

Exercice

On dose un principe actif A de $pK_a = 7,1$ et son métabolite oxydé B de $pK_a 5,3$ dans le plasma à l'aide de 2 méthodes, une méthode chromatographique et une méthode spectroscopique. On précise que le principe actif A et son métabolite oxydé sont des acides faibles.

1) Analyse par spectroscopie UV

A 2mL de plasma, on ajoute 1 mL d'éthanol pour précipiter les protéines. Après centrifugation, le surnageant est récupéré. Les absorbances de cette solution déterminées à 254 nm et 282 nm dans une cuve de 1 cm d'épaisseur sont respectivement de 0,48 UA et de 0,10 UA. Les coefficients d'extinction spécifiques (en $L.g^{-1}.cm^{-1}$) en fonction des longueurs d'onde sont les suivants :

| | Principe actif A | Métabolite oxydé B |
|--|------------------|--------------------|
| Coefficients d'extinction spécifiques à 254 nm (en $L.g^{-1}.cm^{-1}$) | 120 | 22 |
| Coefficients d'extinction spécifiques à 282 nm (en $L.g^{-1}.cm^{-1}$) | 21 | 259 |

Question 1

Déterminer les concentrations du principe actif A et de son métabolite B dans le surnageant en mg/L.

Question 2

En déduire les concentrations du principe actif A et de son métabolite B dans l'échantillon plasmatique en mg/L.

2) Analyse par méthode chromatographique

A 1 mL de plasma, on ajoute 2 mL d'éthanol pour précipiter les protéines. Après centrifugation, le surnageant est récupéré. Le surnageant est directement analysé et 20 μ L sont injectés dans le système chromatographique. On utilise une phase stationnaire greffée en C18 et une phase mobile constituée d'un mélange volume à volume méthanol/tampon acétate à pH 3,0. La détection UV est réalisée à deux longueurs d'onde.

Après intégration des pics chromatographiques, les résultats sont les suivants :

| | Principe actif A | Métabolite oxydé B |
|------------------------|------------------|--------------------|
| Aire des pics à 254 nm | 3038 | 9 |
| Aire des pics à 282 nm | 250 | 105 |

Le maximum d'absorbance du principe actif A étant observé à 254 nm, sa concentration obtenue dans les mêmes conditions expérimentales à partir de solutions étalons est déterminée à cette longueur d'onde selon la droite d'étalonnage suivante :

$$Y_A = 1504 C_A + 30$$

Le maximum d'absorbance du métabolite B est observé à 282 nm, sa concentration est déterminée à cette longueur d'onde selon la droite d'étalonnage suivante :

$$Y_B = 3156 C_B + 4$$

Y_A et Y_B représentent l'aire des pics en mAU/s

C_A et C_B représentent la concentration de chaque composé en mg/L.

Question 3

Préciser l'état d'ionisation du principe actif et de son métabolite oxydé. En déduire l'ordre d'élution si on considère le métabolite oxydé plus polaire que le principe actif.

Question 4

Déterminer les concentrations du principe actif A et de son métabolite B dans la solution injectée en mg/L.

Question 5

En déduire les concentrations du principe actif A et de son métabolite B dans l'échantillon plasmatique en mg/L.

Corrections

Question 1

Sachant que les absorbances sont additives : $120 C_A + 22 C_B = 0,48$ et $21 C_A + 259 C_B = 0,10$

On en déduit les concentrations : $C_A = 4,0 \cdot 10^{-3}$ g/L soit 4,0 mg/L

et $C_B = 0,063 \cdot 10^{-3}$ g/L soit 0,063 mg/L

Question 2

$$C_{A \text{ plasma}} = 4,0 \times 3 / 2 = 6,0 \text{ mg/L}$$

$$C_{B \text{ plasma}} = 0,063 \times 3 / 2 = 0,095 \text{ mg/L}$$

Question 3

Pour les 2 molécules, le pH est inférieur à $pK_a - 1$, donc elles sont sous leur forme non ionisée AH.

Le mécanisme de rétention est le partage (chromatographie à polarité de phases inversée)

La molécule la plus polaire (le métabolite oxydé) est éluée en premier

Ordre d'élution : 1/ métabolite oxydé B 2/ principe actif A

Question 4

$$3038 = 1504 C_A + 30 \text{ soit } C_A = 2,0 \text{ mg/L}$$

$$105 = 3156 C_B + 4 \text{ soit } C_B = 0,032 \text{ mg/L}$$

Question 5

$$C_{A \text{ plasma}} = 2,0 \times 3 / 1 = 6,0 \text{ mg/L}$$

$$C_{B \text{ plasma}} = 0,032 \times 3 / 1 = 0,096 \text{ mg/L}$$