

CHROM. 5409

IDENTIFICATION DES ANTIDÉPRESSEURS TRICYCLIQUES DÉRIVÉS DE L'IMIPRAMINE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

A. VIALA, J. P. CANO, C. GOLA ET F. GOUEZO

Laboratoire de Toxicologie, Faculté de Pharmacie, 27, Bd. Jean Moulin, 13 Marseille, 5 (France)

(Reçu le 6 avril 1971)

SUMMARY

Identification of tricyclic antidepressants derived from imipramine by gas chromatography

The identification and separation of four tricyclic antidepressants (imipramine, desipramine, clomipramine, trimipramine) are carried out by gas chromatography. Three columns are proposed: OV-1/Igepal on Aeropak 30, XE-60/Igepal on Aeropak 30, UCON Polar on pre-alkalinized Varaport 30. The best results are obtained with the XE-60/Igepal and Ucon Polar columns. The latter has the additional advantage to allow indifferently the injection of the bases or the salts of the compounds studied in methanolic solution.

INTRODUCTION

L'importance de l'utilisation thérapeutique des imipraminiques, la fréquence et la gravité des intoxications qu'ils peuvent provoquer ont conduit de nombreux auteurs à rechercher des méthodes d'identification et de dosage de ces composés applicables aux milieux biologiques. Les techniques qualitatives, outre les réactions chromogènes d'orientation telles que celles préconisées par FORREST *et al.*¹, font intervenir essentiellement la chromatographie sur papier ou sur couche mince. Nous-mêmes avons mis au point un procédé qui assure la séparation de cinq antidépresseurs tricycliques par chromatographie sur couche mince et qui peut être appelé à rendre des services en toxicologie analytique². Sur le plan quantitatif, les procédés radio-chimique sont difficilement utilisables dans la pratique courante; quant à la spectrofluorimétrie, si elle présente un intérêt certain parmi les techniques de routine (techniques colorimétriques, spectrales, ...), dû surtout à sa grande sensibilité, elle a l'inconvénient de manquer de spécificité.

Par contre la chromatographie en phase gazeuse possède l'avantage d'être facile à mettre en oeuvre et de donner des résultats à la fois qualitatifs et quantitatifs; et pourtant elle n'a été que rarement retenue pour l'identification et le dosage des imipraminiques. En 1961, GILLETTE *et al.*³ caractérisent par ce procédé le métabolite déméthylé de l'imipramine extrait du cerveau de rat: ils se servent d'une colonne contenant 0.75 % de SE-30 (méthyl-silicone) sur Gas-Chrom P. STREET⁴ propose la même phase pour mettre en évidence l'imipramine et une phase plus polaire, XE-60 (cyano-éthylméthyl-diméthyl-silicone), pour séparer les métabolites mono- et di-

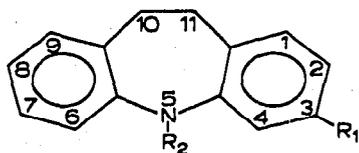
déméthylés. QUERCIA *et al.*^{5,6} emploient une colonne à 2 % de SE-30 sur Aeropak 30 pour caractériser l'imipramine en solution pure ou dans ses préparations pharmaceutiques. WEDER ET BICKEL⁷ séparent l'imipramine et ses principaux métabolites, préalablement extraits des tissus de rat, au moyen d'une colonne en verre contenant de l'Anakrom ABS imprégné de 1.5 % de SE-30. Enfin, plus récemment, KAZYAK ET PERMISOHN⁸ indiquent trois phases stationnaires, OV-1 (diméthyl-silicone), OV-17 (phényl-méthyl-silicone) et QF-1 (trifluoropropyl-méthyl-silicone), pour la détermination des "indices de rétention" ou "indices de Kovats" (relation entre le nombre d'atomes de carbone et le logarithme du temps de rétention) de nombreuses drogues organiques, dont l'imipramine.

La spécificité et la grande sensibilité de la chromatographie gazeuse, ainsi que la rapidité de la réponse qu'elle fournit, lui permettent de satisfaire aussi bien aux exigences de l'examen toxicologique qu'à celles de l'étude pharmacocinétique. Aussi nous a-t-il paru opportun de l'adopter pour les déterminations que nous envisageons. Dans un premier temps notre préoccupation a été de séparer et d'identifier les cinq composés tricycliques sur lesquels s'était déjà portée notre attention. Nous exposons ici les résultats de ces recherches.

STRUCTURE CHIMIQUE DES COMPOSÉS ÉTUDIÉS

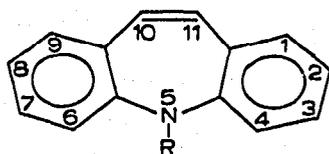
Tous possèdent un noyau tricyclique dont la partie centrale est constituée par un hétérocycle heptagonal azoté, saturé en position 10-11 (série de la dibenzodihydroazépine) ou non saturé (série de la dibenzoazépine), et une chaîne latérale de type γ -amino-propyle; dans le cas de l'opiprapol l'azote de la chaîne latérale est inclus dans un noyau pipéridinique (voir ci-après).

Serie de la dibenzodihydroazépine



	R ₁	R ₂
imipramine (Tofranil) chlorhydrate	H	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$
desipramine (Pertofran) chlorhydrate	H	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} \begin{matrix} \text{H} \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$
triméprimine (Surmontil) maléate acide	H	$-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{N} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$
clomipramine (Anafranil) chlorhydrate	Cl	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$

Serie de la dibenzoazépine



opiprapol (Insidon) dichlorhydrate	R: $-(\text{CH}_2)_3-\text{N} \begin{matrix} \text{ } \\ \text{ } \end{matrix} \text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$
---------------------------------------	---

ESSAIS CHROMATOGRAPHIQUES

L'examen de la formule chimique de ces composés laisse présager, pour certains d'entre eux tout au moins (désipramine, opipramol), des difficultés de résolution en chromatographie gazeuse. En effet, avec les molécules porteuses d'hydrogène mobile ou de groupement polaire, une adsorption plus ou moins réversible sur les sites actifs du support, suivie d'une désorption lente, peut provoquer la traînée des pics chromatographiques ("tailing"), ce qui diminue l'efficacité de la colonne et fausse les résultats lorsque les analyses sont effectuées dans un but quantitatif. Différentes méthodes, visant à masquer les fonctions actives des composés injectés ou les sites réactionnels du support, peuvent être mises en oeuvre pour pallier ces inconvénients. WEDER ET BICKEL⁷, par exemple, soumettent l'imipramine N-oxyde à une réduction et les métabolites à fonction amine secondaire à une acétylation; dans ces conditions le "tailing" n'apparaît plus, sauf dans le cas de l'hydroxy-2-desméthylimipramine acétylée qui présente encore une adsorption non négligeable. Il est également possible de masquer les sites réactionnels des supports; le simple traitement de ceux-ci par un agent alcalin est souvent suffisant, comme nous l'avons constaté encore récemment dans le cas de la nicotine⁹. Nous nous sommes donc efforcés de trouver une ou plusieurs colonnes suffisamment sélectives pour assurer une bonne séparation des composés étudiés.

Nous avons essayé successivement trois sortes de phases stationnaires, OV-1/Igepal, XE-60/Igepal, et Ucon Polar 50 HB-2000*, sur deux types de support: Aeropak 30 dans les deux premiers cas, Varaport 30 dans le troisième. Les colonnes ont été préparées à l'aide de tube en acier "inox super". Nous avons employé des taux d'imprégnation des supports par les phases relativement bas, afin de raccourcir la durée des analyses et de diminuer autant que possible la température de chauffe des colonnes. Les expérimentations ont été conduites sur un chromatographe "Aerograph 1520 B" équipé d'un détecteur à ionisation de flamme d'hydrogène, le gaz vecteur étant l'azote U. Dans tous les cas, l'une des extrémités de la colonne était introduite dans l'injecteur de l'appareil; de la sorte les injections pouvaient être faites directement en tête de colonne. L'autre extrémité était reliée au détecteur sans raccord capillaire. Les conditions chromatographiques ont été les suivantes.

(1) *OV-1/Igepal*

Nous avons opéré sur une colonne de 1.50 m de longueur, à 2 % d'OV-1 et 0.2 % d'Igepal sur Aeropak 30 (80-100 mesh). La température de la colonne était de 195°.

(2) *XE-60/Igepal*

Cette colonne, plus polaire, de 1 m de longueur, était à 4.6 % de XE-60 et 0.5 % d'Igepal sur Aeropak 30 (80-100 mesh). La colonne était chauffée à 180°.

(3) *Ucon Polar*

Nous avons également testé une colonne de 1 m de longueur, contenant 3.2 % d'Ucon 50 HB-2000 Polar sur Varaport 30 (80-100 mesh) préalablement alcalinisé

* OV-1 = diméthyl silicone; Igepal = nonyl phénoxy-polyoxyéthylène éthanol; XE-60 = cyano-éthylméthyl-diméthyl-silicone; Ucon Polar 50 Hb-2000 = polyalkylène glycols.

par 6 % de potasse. Les températures respectives de la colonne, du détecteur et de l'injecteur étaient de 205°, 215° et 220°.

Les solutions injectées dans les deux premières colonnes contenaient la base du composé étudié, solubilisée dans un solvant approprié tel que le méthanol; elles étaient préparées en agitant avec de l'éther des volumes exactement mesurés de solution aqueuse du sel convenablement alcalinisée, puis en évaporant et en reprenant le résidu par un volume déterminé de méthanol. La troisième colonne présentait l'avantage d'autoriser l'injection directe des sels en solution méthanolique.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Nous considérerons en premier lieu le cas de l'opipramol. Bien que possédant comme les autres substances examinées un noyau tricyclique, il s'en différencie par la présence d'une double liaison en C₁₀-C₁₁ et d'une chaîne latérale terminée par une fonction alcool. L'injection de solution d'opipramol dans les trois colonnes précitées n'a provoqué aucune déflexion sur l'enregistreur, ce qui traduit une adsorption pratiquement irréversible. Ce n'est qu'en traitant la base par silylation au "BSA" [N,O-bis-(triméthylsilyl)-acétamide] préalablement à l'injection que l'élution se produit. Ces

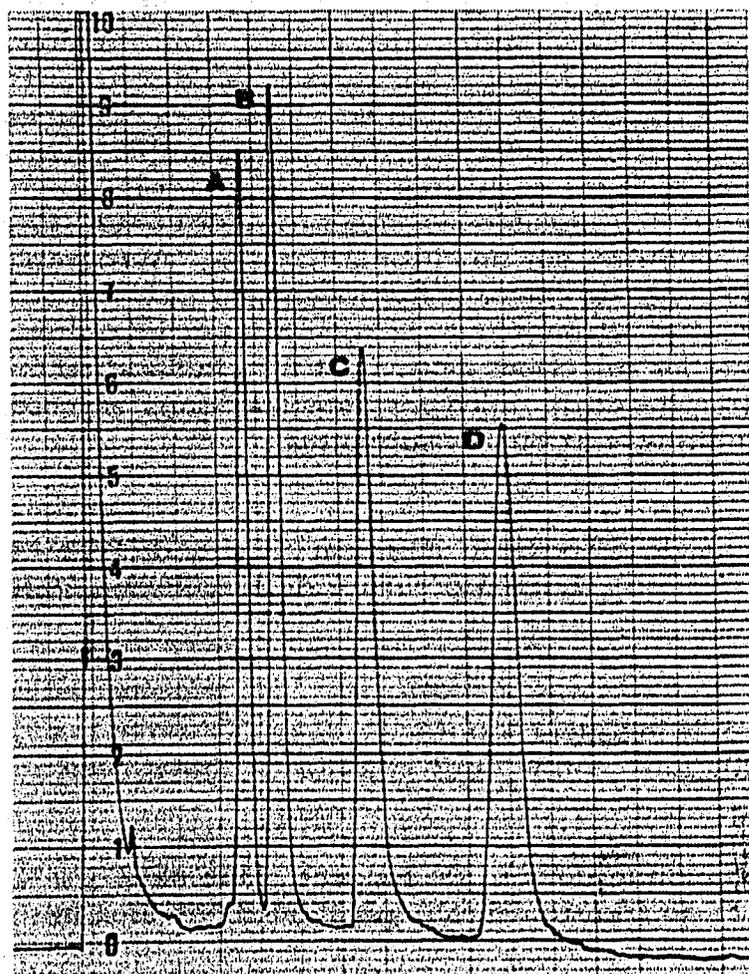


Fig. 1. Séparation sur XE-60/Igepal du mélange triméprimine (A), imipramine (B), désipramine (C) et clomipramine (D).

recherches n'ont cependant pas été poursuivies plus avant; nous avons préféré nous consacrer d'abord à l'imipramine et à ses dérivés dont l'intérêt toxicologique nous a paru supérieur à celui de l'opipramol.

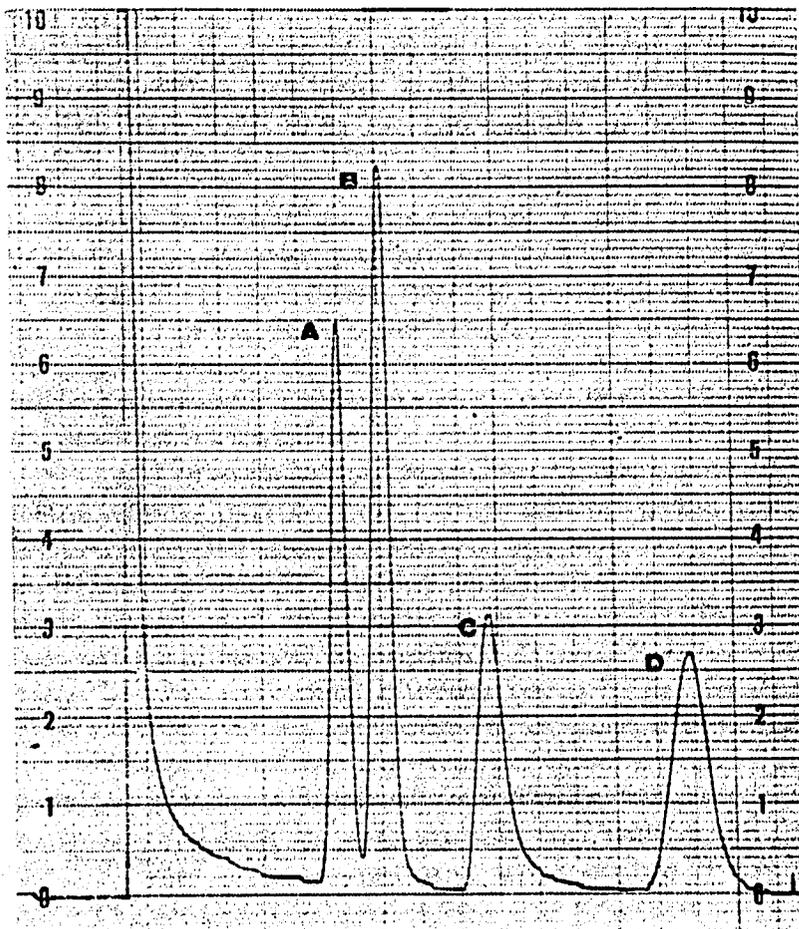


Fig. 2. Séparation sur Ucon Polar du mélange triméprimine (A), imipramine (B), désipramine (C) et clomipramine (D).

Pour les quatre autres médicaments, les performances des colonnes testées ne sont pas identiques. La séparation est très satisfaisante sur les colonnes préparées avec XE-60 et Ucon Polar, l'ordre d'élu­tion étant toujours le même: triméprimine, imipramine, désipramine, clomipramine; les pics sont parfaitement résolus comme le montrent les Figs. 1 et 2. Avec la colonne d'OV-1, par contre, la résolution du couple imipramine-triméprimine est insuffisante (Fig. 3); l'allongement de la colonne, l'abaissement de la température et la modification du débit du gaz vecteur n'influent que modérément sur l'efficacité de la séparation. Par ailleurs les colonnes préparées avec OV-1 ou avec XE-60 ne permettent l'injection des composés que sous forme de bases, ce qui présente plusieurs inconvénients. En effet, les imipraminiques ont, à l'état de bases, une consistance huileuse; les manipulations nécessaires pour obtenir les solutions étalons ne peuvent se faire sans pertes et celles-ci, difficiles à évaluer, rendent la technique pratiquement inutilisable en analyse quantitative. C'est pourquoi nous avons préféré, pour préparer les étalons, recourir au procédé qui consiste à déplacer

la base par addition à une solution aqueuse de son sel d'un tampon de pH élevé, puis à l'extraire par un solvant organique approprié. On peut dans un premier temps, en opérant sur les bases obtenues par extraction à un pH nettement alcalin (pH 11 ou 12 par exemple), sélectionner le solvant qui semble posséder le meilleur pouvoir de solubilisation; ensuite on déterminera pour ce solvant le rendement de l'extraction en fonction du pH, après évaporation et reprise du résidu par le méthanol. Bien que la méthode paraisse donner dans l'ensemble de bons résultats, un doute subsiste quant aux possibilités de récupération totale, car le rendement ne peut pas être calculé de façon rigoureuse.

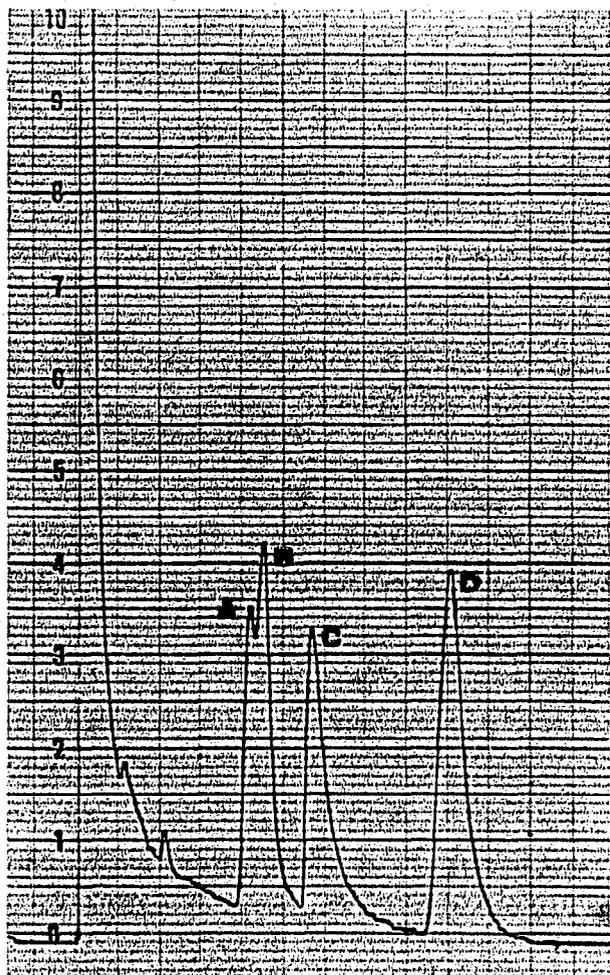


Fig. 3. Séparation sur OV-1/Igepal du mélange triméprimine (A), imipramine (B), désipramine (C) et clomipramine (D).

Un autre problème, d'ordre chromatographique, s'est également présenté avec les colonnes à base d'OV-1 et de XE-60. Alors que les amines tertiaires (imipramine, triméprimine, clomipramine) fournissent des pics parfaitement symétriques, la désipramine manifeste un phénomène de "tailing" très net. C'est pour tenter de supprimer cette traînée que nous avons essayé une colonne préparée avec une phase polaire et un support préalablement traité par un agent alcalin (Ucon Polar sur Varaport), analogue à celle déjà utilisée avec succès pour les benzophénones¹⁰ et la nicotine⁹.

Avec une telle colonne la traînée du pic de désipramine est nettement atténuée (Fig. 2) mais ne disparaît pas totalement.

Quelques enseignements pratiques peuvent être retirés de ces observations. En considérant seulement les composés sur lesquels nous avons nous-mêmes expérimenté, nous avons pu distinguer plusieurs cas:

(1) Les benzophénones, telles que la méthylamino-chloro-benzophénone ou l'amino-chloro-benzophénone provenant de l'hydrolyse acide de certains médicaments benzodiazépiniques, indifférentes au pH du milieu en ce qui concerne leur extraction par les solvants organiques, ne nécessitent pas de traitement du support chromatographique en vue d'en faire varier le pH; le seul emploi d'une phase polaire conduit à l'obtention de pics parfaitement symétriques.

(2) Pour des bases comme la nicotine ou les amphétamines, dont l'extraction par les solvants organiques ne devient complète qu'à des pH élevés (pH supérieur à 11, par exemple, pour la nicotine), l'accroissement de la polarité de la phase n'est pas suffisant pour améliorer la symétrie des pics; une alcalinisation franche du support est alors indispensable.

(3) Lorsque les substances étudiées sont extraites quantitativement à des pH moins élevés (pH 8 pour l'imipramine, pH 9 pour la désipramine, par exemple), la dissymétrie des pics ne semble apparaître qu'avec celles (telle la désipramine) dont les pH d'extraction sont les plus hauts; là encore, le "tailing" peut être considérablement réduit, non seulement en augmentant la polarité de la phase, mais aussi et surtout en alcalinisant le support. Il paraît donc se confirmer qu'il existe une relation entre le comportement chromatographique de divers types de molécules et leurs pH d'extraction par les solvants organiques à partir de milieux aqueux.

L'alcalinisation du support chromatographique, telle que nous l'avons réalisée pour la colonne à base d'Ucon Polar, rend en outre possible l'injection directe des composés à l'état de sels en solution méthanolique. Ce procédé est très avantageux car il permet un gain de temps appréciable et surtout une plus grande précision grâce aux étalons parfaitement titrés qui peuvent ainsi être préparés.

CONCLUSION

Au terme de cette étude nous disposons pour la détection des antidépresseurs imipraminiques par chromatographie gazeuse d'un ensemble de trois colonnes, différentes par la polarité de leurs phases et/ou par le pH de leurs supports. Chacune d'elles permet de réaliser l'identification spécifique de l'imipramine, de la désipramine, de la triméprimine et de la clomipramine, en un temps qui, bien que ne pouvant rivaliser avec celui des réactions chromogènes d'orientation, est encore relativement court. La colonne à base d'Ucon Polar se distingue en outre par le fait qu'elle tolère l'injection des composés aussi bien à l'état de bases que sous forme de sels. Nous rapportons par ailleurs les conditions dans lesquelles elle peut être utilisée pour le diagnostic qualitatif des intoxications par imipraminiques et pour des études cinétiques et métaboliques quantitatives sur l'imipramine et la désipramine:

RÉSUMÉ

L'identification et la séparation de quatre antidépresseurs tricycliques (imipramine, désipramine, clomipramine, triméprimine) sont réalisées par chromato-

graphie en phase gazeuse. Trois colonnes sont proposées: OV-1/Igepal sur Aeropak 30, XE-60/Igepal sur Aeropak 30, Ucon Polar sur Varaport 30 préalablement alcalinisé par l'hydroxyde de potassium. Les meilleurs résultats sont obtenus avec les colonnes de XE-60/Igepal et d'Ucon Polar. Cette dernière présente en outre l'avantage de tolérer indifféremment l'injection des bases ou des sels des composés étudiés en solution méthanolique.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 I. S. FORREST, F. M. FORREST ET A. S. MASON, *Amer. J. Psych.*, 116 (1960) 840 et 1021; 118 (1961) 300.
 - 2 A. VIALA, F. GUEZO ET C. GOLA, *J. Chromatogr.*, 45 (1969) 94.
 - 3 J. R. GILLETTE, J. V. DINGELL, F. SULSER, R. KUNTZMAN ET B. BRODIE, *Experientia*, 17 (1961) 417.
 - 4 H. STREET, *J. Chromatogr.*, 29 (1967) 68.
 - 5 V. QUERCIA, C. CARDINI ET A. CALÓ, *Boll. Chim. Farm.*, 107 (1968) 383.
 - 6 C. CARDINI, V. QUERCIA ET A. CALÓ, *J. Chromatogr.*, 37 (1968) 190.
 - 7 H. J. WEDER ET M. H. BICKEL, *J. Chromatogr.*, 37 (1968) 181.
 - 8 L. KAZYAK ET R. PERMISOHN, *J. Forensic Sci.*, 15 (1970) 346.
 - 9 J. P. CANO, J. CATALIN, R. BADRE, C. DUMAS, A. VIALA ET R. GUILLERME, *Ann. Pharm. Fr.*, 28 (1970) 581 et 633.
 - 10 J. P. CANO, *Thèse Doct. Pharm. (État)*, Marseille, 1969.
- J. Chromatogr.*, 59 (1971) 297-304