

W.H.O. Doc

7972

5/10 [F only with summary in E]
WHO/MAL/86.1026



WORLD HEALTH ORGANIZATION

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE

FRANCAIS SEULEMENT
(with English summary)



659-7

SUIVI THERAPEUTIQUE PAR LA DETERMINATION DE LA CHLOROQUINE
DANS L'URINE APRES FIXATION SUR PAPIER ECHANGEUR D'IONS¹

par

del 700
B. B. Ba,² M. Estadiou,² F. Gouezo,²
A. Durand,² A. Viala,² J. Delmont³ & Ph. Ranque⁴

*therapeutique use
chloroquine - urine*

Table des matières

	<u>Pages</u>
1. Introduction	2
2. Description de la méthode	2
2.1 Matériel, réactifs et solutions de référence	2
2.2 Protocole opératoire	3
3. Valeur de la méthode	3
3.1 Sensibilité	3
3.2 Linéarité	3
3.3 Reproductibilité	4
3.4 Pourcentage de fixation sur le papier	4
3.5 Pourcentage global d'extraction	4
3.6 Conservation	4
3.7 Spécificité	4
4. Application	5
5. Conclusion	5
6. Résumé	5
Summary	6
Références bibliographiques	7
Tableaux et figure	8

¹ Travail effectué avec l'aide du Conseil régional Provence-Alpes-Côte d'Azur.

² Laboratoire de Toxicologie générale et Biotoxicologie, Faculté de Pharmacie, Marseille, France.

³ Faculté des Sciences de la Santé, Université de Bangui, République centrafricaine.

⁴ Ecole de Médecine et de Pharmacie, Bamako, Mali.

The issue of this document does not constitute formal publication. It should not be reviewed, abstracted or quoted without the agreement of the World Health Organization. Authors alone are responsible for views expressed in signed articles.

Ce document ne constitue pas une publication. Il ne doit faire l'objet d'aucun compte rendu ou résumé ni d'aucune citation sans l'autorisation de l'Organisation mondiale de la Santé. Les opinions exprimées dans les articles signés n'engagent que leurs auteurs.

1. INTRODUCTION

Dans la plupart des pays tropicaux et plus précisément en Afrique au sud du Sahara, la lutte contre le paludisme fait partie des programmes sanitaires et consiste avant tout en une chimioprophylaxie individuelle et collective doublée du dépistage et du traitement systématique du paludéen (Attisso, 1968). Malgré l'apparition de cas de résistance du Plasmodium falciparum que certains jugent alarmants, la chloroquine reste l'antipaludique le plus utilisé. Après une prise orale son absorption est rapide et sub-totale, mais son élimination, essentiellement urinaire, est très lente. Ceci autorise donc des prises espacées, commodes en prophylaxie et en traitement de masse (Charmot & Bricaire, 1979). Selon Fauran et Sankale (1970) 30 % seulement de la dose administrée s'éliminent dans l'urine en sept jours. En ce qui concerne la nature des métabolites urinaires, McChesney et al. (1966) notent que dans le cadre d'une posologie normale, pour une élimination globale voisine de 33 % de la dose quotidienne, la chloroquine inchangée représente 59 %, le métabolite monodéséthylé 38 % et le métabolite didéséthylé 3 %; aucune trace d' amino-4-chloro-7-quinoléine n'a été mise en évidence. Certains d'entre nous (Durand, 1974; Schreiber-Deturmeny, 1985; Viala et al., 1984) ont pu confirmer, dans l'ensemble, ces observations.

L'objectif de la présente étude était de contrôler, par des moyens simples, la prise du médicament, voire le respect de la posologie, chez les populations des zones endémiques soumises au traitement chloroquinique. Pour cela, nous avons jugé utile d'élaborer une méthodologie qui pourrait être appliquée sur place ou qui, en simplifiant notamment les problèmes de transport, permettrait à des laboratoires situés loin des lieux de prélèvement d'assurer en routine le contrôle systématique de la prise de chloroquine à partir d'échantillons urinaires recueillis sur supports solides.

Le choix du support s'est porté sur les papiers échangeurs d'ions, en référence notamment aux travaux de Dole et al. (1966) et de Kaistha et Jaffe (1974) sur la détection des narcotiques dans l'urine. Cette technique a été utilisée également par Heaton et Blumberg (1969) pour la recherche des psychotropes, ainsi que par Gorodetzsky (1973) et par Kaistha et Jaffe (1972) plus spécialement pour la détection de la morphine. Alexander (1976) l'a appliquée à la recherche des barbituriques et des morphiniques.

La technique de dosage que nous avons retenue, pour sa commodité d'emploi dans les pays où se feront les contrôles, est la spectrophotométrie dans l'ultra-violet (UV).

2. DESCRIPTION DE LA METHODE

2.1 Matériel, réactifs et solutions de référence

- Spectrophotomètre UV-visible Beckman ACTA III
- Cuves en quartz de 1 cm de trajet optique
- Agitateur tridimensionnel DESAGA
- Boîtes de Pétri en polystyrène (diamètre 9 cm)
- Centrifugeur
- Tubes à centrifuger
- Papier échangeur d'ions SA-2 Whatman, dont les caractéristiques sont les suivantes :

Résine : amberlite IR 120
Type : acide fort
% de résine : 45/50
Forme ionique : Na⁺
Dimensions du papier : 6 x 6 cm

- Eau bidistillée

- Ether éthylique Codex
 - Acide sulfurique 96 % RPE
 - Hydroxyde de potassium en pastilles RPE
 - Acide sulfurique 0,1 N
 - Solution aqueuse d'hydroxyde de potassium à 60 %
 - Sulfate de chloroquine¹
- } CARLO ERBA

A partir de 27,5 mg de sulfate de chloroquine contenant une molécule d'eau, une solution mère titrée à 20 mg de chloroquine base pour 100 ml d'acide sulfurique 0,1 N est préparée. Les solutions filles sont obtenues par dilutions successives de la solution mère dans le même acide.

2.2 Protocole opératoire

Une prise d'essai de 10 ml de l'urine à analyser est introduite dans une boîte de Pétri. Le carré de papier SA-2 y est trempé pendant 15 minutes en agitant manuellement pendant cinq secondes toutes les deux minutes environ. Le papier est ensuite égoutté puis mis à sécher sur un fil métallique. Il est analysé immédiatement ou mis sous enveloppe plastique en vue d'un traitement ultérieur. Les papiers peuvent alors être adressés par la poste ou par tout autre moyen adéquat au laboratoire d'analyses.

L'analyse elle-même est pratiquée dans les conditions ci-après. Dans un tube à centrifuger cylindro-conique de 30 ml de capacité sont successivement introduits 10 ml d'eau bidistillée alcalinisée par 50 μ l d'hydroxyde de potassium à 60 % et le papier SA-2 plié. La chloroquine est extraite à deux reprises par 10 ml d'éther éthylique en agitant chaque fois pendant 20 minutes. Les phases étherées, séparées par centrifugation pendant cinq minutes à 2800 g après chaque extraction, sont réunies. Elles sont agitées pendant 20 minutes en présence de 10 ml d'acide sulfurique 0,1 N, exactement mesurés. Après centrifugation l'éther est rejeté et la phase acide est placée au bain-marie à 40°C jusqu'à élimination totale des traces de solvant organique. Après refroidissement, la densité optique de l'extractif sulfurique est mesurée, après dilution si nécessaire, à 343 nm contre un extractif provenant d'un "blanc" d'urine traité dans les mêmes conditions.

La concentration urinaire est calculée par référence à une gamme d'étalonnage obtenue selon le même protocole à partir d'échantillons de 10 ml d'urine témoin additionnés de quantités de chloroquine comprises entre 20 et 2000 μ g (exprimées en chloroquine base). Lorsque les quantités de chloroquine sont supérieures à 300 μ g pour 10 ml d'urine, l'extractif terminal doit être dilué au dixième dans l'acide sulfurique 0,1 N avant la mesure spectrophotométrique.

3. VALEUR DE LA METHODE

3.1 Sensibilité

Pour une détermination quantitative la limite de sensibilité de la méthode est de 20 μ g de chloroquine base pour 10 ml d'urine. Elle peut être ramenée à 10 μ g pour 10 ml si l'on effectue la dernière extraction avec 5 ml d'acide sulfurique 0,1 N.

3.2 Linéarité

L'étude de la linéarité a été effectuée en traitant des papiers préalablement trempés dans des échantillons d'urine contenant des quantités connues et croissantes de chloroquine. Les réponses sont linéaires dans les gammes de concentrations allant de 20 à 300 μ g pour 10 ml et, après dilution au 1/10, de 300 à 2000 μ g pour 10 ml (exprimées en chloroquine base) (fig. 1).

¹ Aimablement fourni par les Laboratoires Rhône-Poulenc.

3.3 Reproductibilité

La reproductibilité de l'extraction a été testée sur des papiers trempés dans des échantillons de 10 ml d'urine additionnés de quantités connues de chloroquine. Pour chaque concentration 12 échantillons identiques ont été traités selon la méthodologie décrite. Les résultats sont indiqués dans le tableau 1. Le coefficient de variation est compris entre 2,75 et 5,44 %.

3.4 Pourcentage de fixation sur le papier

Le pourcentage de fixation de la chloroquine sur le papier SA-2 a été calculé en mesurant la différence entre les quantités de chloroquine réellement ajoutées à l'échantillon d'urine et celles retrouvées dans le même échantillon après trempage du papier. Il varie entre 67 et 84 % pour des concentrations de 20 à 200 µg de chloroquine pour 10 ml d'urine et entre 84 et 91 % pour des concentrations comprises entre 200 et 2000 µg de chloroquine pour 10 ml d'urine. Le pourcentage augmente donc pour les fortes concentrations urinaires en chloroquine. Par contre il est indépendant du pH de l'urine.

3.5 Pourcentage global d'extraction

Le pourcentage global d'extraction dans les conditions opératoires retenues se situe autour de 48 % pour des quantités de chloroquine base de 20 à 200 µg préexistant dans 10 ml d'urine et autour de 52 % pour les concentrations comprises entre 200 et 2000 µg pour 10 ml. Toutefois aucune correction n'est à appliquer aux résultats des essais dès l'instant où les gammes d'étalonnage sont réalisées dans les mêmes conditions à partir d'échantillons d'urine témoin dopés en chloroquine.

3.6 Conservation

La conservation des papiers après la fixation de la chloroquine à partir de l'urine a été testée dans les conditions suivantes :

- 1 mois à la lumière et à la température du laboratoire (+20°C)
- 1 mois au réfrigérateur (+4°C)
- 1 mois à l'étuve à +40°C.

Pour une même concentration urinaire les valeurs de densité optique obtenues dans ces conditions de conservation ont été comparées à celle obtenue immédiatement après le séchage du papier. Les résultats des tests statistiques mis en oeuvre (coefficient de corrélation linéaire, coefficient de Spearman, test de Wilcoxon, test de Mann-Whitney) permettent de conclure qu'il n'existe pas de différence significative entre les quatre séries d'échantillons. Les papiers imprégnés par la chloroquine peuvent donc être conservés sans précaution spéciale et transportés pratiquement sans aucun risque d'altération si le délai d'un mois est respecté.

3.7 Spécificité

De nombreuses substances absorbant dans l'ultra-violet peuvent perturber la mesure de la densité optique à la longueur d'onde du maximum d'absorption de la chloroquine retenue pour le dosage, à la condition toutefois d'être extractibles dans les conditions opératoires fixées par le protocole. Dans cette optique nous avons plus particulièrement étudié les possibilités d'interférence analytique de la part de :

- la monodéséthyl-chloroquine [chloro-7(éthylamino-4'-méthyl-1'-butylamino)-4 quinoléine] (Atouk, 1985), métabolite principal de la chloroquine;
- trois médicaments susceptibles d'être le plus fréquemment associés au cours des thérapeutiques antipaludiques en milieu africain : l'acide acétylsalicylique, le paracétamol et le diazépam;
- deux autres antipaludiques : la quinine et l'amodiaquine.

Nous avons, d'une part, tracé le spectre d'absorption dans l'UV de ces substances en solution dans l'acide sulfurique 0,1 N (10 µg/ml⁻¹) et, d'autre part, déterminé la pente de la

droite traduisant la densité optique à 343 nm en fonction de la concentration $[DO = f(c)]$, obtenue après ajout à des échantillons de 10 ml d'urine d'une quantité constante de chloroquine et de quantités croissantes du produit pouvant interférer. Après fixation sur le papier SA-2, nous avons appliqué le protocole d'extraction et de dosage décrit précédemment. La pente est nulle lorsqu'il n'existe pas d'interférence entre le produit et la chloroquine.

Les résultats obtenus ont abouti aux constatations suivantes :

- la monodéséthyl-chloroquine présente le même comportement que celui de la chloroquine vis-à-vis de la fixation sur le papier, de l'extraction et du dosage; par conséquent, dans les cas de traitement par la chloroquine, la spectrophotométrie dans l'ultra-violet assure à partir du papier trempé dans l'urine le dosage global de la molécule inchangée et du métabolite monodéséthylé, voire des autres métabolites (mineurs);
- l'acide acétylsalicylique et le paracétamol n'interfèrent pas avec la chloroquine dans les conditions opératoires;
- le diazépam, la quinine et l'amodiaquine peuvent interférer.

Dans tous les cas où une possibilité d'interférence est suspectée, le doute peut être levé en procédant à une réextraction par l'éther en milieu alcalin de la phase sulfurique terminale, puis à une analyse de l'extractif étheré par chromatographie sur couche mince de gel de silice en utilisant comme solvant un mélange de 79 parts d'acétate d'éthyle, 15 parts d'isopropanol et 6 parts d'ammoniaque à 20 % (McChesney et al., 1966) et comme révélateur le réactif iodo-platinique dilué.

4. APPLICATION

La méthodologie proposée a été appliquée à des prélèvements urinaires recueillis 3, 5, 10, 12 ou 17 jours après une prise unique chez l'homme de 1, 2 ou 3 comprimés de sulfate de chloroquine (dosés à 100 mg de base par unité). Les résultats sont consignés dans le tableau 2. Lorsque le prélèvement est fait trois jours après la prise de deux comprimés, la concentration urinaire se situe selon les sujets entre 73 μg pour 10 ml (sujet N° 7) et 840 μg pour 10 ml (sujet N° 6). Après la prise d'un comprimé, la concentration urinaire au troisième jour atteint 47 μg pour 10 ml chez le sujet N° 8 et 220 μg pour 10 ml chez le sujet N° 9. Ces exemples témoignent d'une grande variabilité inter-individuelle qui pourrait être imputée à des différences dans la diurèse et/ou dans l'élimination de la chloroquine en fonction du pH urinaire. Dix jours après la prise d'un ou de deux comprimés, ou 17 jours après la prise de trois comprimés on peut encore noter une concentration urinaire appréciable (allant jusqu'à 23 μg pour 10 ml). Ces résultats confirment la lenteur de l'élimination de la chloroquine.

5. CONCLUSION

La méthodologie que nous avons élaborée est suffisamment performante pour permettre de contrôler en routine les thérapeutiques chloroquiniques et de s'assurer notamment de la prise médicamenteuse dans les cas d'autotraitement. Sa simplicité et le recours à un matériel courant de laboratoire font que les analyses peuvent être effectuées dans les pays mêmes où les chimiothérapies antipaludiques sont instituées. Par ailleurs, les prélèvements d'urine, à l'inverse des prélèvements sanguins, ne sont pas traumatisants, et la fixation sur le papier échangeur d'ions peut être pratiquée par un personnel non scientifique. Enfin, en ce qui concerne la conservation et le transport depuis les lieux de prélèvement vers les laboratoires d'analyse situés localement ou à plus longue distance, les problèmes qui peuvent se poser avec les échantillons liquides disparaissent avec l'emploi du support solide.

6. RESUME

La chloroquine, fixée à partir de l'urine sur papier échangeur d'ions, est extraite par l'éther en milieu alcalin puis dosée par spectrophotométrie dans l'ultra-violet après passage dans l'acide sulfurique 0,1 N. La conservation du papier après fixation est satisfaisante. Son transport vers les laboratoires d'analyse est facile. Cette méthode, simple, permet de détecter jusqu'à 10 μg de chloroquine (base) pour 10 ml d'urine. Elle est applicable au contrôle en routine des traitements chloroquiniques, préventifs ou curatifs, notamment dans les pays impaludés.

SUMMARY

THERAPEUTIC FOLLOW-UP BY DETERMINATION OF CHLOROQUINE
IN URINE FOLLOWING FIXATION ON ION-EXCHANGE PAPER

Chloroquine is absorbed from urine on ion-exchange paper and then extracted into ethyl ether in alkaline medium. It is reextracted from the ether phase into 0.1 N sulfuric acid and determined by ultraviolet spectrophotometry. Conservation of the drug after its fixation on the paper is satisfactory. Sending of the samples to the laboratory for analysis is easy. The method can detect up to 10 µg of chloroquine (base) in 10 ml urine. It is useful in the routine follow-up of preventive or curative chloroquine treatment, especially in countries with endemic malaria.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alexander, G. J. (1976) Direct use of ion-exchange paper in hemagglutination-inhibition tests for drug abuse. Clinical chemistry, 22: 1105-1106
- Atouk, A. (1985) Synthèse des métabolites de la chloroquine. Etude de leurs spectres RMN et de leur activité pharmacologique. Thèse de Doctorat du 3^e cycle (Pharmacologie), Marseille
- Attisso, M. (1968) Les antimalariques d'utilisation courante au Sénégal et en Côte d'Ivoire d'après les données statistiques. Médecine d'Afrique noire, 15: 375-387
- Charmot, G. & Bricaire, F. (1979) Paludisme. In: Encyclopédie médico-chirurgicale, THE 25064 A¹⁰, 10-1979
- Dole, V. P., Kim, W. K. & Eglitis, I. (1966) Detection of narcotic drugs, tranquilizers, amphetamines and barbiturates in urine. Journal of the American Medical Association, 198: 349-352
- Durand, A. (1974) Etudes biotoxicologiques sur la chloroquine. Thèse de Doctorat en Pharmacie (Etat), Marseille
- Fauran, F. & Sankale, M. (1970) Toxicologie des antipaludiques aminoquinoléiques de synthèse. Thérapie, 25: 823-850
- Gorodetzky, C. W. (1973) Efficiency and sensitivity of two common screening methods for detecting morphine in urine. Clinical chemistry, 19: 753-755
- Heaton, M. A. & Blumberg, A. G. (1969) Thin-layer chromatographic detection of barbiturates, narcotics, and amphetamines in urine of patients receiving psychotropic drugs. Journal of chromatography, 41: 367-370
- Kaistha, K. K. & Jaffe, J. H. (1972) Reliability of identification techniques for drugs of abuse in a urine screening program and drug excretion data. Journal of pharmaceutical sciences, 61: 305-307
- Kaistha, K. K. & Jaffe, J. H. (1974) Extraction techniques for narcotics, barbiturates and central nervous system stimulants in a drug abuse urine screening program. Journal of chromatography, 60: 83-94
- McChesney, E. W., Conway, W. D., Banks, W. F. Jr, Rogers, J. E. & Sherosky, J. M. (1966) Studies of the metabolism of some compounds of the 4-amino-7-chloroquinoline series. Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 151: 482-493
- Schreiber-Deturmeny, E. (1985) Contribution à la détermination de la chloroquine et de la monodéséthylchloroquine dans les milieux biologiques. Applications pratiques. Thèse de Doctorat de 3^e cycle (Pharmacologie), Marseille
- Viala, A., Ba, B., Atouk, A., Durand, A., Deturmeny, E., Estadieu, M. & Gouezo, F. (1984) Intérêt thérapeutique et toxicologique de la détermination de la chloroquine et de ses métabolites dans les liquides biologiques et les cheveux. Le pharmacien d'Afrique, N° 5: 7-10
- Wernsdorfer, W. H. (1983) Paludisme pharmacorésistant : situation d'urgence. Chronique OMS, 37: 12-15

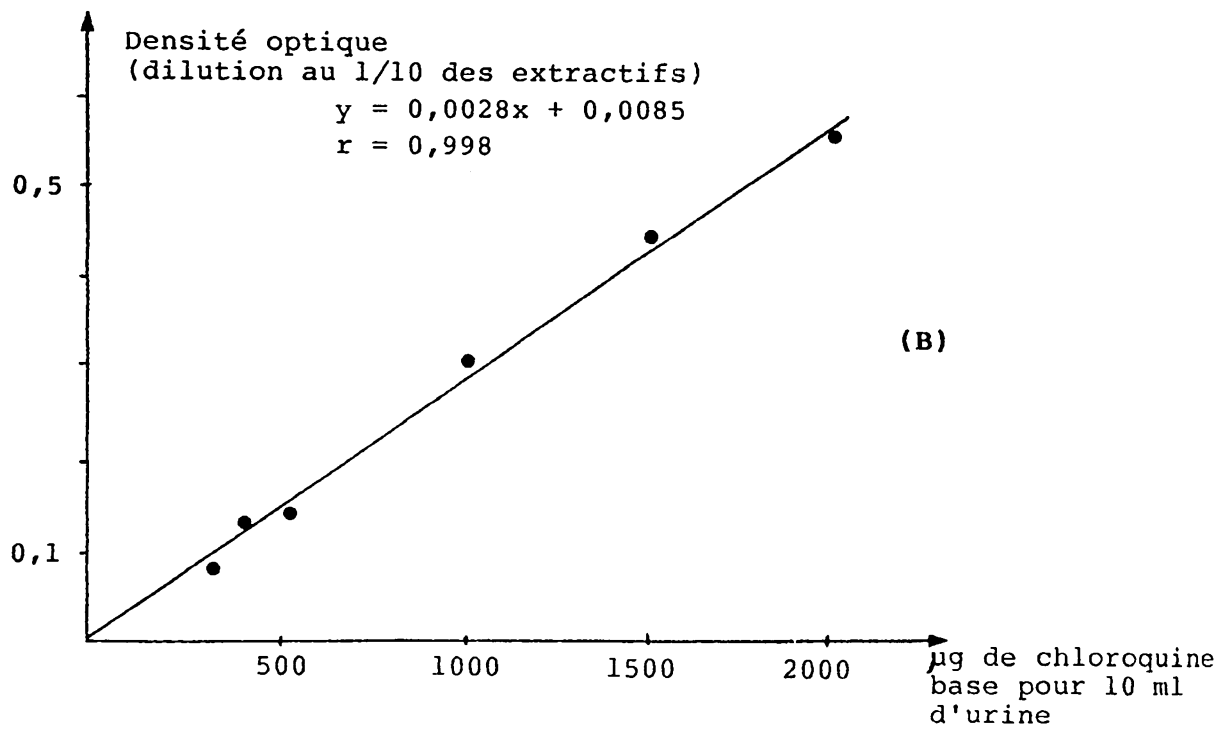
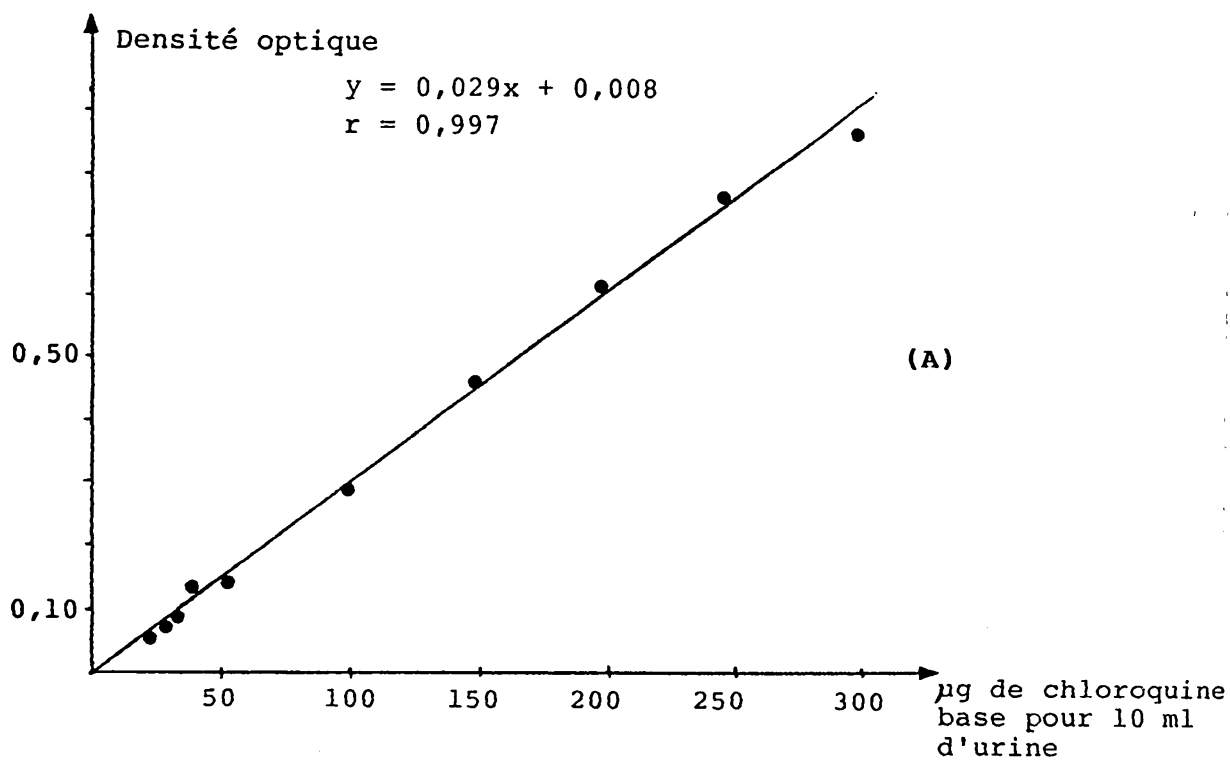
TABLEAU 1. REPRODUCTIBILITE DE L'EXTRACTION A PARTIR DU PAPIER ECHANGEUR D'IONS
(12 essais pour chaque concentration)

Quantité de chloro- quine base en µg dans 10 ml d'urine	20	50	100	200	250	500	1000	2000
Intervalle de confiance de la moyenne des densités optiques au seuil 0,05	0,055 + 0,001 - 0,001	0,151 +0,005 - 0,005	0,302 +0,009 - 0,009	0,410 +0,014 - 0,014	0,071 +0,005 - 0,005	0,160 +0,005 - 0,005	0,340 +0,009 - 0,009	0,587 +0,010 - 0,010
Ecart-type calculé avec un facteur de pondération N-1	$2,937 \cdot 10^{-3}$	$8,233 \cdot 10^{-3}$	$14,823 \cdot 10^{-3}$	$21,563 \cdot 10^{-3}$	$9,160 \cdot 10^{-3}$	$8,575 \cdot 10^{-3}$	$15,149 \cdot 10^{-3}$	$16,172 \cdot 10^{-3}$
Coefficient de variation en %	5,30	5,44	4,90	4,39	3,42	5,35	4,44	2,75

TABLEAU 2. TAUX URINAIRES (μg DE BASE POUR 10 ml)
APRES ADMINISTRATION DE DOSES UNIQUES DE SULFATE DE CHLOROQUINE

Sujet N°	Dose administrée (nombre de comprimés à 100 mg de chloro- quine base)	Délai (en jours) séparant le prélève- ment d'urine de la prise médicamenteuse	Concentration urinaire (μg de chloroquine base pour 10 ml)
1	2	10	23
2	2	10	Traces
3	2	10	Traces
4	2	5	340
5	2	3	370
6	2	3	840
7	2	3	73
8	1	3	47
9	1	3	220
10	2	3	170
11	3	17	23
12	1	10	23

FIG. 1. GRAPHIQUES DE LINEARITE AUX FAIBLES (A) ET AUX FORTES CONCENTRATIONS (B)
DE CHLOROQUINE APRES FIXATION SUR PAPIER ECHANGEUR D'IONS PUIS EXTRACTION



= = =