

*Journal of Chromatography*, 305 (1984) 335–344

*Biomedical Applications*

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

CHROMBIO. 1933

DOSAGE PAR CHROMATOGRAPHIE GAZ—LIQUIDE D'UN NOUVEL  
ANTITUMORAL, 1,3,3,5,5-PENTAKIS-(AZARIDINO)- $\lambda^6$ ,2,4,6,3 $\lambda^5$ ,5 $\lambda^5$ -  
THIATRIAZADIPHOSPHORINE-1-OXYDE

APPLICATIONS AUX ÉTUDES PHARMACOCINÉTIQUES

A. ENGER\* et G. DELTOUR

*Institut Jean Godinot, Laboratoire de Radioimmunologie, B.P. 171, 51056 Reims Cedex  
(France)*

P. CONINX, D. JEZEKOVA et A. CATTAN

*Institut Jean Godinot, Service de Médecine Interne, B.P. 171, 51056 Reims Cedex (France)*

et

R. FOURNAISE

*Faculté des Sciences, Moulin de la Housse, 51100 Reims (France)*

(Reçu le 21 juin 1983, manuscrit modifié reçu le 13 septembre 1983)

---

SUMMARY

*Gas—liquid chromatographic determination of a new anticancer agent, 1,3,3,5,5-pentakis-(azaridino)- $\lambda^6$ ,2,4,6,3 $\lambda^5$ ,5 $\lambda^5$ -thiatriazadiphosphorine-1-oxide, for pharmacokinetic investigations*

A method for the assay of 1,3,3,5,5-pentakis-(azaridino)- $\lambda^6$ ,2,4,6,3 $\lambda^5$ ,5 $\lambda^5$ -thiatriazadiphosphorine-1-oxide (SOAz), a new anticancer drug of which the clinical trials are in progress, is described. This method is based on capillary gas chromatography using a thermionic detector. The lower detection limit was 100 pg per injection and a coefficient of variation smaller than 5% could be obtained when parathion was used as external standard. The method is suitable for biological samples and therefore has been proposed for clinical pharmacokinetic studies as well as for the determination of patterns of SOAz distribution in several organs of the mouse. A preliminary clinical study showed that the serum decay curves of SOAz could be fitted to an open two-compartment model for drug disappearance.

---

## INTRODUCTION

Le 1,3,3,5,5-pentakis-(azaridino)- $\lambda^6,2,4,6,3\lambda^5,5\lambda^5$ -thiatriadiphosphorine-1-oxyle (SOAz) est un médicament appartenant à la série des cyclophosphathiazènes et dérivé directement des cyclophosphazènes. Les cyclophosphazènes sont des composés particulièrement stables qui s'accumulent dans l'organisme et induisent une toxicité cumulative. Le SOAz est issu des recherches de Labarre et collaborateurs [1, 2] qui ont essayé de diminuer la toxicité hématologique observée avec les cyclophosphazènes en remplaçant dans le cycle de la molécule un atome de phosphore par un atome de soufre susceptible de provoquer une déstabilisation et de permettre un meilleur métabolisme.

Après les essais encourageants observés chez l'animal, nous avons testé ce médicament simultanément chez la souris et chez l'homme (essai Phase I et II). Parallèlement aux observations cliniques, nous avons procédé à des études biologiques portant sur les taux plasmatiques tissulaires et les voies d'élimination de cette drogue.

Au début de cette étude nous avons trouvé dans la littérature deux méthodes de dosage, l'une par chromatographie gazeuse (GC) [3]; l'autre par chromatographie liquide haute pression nous avait été communiquée à titre personnel [4]. Cette dernière technique présente un gros inconvénient: son manque de sensibilité.

La technique par GC avec détecteur spécifique azote—phosphore semblait plus performante et nous nous sommes efforcés de la mettre en oeuvre. Nous n'avons jamais pu retrouver les résultats avancés par les auteurs, en particulier en ce qui concerne la reproductibilité des résultats et donc la précision de la méthode et la linéarité de la réponse du détecteur vis-à-vis du SOAz.

On peut évoquer plusieurs raisons pour expliquer ce fait: (1) L'absence d'étalon interne ou externe, la quantification de la drogue se faisant d'après la quantité absolue injectée. On sait que la mesure directe de l'aire du pic obtenu par injection d'une quantité supposée connue de substance est soumise à trop de causes de variation pour obtenir une reproductibilité suffisante. (2) La nature même du SOAz qui s'adsorbe fortement sur tous les supports et donne des résultats totalement différents selon l'état de saturation des différents sites d'adsorption. (3) L'origine différente des chromatographes utilisés pourrait expliquer les distorsions observées au niveau de la détection; la présence simultanée de P, S et N dans la molécule peut aussi être invoquée pour expliquer la réponse non-linéaire du détecteur.

Nous avons donc mis au point notre propre méthode utilisant des colonnes capillaires en silice fondue, un standard externe et la détection spécifique azote—phosphore.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

*Produits chimiques*

Le SOAz est fourni par Otsuka Chemical (Tokushima, Japon), l'éthylparathion provient de Riedel de Haen (Hannover, R.F.A.).

### Conditions chromatographiques

Le chromatographe est un Packard Modèle 427 équipé d'un détecteur thermoionique Modèle 905 avec toutes les régulations pneumatiques nécessaires à l'utilisation des colonnes capillaires et tous modes d'injection. Le système d'injection donnant les meilleurs résultats est le "split" que nous utilisons vanne de fuite fermée, la totalité de l'échantillon injecté passe donc dans la colonne. Le courant de bille du détecteur est fixé à 260 pA. Le système est équipé d'une colonne capillaire en silice fondue (15 m × 0.32 mm I.D.). Ces colonnes sont à phase greffée de type apolaire que nous préparons au laboratoire selon un protocole qui sera publié ultérieurement.

Les conditions de travail sont les suivantes: température colonne 245°C, température injecteur 270°C, température de détecteur 290°C, gaz vecteur azote, pression en tête de colonne 1 bar.

### Administration de la drogue

*Chez l'animal.* Nous utilisons des souris femelles F1 C57 B6/DBA2 porteuses de l'adénocarcinome Ca 755. Le SOAz est administré à la dose de 110 mg/kg de carcasse, après dissolution dans le sérum physiologique, à raison de 0.1 ml par souris et par voie intra-péritonéale. La dose administrée est la même pour chaque animal après détermination d'un poids moyen.

*Chez l'homme.* La drogue est administrée par embol intraveineux à la dose de 220 mg/m<sup>2</sup> [5].

### Prélèvements

*Chez l'animal.* Le sang est prélevé au coin de l'oeil à l'aide d'une pipette Pasteur et recueilli sur tube hépariné. Les organes suivants sont prélevés: reins, foie, rate, poumons, tumeur, cerveau, os et moelle, intestin. Les prélèvements sont recueillis dans des tubes Pyrex de 10 ml contenant chacun 5 ml de tampon phosphate salin (PBS) 0.1 M par gramme d'organe.

Les prélèvements peuvent être conservés quelques jours à 4°C ou plusieurs semaines congelés à -25°C.

*Chez l'homme.* Le sang est prélevé sur tube hépariné par ponction veineuse au pli du coude aux temps suivants: 0 (avant injection), 5, 10, 15 et 30 min, et 1, 3, 6, 12, 18, 24 et 36 h.

Les tubes sont conservés à 4°C avant préparation pour dosage.

### Préparation de prélèvements

*Chez l'animal.* Les organes (sauf l'os) sont broyés pendant 5 min à 4°C à l'aide d'un broyeur Ultra-Turrax IKA T 18.

Ce broyat est centrifugé pendant 20 min à 4°C et 20,000 g. Le surnageant est récupéré dans sa totalité. L'os est broyé à l'aide d'un pulvérisateur thermovac refroidi à l'azote liquide. La poudre obtenue est agitée pendant 1 h dans du sérum physiologique.

*Chez l'homme.* Un ml de sang total est prélevé et servira à déterminer la concentration en SOAz des éléments figurés du sang. Avant extraction les globules sont lysés par congélations—décongélations successives. Le SOAz non-lié aux protéines sériques est évalué après ultrafiltration sur membrane Amicon PM 10.

La totalité des urines est recueillie entre 1—12 h, 12—24 h et 24—48 h. Elles

sont stockées au réfrigérateur ou congelées si le dosage doit être différé. Les urines ne reçoivent aucun traitement particulier avant extraction.

### Extraction

Le protocole d'extraction est le même quels que soient les organes ou liquides physiologiques dans lesquels on veut mesurer le taux de SOAz.

Le surnageant est ajusté à pH 10 avec de la soude 1 M. Après addition de 5 ml de dichlorométhane les tubes sont agités lentement sur un agitateur rotatif pendant 5 min. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3000 g pendant 5 min à 4°C. La phase organique contenant le SOAz est récupérée. On renouvelle l'opération avec 2 ml de dichlorométhane.

Les phases organiques sont ensuite évaporées à sec sous léger courant d'azote et à température ambiante. Le résidu est repris par 100 µl d'acétone et l'on y ajoute 10 µg d'éthylparathion dans les tubes prélevés avant le temps 1 h, 5 µg pour les tubes prélevés entre 1 et 6 h et 2.5 µg dans les autres tubes.

### Déterminations pharmacocinétiques

L'expression mathématique des courbes de décroissance plasmatique est déterminée en faisant l'hypothèse "a priori" que l'on se trouve en présence d'un phénomène pouvant être représenté par une somme d'exponentielles du type

$$C(t) = A_0 e^{-At} + B_0 e^{-Bt}$$

Les coefficients  $A_0$ ,  $A$ ,  $B_0$ ,  $B$  sont obtenus par lissage des valeurs expérimentales selon la méthode de Newton-Raphson et en introduisant une pondération des valeurs expérimentales des concentrations en  $1/C(t)^2$ . Les volumes des compartiments,  $V_{d1}$  et  $V_{d2}$ , le volume de distribution total,  $V_d$ , les coefficients d'échanges,  $K_{12}$  et  $K_{21}$ , le coefficient d'élimination,  $K_{el}$ , sont déterminés de façon classique pour un système bicompartimental ouvert. Les clairances urinaires sont déterminées d'après l'équation

$$Cl = \frac{\Delta u}{\int_{t_1}^{t_2} C(t) dt}$$

$\Delta u$  = quantité de drogue éliminée dans les urines entre les temps  $t_1$  et  $t_2$ .

$$\int_{t_1}^{t_2} C(t) dt = \text{aire sous la courbe de décroissance plasmatique entre les temps } t_1 \text{ et } t_2.$$

## RÉSULTATS

### Étude de la technique

Dans les conditions d'analyse définies les temps de rétention sont respectivement: éthylparathion, 1.3 min; SOAz, 4.09 min.

*Linéarité du détecteur.* Pour des quantités de SOAz comprises entre 1 et 25 ng nous obtenons la courbe Fig. 1. La réponse du détecteur n'est pas linéaire, contrairement aux observations d'Uchida et al. [3].

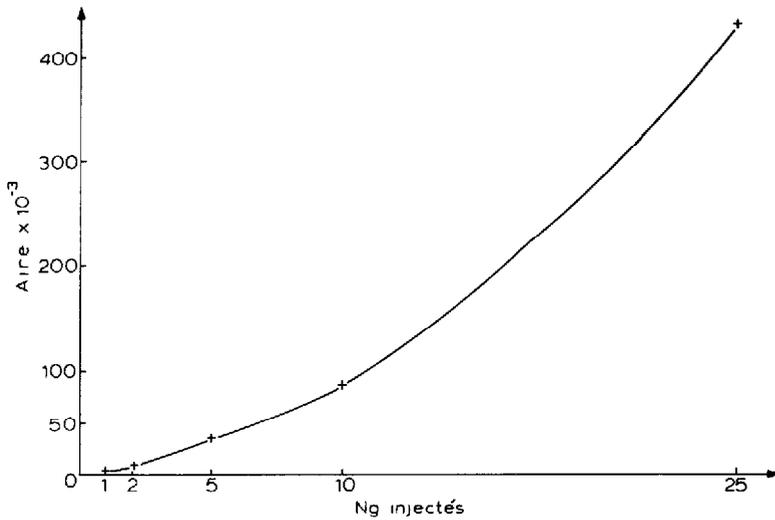


Fig. 1. Réponse du détecteur pour des quantités de SOAz injectées comprises entre 1 et 25 ng ( $n = 5$ ).

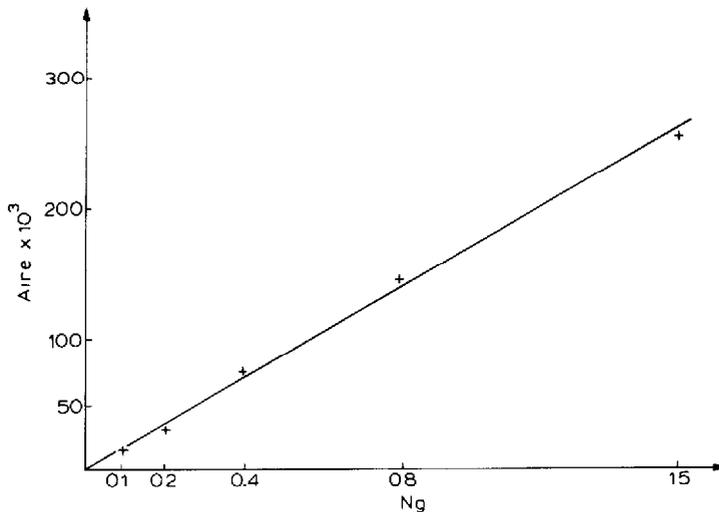


Fig. 2. Réponse du détecteur pour des quantités de parathion comprises entre 0,1 et 1,5 ng ( $n = 5$ ).

Pour des quantités de parathion comprises entre 0.1 et 1.5 ng nous obtenons le tracé Fig. 2. À la différence du SOAz, la réponse du détecteur est linéaire.

Ces observations nous ont amenés à adopter le protocole de dosage suivant: la quantité de SOAz injectée doit être telle que la surface mesurée de son pic soit comprise entre 18,000 et 23,000. Dans ces conditions l'étalonnage est parfaitement linéaire.

*Limite de détection.* Pour une quantité de SOAz injectée de 97 pg nous obtenons une aire de 368 ce qui correspond à la limite de détection acceptable dans les conditions analytiques standards. Il est possible d'abaisser ce seuil de détection en diminuant l'atténuation de l'électromètre et en augmentant

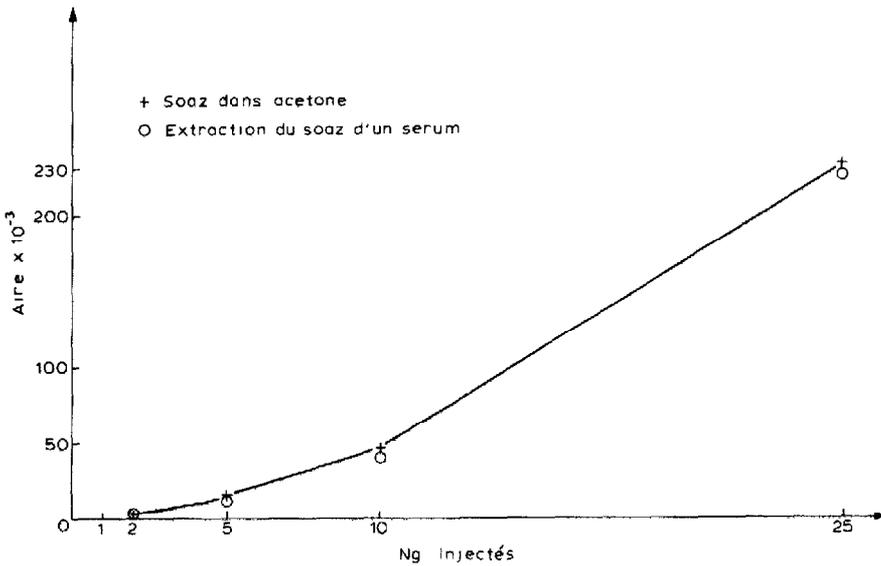


Fig. 3. Comparaison des aires obtenues pour le dosage du SOAz dans une série de sérums surchargés et extraits avec une gamme étalon.

l'intensité du courant de bille du détecteur. Le gain réalisé peut être aisément de 10 mais les conditions de travail deviennent beaucoup plus difficiles.

*Test de récupération.* Des quantités connues et croissantes de SOAz en solution dans l'acétone sont ajoutées à une série de  $4 \times 1$  ml de sérum. Ces sérums sont extraits selon le protocole défini et les résultats sont comparés aux chiffres obtenus par injection de quantités connues de SOAz (Fig. 3). Les pourcentages de récupération varient entre 91 et 108%. Ces chiffres ne sont pas significatifs et correspondent au coefficient de variation de 10% sur la précision des injections. Les pourcentages de récupération ont été mesurés pour les urines et différents organes chez la souris et sont comparables. Nous considérons donc qu'il n'y a pas de coefficient de correction à appliquer pour les extractions de SOAz à partir des différents prélèvements biologiques.

*Reproductibilité intra-essais.* Un pool de sérums humains est aliquoté et surchargés en SOAz à 8, 5, 2.5 et 1  $\mu\text{g/ml}$ . Après extraction selon le protocole défini on ajoute respectivement 10, 5, 2.5 et 1  $\mu\text{g/ml}$  de sérum de parathion. Chaque extrait est dosé dix fois dans les mêmes conditions. Les résultats sont donnés dans le Tableau I.

TABLEAU I

REPRODUCTIBILITÉ INTRA-ESSAI

Dix déterminations par point.

SOAz ( $\mu\text{g/ml}$ )	Moyenne	C.V. (%)
8	7.77	4.46
5	5.02	3.7
2.5	2.56	3.4
1	0.95	4.7

*Contrôle inter-essai.* À un pool de sérums humains aliquoté en fractions de 1 ml, on ajoute 5  $\mu\text{g}$  de SOAz dans l'acétone. Après agitation les pools sont congelés et stockés à  $-25^{\circ}\text{C}$ .

Pour une série de 11 déterminations la moyenne du sérum de contrôle s'établit à 4.95  $\mu\text{g}/\text{ml}$  et le coefficient de variation à 9.7%.

#### *Étude pharmacocinétique chez l'homme*

La Fig. 4 donne le tracé chromatographique type d'un patient ayant reçu 400 mg de SOAz. Le prélèvement effectué à la quinzième minute contient 10.8  $\mu\text{g}$  de SOAz par ml de sérum. Un prélèvement sanguin effectué avant injection de la drogue permet de s'assurer qu'il n'existe pas dans le plasma du malade de substance pouvant interférer avec le dosage.

Sur la série de 17 patients étudiés et les nombreux pools de sérums utilisés,

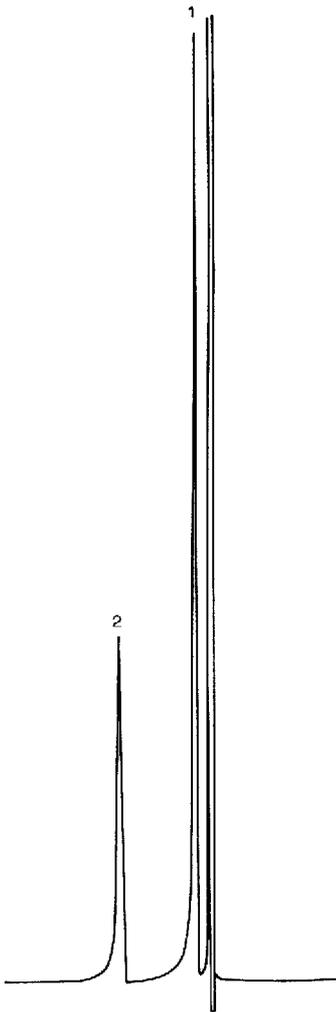


Fig. 4. Tracé chromatographique d'un patient ayant reçu 400 mg de SOAz. Prélèvement à la 15e minute. Pic 1: parathion. Pic 2: SOAz, 10.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

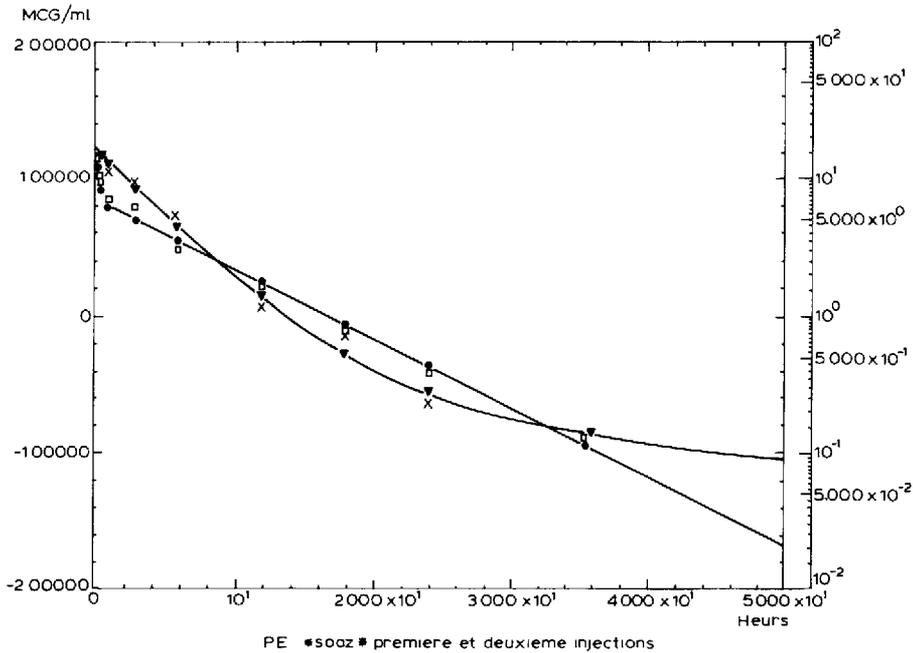


Fig. 5. Courbe de décroissance plasmatique du SOAz chez un patient ayant reçu deux injections à deux mois d'intervalle. 1e injection 430 mg, voie intraveineuse; (□), points expérimentaux; (●), points théoriques recalculés. 2e injection: 300 mg, voie intraveineuse; (×), points expérimentaux; (▼), points recalculés.

## TABLEAU II

### VALEURS DES CONCENTRATIONS EN FONCTION DU TEMPS POUR PATIENT P.E.

Le C.V. représente le coefficient de variation observé entre les valeurs expérimentales et les valeurs théoriques calculées d'après l'équation de la courbe. Le signe négatif indique que les valeurs calculées sont inférieures aux valeurs expérimentales.

Temps (h)	1e injection* ( $\mu\text{g/ml}$ )	C.V.(%)	2e injection** ( $\mu\text{g/ml}$ )	C.V. (%)
0.083	16.9	0.87	15.4	-2.5
0.163	14.7	5.2		
0.25	10.8	-8.6	16.7	8.1
0.5	8.7	3.9	14.4	-0.194
1	6.7	3.9	12	-7.9
3	5.9	16.6	8.6	2.03
6	3.3	-5.1	5	10.5
12	1.6	-7.9	1.16	-17.6
18	0.8	-7.5	0.76	32.4
24	0.4	-7	0.24	-9.9
36	0.13	13.5	0.14	1.74

\*430 mg injectés le 20 septembre 1982; poids du patient 86 kg.

\*\*300 mg injectés le 25 novembre 1982; poids du patient 83 kg.

nous n'avons jamais mis en évidence de pic chromatographique interférant avec le SOAz ou le parathion. La Fig. 5 donne les courbes de pharmacocinétique chez un patient ayant reçu lors de la première injection 430 mg de SOAz et 300 mg lors de la seconde.

Le Tableau II donne les valeurs des concentrations en fonction du temps.

## DISCUSSION

La technique de dosage du SOAz décrite ici donne des résultats très reproductibles. Les coefficients de variation pour la reproductibilité intra-essais sont inférieurs à 5% et inférieurs à 10% pour la reproductibilité inter-essais.

La sensibilité permet d'atteindre des concentrations inférieures à 0.1 µg/ml de sérum en routine et on peut l'abaisser d'un facteur 10 si nécessaire. L'utilisation de colonnes capillaires en silice fondue et à phase greffée autorise l'injection dans la colonne de volumes importants jusqu'à 5 µl sans dommage pour celle-ci. Après une année d'utilisation la colonne en service présente des caractéristiques toujours acceptables malgré des conditions analytiques particulièrement drastiques. L'utilisation d'un standard externe limite les erreurs dues à l'injection. Ce standard est disponible facilement dans le commerce et dispense de synthétiser un analogue structural du SOAz utilisé comme standard interne par d'autres auteurs [6]. Les techniques d'extractions et de dosages, très simples, s'appliquent à tous les liquides biologiques et

TABLEAU III

### PARAMÈTRES PHARMACOCINÉTIQUES DU PATIENT P.E.

1e courbe équation:  $13.845 e^{-4.104t} + 6.971 e^{-0.1162t}$

2e courbe équation:  $15.707 e^{-0.2214t} + 0.3719 e^{-0.02873t}$

Paramètre	1e injection	2e injection
$t_1$ ½ min	10.1	187
$t_2$ ½ min	357.8	1447
$V_{d_1}$ l	20.6	18.7
$V_{d_2}$ l	34.7	14.2
$V_{d \text{ tot}}$ l	58.4	124
$K_{12}$	0.0406	$42 \cdot 10^{-5}$
$K_{21}$	0.0242	$55 \cdot 10^{-5}$
$K_{el}$	0.00548	0.00319
$Cl_{tot}$ ml min <sup>-1</sup>	113	59.6
Urines		
0-12 h	114.5 mg 26.6%	77.5 mg 26.8%
12-24 h	26 mg 32.7%	12 mg 29.8%
24-48 h	7 mg 34.3%*	1.3 mg 30.3%*
Toxicité (classification EORTC)		
Polynucléaires	II	III
Plaquettes	III	III

\* Ces pourcentages représentent la fraction totale de la drogue éliminée dans les urines.

organes et permettent d'aborder la pharmacocinétique plasmatique faite chez l'homme et montrent qu'il existe de très grandes variations entre individus et que l'administration répétée de ce médicament semble entraîner une profonde modification des paramètres pharmacologiques (voir Tableau III).

L'élimination se fait préférentiellement par voie urinaire sous forme inchangée pour 30 à 60%. Il n'a pas été mis en évidence de forme conjuguée. L'étude de différentes formes de traitements mathématiques des données pharmacocinétiques fait l'objet d'un travail plus approfondi dans notre institut.

#### REMERCIEMENT

Nous remercions Mme R. Dufour pour sa collaboration technique au cours de nos différents essais.

#### RÉSUMÉ

Il est décrit une méthode de dosage d'un nouvel antitumoral, le SOAz [1,3,3,5,5-pentakis-(aziridino)- $\lambda^6$ ,2,4,6,3 $\lambda^5$ ,5 $\lambda^5$ -thiatriazadiphosphorine-1-oxide] utilisant la chromatographie en phase gazeuse avec colonnes capillaires et détecteur thermoionique. La quantité minimum mesurable est de 100 pg par injection, l'utilisation d'un standard externe permet d'obtenir des coefficients de variation inférieurs à 5%. La méthode est applicable aussi bien aux liquides biologiques qu'aux organes et permet d'étudier la pharmacocinétique chez l'homme et la distribution de la drogue dans les différents tissus chez l'animal. Les études préliminaires chez l'homme montrent que la cinétique est bien décrite par un système bi-compartimental ouvert.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 J.F. Labarre, F. Sournies, J.C. van de Grampel et A.A. van der Huizen, ANVAR French Patent No. 79-17336, July 4 (1979).
- 2 J.F. Labarre, F. Sournies, S. Cros, G. Francois, J.C. van de Grampel et A.A. van der Huizen, Cancer Lett, 12 (1981) 241.
- 3 T. Uchida, Y. Ogata, Y. Umeno, Y. Mirami et T. Mamnaka, J. Chromatogr., 235 (1982) 527.
- 4 E. Matsushima, Y. Umeno et T. Mamnaka, Taiko Pharmaceutical C. Ltd. et H. Akaji, Otsuka Chemical Co. Ltd., communication personnelle
- 5 S. Nasca, D. Jezekova, P. Coninx, E. Garbe, Y. Carpentier et A. Cattan, Cancer Treat. Rep., 66 (1982) 2039.
- 6 M.H. Beucken, S. Rodenhuis, J.C. van de Grampel and D.R.A. Uges, communication personnelle.