

Optimisation et validation d'une méthode de dosage du 5-fluorouracile par UHPLC-DAD en vue du suivi thérapeutique pharmacologique

F. Bouchenak¹, N. Laoufi¹, I. Belarbi¹, D. Sadouki¹.

¹ : Hôpital Central De L'armée - Alger (Algérie)

Introduction

Le 5-Fluorouracile (**5FU**) est un anticancéreux de référence, utilisé dans le traitement de plusieurs types de cancers notamment les cancers colorectaux. Il est administré par voie intraveineuse en perfusion continue ou par voie orale (pro-drogue). Sa posologie est choisie sur la base d'un calcul en fonction de la surface corporelle (mg/m²). C'est une approche standard associée à une grande variabilité de la réponse au traitement (risque de toxicité ou d'inefficacité). **(1)**

Le suivi thérapeutique pharmacologique (**STP**) du **5FU** est un outil qui permet l'optimisation des doses à administrer en fonction de l'aire sous la courbe (**AUC**) des concentrations plasmatiques en fonction du temps. **(2-6)** Il est, de ce fait, nécessaire de disposer d'une méthode de dosage plasmatique du **5FU** qui soit juste, précise, suffisamment sensible et spécifique. Il existe des nomogrammes permettant l'adaptation de posologie du 5FU. **(4)**

Plusieurs méthodes ont été développées : commençant par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse **(7)**, puis la chromatographie en phase liquide couplée à un détecteur ultraviolet LC/UV **(8)** et enfin la chromatographie en phase liquide avec spectrométrie de masse en tandem LC-MS/MS **(9)**. La LC-MS/MS est un appareillage onéreux non disponible dans tous les centres et laboratoires, ce qui a induit récemment au développement de méthodes immunologiques. **(10)**

Objectifs

Optimisation et validation d'une méthode de dosage du **5FU** par chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un détecteur à barrette de diode **UHPLC-DAD**.

Application de la méthode au **STP** du **5-FU**



Matériel

Réactifs

- **5 Fu** standard A2S 99.9%.
- 5 Fluorocytosine (**5FC**) standard A2S 98%.
- 5 Bromouracile (**5BrU**) standard A2S 98%.
- Pyrazinamide (**PYZ**) standard A2S 99.9%.
- Acide ortho phosphorique 85% (Panreac).
- Méthanol 99.8% grade HPLC.
- 2-Propanol (**IP**) 99.9%.
- Ethyle acétate (**AE**) pour UV, IR, HPLC, ACS 99,9%.
- Ammonium sulfate 99,0%.
- Eau bi distillée.
- Potassium di-hydrogénophosphate KH₂PO₄ 99,0%.
- Ether 99,5%.
- Réactif biologique : Blanc plasma.



Figure 1: Standards A2S: (a) 5FU, (b) 5FC

Equipements

- Nous avons utilisé divers équipements dont:



Figure 2: UHPLC-DAD Waters® System Aquity



Figure 3: Evaporateur Eppendorf Concentrator plus

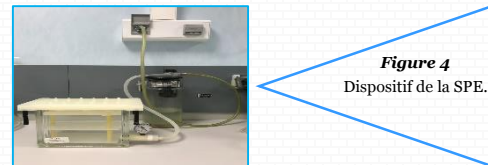


Figure 4: Dispositif de la SPE.

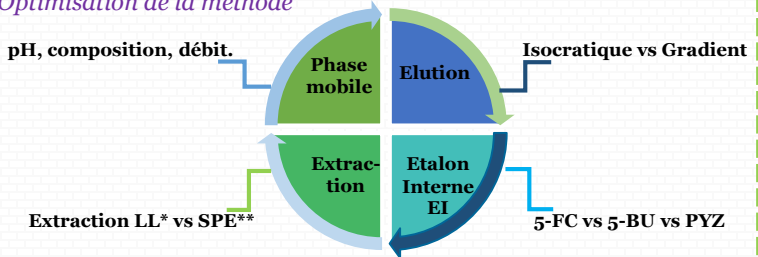
- Autres: HPLC-DAD, balance à précision, centrifugeuses, pH mètre, micropipettes, colonnes SPE C18, verrerie (fioles...), consommables divers.

Méthode

Une revue de la littérature a permis de cibler les conditions chromatographiques ainsi que le traitement d'échantillon de départ (A optimiser). **(8) (11-13)**.

Optimisation de la méthode

pH, composition, débit.

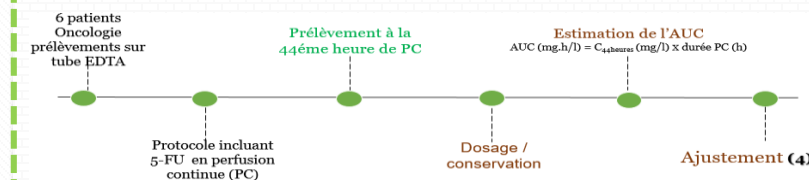


Méthode **optimisée**: Analyse via UHPLC-DAD Waters®. **Longueur d'onde de lecture** : 266 nm. **Colonne** UHPLC mediterranea sea C18 (1.8µm 150x0.21 mm) Teknokroma® avec pré colonne C18 (1.8µm 10x0.21 mm). **Phase mobile A** : Solution KH₂PO₄ 10 mM pH = 4,2. **B** : Méthanol pur. Débit : 0,2 ml/mn. Mode d'élution : gradient (**tableau 1**). Les solutions stock 5FU et EI sont préparées dans Méthanol/eau (50/50, v/v), alicotées et congelées à -45°C. Traitement d'échantillon : ajout 50µl **5FC = EI** (6µg.ml⁻¹) à 500µl de plasma (échantillon, CQ, point de la courbe d'étalonnage), 500mg de Sulfate d'ammonium. ELL par 3,5ml de solvant organique (**AE/IP**) (85 :15 v/v). Evaporation du surnageant à 45°C. Reconstitution avec 50µl de A. **Volume d'injection** : 10 µl. **Temps d'analyse** : 15 minutes.

Validation de la méthode

Selon les critères de l'**ICH M10** (International Council for Harmonisation bioanalytical method validation M10)

Application : Dosage du 5FU chez des patients d'oncologie



ELL* : Extraction Liquide .
SPE** : Extraction en Phase Solide.

Optimisation et validation d'une méthode de dosage de 5-fluorouracile par UHPLC-DAD en vue du suivi thérapeutique pharmacologique

F. Bouchenak¹, N. Laoufi¹, I. Belarbi¹, D. Sadouki¹.

¹ : Hôpital Central De L'armée - Alger (Algérie)

Résultats

Tableau 1: Composition de la phase mobile et mode d'élution

Temps (min)	A %	B %	Débit ml/min
0	100	0	0,2
5,5	90	10	0,2
7	85	15	0,3
10	85	15	0,3
10,2	100	0	0,2
13	100	0	0,2

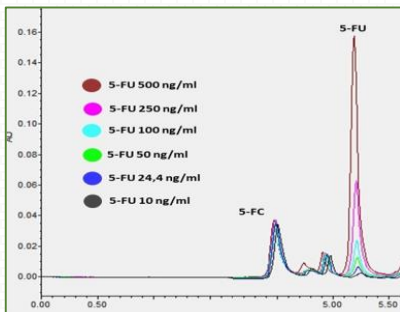


Figure 5: Superposition des chromatogrammes des six standards de calibration. Temps de rétention 5FU_{5,4} min

Limite inférieure de quantification (LLOQ)	10 ng/ml
Domaine de dosage	De 10 à 500 ng/ml
Standards de calibration (ng/ml)	10- 24,4- 50- 100- 250- 500
Modèle	Régression linéaire simple (r>0,998/ r ₂ >0,99)
Contrôles qualité	10 ng/ml LLOQ, 30 ng/ml LQC ^s , 250 ng/ml MQC ^s , 375 ng/ml HQC ^s

Accuracy (Justesse)

Série 1	Recouvrement %	Biais relatif %	Limites	Série 2	Recouvrement %	Biais relatif %	Limites
LLOQ	101,60	+ 1,60	+/- 20%	LLOQ	107,78	+ 7,78	+/- 20%
LQC	99,08	- 0,92	+/- 15%	LQC	100,19	+ 0,19	+/- 15%
MQC	104,88	+ 4,88		MQC	104,49	+ 4,49	
HQC	103,38	+ 3,38		HQC	98,53	- 1,46	

Série 3	Recouvrement %	Biais relatif %	Limites	Inter séries	Recouvrement %	Biais relatif %	Limites
LLOQ	110,62	+ 10,62	+/- 20%	LLOQ	106,67	+ 6,67	+/- 20%
LQC	106,20	+ 6,20	+/- 15%	LQC	101,82	+ 1,82	+/- 15%
MQC	109,91	+ 9,91		MQC	106,43	+ 6,43	
HQC	98,35	- 1,65		HQC	100,09	+ 0,09	

Précision

	LLOQ CV%	LQC CV%	MQC CV%	HQC CV%
Série 1	5,32 %	9,73 %	2,88 %	3,51 %
Série 2	5,84 %	4,76 %	4,03 %	6,33 %
Série 3	2,96 %	4,48 %	2,28 %	2,99 %
Inter-Séries	4,78 %	6,33 %	4,17 %	6,50 %
Limites d'acceptabilité	20 %		15 %	

Effet matrice

Pas d'interférence des 6 sources de matrices différentes (surchargées aux concentrations LQC et HQC) ni avec la justesse (exactitude) ni avec la précision. CV < 7% (largement < 15%).

Sélectivité

Absence d'interférences aux temps de rétention du 5FU (<<20% LLOQ) et de EI (<5%) pour les 6 lots de matrices testés.

Spécificité

Le principal métabolite du 5FU : dihydrofluoro-uracile n'interfère à la longueur d'onde de lecture (266nm).

Carry over

Pas de contamination inter-échantillons. % de réponse <20% de LLOQ pour la 5FU et <5% pour EI

Dilution

Au 1/10 : CV=5,46% et qu'un biais relatif=3,22% (< 15%) Possibilité de doser des concentrations allant jusqu'à 5µg/ml.

Stabilité

Le 5FU est stable dans le plasma 30 jours à -45°C, dans l'extractum reconstitué 7h à température ambiante, dans le résidu sec 24h à +4°C et après 3 cycles de congélation/décongélation. Les solutions stock (5FU, EI) sont stables 3 mois à -45°C.

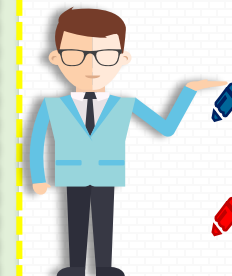
Application : Dosage du 5FU chez des patients d'oncologie

Code du patient	Concentration calculée (ng/ml)	AUC (mg.h/l)	Ajustement de dosage à faire (±%) de la dose précédente (4)
LN-1	206,09	9,89	+25%
BM-2	296,81	14,24	+20%
AZ-3	376,57	18,08	+10%
KD-4	611,90	29,37	Conservé
MF-5	228,36	10,96	+25%
PB-6	337,94	16,22	+20%

Discussion



L'UHPLC a permis de quantifier de plus faibles concentrations en 5FU en comparaison avec l'HPLC. Lors de l'optimisation l'ELL c'est montrée supérieure à la SPE. Le gradient d'élution ainsi que l'augmentation du débit a permis d'éliminer les composés moins polaires que le 5FU qui sont retenus au niveau de la phase stationnaire apolaire C18.



La méthode obtenue est juste, précise, sélective et spécifique, adéquate pour la réalisation du STP du 5FU ainsi que pour d'éventuelles études pharmacocinétique.



L'application de notre méthode à un faible échantillon de patient a néanmoins permis de constater le sous-dosage chez la majorité d'entre eux, mettant encore plus l'accent sur l'intérêt certain du STP dans ce cas.



- (1) Saif MW, Choma A, Salamone SJ, Chu E. Pharmacokinetically Guided Dose Adjustment of 5-Fluorouracil: A Rational Approach to Improving Therapeutic Outcomes. JNCI J Natl Cancer Inst. 18 nov 2009;101(22):1543-52.
- (2) Goirand F, et al. How can we best monitor 5-FU administration to maximize benefit to risk ratio? Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2 déc 2018;14(12):1303-13.
- (3) Lemaître, F. et al. (2018). Suivi thérapeutique pharmacologique du 5-fluorouracile : mise au point et recommandations du groupe STP-PT de la SFPT et du GPCO-Unicancer. Bulletin Du Cancer.
- (4) Gamelin E, et al. Individual Fluorouracil Dose Adjustment Based on Pharmacokinetic Follow-Up Compared With Conventional Dosage: Results of a Multicenter Randomized Trial of Patients With Metastatic Colorectal Cancer. J Clin Oncol. 1 mai 2008;26(13):2099-105.
- (5) Farkouh A, Ettlinger D, Schueller J, Georgopoulos A, Scheithauer W, Czejka M. A rapid and simple HPLC assay for quantification of capecitabine for drug monitoring purposes. Anticancer Res. déc 2010;30(12):5207-11.
- (6) Thorat SG, Chikhale RV, Tajne MR. Development and Validation of HPLC and HPTLC Methods for Therapeutic Drug Monitoring of Capecitabine in Colorectal Cancer Patients. J Chromatogr Sci. 13 nov 2019;57(10):892-900.
- (7) Anderson LW, Parker RJ, Collins JM, Ahlgren JD, Wilkinson D, Strong JM. Gas chromatographic-mass spectrometric method for routine monitoring of 5-fluorouracil in plasma of patients receiving low-level protracted infusions. J Chromatogr. 23 oct 1992;581(2):195-201.
- (8) Gamaou, S. E., & Saguem, S. Extraction sur phase solide et analyses par HPLC du 5-fluoro-uracile plasmatique. Comptes Rendus Chimie, 8(9-10) 2005, 1688-1693.
- (9) Shiraiwa K, Suzuki Y, Uchida H, Iwashita Y, Tanaka R, Iwao M, et al. Simultaneous quantification method for 5-FU, uracil, and tegafur using UPLC-MS/MS and clinical application in monitoring UFT/LV combination therapy after hepatectomy. Sci Rep. 4 févr 2021;11(1):3132.
- (10) Mindt S, Aida S, Merx K, Müller A, Gutting T, Hedtke M, et al. Therapeutic drug monitoring (TDM) of 5-fluorouracil (5-FU): new preanalytic aspects. Clin Chem Lab Med CCLM. 1 juill 2019;57(7):1012-6.
- (11) Nassim MA, et al. An HPLC method for the measurement of 5-fluorouracil in human plasma with a low detection limit and a high extraction yield. Int J Mol Med. oct 2002;10(4):513-6.
- (12) Casale F, et al. Simultaneous HPLC determination of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma of cancer patients. Biomed Chromatogr. oct 2002;16(7):446-52.
- (13) Paolo AD, et al. Improved Analysis of 5-Fluorouracil and 5,6-Dihydro-5-Fluorouracil by HPLC With Diode Array Detection for Determination of Cellular Dihydropyrimidine Dehydrogenase Activity and Pharmacokinetic Profiling. Ther Drug Monit. juin 2005;27(3):362-8.