

## CHROMBIO. 137

## Note

---

**Dosage sensible et rapide du chloramphenicol dans le serum par chromatographie liquide haute pression**

J.M. WAL, J.C. PELERAN et G. BORIES

*I.N.R.A., Laboratoire de Recherches sur les Additifs Alimentaires, 180, chemin de Tournefeuille, 31300 Toulouse (France)*

(Reçu le 16 novembre 1977)

Le développement de l'utilisation du chloramphénicol (CAP) en thérapeutique humaine et animale, soulève le problème de la détection et de la mesure des taux sériques de CAP libre, donc actif, tant sur le plan de la surveillance clinique des patients que sur celui des études de pharmacocinétique du CAP. Parmi les nombreuses méthodes décrites, aucune ne donne satisfaction sur les trois aspects de spécificité, sensibilité et facilité de mise en oeuvre recherchés. Les méthodes classiques de dosage microbiologique [1] présentent l'inconvénient majeur d'un manque de spécificité et de sensibilité. Un progrès a été apporté par les techniques spectrophotométriques [2, 3]. Elles sont fondées sur la mesure de l'amine formée après réduction du groupement nitré du cycle aromatique du CAP et de ses analogues, et pèchent là encore par manque de spécificité et de sensibilité. La chromatographie en phase gazeuse [4, 5] a permis de franchir un degré supplémentaire pour l'obtention d'une bonne spécificité et d'une grande sensibilité. Cependant les résultats obtenus dans une publication récente [6] portant sur des concentrations sériques de CAP de l'ordre de 5—20 mg/l font apparaître un taux de récupération limité à 64 %. Enfin deux méthodes très sensibles ont été récemment décrites, l'une est enzymatique [7], l'autre fluorimétrique [8]. La première, très sensible, présente l'inconvénient d'utiliser des isotopes radioactifs et de nécessiter l'emploi d'un compteur à scintillation liquide; la seconde quant à elle, est limitée par les phénomènes de fluorescence non spécifique, importants et variables, observés sur les échantillons témoins. C'est pourquoi nous nous proposons de décrire une méthode simple et rapide, spécifique et sensible de dosage du CAP dans le sérum. Elle est basée sur une analyse

en chromatographie liquide haute pression après extraction du CAP par l'acétate d'éthyle. Spécifique du CAP libre, à l'exclusion de ses analogues (esters succinique et palmitique, thiamphénicol) et de son principal métabolite (glucuroconjugué), elle permet de détecter, pour une prise d'essai de sérum de 0.5 ml, des taux de l'ordre de 250 ng/ml.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Réactifs*

Tous les solvants utilisés sont purs pour analyse (E. Merck, Darmstadt, R.F.A.). Les produits standard de référence sont: chloramphénicol (Calbiochem, San Diego, Calif., U.S.A.: B grade), thiamphénicol (Parke Davis, Ann Arbor, Mich., U.S.A.), esters palmitiques et succiniques de CAP préparés à partir de CAP standard.

### *Extraction*

0.5 ml de sérum sont dilués dans un volume égal de tampon phosphate 1 M pH 6.5. L'extraction du CAP est réalisée par deux fois 2 ml d'acétate d'éthyle dans des fioles coniques de 5 ml bouchées PTFE. Après filtration sur sulfate de sodium les phases organiques sont réunies et évaporées sous vide. Le résidu est repris par trois fois 1 ml d'acétonitrile saturé en isooctane dans une fiole conique de 5 ml. Après addition d'1 ml d'isooctane saturé en acétonitrile, agitation suivie d'une décantation, la phase supérieure (isooctane) est éliminée par aspiration. La phase acétonitrile est évaporée à sec dans la fiole sous un courant d'azote.

### *Chromatographie liquide haute pression*

L'extrait sec est repris par 0.1 ml d'acétate d'éthyle. 10  $\mu$ l de cette solution sont analysés en chromatographie liquide haute pression dans les conditions suivantes:

L'appareil utilisé est le modèle SP 3500 B Spectra-Physics, équipé d'un détecteur ultraviolet à 254 nm. La colonne (25 cm  $\times$  2.1 mm I.D.) est du type C<sub>18</sub> Spherisorb ODS phase inversée, granulométrie 5  $\mu$ m (Spectra Physics).

L'injection de l'échantillon est effectuée au moyen d'une microseringue Valco de 50  $\mu$ l dans une vanne équipée d'une boucle de capacité 10  $\mu$ l.

L'élution est réalisée par le mélange eau-méthanol (70:30) avec un débit de 0.8 ml/mn. La sensibilité du détecteur est établie à 0.005 unité d'absorbance pleine échelle.

Les pics sur le chromatogramme sont identifiés par leur temps de rétention, leur hauteur est mesurée et les concentrations en CAP des échantillons sont établies par comparaison avec une solution de référence de CAP standard dans l'acétate d'éthyle, de concentration connue et de valeur avoisinante, chromatographiée dans les mêmes conditions.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le chromatogramme obtenu à partir de la solution de référence de CAP dans l'acétate d'éthyle (5  $\mu$ g/ml) est représenté à la Fig. 1. Dans les condi-

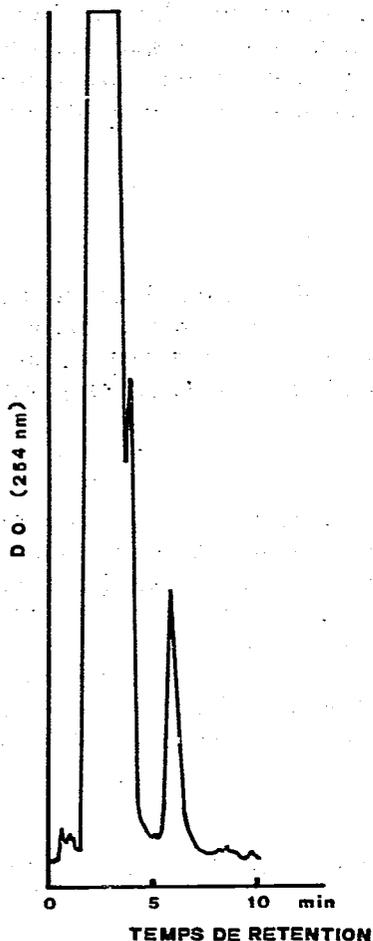


Fig. 1. Chromatogramme de CAP standard (50 ng injectés).

tions décrites le temps de rétention du CAP est de 6 min.

La linéarité de la réponse a été vérifiée pour des doses injectés de 10 ng à 100 ng.

La reproductibilité de l'analyse chromatographique a été estimée par 6 injections successives de 10  $\mu$ l de la solution de référence (50 ng de CAP standard). Le coefficient de variation mesuré est de 3 %.

La spécificité de la réponse a été testée pour le CAP, les esters succinique et palmitique et le thiamphénicol. Les conditions d'extraction du CAP restent valables pour le succinate et le palmitate ainsi que pour le thiamphénicol. Cependant dans les conditions chromatographiques décrites le palmitate est retenu sur la colonne alors que succinate et thiamphénicol sont élués dans le front du solvant. De plus, pour ce dernier la réponse spécifique est beaucoup plus faible que pour le CAP. Les glucuroconjugués du CAP, eux, ne sont pas extraits à l'acétate d'éthyle. Le pic observé est donc caractéristique du CAP libre et permet de le distinguer de ses analogues.

### Détermination dans le sérum

Dans les conditions décrites, les chromatogrammes obtenus avec des extraits, d'une part de sérum témoin normal, d'autre part du même sérum surchargé à  $1 \mu\text{g}$  de CAP par ml sont respectivement représentés aux Fig. 2a et b. Le temps de rétention et la réponse spécifique sont les mêmes que pour la solution standard. L'analyse du sérum témoin ne permet de mettre en évidence aucune interférence mesurable, qui viendrait limiter la sensibilité de la méthode.

Le taux de récupération a été mesuré sur 6 échantillons de sérum surchargés avec  $1 \mu\text{g}$  de CAP standard par ml.

Le taux de récupération moyen est de  $98.7\% \pm 5.8$ . La variabilité du dosage, exprimée par son coefficient de variation est donc inférieure à 6 %.

L'analyse d'un sérum surchargé de  $1 \mu\text{g}$  de CAP standard/ml se traduit par un pic de 6.5 cm de hauteur. Il est aisément possible d'apprécier et de mesurer avec précision un pic de hauteur quatre fois moindre. L'absence d'interférence sur le chromatogramme d'un extrait de sérum témoin permet

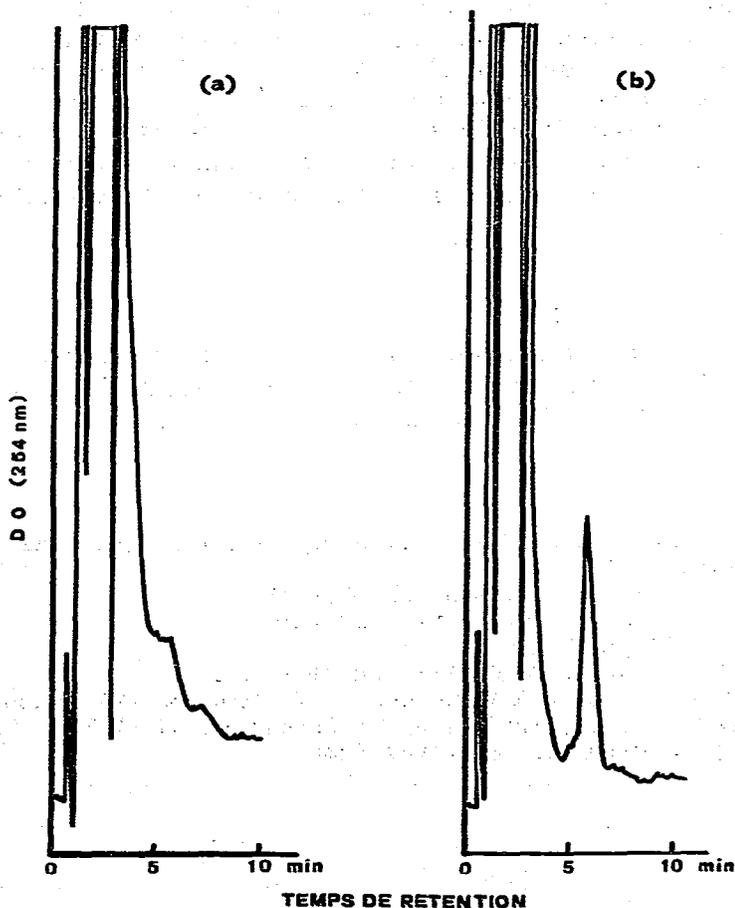


Fig.2. (a) Chromatogramme d'un extrait de sérum témoin. (b) Chromatogramme d'un extrait du même sérum surchargé à  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  de CAP standard.

d'affirmer en toute sécurité qu'un tel pic correspond à une dose de CAP injectée de 12.5 ng, qui se situe dans la zone de linéarité de la réponse. La présente méthode, telle qu'elle est décrite, avec une prise d'essai de 0.5 ml de sérum, permet ainsi facilement de détecter et de mesurer le CAP libre dans le sérum au taux de 250 ng/ml. Or, la surveillance clinique de patients soumis à un traitement thérapeutique au CAP, a permis à de nombreux auteurs de préciser les taux sanguins alors atteints. 2 h après l'administration orale de 2 g de CAP, la concentration sérique atteint un pic de 20–40 µg/ml; le CAP est ensuite éliminé avec une demi vie de 1.5–3.5 h. [5, 6].

#### CONCLUSION

La méthode de dosage décrite allie aux qualités de spécificité d'une méthode chromatographique, la simplicité et la rapidité nécessaires à une mise en oeuvre de routine. L'absence d'interférence observée au niveau des sérums témoins permet d'autre part de tirer parti au maximum de la grande sensibilité de cette méthode. Si la limite de détection ne constitue pas le facteur limitant, ce qui peut être le cas pour la détermination, lors des examens de biologie clinique, des taux sériques de CAP chez des patients sous thérapeutique, le volume d'essai peut être facilement réduit. Par contre, les études de pharmacocinétique et du métabolisme fin du CAP chez l'homme ou l'animal nécessitent des seuils de détection beaucoup plus bas. La méthode décrite ici permet alors, sur des prises d'essai plus importantes, d'abaisser la limite de détection à quelques ng/ml.

#### REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier le Docteur A.M. Moore des Laboratoires Parke-Davis de nous avoir fourni gracieusement un standard thiamphénicol, ainsi que G. et C. Delous pour leur collaboration technique.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 R.M. Hans, M. Galbraith et W.C. Alegnani, dans F. Kavanagh (Rédacteur), *Analytical Microbiology*, Academic Press, New York, 1963, p. 271.
- 2 A.J. Glazko, L.M. Wolf et W.A. Dill, *Arch. Biochem.*, 23 (1949) 411.
- 3 D.W. O'Gorman Hughes et L.K. Diamond, *Science*, 144 (1964) 296.
- 4 M. Margosis, *J. Chromatogr.*, 47 (1970) 341.
- 5 G.L. Resnick, D. Corbin et D.H. Sandberg, *Anal. Chem.*, 38 (1966) 582.
- 6 C.J. Least, N.J. Wiegand, G.F. Johnson et H.M. Solomon, *Clin. Chem.*, 23 (1977) 220.
- 7 P.S. Lietman, T.J. White et W.V. Shaw, *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 10 (1976) 347.
- 8 R. Clarenburg et V.R. Rao, *Drug Metab. Dispos.*, 5 (1977) 246.