

Journal of Chromatography, 225 (1981) 509–515

Biomedical Applications

Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 970

Note

Dosage de l'acide dipropylacétique dans le plasma par chromatographie en phase liquide et détection spectrofluorimétrique

H. CISSE

Service Pharmaceutique, C.H.U. Bichat, 46 rue Henri Huchard, 75018 Paris (France)

R. FARINOTTI*

*Service Pharmaceutique, C.H.U. Bichat, 46 rue Henri Huchard, 75018 Paris, et Laboratoire de Chimie Analytique, Centre d'Études Pharmaceutiques, Université Paris-Sud, Rue J. Baptiste Clément, 92290 Chatenay Malabry (France)**

S. KIRKIACHARIAN

Laboratoire de Pharmacie Chimique, Centre d'Études Pharmaceutiques, Université Paris-Sud, Rue J. Baptiste Clément, 92290 Chatenay Malabry (France)

et

A. DAUPHIN

Service Pharmaceutique, C.H.U. Bichat, 46 rue Henri Huchard, 75018 Paris (France)

(Reçu le 29 décembre 1980; manuscrit modifié reçu le 8 mai 1981)

L'acide dipropylacétique (DPA) ou acide valproïque, sous forme de sel de sodium est utilisé en thérapeutique pour ses propriétés anticonvulsivantes, le plus souvent en association avec le phénobarbital. Son dosage dans les milieux biologiques fait appel à des méthodes chromatographiques.

De nombreuses techniques de dosage en chromatographie en phase gazeuse (GLC) ont été décrites. Elles procèdent soit par injection directe, soit par dérivatisation [1–14]. Les principaux problèmes rencontrés et différemment résolus par les auteurs, étant liés aux pertes d'acide dipropylacétique lors de la phase finale de concentration et à l'adsorption de la molécule sur les supports chromatographiques.

Le développement et les facilités d'utilisation de la chromatographie en phase liquide (HPLC) au laboratoire ont été à l'origine de la mise au point d'un certain nombre de dosages.

Cependant, la faible absorbance du DPA dans l'ultra-violet nécessite en HPLC, soit une détection colorimétrique en sortie de colonne, basée sur ses propriétés acides [15], soit une détection dans l'ultra-violet après formation d'esters [16–19]. Afin d'augmenter la sensibilité du dosage par HPLC, nous proposons une méthode rapide et spécifique avec une détection fluorimétrique. Elle consiste en la formation d'un ester fluorescent avec la bromométhyl-4-méthoxy-7-coumarine (BrMmC). L'étalon interne utilisé est l'isomère linéaire du DPA: l'acide caprylique. Cette technique est utilisable en routine pour l'évaluation des taux plasmatiques de DPA lors des traitements.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Appareillage

Le chromatographe en phase liquide utilisé est constitué d'une pompe Chromatem 380 (Touzart et Matignon), d'un injecteur à boucle (20 μ l) Rhéodyne 7125.

Le détecteur est un spectrofluorimètre Jobin-Yvon JY 3D équipé d'une microcuve à circulation de 20 μ l.

La colonne (15 cm \times 9 mm I.D.) est remplie de Sphérisorb ODS (5 μ m) (Touzart et Matignon, Paris, France) selon la méthode de Coq et al. [20].

Le chromatographe en phase gazeuse est un Girdel 3000 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. La colonne en inox (2 m \times 2 mm I.D.) est chauffée à 140°C, l'injecteur à 160°C et le détecteur à 170°C.

Le débit d'azote (gaz vecteur) est de 30 ml/min. La phase stationnaire est constituée de 10% de butanediol succinate et 3% d'acide phosphorique sur GasChrom Q 80–100 mesh (Girdel, Rueil-Malmaison, France).

La chromatographie semi-préparative est réalisée sur des plaques de Kieselgel 60F 254 d'une épaisseur de 2 mm (Merck, Darmstadt, R.F.A.).

Réactifs

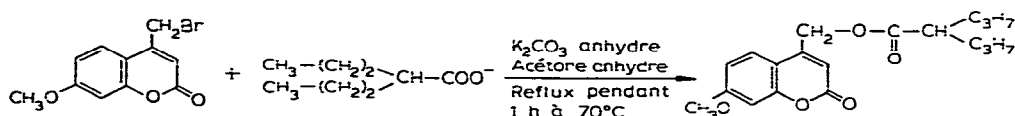
Bromométhyl-4-méthoxy-7-coumarine: Regis Chemical Co. (Morton, Grove, IL, É.U.). 18 Crown-6-éther: Aldrich (Milwaukee, WI, É.U.). Acide caprylique: Applied Science Labs. (State College, PA, É.U.). Ethanol, méthanol, acétone, acétonitrile, éther (Normapur): Prolabo (Paris, France). Acide perchlorique 70%: Prolabo. Dipropylacétate de sodium: Laboratoires Labaz, Bordeaux, France.

Étalons

Solution de bromométhyl-4-méthoxy-7-coumarine à 2 g/l dans l'acétone. Solution d'acide caprylique à 1 g/l dans l'acétonitrile. Solution aqueuse de dipropylacétate de sodium à 1.16 g/l (correspondant à 1 g/l de DPA). Solution de 18 crown-6-éther à 1 g/l dans l'acétone. Acide chlorhydrique 5 N. Soude méthanolique 0.05 N.

Préparation de l'ester de référence

L'ester de référence a été préparé selon la méthode proposée par Dünge et al. [21]. La schéma de la réaction est le suivant:



Les rapports molaires sont de 1 *M* de DPA pour 3 *M* de BrMmC. La solution acétonique est filtrée. Le filtrat est évaporé à sec et recristallisé plusieurs fois dans l'éthanol. La présence d'impuretés nécessite cependant une purification par chromatographie préparative sur gel de silice. Le solvant de migration est un mélange hexane—chloroforme (3:8, v/v). L'identité des cristaux obtenus a été déterminée par spectrophotométrie infra-rouge et par résonance magnétique nucléaire.

Méthode d'extraction et de dérivatisation

Après acidification par 100 μ l de HCl 5 *N* et addition de 75 μ l de la solution d'étalon interne, 0.5 ml de plasma sont extraits par 10 ml d'éther. La phase étherée est desséchée sur du sulfate de sodium anhydre puis récupérée dans des fioles coniques. Après addition de 0.5 ml de solution de soude méthanolique 0.05 *N* et de 2 mg de carbonate de potassium anhydre, la phase organique est évaporée à sec. La fiole est entourée d'un film de papier aluminium. Au résidu sont ajoutés 420 μ l de BrMmC et 100 μ l de solution de 18-crown-6-éther. Un réfrigérant à air est adapté sur la fiole. L'ensemble est ensuite porté au bain-marie à 70°C pendant 15 min. La phase organique est récupérée, évaporée à sec. Le résidu est repris par 100 μ l de méthanol.

Chromatographie en phase liquide

Vingt μ l du résidu sont injectés dans le chromatographe. La phase mobile est constituée d'un mélange méthanol—eau—HClO₄ (70:30:0.05, v/v). Le débit est maintenu à 2 ml/min. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de fluorescence sont respectivement de 336 et 408 nm. Les concentrations sont calculées à partir des rapports de hauteurs de pic en référence à une courbe d'étalonnage. Cet étalonnage est réalisé par extraction et dérivatisation de plasma surchargé par des quantités croissantes de dipropylacétate de sodium (de 1 à 150 mg/l d'acide dipropylacétique) et par une même quantité d'étalon interne.

RÉSULTATS

La Fig. 1A représente le chromatogramme du plasma d'un sujet traité par du DPA sodique. On constate, par rapport au plasma d'un sujet non traité (Fig. 1B), que les constituants normaux n'interfèrent pas sur le tracé.

Le DPA n'absorbant pas dans l'ultra-violet, le rendement de l'extraction par l'éther a été étudié par chromatographie en phase gazeuse. Il est de $95.7 \pm 9.7\%$.

La reproductibilité de la méthode déterminée par l'analyse de 10 échantillons surchargés donne des coefficients de variation de 8.2% pour 50 mg/l, 6.4% pour 75 mg/l et 5.8% pour 100 mg/l.

La linéarité de la méthode pour des concentrations de 0 à 1.04 mmol/l (0 à 150 mg/l) est satisfaisante ($y = 0.01x + 0.01$, $r = 0.999$).

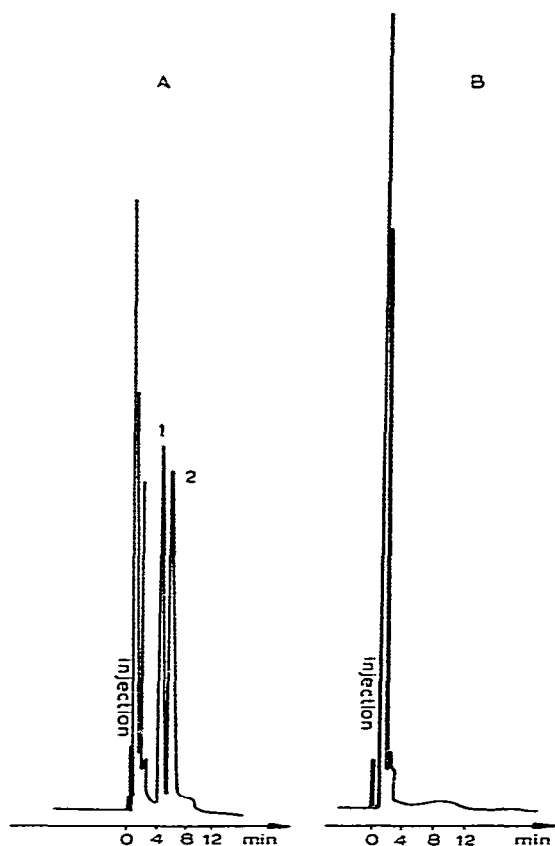


Fig. 1. (A) Chromatogramme d'un plasma humain. (1) DPA-MmC (107 mg/l) en DPA, temps de rétention = 4.6 min. (2) Ester coumarinique de l'acide caprylique, temps de rétention = 6.7 min. (B) Chromatogramme du plasma d'un sujet non traité.

La limite de sensibilité déterminée est de 0.5 mg/l, soit 0.75 μ mol injecté dans un volume de 20 μ l.

DISCUSSION

Le spectre de fluorescence de l'ester DPA-Mmc a été étudié dans les solvants classiquement utilisés en chromatographie liquide en polarité de phase inversée: l'eau, le méthanol, l'acétonitrile. Quelle que soit la nature du solvant, les maxima d'excitation et d'émission sont peu modifiés (Fig. 2): $\lambda_{exc.} = 336$ nm, $\lambda_{ém.} = 408$ nm. Cependant, comme le montre le Tableau I, la fluorescence est inhibée dans l'acétonitrile. Des phases méthanol-eau sont essentiellement retenues et les sensibilités optimales sont atteintes avec un mélange ayant une teneur en eau voisine de 60%. Les variations de pH (1 à 5) et de force ionique (0.04 à 0.5) ont peu d'influence sur l'intensité de la fluorescence. D'autre part, il est observé que celle-ci, pour une solution méthanolique conservée à 4°C à l'obscurité est stable pendant quinze jours.

La cinétique de la réaction d'estérification en présence de 18-crown-6-

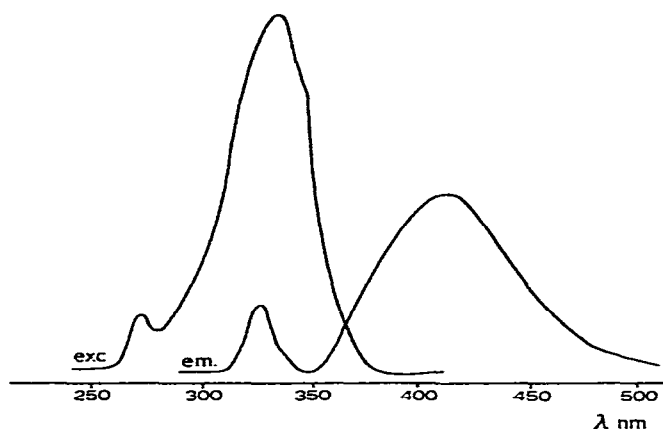


Fig. 2. Spectre de fluorescence du DPA-MmC dans le mélange eau-méthanol (30:70, v/v).

TABLEAU I

INTENSITE RELATIVE DE FLUORESCENCE DU DPA-MmC DÉTERMINÉE PAR RAPPORT AU DÉRIVÉ DIMÉTHOXY-5,7-COUMARINE-4-ACÉTIQUE (CONCENTRATION $2 \cdot 10^{-6}$ M), EN FONCTION DE LA NATURE DU SOLVANT

Solvant	Intensité relative de fluorescence
Eau	0.42
Méthanol	0.13
Acétonitrile	0
Eau-méthanol (20:80)	0.25
Eau-méthanol (40:60)	0.37
Eau-méthanol (60:40)	0.45
Eau-méthanol (80:20)	0.39

éther et de K_2CO_3 a été déterminée pendant une heure à des températures de 30, 50 et 70°C. La Fig. 3 montre que les conditions optimales sont réalisées pour une température de 70°C pendant 15 min. Dans ces conditions, un rapport molaire 1 M DPA et 2 M BrMmC est suffisant pour l'obtention d'une réaction totale. Par ailleurs, l'évaporation de la phase étherée avant estérification n'occasionne aucune perte d'acide dipropylacétique puisqu'il se trouve sous la forme de sel de sodium.

Compte-tenu des données de la littérature et de la faible polarité des esters obtenus, la chromatographie en polarité de phase inversée semble être la méthode de choix, qui permet une bonne séparation des deux isomères. Le choix des conditions chromatographiques a été en partie imposé par les résultats de l'étude de fluorescence. Le Tableau II rapporte les valeurs des facteurs de capacité du DPA-MmC et de l'ester coumarinique de l'acide caprylique, en fonction de la polarité de la phase mobile eau-méthanol et du pH.

L'augmentation de la teneur en méthanol diminue les k' ainsi que la sélectivité, alors que la diminution du pH, si elle diminue les k' , semble sans effet sur la sélectivité. Compte-tenu de la nécessité d'un temps d'analyse court, le

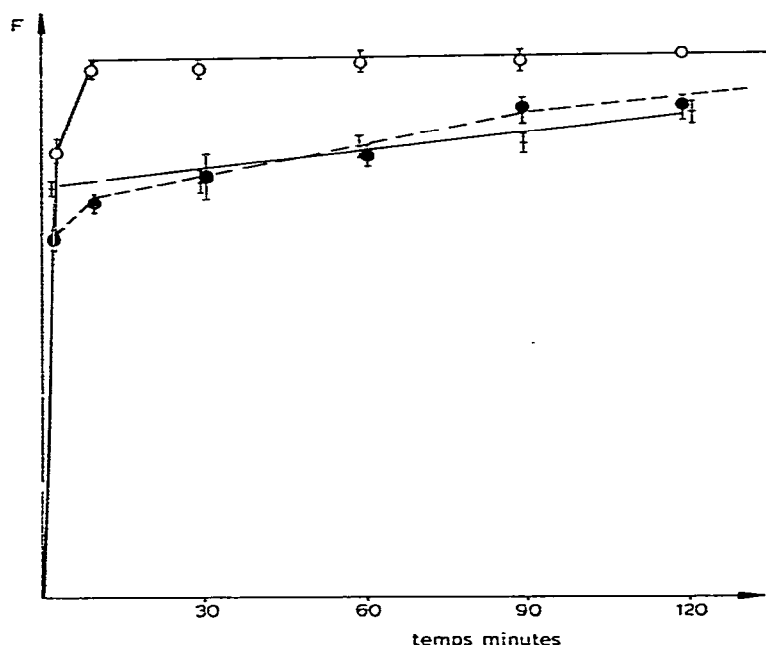


Fig. 3. Cinétique de la réaction d'estérification pour différentes températures: (—) 30°C, (•) 50°C, (○) 70°C. Rapport molaire BrMmC/DPA = 3:1.

TABEAU II

VARIATIONS DES FACTEURS DE CAPACITÉ k' , DES DÉRIVÉS COUMARINIQUES DU DPA ET DE L'ACIDE CAPRYLIQUE EN FONCTION DE LA POLARITÉ DE LA PHASE MOBILE ET DE SON pH

	k'					pH apparent**			
	Eau—méthanol (v/v)*								
	35:65	30:70	25:75	20:80	15:85	1	1.7	2.2	2.8
DPA-MmC	4.9	4.0	3.6	1.9	1.2	1.7	3.1	4.0	5.1
Acide caprylique-MmC	7.1	5.5	4.7	2.5	1.6	3.3	4.2	5.5	6.3

* pH apparent = 2.2.

** Eau—méthanol (30:70, v/v).

mélange eau—méthanol (30:70, v/v) et un pH apparent de 2.2 permet une bonne séparation des deux esters considérés.

CONCLUSION

La méthode proposée s'est révélée simple, rapide, fiable et utilisable en routine. L'emploi de la 18-crown-6-éther comme catalyseur permet l'obtention d'une estérification totale en 15 min. La comparaison des résultats avec ceux obtenus en GLC selon la méthode de Pfaff et Mahuzier [2] donne pour

22 extraits surchargés une corrélation de 0.961. La détection fluorimétrique permet d'atteindre une grande sensibilité (0.5 mg/l) et celle-ci a pu être améliorée (0.1 mg/l) en utilisant un fluorimètre adapté à la HPLC (cellule de 8 μ l). La détection des esters coumariniques est également possible, avec une sensibilité moindre, dans l'ultra-violet à 320 nm. De plus, comme l'a montré Dünge et Seiler [18], la bromométhyl-4-méthoxy-7-coumarine est susceptible d'alkyler des barbituriques et nous étudions au laboratoire un dosage simultané de plusieurs anticonvulsivants traités par ce réactif.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Monsieur le Professeur Mahuzier pour l'intérêt qu'il a porté à notre travail.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 J.W.A. Meijer et L. Messing Brand, Clin. Chim. Acta, 43 (1973) 215.
- 2 M.C. Pfaff et G. Mahuzier, Ann. Pharm. Fr., 33 (1975) 355.
- 3 L.J. Dusci et L.P. Hackett, J. Chromatogr., 132 (1977) 145.
- 4 C.J. Jensen et R. Gugler, J. Chromatogr., 137 (1977) 188.
- 5 M.H. Wood, D.C. Sampson et W.J. Hensley, Clin. Chim. Acta, 77 (1977) 343.
- 6 C. Jakobs, M. Bojasch et F. Hanefeld, J. Chromatogr., 146 (1978) 494.
- 7 S. Willox et S.E. Foote, J. Chromatogr., 151 (1978) 67.
- 8 D.J. Berry et L.A. Clarke, J. Chromatogr., 156 (1978) 301.
- 9 J.-C. Libeer, S. Scharpé, P. Schepens et R. Verkerk, J. Chromatogr., 160 (1978) 285.
- 10 O. Gyllenhaal et A. Albinsson, J. Chromatogr., 161 (1978) 343.
- 11 R.H. Levy, L. Martis et A.A. Lai, Anal. Lett., B11 (1978) 257.
- 12 N.R. Gupta, F. Eng et M.L. Gupta, Clin. Chem., 25 (1979) 1303.
- 13 D.J. Freeman et N. Rawal, Clin. Chem., 26 (1980) 674.
- 14 A. Sioufi, D. Colussi et F. Marfil, J. Chromatogr., 182 (1980) 241.
- 15 R. Farinotti et G. Mahuzier, J. Liquid Chromatogr., 2 (1979) 345.
- 16 W. Dünge, Anal. Chem., 49 (1977) 442.
- 17 E. Grushka, L. Stanley et J. Chassin, Anal. Chem., 50 (1978) 1298.
- 18 W. Dünge et N. Seiler, J. Chromatogr., 145 (1978) 483.
- 19 N.R. Gupta, P.M. Keane et M.L. Gupta, Clin. Chem., 25 (1979) 1984.
- 20 B. Coq, C. Gonnet et J.-L. Rocca, J. Chromatogr., 106 (1975) 249.
- 21 W. Dünge, A. Meyer, K.E. Müller, R. Pietschmann, C. Plachetta, R. Sehr et H. Tuss, Z. Anal. Chem., 288 (1977) 361.