

## **Dosage sérique des antimycosiques azolés par chromatographie liquide à ultra-haute pression couplée à un détecteur à barrette de diodes. Application au suivi thérapeutique pharmacologique**

V. MISTRETTA<sup>1</sup>, R. DENOZ<sup>1</sup>, C. CHARLIER<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Toxicologie clinique, médico-légale, de l'environnement et en entreprise, Centre Hospitalier Universitaire, Liège, Belgique

**Objectif :** Le nombre d'infections fongiques invasives ne cesse d'augmenter et le taux de mortalité associé à ces pathologies est préoccupant. Afin d'optimiser le traitement, le suivi thérapeutique pharmacologique des antimycosiques est proposé (1). Une méthode de dosage par chromatographie liquide à ultra-haute pression couplée à un détecteur à barrette de diodes (UHPLC-DAD) est développée pour doser simultanément tous les antifongiques azolés utilisés dans la pratique hospitalière : le miconazole (MZ), le fluconazole (FZ), le kétoconazole (KZ), le posaconazole (PZ), le voriconazole (VZ), l'itraconazole (IZ) et son métabolite principal actif, l'hydroxy-itraconazole (HIZ).

**Méthodes :** Dans des tubes en verre de 20 ml, à 1 ml de sérum, sont ajoutés 100 µl de solution de standard interne (SI) (20 mg/L d'azacozazole dans du méthanol), 500 µl d'une solution de carbonate de sodium 1,0 M et 5 ml d'un mélange de solvants d'extraction (diéthyléther/dichlorométhane/hexane/alcool n-amylique ; 50/30/20/0,5 ; v/v/v/v). Après bouchage, les tubes sont agités pendant 10 minutes et centrifugés à 2000 tours/min durant 11 minutes. On transfère dans des tubes à essai de 10 ml, 3,5 ml du surnageant que l'on évapore à sec à 40°C sous un flux d'azote. Les résidus obtenus sont remis en solution avec 70 µl d'eau/acétonitrile (50/50 ; v/v) et centrifugés à 10900 tours/min pendant 5 minutes. Les échantillons ainsi extraits sont analysés par une UHPLC-DAD équipée d'une pompe quaternaire à solvant, d'un injecteur, d'une colonne Waters® Acquity BEH C18 (150 x 2,1 mm ; 1,7 µm) thermostatée à 40°C, et du logiciel informatique Empower (Waters Corporation®, Milford, Massachusetts). Le volume d'échantillon injecté sur la colonne est de 5 µl. La phase mobile est constituée d'acétonitrile (phase A) et de tampon aqueux de bicarbonate d'ammonium 10,0 M à pH 10 (phase B), et est délivrée à un débit de 0,4 ml/min selon le gradient suivant : T<sub>0</sub> : 35 % A ; T<sub>9</sub> : 80 % A ; T<sub>11</sub> : 35 % A. Les longueurs d'onde de quantification varient de 210 à 260 nm en fonction de l'antimycosique analysé (MZ : 210 nm ; FZ : 210 nm ; KZ : 210 nm ; PZ : 260 nm ; VZ : 255 nm ; IZ : 260 nm ; HIZ : 260 nm ; SI : 210 nm) (2). La validation analytique est réalisée au moyen du logiciel e-nova (Arlenda®).

**Résultats :** L'ensemble des antimycosiques azolés et le standard interne sont identifiés en 13 minutes avec une bonne résolution. Toutes les droites de calibration sont linéaires ( $r^2 > 0,99$ ). Pour tous les azolés, la limite inférieure de quantification se situe entre 0,05 mg/L et 0,3 mg/L et la limite supérieure de quantification est de 10 mg/L. La méthode développée convient parfaitement aux valeurs thérapeutiques habituelles (1,3). L'exactitude et la précision intra- et inter-essais déterminées par notre logiciel de validation sont inférieures à 10 % et 15 %, respectivement.

**Conclusion :** Nous avons développé une méthode de dosage par UHPLC-DAD simple, rapide et spécifique, adaptée au suivi thérapeutique pharmacologique des antimycosiques azolés commercialisés en Belgique.

**Références :** 1. Andes D. and al. Antifungal Therapeutic Drug Monitoring: Established and Emerging Indications. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(1): 24-34. 2. Gordien J.-B. and al. Simultaneous determination of five systemic azoles in plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2009; 50(5): 932-938. 3. Hulin A. et coll. Bon usage des antifongiques dans le traitement des candidoses et aspergilloses invasives. *J Pharm Clin.* 2005; 24(3): 125-138.