

DOSAGE DE LA CYCLOSPORINE A PAR HPLC-UV À TEMPÉRATURE AMBIANTE AVEC ÉTALON INTERNE D'AMIODARONE.Lyèce Yargui¹, Alain Eschalier², Arezki Berhoun¹¹Laboratoire central de biochimie
CHU Alger Centre
16000 Alger²Laboratoire pharmacologie clinique et toxicologie
CHU Gabriel Montpied
63001 Clermont-Ferrand**RÉSUMÉ**

Objectifs : adapter et valider un nouveau protocole simple de dosage de la cyclosporine A (CsA) dans le sang total par HPLC en phase inverse à température ambiante en utilisant l'amiodarone comme étalon interne. Cette technique permet de quantifier spécifiquement une large gamme de taux sanguins de CsA chez des patients greffés rénaux.

Matériel et méthodes : après une première extraction du sang avec un mélange HCL 0,2N/méthanol en présence d'un étalon interne (amiodarone), la phase organique est de nouveau extraite d'abord avec un mélange diéthyléther/hexane puis avec du NaOH 0,1N. Le résidu sec obtenu après évaporation sous courant d'azote à 50°C est dissout dans 200 µL de phase mobile isopropanol/acétonitrile/eau dont 10mL sont injectés sur colonne de silice C18 (Waters 5 µm ; 4,6 x 250 mm) à un débit de 1 mL/min en isocratique à 25°C. La détection se fait en UV à 210 nm.

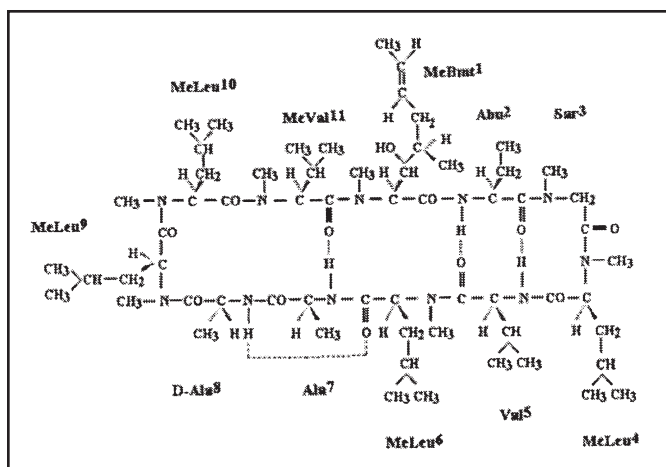
Résultats : le temps de rétention de CsA est de 6,87 min. Les CV journaliers (n = 5) sont compris entre 0,72 et 4,22 % aux concentrations de 31, 170, 417 et 1122 ng/mL. Les CV de jour en jour (n = 8) sont compris entre 2,97 et 9,74 % aux concentrations de 21, 155, 320 et 717 ng/mL. Les courbes de calibration (n = 36 : 10 à 3000 ng/mL) sont linéaires (pente = 0,980 ± 0,144 ; ordonnée à l'origine = -2,731 ± 7,035 ; r = 0,9998 ± 0,0001). La limite de détection est de 5 ng/mL. Le ratio CsA extraite /CsA non extraite est évalué à 0,156 (n = 36). Une bonne corrélation avec la méthode ACMIA sur Xpand Dimension a été calculée (r = 0,985 ; ACMIA = -20,18 + 1,1707 x HPLC).

Conclusion : cette méthode analytique est simple, rapide, sensible, reproductible et adaptée au dosage spécifique de la CsA sanguine sur une gamme étendue de concentrations sans nécessiter de dilution de l'échantillon.

INTRODUCTION

La cyclosporine A (CsA) est une molécule immunosuppressive extraite de champignons. C'est un polypeptide cyclique constitué de 11 acides aminés (Figure 1) de poids moléculaire égal à 1202,6 (1). Introduite en 1978, la CsA a transformé la maîtrise des rejets et le pronostic en transplantation d'organes. Cependant, cet immunosuppresseur présente une néphrotoxicité importante et exige une surveillance thérapeutique étroite. L'intensité des effets secondaires étant dose dépendante (2,3), l'efficacité thérapeutique est basée sur un monitoring régulier et adapté des niveaux sanguins de CsA mesurés à l'aide de méthodes de dosage bien définies et spécifiques (4,5). La CsA est très fortement métabolisée dans l'organisme et jusqu'à 30 métabolites différents ont déjà été identifiés. Ces métabolites résultent essentiellement de réactions d'oxydation sur les acides aminés constitutifs (6). Au plan analy-

Figure 1
Structure de la cyclosporine A



tique, on doit tenir compte de l'importance de ces métabolites dans la circulation sanguine, car ils affecteront la spécificité des méthodes de dosage (7).

Deux technologies principales sont utilisées pour la mesure spécifique de la CsA sanguine : les méthodes de chromatographie liquide à haute pression (HPLC) et les immunoessais. Jusqu'en 1988, l'HPLC était la seule technique disponible de quantification de la CsA et permettait sa mesure spécifique simultanément à celle de ses principaux métabolites (8,9). Les techniques HPLC permettent de quantifier des concentrations sanguines de CsA aussi faibles que 10 ng/mL. En général, ces techniques comportent trois étapes : une longue phase préparatoire préliminaire impliquant une lyse des hématies et différentes phases d'extraction (10-13) ; la séparation chromatographique sur colonne à température comprise entre 50 et 75°C (14) ; et la quantification de la CsA par rapport à un étalon interne, le plus souvent la cyclosporine D. La détection de la CsA s'effectue en UV par mesure d'absorbance entre 190 et 215 nm. L'absence sur la molécule de groupements chromophores ou permettant une dérivation ne permet pas un autre type de détection (15).

Les immunoessais commercialisés à partir de 1988 utilisent tous comme réactifs des anticorps monoclonaux spécifiques, mais leur principe analytique va varier selon le système d'analyse : CEDIA (Roche Diagnostics-Microgenetics), EMIT (Dade Behring-Cobas), ACMIA (Dade Behring-Dimension), FPIA (Abbott-TDX/AxSYM) ou RIA (DiaSorin IncStar). Ces immunoessais sont rapides, simples et démontrent une bonne corrélation avec les techniques HPLC. Cependant, la sensibilité analytique de ces essais est moins bonne

Figure 2

Conditions expérimentales du présent protocole HPLC pour le dosage de la CsA sanguine

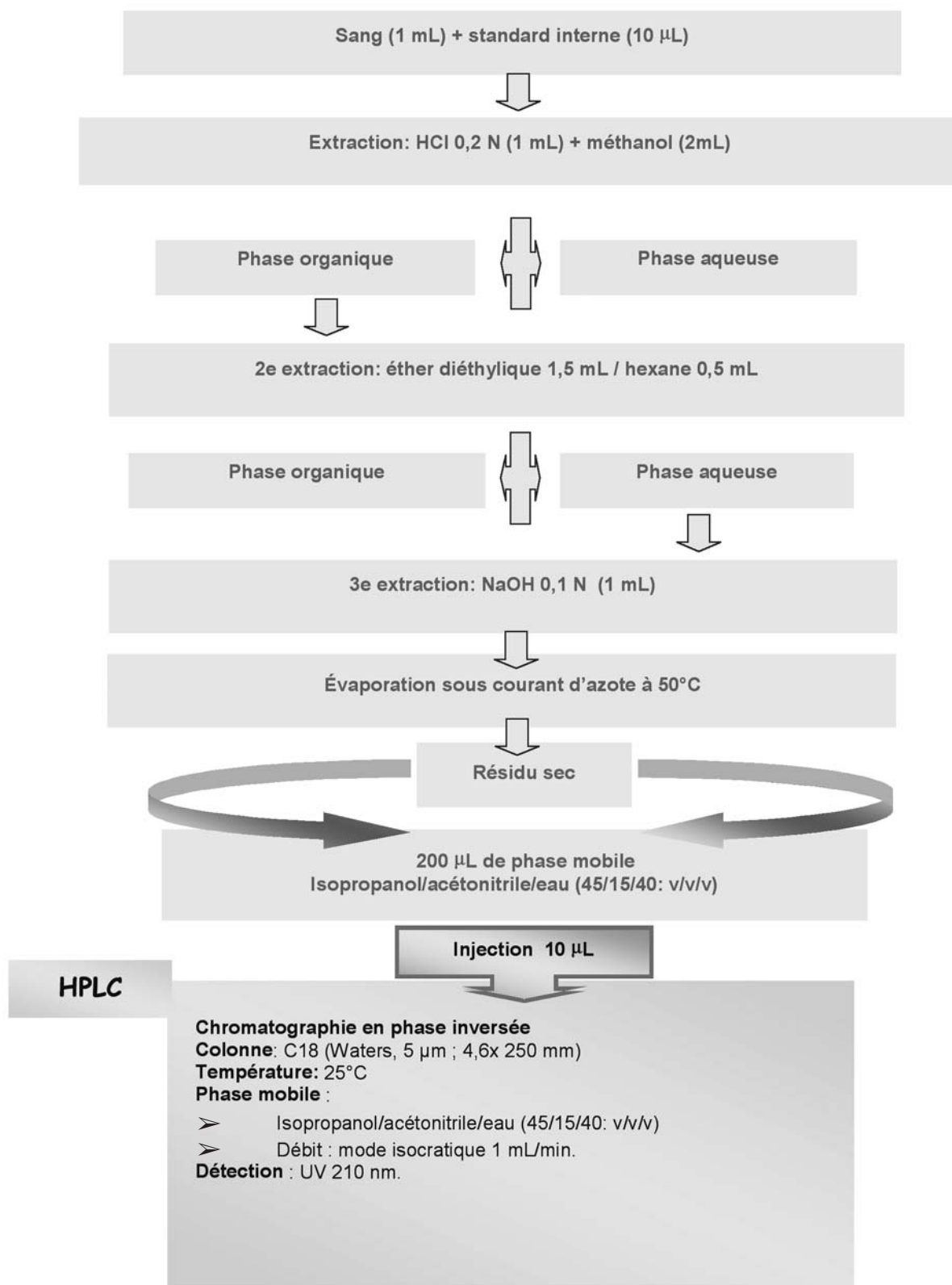
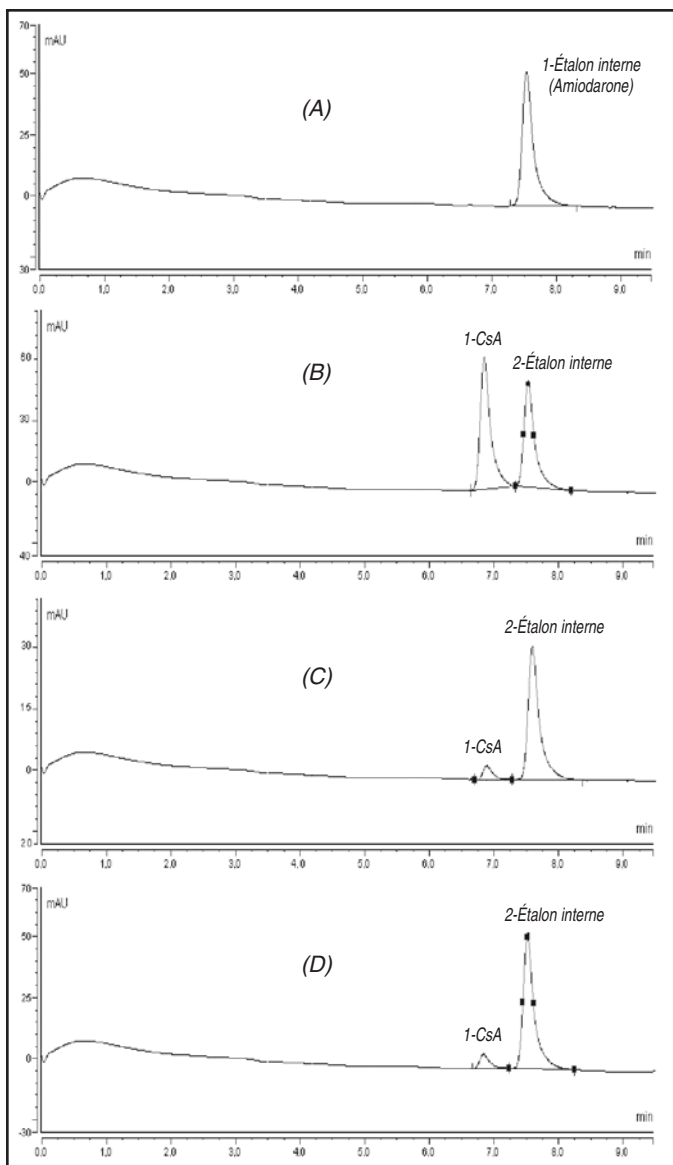


Figure 3

Chromatogrammes de (A) blanc échantillon avec étalon interne extrait ; (B) sang additionné de 3000 ng/mL de CsA ; (C) sang total extrait d'un patient transplanté rénal CsA = 27 ng/mL ; (D) sang total extrait d'un patient transplanté rénal CsA = 203 ng/mL



(30 ng/mL) que celle des techniques HPLC et des réactions croisées à des divers degrés avec les métabolites de la CsA vont les affecter (16,17).

Dans ce travail, nous rapportons notre contribution dans l'adaptation d'un nouveau protocole de dosage de la CsA par HPLC avec une extraction liquide/liquide simple suivie d'une chromatographie à 25°C et utilisant l'amiodarone comme étalon interne. Nous présentons dans ce travail les conditions d'extraction, la mise en place d'une assurance qualité et les résultats de la validation de ce dosage.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Réactifs

Les solvants organiques : méthanol, n-hexane, 1-propanol, éther diéthylique et acétonitrile sont de grade HPLC et proviennent de

Merck et Fluka. L'acide chlorhydrique et l'hydroxyde de sodium proviennent de chez Merck. La CsA utilisée comme étalon externe est de référence Sigma Aldrich. L'amiodarone (Cordarone®) utilisée comme étalon interne a été fournie par Sanofi. L'eau purifiée est produite par un système Milli-Q de Millipore.

Préparation des solutions étalons

Les solutions mères de l'étalon externe CsA (5000 ng/mL) et de l'étalon interne amiodarone (10 mg/mL) dans du méthanol sont préparées chaque semaine et conservées à 4°C. À partir de la solution mère de CsA (5000 ng/mL), une gamme étalon à cinq concentrations est préparée quotidiennement (10, 200, 500, 1000, 3000 ng/mL). Les dilutions sont réalisées à l'aide d'un pool de sang total provenant d'individus ne recevant pas de CsA. Chacune de ces solutions étalons filles est aliquotée et congelée à -20°C. Les aliquots serviront à la détermination de la reproductibilité de jour en jour sur 30 jours.

Échantillons

Un échantillon sanguin recueilli sur EDTA a été prélevé chez 75 transplantés rénaux sous Sandimun Neoral® (Novartis Pharma). La mesure de la CsA est effectuée la journée même par HPLC et par immunoessai sur l'analyseur Dimension X-pand (Dade Behring).

Phase d'extraction

À un volume de 1 mL de sang total dans des tubes en verre de 10 mL sont ajoutés et mélangés successivement 10 µL de la solution mère étalon interne (amiodarone), 1 mL de HCl 0,2N et 2 mL de méthanol. Les tubes sont centrifugés 10 min à 4 000g. La phase organique est récupérée pour subir deux autres extractions successives, d'abord dans un mélange éther diéthylique/hexane (1,5 mL/0,5 mL), puis dans 1 mL de NaOH 0,1N. La phase liquide obtenue est transvidée dans des tubes en verre de 5 mL pour évaporation sous courant d'azote à 50°C. Finalement, le résidu sec formé est dissous dans 200 µL de phase mobile isopropanol/acétonitrile/eau (45/14/40 : v/v/v). Le volume injecté sur la colonne est de 10 µL.

Système chromatographique

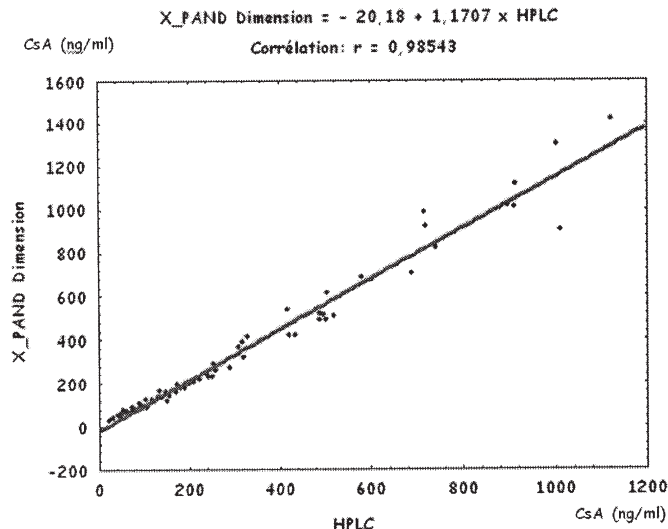
L'instrumentation chromatographique utilisée (Dionex) se compose d'une pompe isocratique P-580A, d'un injecteur automatique ASI-100, d'une colonne en phase inverse (C18, 5 µm ; 4,6x 250 mm Waters) et d'un détecteur UV 170S. Le logiciel d'acquisition des données est Chroméléon®. L'éluion se fait selon un mode isocratique à 25°C avec une phase mobile constituée d'un mélange isopropanol/acétonitrile/eau (45/15/40 : v/v/v). Le débit est de 1 mL/min. La détection est en UV à 210 nm (Figure 2).

Dosage immunologique de CsA

Cartouche de réactifs Flex® spécifique (# cat. DF89, Dade Behring) sur automate Dimension® X-pand. Il s'agit d'un immunoessai hétérogène de type ACMA (*antibody conjugated magnetic immunoassay*) dans lequel la fraction libre de la CsA et la fraction liée à des anticorps-enzymes sont séparées à l'aide de particules magnétiques. L'essai utilise une cartouche de réactifs Flex spécifique contenant un réactif de pré-traitement (saponine et EDTA), un conjugué β-galactosidase-anticorps anti-CsA, des particules de bioxyde de chrome liées à la CsA, un substrat CPRG (β-d-galactopyranoside rouge de chlorophénol) et un diluant. Le nombre de complexes bioxyde de chrome-CsA-Ac anti-CSA-β-galactosidase retenu par la force magnétique est inversement proportionnel à la concentration de CsA dans l'échantillon sanguin à doser. L'absorbance du rouge de chlorophénol libéré par l'action de la

Figure 4

Courbe de régression linéaire du dosage de la CsA par méthode ACMIA sur analyseur Dimension X-pand versus méthode HPLC UV dans des spécimens sanguins provenant de patients transplantés rénaux (n = 75).



β -galactosidase est mesurée à 577 nm. L'intervalle de mesure s'étend entre 25 et 500 ng/mL. La courbe de calibration est établie en cinq points : 0, 80, 180, 330 et 500 ng/mL. Trois niveaux de contrôle de qualité (Lyphochek Whole Blood Control 1, 2, 3, Bio-Rad) sont utilisés quotidiennement.

Validation analytique

La validation de notre méthode est basée sur les recommandations des Société française de biologie clinique (SFBC) et Société française des sciences et techniques pharmaceutiques (SFSTP) pour l'adaptation de nouvelles techniques chromatographiques (18-24).

La spécificité a été vérifiée par l'analyse d'échantillons sanguins témoins auxquels on a ajouté soit 10 mg/mL d'amiodarone ou 200 ng/mL de CsA et 10 mg/mL d'amiodarone. Les analyses ont été répétées avec dix prélèvements sanguins provenant de différents patients transplantés du rein. Les chromatogrammes obtenus avec les différents types d'échantillons ont été comparés dans le but d'identifier d'éventuelles interférences. Il s'agissait de déterminer la spécificité par rapport aux nombreux métabolites de la CsA mis en évidence dans le sang.

La linéarité a été établie par l'analyse de sang additionné de CsA de façon à obtenir les concentrations suivantes : 10, 100, 200, 1000 et 3000 ng/mL. Ces niveaux ont été sélectionnés en fonction des concentrations habituellement dosées en routine. La concentration de l'étalon interne d'amiodarone était de 10 mg/mL. Chaque niveau a été dosé 2 fois par jour sur 6 jours. Par ailleurs, des injections directes des étalons (interne et externe) dans du méthanol aux mêmes concentrations que les échantillons sanguins ont aussi été effectuées.

Les limites de quantification et de détection ont été estimées à partir d'étalons externes de CsA aux concentrations suivantes : 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 et 10,0 ng/mL. Il est à noter que l'évaluation de ces deux limites est possible en considérant le rapport de la hauteur du signal de la substance à mesurer sur la hauteur du blanc au même temps de rétention. Il est admis de fixer un rapport

de 3 pour l'estimation de la limite de détection et de 10 pour celle de la limite de quantification (19,24).

L'exactitude, exprimée en pourcentage de recouvrement, a été évaluée en comparant pour chaque niveau, la valeur moyenne mesurée par rapport à la courbe de calibration avec la valeur attendue.

La précision journalière a été estimée pour chaque niveau de concentration par la répétition 5 fois par jour de la mesure dans les mêmes conditions opératoires. Les prélèvements sanguins sélectionnés contenaient : 31 (niveau faible), 170 (niveau intermédiaire), 417 (niveau élevé) et 1122 ng/mL (niveau très élevé) de CsA.

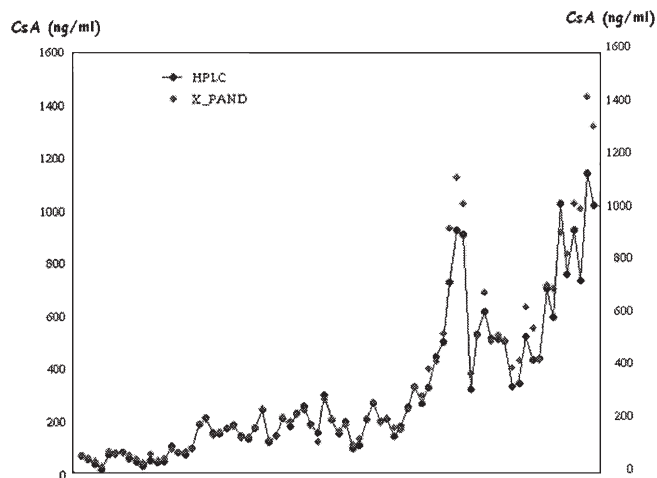
La précision de jour en jour a été évaluée sur une période de 30 jours. Dans les mêmes conditions opératoires, la mesure de chaque niveau de concentration est répétée au 1^{er}, 2^e, 3^e, 4^e, 5^e, 10^e, 15^e et 30^e jour. Les niveaux de concentrations dosés sont : 21, 155, 320 et 717 ng/mL de CsA.

Le rendement d'extraction a été déterminé sur 36 échantillons à 3 niveaux de concentrations de CsA : < 100, 100-300 et > 300 ng/mL. Pour chaque niveau, l'analyse est effectuée le même jour avec et sans extraction. Dans tous les cas, l'étalon interne est extrait.

Les résultats obtenus avec la méthode HPLC ont été corrélés, pour 75 échantillons, avec ceux obtenus avec un immuoessai de type ACMIA. Le test paramétrique t-Student a été utilisé et un P < 0,05 a été considéré comme significatif.

Figure 5

Comparaison des concentrations obtenues avec les deux méthodes de dosage utilisées (ACMIA X-pand et HPLC-UV) pour 75 échantillons sanguins de patients transplantés rénaux.



RÉSULTATS

Les résultats de l'évaluation du nouveau protocole HPLC proposé pour le dosage de la CsA dans le sang entier sont détaillés dans le Tableau 1.

Chromatogrammes

Les chromatogrammes présentés à la Figure 3 démontrent l'absence d'interférences au niveau des pics correspondants à la CsA et au standard interne, lesquels sont élués respectivement à 6,87 et 7,55 min.

Tableau 1

Résumé des résultats de la validation analytique de la méthode HPLC pour le dosage de la CsA sanguine.

Linéarité (n = 35) : 0, 10, 100, 200, 1000, 3000 ng/mL		
	Moyenne ± écart-type	
Pente	0,980 ± 0,144	
Ordonnée à l'origine	-2,731 ± 7,035	
Coefficient de corrélation	0,9998 ± 0,0001	
Limite de détection	5 ng/mL	
Limite basse de quantification	10 ng/mL	
Précision journalière (n = 5)		
Niveaux (ng/mL)	Moyenne ± écart-type	CV (%)
31	30,0 ± 1,26	4,22
170	168,8 ± 1,47	0,87
417	415,5 ± 1,22	0,29
1122	1114 ± 8,02	0,72
Précision de jour en jour (n = 8)		
Niveaux (ng/mL)	Moyenne ± écart-type	CV (%)
21	20,1 ± 1,96	9,74
155	152,4 ± 8,16	5,35
320	315,1 ± 6,96	2,21
717	714,0 ± 21,22	2,97
Rendement d'extraction (n = 36)		
	Moyenne ± écart-type	
CsA avec extraction	310 ± 347	
CsA sans extraction	1982 ± 1454	
Ration avec/sans extraction	15,6 %	

Linéarité

La droite de régression déterminée à partir des 5 niveaux de concentrations (chaque point représente une moyenne issue d'une série de 35 déterminations) démontre une bonne linéarité : $y = 0,980x - 2,73$, $r = 0,9998$.

Sensibilité, limite de quantification et exactitude

Dans les conditions énoncées, la limite de détection est 5 ng/mL, la limite de quantification égale 10 ng/mL et le % de recouvrement est de 113 %.

Imprécision

Le CV journalier variait de 0,3 à 4,2 % alors que le CV de jour en jour variait entre 2,2 % (CsA = 320 ng/mL) et 9,7 % (CsA = 21 ng/mL).

Efficacité d'extraction

Le ratio d'extraction calculé à partir de 36 échantillons sanguins (moyenne des concentrations obtenues après extraction sur moyenne des concentrations obtenues sans extraction) est égal à 15,64 %. Cette donnée démontre bien la nécessité de l'extraction de la CsA du sang entier car à défaut de cette phase préparatoire,

les résultats retrouvés montrent une majoration allant jusqu'à 84,36 % des taux escomptés après extraction.

Corrélation

Une corrélation hautement significative a été calculée entre notre technique HPLC et la méthode immunologique automatisée ACMIA sur analyseur Dimension Xpand, $r = 0,985$ (Figure 4). Cependant, l'examen des concentrations obtenues pour chaque échantillon (Figure 5) met en évidence une majoration des taux mesurés par ACMIA pour des valeurs de CsA supérieures à 500 ng/mL. Dans cette gamme de concentrations, le CV estimé entre les 2 techniques varie de 9 à 25 %, et le coefficient de corrélation est évalué à 0,914. La différence dans les concentrations mesurées à un niveau élevé de CsA serait en relation avec les dilutions systématiques des échantillons exigées par la méthode immunologique dont la limite de linéarité se situe à 500 ng/mL.

DISCUSSION

Le développement de cette procédure HPLC a été effectué par étapes d'optimisation successives à partir de conditions expérimentales initiales fixées.

Tableau 2

Résumé des protocoles HPLC publiés pour la détermination de la CsA sanguine.

T (°C)	PHASE	COLONNE	PHASE MOBILE		ÉLUTION	UV (nm) Détection	RÉF
72	INV	C8 (5 µm; 3 x 125 mm)	Eau/acétonitrile/méthanol	60/20/20 0,5/75/20	Gradient	210	10
75	INV	C18 (5 µm; 4,6 x 150 mm)	Eau/acétonitrile	55/45	Isocratique	202	27
50	INV	C18 (5 µm; 4 x 250 mm)	Acétonitrile/eau	61/39	Isocratique	210	12
50	NOR	CN (5 µm; 4,6 x 150 mm)	Acétonitrile/tampon phosphate pH 7	43/57	Isocratique	210	13
75	INV	C8 (n.s.)	Acétonitrile/eau	60/40	Isocratique	210	28
70	INV	C18 (n.s.)	Acétonitrile/méthanol/eau	60/15/25	Isocratique	214	29
75	INV	C8 (3 µm; 4 x 30 mm)	Acétonitrile/eau/méthanol	53,5/32/40,5	Isocratique	210	30
50	NOR	CN (3 µm; 4,6 x 150 mm)	Acétonitrile/eau	71/29	Isocratique	212	31
60	INV	C18 (5 µm; 4,6 x 150 mm)	Acétonitrile/méthanol/eau	20/45/35	Isocratique	214	32
70	INV	C18 (5 µm; 4 x 250 mm)	Acétonitrile/eau	71/29	Isocratique	212	33
70	INV	C18 (3 µm; 3,2 x 40 mm)	Acétonitrile/méthanol/ tampon phosphate pH 6,5	50/11/39	Gradient	225	34
70	INV	C18 (5 µm; 4,6 x 50 mm)	Acétonitrile/tétrahydrofurane/ H ₃ PO ₄ 1 %	52/4/44	Isocratique	208	35
70	INV	C8 (5 µm; 4,6 x 250 mm)	Acétonitrile/méthanol/eau	51/20/29	Isocratique	214	36
70	INV	C18 (n. s.)	Acétonitrile/eau	70/30	Isocratique	210	37
50	NOR	CN (5 µm; 4,6 x 250 mm)	Hexane/isopropanol	90/10	Isocratique	212	38
80	INV	C18 (variable)	Variable (étude comparative)	Variable	Isocratique Gradient	210	39
70	INV	C18 (n. s.)	Acétonitrile/méthanol/eau	60/10/30	Isocratique	210	40
70	INV	C18 (µbore; 1 x 150 mm)	Acétonitrile/méthanol/eau	78/8/14	Isocratique	205	41
72	INV	Cphe (5 µm; 3,9 x 150 mm)	Acétonitrile/méthanol/eau	20/52/28	Isocratique	210	42
70	INV	C18 (n. s.)	Méthanol/acétonitrile/ KH ₂ PO ₄ 0,01M	50/25/25	Isocratique	205	43
70	INV	C18 (5 µm ; 4,6 x 250 mm)	Acétonitrile/eau	70/30	Isocratique	215	44
70	INV	C18 (5 µm; 3,9 x 150 mm)	Acétonitrile/Na ₂ HPO ₄ 5 mM pH 5,1	75/25	Isocratique	210	15
75	INV	Cphe (4 µm; 3,9 x 150 mm)	Acétonitrile/KH ₂ PO ₄ 0,04 M pH 2,5	65/35	Isocratique	210	45

n. s. : non spécifié ; INV : phase inversée ; NOR : phase normale ; RÉF : référence

Notre choix a porté sur une procédure de chromatographie à phase inversée parce que cette procédure constitue le plus souvent la méthode de choix en première intention (25) pour la séparation des composés neutres ou peu ionisés, de masse moléculaire faible à intermédiaire (< 2000 Da) et solubles à la fois dans les phases aqueuses et organiques (critères rencontrés par la CsA). De plus, les procédures d'optimisation sont en règle générale moins complexes en phase inversée, d'une part en raison du nombre restreint de solvants utilisables en pratique et d'autre part en raison du fait que les variations de rétention induites par les modifications de la phase mobile (nature du solvant, force ionique, pH, température) y sont en grande partie prévisibles, ce qui n'est pas

forcément le cas en phase normale (26). L'examen des données bibliographiques est à cet égard significatif puisque sur un total de 23 techniques HPLC/UV décrites, la séparation était réalisée en phase inversée dans 20 cas (Tableau 2).

Concernant le type de colonne utilisée, notre choix s'est porté sur une colonne à silice greffée octadécyl (C18) de marque Hypersil (Waters), de granulométrie 5 µm, de longueur 25 cm et de diamètre interne 4,6 mm. Le greffage en C18 assure à la phase stationnaire un caractère apolaire maximal et est de loin le plus commun des greffages utilisés en phase inversée. Ce matériau de remplissage est par ailleurs disponible en grandes quantités chez

les différents fournisseurs, permettant de commander sur une longue période des colonnes issues d'un même lot et de minimiser ainsi la variabilité analytique. Il est également reconnu que les chaînes alkyles de grande dimension confèrent au greffage une plus grande stabilité comparativement à d'autres groupements, d'où un maintien prolongé des performances de la colonne. La CsA étant une molécule neutre riche en acides aminés hydrophobes, sa séparation est souvent assortie d'une élution tardive avec pics traînants, ainsi que d'une imprécision élevée d'une élution à l'autre et d'une colonne à l'autre. Ces caractéristiques sont essentiellement liées à la persistance à la surface de la silice, en dépit du greffage, de groupements silanols libres qui lui confèrent un caractère acide variable. En effet, pour des raisons d'encombrement stérique, les procédés de greffage qui font appel à la réaction de $\text{Cl-Si(CH}_3)_2\text{-R}$ avec les silanols de surface ne permettent pas de dépasser un taux de greffage de 30 à 40 %. Cet inconvénient peut être partiellement compensé par une triméthylsilanisation complémentaire dite « end-capping » qui vient masquer une partie des silanols résiduels (46,47). Pour ces raisons, il convient de choisir une silice au caractère acide plus ou moins marqué et ayant subi un « end-capping ». La silice de type Hypersil répond à ces spécifications. Ce matériau est par ailleurs très répandu et disponible selon plusieurs granulométries et géométries de colonnes. Enfin, il s'agit d'une silice à particules sphériques de stabilité mécanique supérieure aux silices irrégulières, et à pores de très faibles dimensions (6 nm) particulièrement adaptés à la séparation de composés de faible masse moléculaire. Le nombre de plateaux théoriques de la colonne, qui définit son efficacité et représente un des paramètres déterminants de la résolution, est grossièrement proportionnel à la granulométrie de la phase stationnaire. La plupart des opérateurs choisissent comme point de départ des colonnes de 25 cm de longueur avec des particules de 5 à 7 μm , et des colonnes de 15 cm de longueur avec des particules de 3 à 5 μm (48). Compte tenu du niveau élevé de résolution requis par notre méthode, nous avons, afin de maximiser le nombre de plateaux théoriques, opté pour une colonne de grandes dimensions, soit 25 cm de longueur et 4,6 mm de diamètre interne. Nous avons, d'autre part, choisi une granulométrie relativement faible (5 μm), ce qui représente un compromis entre les valeurs usuelles et des granulométries beaucoup plus fines ($\leq 3 \mu\text{m}$) utilisées surtout pour des séparations ultra-rapides mais sujettes à certains inconvénients, comme l'instabilité mécanique et l'élévation importante de la pression en tête de colonne.

Le problème majeur de la séparation chromatographique à phase inversée de la CsA est la durée de vie des colonnes, directement dépendante de la température élevée appliquée. Certains auteurs rapportent une détérioration de la colonne conditionnée à 70°C après 100 h ou encore de 3 mois d'utilisation (49). Dans tous les protocoles rapportés (Tableau 2), on mentionne l'importance de cette exigence technique afin d'avoir une résolution efficace et optimale de la CsA élue. En effet, cette température élevée (entre 50 et 80°C) est nécessaire pour forcer la molécule à travers les canalicules de la colonne et obtenir des pics gaussiens. La température rompt les liaisons hydrogènes qui contrôlent la structure tertiaire de la CsA. À défaut de cet équilibre thermique, la séparation est mauvaise et les pics sont larges, déformés et tardifs. Afin de pallier à ces contraintes analytiques, nous avons trouvé un compromis entre une température de colonne fixée à 25°C et une composition adéquate de la phase éluante à utiliser. En effet, la phase éluante constitue un autre paramètre d'optimisation qui agit efficacement sur la sélectivité en HPLC.

Nous avons opté pour une combinaison ternaire comme phase éluante de départ, soit isopropanol/acétonitrile/eau. Afin d'épargner à la colonne une température élevée et de contrôler la sélectivité de la séparation, nous avons jugé nécessaire de remplacer le méthanol qui est habituellement utilisé et dont la polarité globale est de 5,1 (48) par un solvant appartenant au même groupe de sélectivité mais de polarité moindre, soit l'isopropanol (polarité = 3,9). L'acétonitrile a été retenu comme second solvant dans ce système d'élution ternaire car il présente l'avantage d'une plus faible viscosité et d'une meilleure transparence dans l'UV lointain.

En HPLC, l'alimentation en phase mobile peut se faire soit selon un régime isocratique, dans lequel la composition et le débit de l'éluant restent inchangés tout au long de l'analyse, ou selon un régime de gradient dans lequel la composition et/ou le débit varient dans le temps de façon programmée. L'analyse des données de la littérature (Tableau 2) montre que la majorité des protocoles appliquent une élution en mode isocratique. L'emploi du régime de gradient comporte en effet un certain nombre d'inconvénients : complexité de la mise en œuvre, moins bonne répétabilité des temps de rétention, nécessité d'un temps additionnel de ré-équilibrage de la colonne entre deux analyses successives et impossibilité du recyclage de la phase mobile. Pour notre part, pour atteindre une séparation convenable en un temps raisonnable, nous avons utilisé au départ un gradient de concentration pour balayer en une injection la plage de force éluante. Suivant l'allure des pics obtenus, la composition du gradient peut être augmentée ou diminuée par pas de 5 ou 10 % jusqu'à ce que le chromatogramme final présente tous les solutés bien séparés. Une composition isocratique finale est alors déduite à partir de ce gradient et est maintenue comme régime d'alimentation définitif pour toutes nos manipulations.

Depuis les premiers protocoles HPLC et jusqu'à récemment, c'était la cyclosporine D ou C qui était utilisée comme étalon interne. Il est évident que la structure et les propriétés physico-chimiques de ces deux cyclosporines, très semblables à celles de la CsA, ont facilité leur utilisation. Malheureusement, ces molécules, par ailleurs assez onéreuses, ont été retirées du marché par Novartis qui en a limité l'utilisation au domaine de la recherche. Par conséquent, on se devait de trouver une alternative en un autre composé de coût raisonnable et surtout disponible dans le commerce sans aucune restriction. Parmi les molécules utilisées avec succès dans la méthode HPLC en phase inversée, le tamoxifène (44) le naproxène (45) et le kétoconazole (50) ont fait leurs preuves. Afin d'élargir la panoplie des étalons internes, nous avons voulu tester d'autres substances : la protriptyline, la clozapine et l'imidazole. Ces molécules sont déjà utilisées couramment dans des protocoles de tri préliminaire toxicologique et de dosages de médicaments autres que la CsA. Aucune réponse satisfaisante de ces substances n'a été observée puisqu'il y avait absence totale de pics pour l'imidazole et la clozapine, et seulement une timide incurvation pour la protriptyline à 35 min de l'injection (temps de rétention énorme comparativement aux 8 min de la CsA). Par contre, l'utilisation de l'amiodarone, un médicament anti-arythmique métabolisé par le même cytochrome P450 que la CsA, et dont la prise concomitante chez un de nos patients majorait les résultats de CsA, a été très favorable. On observait un pic symétrique bien individualisé avec, en plus, un temps de rétention très proche de celui de la CsA évitant toute co-élution des autres métabolites pouvant interférer dans le dosage.

Les résultats de l'évaluation analytique détaillés au Tableau 1 rencontrent favorablement les normes recommandées pour tout nouveau protocole HPLC. La spécificité, la précision, l'efficacité et la simplicité caractérisent cette technique. Les améliorations apportées par rapport aux autres procédures déjà publiées sont d'une part la capacité d'élu­tion spécifique et rapide (9 min) de la CsA à température ambiante et d'autre part, l'amiodarone qui a montré des propriétés analytiques satisfaisantes comme étalon interne. Il est important toutefois de souligner que l'emploi de l'amiodarone comme étalon interne est strictement réservé aux échantillons de patients non traités avec ce médicament.

Les résultats de CsA sanguine mesurée simultanément par ce procédé HPLC-UV et la méthode immunologique ACMIA sur Dimension® X-pand sont comparables et une corrélation hautement significative a été calculée. Cependant, nous avons observé quelques discordances pour des taux de CsA supérieurs à 500 ng/mL. La différence observée serait en relation avec les dilutions systématiques des échantillons dans ce domaine de concentrations puisque l'intervalle de mesure de l'immunoessai préconisé par le fabricant s'étend jusqu'à 500 ng/mL (51,52).

CONCLUSION

Même si la tendance actuelle pour le dosage de la CsA est axée vers les méthodes de couplage HPLC/spectrométrie de masse (SM) ou en tandem SM/SM, le nouveau protocole HPLC-UV que nous avons mis au point convient mieux aux exigences matérielles de notre laboratoire. La possibilité d'effectuer la séparation chromatographique à température ambiante et l'utilisation peu coûteuse de l'amiodarone comme étalon interne constitue les deux principales innovations qui nous permettront d'offrir un meilleur service dans le cadre du monitoring thérapeutique des patients greffés du rein.

RÉFÉRENCES

- Borel JF. The cyclosporins. *Transplant Proc* 1989;21:810-5.
- Ishikawa A, Suzuki K, Fujita K. Mechanisms of cyclosporine-induced nephrotoxicity. *Transplant Proc* 1999;31:1127-28.
- Christians U, Sewing K F. Alternative cyclosporine metabolic pathways and toxicity. *Clin Biochem* 1995;28:547-59.
- Rodighiero V. Therapeutic drug monitoring of cyclosporin. Practical applications and limitations. *Clin Pharmacokinet* 1989;16:27-37.
- Humbert H, Vernillet L, Cabiach MD, Barradas J, Billaud E. Influence of different parameters for the monitoring of cyclosporine. *Transplant Proc* 1990;22:1210-5.
- McMillan MA. Clinical pharmacokinetics of cyclosporin. *Pharmacol Ther* 1989;42:135-56.
- Garaffo R. Suivi thérapeutique des immunosuppresseurs : données actuelles. *Revue française des laboratoires* 1998;304:75-82.
- Hermann M, Christensen H, Reubsæet JL. Evaluation of essential parameters in the chromatographic determination of cyclosporin A and metabolites using a D-optimal design. *J Pharm Biomed Anal* 2002;30:1263-76.
- Shaw LM, Bowers L, Demers L, Freeman D, Moyer T, Sanghvi A, et al. NACB/AACC Task Force on Cyclosporin Monitoring. Critical issues in cyclosporine monitoring: report of the task force on cyclosporine monitoring. *Clin Chem* 1987;33:1269-88.
- Niederberger W, Schaub P, Beveridge T. High-performance liquid chromatographic determination of cyclosporin A in human plasma and urine. *J Chromatogr* 1980;182:454-8.
- Kates RE, Latini R. Simple and rapid high-performance liquid chromatographic analysis of cyclosporin in human blood and serum. *J Chromatogr* 1984;309:441-7.
- Leyland-Jones B, Clark A, Kreis W. High pressure liquid chromatographic determination of cyclosporin-A in human plasma. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1982;37:431-44.
- Kabra PM, Wall JH, Blanckaert N. Solid-phase extraction and liquid chromatography for improved assay of cyclosporin in whole blood or plasma. *Clin Chem* 1985;31:1717-20.
- Flouvat B. Méthodes de dosage de la ciclosporine dans les milieux biologiques. *Thérapie* 1992;47:305-10.
- Amini H, Ahmadiani A. Simple determination of cyclosporine in human whole blood by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;795:209-14.
- Murthy JN, Yatscoff RW, Soldin SJ. Cyclosporine metabolite cross-reactivity in different cyclosporine assays. *Clin Biochem* 1998;31:159-63.
- Wong SH. Therapeutic drug monitoring for immunosuppressants. *Clin Chim Acta* 2001;313:241-53.
- Guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale. Décret du 2 novembre 1994, Journal officiel, 4 décembre 1994.
- Vassault A, Grafmeyer D, Naudin C, Dumont G, Bailly M, Henny J, et al. Commission Validation de techniques de la SFBC. Protocole de validation de techniques. Document B, Stade 3. *Ann Biol Clin (Paris)* 1986;44:686-745.
- Vassault A, Baud M, Castanier M, Dumont G, Ingrand J, Mercier M, et al. Commission Validation de techniques de la SFBC et groupe de travail SFBC Corata « Comparaison de techniques ». Recommandations pour la comparaison de techniques. Document F, Stade 3. *Ann Biol Clin (Paris)* 1992;50:727-30.
- Mollard JF, Naudin C, Dumont G, Vassault A, Azzedine MC, Bailly M et les membres de la Commission Validation de techniques de la SFBC. Dictionnaire des termes à l'usage de la validation des techniques. Document A, Stade 3. *Ann Biol Clin (Paris)* 1986;44:679-85.
- Vassault A, Grafmeyer D, De Grave J, Cohen R, Beaudonnet A, Biennu J. Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation des techniques. *Ann Biol Clin (Paris)* 1999;57:685-95.
- Fraser CG, Petersen PH, Ricos C, Haackel R. Proposed quality specifications for the imprecision and inaccuracy of analytical systems for clinical chemistry. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992;30:311-7.
- SFSTP. Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégie de validation. *STP Pharma Prat* 1997;7:169-94.
- Daldrup T, Michalke P, Boehme W. A screening test for pharmaceuticals, drugs and insecticides with reversed phase liquid chromatography: retention data of 560 compounds. *Chromatography Newsletter* 1982;10:1-7.
- Gill R. High pressure liquid chromatography. In: Clarke's Isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material (2nd ed.), Moffat AC. Ed. The Pharmaceutical Press, London 1986:p. 201-20.
- Sawchuk RJ, Cartier LL. Liquid-chromatographic determination of cyclosporin A in blood and plasma. *Clin Chem* 1981;27:1368-71.

28. Toulet V, Saux MC, Rouquette C, Penouil F, Brachet-Liermain A. Méthode rapide de dosage de la ciclosporine A dans le sang par chromatographie liquide haute performance. *Ann Biol Clin (Paris)* 1986;44:517-21.
29. Buice RG, Stentz FB, Gurley BJ. Analytical methodologies for cyclosporine pharmacokinetics: A comparison of radioimmunoassay with high performance liquid chromatography. *J Liq Chrom* 1987;10:421-38.
30. Sangalli L, Bonati M. Reversed-phase high-performance liquid chromatography determination of cyclosporine in human blood. *Ther Drug Monit* 1987;9:353-7.
31. Wallemacq P, Lesne M. New automated high-performance liquid chromatographic analysis of cyclosporin A and G in human serum. *J Chromatogr* 1987;413:131-40.
32. Svinarov DA, Dimova MN. Liquid chromatographic determination of cyclosporine A in whole blood, with Chromosorb P columns used for sample purification. *J Liq Chrom* 1991;14:1683-90.
33. Husek A, Eibler E, Wiegrebe W. High-performance liquid chromatographic analysis of cyclosporine A in human skin. *Arch Pharm* 1993;326:365-8.
34. Salm P, Norris R, Taylor P, Davis D, Ravenscroft P. A reliable high-performance liquid chromatography assay for high-throughput routine cyclosporin A monitoring in whole blood. *Ther Drug Monit* 1993;15:65-9.
35. Moyer TP, Charlson JR, Ebnet LE. Improved chromatography of cyclosporine. *Ther Drug Monit* 1986;8:466-8.
36. Liu WT, Levy GA, Wong PY. Measurement of AM19 and other cyclosporine metabolites in the blood of liver transplant patients with stable liver function. *Ther Drug Monit* 1995;17:479-86.
37. McBride J, Kim SS. Analysis of whole-blood cyclosporin G by liquid chromatography in renal transplant recipients. *J Clin Lab Anal* 1995;9:238-42.
38. Khoschorur G, Semmelrock HJ, Rodl S, Auer T, Petek W, Iberer F, et al. Rapid, sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of cyclosporin A and its metabolites M1, M17 and M21. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997;690:367-72.
39. Husek A. High-performance liquid chromatographic analysis of cyclosporin A and its oral solutions. *J Chromatogr A* 1997;759:217-24.
40. Zeng L, Huang Y, Peng G. Measurement of cyclosporine A in whole blood by high performance liquid chromatography (HPLC). *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 1999;24:387-9.
41. Brozmanova H, Grundmann M, Safarcik K, Jedorov A. High-performance liquid chromatographic method for therapeutic drug monitoring of cyclosporine A and its two metabolites in renal transplant patients. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;749:93-100.
42. Bardelmeijer HA, Ouwehand M, Beijnen JH, Schellens JH, van Tellingen O. Determination of cyclosporin A in human and mouse plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci appl* 2001;763:201-6.
43. Chimalakonda AP, Shah RB, Mehvar R. High-performance liquid chromatographic analysis of cyclosporin A in rat blood and liver using a commercially available internal standard. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;772:107-14.
44. Sharma P, Chawla H, Panchagnula R. Analytical method for monitoring concentrations of cyclosporin and lovastatin in vitro in an everted rat intestinal sac absorption model. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;768:349-59.
45. Zaghoul A, Hussain A, Khan MA, Ahsan F. Development of a HPLC method for the determination of cyclosporin-A in rat blood and plasma using naproxen as an internal standard. *J Pharm Biomed Anal* 2003;31:1101-7.
46. Chan Leach D, Stadalius MA, Berus JS, Synder LR. Reversed phase HPLC of basic samples. *LC-GC International* 1988;1:22-30.
47. Sander LC, Wise SA. Evaluation of shape selectivity in liquid chromatography. *LC-GC International* 1990;3:24-34.
48. Rosset R, Caude M, Jardy A. Manuel pratique de chromatographie en phase liquide. Masson édition Paris 1982, p.1-373.
49. Giesbrecht EE, Soldin SJ, Wong PY. A rapid, reliable high-performance liquid chromatographic micromethod for the measurement of cyclosporin in whole blood. *Ther Drug Monit* 1989;11:332-6.
50. Ouyang J, Baeyens WR, Duan J, Delanghe J. Improvement of cyclosporin A determination in whole blood by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 2003;17:404-10.
51. Steimer W. Performance and specificity of monoclonal immunoassays for cyclosporine monitoring: how specific is specific? *Clin Chem* 1999;45:371-81.
52. Huet E, Morand K, Blanchet B, Astier A, Hulin A. Evaluation of the new heterogeneous ACMA immunoassay for the determination of whole-blood cyclosporine concentrations in bone marrow, kidney, heart, and liver transplant recipients. *Transplant Proc* 2004;36:1317-20.

ABRÉVIATIONS

ACMA	"antibody conjugated magnetic immunoassay"
CEDIA	"cloned enzyme donor immunoassay"
CsA	cyclosporine A
CV	coefficient de variation
HPLC	chromatographie liquide à haute pression
RIA	radioimmunoessai