

CHROMBIO. 4378

**Note****Détermination de la céfaloglycine et de la céfroxadine dans les milieux biologiques par chromatographie sur couche mince avec détection fluorimétrique**

M.D. BLANCHIN\* et M.L. RONDOT-DUDRAGNE

*Laboratoire de Chimie Analytique et Toxicologie, Faculté de Pharmacie, 34060 Montpellier Cedex (France)*

(Reçu le 10 mai 1988; manuscrit modifié reçu le 21 juin 1988)

Dans le cadre de mises au point de méthodes sensibles et spécifiques de dosage des céphalosporines dans les milieux biologiques [1–4], nous avons proposé des techniques de chromatographie sur couche mince (CCM) avec analyse in situ des chromatogrammes par détection fluorimétrique.

Les céphalosporines ne présentant pas une fluorescence native, nous avons mis à profit: (i) la propriété particulière des céphalosporines à groupement aminothiazole (céfotaxime, cefmenoxime, ceftizoxime) d'émettre au contact d'un gel de silice additionné d'indicateur une intense fluorescence [3] et (ii) la formation de dérivés fluorescents par pulvérisation de fluoescamine pour les céphalosporines (céfador, céfalexine, céfadroxil, céfradine) ayant une fonction aminée primaire dans leur chaîne latérale [1]. La détection fluorimétrique des céphalosporines après séparation sur couche mince s'est révélée un mode de détection beaucoup plus sensible que l'absorption dans l'ultraviolet ce qui a permis de proposer une méthode de dosage de ces composés dans les milieux biologiques à des concentrations thérapeutiques.

Aucune référence de la littérature ne mentionne la CCM pour doser la céfradine et la céfaloglycine (Fig. 1). Nous proposons ici une technique de dosage de ces deux céphalosporines dans le plasma et l'urine par CCM. La méthode proposée est dérivée de celle précédemment mise au point pour l'étude des céphalosporines ayant un groupement  $\alpha$ -aminé primaire dans leur chaîne latérale: séparation sur gel de silice et analyse du chromatogramme in situ après révélation des spots à la fluoescamine.

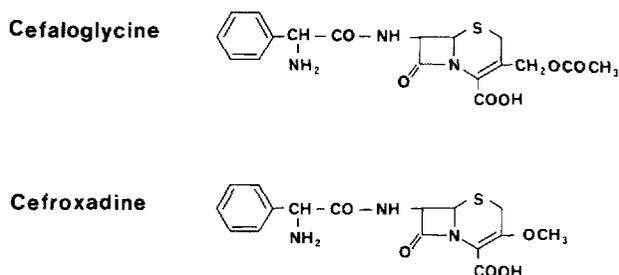


Fig. 1. Structure des céphalosporines étudiées.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Matériel et réactifs*

La fluorescamine (Fluram Roche, Fluka, Buchs, Suisse) et les solvants utilisés sont de qualité analytique.

La céfaloglycine (Eli Lilly, Indianapolis, IN, U.S.A.) et la céfroxadine (Ciba Geigy, Bâle, Suisse) ont été gracieusement fournis par ces laboratoires.

Les plaques de CCM utilisées sont des plaques de gel de silice 60 de 0,25 cm d'épaisseur sur support de verre 20 × 20 cm (Merck, réf. 5715, Darmstadt, R.F.A.).

La phase mobile est constituée d'un mélange acétate d'éthyle-acétone-eau-acide acétique (50:25:15:10, v/v).

Les solutions de pulvérisation sont de la triéthylamine dans le dichlorométhane à 10% (v/v) et de la fluorescamine dans l'acétone à 0,025% (m/v).

Les dosages sont effectués à l'aide d'un spectrophotomètre chromatographique Zeiss PMQ II, équipé d'un enregistreur BBC Gooerz et d'un intégrateur électronique Minigrator Intersmat. La source lumineuse est une lampe à vapeur de mercure haute pression. La vitesse de déroulement du papier enregistreur est de 60 mm/min. La vitesse de déroulement de la plaque chromatographique est de 50 mm/min. Les dosages se font aux longueurs d'onde suivantes  $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ .

### *Solutions de référence*

Les solutions de référence (5–500 mg/l) sont préparées par dilution dans l'eau à partir de solutions mères à 1 g d'antibiotique par litre d'un mélange eau-méthanol (1:1, v/v).

### *Solutions à analyser*

Les échantillons biologiques à analyser sont préparés à partir de plasma et d'urine témoins surchargés titrant de 25–200 mg/l d'antibiotique. Pour les échantillons de plasma, 1 ml d'éthanol à 95% vol. est additionné à 1 ml de plasma pour déprotéiniser; après agitation et centrifugation 15 min à 1500 g, le surnageant est déposé directement. Les échantillons d'urine sont déposés directement ou après dilution sans traitement préalable.

### *Mode opératoire*

Les solutions de référence (2  $\mu$ l) et les solutions à analyser (2  $\mu$ l) sont déposés sur la plaque chromatographique par petites fractions en séchant après chaque addition. Le chromatogramme est développé sur une hauteur de 15 cm environ dans une cuve préalablement saturée avec la phase mobile. Après séchage sous un courant d'air tiède, la plaque est pulvérisée avec la solution de triéthylamine, séchée et ensuite pulvérisée avec la solution de fluorescamine.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### *Essai préliminaire*

Une décomposition sur couche mince de gel de silice ayant été noté par Marrelli [5], la stabilité de la céfaloglycine et de la céfroxadine sur ce support a été testée dans les conditions expérimentales utilisées: des dépôts de 100 ng d'antibiotique ont été effectués 60, 45, 30, 15 et 0 min avant développement. Aucune dégradation n'a été observée dans les limites de sensibilité de la méthode.

### $R_F$

Les valeurs des  $R_F$  sont de 0,20 pour la céfaloglycine et de 0,24 pour la céfroxadine.

### *Stabilité de la fluorescence*

La fluorescence émise est stable entre 10 et 60 min après pulvérisation de fluorescamine, ce qui est suffisant pour une analyse correcte du chromatogramme. Les dérivés fluorescents soumis à une irradiation continue sont stables pendant 15 min.

### *Linéarité*

La linéarité de la variation des surfaces des pics en fonction de la variation des concentrations de l'antibiotique à analyser a été vérifiée. Le domaine de linéarité est de 5 à 250 mg/l.

### *Répétabilité*

La répétabilité de la méthode a été déterminée en effectuant onze dépôts de 2  $\mu$ l d'une solution à 50 mg/l. Les coefficients de variation sont de 4,5% pour la céfaloglycine et de 5,2% pour la céfroxadine.

### *Seuil de détection*

Le seuil de détection est défini comme la quantité minimale donnant une réponse égale à deux fois le bruit de fond.

Le seuil de détection par fluorescence a été comparée à celle obtenue en utilisant la détection par absorption dans l'UV, en se plaçant au maximum d'absorption de ces composés  $\lambda = 266$  nm (céfaloglycine) et  $\lambda = 274$  nm (céfroxadine).

Les seuils de détection sont de 20 ng (UV) et 8 ng (fluorescence) pour la céfaloglycine et de 60 ng (UV) et 8 ng (fluorescence) pour la céfroxadine.

TABLEAU I

## DOSAGE DE LA CÉFALOGLYCINE ET DE LA CÉFROXADINE DANS LE PLASMA ET L'URINE

	Quantité théorique ajoutée (ng/dépôt)	Céfroxadine		Céfaloglycine	
		Quantité trouvée (ng/dépôt)	Pourcentage retrouvé	Quantité trouvée (ng/dépôt)	Pourcentage retrouvé
Urine	25	26,9	107,5	27	108,2
	50	49,5	98,9	52,5	105,0
	100	105,9	105,9	108,2	108,2
	200	180,7	90,4	190,2	95,0
	250	252,4	101,0	268,9	107,5
Plasma	25	21,0	84,0	22,5	90,0
	50	54,8	109,6	45,1	90,2
	100	105,3	105,3	91,3	91,3
	200	209,0	104,5	197,3	98,7

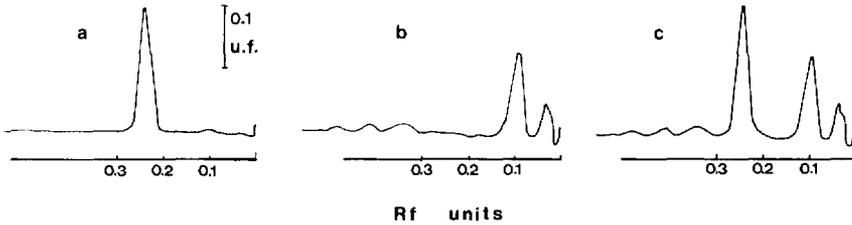


Fig. 2. Détermination de la céfroxadine dans le plasma. (a) Chromatogramme d'une solution de référence 25 mg/l; (b) chromatogramme d'un plasma témoin; (c) chromatogramme d'un plasma contenant 50 mg/l d'antibiotique.

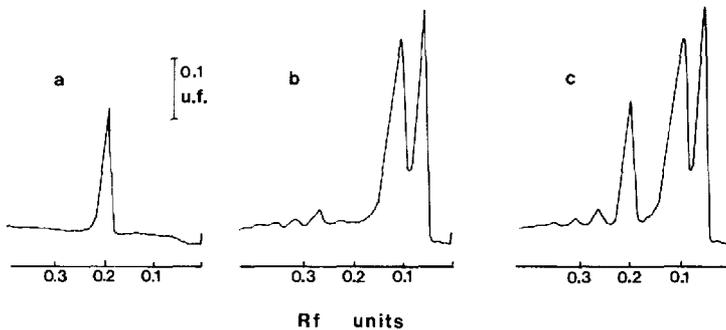


Fig. 3. Détermination de la céfaloglycine dans l'urine. (a) Chromatogramme d'une solution aqueuse de référence 50 mg/l; (b) chromatogramme d'une urine témoin; (c) chromatogramme d'une urine contenant 50 mg/l d'antibiotique.

#### Recherche des erreurs systématiques par la méthode des ajouts dosés

La recherche des erreurs systématiques dans le dosage de l'antibiotique analysé, ou justesse de dosage, a été étudiée en ajoutant des quantités connues de céphalosporines à des plasmas ou urines témoins.

Les pourcentages retrouvés à partir des échantillons biologiques et évalués par rapport à des solutions aqueuses de référence sont donnés dans le Tableau I. Ces pourcentages compris entre 84 et 107% montrent la fiabilité de la méthode pour le dosage de la céfroxadine et de la céfaloglycine dans l'urine et le plasma.

Des exemples de chromatogrammes sont donnés sur les Figs. 2 et 3.

## CONCLUSION

Les résultats obtenus mettent en évidence l'intérêt de la technique proposée pour le dosage de la céfaloglycine et de la céfroxadine dans les milieux biologiques. Le dépôt direct après un traitement très simple de l'échantillon, la bonne stabilité de la fluorescence, la précision satisfaisante en font une méthode facile à mettre en oeuvre et plus rapide que les méthodes microbiologiques très couramment employés.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 H. Fabre, M.D. Blanchin, D. Lerner et B. Mandrou, *Analyst*, 110 (1985) 775.
- 2 M.D. Blanchin, W.Th. Kok et H. Fabre, *Chromatographia*, 24 (1987) 625.
- 3 M.D. Blanchin, M.L. Rondot-Dudragne, H. Fabre et B. Mandrou, *Analyst*, 113 (1988) 899.
- 4 H. Fabre, M.D. Blanchin et W.Th. Kok, *Analyst*, 113 (1988) 651.
- 5 L.P. Marrelli, dans E. Flynn (Rédacteur): *Cephalosporins and Penicillins*, Academic Press, New York, 1972, p. 610.