

Note

Technique de dosage et variations des taux de l'*o,p'*-DDD plasmatique

A. ENGER*, J. M. BRUNETAUD et Y. MOSCHETTO

Centre de Technologie Biomédicale INSERM, 13 à 17 rue Camille Guérin, 59000 Lille (France)

et

H. CHOISY

Laboratoire de Pharmacologie Toxicologie et Chimie des Explorations fonctionnelles, Centre Hospitalier Régional, 45 rue Cognacq Jay, 51100 Reims (France)

(Reçu le 15 août 1977)

L'*o,p'*-DDD 1,1-dichloro-2-(*o*-chlorophényl) ethane structuralement proche du DDT est employé en thérapeutique comme inhibiteur de la synthèse stéroïdienne dans certains hyperfonctionnements surrénaliens. Outre les problèmes de tolérance que pose son emploi, il a été décrit des cas de rechute à l'arrêt du traitement, ou au contraire d'aplasie irréversible des surrénales¹.

La surveillance des patients ainsi traités pose un problème aigu au médecin prescripteur². Le but proposé est de savoir si l'on peut établir une corrélation entre le taux d'*o,p'*-DDD circulant et l'effet thérapeutique (récidive ou stabilisation de la maladie).

Nous avons étudié une technique de dosage simple de ce dérivé polychloré, faisant appel à la sensibilité et à la spécificité de la chromatographie en phase gazeuse (CPG) à détection par capture d'électrons.

La seule technique spécifique de dosage de l'*o,p'*-DDD décrite lorsque nous avons abordé ce travail était une méthode par spectrophotométrie³. Une autre technique de dosage par CPG avec détecteur à ionisation de flamme vient d'être décrite très récemment⁴.

Les implications thérapeutiques éventuelles ont été rapportées par ailleurs sur un petit nombre de cas⁵.

PARTIE EXPÉRIMENTALE ET RÉSULTATS

Chromatographie gaz-liquide

Nous utilisons un chromatographe en phase gazeuse avec détecteur à capture d'électrons au Ni63 (Modèle 5710A Hewlett-Packard) et une colonne de verre (1 m × 3 mm I.D.) garnie de Chromosorb G AW DMCS (80–100 mesh) à 1 % de OV-1. Le gaz vecteur d'un débit de 40 ml/min est de l'argon à 10 % de méthane, la température de colonne de 220°, avec température du détecteur 300° et température de l'injecteur 250°. Le DDT est employé comme étalon interne.

* À qui envoyer la correspondance.

Traitement des données chromatographiques

Il se fait par un couplage "en ligne" chromatographe ordinateur (modèle 2100 Hewlett-Packard) avec software 3352 B multifonctions). Les paramètres de l'analyse sont les suivants: fenêtre d'identification du standard interne, 30 sec; pourcentage d'erreur maximum sur les temps de rétention pour la reconnaissance d'un pic désigné, 1%; sensibilité de détection de pente, 0.01 V/min; mode d'intégration base-base; durée de l'analyse, 30 min.

Standards et réactifs

L'*o,p'*-DDD provient de chez Fluka (Buchs, Suisse), qualité "purissime". Le DDT provient du Kit 51 AX (polyscience Corp., Niles, Ill., U.S.A.). Le *n*-hexane est de qualité R.P. (Prolabo, Paris, France). Les solutions dosées sont préparées dans le *n*-hexane.

Prélèvements

Les échantillons sanguins sont prélevés sur tubes héparinés, immédiatement centrifugés et le plasma conservé à -18° .

Méthode d'extraction

À 2 ml de plasma on ajoute 1 ml d'une solution à 5 $\mu\text{g/ml}$ de DDT, puis 2 ml de *n*-hexane. Le tube est agité manuellement pendant 30 sec et centrifugé. On recueille la phase organique et l'on injecte 1 μl dans le chromatographe. Les temps de rétention sont donnés dans le Tableau I.

TABLEAU I

TEMPS DE RÉTENTION DE L'*o,p'*-DDD ET DU DDT

Pour les conditions de l'analyse voir le texte.

<i>Composé</i>	<i>Temps de rétention (min)</i>
<i>o,p'</i> -DDD	7.90 \pm 0.1
DDT	12.00 \pm 0.1

Linéarité et précision

Nous avons vérifié sur une série de 30 sérums prélevés au hasard, supposés ne pas renfermer de pesticides, qu'il n'y avait pas d'interférence dans les conditions de l'analyse (Fig. 1). Les résultats des mesures sont donnés dans le Tableau II.

DISCUSSION

Conditions expérimentales

Les taux relativement importants d'*o,p'*-DDD à mesurer, conjugués à la sensibilité du détecteur à capture d'électrons permettent d'éviter les complications des techniques classiques pour le dosage des pesticides. En particulier la chromatographie utilise une colonne courte peu chargée en phase stationnaire, suffisante pour séparer DDT et *o,p'*-DDD. Les temps d'analyse s'en trouvent réduits.

Au niveau de l'extraction, on évite les purifications sur acide silicique^{6,7},

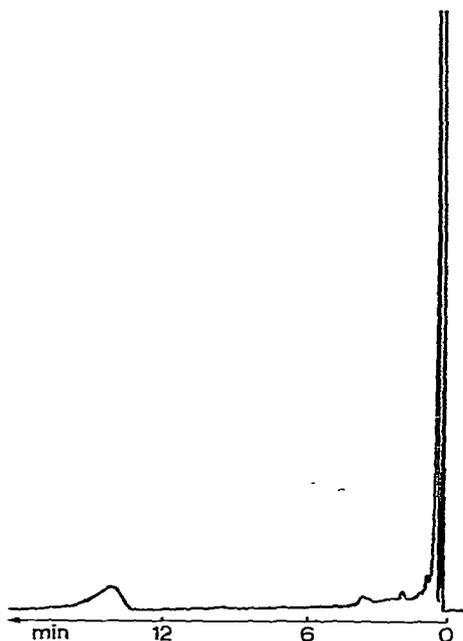


Fig. 1. Chromatogramme du blanc. Atténuation, $\times 8$. Pour les conditions voir le texte.

TABLEAU II

VALEURS OBTENUES À PARTIR DE SÉRUMS SURCHARGÉS EN DDT ET *o,p'*-DDD

Coefficient de réponse déterminé expérimentalement égal à 0.729 (rapport *o,p'*-DDD/DDT). Les concentrations en DDT et *o,p'*-DDD sont exprimées en μg par ml de sérum.

DDT ($\mu\text{g/ml}$)	<i>o,p'</i> -DDD ($\mu\text{g/ml}$)	Nombre de mesures	Rapport <i>o,p'</i> -DDD/DDT (moyenne)	Déviations standard	Coefficient de variation (%)
0.25	0.05	6	0.165	0.06	3.53
0.25	0.1	6	0.345	0.016	3.45
0.25	0.2	6	0.688	0.024	6.7
0.25	0.25	5	0.89	0.04	5.1
0.25	0.30	5	1.10	0.0065	0.6
0.25	0.40	7	1.60	0.10	6.25
0.25	0.50	22	2.08	0.11	5.46
0.25	1	7	4.28	0.57	13.3

Florisil⁷⁻⁹, Célite^{7,9} ou les lavages avec une solution de carbonate de potassium¹⁰, de même que l'emploi de solvants très purs, nécessaires pour la détermination des pesticides.

Ceci conduit à une technique très simple, dont la précision est de l'ordre de 5% à condition que le taux plasmatique d'*o,p'*-DDD soit supérieur à 0.1 $\mu\text{g/ml}$. Nous n'avons pas cherché à étendre la précision des mesures en dessous de cette limite qui est plus de 100 fois inférieure au pic sérique observé au cours du traitement.

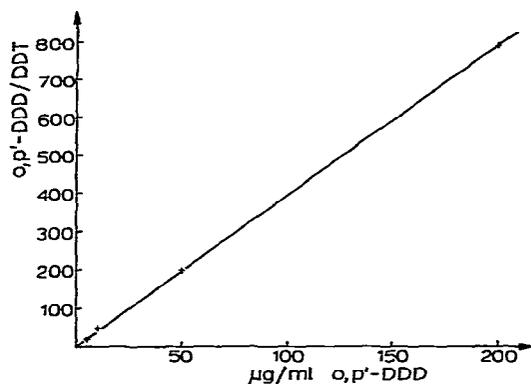
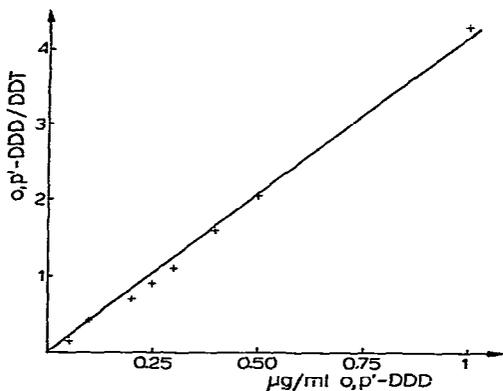


Fig. 2. Droite d'étalonnage obtenue à partir de sérums surchargés en *o,p'*-DDD et DDT pour une gamme de rapport *o,p'*-DDD/DDT variant de 0.05 à 4. Pour les conditions voir le texte.

Fig. 3. Droite d'étalonnage obtenue à partir de sérums surchargés en *o,p'*-DDD et DDT pour une gamme de rapport *o,p'*-DDD/DDT variant de 1 à 800. Pour les conditions voir le texte.

Résultats

Les droites d'étalonnage obtenues à partir de sérums surchargés en *o,p'*-DDD et DDT montrent que la linéarité est parfaite pour une gamme de rapports *o,p'*-DDD/DDT de 1 à 800 (Figs. 2 et 3). La limite de détection pour *o,p'*-DDD est inférieure à 5 pg, puisque pour cette quantité injectée nous obtenons une aire exprimée en unités arbitraires de 500 (Fig. 4).

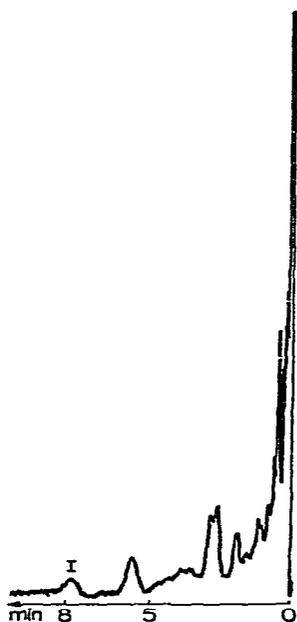


Fig. 4. Chromatogramme d'un sérum contenant de l'*o,p'*-DDD. Quantité injectée, 1 µl (5 pg); atténuation, $\times 2$. I = *o,p'*-DDD.

TABLEAU III

CONCENTRATIONS PLASMATIQUES (μg PAR ml DE SÉRUM) CHEZ QUATRE PATIENTS TRAITÉS PAR 9 g PAR 24 h D'*o,p'*-DDD SOUS FORME DE GÉLULES À DÉLITEMENT INTESTINAL

Concentrations après sevrage de durée variable, indiquée en parenthèses (mois).

Patient	Concentrations								
I	3.02*	2.15*	1.7*	(traitement interrompu)					
II	0.625	0.25	0.40	0.15	0.07	0.05	0.03	0.03	0.03
	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(13)	(17)	(19)
III	0.07	0.07	0.07	9.45*	2.9	2.6	0.5	0.05	
	(18)	(23)	(23)		(1)	(2)	(6)	(11)	
IV	0.03	0.03	0.025	0.03					
	(18)	(27)	(28)	(32)					

* En cours de traitement.

Les courbes d'évolution des taux plasmatiques (Tableau III) (Fig. 5) montrent que l'on obtient rapidement après prise du médicament un taux supérieur à $10 \mu\text{g/ml}$. Ces valeurs ne reviennent, après l'arrêt du traitement, à des taux inférieurs à $0.10 \mu\text{g/ml}$ qu'après plusieurs mois. Tous les malades ont présenté une rechute après un délai variable, mais leur taux d'*o,p'*-DDD plasmatique étant dans tous les cas inférieur à $0.2 \mu\text{g/ml}$.

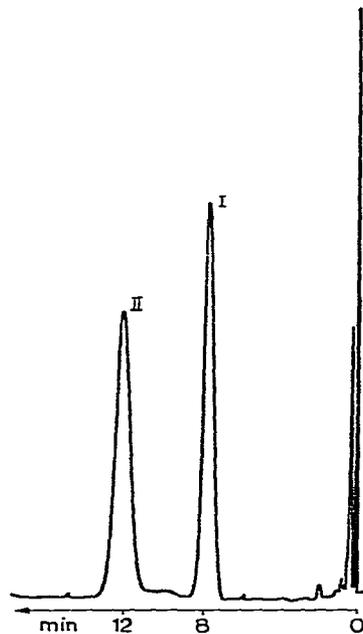
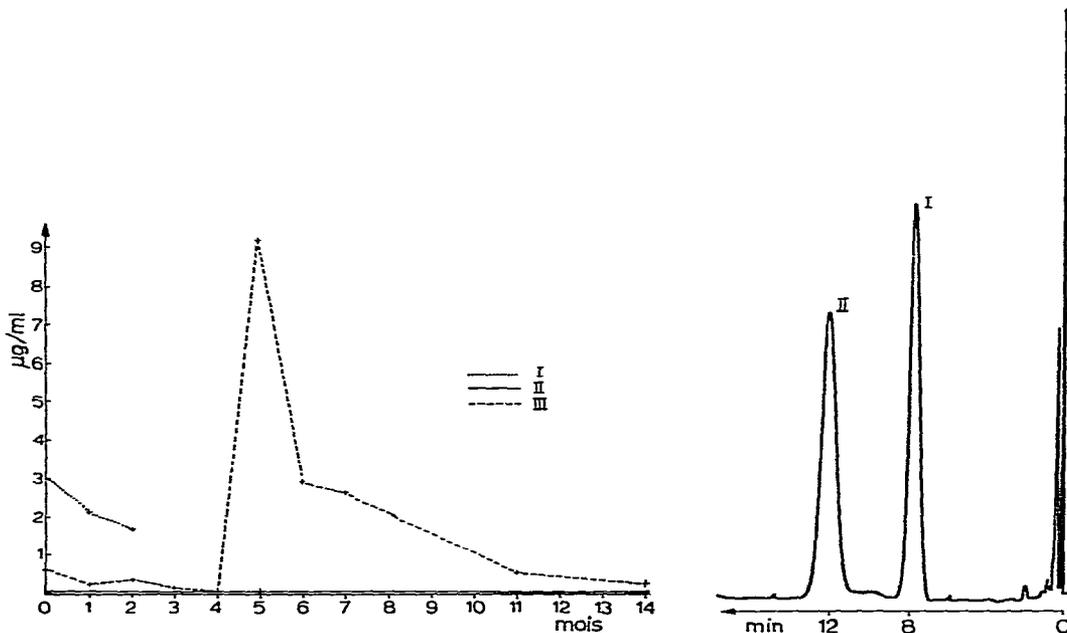


Fig. 5. Variation des taux plasmatiques (μg par ml de sérum) chez 3 patients recevant 9 g par 24 h d'*o,p'*-DDD sous forme de gélules à délitement intestinal.

Fig. 6. Chromatogramme d'un sérum contenant $0.5 \mu\text{g/ml}$ d'*o,p'*-DDD et de DDT. Quantité injectée, 3 ng; atténuation, $\times 16$.

Il n'est pas possible de tirer des conclusions quant à la surveillance thérapeutique de ces patients, le nombre de cas étant trop limité, mais ces faits nous incitent à poursuivre cette étude.

CONCLUSION

La technique décrite permet de doser l'*o,p'*-DDD plasmatique avec une bonne précision, tout en étant d'une réalisation technique très simple. Les premières études conduites sur quatre sujets ne permettent pas de tirer de conclusion quant à l'intérêt de ce dosage, mais laissent espérer une meilleure approche dans la surveillance des traitements par cet inhibiteur de la biosynthèse stéroïdienne qui présente une toxicité non négligeable.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 H. Bricaire et J. P. Luton, *Nouv. Presse Med.*, 5 (1976) 325.
- 2 D. L. Hoffmann et V. R. Mattox, *Med. Clin. N. Amer.*, 56 (1972) 999.
- 3 R. H. Moy, *J. Lab. Clin. Med.*, 58 (1961) 296.
- 4 J. Guilford et E. Hickman, *J. Chromatogr.*, 133 (1977) 218.
- 5 A. Enger, H. Millart, M. Leutenegger, J. Caron, J. Couchot, A. Gross et B. Maes, *Nouv. Presse Med.*, 6 (1977) 566.
- 6 J. A. Armour et J. A. Burke, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 53 (1970) 761.
- 7 W. L. Oller et M. F. Crammer, *J. Chromatogr. Sci.*, 13 (1975) 296.
- 8 J. H. Ford, C. A. MacDaniel, F. C. White, R. E. Vest et R. E. Roberts, *J. Chromatogr. Sci.*, 13 (1975) 291.
- 9 B. Versino, M. T. van der Venne et H. Vissers, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 54 (1971) 147.
- 10 L. Palmer et B. Kolmodin-Wedman, *J. Chromatogr.*, 74 (1972) 21.