

CHROM. 4344

SÉPARATION ET IDENTIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE CINQ ANTIDÉPRESSEURS THYMOANALEPTIQUES DÉRIVÉS DE LA DIBENZOAZÉPINE

A. VIALA, F. GOUEZO ET C. GOLA

Laboratoire de Toxicologie, Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie, 27 Bd. Jean Moulin, 13, Marseille 5^e (France)

(Reçu le 14 juillet 1969; modifié le 27 août 1969)

SUMMARY

Separation and identification by thin-layer chromatography of five thymoanaleptic drugs derived from dibenzoazepine

Two thin-layer chromatographic procedures on activated Silica Gel G are presented. They are used for the separation and identification of: imipramine, desipramine, clomipramine, trimipramine, and opipramol. Developing solvents consist of: (A) dehydrated peroxide-free diethyl ether-acetone-diethylamine (90:10:1); (B) benzene-acetone (100:20), shaken with 10 ml of 5% aqueous ammonia solution. Spots are detected by spraying first with diluted iodoplatinum reagent, then with 50% sulphuric acid. Fluorescence can be performed after 24 h. Positive results are obtained with only 100 ng of product. Migration of the five mixed compounds does not significantly affect the R_F values with respect to those obtained in case that every substance migrated separately.

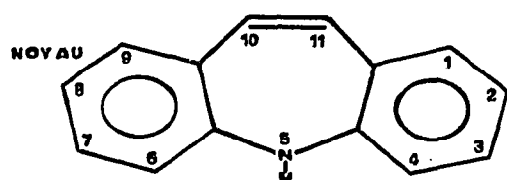
INTRODUCTION

Les médicaments groupés sous la dénomination clinique de "thymoanaleptiques"¹ sont parmi les plus utilisés des agents chimiques psychotropes destinés au traitement des états dépressifs. La nécessité de les utiliser à doses relativement élevées pendant de longues périodes fait qu'ils sont souvent en quantités très importantes entre les mains des malades. Ceux-ci peuvent songer à attenter à leurs jours et possèdent alors, avec ces drogues, une arme redoutable et efficace, hélas trop souvent utilisée. En effet, le nombre d'intoxications volontaires dues à cette classe de médicaments, en particulier à son chef de file, l'imipramine, est actuellement très important. Nous n'en voulons pour preuve que les chiffres donnés par FREJAVILLE *et al.*² sur la part de responsabilité de ces composés dans les intoxications traitées à la Clinique toxicologique de l'Hôpital Fernand Widal en 1966: selon ces auteurs, 5% des malades traités durant cette période auraient été les victimes de tentatives de suicide à l'imipramine; le taux de mortalité chez ces malades serait supérieur à 15% alors qu'il atteint seulement 6% pour l'ensemble des intoxications aiguës reçues.

La fréquence des intoxications de ce type et leur gravité rend donc impérative la possession de techniques toxicologiques simples et rapides pour la recherche de ces poisons dans les milieux biologiques. Plusieurs auteurs se sont déjà attachés à la séparation chromatographique sur papier³⁻⁵ ou sur couche mince^{3,6-10} de l'imipramine, de quelques uns de ses dérivés ou de composés à structure chimique voisine. Il nous a semblé intéressant de compléter les résultats obtenus en analysant, par chromatographie sur couche mince, cinq antidépresseurs de la série de la dibenzoazépine, nous réservant d'appliquer par la suite ces procédés aux milieux biologiques.

Structure chimique des composés étudiés

Le groupe des antidépresseurs dérivés de la dibenzoazépine, homogène sur le plan clinique, l'est aussi dans sa structure chimique. Tous ces représentants possèdent



5H DIBENZOAZÉPINE

CHAÎNES LATÉRALES

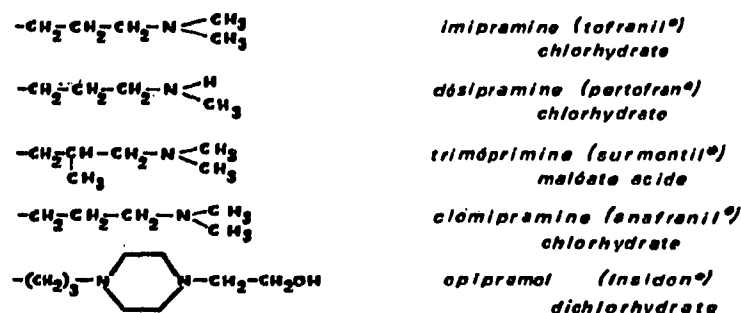


Fig. 1. Noyau de la 5H-dibenzoazépine et chaînes latérales portées par l'azote chez les composés antidépresseurs étudiés. I = imipramine (Tofranil) chlorhydrate; II = désipramine (Pertofran) chlorhydrate; III = triméprimine (Surmontil) maléate acide; IV = clomipramine (Anafranil) chlorhydrate; V = opipramol (Insidon) dichlorhydrate.

un noyau tricyclique dont la partie centrale est constituée par un hétérocycle heptagonal azoté (Fig. 1). On peut, structurellement y distinguer deux séries:

(1) les dibenzodihydroazépines (ou iminodibenzyles) chez lesquels la double liaison en 10-11 est saturée;

(2) les dibenzoazépines proprement dites.

Les seuls représentants de la première série actuellement utilisés sont: l'imipramine ("Tofranil" N.D.); la clomipramine ("Anafranil" N.D.); la desipramine ("Pertofran" N.D.); le triméprimine ("Surmontil" N.D.).

Ils ne diffèrent entre eux que par des modifications légères de la chaîne latérale substituée sur l'azote du noyau, à l'exception de la clomipramine qui possède en outre un chlore en position 3 sur l'un des noyaux benzène (Fig. 1).

La deuxième série comprend deux représentants: la carbamazépine ("Tegretol" N.D.) qui, uniquement utilisée comme antiépileptique, ne nous intéresse pas ici, et l'opipramol ("Insidon" N.D.) dont la chaîne latérale comporte une structure pipéridinique analogue à celle existant chez certaines phénothiazines à propriétés neuroleptiques puissantes (Fig. 1).

PARAMÈTRES EXPÉRIMENTAUX

Technique employée

Chromatographie monodimensionnelle ascendante en atmosphère sursaturée et sans équilibration préalable des plaques (migration effectuée sur 15 cm).

Phases adsorbantes

(1) Silica Gel G Merck activé.

(2) Silica Gel G Merck activé, additionné d'un indicateur fluorescent excitable à 254 nm (nous avons employé dans ce cas des plaques de 20 × 20 cm prêtes à l'emploi, commercialisées par les laboratoires Camag sous le sigle DSF-A).

Phases mobiles

(A) Éther éthylique déperoxydé et déshydraté-acétone-diéthylamine (90:10:1)*;

(B) Benzène-acétone (100:20), chargé en NH₃ par agitation avec 10 ml d'une solution aqueuse ammoniacale à 5% pour une température de 18 à 20°, titrée juste avant l'emploi**.

Dépôts

Des solutions mères de chaque composé à 1 mg par ml (exprimé en base) dans le mélange acétone-méthanol (2:1) ont été déposées sous forme de taches à raison de 10 µl. Le mélange des solutions mères à parties égales fut déposé à raison de 30 µl. Pour les essais de sensibilité, des dilutions comprises entre 1/10 et 1/200 ont été réalisées dans le même solvant à partir des solutions mères.

Enfin, pour la mesure des R_x des médicaments testés, nous avons déposé une solution de papavérine, préparée dans les mêmes conditions.

Procédés de révélation

Plusieurs procédés ont été expérimentés.

Examen en lumière UV. Avec les couches ne comportant pas d'indicateur de fluorescence l'irradiation à 350 nm est inexploitable, seuls l'opipramol et la papavérine émettant alors une fluorescence jaune d'intensité convenable. En revanche l'excitation sous 254 nm est plus valable: l'émission jaune de la papavérine et de l'opipramol est intense, tandis que les dibenzodihydroazépines apparaissent en bleuté.

Avec les couches additionnées d'un indicateur de fluorescence, l'irradiation à

* Ce mélange avait déjà été utilisé par l'un de nous à l'occasion de l'étude de médicaments psychotropes variés¹¹.

** Ce solvant est une modification de la phase préconisée par DANHIER pour l'imipramine et d'autres antidépresseurs¹² et précédemment utilisée par PAULUS *et al.* pour la séparation des dérivés de la phénothiazine¹³.

254 nm fait apparaître le fond en jaune tandis que les emplacements de tous les composés essayés se manifestent par des taches sombres.

Révélation par voie chimique. Nous avons utilisé deux réactions: (1) Pulvérisation d'acide nitrique concentré: les antidépresseurs dibenzodihydroazépiniques se colorent en bleu intense virant au jaune avec le temps, l'opipramol prend immédiatement une teinte jaune, alors que la papavérine ne réagit pas; (2) double pulvérisation, d'abord de réactif iodoplatinique de MUNIER ET MACHEBEUF¹⁴ dilué au tiers dans HCl N, puis immédiatement après d'acide sulfurique au demi p.v.^{11,15}: dans ces conditions, clomipramine, triméprimine et papavérine apparaissent en rouge brique, l'opipramol en bleu violacé, tandis que l'imipramine et la désipramine se manifestent par une tache possédant un noyau brique entouré, pour les quantités élevées, d'un halo bleu (particulièrement important pour l'imipramine).

Révélation chimique suivie d'examen en lumière UV. Les plaques révélées par le réactif iodoplatinique et l'acide sulfurique sont séchées et examinées sous lumière UV au bout de 24 h; les taches correspondant aux composés essayés possèdent alors, autant à 254 nm qu'à 350 nm, une intense fluorescence jaune à l'exception de la papavérine qui émet en rouge faible tirant sur l'orangé.

RÉSULTATS

Les résultats obtenus sont illustrés par les Fig. 2 et 3.

Ces photographies de chromatogrammes montrent que, quel que soit le système solvant, les résolutions sont parfaitement satisfaisantes, la diffusion des taches en cours de migration étant cependant beaucoup moins importante avec le solvant B qu'après usage du solvant A. En outre la reproduction photographique nous a permis de déceler sur le chromatogramme obtenu avec le solvant A et quel que soit le procédé de révélation employé, deux particularités que l'oeil n'était pas parvenu à détecter: (1) l'existence d'un front de démixtion au niveau de la tache de triméprimine (celle-ci est même partagée par ce front sur la piste du composé isolé); (2) la présence sur la piste de l'opipramol d'une tache parasite possédant le même R_F que l'imipramine;

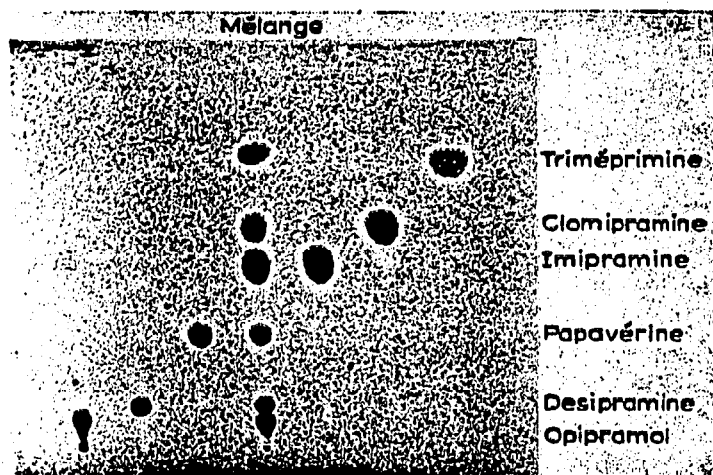


Fig. 2. Chromatographie sur couche mince de cinq antidépresseurs dibenzodihydroazépiniques et d'un étalon de papavérine. Solvant A.

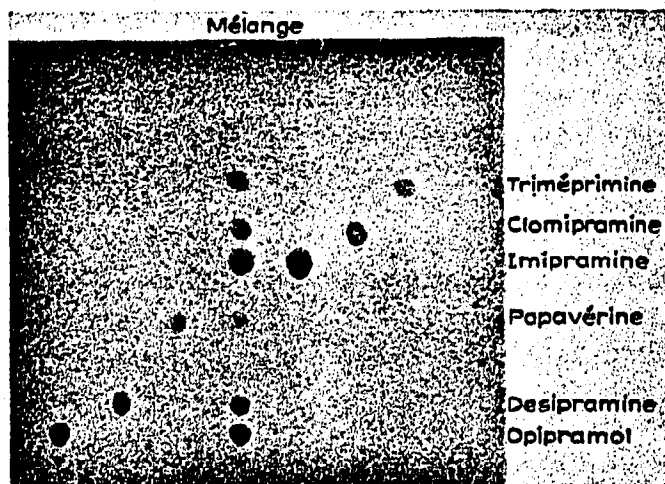


Fig. 3. Chromatographie sur couche mince de cinq antidépresseurs dibenzoazépiniques et d'un étalon de papavérine. Solvant B.

cette tache est vraisemblablement imputable à un produit de décomposition de la dibenzoazépine étudiée, préexistant ou se formant en cours de migration.

DISCUSSION

Phases adsorbantes

L'emploi de Silica Gel G additionné d'un indicateur fluorescent ne présentant aucun avantage particulier sur celui de Silica Gel G simple, nous n'avons donc pas d'intérêt à préconiser l'usage du premier.

Phases mobiles

Aucun commentaire spécial n'est à faire sur le mélange A. Pour la mise au point du solvant B, nous nous sommes inspirés de la formule proposée par PAULUS¹³ et par DANHIER¹². Ces auteurs indiquent la composition suivante:

benzène-acétone-ammoniaque à 25% (50:10:5).

Préparé ainsi, ce mélange se sépare en deux phases; de plus le volume total indiqué est tout juste suffisant pour assurer une immersion correcte du bas de la plaque dans les conditions où nous avons opéré. Aussi avons-nous préféré, d'abord doubler le volume total, puis, après agitation en ampoule à décantation du mélange benzène-acétone avec l'ammoniaque, éliminer la phase aqueuse excédentaire. Ainsi obtenu le solvant assure une excellente résolution pour l'opipramol et la désipramine mais ne différencie pas les trois autres thymoanaleptiques.

Pour pallier cet inconvénient nous avons effectué une série d'essais en diminuant progressivement la quantité de NH_3 saturant le mélange benzène-acétone. Pour cela nous avons utilisé de "l'ammoniaque RP pour analyses, Prolabo" dont la teneur en NH_3 devait se situer entre 26.5 et 28% mais qui n'était en fait que de 18.9% car il s'agissait d'un flacon entamé. A partir de cette solution exactement titrée nous avons préparé une série de dilutions en étendant à 10 ml respectivement 4, 3, 2 et 1 ml du réactif; chaque dilution nous a servi ensuite à la préparation d'un solvant de migration différent par agitation avec la phase organique et décantation. Les chromatogrammes obtenus dans ces différentes conditions sont schématisés sur la Fig. 4.

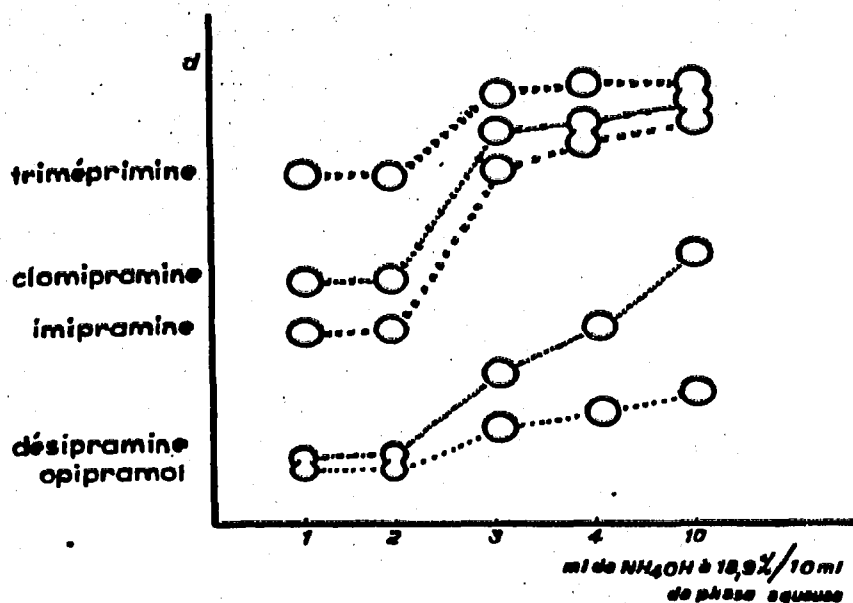


Fig. 4. Schéma des différentes séparations chromatographiques obtenues avec des solvants du type B (benzène-acétone, 100:20) possédant des teneurs en NH₃ différentes (charges effectuées par agitation avec des solutions ammoniacales contenant 1, 2, 3, 4 ... 10 ml d'ammoniaque à 18.9%/10 ml).

On observe sur ce schéma que les valeurs des R_F s'élèvent d'autant plus que la teneur en NH₃ du solvant de migration est plus forte. Mais il est encore plus intéressant de constater que les taches de l'imipramine, de la clomipramine et de la triméprimine sont beaucoup mieux séparées que celles de la désipramine et de l'opipramol pour les faibles teneurs en NH₃ du solvant, le phénomène étant exactement inversé pour les fortes teneurs. Nous avons émis à ce sujet l'hypothèse que les séparations sont en

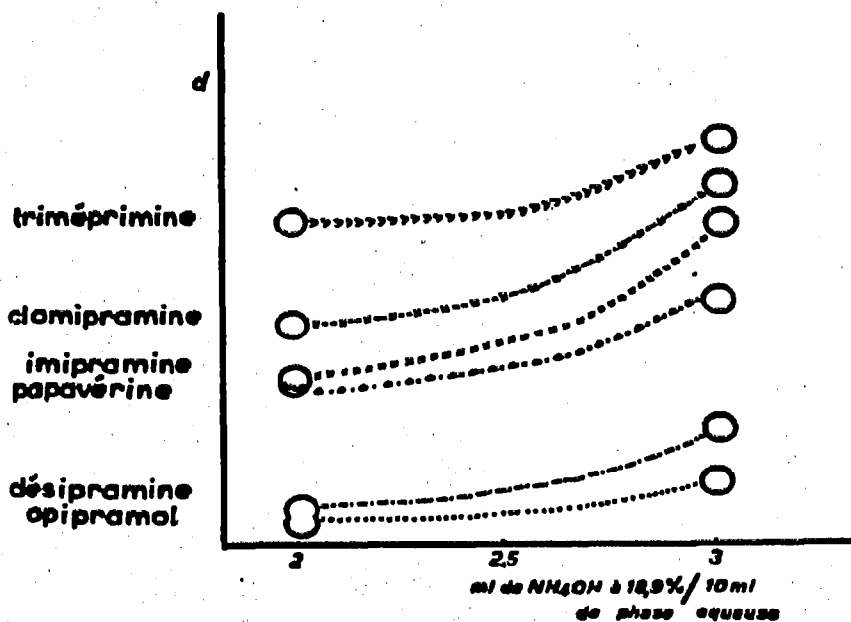


Fig. 5. Schéma des différentes séparations chromatographiques obtenues avec des solvants du type B (benzène-acétone, 100:20) possédant des teneurs en NH₃ différentes (charges effectuées par agitation avec des solutions ammoniacales contenant 2.5, 2.6, 2.7, ... 3 ml d'ammoniaque à 18.9%/100 ml).

relation avec la structure chimique des composés étudiés (influence des groupements CH_3 et Cl) et avec l'existence possible de fronts de démixtion. Sa vérification expérimentale est en cours et le tout fera l'objet d'un mémoire ultérieur.

Quoiqu'il en soit, la résolution la plus satisfaisante pour les cinq composés (et pour la papavérine) se réalise avec des solvants traités par des solutions ammoniacales de concentration comprise entre 2.5 et 3 ml d'ammoniaque à 18.9% pour 10 ml. Pour préciser la teneur optimale en ammoniaque nous avons fait une nouvelle série d'essais en faisant varier de 0.1 ml en 0.1 ml entre ces limites la teneur en ammoniaque à 18.9% de la phase aqueuse destinée à charger le solvant en alcali. La Fig. 5 schématise les résultats de cette expérimentation.

Les meilleures résolutions sont obtenues avec des concentrations de 2.5 à 2.9 ml d'ammoniaque à 18.9% pour 10 ml, soit 4.7 à 5.5% de NH_3 dans 10 ml de phase aqueuse. Nous avons estimé légitime d'adopter une teneur moyenne de 5% et nous avons fixé le protocole de préparation du solvant de migration comme suit: Benzène-acétone (100:20) chargé en NH_3 par agitation avec 10 ml exactement mesurés d'une solution aqueuse ammoniacale à 5%, titrée immédiatement avant l'emploi, et élimination de la phase aqueuse excédentaire par décantation.

Sensibilité des différents procédés de révélation

Le Tableau I mentionne les limites de sensibilité des différents procédés de révélation employés.

Ces limites ont été évaluées à l'examen visuel, mais il est possible qu'elles soient encore reculées en ayant recours à la photographie des plaques. Quoiqu'il en soit, le procédé de révélation le plus sensible paraît être, pour cette série médicamenteuse, la double pulvérisation iodoplattinique/sulfurique suivie ou non d'un examen en lumière UV. Il faut également souligner un autre intérêt de ce dernier procédé sur la révélation par la seule voie chimique: alors que les taches deviennent invisibles à la lumière du jour après quelques heures, tout au moins pour les plus faibles quantités, elles demeurent encore apparentes plusieurs jours en examinant les plaques sous lumière UV.

TABLEAU I

LIMITES DE SENSIBILITÉS (ng) POUR LES DIFFÉRENTS PROCÉDÉS DE RÉVÉLATION EMPLOYÉS

	Irradiation à 254 nm	Procédés chimiques			Réactif iodoplattini- que + H_2SO_4 au demi; séchage et repos de 24 h; examen sous irra- diation à 254 ou 350 nm
		NHO_3 concentré	Réactif iodoplatti- nique	Réactif iodoplattini- que + H_2SO_4 au demi	
Opipramol	100	} 200	} 250	} 100	100
Désipramine	1000				100
Autres dibenzoazépines	1000				350

Valeurs moyennes des R_F et des R_X ; calcul des paramètres statistiques et analyse de variance pour les composés chromatographiés isolément ou en mélange

Nous avons effectué une interprétation statistique sur les différentes valeurs des R_F et des R_X établis par rapport à la papavérine à l'aide des solvants standardisés. Son exploitation nous a permis:

- (1) de chiffrer la reproductibilité des paramètres mesurés (R_F et R_X) pour chaque composé étudié et dans chaque système chromatographique;
- (2) de comparer entre eux les deux groupes de mesures (R_F et R_X) et de déduire la confronce qui peut être attachée à chacun de ces deux paramètres;
- (3) d'établir enfin s'il est licite de considérer que les valeurs des R_F (et des R_X) mesurées sur les composés migrant isolément ou en mélange font partie de la même population statistique et donc si le mélange des composés a ou n'a pas d'influence sur la valeur des R_F (et des R_X).

Les valeurs des paramètres statistiques essentiels (moyennes et coefficients de variation), calculées à partir des R_F et des R_X mesurés, sont mentionnés dans le Tableau II.

L'examen comparatif des coefficients de variation montre que la dispersion des résultats augmente en règle générale lorsque les valeurs des R_F (ou des R_X) diminuent, quel que soit le solvant employé. Cette constatation est particulièrement évidente

TABLEAU II

PARAMÈTRES STATISTIQUES (MOYENNES ET COEFFICIENTS DE VARIATION) CALCULÉS À PARTIR DES MESURES R_F DE CINQ ANTIDÉPRESSEURS DIBENZOAZÉPINIQUES ET DES MESURES DE LEURS R_X PAR RAPPORT À LA P. VÉRINE PRISE COMME ÉTALON

Système A: 10 essais; système B: 8 essais.

		Système chromatographique A				Système chromatographique B			
		R_F		R_X		R_F		R_X	
		Moyennes	Coeff. de variation de la moyenne (%)	Moyennes	Coeff. de variation de la moyenne (%)	Moyennes	Coeff. de variation de la moyenne (%)	Moyennes	Coeff. de variation de la moyenne (%)
Trimépramine	Produit isolé	0.866	3.6	2.614	5.6	0.781	2.5	1.927	4.2
	Mélange	0.872	2.65	2.235	6.75	0.784	2.5	1.945	4.4
Clomipramine	Produit isolé	0.717	6.0	2.158	8.3	0.634	3.5	1.580	5.6
	Mélange	0.666	9.5	1.946	8.8	0.626	3.5	1.564	3.3
Imipramine	Produit isolé	0.552	11.9	1.693	13.4	0.541	5.2	1.349	4.9
	Mélange	0.554	10.9	1.631	11.2	0.531	5.8	1.332	4.1
Papavérine (étalon)	Produit isolé	0.335	8.1			0.402	5.2		
	Mélange	0.345	8.2			0.400	5.9		
Désipramine	Produit isolé	0.170	5.8	0.555	9.4	0.154	12.6	0.406	14.8
	Mélange	0.176	5.4	0.535	5.9	0.154	14.2	0.397	12.1
Opipramol	Produit isolé	0.115	11.2	0.344	8.1	0.079	16.1	0.194	12.4
	Mélange	0.104	6.6	0.318	5.15	0.076	19.6	0.189	12.0

avec le système B. Avec le solvant A, cependant, l'imipramine se singularise, les valeurs mesurées des R_F ayant une dispersion beaucoup plus importante que celle des composés de plus faible mobilité; ce phénomène peut s'expliquer par le fait que les taches de désipramine et d'opipramol sont bloquées l'une contre l'autre (probablement par l'effet d'un front de démixtion situé immédiatement au dessus de la tache de désipramine): ainsi leurs R_F sont relativement peu sujets à variations alors que dans le système B, elles sont nettement détachées l'une de l'autre et ainsi plus libres.

Quant à la comparaison entre elles des valeurs des R_F et des R_X par l'intermédiaire des coefficients de variation, elle nous permet de conclure, quel que soit le solvant, que l'emploi d'un étalon interne de papavérine et le calcul des R_X n'améliorent en rien la reproductibilité des paramètres mesurés.

Enfin, dans le but de savoir si nous pouvions légitimement considérer que les produits en mélange possèdent le même R_F (ou R_X) que lorsqu'ils migrent isolés, nous avons soumis nos résultats à une analyse de variance par la méthode du "test F". Nous avons ainsi pu conclure qu'il n'existait aucune différence significative entre les R_F (et les R_X) d'un même composé migrant isolément ou en mélange, sauf dans les cas de la clomipramine et de l'opipramol en système A; il est apparu alors une très légère différence significative. Un complément d'information analytique s'imposerait donc pour ces deux composés afin de confirmer ou infirmer l'analyse de variance actuelle, et dans le cas d'une confirmation, afin de rechercher la nature du facteur de perturbation intervenant lorsque ces composés sont mélangés aux autres.

CONCLUSION

Le grand intérêt toxicologique actuel des antidépresseurs thymoanaleptiques à noyau de dibenzoazépine nous a incités à présenter deux méthodes de chromatographie sur couche mince assurant la séparation et l'identification de l'imipramine, de la désipramine, de la clomipramine, de la triméprimine et de l'opipramol.

L'une d'elles nécessite que des précautions rigoureuses soient prises en ce qui concerne la teneur en agent alcalin du solvant de migration. Avec les deux techniques la reproductibilité des R_F et la résolution des taches sont pleinement satisfaisantes. La sensibilité est extrême puisque certains procédés de révélation permettent de déceler jusqu'à 100 ng de produit.

Enfin une analyse statistique nous a permis de montrer que, à l'exception de deux composés sur lesquels nous n'avons pu conclure avec l'un des solvants, le fait que les cinq corps étudiés soient en mélange ne perturbe pas significativement la migration de chacun d'entre eux.

RÉSUMÉ

Les auteurs présentent deux méthodes chromatographiques sur Silica Gel G activé permettant la séparation et l'identification de cinq antidépresseurs à structure dibenzoazépinique: imipramine, désipramine, clomipramine, triméprimine, opipramol. Les mélanges solvants utilisés sont les suivants: (A) éther éthylique déperoxydé et déshydraté-acétone-diéthylamine (90:10:1); (B) benzène-acétone (100:20), chargé en ammoniac par agitation avec 10 ml d'eau ammoniacale à 5%. Le meilleur procédé de révélation consiste à pulvériser d'abord un réactif iodoplatinique dilué puis de

l'acide sulfurique au demi; éventuellement un examen de fluorescence est effectué au bout de 24 h. Dans ces conditions, il est encore possible d'obtenir un résultat positif avec seulement 100 ng de produit. Les deux méthodes sont de valeurs pratiquement égales et, en règle générale, la migration des cinq composés en mélange ne perturbe pas significativement les R_F par rapport à ceux qui sont obtenus lorsque chaque substance migre isolément.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. R. BOISSIER, *Thérapie*, 20 (1965) 1089.
- 2 J. P. FREJAVILLE, A. M. NICAISE ET F. PEBAY PEYROULA, *Concours Méd.*, 9 (1967) 8351.
- 3 T. J. MELLINGER ET C. E. KEELER, *J. Pharm. Sci.*, 51 (1962) 1169.
- 4 G. SCHNEIDER, *J. Chromatog.*, 31 (1967) 612.
- 5 J. VEČERKOVÁ, J. ŠOLC ET K. KÁCL, *J. Chromatog.*, 10 (1963) 479.
- 6 M. FERRARI ET C. E. TÓTH, *J. Chromatog.*, 9 (1962) 388.
- 7 A. NOIRFALISE, *J. Chromatog.*, 20 (1965) 61.
- 8 E. RÖDER, E. MUTSCHLER ET H. ROCHELMMEYER, *J. Chromatog.*, 42 (1969) 131.
- 9 J. J. THOMAS ET L. DRYON, *J. Pharm. Belg.*, 19 (1964) 481.
- 10 I. ZINGALES, *J. Chromatog.*, 31 (1967) 405; 34 (1968) 44.
- 11 L. VIGNOLI, B. CRISTAU, F. GOUEZO ET J. M. VASSALO, *Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon*, 9 (1965) 277.
- 12 A. DANHIER, *J. Pharm. Belg.*, 19 (1964) 385.
- 13 W. PAULUS, W. HOCH ET R. KEYMER, *Arzneimittel Forsch.*, 13 (1963) 609.
- 14 R. MUNIER ET M. MACHEBEUF, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 31 (1949) 1144.
- 15 A. VIALA, F. GOUEZO ET J. CATALIN, *Méd. Lég. Domm. Corp.*, 2 (1969) 21.

J. Chromatog., 45 (1969) 94-103