

CHROM. 5588

INTÉRÊT DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE D'ADSORBANT POUR L'IDENTIFICATION EN TOXICOLOGIE D'URGENCE DES BENZO[f]DIAZÉPINES-1,4 UTILISÉES EN THÉRAPEUTIQUE

PAUL LAFARGUE, JEAN MEUNIER* ET YVES LEMONTIEY

École d'Application du Service de Santé des Armées et Laboratoire de Biochimie Clinique et de Toxicologie d'Urgence de l'Hôpital d'Instruction des Armées du Val-de-Grâce, 277 bis, rue Saint-Jacques, 75-Paris (Ve) (France)

(Reçu le 17 juin 1971)

SUMMARY

The importance of thin-layer chromatography for the identification in urgent toxicological analysis of 1,4-benzo[f]diazepines used in therapeutic treatment

Thin-layer chromatography may be used, in urgent toxicological analysis, for the classification of derivatives of hydrolysis products of urinary benzodiazepine into one of several groups differing in pharmacological activity. Extracts of derivatives and hydrolysis products of gastric juices are identified by thin-layer chromatography. This identification is completed by gas-liquid chromatographic and spectrofluorimetric studies.

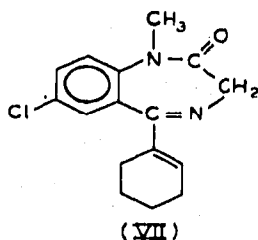
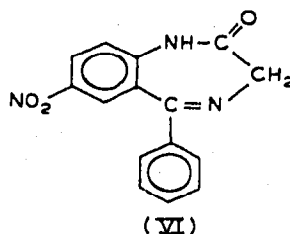
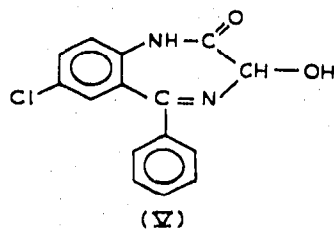
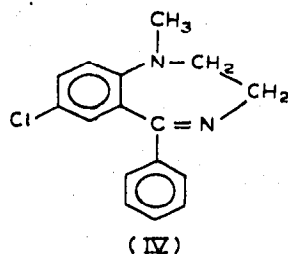
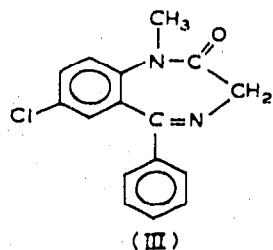
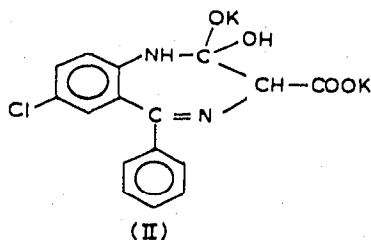
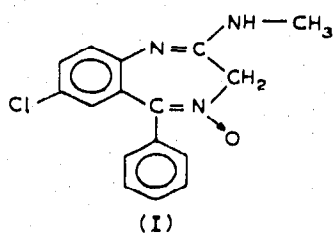
INTRODUCTION

Les dérivés de la benzo[f]diazépine-1,4 (I-VII) sont utilisés en thérapeutique pour leurs propriétés suivantes: anxiolytiques — le chlordiazépoxyde (I), le clorazépate (II), le diazépam (III), le médazépam (IV) et l'oxazépam (V); hypnotiques — le nitrazépam (VI); myorelaxantes — le tétrazépam (VII).

Comme toutes les drogues psychotropes, les six premiers dérivés précédents sont fréquemment rencontrés en toxicologie hospitalière d'urgence. La chromatographie sur couche mince d'adsorbant (CCM) et la chromatographie en phase gazeuse font partie des techniques utilisées pour l'identification de ces dérivés, soit directement, soit par l'intermédiaire de leurs produits d'hydrolyse^{1,2}. Voir le Tableau I.

La méthode que nous présentons dans ce travail a pour but de permettre: (1) la détection rapide de ces dérivés, en urgence, dans les liquides gastriques et (2) à partir des urines, le classement du dérivé absorbé dans l'un des groupes suivants: (a) diazépam et médazépam, (b) chlordiazépoxyde, clorazépate et oxazépam, (c) nitrazépam et (d) tétrazépam (non-doué d'activité psychotrope et qui ne doit pas être confondu avec les molécules précédentes).

* Adressez correspondance à Professeur Agrégé J. MEUNIER.



Cette méthode est basée sur les données analytiques suivantes, rassemblées dans des travaux antérieurement publiés.

(a) Tous les produits N₁-méthylés subissent dans l'organisme une déméthylation.

(b) Le métdazépam possédant (notamment sur le carbone 2) un groupement méthylène, subit dans l'organisme une oxydation conduisant à la formation d'un dérivé oxo ou hydroxy-2^{β-δ}.

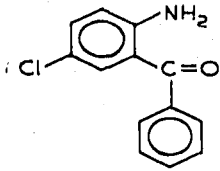
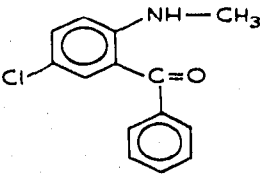
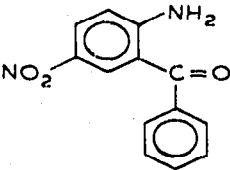
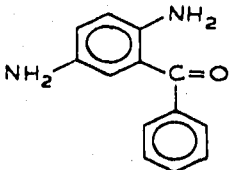
(c) L'hydrolyse chlorhydrique à chaud des composés résultant des transformations précédentes (à l'exception des métabolites du tétrazépam) conduit à la formation d'une amine aromatique primaire (dérivé d'une amino-2 benzophénone) diazocopulable (Tableau I).

(d) Le nitrazépam subissant dans l'organisme une nitro-réduction, l'hydrolyse des urines conduit à la formation de deux benzophénones différentes, l' amino-2 nitro-5 benzophénone et la diamino-2,5 benzophénone.

(e) La présence d'un radical cyclohexène dans la molécule du tétrazépam et de ses métabolites est à l'origine, sous l'action de l'acide chlorhydrique et à 100°, de la

TABLEAU I

PRODUITS D'HYDROLYSE CHLORHYDRIQUE DES DÉRIVÉS DE LA PHÉNYL-5 BENZODIAZÉPINE-1,4 ET DE LEURS MÉTABOLITES

Dérivé de la benzophénone	Structure	Produit de base	Métabolite identifié	Métabolite supposé
Amino-2 chloro-5		Diazépam	3-Hydroxy diazépam Oxo-2 mélazépam	
Méthylamino-2 chloro-5		Chlordiazépoxyde Oxazépam Clorazépate	N-Déméthyl diazépam 3-Hydroxy N-déméthyl diazépam N-Déméthyl chlordiazépoxyde Lactame du chlordiazépoxyde	
Amino-2 nitro-5		Nitrazépam		3-Hydroxy nitrazépam
Diamino-2,5			3-Hydroxy nitrazépam réduit Nitrazépam réduit 7-Acétamido nitrazépam	3-Hydroxy 7-acétamido nitrazépam

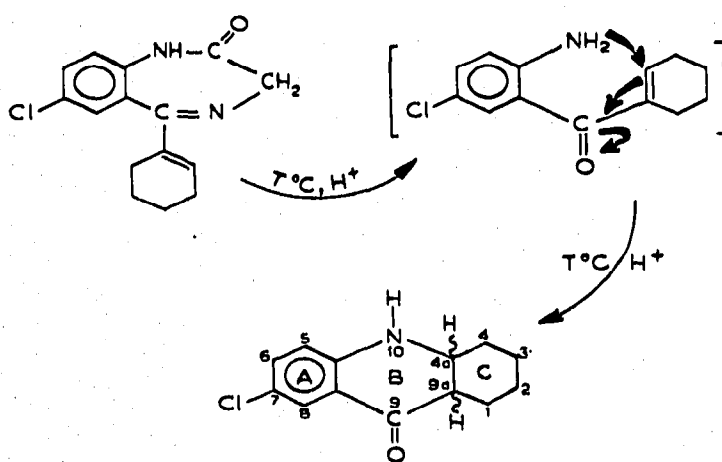


Fig. 1. Formation de la chloro-7 hexahydro-1,2,3,4,4a,9a acridone par hydrolyse chlorhydrique du tétrazépam déméthylé⁶.

cyclisation des produits d'hydrolyse, et de l'obtention de dérivés de l'hexahydroacridone⁶ ne présentant pas de fonction amine aromatique primaire (Fig. 1).

La caractérisation des dérivés de la benzo[*f*]diazépine peut être réalisée par CCM à partir des urines, uniquement par l'étude de leurs produits d'hydrolyse, l'excrétion urinaire des dérivés non-métabolisés étant très faible, et à partir des liquides gastriques d'une manière directe et par l'intermédiaire de leurs produits d'hydrolyse.

IDENTIFICATION "PARTIELLE" À PARTIR DES URINES

Composés formés par l'hydrolyse des dérivés benzodiazépiniques présents dans les urines

Le médazépam et son dérivé N-déméthylé n'ayant pas subi l'oxydation du carbone 2, ne conduisent pas à la formation de dérivés de la benzophénone, la présence du groupement méthylénique sur le carbone 2 assurant à la liaison N₁-C₂ une grande stabilité vis à vis de l'action hydrolysante de l'acide chlorhydrique. Seuls les métabolites ayant subi l'oxydation du carbone 2 conduisent, sous l'action de l'acide chlorhydrique à la formation de dérivés de la benzophénone. Voir le Tableau II.

TABLEAU II

COMPOSÉS FORMÉS PAR L'HYDROLYSE ACIDE DES DÉRIVÉS BENZODIAZÉPINIQUES ET DE LEURS MÉTABOLITES URINAIRES

<i>Produits absorbés</i>	<i>Produits d'hydrolyse de l'ensemble "dérivés absorbés et métabolites" présents dans les urines^a</i>
Diazépam et mélazépam (anxiolytiques)	Méthylamino-2 chloro-5 benzophénone et amino-2 chloro-5 benzophénone
Chlordiazépoxide, clorazépate et oxazépam (anxiolytiques)	Amino-2 chloro-5 benzophénone (exclusivement)
Nitrazépam (hypnotique)	Amino-2 nitro-5 benzophénone et diamino-2,5 benzophénone
Tétrazépam (myoreléxant)	N ₁₀ -Méthyl chloro-7 hexahydroacridone et chloro-7 hexahydroacridone

^a Tous les produits d'hydrolyse acide sont de couleur jaune.

Préparation des dérivés d'hydrolyse

Dans un erlenmeyer de 500 ml bouchant émeri, placer 50 ml d'urines et 20 ml d'acide chlorhydrique ($d = 1,18$). Porter le mélange 30 min au bain-marie à 100°. Après refroidissement extraire les produits d'hydrolyse par 100 ml d'éther éthylique. Après séparation, la phase étherée est lavée deux fois avec 50 ml de solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1 N, puis deux fois avec 50 ml d'eau distillée. Après déshydratation par agitation avec du sulfate de sodium anhydre, l'extrait étheré est évaporé. La solution dans l'éthanol du résidu d'évaporation à 95° est soumise à l'analyse chromatographique.

Analyse chromatographique

Chromatographie sur couche mince d'oxyde d'aluminium F₂₅₄ (Merck,

5713/0025, plaques prêtes à l'emploi) une migration de 10 à 12 cm (substance de référence: benzophénone) avec le solvant benzène-chloroforme (3:1).

La révélation des produits d'hydrolyse acide est réalisée comme suit:

(1) Pour localiser les spots le chromatogramme est soumis à l'irradiation à 254 nm.

(2) Irradiation à 366 nm: fluorescence jaune-verte intense des deux dérivés de l'aeridone (après absorption de tétrazépam).

(3) Réaction de diazocopulation — Pulvériser sans excès une solution de nitrite de sodium à 0.5 % dans l'acide chlorhydrique ($d = 1.18$) au 1/10 préparée extemporanément. Attendre 5 min. Sécher la plaque sous un courant d'air tiède. Pulvériser enfin le réactif de Tréfouel (solution aqueuse à 0.1 % de chlorhydrate de N- α -naphthyl N'-diéthylpropylène diamine). Les spots correspondants aux amines aromatiques primaires apparaissent en quelques minutes colorés en violet. La coloration s'intensifie plus rapidement en plaçant les chromatoplaques quelques minutes à $+50^{\circ}$.

Résultats

La chloro-7 N₁₀-méthyl hexahydroacridone et la chloro-7 hexahydroacridone fluorescent en jaune-vert sous l'irradiation à 366 nm. L'amino-2 chloro-5 benzophénone, l'amino-2 nitro-5 benzophénone et la diamino-2,5 benzophénone ont une réaction de diazocopulation positive; la méthylamino-2 chloro-5 benzophénone et les dérivés de l'hexahydroacridone ont une réaction de diazocopulation négative.

Le Tableau III donne les valeurs des R_F absolus et les valeurs des R_F relatifs à la benzophénone des produits d'hydrolyse.

TABLEAU III

VALEURS DES R_F ABSOLUS ET DES R_F RELATIFS À LA BENZOPHÉNONE DES PRODUITS D'HYDROLYSE DES BENZODIAZÉPINES ET DE LEURS MÉTABOLITES URINAIRES

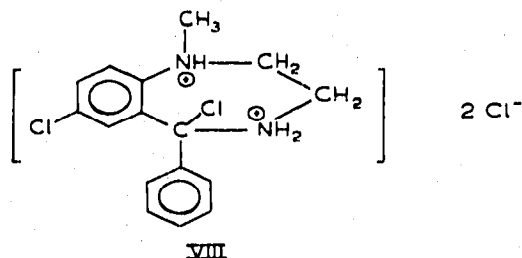
	R_F absolu	R_F relatif
Benzophénone (référence)	0.70	1.00
Amino-2 chloro-5 benzophénone	0.55	0.79
Méthylamino-2 chloro-5 benzophénone	0.77	1.11
Amino-2 nitro-5 benzophénone	0.35	0.50
Diamino-2,5 benzophénone	0.05	0.07
Chloro-7 N ₁₀ -méthyl hexahydroacridone	0.58	0.83
Chloro-7 hexahydroacridone	0.67	0.96

Interprétation (urines). Les benzodiazépines anxiolytiques, chlordiazépoxyde, clorazépate et oxazépam, conduisent à un spot jaune, une diazocopulation positive et un R_F relatif de 0.79; les benzodiazépines anxiolytiques, diazépam et médazépam, conduisent à un spot jaune, une diazocopulation positive et un R_F relatif de 0.79, et à un second spot jaune, non-diazocopulable et de R_F relatif 1.11. La benzodiazépine hypnotique, le nitrazépam, conduit à deux spots jaunes, de diazocopulation positive et de R_F relatifs 0.50 et 0.07.

La benzodiazépine myorelaxante, le tétrazépam, conduit à deux spots jaunes, de diazocopulation négative, de R_F relatifs 0.96 et 0.83, fluorescents à 366 nm.

IDENTIFICATION À PARTIR DES LIQUIDES GASTRIQUES

A partir d'un liquide gastrique contenant les produits non-métabolisés, on observe, après hydrolyse acide: pour le diazépam — la formation exclusive de méthyl-amino-2 chloro-5 benzophénone; pour le chlor diazépoxide, le clorazépate et l'oxazépam — la formation exclusive d'amino-2 chloro-5 benzophénone; pour le mélazépam — pas de formation de benzophénone (VIII); pour le nitrazépam — formation exclusive d'amino-2 nitro-5 benzophénone; et pour le tétrazépam — formation exclusive de chloro-7 N₁₀-méthyl hexahydroacridone.



Dans les liquides gastriques, après extraction par l'éther en milieu neutre ou faiblement acide, l'identification du produit absorbé peut être réalisée par CCM, par spectrofluorimétrie ou par chromatographie en phase gazeuse.

CCM. La CCM est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment, mais en utilisant comme solvant le mélange chloroforme-éthanol (20:1). (Tableau IV).

TABLEAU IV

VALEURS DE R_F ABSOLUS ET DES R_F RELATIVES AU DIAZÉPAM DES BENZODIAZÉPINES-1,4 UTILISÉES EN THÉRAPEUTIQUE

	R_F absolu	R_F relatif
Diazépam (référence)	0.80	1.00
Chlor diazépoxide	0.54	0.67
Clorazépate	0.39	0.48
Mélazépam	0.85	1.07
Nitrazépam	0.32	0.39
Oxazépam	0	0
Tétrazépam	0.81	1.01

Spectrofluorimétrie. Après évaporation de la phase extractive étherée, le résidu est dissous dans 10 ml d'alcool éthylique anhydre (Carlo Erba R.P. A.C.S.). La phase alcoolique est divisée en trois parties égales à partir desquelles on prépare des solutions dans les acides perchlorique ($d = 1.67$), phosphorique ($d = 1.71$) ou sulfurique ($d = 1.83$) (un volume de solution éthanolique, trois volumes d'acide). Après un premier examen en lumière de Wood qui permet de déterminer le milieu acide dans lequel la solution alcoolique de benzodiazépine présente la fluorescence la plus intense, on procède alors à l'analyse spectrofluorimétrique de la solution (Tableau V).

TABLEAU V

ÉTUDE SPECTROFLUORIMÉTRIQUE QUALITATIVE DES BENZODIAZÉPINES-1,4

Produit	Solution alcoolique en milieu acide	λ_{max} . Excitation (nm)	λ_{max} . Émission (nm)
Chlordiazépoxyde	H ₂ SO ₄	310	530
Clorazépate	H ₂ SO ₄	388	508
Diazépam	H ₂ SO ₄	295	490
Médazépam	H ₂ SO ₄	345	485
Nitrazépam	HClO ₄	300	495
Oxazépam	H ₃ PO ₄	360	475
Tétrazépam	H ₃ PO ₄	308	492

Chromatographie en phase gazeuse. La chromatographie en phase gazeuse est réalisée dans les conditions que nous avons antérieurement préconisées², en utilisant une colonne de 2 m de 3 % d'OV-17 (méthylphénylsilicone) sur Gas-Chrom Q, 100/120 mesh une température de 250° pour les dérivés benzodiazépiniques et de 210° pour les produits d'hydrolyse

RÉSUMÉ

L'étude par chromatographie sur couche mince d'adsorbant des produits d'hydrolyse acide des dérivés benzodiazépiniques présents dans les urines permet, en toxicologie d'urgence, de classer le dérivé absorbé dans divers groupes se différenciant par leur activité pharmacologique. À partir des liquides gastriques, l'étude par chromatographie sur couche mince du composé extrait et de son produit d'hydrolyse acide, permet l'identification; celle-ci peut être complétée par une étude en chromatographie en phase gazeuse et par spectrofluorimétrie.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 P. LAFARGUE, P. PONT ET J. MEUNIER, *Ann. Pharm. Fr.*, 28 (1970) 343.
- 2 P. LAFARGUE, P. PONT ET J. MEUNIER, *Ann. Pharm. Fr.*, 28 (1970) 477.
- 3 L. O. RANDALL, C. L. SCHECKEL ET W. POOL, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 185 (1970) 135.
- 4 J. RIEDER ET G. RENTSCH, *Arzneim. Forsch.*, 18 (1968) 1545.
- 5 J. A. DE SILVA ET C. V. PUGLISI, *Anal. Chem.*, 42 (1970) 1725.
- 6 P. LAFARGUE, J. L. MORINIERE, P. PONT ET J. MEUNIER, *C. R. Acad. Sci. (Paris), Sér. C*, 270 (1970) 1186.