

## Article original

# Dosage par chromatographie liquide haute performance de la luméfántrine sur spot de sang séché

## Liquid chromatographic assay for the lumefantrine quantification on dried blood spot

Jennifer Wong<sup>1</sup>, Isabelle Souletie<sup>1</sup>, Jean François Faucher<sup>2,3</sup>, Pascal Houzé<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Biochimie, Hôpital St Louis, 1 avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris, France

<sup>2</sup> Institut de Recherche pour le développement ; Mother and Child Health in the Tropics Research Unit, 08BP841 Cotonou, Benin

<sup>3</sup> Département des maladies infectieuses, CHU de Besançon, 25030 Besançon Cedex, France

**Résumé – Objectif :** La luméfántrine, est un nouvel antipaludéen de synthèse utilisé en association avec l'artéméter dans le traitement de l'accès palustre simple chez l'enfant. Sa mauvaise biodisponibilité impose un suivi des concentrations circulantes pour identifier les échecs thérapeutiques qui sont dus à une mauvaise absorption de ceux qui résultent d'un phénomène de résistance. Nous avons développé le dosage de la luméfántrine sur spot de sang séché, support adapté au prélèvement et au stockage des échantillons dans des conditions difficiles. **Méthodes :** Le dosage de la luméfántrine a été réalisé par chromatographie liquide après extraction liquide-liquide des spots par le mélange acétate d'éthyle/acide acétique. La séparation est réalisée sur colonne Xbridge<sup>®</sup> avec une phase acétate d'ammonium pH 4 / acétonitrile (10/90 v/v) en mode isocratique. La détection est réalisée en UV à 335 nm, avec le tocol comme étalon interne. **Résultats :** La luméfántrine et l'étalon interne sont élués en respectivement 7,1 et 10,3 minutes. La méthode est linéaire entre 250 et 5000 µg/L. La limite de détection est de 85 µg/L avec une limite de quantification à 250 µg/L. La précision est satisfaisante (< 10 %), de même que l'exactitude (biais < 10 %). Les spots sont stables à +4 °C pendant 10 jours, mais une conservation à +25 °C, s'accompagne d'une baisse significative des concentrations. Les concentrations résiduelles chez des enfants traités 3 jours par la luméfántrine sont de 490 ±152 µg/L. **Conclusion :** Nous rapportons une méthode robuste et fiable de dosage de la luméfántrine sur spots de sang séché applicable aux études pharmacocinétiques et épidémiologiques.

**Mots clés :** Luméfántrine, CLHP, spot de sang séché

**Abstract – Aim:** Lumefantrine is a new anti-malarial drug used in association with artemeter in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in children. Poor absorption of lumefantrine needs to monitor concentrations to identify the nature of the therapeutic failure. We have developed the determination of lumefantrine on dried blood spots, which are frequently used to collect and store blood in hard conditions. **Methods:** Lumefantrine measurement was assayed by liquid chromatography after liquid-liquid extraction procedure using ethyl acetate/acetic acid as solvent. Separation was performed on a Xbridge<sup>®</sup> column using ammonium acetate pH 4 / acetonitrile (10/90 v/v) in isocratic mode. UV detection was set at 335 nm using tocol as internal standard. **Results:** Lumefantrine and internal standard are eluted at 7.1 and 10.3 min, respectively. The method is linear from 250 to 5000 µg/L with a good sensitivity corresponding to 85 µg/L for limit of detection and 250 µg/L as limit of quantification. Precision (below 10%) and accuracy (below 10%) are satisfying. Lumefantrine concentrations were stable in dried blood spot during 10 days at +4 °C but a significant decrease was observed at +25 °C. Blood residual concentrations in children treated by lumefantrine during 3 days were 490 ±152 µg/L. **Conclusion:** We have developed a specific and accurate method to measure lumefantrine in dried blood spot available to realise pharmacologic or epidemiologic studies.

**Key words:** Lumefantrine, HPLC, dried blood spot

Reçu le 15 décembre 2008, accepté après modifications le 4 mai 2009

Publication en ligne le 10 juillet 2009

\* Correspondance : Pascal Houzé, [pascal.houze@sls.aphp.fr](mailto:pascal.houze@sls.aphp.fr)

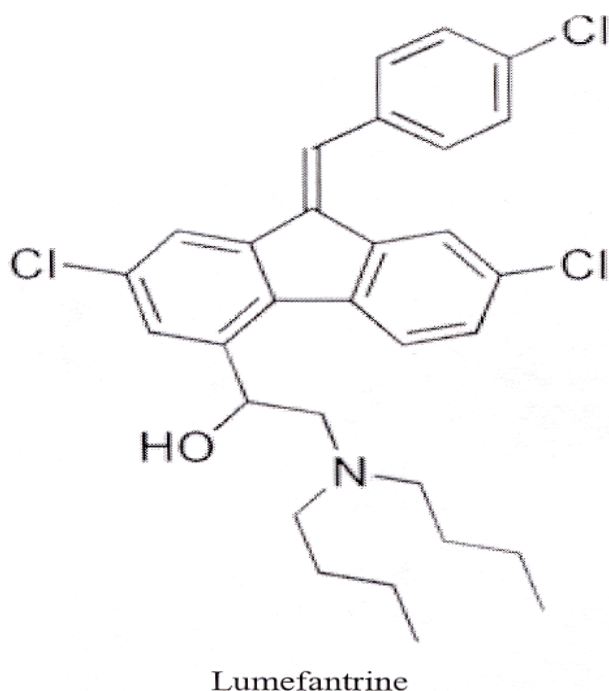


Fig. 1. Structure de la luméfántrine.

## 1 Introduction

Le paludisme reste toujours la première cause de mortalité au monde en particuliers chez le jeune enfant de moins de 5 ans en zone d'endémie [1]. Le développement de la résistance des différentes espèces de *Plasmodium* et principalement de *Plasmodium falciparum*, nécessite de recourir à la mise en place de nouveaux schémas thérapeutiques basés sur l'utilisation de nouvelles molécules et/ou sur de nouvelles associations médicamenteuses [1, 2].

La luméfántrine ou benflumétol (figure 1) est un antipaludéen synthétisé pour la première fois en Chine et disponible en association avec l'artéméter, dans deux spécialités Coartem<sup>TM</sup> et Riamet<sup>TM</sup>. Bien tolérée par les patients, cette combinaison thérapeutique est maintenant la plus recommandée dans le traitement de première ligne de l'accès palustre non compliqué dans les pays d'Afrique en remplacement des monothérapies, devenues inefficaces par l'accroissement de la chimiorésistance [3].

D'un point de vue pharmacologique, la luméfántrine en raison de sa lipophilie présente une biodisponibilité, très variable d'un sujet à l'autre et fortement influencée par la prise concomitante d'un repas riche en graisse [4]. Fortement liée aux protéines à plus de 99 %, elle est métabolisée par débutylation hépatique pour conduire à la desbutylluméfántrine, métabolite primaire possédant une activité schizonticide équivalente sinon supérieure à celle de la molécule mère [5]. La demi-vie plasmatique de la luméfántrine est longue d'environ 100 heures. Il a été démontré que la concentration plasmatique en luméfántrine à 7 jours était un des facteurs prépondérants pour juger de l'efficacité thérapeutique [1, 4, 5].

La mauvaise biodisponibilité du produit rend compte de la nécessité de réaliser des études épidémiologiques et/ou phar-

macologiques de terrain de façon à imputer un échec thérapeutique à l'apparition de souche plasmodiale résistante et non pas à une concentration plasmatique trop faible. De telles études se prêtent mal, pour des raisons évidentes (température élevée, transport difficile) à l'obtention et à la conservation de prélèvements plasmatiques. Aussi depuis quelques années, se développent les prélèvements sur spots de sang séchés (SSS), présentant de nombreux avantages : procédure peu invasive, faible quantité de sang nécessaire, facilité de transport et de stockage des échantillons [6]. De nombreuses méthodes de dosages d'antipaludéens sur SSS ont été développées au cours de ces dernières années [6-8]. L'étude de la littérature rapporte pour la luméfántrine plusieurs méthodes de dosages chromatographiques sur plasma [9-11] ou sur sang total [12]. Récemment, deux méthodes de dosage sur spot de sang séché ont été rapportées, permettant soit le dosage de la luméfántrine seule [13], soit de la molécule mère et de son métabolite [14].

Nous rapportons dans ce travail une méthode de dosage de la luméfántrine sur spot de sang total après une extraction liquide-liquide. Cette méthode simple et précise a été appliquée à une pré-étude de faisabilité au Bénin dans le but d'évaluer l'efficacité du Coartem<sup>TM</sup> dans l'accès palustre simple chez l'enfant.

## 2 Matériel et méthodes

### 2.1 Réactifs et préparations

La luméfántrine (numéro CAS : 82186-77-4; masse molaire : 529 g/mol), est un don des laboratoires Novartis (Paris, France). Le tocol, 1 mg lyophilisé, est obtenu auprès du laboratoire Lara-Spiral (France). Les poudres de luméfántrine et de tocol sont conservées à +4 °C.

La chloroquine, la quinine (sous forme de sulfates) et la doxycycline ont été achetées chez Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France). Le proguanil et le cygloguanil ont été obtenus auprès du laboratoire Astra Zeneca (Paris, France). Les autres antipaludéens de synthèse (méfloquine, carboxyméfloquine, 7-monodéséthylamodiaquine, halofantrine et atovaquone) ont été gracieusement fournis par le laboratoire de Parasitologie de l'hôpital Bichat-Claude Bernard (Paris, France).

L'acétonitrile, l'acétate d'éthyle, l'aide perchlorique à 70 %, l'acétate d'ammonium et tous les autres produits chimiques sont de qualité analytique et ont été fournis par la société VWR International (Fontenay-sous-Bois, France). L'eau pour préparation injectable et le chlorure de sodium isotonique sont fournis par le Laboratoire Lavoisier (Paris, France).

Le sang humain lyophilisé est obtenu au près de la société Bio-Rad (Marne-la-Coquette, France). Au moment de l'emploi, chaque flacon est reconstitué avec 1 mL d'eau distillée.

Le papier buvard pour la préparation des spots a été acheté chez Wathmann sous la référence : Whatman<sup>®</sup>, N° 3\_qualitative, 46 × 57 cm, 100 sheets, Cat No. 1003-917.

La solution mère de luméfántrine à 1 mg/mL est préparée par dissolution du produit pesé dans un mélange méthanol/acide acétique (98/2, v/v). La solution mère est stable pendant 6 mois, conservée à -20 °C. Une solution fille à 10 µg/mL

est préparée extemporanément par dilution au 1/100 de la solution mère dans du chlorure de sodium isotonique.

Une solution de tocol à 1 mg/mL est préparée en reprenant le flacon commercial par 1 mL d'éthanol. Cette solution est stable pendant 6 mois, conservée à  $-20^{\circ}\text{C}$  à l'abri de la lumière. Une solution fille à 5  $\mu\text{g/mL}$  est préparée extemporanément par dilution au 1/200 de la solution mère dans de l'eau distillée.

## 2.2 Système et conditions chromatographiques

Le système utilisé est constitué d'une pompe à gradient Ultimate gradient 820 (Dionex, Voisins-le-Bretonneux, France) couplée à un injecteur automatique (Autosampler 712 Waters, Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) et à un détecteur UV-visible (Waters 2487, Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). L'ensemble est piloté par le logiciel dédié Chromleon™ (Software V 6.8, Dionex, Voisins-le-Bretonneux, France). La séparation chromatographique des analytes est effectuée au moyen d'une colonne XBridge™ Shield RP18 (100  $\times$  4.6 mm d.i., taille des particules 3,5  $\mu\text{m}$ , Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). La phase mobile, constituée d'un mélange de tampon acétate d'ammonium pH 4 / acétonitrile (10/90 v/v), est délivrée à un débit de 1 mL/min en mode isocratique. La détection est réalisée en spectrophotométrie UV à 335 nm pour la luméfantine et à 292 nm pour le tocol, avec un basculement automatique entre ces deux longueurs d'onde programmé à 9 minutes.

## 2.3 Préparation de la gamme d'étalonnage et des contrôles

Toutes les solutions et dilutions sont réalisées dans des tubes borosilicatés de façon à limiter l'adsorption non spécifique des molécules à doser.

La gamme d'étalonnage en 6 points (250 à 5000  $\mu\text{g/L}$ ) est préparée par surcharge du sang humain lyophilisé en luméfantine. Des volumes croissants (25 à 500  $\mu\text{L}$ ) de la solution fille sont déposés dans tubes puis le volume est complété à 1000  $\mu\text{L}$  avec le sang humain lyophilisé. Le sang humain lyophilisé seul permet l'obtention du point zéro.

Trois contrôles de qualité sont réalisés par surcharge du même sang humain à des concentrations basse (CQ<sub>1</sub> : 750  $\mu\text{g/L}$ ) moyenne (CQ<sub>2</sub> : 1500  $\mu\text{g/L}$ ) et haute (CQ<sub>3</sub> : 3500  $\mu\text{g/L}$ ).

Les points de calibration et les contrôles sont préparés en déposant 100  $\mu\text{L}$  exactement mesurés sur du papier buvard. Les spots sont séchés 6 heures à température ambiante, à l'abri de la lumière. Ils sont ensuite découpés aux ciseaux et fragmentés avant d'être placés dans des tubes borosilicatés et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Dans ces conditions les échantillons sont considérés comme stables pendant un mois.

## 2.4 Extraction des échantillons

Dans le tube contenant le spot (gamme, contrôles et échantillons) est ajouté 50  $\mu\text{L}$  d'étalon interne (EI) à 5  $\mu\text{g/mL}$ .

Les échantillons sont traités par 500  $\mu\text{L}$  d'acide perchlorique 0,6 M, vortexés et laissés en contact 5 min à température ambiante. Après alcalinisation (2 mL d'ammoniaque 0,9 M) et vérification de l'obtention d'un pH alcalin ( $> 10$ ), les tubes sont mis aux ultra-sons pendant 30 min puis extraits au multivortex (3 fois 20 secondes) par 3 mL d'un mélange acétate d'éthyle / acide acétique (99/1 v/v). Après centrifugation 10 minutes à 4000 tours, 2,5 mL de phase organique sont récupérés. L'extraction par l'acétate d'éthyle est répétée à deux reprises. Les phases organiques sont rassemblées puis évaporées à  $37^{\circ}\text{C}$  sous courant d'azote. Les extraits secs sont repris par 200  $\mu\text{L}$  de phase mobile et 100  $\mu\text{L}$  sont injectés dans le système chromatographique.

## 2.5 Étude de stabilité

La stabilité thermique de la luméfantine a été étudiée sur les spots utilisés pour le contrôle de qualité. Les différents spots ont été conservés à 3 températures ( $-20$ ,  $+4$  et  $+25^{\circ}\text{C}$ ) pendant 1, 5 et 10 jours, à l'abri de la lumière. Cette dernière durée étant considérée comme la plus longue période entre le prélèvement et l'analyse ou le stockage des spots à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Toutes les concentrations (moyenne de 3 déterminations) ont été comparées à des spots préparés simultanément et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . En absence de données précises sur la stabilité des spots, nous avons choisi de conserver les spots de référence à  $-80^{\circ}\text{C}$ , température qui est recommandée, si l'analyte est considéré comme instable ou si stabilité n'est pas connue [15,16]. Une variation de 10 % des concentrations sera considérée comme significative [14].

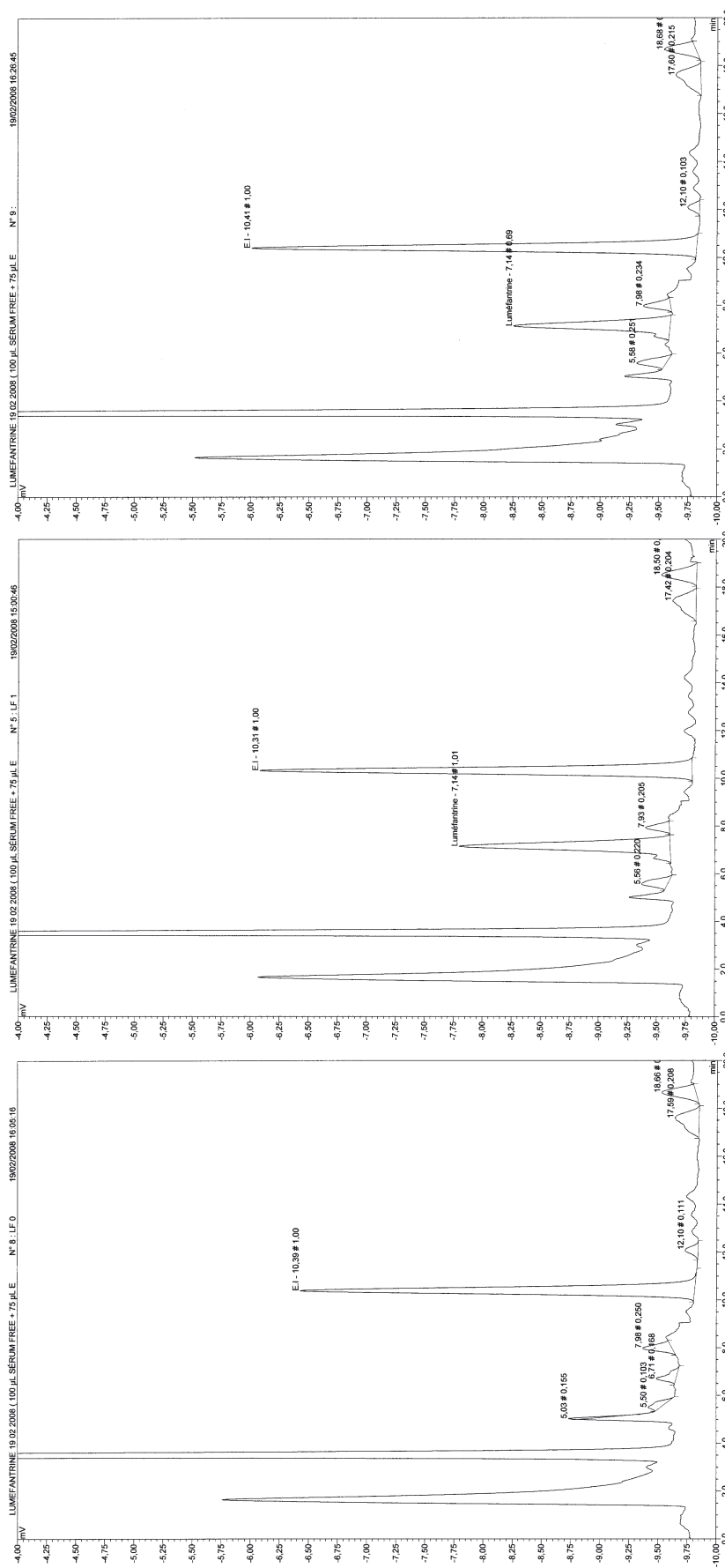
## 2.6 Étude de faisabilité chez l'enfant

Une pré-étude de faisabilité a été réalisée au Bénin, chez des enfants (6 à 60 mois) venant consulter pour un accès palustre non compliqué à *Plasmodium falciparum*. Les enfants ont reçu comme traitement l'association artéméter-luméfantine (Coartem™, Novartis) à la posologie de 6  $\times$  20 mg/j (enfants  $< 15$  kg) pendant 3 jours (J0 à J2). Les prélèvements, par ponction au pli du coude, ont été pratiqués à J3 (24 heures après la dernière prise). Les spots ont été réalisés par dépôt de 100  $\mu\text{L}$ , exactement mesurés de sang total, sur du papier buvard. Ils ont été séchés à l'air libre, à l'abri de la lumière puis placés dans des emballages en aluminium avant d'être stockés dans des pochettes plastiques à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'au moment des dosages.

# 3 Résultats

## 3.1 Profils chromatographiques

La figure 2 représente les tracés chromatographiques obtenus pour le point zéro (figure 2a), un point de gamme à 1000  $\mu\text{g/L}$  (figure 2b) et un prélèvement obtenu chez un enfant traité par le mélange artéméter-luméfantine depuis 3 jours,



**Fig. 2.** Profil chromatographique du point de gamme zéro (a), d'un point de gamme à 1000 µg/L (b), et d'un prélèvement obtenu à J3 chez un enfant traité l'association artéméter-lumefantrine (Coartem®) à la posologie de 6 × 20 mg/j pendant 3 jours (J0 à J2). EI : 1 = étalon interne.

**Tableau I.** Précision et exactitude de la gamme d'étalonnage pour le dosage de la luméfántrine.

Composé	Concentrations théoriques ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentrations calculées ( $m \pm \text{S.D.}, n = 5$ ) ( $\mu\text{g/L}$ )	Précision (C.V., %)	Exactitude (biais, %)
Luméfántrine	250	270 $\pm$ 29	10,8	9
	500	528 $\pm$ 28	5,3	6,6
	1000	1068 $\pm$ 54	5,1	7,8
	2000	2146 $\pm$ 189	8,8	8,3
	3000	2942 $\pm$ 76	2,6	-0,9
	5000	5245 $\pm$ 309	5,9	5,9

C.V. : coefficient de variation.

**Tableau II.** Précision et exactitude de la méthode de dosage de la luméfántrine.

Composé	Concentrations théoriques ( $\mu\text{g/L}$ )	Précision inter-séries ( $n = 10$ )			Précision intra-séries ( $n = 10$ )		
		Concentrations mesurées ( $m \pm \text{S.D.}$ ) ( $\mu\text{g/L}$ )	Précision (C.V., %)	Exactitude (biais, %)	Concentrations mesurées ( $m \pm \text{S.D.}$ ) ( $\mu\text{g/L}$ )	Précision (C.V., %)	Exactitude (biais, %)
Luméfántrine	750 (CQ1)	768 $\pm$ 72	9,4	3,4	735 $\pm$ 76	10,3	-1
	1500 (CQ2)	1486 $\pm$ 105	7,1	0,1	1586 $\pm$ 153	9,6	6,7
	3500 (CQ3)	3464 $\pm$ 267	7,7	-0,03	3528 $\pm$ 142	2,9	1,8

C.V. : coefficient de variation.

correspondant à un temps de 24 heures après la dernière prise (figure 2c). Les pics obtenus sont fins, symétriques et bien séparés dans un temps d'analyse totale de 20 minutes. Les temps de rétention sont respectivement de 7,1 et 10,3 minutes pour la luméfántrine et l'étalon interne.

### 3.2 Validation analytique de la méthode

Dans ce but, nous avons vérifié les critères habituels de validation que sont la linéarité, la limite de détection, la précision, l'exactitude et la spécificité [14]. En plus de ces critères, nous avons réalisé une épreuve de stabilité pour juger des possibilités de conservation de la luméfántrine dans des conditions de prélèvement et de transport difficiles.

#### Linéarité

La linéarité a été vérifiée en injectant cinq gammes d'étalonnage à des jours différents dans les mêmes conditions chromatographiques. Le calcul des rapports des surfaces, luméfántrine sur EI, montre une relation linéaire pour la zone de concentrations comprises entre 250 et 5000  $\mu\text{g/L}$ . En utilisant la régression par la méthode des moindres carrés, l'équation moyenne de la droite d'étalonnage obtenue est  $y = 1,0308x + 0,0242$  avec un coefficient de détermination ( $R^2$ ) à 0,998. Le tableau I résume pour chaque point de gamme, les valeurs de la moyenne, des écart-types, de la précision (coefficient de variation) et de l'exactitude (biais).

#### Limites de détection et de quantification

La limite de détection (LD) a été déterminée en considérant un rapport signal/bruit de 3/1. Dans ces conditions, nous avons obtenu une valeur de limite de détection égale à 85  $\mu\text{g/L}$ . La limite de quantification (LQ) se définissant comme étant égale à 3,3 fois la limite de détection, nous obtenons pour la luméfántrine une limite de quantification voisine de 250  $\mu\text{g/L}$ . Cette valeur de limite de quantification a été retenue pour correspondre au premier point de la gamme d'étalonnage.

#### Exactitude et précision (inter et intra séries)

Ces paramètres de validation ont été déterminés en mesurant les 3 contrôles de qualité. La précision de la méthode a été évaluée en inter ou en intra-série ( $n = 10$ ) et exprimée en coefficient de variation. Les valeurs des coefficients de variation sont comprises entre 2,9 et 10,3 % (tableau II). Sur les mêmes déterminations, la valeur de l'exactitude a été calculée comme le pourcentage de biais observé par rapport à la valeur vraie. Les valeurs du biais sont toutes très inférieures à 10 % et sont donc compatibles avec une exactitude satisfaisante de notre méthode (tableau II).

#### Rendement d'extraction

Pour calculer le rendement d'extraction, nous avons comparé la hauteur des pics de solutions de luméfántrine préparées dans un mélange méthanol/acide acétique (98/2, v/v) à des

**Tableau III.** Étude de la stabilité de la luméfántrine sur spot de sang séché.

(n = 3)	CQB (µg/L)			CQM (µg/L)			CQH (µg/L)			
	ref -80 °C	-20 °C	+4 °C	ref -80 °C	-20 °C	+4 °C	ref -80 °C	-20 °C	+4 °C	+25 °C
J + 1	750 ± 62	780 ± 35	790 ± 37	1512 ± 125	1528 ± 78	1478 ± 85	3524 ± 112	3508 ± 78	3231 ± 49	3514 ± 56
J + 5	780 ± 110	830 ± 70	800 ± 35	1468 ± 106	1423 ± 132	1322 ± 68	3468 ± 85	3425 ± 112	33582 ± 112	3028 ± 114
J + 10	780 ± 40	780 ± 45	710 ± 69	1535 ± 186	1531 ± 98	1392 ± 105	3550 ± 128	3562 ± 145	3426 ± 96	2869 ± 65

sangs totaux surchargés aux mêmes concentrations et déposés sur des spots. De façon à vérifier le rendement d'extraction sur une plage étendue de concentrations, nous avons retenu comme concentrations tests les valeurs des 3 contrôles de qualité, respectivement 750, 1500 et 3500 µg/L. Sur 3 déterminations, nous avons observé un rendement d'extraction de 78 ± 6 % (750 µg/L); 70 ± 8 % (1500 µg/L) et 80 ± 9 % (3500 µg/L).

### Spécificité

Les chromatogrammes obtenus ne montrent aucune interférence biologique ou pharmacologique (figure 2), en particulier avec les différents antipaludéens testés, naturel (quinine) ou de synthèse (chloroquine, monodéséthylchloroquine, proguanil, cycloguanil, méfloquine et métabolite carboxylé, doxycycline, halofantrine).

### Étude de stabilité

Les résultats de notre étude de stabilité sont rapportés dans le tableau III. Aucune variation significative de concentration n'est observée pour les spots conservés pendant 1 journée aux températures testées. Pour une durée de conservation de 5 jours, on observe une baisse modérée des concentrations à +4 °C, qui devient significative (supérieure à 10 %) à +25 °C. Pour la conservation à 10 jours, le même phénomène est observé, mais la baisse de concentration est déjà significative (supérieure à 10 %) pour la conservation à +4 °C. Les spots conservés à +25 °C pendant 10 jours présentent une baisse de concentration moyenne comprise entre 15 et 25 % de la concentration initiale.

### Étude de faisabilité chez l'enfant

Les concentrations en luméfántrine chez les 10 enfants étudiées sont rapportées dans le tableau IV. Un des patients (n° 5 dans le tableau) présente une concentration très élevée en luméfántrine (2680 µg/L). Cette valeur a été exclue pour le calcul de la concentration moyenne en luméfántrine après 3 jours de traitement. Chez les neuf autres enfants, cette concentration est de 490 ± 152 µg/L (extrêmes : 280–690 µg/L).

## 4 Discussion

Nous rapportons dans ce travail la mise au point d'une méthode de dosage de la luméfántrine sur spot de sang séché (SSS) par chromatographie liquide haute performance (CLHP). La revue de la littérature ne permet de retrouver que 6 méthodes de dosages de cet antipaludéen dont deux récentes, publiée en 2007 et 2008, s'intéressent au dosage de la luméfántrine sur spot de sang séché [13, 14].

Blessborn et coll. [13] ont utilisé dans leur mise au point une extraction solide-liquide qui est dans leur expérience, plus

**Tableau IV.** Concentrations en luméfántrine mesurées sur spot de sang total chez des enfants traités par l'association artéméter-luméfántrine.

Patient	Sexe	Âge	Luméfántrine ( $\mu\text{g/L}$ )
1	M	30	300
2	F	24	410
3	F	7	490
4	F	24	280
5	F	48	2680
6	F	12	690
7	M	24	620
8	F	36	600
9	M	6	570
10	F	15	410

facile à réaliser et moins consommatrice de temps que l'extraction liquide-liquide. Cependant, ils utilisent pour développer et valider leur technique un système d'extraction automatisée, assurant ainsi un gain de temps et une excellente reproductibilité. Dans une configuration « manuelle » comme la nôtre, l'extraction solide-liquide n'est pas obligatoirement la meilleure option. C'est pourquoi, nous avons comparé cette extraction avec une extraction liquide-liquide utilisant différents solvants comme le diéthyléther, l'acétate d'éthyle ou le mélange hexane-éther (70/30 v/v). Nous avons testé ces mêmes solvants en leur ajoutant 1 % (v/v) d'acide acétique. En utilisant la procédure liquide-solide, nous avons retrouvé un rendement d'extraction pour la LF de 62 %, tout à fait comparable à celui décrit par Blessborn et coll. [13]. Les rendements moyens pour les extractions liquide-liquide pratiquées en double, ont été respectivement, de 45 % pour le diéthyléther, 60 % pour l'acétate d'éthyle acide et 55 % pour le mélange hexane-éther. Ntale et coll. [14] ont rapporté une simple procédure d'extraction liquide-liquide de la luméfántrine sur spot utilisant le diisopropyléther, avec un rendement moyen de 48 %, comparable à celui que nous avons obtenu avec le diéthyléther. L'adjonction d'acide acétique est connue pour faciliter la libération de la LF du sang total [9, 13]. En ajoutant de l'acide acétique, nous avons observé une amélioration significative du rendement moyen d'extraction pour l'acétate d'éthyle qui a augmenté de 60 à 70 %. L'extraction liquide-liquide avec ce solvant nous permettant d'obtenir des rendements comparables avec ceux de la procédure liquide-solide, nous avons donc choisi de la conserver. D'autre part, en raison de la très forte liaison de la luméfántrine aux protéines (> 99,9 %), nous avons choisi de réaliser une défécation acide préalablement à l'extraction. Nous avons comparé la défécation par l'acide perchlorique 0,6 M et l'acide trichloracétique à 10 % (v/v). Contrairement à l'acide trichloracétique, l'utilisation de l'acide perchlorique en défécation préalable a permis d'accroître notre rendement d'extraction moyen de la luméfántrine de 70 à 78 %. À notre connaissance, aucune défécation à l'acide n'a été décrite pour le dosage de la LF sur spot [13, 14]. Seule une défécation douce à l'acétonitrile [9, 10] ou au méthanol [14] ont été rapportées, respectivement pour les dosages plasmatiques et sur spot de sang total. Ces méthodes de défé-

cation ne nous sont pas apparues suffisamment efficaces dans le cas des spots de sang séché. Nos rendements d'extraction supérieurs à ceux décrits [13, 14] pourraient s'expliquer par notre méthode de défécation plus drastique et par la double extraction liquide-liquide.

La plupart des méthodes récemment développées utilise comme étalon interne des dérivés de la luméfántrine [10, 13] développés par Novartis ou une autre molécule anti-paludique, comme l'halofántrine [14]. Nous n'avons pas pu nous procurer les dérivés de la luméfántrine. D'autre part, dans nos conditions chromatographiques, l'halofántrine est éluee sous forme d'un pic asymétrique, trop proche du front de solvant pour être exploitable. Nous avons recherché un produit non physiologique et sans activité pharmacologique caractérisé par une très grande lipophilie. Notre choix s'est porté sur le tocol, noyau de la vitamine E, que nous utilisons déjà comme étalon interne pour le dosage des vitamines liposolubles. Dans nos conditions, ce composé est extrait avec un très bon rendement (90 %). Son temps de rétention est suffisamment différent de celui de la LF pour permettre le changement de longueur d'onde (292 nm) nécessaire à sa détection.

La plupart des méthodes développées reposent sur l'utilisation de colonnes C18 classique ou de type « cyano » [10, 13], nécessitant l'emploi de contre-ions, comme le perchlorate de sodium ou la diéthylamine, pour obtenir des pics symétriques et fins. La séparation sur colonne XBridge<sup>TM</sup> Shield RP18 (Waters) nous a permis d'obtenir des pics parfaitement symétriques sans phénomène de « trainée » en évitant l'utilisation de contre-ions. Dans leur publication récente, Ntale et coll. [14] obtiennent, sans utilisation de contre-ions, une séparation comparable à la nôtre, en utilisant une colonne de type « phényl ».

Sur le plan de la sensibilité, notre méthode présente une limite de détection (85  $\mu\text{g/L}$ ) environ 1,5 fois plus élevée que la valeur de 50  $\mu\text{g/L}$  rapportée par Blessborn et coll. [13]. Dans ces conditions, notre limite de quantification (250  $\mu\text{g/L}$ ) se trouve également être deux fois plus faible que celle rapportée par Blessborn et coll. [13], ou par Ntale et coll. [14], qui décrivent respectivement, une LOQ à 0,25  $\mu\text{M}$  (132,5  $\mu\text{g/L}$ ) et à 0,30  $\mu\text{M}$  (160  $\mu\text{g/L}$ ).

Notre méthode ne montre pas d'interférence analytique avec les autres antipaludéens les plus fréquemment utilisés en chimioprophylaxie ou en traitement. Cependant, notre étude n'est pas exhaustive et se devra d'être complétée pour de nouveaux composés ou pour les traitements moins fréquemment utilisés.

Quelque soit la nature du prélèvement, la bonne conservation des échantillons est toujours un problème. Dans le cas des spots, cette question devient souvent critique en raison des conditions particulières (température, humidité) dans lesquelles ils sont prélevés, voire transportés. Nous avons donc réalisé une étude de stabilité sur 10 jours au maximum pour des températures allant jusqu'à 25 °C. À cette température, nous avons observé une baisse très significative (entre 15 et 25 %) des concentrations en luméfántrine au bout de 10 jours. Nos résultats sont en opposition avec ceux de Blessborn et coll. [13] et qui rapportent une bonne conservation des spots pour des durées de 60 à 120 jours. De façon similaire, Ntale et coll. [14] rapportent une bonne stabilité sur 5 mois de spots conservés à

des températures de 20 à 25 °C [14]. Les deux méthodes utilisent un pré-traitement des spots par de l'acide tartrique à 0,25 ou 0,75 M, qui pourrait expliquer l'accroissement de stabilité. Cet acide qui est utilisé par les auteurs, pour rompre la liaison de la luméfantine aux protéines, permettrait aussi d'accroître la stabilité des spots à température ambiante.

Nous avons appliqué cette méthode à une pré-étude qui avait pour but de montrer la faisabilité d'un protocole devant être réalisé chez l'enfant au Bénin. Les concentrations mesurées sont du même ordre de grandeur que celles rapportées dans la littérature [13, 17, 18]. Nos résultats montrent une dispersion significative des concentrations avec même une valeur extrême comprise entre 5 et 6 fois la valeur moyenne du groupe étudié. Ainsi, bien que la prise de la luméfantine ait été réalisée sous contrôle médical (essai supervisé), cette dispersion des concentrations est le reflet d'une biodisponibilité orale très variable selon les patients, pouvant être à l'origine d'une inefficacité thérapeutique comme rapporté dans d'autres études [4].

## 5 Conclusion

Nous rapportons dans ce travail une méthode de dosage de la luméfantine sur spot de sang séché par chromatographie liquide. Basée sur une extraction liquide-liquide, notre méthode est donc facile à mettre en œuvre, robuste et fiable. Une étude préliminaire prouve que cette technique est applicable chez l'enfant prélevé sous un faible volume et dans des conditions de réalisation difficile.

## Références

- White NJ, Van Vught M, Ezzet F. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of artemether-lumefantrine. *Clin Pharmacokinet.* 1999; 37(2): 105–125.
- Wernsdorfer WH. Coartemether (artéméter and luméfantine): an oral antimalarial drug. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2004; 2(2): 181–196.
- Denis MB, Tsuyuoka R, Lim P, Lindegårdh N, Yi P, Top SN, Socheat D, Fandeur T, Annerberg A, Christophel EM, Ringwald P. Efficacy of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in northwest Cambodia. *Trop Med Int Health.* 2006; 11(12): 1800–1807.
- Colussi D, Oarisot C, Legay F, Lefèvre G. Binding of artemether and luméfantine to plasma proteins and erythrocytes. *Eur J Pharm Sci* 1999; 9(1): 9–16.
- Noedl H, Allmendinger T, Prajakwong S, Wernsdorfer G, Wernsdorfer WH. Desbutyl-benflumetol, a novel antimalarial compound: in vitro activity in fresh isolates of *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(7): 2106–2109.
- Lejeune D, Souletie I, Houzé S, Le Bricon T, Le Bras J, Gourmel B, Houzé P. Simultaneous determination of monodesethylchloroquine, chloroquine, cycloguanil and proguanil on dried blood spots by reverse-phase liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 43(3): 1106–1115.
- Kolawole JA, Taylor RB, Moody RR. Determination of proguanil and metabolites in small sample volumes of whole blood stored on filter paper by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1995; 674(1): 149–154.
- Minzi OM, Masseur AY, Gustafsson LL, Ericsson O. Simple and cost-effective liquid chromatographic method for determination of pyrimethamine in whole blood samples dried on filter paper. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005; 814(1): 179–183.
- Zeng MY, Lu ZL, Yang SC, Zhang M, Liao J, Liu SL, Teng XH. Determination of benflumetol in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1996; 681(2): 299–306.
- Annerberg A, Singtoroj T, Tipmanee P, White NJ, Day NP, Lindegårdh N. High throughput assay for the determination of lumefantrine in plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005; 822(1-2): 330–333.
- Lindegårdh N, Annerberg A, Blessborn D, Bergqvist Y, Day N, White NJ. Development and validation of a bionalatrytical method using automated solid-phase extraction and LC-UV for the simultaneous determination of luméfantine and its desbutylmetabolite in plasma. *J Pharm Biomed Anal.* 2005; 35: 1081–1088.
- Mansor SM, Navaratnam V, Yahaya N, Nair NK, Wernsdorfer WH, Degen PH. Determination of a new antimalarial drug, benflumetol, in blood plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1996; 682(2): 321–325.
- Blessborn D, Römsing S, Annerberg A, Sundquist D, Björkman A, Lindegårdh N, Bergqvist Y. Development and validation of an automated solid-phase extraction and liquid chromatographic method for determination of lumefantrine in capillary blood on sampling paper. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 45(2): 282–287.
- Ntale M, Ogwal-Okeng JW, Mhindi M, Gustafsson LL, Beck O. A field-adapted sampling and HPLC quantification method for luméfantine and its desbutyl metabolite in whole blood spotted on filter paper. *J Chromatogr B.* 2008; 876: 261–265.
- Guidance for industry: Bioanalytical method validation. Document consulté sur le site <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>. le 5 mars 2009.
- Shah VP, Midha KK, Findlay JW, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, McKay G, Miller KJ, Patnaik RN, Powell ML, Tonelli A, Viswanathan CT, Yacobi A. Bioanalytical method validation – a revisit with a decade of progress. *Pharm Res.* 2000; 17(12): 1551–1557.
- Mayxay M, Khanthavong M, Lindegårdh N, Keola S, Barends M, Pongvongsa T, Yapom R, Annerberg A, Phompida S, Phetsouvanh R, White NJ, Newton PN. Randomized comparison of chloroquine plus sulfadoxine-pyrimethamine versus artesunate plus mefloquine versus artemether-lumefantrine in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in the Lao People's Democratic Republic. *Clin Infect Dis.* 2004; 39(8): 1139–1147.
- Stohrer JM, Dittrich S, Thongpaseuth V, Vanisaveth V, Phetsouvanh R, Phompida S, Monti F, Christophel EM, Lindegårdh N, Annerberg A, Jelinek T. Therapeutic efficacy of artemether-lumefantrine and artesunate-mefloquine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Luang Namtha Province, Lao People's Democratic Republic. *Trop Med Int Health.* 2004; 9(11): 1175–1183.