

CHROM. 13,209

## Note

### Détermination de onze dérivés des benzodiazépines en solution acétonique par chromatographie en phase gazeuse utilisant un détecteur spécifique azote

#### Comparaison de cinq phases stationnaires

SALEH BARAZI\* et MICHELLE BONINI

*Laboratoire de Toxicologie, UER des Sciences Pharmaceutiques, Université de Bordeaux II, 91 Rue Leyteire, 33076 Bordeaux Cedex (France)*

(Reçu le 26 février 1980; manuscrit modifié reçu le 21 juillet 1980)

Les molécules commercialisées de la famille des benzodiazépines ne cessent de croître et leur utilisation est de plus en plus répandue.

Lorsqu'elles sont seules en cause l'intoxication reste relativement bénigne<sup>1</sup>, cependant leur détermination dans les milieux biologiques est de plus en plus demandée car elles sont responsables de nombreux cas de surdosages médicamenteux et de tentative de suicide<sup>2,3</sup>.

Nous avons utilisé les propriétés du détecteur spécifique azote-phosphore en chromatographie en phase gazeuse pour doser onze de ces molécules dans le sang et l'urine: chlordiazépoxyde, clonazépam, diazépam, N-déméthyl-diazépam, lorazépam, médazépam, nitrazépam, oxazépam, tétrazépam (benzodiazépines 1,4), clobazam (benzodiazépine 1,5) et tofisopam (benzodiazépine 1,2).

Dans un premier temps, en solution acétonique pure et sur cinq phases stationnaires (OV-101, OV-17, OV-25, OV-210, OV-225) nous avons déterminé les paramètres chromatographiques les mieux adaptés à leur séparation et à leur dosage.

Les résultats obtenus nous ont permis, dans un deuxième temps, de sélectionner les meilleures conditions opératoires applicables aux milieux biologiques, que nous soyons en présence d'une substance ou d'un mélange de plusieurs produits.

#### PARAMÈTRES EXPÉRIMENTAUX

##### *Appareillage*

Chromatographe Hewlett-Packard type 5710-A équipé d'un détecteur thermoionique spécifique azote-phosphore modèle 18789-A.

Enregistreur W + W recorder 1100.

##### *Conditions chromatographiques*

Elles sont résumées dans le Tableau I.

TABLEAU I  
PARAMÈTRES CHROMATOGRAPHIQUES DES COLONNES UTILISÉES

	<i>Condition chromatographique No.</i>				
	1	2	3	4	5
Phase stationnaire	OV-101	OV-17	OV-25	OV-210	OV-225
Contenu de la colonne (colonne en verre 183 cm x 2 mm)	2% OV-101 sur Chromosorb W, HP AW DMCS, 100-120 mesh	2% OV-17 sur Chro- mosorb W, HP AW DMCS, 100-120 mesh	2% OV-25 sur Gas- chrom Q, 100-120 mesh	2% OV-210 sur Gas- chrom Q, 100-120 mesh	2% OV-225 sur Gas- chrom Q, 100-120 mesh
Gaz vecteur azote U (ml/min)	20	30	22	23	22
Gaz détecteurs			Air médical: 60 ml/min Hydrogène U: 6 ml/min		
Température de l'in- jecteur (°C)	300	250	250	250	250
Température du détec- teur (°C)	300	300	350	300	350
Programmation du four:					
Température initiale (°C)	160	220	200	180	227
Temps initial (min)	0	16	0	0	16
Programmation (°C/ min)	4	32	4	4	8
Température finale (°C)	270	260	280	260	280
Temps final (min)	0	16	4	4	8

TABLEAU II  
TEMPS DE RÉTENTION ABSOLUS (TRA) ET COEFFICIENTS DE PROPORTIONNALITÉ RELATIFS (CPR) DE CHAQUE PRODUIT ET  
POUR CHAQUE PHASE STATIONNAIRE

Produits	OV-101		OV-17		OV-25		OV-210		OV-225	
	TRA	CPR	TRA	CPR	TRA	CPR	TRA	CPR	TRA	CPR
Chlordiazépoxide	19 min 27 sec	63	23 min 12 sec	45	20 min 4 sec	64	13 min 54 sec	49	24 min 7 sec	32
Clobazam	14 min 26 sec	43	15 min 2 sec	30	13 min 14 sec	66	13 min 48 sec	100	19 min 12 sec	50
Clonazépam	20 min 0 sec	10	22 min 50 sec	18	19 min 15 sec	29	18 min 38 sec	21	28 min 34 sec	13
Diazépam	12 min 34 sec	83	9 min 24 sec	50	10 min 30 sec	83	8 min 50 sec	94	8 min 2 sec	46
Lorazépam	12 min 10 sec	24	8 min 21 sec	19	9 min 50 sec	51	7 min 48 sec	35	6 min 37 sec	28
Méflazépam	9 min 13 sec	100	4 min 16 sec	100	6 min 46 sec	100	3 min 26 sec	85	2 min 25 sec	100
N-Déméthylidiazépam	14 min 30 sec	22	14 min 10 sec	24	12 min 28 sec	55	10 min 28 sec	37	16 min 40 sec	22
Nitrazépam	18 min 50 sec	13	21 min 50 sec	30	17 min 51 sec	41	17 min 52 sec	26	26 min 32 sec	22
Oxazépam	10 min 54 sec	27	6 min 20 sec	20	8 min 15 sec	50	6 min 40 sec	40	4 min 56 sec	33
Tétrazépam	12 min 30 sec	79	8 min 15 sec	53	9 min 48 sec	75	7 min 38 sec	97	6 min 4 sec	51
Tofisopam	23 min 6 sec	37	28 min 45 sec	15	22 min 37 sec	8	17 min 30 sec	39	25 min 31 sec	12

### Solutions étalons

Préparer un mélange des onze molécules à la concentration de 1 mg de chaque substance dans 1 ml d'acétone. Les solutions d'essai sont obtenues par dilution acétonique de la solution mère.

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le Tableau II mentionne les temps de rétention absolus (TRA), ainsi que les coefficients de proportionnalité relatifs (CPR) pour chaque produit et pour chaque phase stationnaire.

La sensibilité de la détection permet de retrouver des quantités très faibles de ces produits allant de quelques picogrammes à un nanogramme selon la benzodiazépine considérée.

La sélectivité et la reproductibilité de l'analyse de ces molécules sous leur forme intacte, sont excellentes.

Il est donc possible d'envisager leur détermination dans les milieux biologiques par la méthode directe, sans hydrolyse ni dérivatisation d'où un gain de temps appréciable et une plus grande spécificité et sélectivité<sup>4-6</sup>. De nombreux auteurs avaient d'ailleurs déjà signalé les avantages de la méthode directe<sup>6-9</sup> en soulevant une principale objection, son manque de sensibilité. L'utilisation du détecteur spécifique azote-phosphore et les conditions chromatographiques citées permettent de palier à cet inconvénient.

Seule la phase OV-225 est capable de séparer correctement les onze molécules puisqu'avec les autres phases nous trouvons les interférences suivantes: tétrazépam et lorazépam sur OV-17, OV-25 et OV-210; tétrazépam et diazépam sur OV-101; clobazam et chlordiazépoxyde sur OV-210; clobazam et N-déméthyl diazépam sur OV-101.

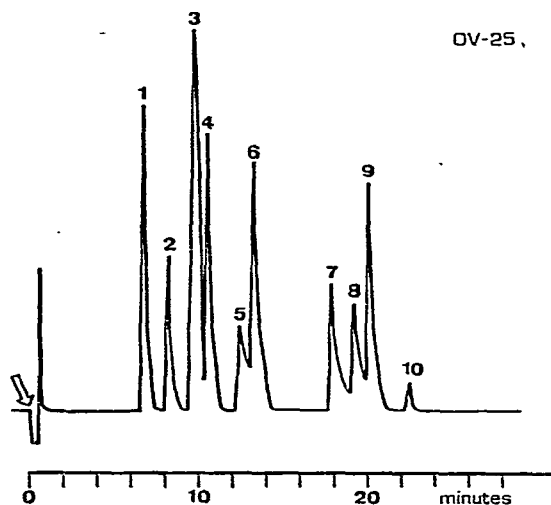


Fig. 1. Chromatogramme obtenu sur OV-25 à partir d'une solution acétonique contenant onze benzodiazépines à concentration égale: 1 = médazépam; 2 = oxazépam; 3 = tétrazépam et lorazépam; 4 = diazépam; 5 = N-déméthyl diazépam; 6 = clobazam; 7 = nitrazépam; 8 = clonazépam; 9 = chlordiazépoxyde; 10 = tofisopam.

Cependant sa stabilité est médiocre surtout à des températures supérieures à 250°C. De plus les variations thermiques provoquant une dérive importante de la ligne de base, son utilisation est difficilement compatible lors des analyses nécessitant une programmation de température.

Clonazépam, nitrazépam et N-déméthyl diazépam présentent le phénomène de "tailing" sur toutes les phases bien qu'il soit beaucoup moins marqué sur OV-225 en ce qui concerne les deux premières substances.

En fonction des résultats obtenus, il nous semble que la phase stationnaire OV-25 associée au détecteur thermoionique spécifique azote-phosphore présente toutes les qualités de stabilité, de reproductibilité, de sensibilité, de pouvoir séparateur (Fig. 1) permettant l'application aux milieux biologiques. Toutefois, dans certains cas, il pourra être judicieux de choisir une autre phase et ses conditions chromatographiques.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 A. Viala, J. P. Cano et A. Angeletti-Philippe, *Eur. J. Toxicol.*, 2 (1971) 109.
- 2 T. A. Rejent et K. C. Wahl, *Clin. Chem.*, 22 (1976) 889.
- 3 M. Daudon, *Le Pharmacien Biologiste*, 11 (1977) 389.
- 4 J. A. F. de Silva et I. Bekersky, *J. Chromatogr.*, 99 (1974) 447.
- 5 D. M. Hailey, *J. Chromatogr.*, 98 (1974) 527.
- 6 J. P. Cano, F. Gouezo, T. Lindoulsi et A. Viala, *Toxicol. Eur. Res.*, 2 (1979) 25.
- 7 A. R. Viala, J. P. Cano, A. G. Durand, T. Erlenmaier et R. M. Garreau, *Anal. Chem.*, 49 (1977) 2354.
- 8 L. Kangas, *J. Chromatogr.*, 136 (1977) 259.
- 9 A. G. de Boer, J. Röst-Kaiser, H. Bracht et D. D. Breimer, *J. Chromatogr.*, 145 (1978) 105.