  $\mu$ g/ml. The results obtained by HPLC show a very good correlation with those obtained by gas-liquid chromatography.

The proposed method is sensitive, reproducible and rapid and very suitable for ketoprofen determination in pharmacokinetic studies.

#### INTRODUCTION

Le kétoprofène ou acide (benzoyl-3 phényl)-2 propionique (Fig. 1) est un dérivé de la benzophénone doué d'une importante activité antiinflammatoire<sup>1</sup>. Les



Fig. 1. Structure chimique de (a) kétoprofène et de (b) l'étalon interne.

\* Profénid (ND, Spécia, Paris, France).

premiers résultats cliniques ont confirmé son intérêt thérapeutique<sup>2</sup>, si bien que largement utilisé en rhumatologie, il a fait l'objet de nombreuses études cliniques<sup>3-5</sup> et pharmacocinétiques<sup>6-9</sup>.

Trois méthodes de dosage du kétoprofène dans les milieux biologiques utilisant les diverses fonctions réactives de la molécule ont été décrites<sup>10</sup>: la colorimétrie, la polarographie et la chromatographie en phase gazeuse (CPG). Seule cette dernière est applicable au sérum et contitue en raison de sa spécificité et de sa sensibilité la méthode de référence. Toutefois les nombreuses phases de la technique ne permettent pas une précision supérieure à  $\pm 10\%$  et imposent un temps d'analyse assez long: seul un petit nombre de prélèvements peuvent être analysés chaque jour.

Aussi nous proposons une nouvelle méthode de dosage du kétoprofène dans le sang par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Cette méthode est spécifique, sensible, reproductible et rapide. L'étalon interne utilisé est un composé de structure voisine l'acide (benzoyl-4 phényl)-2 butyrique (Fig. 1).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Réactifs*

Kétoprofène et acide (benzoyl-4 phényl)-2 butyrique utilisé comme étalon interne (Spécia, Paris, France). Tous les réactifs et solvants sont de pureté pour analyses: acétone, sulfate de sodium anhydre, hexane, propanol-2, dichlorométhane, N-méthyl N-nitroso *p*-toluène sulfonamide (Prolabo, Paris, France); méthanol, hydroxyde de potassium, acide chlorhydrique, éther diéthylique, (E. Merck, Darmstadt, R.F.A.); plaques de chromatographie sur couche mince F 1500 LS 254 (Schleicher & Schüll, Dassel, R.F.A.).

### *Appareils*

L'appareil utilisé pour la CPG est un chromatographe en phase gazeuse Carlo Erba Fractovap 2200 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. La colonne en verre pyrex (longueur 2 m et diamètre interne 3 mm) est remplie d'OV-17 à 3% sur du Chromosorb W AW DMCS.

Les séparations par HPLC ont été effectuées sur un chromatographe en phase liquide Chromatem 38 (Touzar & Matignon, Paris, France) équipé d'un détecteur UV (254 nm) modèle 153 (Altex, Berkeley, Calif., U.S.A.) et d'un calculateur intégrateur modèle 3385 A (Hewlett-Packard, Orsay, France). La colonne (longueur 250 mm et diamètre interne 4.7 mm) est remplie avec du LiChrosorb Si 60 (5  $\mu\text{m}$ ; E. Merck) selon une méthode par voie humide<sup>11</sup>. Le nombre de plateaux théoriques calculé sur le kétoprofène est de 53,000 plateaux par mètre.

### *Solutions étalons*

L'acide (benzoyl-4phényl)-2 butyrique (100 mg/l dans l'acétone) est diluée au 1/10 dans un mélange eau-éthanol (50:50) au moment de l'emploi. Solution de kétoprofène et d'étalon interne méthylés à 10 mg/l dans l'acétone; cette solution sert à déterminer le coefficient de réponse du détecteur en CPG. Pour la HPLC, 1 ml de la solution est évaporé et le résidu est repris par 1 ml de phase mobile.

### Méthodes

**CPG.** Les dosages sanguins du kétoprofène ont été réalisés selon la technique publiée par Populaire *et al.*<sup>10</sup> modifiée par Brazier *et al.*<sup>12</sup>. Dans une ampoule à décantation de 150 ml, sont ajoutés 1 ml de sérum, 1 ml de solution d'étalon interne à 10 mg/l et 1 ml d'acide chlorhydrique 1 N. L'ensemble est extrait par deux fois 30 ml d'éther diéthylique. Les extraits rassemblés sont lavés successivement par 10 ml d'HCl 1 N, 10 ml d'HCl 0.1 N et 10 ml d'eau distillée. Après filtration sur sulfate de sodium anhydre, l'extrait est évaporé sous courant d'azote à 40°. Le résidu repris par 3 ml d'acétone est transféré dans un tube de verre à fond conique et à bouchon rodé pour être méthylé par le diazométhane gazeux<sup>13</sup>. L'extrait méthylé est évaporé, repris par 150  $\mu$ l d'acétone et les différents constituants sont fractionnés par chromatographie sur couche mince sur film de silice dans le système hexane-acétone (85:15). Les bandes correspondantes au kétoprofène et à l'étalon interne sont éluées par l'acétone. Après évaporation, le résidu repris par 50  $\mu$ l de propanol-2 est analysé par CPG. La séparation s'effectue en régime isotherme à 240°. La température de l'injecteur et du détecteur est de 280°. Le débit du gaz vecteur (azote) est de 30 ml/min.

**HPLC.** L'extraction est réalisée dans les mêmes conditions. Les extraits méthylés sont évaporés et repris par 50  $\mu$ l de phase mobile. 3  $\mu$ l de la solution sont alors injectés dans le chromatographe. La phase mobile, dichlorométhane-hexane (60:40), est pompée à travers la colonne à un débit de 1.3 ml/min sous une pression de 35 bar.

## RÉSULTATS

### Paramètres chromatographiques

**CPG.** La Fig. 2 représente le chromatogramme d'un extrait plasmatique. Les temps de rétention absolus du kétoprofène et de l'étalon interne sont respectivement de 4.8 et de 6.6 min. Les concentrations correspondantes sont de 7.90 mg/l en kétoprofène et de 5 mg/l en étalon interne.

**HPLC.** La Fig. 3a montre le chromatogramme d'un extrait plasmatique contenant 8.6 mg/l de kétoprofène et 5 mg/l d'étalon interne. La Fig. 3b montre le chromatogramme d'un blanc sérum du même sujet. Dans les conditions adoptées précédemment, les temps de rétention absolus de l'étalon interne et du kétoprofène sont respectivement de 11.6 et de 12.8 min. Les facteurs de capacité de l'étalon interne ( $k'_1$ ) et du kétoprofène ( $k'_2$ ) calculés par rapport au pic de l'air ( $t_R = 3.8$  min) sont les suivants:  $k'_1 = 2.05$ ,  $k'_2 = 2.37$ . La résolution,  $R_s$  est 1.25.

### Calcul de la concentration en kétoprofène

La méthode de standardisation utilisée dans les deux cas est la méthode d'éta-lonnage interne.

**CPG.** La solution étalon de kétoprofène et d'étalon interne méthylés à 10 mg/l dans l'acétone sert à déterminer le coefficient de proportionnalité par la mesure du rapport surface étalon sur surface de kétoprofène. Dix injections ont été effectuées pour ce calcul et le coefficient de proportionnalité obtenu est égale à  $0.99 \pm 0.016$ . La reproductibilité de la méthode est de  $\pm 10\%$  et la limite inférieure de sensibilité est comprise entre 0.02 et 0.04 mg/l de kétoprofène<sup>10</sup>.

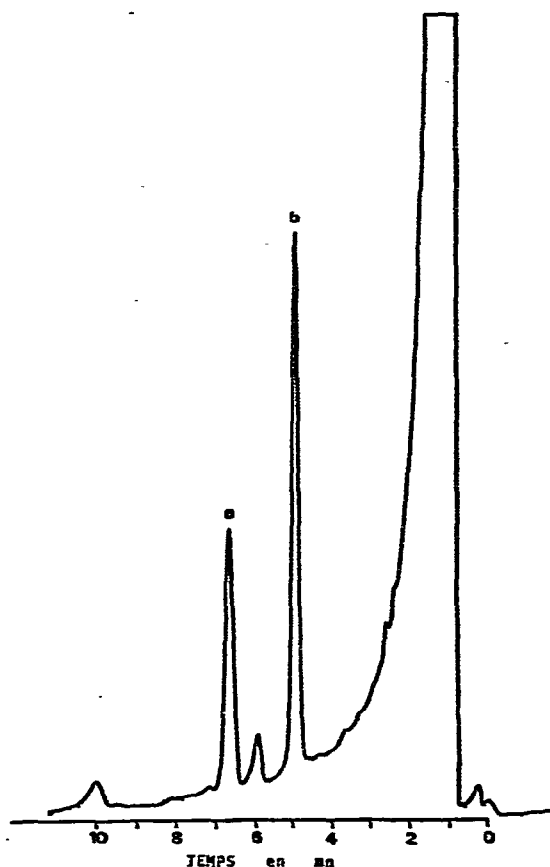


Fig. 2. Chromatogramme d'un extrait plasmatique obtenu par CPG contenant 7.90 mg/l de kétoprofène (b) et 5 mg/l d'étalon interne (a).

**HPLC.** Le coefficient de proportionnalité mesuré avec la solution étalon de kétoprofène et d'étalon interne à 10 mg/l dans la phase mobile est égal à  $1.04 \pm 0.013$  ( $n = 10$ ). Avant chaque série de dosage le coefficient de proportionnalité est vérifié.

#### *Linéarité de la méthode HPLC*

La courbe d'étalonnage a été réalisée sur des extractions de sérum contenant respectivement 2, 4, 6, 8 et 10 mg/l de kétoprofène. Les résultats obtenus sont portés sur la Fig. 4. Chaque point porté sur le graphe correspond à la moyenne de 3 injections. Les paramètres de la droite d'étalonnage (ordonnée à l'origine 0.026, pente 0.153 et coefficient de regression 0.999) montrent que la linéarité est très bonne dans la gamme des taux thérapeutiques.

#### *Réproductibilité et précision*

La reproductibilité de la méthode HPLC a été étudiée en mesurant la concentration en kétoprofène dans des échantillons sanguins chargés respectivement à 5 mg/l et à 10 mg/l en kétoprofène. Les résultats obtenus (Tableau I) montrent que

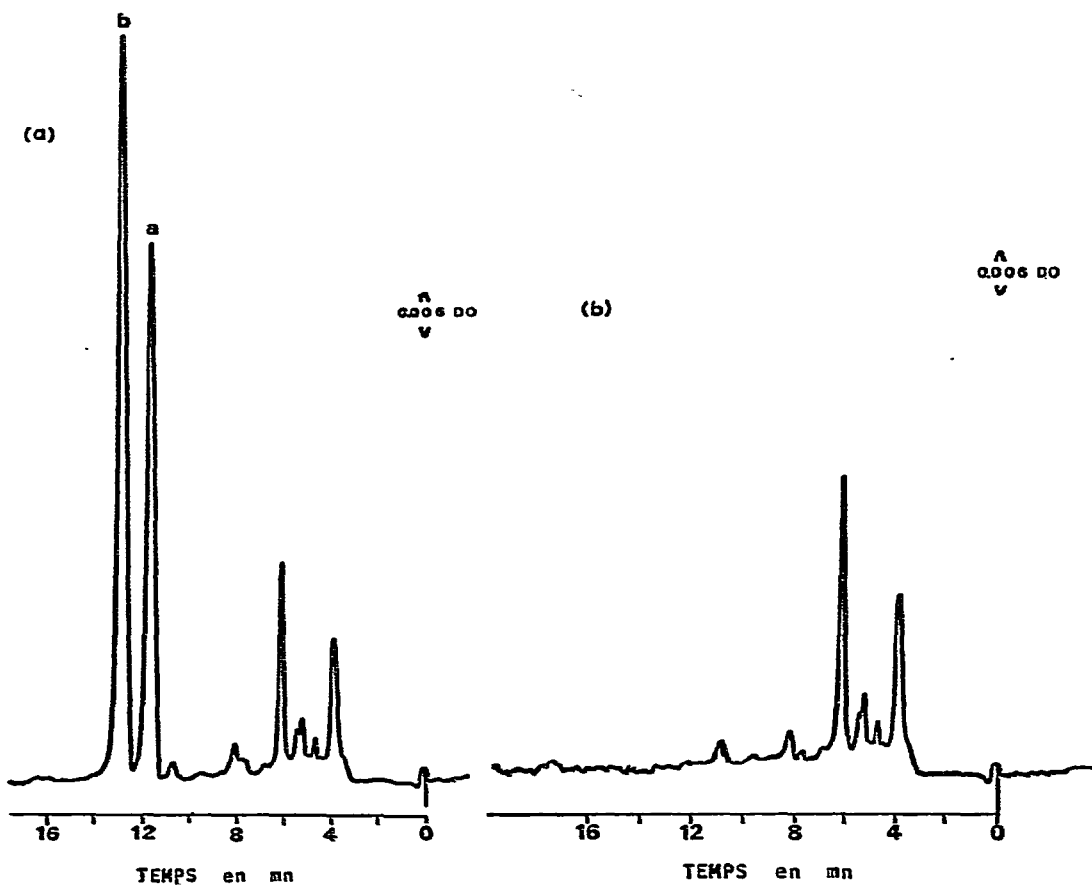


Fig. 3. Chromatogramme d'un extrait plasmatique obtenu par HPLC. Extrait contenant 8.6 mg/l de kétoprofène (b) et 5 mg/l d'étalon interne (a). Extrait d'un blanc plasma; colonne, 250 × 4.7 mm, LiChrosorb Si 60 (5 µm); phase mobile, dichlorométhane-hexane (60:40), débit, 1.3 ml/min; détection, UV (254 nm).

les taux moyens retrouvés sont respectivement de 4.91 mg/l ± 0.221 ( $n = 10$ ) et de 9.81 mg/l ± 0.391 ( $n = 10$ ). La précision de la méthode est de ±4%.

#### Limite de détection quantitative

La méthode HPLC permet encore de mesurer avec une bonne précision des concentrations de kétoprofène comprises entre 0.06 et 0.10 mg/l.

#### Exactitude

L'exactitude de la méthode HPLC a été testée en mesurant les concentrations sériques de kétoprofène par les deux méthodes (HPLC et CPG) chez 4 sujets ayant reçu une dose orale de kétoprofène de 150 mg. 44 Dosages ont été ainsi effectués parallèlement. La Fig. 5 montre la corrélation existant entre les résultats obtenus. En ordonnée sont portés les valeurs trouvées par CPG et en abscisse les valeurs trouvées par HPLC.

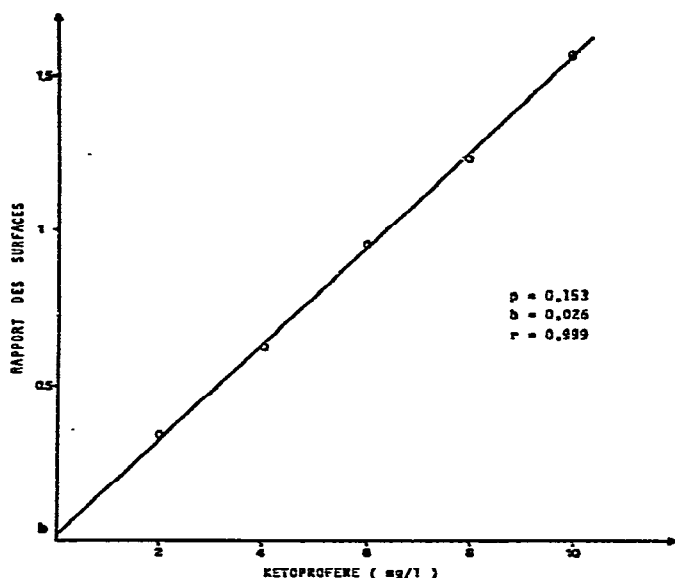


Fig. 4. Courbe d'étalonnage. En ordonnées sont portés les rapports surface kétoprofène sur surface étalon interne et en abscisses les concentrations de kétoprofène en mg/l.  $r$ , Coefficient de régression;  $b$ , ordonnée à l'origine;  $p$ , pente.

TABLEAU I

RÉPRODUCTIBILITÉ ET PRÉCISION DE LA MÉTHODE HPLC

| Nombre d'essais | Quantité ajoutée ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Quantité retrouvée ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Écart type ( $\mu\text{g/ml}$ ) | C.V. (%) |
|-----------------|---------------------------------------|---|---------------------------------|----------|
| 10              | 5                                     | 4.91                                    | 0.221                           | 4.5      |
| 10              | 10                                    | 9.81                                    | 0.331                           | 3.98     |

Les paramètres de la droite de régression sont les suivants: pente,  $1.041 \pm 0.022$ ; ordonnée à l'origine,  $-0.240 \pm 0.102$ ; coefficient de corrélation, 0.991. Le test  $t$  pour les couples de valeurs donnent les résultats suivants: moyenne des différences (HPLC — CPG), 0.0725;  $n$ , 44; erreur standard, 0.0514.

Pour l'hypothèse d'une différence nulle, la valeur de  $t$  montre qu'il n'y a pas de différence significative entre la dispersion des résultats selon les deux méthodes.

DISCUSSION

Dans la méthode proposée, l'étalon interne, acide (benzoyl-4 phényl)-2 butyrique, utilisé par Populaire *et al.*<sup>6</sup> a été conservée pour doser le kétoprofène. En effet ces deux composés, de structure voisine, possèdent le même comportement à l'extraction et cela nous a permis une comparaison des résultats valable entre les deux méthodes de dosage par HPLC et par CPG à partir du même prélèvement. 3  $\mu\text{l}$  de l'extrait méthylé repris par la phase mobile ont été injectés en HPLC et une aliquot du même extrait a été dosée par CPG.

La précision obtenue par HPLC ( $\pm 4\%$ ) est meilleure que celle obtenue par

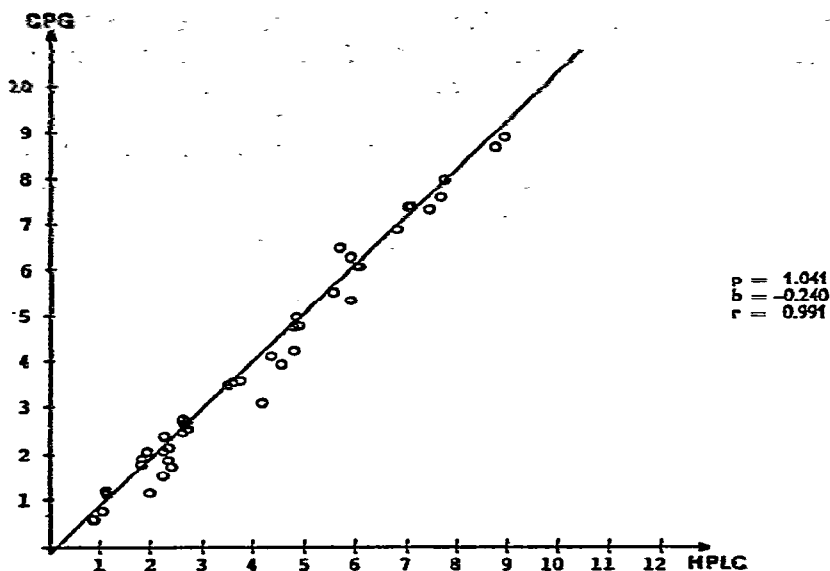


Fig. 5. Corrélation entre les résultats obtenus par CPG et par HPLC.

CPG ( $\pm 10\%$ ), vraisemblablement grâce à la diminution des étapes intermédiaires: en effet la chromatographie sur couche mince, étape particulièrement longue, peut être responsable de pertes importantes pouvant affecter indifféremment le kétoprofène ou l'étalon.

La sensibilité de la méthode proposée est légèrement inférieure à celle obtenue en CPG. La limite de détection quantitative est respectivement de 0.100 mg/l et de 0.04 mg/l de kétoprofène. Toutefois comme le montre la Fig. 3b, aucun pic parasite n'est susceptible d'interférer au cours du dosage et il est toujours possible d'augmenter la sensibilité en reprenant les extraits par 30  $\mu$ l de phase mobile et en augmentant le volume injecté. D'autre part, la méthode est suffisamment sensible pour suivre l'évolution des taux sanguins au cours des 12 h suivant la prise de 150 mg de kétoprofène.

Enfin le gain de temps est important: d'une part, l'étape intermédiaire la plus longue a été supprimée et d'autre part nous avons observé lors de l'injection des extraits en CPG des pics dont les temps de rétention sont voisins de 45 min. Ces pics de nature inconnue et présents dans tous les sérum limitent à 3 le nombre d'injections pouvant être effectuées consécutivement alors qu'en HPLC ce problème n'est pas rencontré.

La méthode que nous proposons est reproductible, sensible et rapide. Elle est parfaitement adaptée au dosage du kétoprofène dans le sang pour des études de pharmacocinétiques et de biodisponibilité.

## RÉSUMÉ

Nous décrivons une méthode de dosage du kétoprofène ou acide (benzoyl-3 phényl)-2 propionique dans le sang par chromatographie liquide haute performance.

Après extraction par l'éther en milieu acide, le kétoprofène et l'acide (benzoyl-4 phényl)-2 butyrique utilisé comme étalon interne sont méthylés par le diazométhane gazeux et analysés par chromatographie liquide haute performance [colonne de Li-Chrosorb Si 60, 5  $\mu\text{m}$ ; phase mobile, dichloro méthane-hexane (60:40)]. Les temps de rétention absolus de l'étalon interne et du kétoprofène sont respectivement de 11.6 et 12.8 min. La précision de la méthode est de  $\pm 4\%$  et la limite de détection quantitative est comprise entre 0.06 et 0.100  $\mu\text{g/ml}$  de kétoprofène. Les résultats comparés avec ceux obtenus en chromatographie en phase gazeuse montrent une excellente corrélation entre les deux méthodes.

La méthode proposée est sensible, reproductible et rapide. Elle est parfaitement adaptée au dosage du kétoprofène dans le sang en vue d'études pharmacocinétiques.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 L. Julou, J. C. Guyonnet, R. Ducrot, C. Ducrot, C. Garret, M. C. Bardone, G. Maignan et J. Pasquet, *J. Pharmacol. (Paris)*, 2 (1971) 259.
- 2 B. Amor, A. de Géry et F. Delbarre, *Rev. Rhum.*, 40 (1973) 451.
- 3 J. Fossgreen, *Scand. J. Rheum.*, suppl. 14 (1976) 7.
- 4 J. Sany et H. Serré, *Rheum. Rehab.*, (1976) 67.
- 5 P. Coupron, J. L. Brazier, P. Meunier, B. Ribon et A. Bannier, *XIV Int. Congr. Rheum., San Francisco, Calif., 26 juin - 1 juillet 1977*, J. R. Rice, Bethesda, Md., 1977, p. 72.
- 6 P. Populaire, B. Terlain, S. Pascal, B. Decoulevaere, A. Renard et J. P. Thomas, *Ann. Pharm. Fr.*, 31 (1973) 735.
- 7 A. Castegnaro, F. Annotta et C. Pollini, *Farmaco. Sci.*, 29 (1974) 520.
- 8 O. R. W. Lewellen et R. Templeton, *Scand. J. Rheum.*, suppl. 14 (1976) 53.
- 9 P. Meunier, R. Coupron, J. L. Brazier, B. Ribon et A. Bannier, *Rev. Rhum.*, 44 (1977) 519.
- 10 P. Populaire, B. Terlain, S. Pascal, B. Decoulevaere, G. Lebreton, A. Renard et J. P. Thomas, *Ann. Pharm. Fr.*, 31 (1973) 679.
- 11 B. Coq, C. Gonnet et J. L. Rocca, *J. Chromatogr.*, 106 (1975) 249.
- 12 J. L. Brazier, A. Bannier et B. Ribon, *Rapport Interne, Spécia*, Paris, 1976.
- 13 A. I. Vogel, *Practical Organic Chemistry*, Longmans, London, 1951, p. 971.