

CHROMBIO. 3667

Note**Dosage du céfotaxime et du désacétylcéfotaxime sériques par chromatographie liquide haute performance avec appariement d'ions**

L. HARY* et M. ANDREJAK

Laboratoire de Pharmacologie Clinique, Centre Hospitalier Régional Sud, Université de Picardie, B.P. 3009, 80030 Amiens Cédex (France)

(Reçu le 17 décembre 1986; manuscrit modifié reçu le 17 février 1987)

Plusieurs techniques chromatographiques de dosage de céfotaxime et de son principal métabolite, le désacétylcéfotaxime, ont été décrites [1-9]. L'essai de quelques-unes d'entre elles nous a posé des problèmes techniques d'adaptation dans notre laboratoire. Nous avons développé et proposons ici une technique de dosage simple, peu coûteuse et suffisamment précise pour nous permettre d'étudier l'évolution des concentrations sériques de ces substances après administration veineuse de céfotaxime chez l'homme.

Parmi les techniques précitées, l'une d'elles utilise une méthode faisant appel à l'appariement d'ions pour le dosage du céfotaxime et du désacétylcéfotaxime (utilisant le tétrabutylammonium hydrogénéosulfate) [7]; ces deux substances sont chromatographiées dans des conditions d'élution légèrement différentes. Nous décrivons ici une technique permettant le dosage simultané des deux molécules en utilisant le tétrapentylammonium bromide (TPAB) dans la phase mobile.

MATÉRIEL ET MÉTHODE*Appareillage*

L'appareil utilisé est un chromatographe liquide à haute performance Waters (Saint-Quentin en Yvelines, France). Ce système comprend une pompe M6000, un injecteur manuel U6K, un spectrophotomètre UV 480 à longueur d'onde variable (réglé à 254 nm) raccordé à un enregistreur (Data Module). La colonne est une Brownlee C₁₈, 5 µm (100×4,6 mm I.D.) (Touzart et Matignon, Vitry sur Seine, France) à la suite d'une précolonne (30×4,6 mm I.D.) de même origine et remplie du même support.

Réactifs

Le céfotaxime et le désacétylcéfotaxime nous ont été fournis gracieusement par les laboratoires Roussel (Paris, France). Nous avons également utilisé de l'acétronitrile (pour analyses) et du tampon phosphate pH 7 Titrisol (Merck Clev-enot, Nogent sur Seine, France) ainsi que du TPAB (Aldrich, Strasbourg, France).

Étalonnage prélèvements

L'étalonnage est réalisé en surchargeant dans des tubes de verre des sérums (200 μl) par un même volume (50 μl) de solution aqueuse fraîchement préparée de céfotaxime et de désacétylcéfotaxime à différentes concentrations.

Le sang est recueilli sur tube sec. Après centrifugation 200 μl de sérum sont prélevés dans des tubes de verre et 50 μl d'eau sont ajoutés.

Méthode

Aux échantillons préparés ci-dessus 250 μl d'acétronitrile sont ajoutés pour déprotéinisation. Le mélange est agité 15 s puis centrifugé (15 min, 3000 g). Le surnageant est récupéré puis 20 μl sont injectés dans le chromatographe.

La phase mobile est constituée d'acétronitrile-tampon phosphate pH 7-eau (20:5:75, v/v/v) et contient 3,8 g l⁻¹ de TPAB. Le débit est de 2 ml min⁻¹. La sensibilité du détecteur est réglée de 0.01 à 0.1 a.u.f.s. selon la concentration de céfotaxime et de désacétylcéfotaxime.

Les concentrations de ces substances dans les échantillons d'étalonnage sont corrélées aux hauteurs de pics mesurées sur le chromatogramme. Nous avons testé, sur ces courbes d'étalonnage, la linéarité et la valeur de l'ordonnée à l'origine; nous avons également testé la reproductibilité de dosages effectués sur différents aliquots de sérums surchargés en céfotaxime et désacétylcéfotaxime.

Les tests statistiques appropriés ont été utilisés [10].

RÉSULTATS

Les temps de rétention, dans les conditions indiquées, sont respectivement de 3,4 et 6,0 min pour le désacétylcéfotaxime et le céfotaxime (Fig. 1).

La linéarité a été testée pour chaque substance sur quatorze courbes d'étalonnage, réalisées avec trois à sept points, et correspondant à des concentrations de 1 à 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de désacétylcéfotaxime et de 1 à 160 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de céfotaxime. Dans tous les cas, la régression est statistiquement satisfaisante (p toujours inférieur à 0,02).

Les moyennes des ordonnées à l'origine pour les équations des quatorze droites d'étalonnage, réalisées pour chacune des deux substances, s'avèrent non significativement différentes d'une moyenne théorique égale à 0. Ceci nous conduit à déterminer, dans tous les cas, les concentrations d'échantillons contenant les désacétylcéfotaxime et le céfotaxime en quantités inconnues, en multipliant la hauteur de pic par la pente de la droite de régression des concentrations en fonction des hauteurs de pic.

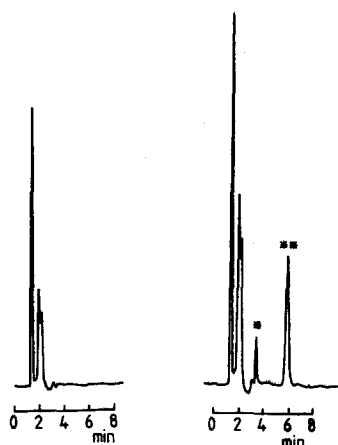


Fig. 1. (A gauche) chromatogramme de sérum témoin. (A droite) chromatogramme de sérum contenant $4,9 \mu\text{g ml}^{-1}$ de désacétylcéfotaxime (*) et $28,6 \mu\text{g ml}^{-1}$ de céfotaxime (**), sensibilité $0,05 \text{ a.u.f.s.}$

La limite de détection pour les deux substances est de $0,25 \mu\text{g ml}^{-1}$ (pic \geq à quatre fois le bruit de fond).

L'étude de reproductibilité a été effectuée sur sept échantillons pour chaque dose testée et figure dans le Tableau I.

DISCUSSION

La présence d'un ion ammonium quaternaire (TPAB) dans la phase mobile nous permet d'obtenir une chromatographie rapide (moins de 10 min) du cefotaxime et du désacétylcéfotaxime dans le sérum. Ces deux substances sont bien séparées et nous n'avons pas observé d'interférence avec une éventuelle substance endogène (absence de pic "parasite" dans un sérum témoin).

TABLEAU I

ÉTUDE DE REPRODUCTIBILITÉ

Sept déterminations pour chaque concentration testée.

Composé	Concentration ajoutée ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Concentration trouvée ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Coefficient de variation (%)
Désacétylcéfotaxime	1	0,94	3,6
	5	5,24	3,3
	20	19,28	2,6
Céfotaxime	2	1,97	5,0
	10	9,77	4,2
	40	40,79	3,8
	160	152,35	2,8

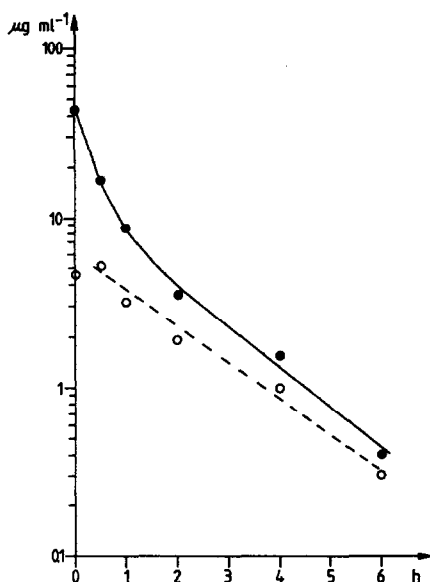


Fig. 2. Evolution des concentrations sériques decéfotaxime (●) et de desacétylcéfotaxime (○) après injection par voie i.v. chez l'homme de 1 g de céfotaxime.

Un volume d'échantillon assez faible (200 μl) est suffisant; il en est de même pour le volume d'injection (20 μl).

Cette technique est simple dans la mesure où il n'est pas nécessaire d'avoir recours à une extraction des produits comme dans d'autres techniques, que cette extraction soit réalisée en phase organique [1-3] ou sur colonne de silice greffée en C_{18} [4]. Le desacétylcéfotaxime est chromatographié directement sans avoir recours, comme l'ont décrit Kees et al. [5] à une transformation en lactone.

L'utilisation d'acétonitrile pour déprotéiniser le sérum nous semble préférable à l'utilisation d'un milieu acide fort [6-8] susceptible d'induire des pics importants en début de chromatogramme.

L'absence d'étalon interne et le recours à des courbes d'étalonnage (en pratique trois à quatre concentrations différentes suffisent) ne sont pas apparus pénalisants au regard de la reproductibilité et de la précision des dosages. Ces dernières n'ont pas été affectées par la réutilisation, jusqu'à trois fois, de la phase mobile.

La technique développée est applicable à l'étude cinétique sérique du céfotaxime et du desacétylcéfotaxime après administration intraveineuse chez l'homme (Fig. 2).

BIBLIOGRAPHIE

- 1 A.M. Brisson et J.B. Fourtillan, *J. Chromatogr.*, 223 (1981) 393.
- 2 D. Dell, J. Chamberlain et F. Coppin, *J. Chromatogr.*, 226 (1981) 431.
- 3 R.L. Yost et H. Derendorf, *J. Chromatogr.*, 341 (1985) 131.
- 4 M. Boyer, J. Sirot et R. Cluzel, *Pathol. Biol.*, 32 (1984) 285.
- 5 F. Kees, E. Strehl, K. Seeger, G. Seidel, P. Dominiak et H. Grobecker, *Arzneim.-Forsch.*, 31 (1981) 362.

- 6 T. Bergan et R. Solberg, *Chemotherapy*, 27 (1981) 155.
- 7 J.B. Lecaillon, M.C. Rouan, C. Souppart, N. Febvre et F. Juge, *J. Chromatogr.*, 228 (1982) 257.
- 8 W. Graninger, M. Uihlein, P. Ferenci, C. Moser et A. Georgopoulos, *J. Antimicrob. Chemother.*, 14 (1984) 143.
- 9 S.A. Signs, T.M. File et J.S. Tan, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 26 (1984) 652.
- 10 D. Schwartz, *Méthodes Statistiques à l'Usage des Médecins et des Biologistes*, Flammarion, Paris, 1963.