

CHROMBIO. 2809

Note**Microdosage de la 5-fluorocytosine par chromatographie en phase liquide et détection fluorimétrique**

C. LACROIX*, P. LEVERT, G. LAINE et J.P. GOULLE

Laboratoire de Biochimie, Centre Hospitalier Général, B.P. 24, 55 bis, Rue Gustave Flaubert, 76083 Le Havre Cedex (France)

et

A. GRINGORE

Unité de Réanimation Chirurgicale, Centre Hospitalier Général, B.P. 24, 55 bis, Rue Gustave Flaubert, 76083 Le Havre Cedex (France)

(Reçu le 14 janvier 1985; manuscrit modifié reçu le 31 juillet 1985)

La fluorocytosine (fluoro-5-cytosine; 5-FC) est un produit actif à la fois par voie orale et parentérale, fréquemment utilisé en association avec l'amphotéricine B. Son activité antifongique dans les mycoses aiguës systémiques ou chroniques s'exerce essentiellement dans les candidoses, les cryptococcoses, les chromomycoses et certaines aspergilloses.

Si les effets secondaires de ce produit sont peu nombreux [1–4], il semble que leur fréquence et leur gravité soient majorées par l'insuffisance rénale. En effet, la 5-FC est éliminée dans la proportion de 80 à 95% sous forme inchangée dans les urines et la plupart des effets toxiques sont rencontrés chez des patients présentant un dysfonctionnement rénal. Ces effets secondaires sont attribués à un métabolisme partiel de la 5-FC en 5-fluorouracile [5]. Différents auteurs ont donc développé des techniques de dosage de la 5-FC faisant appel à des méthodes microbiologiques [6, 7], fluorimétriques [8, 9], utilisant la chromatographie gazeuse [10, 11] ou liquide sur colonne échangeuse de cations [12, 13] à polarité de phase inverse [14, 15] avec formation de paires d'ions [16].

La fluorescence naturelle de la 5-FC s'exprime de façon exploitable à partir de pH 10 et est maximale à pH 12,5 [2]. Dans ces conditions, deux solutions sont possibles pour mettre à contribution ce système de détection en phase inverse.

(1) Utiliser une silice greffée de type C_{18} puis élever le pH de la phase mobile en ajoutant un tampon alcalin en post-colonne; mais cette technique nécessite un montage spécial, l'utilisation d'une deuxième pompe et est à l'origine d'une instabilité de la ligne de base toujours délicate à réduire.

(2) Mettre à profit les possibilités des colonnes de poly(styrène divinylbenzène) qui supportent des solutions de pH de 1 à 13 et opérer directement en milieu alcalin.

Le but de ce travail est la mise au point d'une technique rapide de dosage de la 5-FC afin de répondre aux besoins des services de réanimation et d'hémodialyse. L'étude de la cinétique du produit après la première injection chez l'insuffisant rénal va permettre la mise en place d'une posologie personnalisée dès la deuxième injection.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Appareillage

L'appareil utilisé comprend une pompe haute pression (Touzard et Matignon, Vitry-sur-Seine, France), Type E.C. 93, une vanne d'injection de 50 μ l (Rhéodyne 71-25, Berkeley, CA, États-Unis), un spectrofluorimètre (Shimadzu Type RF-530, Touzard et Matignon), comportant une cuve de 12 μ l. La longueur d'onde d'excitation est de 300 nm, celle d'émission de 370 nm. La colonne est une PRP 1 poly(styrène divinylbenzène) fabriquée par Hamilton (Reno, NE, États-Unis) de 25 cm \times 4,1 mm dont le diamètre moyen des particules est de 10 μ m. L'appareil est raccordé (sortie 1 mV) à un enregistreur Omniscribe (Houston Instruments).

Prélèvements étalonnage

Les prélèvements sanguins (5 ml) sont recueillis dans des tubes de verre sans anticoagulant (Vacutainer) immédiatement centrifugés à 1000 g pendant 10 min. La fraction sérique est conservée à 4°C jusqu'au dosage. L'étalonnage est réalisé en surchargeant des sérums par des solutions de 5-FC à différentes concentrations.

Réactifs

5-Fluorocytosine (Laboratoires Roche, Neuilly-sur-Seine, France). Méthanol qualité HPLC (Carlo-Erba, St Cloud, France). Soude (Merck, Darmstadt, R.F.A.).

Méthode

Le sérum (10 μ l) dilué dans 1 ml de phase mobile constituée d'une solution aqueuse de soude (0.09 M, 3,75 g/l) et 50 μ l du mélange sont injectés dans le chromatographe. Avant usage, la phase mobile est passée sur filtre Millipore (0,45 μ m). Le débit est de 0,8 ml/min, ce qui entraîne une pression de 5 MPa. La colonne dans les conditions d'utilisation indiquées comporte 2000 plateaux théoriques.

RÉSULTATS

La Fig. 1 montre les chromatogrammes obtenus avec deux sérums contenant 50 mg/l et 1 mg/l 5-FC, ainsi que les tracés des blancs sériques aux sensibilités de travail correspondantes. L'étude de la linéarité a été effectuée avec des sérums surchargés en 5-FC aux concentrations suivantes: 6,25, 12,5, 25, 50, 100 et 200 mg/l. La relation entre la concentration et la hauteur des pics s'est avérée linéaire dans l'intervalle des concentrations indiquées plus haut. Le recouvrement entre les gammes aqueuses et sériques traitées dans des conditions identiques a donné des valeurs de 98 à 103%. La limite de détection (L.D.) a été évaluée selon les recommandations de la S.F.B.C. [17]: $L.D. = m_d + K S.D.$ où m_d = moyenne des blancs; S.D. = écart-type; K étant fonction du nombre de répétitions du blanc ($n = 10$) et des risques α et β (risques de première et deuxième espèces, fixés à 5%). Dans ces conditions, cette limite est de 0,4 mg/l.

La viscosité de la phase mobile nécessite de rincer soigneusement la seringue entre chaque injection sous peine d'une mauvaise reproductibilité et de l'apparition d'un pic sur le blanc sérique. La reproductibilité a fait l'objet de cinq déterminations pour chaque niveau et les résultats figurent dans le Tableau I. Des dosages répétés pendant dix jours sur deux pools de sérum ont

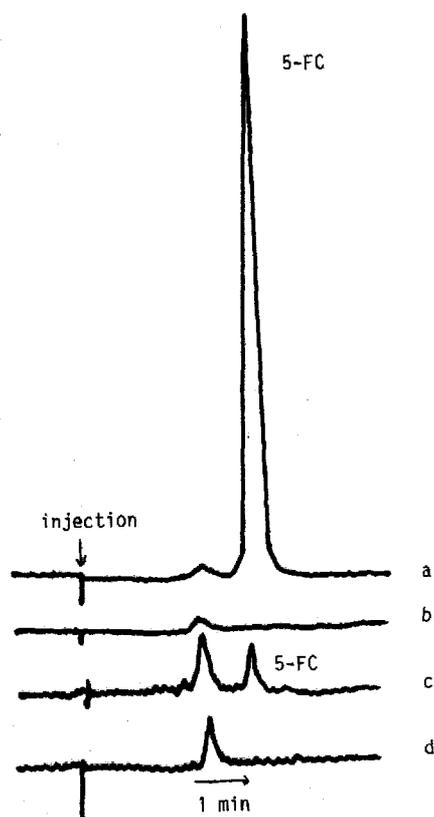


Fig. 1. Chromatogrammes obtenus sur des sérums aux concentrations de 50 mg/l (a) et 1 mg/l (c), ainsi que les tracés des blancs sériques aux sensibilités correspondantes (b et d).

TABEAU I
ÉTUDE DE LA REPRODUCTIBILITÉ

Concentration (mg/l)	Écart-type (mg/l)	Coefficient de variation (%)
6,25	0,35	5,9
12,5	0,61	5,1
25	0,86	3,7
50	0,55	1,2
100	1,51	1,5
200	3,34	1,8

TABEAU II
MÉDICAMENTS TESTÉS NE DONNANT PAS D'INTERFÉRENCE

Acide salicylique	K' = 0,04	Ketoconazole	N.D.
Amikacine	N.D.*	Metronidazole	N.D.
Amphotericine B	N.D.	Miconazole	N.D.
Ampicilline	N.D.	Ornidazole	N.D.
Cefoxitine	N.D.	Penicilline	N.D.
5-Fluorouracile	K' = 0,03	Thiamphenicol	N.D.
Furosemide	N.D.	Ticarcilline	N.D.
Griseofulvine	N.D.		

*N.D. = Non détecté.

donné les résultats suivants: $134 \pm 1,7$ mg/l (coefficient de variation, C.V. = 1,3%); $40,3 \pm 1,4$ mg/l (C.V. = 3,5%). Après plus de cent injections, les spécificités de la colonne sont restées identiques.

DISCUSSION

Différents médicaments ont été testés (Tableau II) afin de dépister une interférence possible. Seuls le 5-fluorouracile et l'acide salicylique présentent des propriétés de fluorescence analogues mais sont élués rapidement avec des K' respectivement de 0,03 et 0,04. La technique est d'exécution très simple puisqu'elle ne nécessite que la dilution d'un faible volume de sérum dans la phase mobile et l'injection directe du mélange. Sa rapidité en fait une méthode de choix dans la surveillance de l'accumulation de la 5-FC chez l'insuffisant rénal.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 P.L. Steer, M.I. Marka, P.D. Klite et T.C. Eickoff, *Ann. Intern. Med.*, 76 (1972) 15.
- 2 R. Meyer et J.L. Axelrod, *J. Am. Med. Assoc.*, 228 (1974) 1573.
- 3 C.O. Record, J.M. Skinner, P. Sleight et D.C.F. Speller, *Br. Med. J.*, 1 (1971) 262.
- 4 C.A. Kauffman et P.T. Frame, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 11 (1977) 244.
- 5 R.B. Diasio, D.E. Laking et J.E. Bennett, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 14 (1978) 903.
- 6 R.C. Kasper et D.J. Drutz, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 7 (1975) 462.

- 7 D.J. Schiavone, D. Page and J.F. Dawborn, *Br. Med. J.*, 42 (1973) 380.
- 8 D. Wade et G. Sudlow, *J. Pharm. Sci.*, 62 (1973) 828.
- 9 R.A. Richardson, *Clin. Chim. Acta*, 63 (1975) 109.
- 10 S.A. Harding, G.F. Johnson et H.M. Solomon, *Clin. Chem.*, 22 (1976) 772.
- 11 S.H. Wee et J.P. Anhalt, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 11 (1977) 914.
- 12 A.D. Blair, A.W. Forrey, B.T. Meijsen et R.E. Cutler, *J. Pharm. Sci.*, 64 (1975) 1334.
- 13 R.B. Diasio, M.E. Wilburn, S. Shadomy et A. Espinel-Ingroff, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 13 (1978) 500.
- 14 R.W. Bury, M.L. Mash Ford et H.M. Miles, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 16 (1979) 529.
- 15 J.O. Miners, T. Foenander et D. Kirkett, *Clin. Chem.*, 26 (1980) 117.
- 16 D.W. Warnock et A. Turner, *J. Antimicrob. Chemother.*, 7 (1981) 363.
- 17 Travail de la Commission "Validation des Techniques", *I.S.B.*, 1 (1985) 5.