

## Evaluation de la méthode de Trinder pour le dosage de l'acide salicylique

W. DOUKI  
H. MEZZOUR  
A. BEN AMOR  
MF. NAJJAR

**Résumé :** En dépit de l'émergence de nouvelles techniques de dosage des salicylés, basées sur des technologies modernes, la méthode de Trinder reste l'une des plus simples et rapides. Dans ce travail, nous avons évalué les performances analytiques fondamentales de cette méthode dans l'objectif d'en étudier la fiabilité. Nous avons travaillé sur un pool de sérums surchargé en acide salicylique pour une concentration finale de 2000 mg/l, à partir de laquelle nous avons réalisé une gamme de dilutions à 50,100, 200, 400, 500, 800, 1000, 1200 et 1500 mg/l. Nous avons adapté la méthode de Trinder, qui repose sur la mesure colorimétrique à 540 nm du complexe chlorure ferrique/acide salicylique, sur spectrophotomètre Hitachi U-2000. Nous avons appliqué le protocole d'évaluation recommandé par la SFBC et l'IFCC pour établir la linéarité et le profil de précision, et étudier la précision (répétabilité et reproductibilité), l'exactitude (test de dilution et corrélation avec la technique colorimétrique SIGMA®) et l'interférence des états du sérum (bilirubine, hémolyse, turbidité), de 2 substances réductrices (glucose, acide ascorbique) et du fer. La méthode est linéaire de 3 mg/l (limite de détection) à 2000 mg/l (limite de linéarité), avec un profil de précision validé dans ce domaine. La précision, testée sur 3 niveaux de concentration, est acceptable (répétabilité: CV < 2,74% ; reproductibilité : CV < 6,67%). La droite de régression de l'exactitude par le test de dilution a pour équation  $Y = 1,006 X - 2,231$  ( $r = 1,0000$ ). L'étude de la corrélation avec la méthode colorimétrique SIGMA® a fourni un coefficient  $r = 0,9996$ . Enfin, nous n'avons pas relevé d'interférence statistiquement significative de la turbidité, de la bilirubine, de l'hémolyse, du glucose, de l'acide ascorbique et du fer. Les performances analytiques de cette méthode témoignent de sa fiabilité et lui permettent une large application en toxicologie clinique.

**Mots clés :** Salicylés - Trinder - Précision - Exactitude - Interférences

**Abstract :** In spite of the emergence of new techniques of salicylates determination, based on modern technologies, the Trinder method remains one of the simplest and most rapid. In this work, we assessed the fundamental analytic performances of this method in order to study its reliability. We worked on a pool of sera overloaded with salicylic acid for a final concentration of 2000 mg/l, from which we achieved a range of dilutions to 50,100, 200, 400, 500, 800, 1000, 1200 and 1500 mg/l. We adapted the Trinder method, that is based on colorimetric measure at 540 nm of the complex ferric chloride / salicylic acid, on spectrophotometer Hitachi U-2000. We applied the protocol of assessment recommended by the SFBC and the IFCC to establish the linearity and the precision profile, and to study the within run and between run precision, the accuracy (test of dilution and relationship with the SIGMA™ colo-

Laboratoire de Biochimie  
Toxicologie - CHU Fattouma  
Bourguiba - Monastir

rimetric technique) and the interference of statements of the serum (bilirubin, hemolysis, turbidity), of 2 reducing substances (glucose, ascorbic acid) and iron.

The method is linear from 3 mg/l (limit of detection) to 2000 mg/l (limit of linearity), with a precision profile validated in this domain. The precision, tested on 3 levels of concentration, is acceptable (repeatability: CV <2,74%; reproductibility : CV <6,67%). The accuracy regression line, obtained by the test of dilution has for equation:  $Y = 1,006 X - 2,231$  ( $r = 1,0000$ ). The correlation with the SIGMA® colorimetric method provided a coefficient  $r = 0,9996$ . At last, we did not notice statistically significant interference of turbidity, bilirubin, hemolysis, glucose, ascorbic acid and iron. The analytic performances of this method testify to its reliability and allow it a large application in clinical toxicology.

**Keywords :** Salicylate - Trinder - Precision - Accuracy - Interferences

## Introduction

Les salicylés constituent une classe médicamenteuse anciennement connue. L'acide acétylsalicylique, plus connu sous le nom d'aspirine, est utilisé en thérapeutique humaine depuis 1899 et figure encore de nos jours parmi les médicaments les plus prescrits. L'acide salicylique, support de l'activité biologique des salicylés, est doué de nombreuses propriétés pharmacologiques notamment analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires. La relation entre sa concentration dans le sérum d'une part, et son efficacité thérapeutique et sa toxicité d'autre part, est actuellement bien établie (1,2). Son dosage présente donc un intérêt dans le diagnostic et le pronostic des intoxications aiguës, ainsi que dans le suivi thérapeutique. Au départ, les méthodes de dosage mises au point faisaient appel à la spectrophotométrie mesurant le complexe coloré formé entre les salicylates et les ions ferriques. Par la suite, la spectrophotométrie UV et la spectrofluorimétrie, et plus récemment, l'immuno-enzymologie et la polarisation de fluorescence ont été développées. Actuellement, les méthodes de choix sont essentiellement la chromatographie gaz-liquide et la chromatographie liquide haute performance qui est la méthode de référence.

Cependant, et en dépit de l'émergence de ces méthodes hautement sensibles et spécifiques, la méthode colorimétrique de Trinder (3), mise au point depuis 1954, reste

l'une des plus simples et rapides. Dans ce travail, nous avons évalué les performances analytiques fondamentales de cette méthode dans l'objectif d'étudier sa fiabilité et la pertinence de son adaptation aux différentes situations en toxicologie clinique.

## Matériel et méthodes

Nous avons utilisé comme matériel d'étude un pool de sérums après homogénéisation et filtration sur gaze, avant de procéder à une surcharge en acide salicylique pur (Thermolyne Corporation®, Réf. HM0500VF2) par dissolution. La concentration finale  $C_i$  ainsi obtenue et vérifiée par dosage était de 2000 mg/l. Nous avons réalisé une gamme de dilutions dans l'eau distillée, dosées à 50, 200, 400, 800, 1000, 1200 et 1500 mg/l. Nous avons évalué, selon les protocoles de la SFBC (4,5) et de l'IFCC (6,7) les principales performances analytiques du dosage de l'acide salicylique par la méthode de Trinder qui repose sur la mesure à 540 nm du complexe acide salicylique/chlorure ferrique de coloration violette, sur un spectrophotomètre Hitachi U-2000 (utilisation d'un blanc réactif) :

- *Limite de détection (LD)* : par mesures répétées ( $n=15$ ) d'un blanc réactif contre l'eau distillée :

$LD = X_m + 3 SD$  ( $X_m$  = moyenne,  $SD$  = écart type)

- *Linéarité* : nous avons effectué 15 mesures pour chacune des 9 concentrations de la gamme de dilution ( $n = 9$ ) et porté les moyennes respectives obtenues en fonc-

tion de l'absorbance.

- *Profil de précision* : à partir des mesures de 21 dilutions d'acide salicylique s'étalant de 0 à 2000 mg/l, nous avons établi le profil de précision  $CV = f(\text{Concentration } C)$

- *Précision* : à partir de 3 niveaux de concentration (basse, moyenne et élevée), nous avons étudié la répétabilité ( $n=20$ ) et la reproductibilité intersérielle ( $n=20$ ) de la méthode.

- *Exactitude* : à partir de la concentration initiale en acide salicylique ( $C_i$ ), nous avons réalisé une gamme de 9 dilutions dont les moyennes des mesures répétées ( $n=10$ ) ont été corrélées par le test t de Student avec les concentrations théoriques calculées. Nous avons également réalisé une corrélation entre la méthode étudiée et une méthode colorimétrique commercialisée (Réf : 530-A, SIGMA-ALDRICH chimie GmbH, Germany) par le test de Student ( $n = 110$ ), au moyen du pool de dilutions utilisé pour le profil de précision.

- *Interférences* : nous avons étudié par le biais du coefficient d'exactitude l'interférence des états du sérum et de 3 substances réductrices par le procédé de surcharge en utilisant les matrices suivantes :

- \* Turbidité due à l'hypertriglycéridémie : solution d'intralipide®
- \* Bilirubine : solution primaire de bilirubine dans NaOH N/10
- \* Hémolyse : hémolysât d'hématies lavées puis lysées à l'eau distillée
- \* Glucose : solution primaire dans l'eau distillée
- \* Acide ascorbique : solution primaire dans l'eau distillée
- \* Fer : solution de chlorure ferrique dans l'eau distillée

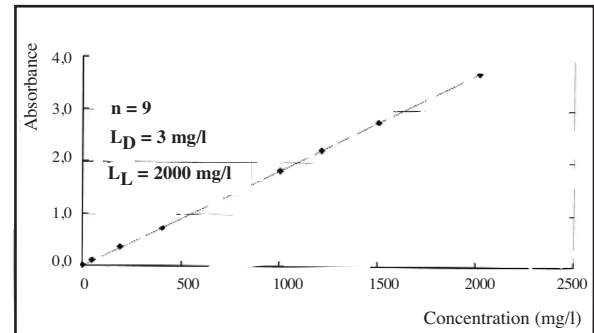
**Tableau I : Précision de la méthode de TRINDER pour le dosage de l'acide salicylique à trois niveaux de concentration S1, S2 et S3 (n = 20)**

	REPETABILITE			REPRODUCTIBILITE		
	Xm (mg/l)	SD (mg/l)	CV (%)	Xm (mg/l)	SD (mg/l)	CV (%)
S1	191,5	3,12	1,63	199,9	0,88	0,44
S2	401,84	2,36	0,58	398,8	8,14	2,04
S3	822,54	3,64	0,43	832,3	66,6	8,00

Xm : valeur moyenne  
SD : écart-type  
CV : coefficient de variation

## Résultats

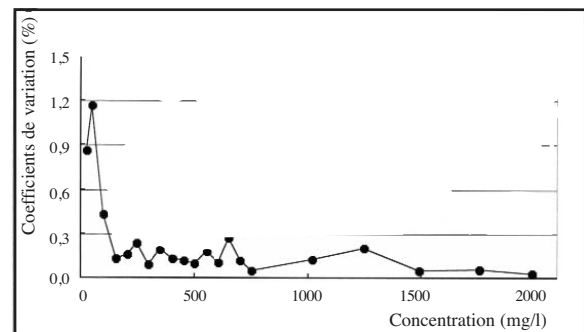
La méthode est linéaire de 3,0 mg/l (LD) à 2000 mg/l (Limite de linéarité =  $L_L$ ) (figure 1). Elle est précise dans ce domaine de linéarité pour une limite d'acceptabilité < 10% (figure 2). Le tableau I qui rap-



LD : limite de détection

LL : limite de linéarité

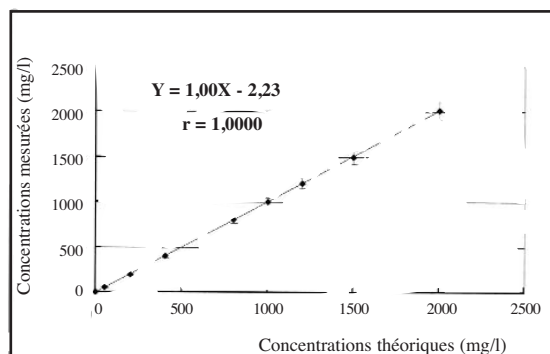
**Figure 1 : Linéarité de la méthode de TRINDER pour le dosage de l'acide salicylique**



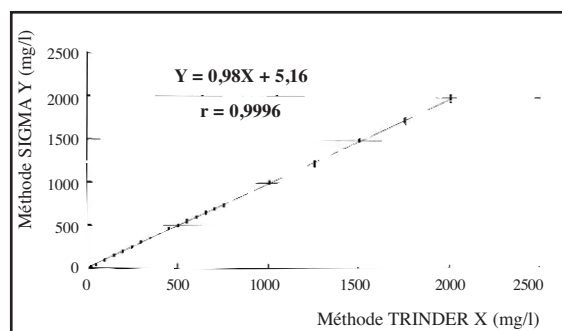
**Figure 2 : Profil de précision de la méthode de TRINDER pour le dosage de l'acide salicylique**

## Evaluation de la méthode de Trinder pour le dosage de l'acide salicylique

porte les CV obtenus pour les 3 niveaux de concentrations utilisés pour l'étude de la répétabilité et de la reproductibilité intersérielle confirme la précision de la méthode. Les figures 3 et 4, représentant respectivement les résultats obtenus par le test de dilution, avec une droite de régression d'équation  $Y = 1,006 X - 2,231$  ( $r = 1,000$ ), et la corrélation avec la méthode SIGMA® ( $r = 0,996$  ;  $p < 0,001$ ), attestent de l'exactitude de la méthode. Le tableau II montre l'absence d'interférence statistiquement significative de la turbidité, de la bilirubine, de l'hémolyse, du glucose, de l'acide ascorbique et du fer, par rapport à une inexactitude tolérée à 5%.



**Figure 3 : Exactitude de la méthode de TRINDER pour le dosage de l'acide salicylique (test de dilution)**



**Figure 4: Corrélation de la méthode de TRINDER pour le dosage de l'acide salicylique avec la méthode colorimétrique SIGMA®**

### Discussion

Dans notre domaine de linéarité, les concentrations en acide salicylique permettent de satisfaire à toutes les situations envisageables au laboratoire, qu'il s'agisse de

suivi thérapeutique ou d'un contexte d'intoxication aiguë. Ces résultats ne concordent pas avec les données de Svrbely qui rapporte une limite de linéarité de 1000 mg/l pour toutes les méthodes spectrophotométriques, alors qu'une limite de linéarité à 2000 mg/l est plutôt retrouvée avec la méthode HPLC (8). Selon ce même auteur, la limite de détection est plus élevée que la notre et serait d'environ 20 mg/l, en raison d'une interférence présumée du fer qui donnerait avec les méthodes colorimétriques une réaction positive même en l'absence de salicylés. Eckfeldt et coll (9) et Porter (10) confirment les observations de Svrbely (8) en signalant des limites de détection plus élevées que la notre, et qui majoreraient les salicylémies respectivement de 10 à 30 mg/l et de 20 à 25 mg/l. D'ailleurs, Porter (10) suggère le recours à un blanc échantillon pour éliminer l'interférence quasi-constante notée en l'absence de salicylés.

Notre étude de la répétabilité et de la reproductibilité permet de conclure à une bonne précision de la méthode avec des CV  $< 6,67\%$ , sachant qu'un CV maximum de 9,6% caractérise les méthodes spectrophotométriques, selon Svrbely (8). Cependant, la précision est nettement meilleure lorsque la méthode de Trinder est adaptée sur automate, comme le montrent les résultats de Eckfeldt et coll qui retrouvent un CV de 4% (9). Morris et coll (11) rapportent également une meilleure précision (CV  $< 4\%$ ) avec une méthode enzymatique automatisée à la salicylate mono-oxygénase.

Le profil de précision établi dans notre domaine de linéarité confirme les résultats de la répétabilité et de la reproductibilité, et témoigne de la bonne précision de la méthode, puisque les CV obtenus sont tous  $< 3\%$ , largement en deçà de la limite d'acceptabilité habituellement tolérée à 10%.

L'exactitude de la méthode de Trinder est attestée par les résultats du test de dilution et la bonne corrélation avec la méthode colorimétrique SIGMA®. Jarvie et coll (12) confirment l'exactitude de cette méthode qu'ils trouvent étroitement corrélée avec la CLHP, méthode de référence. Morris (11) et You (13) rapportent également une bonne corrélation de la méthode de Trinder respectivement avec la méthode enzymatique colorimétrique automatisée

Tableau II : Etude de certaines interférences sur la méthode de TRINDER pour le dosage de l'acide salicylique

Interfèrent	Nombre de dilutions	Concentration moyenne en acide salicylique (mg/l)	Marges de concentrations en interfèrent	Limites du coefficient d'exactitude (CE %)
Bilirubine	4	400	0 – 500 $\mu$ mol/l	0,93 – 0,98
Hémoglobine	4	400	0 – 240 $\mu$ mol/l	0,98 – 1,02
Hypertriglycéridémie	4	400	2,0 – 7,0 mmol/l	1,01 – 1,03
Glucose	2	250	5,0 – 33,0 mmol/l	0,02 – 1,07
Acide Ascorbique	2	250	0 – 500 mg/l	0,01 – 1,99
Fer	2	250	3 – 80 $\mu$ mol/l	0,10 – 1,57

( $r = 0,994$ ) et la méthode enzymatique spectrophotométrique en UV ( $r = 0,97$ ). Par contre, d'autres auteurs contestent l'exactitude de cette méthode. Ainsi, pour Eckfeldt et coll (9), la méthode de Trinder est précise plutôt qu'exacte et présente une mauvaise corrélation avec la CLHP. Mutchie et coll (14) retrouvent eux aussi des variations significatives par rapport aux résultats obtenus par spectrofluorimétrie.

Notre étude n'a pas montré d'interférence significative de la bilirubine, de la turbidité due à l'hypertriglycéridémie et de l'hémolyse. En accord avec ce résultat, certains auteurs rapportent une absence d'interférence des états du sérum avec les méthodes spectrophotométriques (8), une méthode enzymatique spectrophotométrique en UV (13) et une méthode enzymatique colorimétrique automatisée (11). Par contre, Eckfeldt et coll (9) retrouvent, en étudiant les performances d'une méthode colorimétrique automatisée une interférence de la turbidité lorsque la lipémie dépasse 60 g/l-situation rarement rencontrée en pathologie humaine, de même qu'une interférence négative de la bilirubine. Cette dernière est également signalée par Barlow et coll (15) pour une méthode colorimétrique adaptée sur l'analyseur multiparamétrique TECHNICON RA1000®. Par ailleurs, Berkovitch et coll (16) retrouvent des concentrations faussement élevées en acide salicylique chez les nouveaux-nés présentant un ictère néonatal, en l'absence de toute prise de salicylés, et recommandent le recours à une technique immunologique pour le diagnostic d'une

intoxication aux salicylés en période néonatale.

Les 3 composés réducteurs que nous avons testés (acide ascorbique et glucose) de même que le fer, n'ont pas donné d'interférence significative avec la méthode de Trinder. Mais ce résultat préliminaire devrait être complété par l'étude de nombreux autres interférents potentiels, tels que certains composés endogènes et analogues structuraux des salicylés (10).

### Conclusion

La méthode de Trinder est une méthode fiable, suffisamment précise, exacte et indépendante des états du sérum, dans un domaine de linéarité permettant de répondre à toutes les prescriptions de ce dosage en toxicologie clinique, du suivi thérapeutique aux intoxications aiguës les plus sévères.

En dépit de l'existence de plusieurs autres méthodes plus précises et plus spécifiques, elle demeure une méthode de choix pour le dosage en routine des salicylés en raison de sa bonne praticabilité (simplicité, rapidité et faible coût). Cependant, l'interférence rapportée à propos de certaines substances mériterait une étude complémentaire pour identifier l'interfèrent, quantifier son

interférence et en élucider le mécanisme.

### Références

1. Levy G. Clinical pharmacokinetics of salicylates : A reassessment. *Br.J.Clin.Pharmacol.*, 1980 ; 10: 285S-290S.
2. Levy G. Clinical pharmacokinetics of salicylate in man. *Drug Metab. Rev.*, 1979 ; 9 : 3-19.
3. Trinder P., Rapid determination of salicylate in biological fluids. *Biochem. J.*, 1954 ; 57 : 301-303.
4. Vassault A., Procédure de validation d'une technique. *Spectra Biologie*, 1997 ; 16 : 43-50.
5. Vassault A., Azzeddine M.C., Baily M., Cam G., Dumont G., Ekindjian, O.G. et al, Protocole d'étude de l'influence de la bilirubine, de l'hémoglobine et de la turbidité des spécimens. *Ann. Biol. Clin.*, 1986 ; 44 : 686-745.
6. MacDonald R.P. Standard methods of Clinical Chemistry, Vol.5, Academic Press, New York, 1995.p.237-243.
7. Tietz N.W. Fundamentals of Clinical Chemistry, N.W. Tietz Editor, Saunders, Philadelphia, 1976.p.1148.
8. Svirbely J. Toxicology and therapeutic drug monitoring, Salicylates, in : Kaplan L.A., Pesce A.J. (Eds), Clinical Chemistry. Theory, analysis, and correlation, 2nd edition, The C.V. Mosby Compagny, St-Louis, 1989. p.1066-1121.
9. Eckfeldt J.H., Nelson K.M. Salicylate determined with a Microcentrifugal Analyzer, and compared with Du Pont aca, Trinder, and Liquid-Chromatographic Methods. *Clin. Chem.* 1983 ; 29 : 839-841.
10. Porter W.H. Clinical toxicology, in : Burtis C.A., Ashwood E.R. (Eds), Tietz textbook of Clinical Chemistry, 3rd edition, W.B. Saunders Compagny, Philadelphia, 1999, pp.906-981.
11. Morris M.C., Overton P.D., Ramsay J.R., Campbell R.S., Hammond P.M., Atkinson T., and Price C.P. Development and validation of an automated, enzyme-mediated colorimetric assay of salicylate in serum. *Clin. Chem.*, 1990 ; 36 : 131-135.
12. Jarvie D.R., Heyworth R.H., Simpson D., Plasma salicylate analysis : a comparison of colorimetric, HPLC and enzymatic techniques. *Ann. Biochem.*, 1987 ; 24 : 364-373.
13. You K.S., Bittikofer J.A. Quantification of salicylate in serum by use of salicylate hydroxylase. *Clin. Chem.*, 1984 ; 30 : 1549 - 1551.
14. Mutchie K.D., Saunders G.H., Hanissian A.S., Poe T.E. Interlaboratory salicylate variability. *J. Rheumatol.*, 1980 ; 7 : 737-740.
15. Barlow I.M., Harrison S.P. Bilirubin interference with salicylate method on the RA 1000 analyzer [Tech Brief]. *Clin. Chem.*, 1987 ; 33 : 309.
16. Berkovitch M., Uziel Y., Greenberg R., Chen-Levy Z., Arcusin M., Marcus O., et al. False-high blood salicylate levels in neonates with hyperbilirubinemia. *Ther. Drug Monit.*, 2000 ; 22 :