

Journal of Chromatography, 309 (1984) 183–186

Biomedical Applications

Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 2124

Note

Microdosage de deux antifibrinolytiques (acide ϵ -aminocaproïque et acide tranexamique) par chromatographie liquide et détection fluorimétrique

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

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

(Reçu le 16 janvier 1984)

L'acide ϵ -aminocaproïque (AEAC, acide 6-aminohexanoïque) et l'acide tranexamique (AMCHA, acide *trans*-4-aminométhylcyclohexane carboxylique) sont essentiellement utilisés en thérapeutique comme agents antifibrinolytiques (inhibiteurs de la conversion du plasminogène en plasmine) dans différents processus hémorragiques [1, 2].

D'autres indications proposent leur emploi dans l'oedème angio-neurotique [3, 4], dans certaines réactions allergiques ou comme anti-inflammatoires.

Deux voies sont possibles pour l'évaluation de ces composés: (1) l'une indirecte faisant appel aux différentes méthodes d'exploration de la coagulation [5] ou de lyse du caillot [6]; (2) l'autre plus directe par détermination du taux sanguin de l'antifibrinolytique lui-même.

Dans ce cas, différentes techniques ont été développées jusqu'à présent et mettent en jeu: l'électrophorèse [7], la chromatographie sur papier [8], la chromatographie sur colonne échangeuse de cation [9], en phase gazeuse [10], en phase liquide [11]. Cette technique appliquée à l'AEAC met en oeuvre une détection fluorimétrique des dérivés obtenus après dansylation. L'emploi de la fluoescamine [12] nous a semblé représenter un gain de temps et une simplification du dosage de ces composés.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Appareillage

L'appareil utilisé comprend une pompe haute pression (Touzard et Matignon, Vitry-sur-Seine, France) Type E.C.-93 équipée d'une vanne d'injection à boucle de 20 μ l (Rhéodyne 71-25, Berkeley, CA, E.U.), un spectrofluori-

mètre (Shimadzu Type RF-530, Touzard et Matignon), comportant une cuve de 12 μ l. La longueur d'onde d'excitation est de 390 nm, celle d'émission 475 nm. La colonne est une LiChrosorb RP 18 (10 μ m, 25 cm \times 4.6 mm I.D.) (E. Merck, Darmstadt, R.F.A.). L'appareil est raccordé (sortie 1 mV) à un enregistreur Omniscrite (Houston Instruments).

Prélèvements étalonnage

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

Réactifs

Acide ϵ -aminocaproïque et acide tranexamique (EGA-Chimie, Strasbourg, France), acétonitrile qualité HPLC (Carlo Erba, St Cloud, France), fluorescamine (Fluram, Laboratoires Roche, Neuilly-sur-Seine, France).

Méthode

À 20 μ l de sérum, mélanger 2 μ l de solution aqueuse d'étalon interne (3 g/l d'AMCHA pour le dosage sérique de l'AEAC et 1 g/l d'AEAC pour celui de l'AMCHA), et déprotéiniser par 20 μ l d'acétonitrile. Après 3 min de centrifugation (10,000 *g*), prélever 5 μ l de surnageant et le mélanger à 100 μ l de tampon phosphate 0.025 mol/l ajusté à pH 8. La fluorescamine (100 μ l d'une solution à 300 mg/l dans l'acétone) est ajoutée rapidement en maintenant le tube en agitation sur un vortex. Injecter 20 μ l dans le chromatographe. La phase mobile est constituée par un mélange acétonitrile-eau-acide acétique-tetrahydrofurane (300:690:5:5) contenant 40 mmol/l d'acétate de sodium. Avant usage, la phase mobile est passée sur filtre Millipore (0.45 μ m). Le débit est de 2 ml/min soit une pression d'environ 14 MPa.

RÉSULTATS

La Fig. 1 montre le tracé obtenu avec le sérum d'un patient traité par l'AEAC ainsi qu'un chromatogramme d'un sérum exempt d'AEAC et AMCHA.

L'étude de la linéarité a été effectuée sur du sérum surchargé en AEAC ou en AMCHA aux concentrations suivantes: AEAC: 62.5, 125, 250, 500, 750 et 1000 mg/l; AMCHA: 25, 50, 100 et 200 mg/l. La relation entre les concentrations et le rapport de hauteur du pic du dosage et de l'étalon interne s'est avérée linéaire pour les deux composés 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 94–103% pour l'AEAC et de 98–105% pour l'AMCHA.

Des limites de détection des produits, compte tenu des valeurs des blancs sériques sont de 6 mg/l (AEAC) et de 4 mg/l (AMCHA).

La reproductibilité a fait l'objet de dix déterminations pour chaque niveau et figure dans le Tableau I. Des dosages répétés pendant dix jours de deux pools de sérum pour chaque antifibrinolytique ont donné les résultats suivants:

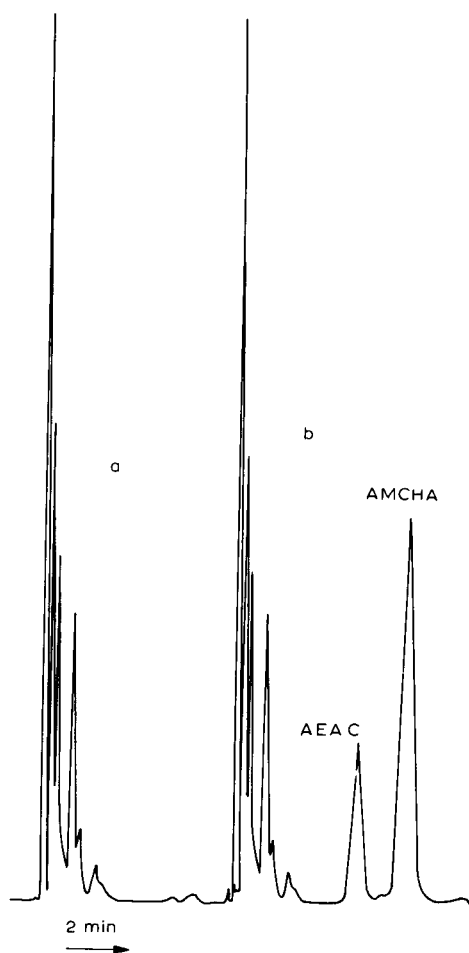


Fig. 1. Chromatogramme obtenu sur un blanc sérique (a) et lors d'un traitement par l'AEAC (b) (52 mg/l).

AEAC: 127.8 ± 2.6 mg/l (C.V. = 2.1%); 251.1 ± 9.2 mg/l (C.V. = 3.7%);
 AMCHA: 52.8 ± 1.3 mg/l (C.V. = 2.4%); 101.4 ± 1.9 mg/l (C.V. = 1.9%).

DISCUSSION

Ces deux antifibrinolytiques sont caractérisés par une clairance rénale élevée [13], ce qui implique des administrations répétées afin de rester dans des zones thérapeutiques (AEAC = 100–400 mg/l; AMCHA = 10–50 mg/l), et des risques d'accumulation lors d'atteintes rénales.

Dans ces conditions, l'évaluation des taux plasmatiques permet une meilleure adaptation de la posologie et d'anticiper éventuellement sur l'apparition des problèmes hématologiques. Mais, pour cela, il est nécessaire de disposer d'une méthode rapide de dosage et c'est pourquoi l'emploi de la fluorescamine comme agent de dérivation apporte une solution simple et rapide à ce problème, le temps de manipulation étant réduit à une déprotéinisation.

TABLEAU I
ÉTUDE DE LA REPRODUCTIBILITÉ

Chaque concentration a fait l'objet de dix déterminations.

| | Concentration (mg/l) | Écart-type (mg/l) | C.V.* (%) |
|-------|-------------------------|----------------------|--------------|
| AEAC | 62.5 | 6.1 | 1 |
| | 125 | 3 | 2.4 |
| | 250 | 3 | 1.1 |
| | 500 | 16 | 3.1 |
| | 1000 | 28 | 2.8 |
| AMCHA | 25 | 1 | 3.3 |
| | 50 | 1.5 | 2.8 |
| | 100 | 1.3 | 1.2 |
| | 200 | 2 | 1.1 |

*Coefficient de variation.

La technique décrite permet le dosage de l'un ou l'autre des produits en inversant l'étalon interne, ces antifibrinolytiques n'étant pas utilisés simultanément en thérapeutique. De plus, la prise d'essai de 20 μ l de sérum peut être très facilement diminuée car seulement 5 μ l du surnageant sont repris, le facteur limitant étant constitué par le matériel qui ne se prête pas toujours à un travail sur des microvolumes.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 I.M. Nilsson, L. Anderson et S.E. Bjorkman, *Acta Med. Scand. Suppl.*, 448 (1966) 5.
- 2 S. Okamoto, S. Sato, Y. Takada et N. Okamoto, *Keio J. Med.*, 13 (1964) 177.
- 3 M.M. Franck, J.S. Sergeant, M.A. Kane et D.W. Alling, *New Engl. J. Med.* 286 (1972) 808.
- 4 A.L. Sheffer, F. Austel et S. Rosen, *New Engl. J. Med.*, 287 (1972) 452.
- 5 F. Markwardt, H.P. Klöcking et M. Richter, *Pharmazie*, 22 (1967) 83.
- 6 N. Wolosowicz, S. Niewiarowski et K. Czerepko, *Thromb. Diath. Haemorrh.*, 10 (1964) 309.
- 7 A. Sjoerdsma et E.A. Hanson, *Acta Chem. Scand.*, 13 (1959) 2150.
- 8 G.P. McNichol, A.P. Fletcher, N. Alkjaersig et S. Sherry, *J. Clin. Lab. Med.*, 59 (1962) 7.
- 9 Y. Takada, A. Takada et U. Okamoto, *Keio J. Med.*, 13 (1964) 115.
- 10 T.R. Keucher, E.B. Solow, J. Metaxas et R.L. Campbell, *Clin. Chem.*, 22 (1976) 806.
- 11 R.F. Adams, G.J. Schmidt et F.L. Vondemark, *Clin. Chem.*, 23 (1977) 4226.
- 12 M. Weigele, S.L. De Bernardo, J.P. Tengi et W. Leimgruber, *J. Amer. Chem. Soc.*, 94 (1972) 5927.
- 13 G.P. McNichol, A.P. Fletcher, N. Alkjaersig et S. Sherry, *J. Clin. Lab. Med.*, 59 (1962) 15.