

Journal of Chromatography, 272 (1983) 193–199

Biomedical Applications

Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 1467

Note

Dosage du méthoxy-5 psoralène dans le plasma par chromatographie en phase liquide et detection spectrofluorimétrique

P. PROGNON, G. SIMON et G. MAHUZIER*

Laboratoire de Chimie Analytique, Centre d'Études Pharmaceutiques, Université Paris Sud, rue Jean Baptiste Clément, 92220 Chatenay-Malabry (France)

(Reçu le 8 avril 1982; manuscrit modifié reçu le 4 août 1982)

Le méthoxy-5 psoralène (5 MOP, I) est une furocoumarine qui vient d'être introduite récemment dans le traitement du psoriasis.

Deux heures après son absorption orale, une irradiation de la lésion par des rayonnements UVA (320–400 nm) entraîne après plusieurs séances la disparition des symptômes cliniques. Cette association, appelée puvathérapie [1], est depuis longtemps pratiquée avec son homologue le méthoxy-8 psoralène (8 MOP, II) [2]. Avec ce dernier produit, l'apparition d'effets secondaires pour certaines posologies et la nécessité de déterminer sa pharmacocinétique ont nécessité la mise au point de méthodes faisant appel à la chromatographie en phase gazeuse [3–6], à son couplage avec la spectrométrie de masse [7, 8], ou à la chromatographie liquide. Dans ce cas, la détection met à profit l'absorbance dans l'ultraviolet des psoralènes [9–11].

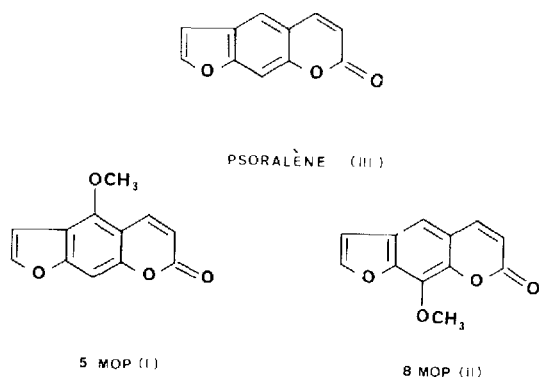
De telles techniques peuvent selon toute vraisemblance être appliquées au dosage du 5 MOP. Cependant celui-ci présente une fluorescence dix fois plus importante que le 8 MOP qui peut être exploitée pour obtenir une meilleure sensibilité et surtout une meilleure spécificité de détection.

La méthode proposée met en oeuvre une chromatographie liquide avec une détection spectrofluorimétrique. L'étalon interne est le psoralène (III). Elle permet ainsi d'atteindre une limite de 5 ng de 5 MOP par ml de plasma, alors qu'en spectrophotométrie d'absorption la limite inférieure se situe aux alentours de 15 ng/ml.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Appareillage

Micropipettes automatiques réglables type SMI, tubes à extraction en verre



pyrex de 10 ml, tubes à hémolyse, agitateur type Vortex, évaporateur à sec Biobloc type 92617, spectrofluorimètre Perkin Elmer MPF 3L.

Le système chromatographique comprend: une pompe Chromatem 330 (Touzart et Matignon, Paris, France), un injecteur à boucle (20 μ l) Rheodyne 7125, une colonne en acier inox (30 cm \times 4.6 mm I.D.) remplie de Spherosil C₁₈, 5 μ m (Waters Assoc.) selon la méthode de Coq et al. [12], un spectrofluorimètre Schoeffel type FS 970 équipé d'un monochromateur d'entrée à 330 nm et d'un filtre de sortie (440 nm), un enregistreur multi-canaux Kipp en Zonen type BD 40 réglé avec un déroulement de papier de 5 mm/min.

Réactifs

Méthanol, éthanol, acétate d'éthyle Normapur (Prolabo, France), acide sulfurique, benzène "pour fluorimétrie" (Merck), Psoralène (Laboratoires Promedica, France), méthoxy-5 psoralène (Laboratoire GOUPIL, France), bisulfate de quinine (Prolabo, France).

Étalons

Solution de psoralène à 5 mg/l dans l'éthanol (solution A); solution de méthoxy-5 psoralène à 1 mg/l dans l'acétate d'éthyle (solution B).

Méthode d'extraction

1 ml de sérum ou de plasma est additionné de 100 μ l de solution A (étalon interne), agité au Vortex 30 sec, extrait par 2 ml de benzène après agitation mécanique de 15 min. L'ensemble est centrifugé pendant 10 min à 3000 rpm. La phase organique est prélevée, transférée dans des tubes à hémolyse puis évaporée à sec. L'extrait sec est repris par 50 μ l de méthanol et 20 μ l sont injectés dans le chromatographe.

Chromatographie en phase liquide

La phase mobile est constituée d'un mélange isocratique méthanol-eau (70:30, v/v). Le débit est maintenu à 1.5 ml/min. Les concentrations sont calculées à partir des rapports des hauteurs de pic par rapport à une courbe d'étalonnage.

Cet étalonnage est réalisé par extraction de sérum surchargé par des quan-

tités croissantes de 5 MOP (10–500 ng/ml) et par une même quantité d'étalon interne (500 ng/ml).

RÉSULTATS

La Fig. 1A représente un chromatogramme obtenu à partir du sérum d'un sujet non traité, la Fig. 1B représente celui obtenu chez le même sujet deux heures après l'absorption d'une gélule renfermant 45 mg de 5 MOP. Comme on le constate, les constituants normaux du plasma ne peuvent interférer sur le dosage du fait de la spécificité de la détection spectrofluorimétrique. La puvathérapie étant en principe réservée à des sujets n'ayant pas d'autres médicaments, il n'a pas été besoin de rechercher les interférences médicamenteuses.

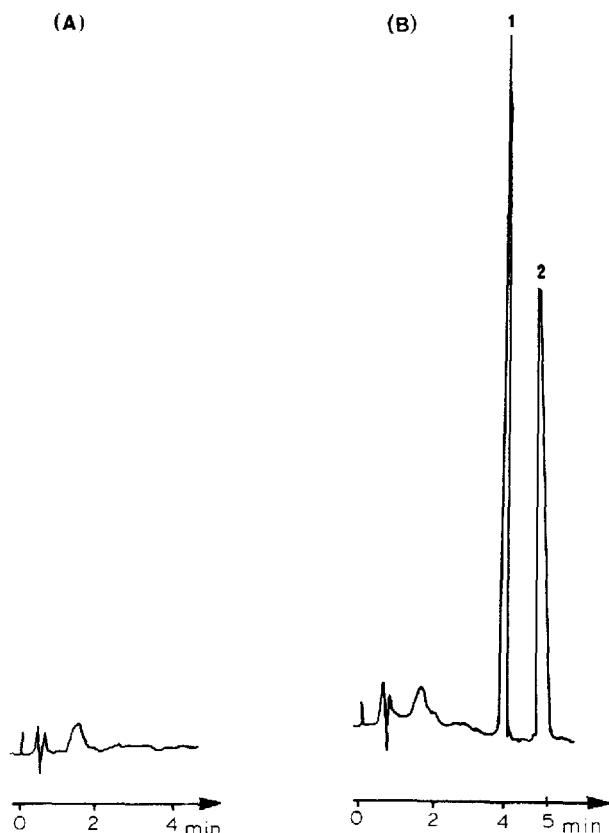


Fig. 1. (A) Chromatogramme d'un sérum de malade non traité; (B) chromatogramme d'un sérum de malade, 3 h après l'administration d'une gélule dosée à 45 mg de 5 MOP. (1) psoralène: temps de rétention 4 min, (2) 5 MOP: temps de rétention 5 min.

Les temps de rétention du psoralène et du 5 MOP sont respectivement de 4 et 5 min dans les conditions décrites. Les caractéristiques de la méthode ont été étudiées:

Le rendement d'extraction du 5 MOP est de $95 \pm 1.60\%$, la reproductibilité déterminée par l'analyse de dix échantillons surchargés donne des coefficients

de variations de 6.10% pour 25 ng/ml, 4.80% pour 100 ng/ml et 4% pour 500 ng/ml.

La linéarité de la méthode pour des concentrations de 0–500 ng/ml (0–0.0231 nmol/ml) est satisfaisante ($Y = 0.039 X + 0.022$; $r = 0.999$). La limite de sensibilité est de 4 ng/ml soit 0.007 nmol injectées dans un volume de 20 μ l.

DISCUSSION

Les propriétés de fluorescence présentées par le 5 MOP et le psoralène ont été mises à profit pour leur détection en chromatographie liquide. Au préalable, il a été nécessaire d'envisager l'influence, sur l'intensité de cette fluorescence, des différents facteurs pouvant intervenir lors de la séparation: nature de la phase mobile, variation du pH et de la force ionique.

Des essais préliminaires ont montré que le pH du milieu entre 2.5 et 7.5 ainsi que la force ionique entre 0.02 et 0.5 M ne modifient pas cette fluorescence. Par contre, celle-ci est influencée par la composition du mélange binaire eau–méthanol, classiquement utilisé en chromatographie liquide en phase inverse, qui intervient sur la longueur d'onde d'émission et sur l'intensité de cette fluorescence.

On constate en effet (Tableau I) que si la position des maxima d'excitation varie peu en fonction de la composition du solvant; les maxima d'émission subissent un effet bathochrome marqué avec l'augmentation de polarité du mélange.

TABLEAU I

INFLUENCE DU SOLVANT SUR LA POSITION DES LONGUEURS D'ONDES MAXIMA D'EXCITATION ET D'EMISSION DU 5 MOP

Solvant	λ_{exc}^{max}	λ_{em}^{max}
Méthanol	329	480
Méthanol–eau (70:30)	330	485
Méthanol–eau (5:95)	328	492

Ceci traduit l'augmentation de l'interaction dipole–dipole entre l'état excité légèrement polarisé de la molécule et le solvant qui caractérise une émission de fluorescence $\pi^* \rightarrow \pi$.

Les variations d'intensité de fluorescence du 5 MOP et du psoralène en fonction de la teneur en méthanol de la phase mobile ont été ensuite étudiées en déterminant les rendements quantiques relatifs de ces deux molécules selon la méthode proposée par Parker et Rees [13].

Cette notion présente l'avantage de définir précisément l'intensité de fluorescence d'une molécule dans des conditions de concentration et de solvant déterminées en la comparant à celle d'une substance dont les caractéristiques de fluorescence sont bien établies.

Les rendements quantiques présentés dans le Tableau II ont été calculés par rapport au bisulfate de quinine 10^{-6} M en solution sulfurique 0.1 N en se plaçant à une longueur d'excitation de 330 nm. Le rendement quantique du psoralène est maximum dans l'eau, alors que celui du 5 MOP l'est dans le méthanol. Un mélange méthanol-eau (50:50) permet cependant d'atteindre une bonne sensibilité.

TABLEAU II

RENDEMENT QUANTIQUE RELATIF DU 5 MOP ET DU PSORALÈNE EN FONCTION DE LA TENEUR EN MÉTHANOL DE LA PHASE MOBILE

	Méthanol (%)			
	0	50	70	100
5 MOP	$3.2 \cdot 10^{-3}$	$5.8 \cdot 10^{-3}$	$8.3 \cdot 10^{-3}$	$1.2 \cdot 10^{-2}$
Psoralène	$1.5 \cdot 10^{-2}$	$1.2 \cdot 10^{-2}$	$1.0 \cdot 10^{-2}$	$6.5 \cdot 10^{-3}$

À partir de ces résultats, des essais rapportés dans le Tableau III ont été effectués pour préciser la composition et le débit de la phase mobile permettant d'obtenir une bonne séparation.

Il apparaît que, d'une part, le pH apparent est sans influence sur la résolution des deux molécules, d'autre part que l'augmentation de la teneur en méthanol ainsi que l'augmentation du débit diminuent les k' . Les valeurs de 50, 60 et 70% en méthanol semblent acceptables, mais une valeur de 70% a été cependant choisie car dans ces conditions le rendement quantique du 5 MOP est plus élevé ($8.3 \cdot 10^{-3}$) et l'on obtient ainsi une meilleure sensibilité de détection spectrofluorimétrique.

Un exemple d'application de cette technique est donné sur la Fig. 2 où sont reportés les taux sériques déterminés chez un même malade ayant ingéré à jeun en l'absence de toute autre thérapeutique, par voie orale, 45 mg de 5 MOP sous forme de gélule et la même dose sous forme de solution hydro-alcoolique [eau-éthanol (50:50) à 90°]. Comme pour le 8 MOP, les posologies habituelles sont de 0.60 mg/kg. Les équations des concentrations sanguines, au cours du temps, sont également reportées ainsi que les constantes d'absorption, d'élimination et les temps de demie-vie qui indiquent un modèle de type monocompartimental pour les deux formes.

CONCLUSION

La méthode proposée est simple, rapide et reproductible. Son originalité repose sur l'exploitation des propriétés de fluorescence du 5 MOP qui lui confère une sensibilité et une spécificité applicable aux dosages de cette molécule dans les milieux biologiques lors des études pharmacocinétiques et de métabolisme ou lors de la détermination des susceptibilités individuelles.

TABLEAU III

VARIATION DES FACTEURS DE CAPACITÉ k' DU 5 MOP ET DU PSORALÈNE EN FONCTION DE LA COMPOSITION DE LA PHASE MOBILE, DU DÉBIT ET DU pH APPARENT

	pH apparent 5; débit 1.5 ml/min Eau-méthanol (v/v)		pH apparent 5; eau-méthanol (30:70, v/v)		Débit 1.5 ml/min; eau-méthanol (30:70, v/v)		pH apparent
	50:50	40:60	30:70	20:80	0.5	1	
					1.5	2	2.5
					1.5	2	4
					1.5	2	5
k' 5 MOP	5	3.7	2.8	2	3	2.8	2.8
k' PSO	3.6	2.5	1.9	0.95	2.7	1.9	1.9
					2	1.8	2.8
					2	1.8	1.9
					2	1.8	1.9
					2	1.8	1.92
					2	1.8	2.81

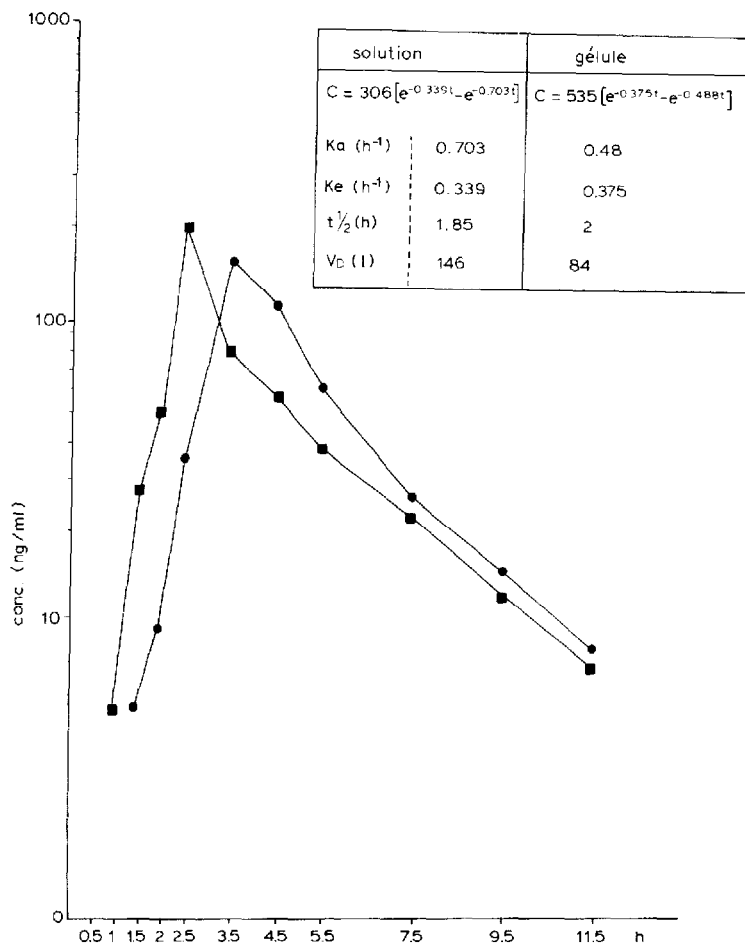


Fig. 2. Taux sériques de 5 MOP chez un même malade ayant ingéré deux formes orales de 5 MOP également dosées: 45 mg en une seule prise sous forme de solution (■—■) ou gélule (●—●).

BIBLIOGRAPHIE

- 1 T.F. Anderson et J.J. Voorhees, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 20 (1980) 235.
- 2 K. Wolff, T.D. Fitzpatrick, J.A. Parrish, F. Gschnait, B. Gilchrest, H. Honigsmann, M.A. Pathack et L. Tannenbaum, *Arch. Dermatol.*, 112 (1976) 943.
- 3 J. Gazith et H. Schaefer, *Biochem. Med.*, 18 (1977) 102.
- 4 H. Ehrsson, S. Eksborg, I. Wallin, N. Kallberg et G. Swanbeck, *J. Chromatogr.*, 140 (1977) 157.
- 5 J. Schmid et F.W. Koss, *J. Chromatogr.*, 146 (1978) 498.
- 6 J. Gazith, W. Schalla et H. Schaefer, *Arch. Dermatol. Res.*, 263 (1978) 215.
- 7 C.N. Hensby, *Clin. Exp. Dermatol.*, 3 (1978) 355.
- 8 J. Schmid, A. Prox, H. Zipp et F.N. Koss, *Biom. Mass Spectrom.*, 7 (1980) 560.
- 9 C.V. Puglisi, J.A.F. de Silva et J.C. Meyer, *Anal. Lett.*, 10 (1977) 39.
- 10 J. Kreuter et T. Higuchi, *J. Pharm. Sci.*, 68 (1979) 451.
- 11 B. Ljungeren, D.M. Carter, J. Albert et T. Reid, *J. Invest. Dermatol.*, 74 (1980) 59.
- 12 B. Coq, G. Gonnet et J.L. Rocca, *J. Chromatogr.*, 106 (1975) 249.
- 13 C.A. Parker et W.T. Rees, *Analyst (London)*, 85 (1960) 587.