

*Journal of Chromatography*, 277 (1983) 61–69

*Biomedical Applications*

Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 1779

## DOSAGE DE L'ACIDE PHENYL-2 BUTYRIQUE DANS LE PLASMA PAR CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE ET CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

M. TSITINI TSAMIS, A.M. MANGE, R. FARINOTTI et G. MAHUZIER\*

*Laboratoire de Chimie Analytique II, Faculté de Pharmacie, Rue Jean-Baptiste Clément, 92290 Chatenay-Malabry (France)*

(Reçu le 1 février 1983; manuscrit modifié reçu le 6 mai 1983)

### SUMMARY

*Determination of 2-phenylbutyric acid in plasma by liquid and gas chromatography*

Two chromatographic methods which allow the measurement of 2-phenylbutyric acid in serum are described: a gas chromatographic, after silylation, and a reversed-phase high-performance liquid chromatographic. The liquid chromatography with a fluorescent detection, after derivatization by 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin, is ten times more sensitive than gas chromatography and 50 ng/ml can be measured in biological liquids.

### INTRODUCTION

L'acide phényl-2 butyrique (PB) estérifié par des amino alcools diversement substitués permet l'obtention d'un certain nombre de médicaments à propriétés pharmacologiques diverses tel le butamirate antitussif (Ia) [1], le butéthamate anticholinergique et spasmolytique (Ib) et le fenbutrazate anorexique (Ic) [2–4]. Dans l'organisme, la transformation métabolique entraîne la rupture de la liaison ester, comme cela a été montré dans le cas du butamirate [5]. Après absorption, il donne naissance à divers métabolites dont les principaux sont l'acide phényl-2 butyrique (II) et le diéthyl-amino-éthoxy-éthanol qui sont conjugués pour être ensuite éliminés.

Le dosage de l'acide phényl-2 butyrique, dans le plasma et les urines, permet donc de suivre la pharmacocinétique de ce type de molécules.

A cette fin, nous décrivons deux méthodes chromatographiques, l'une en phase gazeuse après silylation de l'acide, l'autre en phase liquide après sa transformation en ester fluorescent par la bromométhyl-4 méthoxy-7 coumarine (BrMmC) (IV) (Fig. 1).

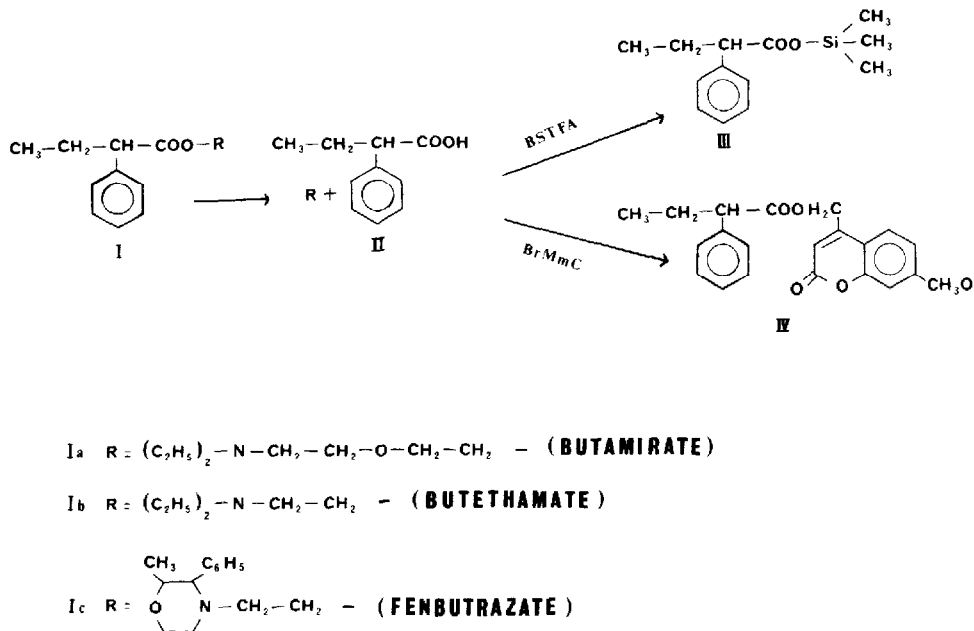


Fig. 1. Schéma de la réaction.

Ces deux méthodes utilisent le même étalon interne et présentent une excellente corrélation. Elles ont cependant des performances différentes puisque la méthode en chromatographie liquide avec détection fluorimétrique est dix fois plus sensible que la méthode en chromatographie gazeuse et permet d'atteindre des concentrations de  $50 \text{ ng ml}^{-1}$  dans le sérum ou les urines.

Le choix entre ces deux techniques dépendra donc des disponibilités matérielles du laboratoire et des quantités recherchées.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Chromatographie gazeuse

Un chromatographe Girdel 3000, muni d'un détecteur à ionisation de flamme, est utilisé avec un enregistreur Servo Trace dont le déroulement est de  $0.5 \text{ cm min}^{-1}$ . La température du four est de  $140^\circ\text{C}$ , celle de l'injecteur de  $190^\circ\text{C}$  et celle du détecteur de  $290^\circ\text{C}$ . Le débit de l'hydrogène est de  $25 \text{ ml min}^{-1}$ , celui de l'air comprimé de  $350 \text{ ml min}^{-1}$  et la pression de l'azote  $1.5 \text{ bar}$ , l'atténuation est de  $1 \times 8$ . Une colonne de verre ( $2 \text{ m} \times 2 \text{ mm}$ ), préalablement silanisée, est remplie par une phase stationnaire SE-30, 2.4% sur Gas-Chrom Q (80–100 mesh) (Alltech Europe).

### Chromatographie liquide

L'ensemble chromatographique est constitué par une pompe Chromatem 380, un injecteur à boucle ( $20 \mu\text{l}$ ) Rhéodyne 7125, une colonne inox ( $15 \text{ cm} \times 4.6 \text{ mm I.D.}$ ) remplie de Sphérisorb ODS Chromatem ( $5 \mu\text{m}$ ) selon la méthode de Coq et al. [6], d'un spectrofluorimètre Schoeffel GM 970 dont la longueur d'onde d'excitation est fixée à  $330 \text{ nm}$  et la longueur d'onde d'émission à  $418 \text{ nm}$ . Le déroulement de l'enregistreur est de  $0.5 \text{ cm min}^{-1}$ .

### Réactifs

Sulfate de soude anhydre, acide anisique (An), acide chlorhydrique, soude en pastille, acide perchlorique, diéthyléther, heptane, méthanol (Normapur, Prolabo, France). N,O-Bis triméthylsilylacétamide (BSA), bromométhyl-4 méthoxy-7 coumarine (BrMmC) (Regis Chemical Co., U.S.A.). 18-Crown-6 éther (Aldrich, U.S.A.). Acide phényl-2 butyrique (PB) (Laboratoire Valpan, France). Acide phényl-2 butyrique (PB) (Laboratoire Valpan): solutions étalons dans l'éther à  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  (CL) et à  $150 \mu\text{g ml}^{-1}$  (CPG). Acide anisique (Prolabo): solutions étalons dans l'éther à  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  (CL) et à  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  (CPG).

Toutes ces solutions sont stables un mois quand elles sont conservées à  $+4^\circ\text{C}$ .

La phase mobile est constituée par un mélange méthanol—eau—acide perchlorique (65:35:0.075, v/v).

### Méthode par chromatographie gazeuse

À 1.5 ml de plasma sont ajoutés  $200 \mu\text{l}$  de la solution étherée d'acide anisique ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ),  $75 \mu\text{l}$  d'acide chlorhydrique normal et 2 ml d'éther. Après agitation au Vortex pendant 1 min et centrifugation, 10 min à  $-9^\circ\text{C}$ , à 2000 g, la couche étherée est séparée. Cette opération est renouvelée une fois. Les phases étherées sont réunies, séchées sur sulfate de sodium anhydre et, après avoir été transvasées dans un autre tube à hémolyse, bouché émeri, évaporées à sec à  $30^\circ\text{C}$ , sous courant d'azote.

Le résidu sec est repris par  $75 \mu\text{l}$  d'une solution de BSA dans l'heptane (1:3, v/v) et laissé en contact 30 min. 1–3  $\mu\text{l}$  du mélange sont injectés dans le chromatographe dans les conditions décrites ci-dessus.

*Étalonnage.* Il est réalisé à partir de plasma de sujet témoin non-traité.

Quatre tubes à hémolyse, contenant chacun 1.5 ml de plasma, sont additionnés respectivement de 50, 100, 150 et  $200 \mu\text{l}$  de la solution standard d'acide phényl-2 butyrique ( $150 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). A chacun de ces tubes correspondent des concentrations respectives de 5, 10, 15 et  $20 \mu\text{g}$  d'acide phényl-2 butyrique par millilitre de plasma.

Un blanc est obtenu en traitant un sérum non-surchargé de la même manière.

### Méthode par chromatographie liquide

Après acidification par  $100 \mu\text{l}$  d'acide chlorhydrique normal et addition de  $75 \mu\text{l}$  de la solution étherée d'acide anisique ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), 0.5 ml de plasma sont extraits deux fois par 2 ml d'éther comme indiqué dans la méthode précédente.

Les phases étherées sont desséchées sur sulfate de sodium anhydre et placées dans des tubes à hémolyse bouchés émeri, et additionnées de  $10 \mu\text{l}$  de solution de méthanolate de sodium 0.015 M. La phase organique est évaporée à sec, sous courant d'azote. Au résidu, sont ajoutés  $500 \mu\text{l}$  de la solution de BrMmC et  $250 \mu\text{l}$  de la solution de 18-Crown-6 éther.

Les tubes sont entourés de papier d'aluminium, hermétiquement bouchés, et placés dans un bloc chauffant à  $70^\circ\text{C}$  pendant 15 min. La phase organique est évaporée à sec, sous courant d'azote, et le résidu est repris par  $100 \mu\text{l}$  de

méthanol. Vingt  $\mu\text{l}$  sont injectés dans le chromatographe. Le débit de la phase mobile est fixé à  $2.5 \text{ ml min}^{-1}$ .

*Étalonnage.* Il est réalisé à partir de plasma de sujet témoin. Quatre tubes à hémolyse contenant chacun 0.5 ml de plasma sont additionnés respectivement de 125, 250, 375 et 500  $\mu\text{l}$  de la solution standard d'acide phényl-2 butyrique ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) correspondant à des concentrations respectives de 0.25, 0.50, 0.75 et 1  $\mu\text{g}$  d'acide phényl-2 butyrique par millilitre de plasma. Un blanc est obtenu en traitant un sérum témoin non-surchargé de la même manière.

## RÉSULTATS

La Fig. 2a et b montre les tracés obtenus par chromatographie en phase gazeuse à partir d'un plasma d'un sujet avant traitement et celui du même sujet contenant  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  d'acide phényl-2 butyrique.

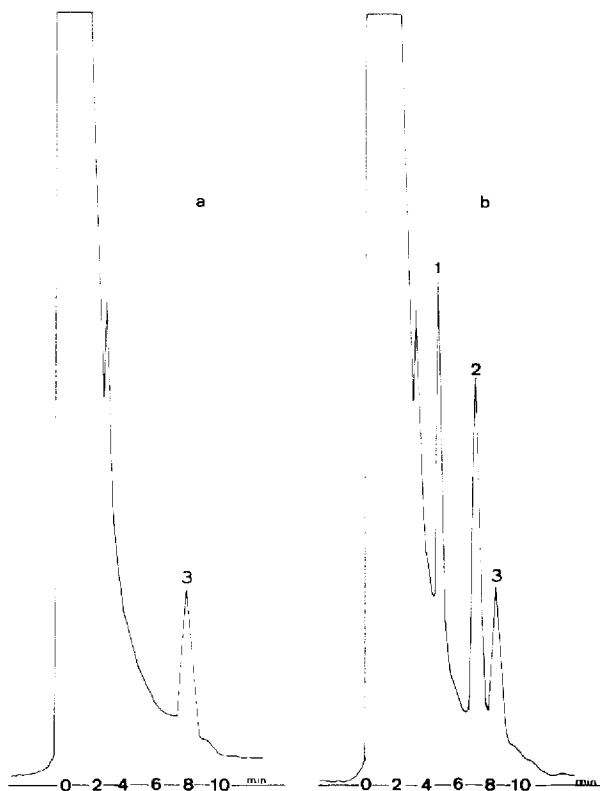


Fig. 2. Chromatographie gazeuse. (a) Chromatogramme d'un extrait plasmatique d'un sujet non-traité. (b) Chromatogramme d'un extrait plasmatique contenant  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  d'acide phényl-2 butyrique (1), l'étalon interne (2) et substance endogène (3).

Le temps de rétention relatif du dérivé silylé de l'acide phényl-2 butyrique par rapport à celui de l'acide anisique est de 0.63 dans les conditions décrites.

La Fig. 3a et b présente les tracés obtenus en chromatographie liquide à partir d'un plasma d'un sujet avant traitement et celui du même sujet contenant  $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  d'acide phényl-2 butyrique.

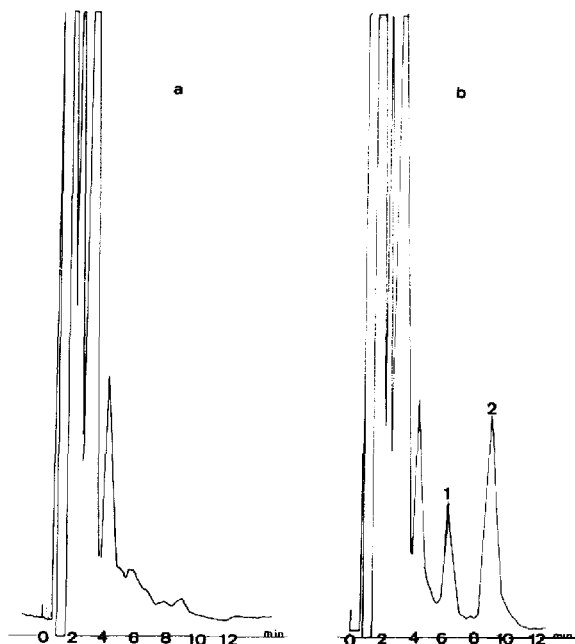


Fig. 3. Chromatographie liquide. (a) Chromatogramme d'un extrait plasmatique d'un sujet non-traité. (b) Chromatogramme d'un extrait plasmatique contenant  $0.50 \mu\text{g ml}^{-1}$  d'acide phényl-2 butyrique (1) et l'étalon interne (2).

Le temps de rétention relatif de l'ester de l'acide phényl-2 butyrique par rapport à celui de l'acide anisique est de 1.45 dans les conditions décrites. On constate que, par rapport aux sujets non-traités, les constituants normaux des plasmas n'interfèrent pas.

#### *Critères de fiabilité des méthodes analytiques*

Le Tableau I regroupe les caractéristiques analytiques de ces deux méthodes: rendement d'extraction, linéarité, précision, sensibilité et leur corrélation.

TABLEAU I

#### CARACTÉRISTIQUES ANALYTIQUES DES DEUX MÉTHODES

	Chromatographie gazeuse	Chromatographie liquide
Linéarité	$y = 0.093x - 0.065$ $r = 0.997$	$y = 0.365x + 1.744$ $r = 0.999$
Précision		
Reproductibilité ( $n = 4$ )	3.77%	1.51%
Répétabilité	3.6–6.2%	0.77–5.1%
Limite de sensibilité	$2 \mu\text{g ml}^{-1}$	$50 \text{ ng ml}^{-1}$
Corrélation entre les deux méthodes		$y = 0.840x + 0.121$ $r = 0.979$

*Rendement d'extraction et exactitude.* Le rendement d'extraction par l'éther en milieu acide a été étudié par spectrophotométrie UV en se plaçant au maximum d'absorption de l'acide phényl-2 butyrique (214 nm) et de l'acide anisique (212 nm). Dans les conditions expérimentales décrites, ces rendements sont de  $84 \pm 5\%$  ( $n = 5$ ) pour l'acide phényl-2 butyrique et de  $82 \pm 9\%$  ( $n = 5$ ) pour l'étalon interne.

L'exactitude des méthodes a été déterminée en surchargeant des plasmas témoins, avec des quantités connues d'acide phényl-2 butyrique. Les quantités retrouvées sont satisfaisantes (Tableau II).

TABLEAU II

## EXACTITUDE ET RÉCUPÉRATION

	Quantité d'acide phényl-2 butyrique ajoutée (en $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Quantité retrouvée (en $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Pourcentage récupéré
Chromatographie liquide ( $n = 4$ )	0.25	$0.29 \pm 0.017$	116
	0.50	$0.53 \pm 0.02$	96.3
	0.75	$0.76 \pm 0.02$	101
	1	$1.02 \pm 0.017$	102
Chromatographie gazeuse ( $n = 5$ )	5	$4.9 \pm 0.34$	98
	10	$10.1 \pm 0.73$	101
	15	$15.62 \pm 0.48$	101.4
	20	$20.14 \pm 0.91$	108.5

*Linéarité.* La linéarité de la méthode a été étudiée pour des concentrations allant de 5 à 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  en CPG et de 0.25 à 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  en CL. Les courbes d'étalonnage, obtenues à partir des rapports de surface du pic de l'acide phényl-2 butyrique et de l'étalon interne, sont parfaitement linéaires comme l'indiquent leurs coefficients de régression (Tableau I). De plus, la moyenne des courbes standard effectuées pendant un mois donne une excellente reproductibilité:  $y = 0.095x - 0.053$ ,  $r = 0.995$  en CPG et  $y = 1.744x + 0.365$ ,  $r = 0.998$  en CL.

*Précision.* La reproductibilité de la méthode a été déterminée en répétant quatre fois, au cours d'un mois, l'analyse des mêmes échantillons: en chromatographie liquide, un plasma renfermant 1.4  $\mu\text{g ml}^{-1}$  a présenté un coefficient de variation de 3.77%, en phase gazeuse, un plasma renfermant 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  a présenté un coefficient de variation de 1.51%.

La répétabilité a été déterminée en répétant plusieurs fois, dans une même journée, l'analyse d'un même échantillon.

En chromatographie liquide, les coefficients de variation ( $n = 4$ ) ont été de 5.1, 3.42, 1.54 et 0.77% pour des valeurs respectives de 0.25, 0.5, 0.75 et 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . En chromatographie gazeuse, pour des concentrations de 5, 10, 15 et 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , les coefficients de variation ont été de 5.8, 6.2, 3.6 et 4.1% ( $n = 6$ ).

*Sensibilité.* Les limites de sensibilité, dans les conditions décrites, sont de 2  $\mu\text{g ml}^{-1}$  soit 200 ng injecté dans un volume de 5  $\mu\text{l}$  en chromatographie

gazeuse, et de  $50 \text{ ng ml}^{-1}$  soit 5 ng injectés dans un volume de  $20 \mu\text{l}$  en chromatographie liquide.

*Corrélation des deux méthodes.* La droite de régression obtenue pour dix analyses effectuées en chromatographie liquide et chromatographie gazeuse montre une bonne corrélation entre les deux méthodes ( $r = 0.979$ ).

## DISCUSSION

Des procédés de dérivation, pour diminuer la polarité de l'acide phényl-2 butyrique en CPG ou pour augmenter la sensibilité de sa détection en chromatographie liquide, ont été retenus. Il a été nécessaire de rechercher comme étalon interne une substance ayant les mêmes caractéristiques d'extraction, de dérivation et de séparation que l'acide phényl-2 butyrique transformé.

L'acide benzoïque, s'extrayant et se dérivant comme l'acide phényl-2 butyrique, nous a semblé tout d'abord devoir convenir [7], en effet, sur une colonne OV-17 1.5% à  $100^\circ\text{C}$ , des temps de rétention de 3.6 min pour l'acide benzoïque et de 8 min pour l'acide phényl-2 butyrique étaient parfaitement acceptables et donnaient une excellente linéarité d'étalonnage.

Le passage en milieu biologique s'avéra moins satisfaisant car, outre ces deux pics, quatre autres pics apparaissaient dont l'un se confondait avec l'acide benzoïque.

La présence de ce pic ayant pu être attribuée à l'action du réactif silylant sur l'extrait biologique étheré, de nombreux essais ont été effectués pour obtenir la séparation des pics: changement des conditions de température et de pression, changement de colonne, changement de réactif silylant (BSTFA). Des essais sur colonnes remplies SE-30 2.40%, Gas-Chrom Q 80-120 mesh, ont montré que cette phase permettait d'accroître la sensibilité mais il est apparu que l'on ne pouvait pas bien séparer ce pic parasite de l'acide benzoïque. Ceci nous a conduit à rechercher d'autres étalons internes. Parmi les acides testés, l'acide anisique et l'acide hydrocinnamique ont présenté des temps de rétention respectifs de 6 et 4.5 min.

Dunges et al. [8] ayant décrit que l'acide anisique forme facilement avec la bromométhyl-4 méthoxy-7 coumarine un ester fluorescent AnMmC, ce composé a pu être également retenu comme étalon interne en chromatographie liquide.

La formation de dérivés fluorescents a été réalisée en présence de 18-crown-6 éther proposé par les transformations des sels métalliques dans les solvants aprotiques [9]. Mais, contrairement aux auteurs précédemment cités, l'utilisation de carbonate de potassium comme deuxième catalyseur n'a pas ici amélioré de façon sensible la réaction [10].

Une augmentation du temps de dérivation au-delà de quinze minutes ainsi qu'un plus grand excès de BrMmC n'est pas souhaitable car il apparaît des pics parasites. Les conditions opératoires décrites sont les plus appropriées et, l'optimum de cette transformation est obtenue pour une température de  $70^\circ\text{C}$ .

Afin de séparer en phase inverse l'acide phényl-2 butyrique et l'étalon interne, les conditions optimales de cette séparation ont été recherchées en utilisant des proportions variables de méthanol et d'eau, de préférence à l'acétonitrile qui inhibe la fluorescence des esters de la méthyl-4 méthoxy-7 coumarine [11].

TABLEAU III

VARIATION DES FACTEURS DE CAPACITÉ DE SÉLECTIVITÉ ET DE RÉOLUTION EN FONCTION DE LA NATURE DE LA PHASE MOBILE DES ESTERS FLUORESCENTS

		Phase mobile (v/v)									
		MeOH-H <sub>2</sub> O (60:40)	MeOH-H <sub>2</sub> O (65:35)	MeOH-H <sub>2</sub> O (70:30)	MeOH-H <sub>2</sub> O (60:40) + 75 µl HClO <sub>4</sub>	MeOH-H <sub>2</sub> O (65:35) + 75 µl HClO <sub>4</sub>	MeOH-H <sub>2</sub> O (70:30) + 75 µl HClO <sub>4</sub>				
pH apparent		7.24		7.00		2.28		2.22		2.50	
		R <sub>s</sub>	k'	α	R <sub>s</sub>	k'	α	R <sub>s</sub>	k'	α	R <sub>s</sub>
PbMmC	9.46	1.66	6.75	6.8	3.81	15	1.7	11.73	8.75	4.11	4.03
AnMmC	5.69			4.4	2.45	9	1.54	6.31	5.75	2.88	



Cette étude a été réalisée pour des valeurs de pH apparent au voisinage de la neutralité ou en milieu acide et les résultats obtenus sont rapportés dans le Tableau III.

L'augmentation de la teneur en méthanol diminue les facteurs de capacité  $k'$  ainsi que les facteurs de sélectivité  $\alpha$ . La diminution du pH est pratiquement sans action sur les facteurs de sélectivité, mais elle augmente les facteurs de capacité ainsi que l'efficacité et, par ce fait, améliore la résolution  $R_s$  [12].

Compte tenu de la nécessité de trouver un compromis entre le temps de l'analyse et la meilleure résolution, le mélange eau-méthanol (65:35, v/v), additionné de 75  $\mu$ l d'acide perchlorique, a été préféré.

## CONCLUSION

Les méthodes proposées se sont révélées simples, rapides et fiables. Elles ont pu être utilisées lors de l'établissement de données pharmacocinétiques. Leur application aux urines, après une hydrolyse préalable par le suc d'Hélix pomatia, a permis d'établir les profils d'élimination de cet acide après absorption de butamirate [13].

Leur différence réside dans leurs limites de sensibilité et, outre l'appareillage disponible, leur mise en oeuvre devra être fonction des quantités recherchées.

## RÉSUMÉ

Deux méthodes chromatographiques permettant de doser l'acide phényl-2 butyrique dans le sérum sont décrites: une méthode par chromatographie en phase gazeuse après silylation et une méthode en chromatographie liquide en phase inverse. La chromatographie liquide met en oeuvre une détection fluorimétrique après formation d'un ester fluorescent avec la bromométhyl-4 méthoxy-7 coumarine. Cette méthode est dix fois plus sensible que la chromatographie gazeuse et permet de déterminer des concentrations de 50 ng/ml dans les milieux biologiques.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 G. Deheyn, *Bruxelles Med.*, 10 (1972) 719.
- 2 O. Hengen et H. Siemer, *Arzneim.-Forsch.*, 5 (1956) 526.
- 3 H. Jordan, *Arzneim.-Forsch.*, 8 (1958) 716.
- 4 A. Fleish, K. Formanek, E. Habicht et W. Weis, *Arzneim.-Forsch.*, 11 (1961) 1119.
- 5 D.J. Anderson et C.B. Estep, *International Pharmacology Meeting, San Francisco, 1972*, pp. 466-476.
- 6 B. Coq, C. Gonnet et J.L. Rocca, *J. Chromatogr.*, 106 (1975) 249.
- 7 Suk Han Wan et S. Riegelman, *J. Pharm. Sci.*, 61 (1972) 1278.
- 8 N. Dinges, A. Meyer, K.G. Muller, M. Muller, R. Pietschmann, C. Plachetta, R. Sehr et H. Tuss, *Z. Anal. Chem.*, 288 (1977) 361.
- 9 H.D. Durst, M. Milano, E.J. Kikta, S.A. Connelly et E. Grushka, *Anal. Chem.*, 47 (1975) 1797.
- 10 S. Lam et E. Grushka, *J. Chromatogr.*, 158 (1978) 207.
- 11 H. Cisse, R. Farinotti, S. Kirkiacharian et A. Dauphin, *J. Chromatogr.*, 225 (1981) 509.
- 12 J.H. Purnell, *J. Chem. Soc.*, (1960) 1268.
- 13 C. Jacquot, M. Tsamis et G. Mahuzier, résultats à paraître.