

CHROM. 10,009

IDENTIFICATION ET DOSAGE DES IMPURETÉS DU BÉNORILATE (SALIPRAN) PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE

G. CHEVALIER et P. ROHRBACH

Laboratoires Bottu, 52-58, Avenue du Maréchal Joffre, 92000 Nanterre (France)

et

C. BOLLET et M. CAUDE

Laboratoire de Chimie analytique de l'École Supérieure de Physique et de Chimie de Paris, 10, Rue Vauquelin, 75231 Paris Cedex 05 (France)

(Reçu le 21 février 1977)

SUMMARY

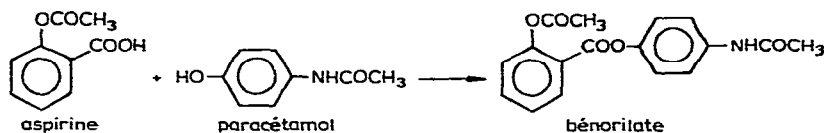
Identification and quantitation of impurities from benorilate (Salipran) by high-performance liquid chromatography

High-performance liquid chromatography is used for identification and quantitation of impurities which may be encountered in a new antalgic, benorilate (or Salipran), an ester of aspirin with paracetamol. Gradient elution is carried out using a stationary phase consisting of porous 10- μ m silica beads bonded to alkyl nitrile (Micropak CN), and a mixture of hexane-methylenechloride-methanol-acetic acid with varying methanol percentage as mobile phase. The following impurities were separated from benorilate: acetylsalicylic anhydride, aspirin, acetylsalicylsalicylic acid, salophene, amino-4-phenylacetoxy-2-benzoate, paracetamol, *p*-aminophenol. The repeatability of the quantitative analysis is good with a standard variation of 0.54% for benorilate (7 injections). Detection is by UV absorption at 254 nm, and detectability is between $2 \cdot 10^{-9}$ moles for *p*-aminophenol and $4 \cdot 10^{-11}$ moles for salophene.

INTRODUCTION

La pureté chimique des médicaments joue un rôle important dans la mesure où elle peut conditionner la tolérance de l'organisme humain aux produits administrés. En particulier, il n'est pas toujours aisé, lorsqu'un médicament provoque des réactions d'allergie, de les imputer à la molécule elle-même ou à une impureté qui peut exister à faible concentration. Ainsi, dans le cas de l'aspirine, divers auteurs incriminent, non pas le produit lui-même, mais certaines de ses impuretés dans les allergies que provoque ce médicament. Il s'agirait de l'anhydride acétylsalicylique¹ et ou de l'acide acétylsalicylsalicylique². D'autre part, le fait que l'aspirine présente une certaine instabilité rend sa conservation difficile, ce qui complique encore le problème des réactions d'intolérance à ce médicament.

Un ester de l'aspirine appelé bénorilate (ou Salipran) jouit au contraire d'une excellente stabilité. Le *p*-ac tylaminoph nol (ou paracétamol) est l'agent d'estérification:



Le bénorilate possède les propriétés antalgiques de l'aspirine, mais avec une bien meilleure tol rance³ et il est maintenant utilisé en thérapeutique.

Dès lors il était essentiel de disposer, pour contrôler la pureté de cet ester, d'une méthode d'analyse qualitative et quantitative des impuretés qu'il peut contenir et qui peuvent provenir: (1) de l'aspirine: anhydride acétylsalicylique (allergisant possible), acide salicylique (irritant), acide acétylsalicylsalicylique (allergisant éventuel); (2) du paracétamol: *p*-aminophénol (m th moglobinisant); (3) de la synthèse de l'ester: aspirine, paracétamol, ester salicylique du paracétamol, ester acétylsalicylique du *p*-aminophénol.

Les formules chimiques de ces différents produits sont rassemblées dans le Tableau I. Ils représentent les impuretés logiquement prévisibles du bénorilate et en particulier celles pouvant être néfastes, mais rien ne dit, bien sûr, qu'il n'en existe pas d'autres. Seule une méthode d'analyse présentant une haute résolution et une bonne sensibilité permettra donc une analyse quantitative précise du bénorilate. Nous montrons ici que la chromatographie en phase liquide rapide permet de résoudre le problème.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Appareillage

Nous avons utilisé un chromatographe en phase liquide Varian (Palo Alto, Calif., U.S.A.), modèle 8520 à deux pompes et dispositif pour gradient équipé d'un détecteur LDC UV Monitor (Riviera Beach, Fla., U.S.A.)  quip  de microcuvettes à circulation de 8 μ l (longueur d'onde de détection: 254 nm). L'analyse quantitative est réalisée au moyen d'un intégrateur calculateur Hewlett-Packard (Avondale, Pa., U.S.A.), type 1080.

Phase stationnaire

Nous avons utilisé une colonne Micropak CN (Varian). Cette colonne est remplie de grains de silice poreuse de 10 μ m de diamètre nominal sur lesquels sont greffés des groupements alkylnitrile.

Solvants

Le méthanol et l'acide acétique étaient de qualité RP (No. 20847 et 20104; Prolabo, Paris, France); l'hexane et le chlorure de méthylène étaient de qualité Uvasol no. 4372 et 6048; (Merck, Darmstadt, R.F.A.).

TABLEAU I
FORMULES DES IMPURETÉS ÉVENTUELLES DU BÉNORILATE

Nom	Formule
Acétoxy-2 benzoate d'acétamido-4 phényl (bénorilate)	
Anhydride acétylsalicylique	
Acide salicylique	
Acide acétylsalicylique (aspirine)	
Acide acétylsalicylsalicylique	
Hydroxy-2 benzoate d'acétamido-4 phényl (ou salophène; ester salicylique du N-acétyl p-aminophénol)	
Acétoxy-2 benzoate d'amino-4 phényl (ester acétylsalicylique du p-aminophénol)	
N-Acétyl p-aminophénol (paracétamol)	
p-Aminophénol	

Produits pharmaceutiques

Tous les produits pharmaceutiques nous ont été fournis par les laboratoires Bottu. Ils ont été mis en solution dans le chlorure de méthylène. Les volumes injectés au moyen d'une seringue et d'un injecteur Varian, type Stop-Flow, étaient compris entre 3 et 25 μ l.

RÉSULTATS

En raison de la diversité des groupements fonctionnels constituant les molécules des différents produits à séparer, nous avons choisi de mettre en œuvre la chromatographie de partage en utilisant comme phase stationnaire une silice poreuse de 10 μ m greffée alkylnitrile (colonne Micropak CN).

Bien que la quasi totalité des produits à séparer soit ionisable, nous avons écarté la chromatographie d'échange d'ions, car la présence d'eau aurait entraîné l'hydrolyse de l'anhydride acétylsalicylique alors qu'il est indispensable de pouvoir préciser la teneur de cette impureté éventuelle dans le bénomilate.

Choix de la phase mobile

Les essais d'orientation effectués nous ont amené à choisir comme phase mobile le mélange tertiaire hexane-chlorure de méthylène-méthanol auquel on ajoute 0.2% d'acide acétique afin de fixer l'acidité de la phase mobile et d'éviter les déformations des pics chromatographiques dues aux sites actifs de la silice laissés libres par la réaction de greffage.

Le méthanol permet d'une part d'éluer tous les produits fixés par la colonne, et, d'autre part, il forme des liaisons hydrogène avec les produits donneurs tels que les acides salicylique, acétylsalicylique, acétylsalicylsalicylique et avec les produits accepteurs tels que le *p*-aminophénol, ce qui confère à ce solvant une grande sélectivité.

Pour déterminer la composition de la phase mobile permettant d'obtenir une bonne sélectivité et une durée d'analyse minimale, nous avons mesuré les temps de rétention des différents solutés en fonction du pourcentage en méthanol dans le mélange.

La Fig. 1 représente les résultats obtenus. On obtient des courbes présentant

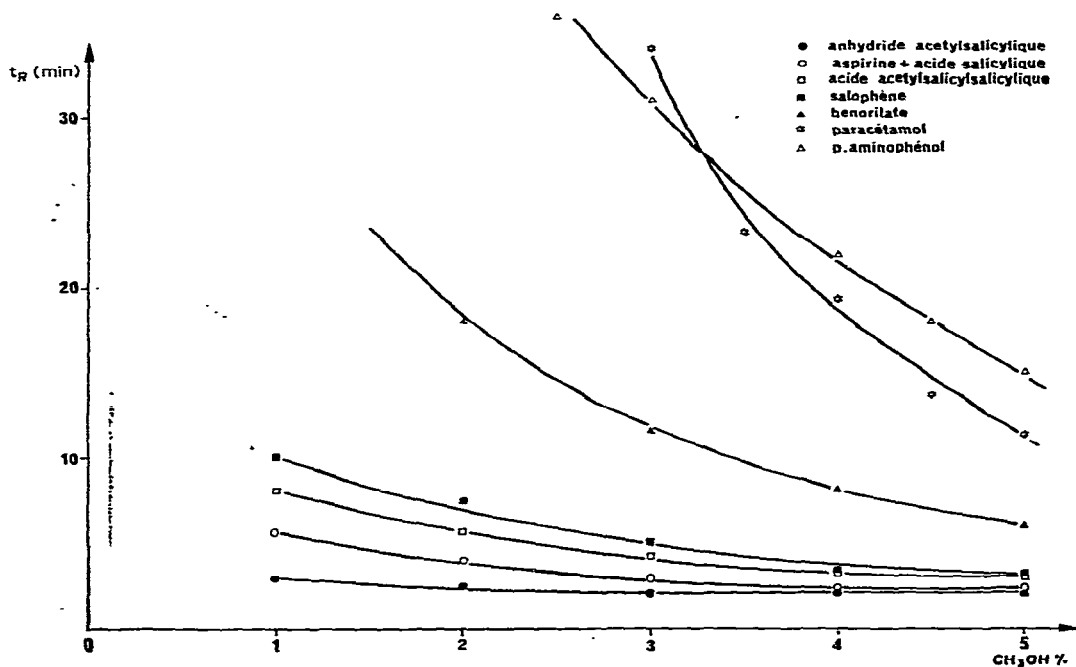


Fig. 1. Variation des temps de rétention des différentes substances chromatographiées en fonction du pourcentage de méthanol de la phase mobile. Colonne, 25 cm \times 2.1 mm I.D. Phase stationnaire, Micropak CN 10 μm (silice greffée alkyl nitrile). Phase mobile, hexane-chlorure de méthylène-méthanol-acide acétique (variant de 93.8:5:1:0.2 à 89:8:5:5:0.2, v/v). Débit, 90 ml/h; pression d'entrée, 70 bars.

une allure hyperbolique, ce qui est confirmé en portant les temps de rétention en fonction de l'inverse du pourcentage de méthanol dans le mélange (Fig. 2).

On voit qu'il ne sera pas possible de séparer l'ensemble des composés considérés par une élution isocratique en un temps raisonnable: le paracétamol, le *p*-aminophénol et le bénomilate seraient élués en des temps trop longs pour les pourcentages de méthanol qui assureraient une séparation satisfaisante de l'anhydride acétylsalicylique, de l'acide acétylsalicylique, de l'acide acétylsalicylsalicylique et du salophène.

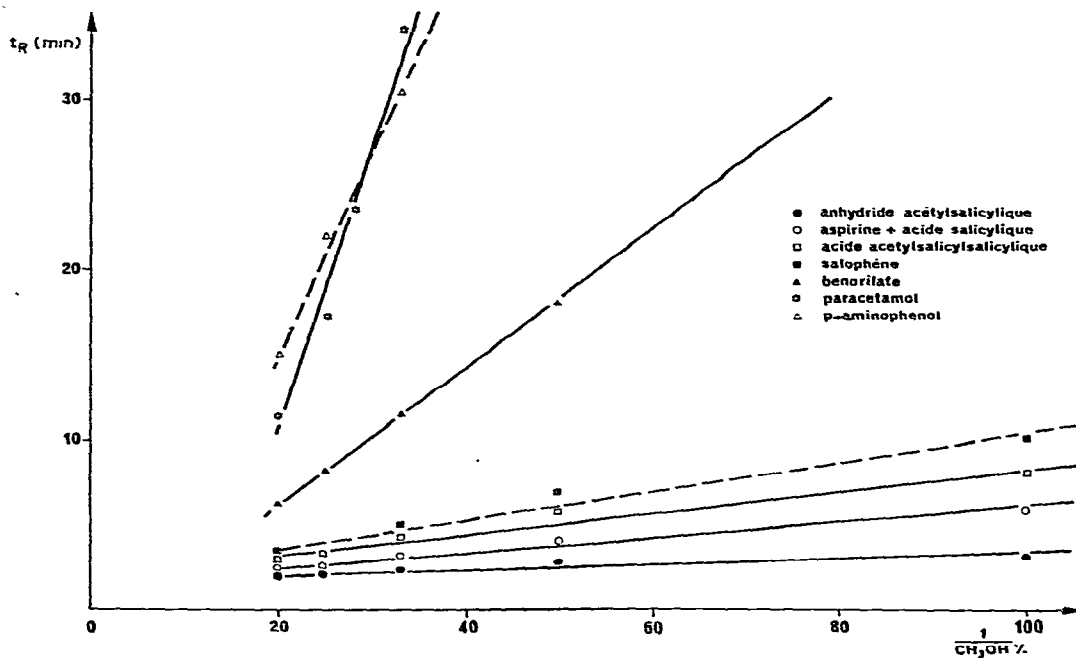


Fig. 2. Variation des temps de rétention des différentes substances chromatographiées en fonction de l'inverse du pourcentage de méthanol de la phase mobile (conditions expérimentales identiques à celles de la Fig. 1).

Nous avons donc opéré par élution graduée en utilisant deux solvants: un solvant A: hexane-chlorure de méthylène-acide acétique (94.8:5:0.2); et un solvant B: hexane-chlorure de méthylène-méthanol-acide acétique (89.8:5:5:0.2).

On effectue d'abord une élution avec un mélange de 55% de la phase A et de 45% de la phase B, soit une phase ayant la composition globale suivante: hexane-chlorure de méthylène-méthanol-acide acétique (92.5:5:2.3:0.2).

Cette phase permet de séparer avec une bonne résolution l'anhydride acétylsalicylique, l'aspirine, l'acide acétylsalicylsalicylique et le salophène. Puis on augmente rapidement le pourcentage du solvant B, donc la teneur en méthanol. Les quatre autres composés: l'acétoxy-2 benzoate d'amino-4 phényl, le bénomilate, le paracétamol, une impureté non identifiée du *p*-aminophénol et le *p*-aminophénol lui-même sont élués avec une durée totale d'analyse d'un peu plus de 30 min (Fig. 3). Remarquons toutefois que l'aspirine et l'acide salicylique sont élués au même temps de rétention et ne peuvent être séparés par cette méthode.

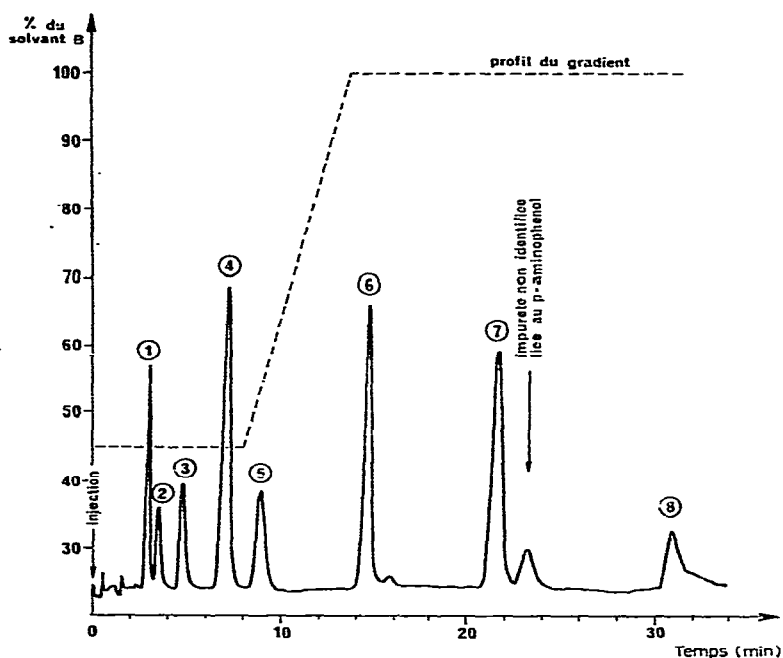


Fig. 3. Chromatogramme du bénorilate et de ses impuretés éventuelles en solution dans le chlorure de méthylène. 1 = anhydride acétylsalicylique (1 mg/ml); 2 = aspirine (1.5 mg/ml); 3 = acide acétylsalicylsalicylique (1.5 mg/ml); 4 = salophène (0.5 mg/ml); 5 = acétoxy-2 benzoate d' amino-4 phényl (1 mg/ml); 6 = bénorilate (0.5 mg/ml); 7 = paracétamol (0.5 mg/ml); 8 = *p*-aminophénol (1.5 mg/ml). Colonne, 25 cm \times 2.1 mm I.D. Phase stationnaire, Micropak CN 10 μ m. Phase mobile: solvant A, hexane-chlorure de méthylène-acide acétique (94.8:5:0.2); solvant B, hexane-chlorure de méthylène-méthanol-acide acétique (89.8:5:5:0.2). Débit, 90 ml/h; pression d'entrée, 70 bars. Quantité injectée, 3 μ l.

Analyse quantitative

Nous avons tout d'abord vérifié la reproductibilité de la réponse du détecteur et des temps de rétention pour des teneurs en quelques impuretés (celles qui sont jugées les plus nocives et qui nécessitent donc un contrôle rigoureux et qui sont par ailleurs les plus difficiles à séparer) comprises entre 1 et 3% environ. A cet effet, nous avons effectué 7 injections successives de bénorilate auquel nous avons ajouté quatre impuretés aux teneurs suivantes (% en poids): Anhydride acétylsalicylique, 1.5%; aspirine, 1.9%; acide acétylsalicylsalicylique, 2.7%; salophène, 1.7%. La teneur en bénorilate était donc de 92.2%.

Le Tableau II rassemble les résultats obtenus et la Fig. 4 représente le chromatogramme correspondant à l'injection No. 2. Les concentrations de chaque soluté ont été déterminées par normalisation interne. Au seuil de confiance de 95%, on obtient un écart type relatif de $\pm 0.54\%$ pour le produit principal et compris entre ± 6.2 et $\pm 13.6\%$ pour les principales impuretés éventuelles du bénorilate, ce qui peut être considéré comme satisfaisant.

Par ailleurs, le Tableau II montre une bonne reproductibilité des temps de rétention de chacun des solutés, ce qui est important pour l'identification des impuretés, et d'autre part démontre la stabilité du système chromatographique adopté.

TABLEAU II

ANALYSE QUANTITATIVE D'UN ÉCHANTILLON DE BÉNORILATE ADDITIONNÉ DE QUATRE IMPURETÉS

Injection	Bénorilate		Anhydride acétylsalicylique		Aspirine		Acide acétylsalicylique		Salophène	
	% Poids	t_R (min)	% Poids	t_R (min)	% Poids	t_R (min)	% Poids	t_R (min)	% Poids	t_R (min)
1	92.11	17.42	1.54	2.80	1.93	3.65	2.70	4.69	1.73	6.89
2	92.03	17.51	1.38	2.83	1.79	3.64	3.23	4.61	1.57	6.95
3	92.45	17.58	1.28	2.89	1.58	3.72	3.06	4.51	1.66	7.03
4	92.18	17.63	1.45	2.89	1.58	3.60	3.37	4.68	1.63	6.96
5	93.4	17.32	1.02	2.78	1.39	3.58	2.81	4.52	1.40	7.15
6	92.4	17.31	1.46	2.76	1.42	3.56	3.20	4.49	1.55	6.96
7	92.23	17.34	1.14	2.76	1.44	3.58	2.86	4.51	1.63	6.94
Moyenne	92.4	17.44	1.32	2.81	1.59	3.61	3.03	4.57	1.6	6.98
Ecart-type	0.43	0.12	0.18	0.05	0.19	0.05	0.23	0.08	0.1	0.08
Ecart-type relatif %	0.5	0.7	13.6	1.8	11.9	1.4	7.6	1.7	6.2	1.1

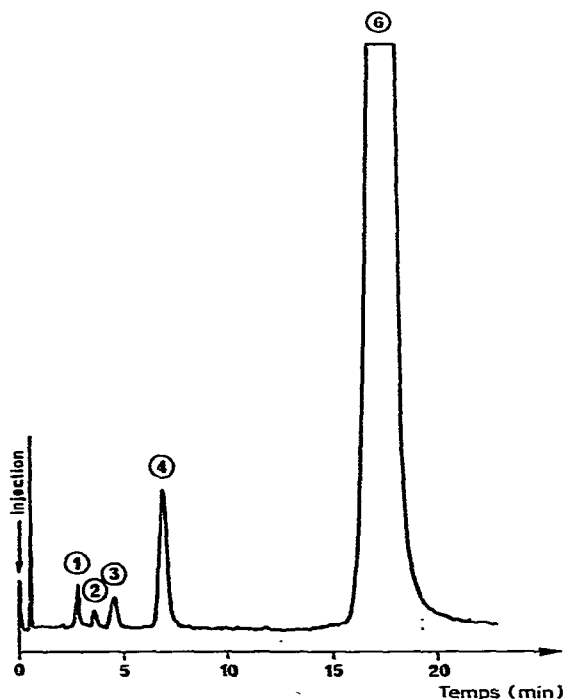


Fig. 4. Chromatogramme du bénorilate (pic No. 6) et de quatre de ses impuretés (cf., Fig. 3 et Tableau II, injection No. 2). Colonne, 25 cm \times 2.1 mm I.D. Phase stationnaire, Micropak CN 10 μ m. Phase mobile, hexane-chlorure de méthylène-méthanol-acide acétique (92.8:5:2:0.2). Débit, 90 ml/h; pression d'entrée, 70 bars. Quantité injectée, 2.5 μ l d'une solution de bénorilate à 10 mg/ml dans le chlorure de méthylène.

Limites de detection

Certaines des impuretés éventuelles du bénorilate pouvant conduire à des réactions d'allergie, il était intéressant de préciser les quantités minimales détectables pour la méthode de détection utilisée (absorptiométrie dans l'ultraviolet en utilisant un détecteur à longueur d'onde fixe 254 nm, en raison de la présence d'au moins un noyau benzénique dans tous les composés étudiés).

Nous avons considéré que la limite de détection était atteinte pour un signal égal à deux fois le bruit de fond du détecteur. Le Tableau III rassemble les résultats obtenus. La quantité minimale détectable est comprise entre 2 nmoles pour le *p*-amino

TABLEAU III
QUANTITÉS MINIMALES DÉTECTABLES

<i>Composé</i>	<i>Quantité minimale détectable (mole)</i>
Anhydride acétylsalicylique	$1.5 \cdot 10^{-10}$
Acide salicylique	$7 \cdot 10^{-10}$
Aspirine	$5.5 \cdot 10^{-10}$
Acide acétylsalicylsalicylique	$6.5 \cdot 10^{-10}$
Salophène	$4 \cdot 10^{-11}$
Acétoxy-2 benzoate d'amino-4 phényl	$7 \cdot 10^{-10}$
Paracétamol	$6 \cdot 10^{-11}$
<i>p</i> -Aminophénol	$2 \cdot 10^{-9}$

phénol et 40 pmoles pour le salophène. Ces quantités minimales détectables déjà très faibles pourraient encore être diminuées si cela s'avérait nécessaire, en utilisant un spectrophotomètre permettant de choisir pour chaque produit la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption. A titre d'exemple, la Fig. 5 représente un chromatogramme d'un échantillon de bénorilate auquel ont été rajoutés 0.4% d'anhydride acétylsalicylique, 0.20% de salophène et 0.25% de paracétamol (injection de 25 μ l d'une solution de bénorilate à 20 mg/ml).

CONCLUSION

La chromatographie en phase liquide à haute performance permet d'identifier et de doser les impuretés qui pourraient être éventuellement rencontrées dans un nouvel antalgique, le bénorilate. On opère par élution graduée en chromatographie de partage sur phase alkylnitrile greffée sur une silice poreuse de 10 μ m (Micropak CN), la phase éluante étant constituée d'un mélange hexane-chlorure de méthylène-méthanol-acide acétique. La détection est effectuée par absorptiométrie dans l'ultraviolet (254 nm), ce qui confère à la méthode une grande sensibilité.

RÉSUMÉ

La chromatographie en phase liquide à haute performance permet d'identifier et de doser les impuretés qui pourraient être éventuellement rencontrées dans un nouvel antalgique, le bénorilate (ou Salipran), ester de l'aspirine avec le *p*-acétylamino-

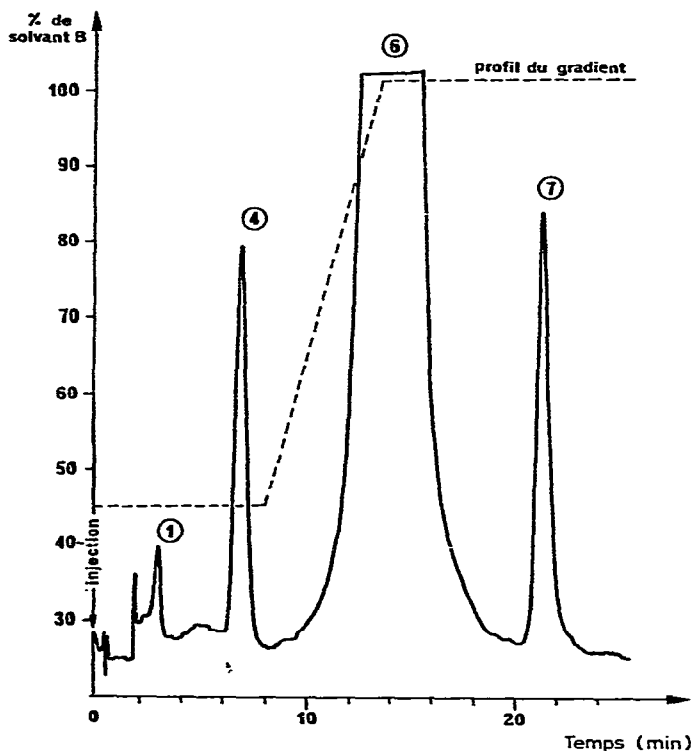


Fig. 5. Chromatogramme d'un échantillon de bénomilate (6) auquel ont été ajoutés 0.20% de salophène (4), 0.25% de paracétamol (7) et 0.4% d'anhydride acétylsalicylique (1). Conditions chromatographiques identiques à celles de la Fig. 3. Quantité injectée, 25 μ l d'une solution de bénomilate à 20 mg/ml dans le chlorure de méthylène.

phénol (ou paracétamol). On opère par élution graduée en chromatographie de partage sur silice poreuse de 10 μ m greffée alkylnitrile (Mikropak CN) la phase éluante étant constituée d'un mélange hexane-chlorure de méthylène-méthanol-acide acétique à teneur variable en méthanol. On sépare ainsi du bénomilate les impuretés éventuelles suivantes: anhydride acétylsalicylique, aspirine, acide acétylsalicylsalicylique, salophène, acétoxy 2-benzoate d' amino-4 phényl, paracétamol et *p*-aminophénol. La reproductibilité de l'analyse quantitative du bénomilate a été étudiée: l'écart-type relatif est de 0.54% pour le bénomilate (7 injections). La détection, effectuée par absorptiométrie dans l'ultraviolet à 254 nm confère à la méthode une très bonne sensibilité: les quantités minimales détectables sont comprises entre 2 nmoles pour le *p*-aminophénol et 40 pmoles pour le salophène.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 A. L. De Weck, *Int. Arch. Allergy*, 41 (1971) 393.
- 2 H. Bundgaard, *J. Pharm. Pharmacol.*, 26 (1974) 18.
- 3 P. Rohrbach, M. J. Laroche et G. Teche, *Thérapie*, 32 (1977) 89.