

CHROM. 16,661

Note

Dosage de l'heptaminol dans des préparations pharmaceutiques par chromatographie liquide après dérivation par le 4-N,N-diméthylaminoazobenzène-4-isothiocyanate

MICHEL BAUER*, LILIANE MAILHE et LAN NGUYEN

Service de Chimie Analytique, Département de Recherches et Développement Pharmaceutique, Centre de Recherches Pierre Fabre, 17, Avenue Jean Moulin, 81106 Castres Cédex (France)

(Reçu le 7 février 1984)

Le chlorhydrate d'heptaminol (6-amino-2-méthyl-2 heptanol) a été reconnu dès 1951 par A. Loubatière¹ comme présentant une action cardiotonique intéressante sur le plan thérapeutique et de ce fait figure dans la composition de certaines spécialités pharmaceutiques. Sur le plan analytique cette molécule a fait l'objet d'études par chromatographie sur couche mince², par chromatographie gazeuse³ et par chromatographie liquide haute performance (CLHP). Dans ce dernier cas, la molécule ne possédant pas de spectre d'absorption dans l'ultra-violet, une dérivation reposant sur la réaction de l'orthophtalaldéhyde avec une amine primaire en présence de 2-mercaptoéthanol a été mise à profit et appliquée à des préparations pharmaceutiques aussi bien qu'à des études de pharmacocinétique⁵. Cette méthode nécessitant l'utilisation d'un mercaptan, surtout dans le cas d'un usage en routine, est très désagréable sur le plan organoleptique. Afin de remédier à cet inconvénient nous avons développé une méthode de dérivation du groupement amine primaire de l'heptaminol par le réactif coloré 4-N,N diméthylaminoazobenzène-4'-isothiocyanate (DABITC) et utilisé dès 1976⁶ par Chang *et al.* pour la détermination de séquence des protéines et peptides⁷. Cette note décrit le mode de dérivation ainsi que la méthode CLHP sur phase greffée C₁₈ mise au point pour le dosage de l'heptaminol dans deux spécialités pharmaceutiques, une forme liquide (ampoule) et une forme solide (comprimé).

PARTIE EXPERIMENTALE

Appareillage

La méthode a été étudiée sur un appareil Waters 6000 A (Waters Assoc., Paris, France) couplé avec un détecteur à longueur d'onde variable modèle 450 (fixée dans ce cas à 420 nm), un injecteur automatique Wisp 710 B (Waters Assoc., Paris, France) et un enregistreur Omniscrite (Houston Instrument, Austin, TX, U.S.A.). La colonne en acier inoxydable, longueur 30 cm, diamètre interne 3.9 mm, est remplie par du LiChrosorb RP-18 10 µm (Merck n° 9334, Merck, Darmstadt, R.F.A.) suivant la méthode par voie humide⁸.

Réactifs

Acétonitrile pour chromatographie (Merck n° 30); DABITC qualité Purum (Fluka n° 39065); chlorhydrate d'heptaminol (Finorga, Courbevoie, France) de pureté supérieure à 99% mesurée par anhydrotitrimétrie à l'acide perchlorique; chloroforme (qualité Purex, SDS, France); lessive de soude (Prolabo n° 28226.293). Deux préparations pharmaceutiques ont été testées, une forme ampoule renfermant une solution à 3.6 g de chlorhydrate d'heptaminol pour 100 ml et une forme comprimé de 0.180 g de chlorhydrate d'heptaminol par unité.

Conditions chromatographiques

L'éluant a la composition suivante: eau-acétonitrile (60:40); il est utilisé après filtration sur membrane Schleicher et Schüll n° 6. Pour l'ensemble des manipulations un débit de 2 ml/min, une longueur d'onde de détection de 420 nm et une sensibilité de 0.04 unité d'absorbance pleine échelle ont été utilisés.

Réaction de dérivation — mode opératoire

Préparer les solutions suivantes:

Solution de chlorhydrate d'heptaminol témoin à 0.1 g pour 100 ml d'eau, notée HEP-T.

Solution de DABITC à 0.35 g pour 100 ml de chloroforme, notée DABITC.

Solution forme solide (comprimé): effectuer une prise d'essai exactement pesée (voisine de 0.150 g) de poudre obtenue par broyage de cinq comprimés. Ajouter 20 ml d'eau. Extraire au bain-marie bouillant en agitant périodiquement pendant 10 min. Transvaser quantitativement dans une fiole jaugée et compléter avec de l'eau en quantité suffisante pour 100 ml. Filtrer sur filtre sans cendre. On obtient la solution essai comprimés notée SEC.

Solution forme liquide (ampoule): diluer la solution au 3:100 dans l'eau. On obtient la solution à analyser notée SEA.

Dans cinq béchers de 50 ml notés T1, T2, T3, EC et EA introduire suivant le schéma ci-dessous les volumes (exprimés en ml) des différentes solutions décrites:

	T1	T2	T3	EA	EC
HEP-T	1	2	3	0	0
SEA	0	0	0	2	0
SEC	0	0	0	0	2
Eau	←—————→		10	—————→	
Lessive de soude	←—————→		1	—————→	
DABITC	←—————→		3	—————→	

Placer les béchers dans un bain thermostaté à 45°C pendant une heure (le milieu est le siège de mouvements de convection assurant le développement homogène de la réaction). Refroidir à température ambiante et extraire par 3 fois 20 ml de chloroforme. Réunir les extractions et sécher l'ensemble sur sulfate de sodium anhydre. Evaporer à sec et reprendre par du chloroforme en quantité suffisante pour 10 ml. Effectuer une dilution au 1:10 de chaque solution dans l'acétonitrile. Les solutions sont stables 24 h à température ambiante mais à l'abri de la lumière.

Dans tous les cas le volume injecté a été de 10 μ l.

La détermination quantitative a été effectuée par la mesure des hauteurs de

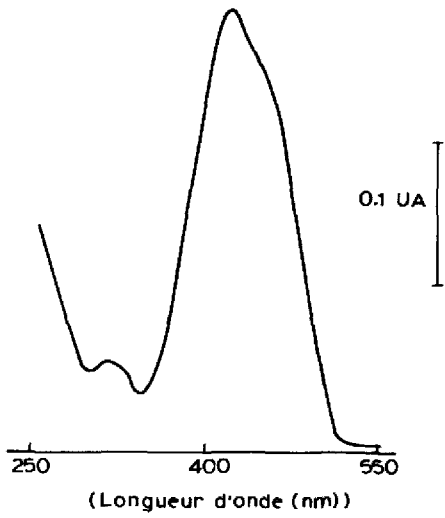


Fig. 1. Spectre d'absorption UV-visible de l'heptaminol dérivé ($c = 0.0004$ g pour 100 ml d'alcool éthylique).

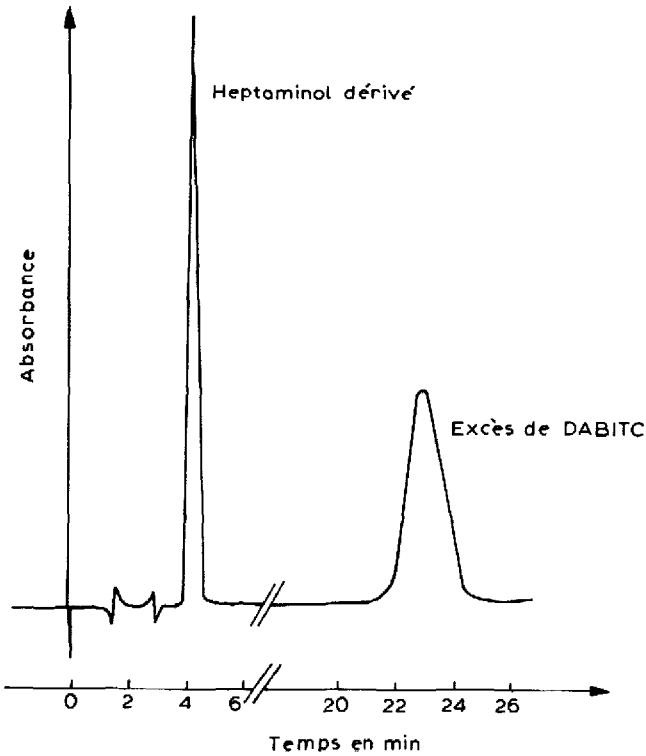


Fig. 2. Chromatogramme de la solution témoin heptaminol dérivé.

TABLEAU I

ÉTUDE DU RECOUVREMENT DE L'HEPTAMINOL PAR MESURE DE LA QUANTITÉ RETROUVÉE APRES SURCHARGE

$$\text{Recouvrement (\%)} = \frac{Q_r \times 100}{Q_i + S}$$

	Quantité initiale injectée, Q_i (ng)	Quantité retrouvée, Q_r (ng), après surcharge S en ng		
		$S = 29.9$	$S = 60$	$S = 90.3$
Forme ampoule	108	139.6	165.5	203
Recouvrement (%)		101.2	98.5	102.4
		$S = 31.7$	$S = 48.3$	$S = 80$
Forme comprimés	103.3	137	151.6	181.7
Recouvrement (%)		101.5	100	99.1

pics. Le calcul des droites d'étalonnage a été réalisé à l'aide d'une calculatrice HP 41 C (Hewlett Packard, Corbeil Essones, France) suivant la méthode des moindres carrés⁹.

RESULTATS ET DISCUSSION

La Fig. 1 représente le spectre UV du composé dérivé obtenu par chromatographie sur plaque préparative (support silice F 254 2 mm d'épaisseur, Merck n° 5717, éluant: chloroform-acide acétique glacial (100:5). Le $E_{1\text{cm}}^{1\%}$, obtenu à 420 nm est de 725. La Fig. 2 représente le chromatogramme obtenu pour la solution témoin, les chromatogrammes obtenus pour les deux solutions essais étant en tout point identiques. Pour l'heptaminol dérivé nous avons obtenu une réponse linéaire en hauteur de pic (h en cm) relativement aux quantités injectées (q en ng) comprises entre 100 et 300 ng, $h = 5.101 q - 0.169$, coefficient de corrélation = 0.9997.

La reproductibilité de la méthode chromatographique proprement dite (injection-élution-détection-mesure des hauteurs) a été étudiée en injectant 6 fois une solution témoin. Le coefficient de variation trouvé a été de 0.25%. Le résultat obtenu montre la très bonne reproductibilité du système confirmant qu'avec les systèmes d'injection actuels il n'est pas obligatoire comme l'a montré P. Haefelfinger¹⁰ d'utiliser un étalon interne. Pour étudier la reproductibilité globale de la méthode analytique nous avons, à partir de prises d'essais homogénéisées, effectué cinq essais indépendants pour la forme liquide ampoule et la forme solide comprimés. Les coefficients de variation trouvés ont été respectivement de 1.6% et 1.7%. Nous avons par ailleurs procédé pour chaque type de préparation à des surcharges connues en chlorhydrate d'heptaminol et mesuré le taux de recouvrement (Tableau I) qui dans tous les cas est compris entre 98.5 et 102.5%.

CONCLUSION

La méthode décrite dans cette note peut donc être utilisée pour des contrôles

de spécialités pharmaceutiques pour lesquelles les contraintes administratives actuelles peuvent exiger des limites de variation de la teneur en principe actif de $\pm 5\%$ par rapport à la valeur déclarée.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Monsieur J. P. Roy (INSERM, hôpital St Louis), le Docteur Basquin, Directeur du département Recherches et développement Pharmaceutique, Monsieur Leverd et l'ensemble des personnes du département qui nous ont aidés dans la réalisation de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 A. Loubatières, *Arch. Int. Pharmacodyn. Thér.*, 85 (1951) 333.
- 2 W. Messerschmidt, *Arzneim. Forsch.*, 5 (1970) 726.
- 3 J. Rabiant, M. Sergant et A. F. Gaudin, *Ann. Pharm. Fr.*, 29 (1971) 331.
- 4 A. Nicolas, P. Leroy, A. Moreau et M. Mirjolet, *J. Chromatogr.*, 244 (1982) 148.
- 5 R. R. Brodic, L. F. Chasseaud, L. Rooney, A. Darragh et R. F. Lambe, *J. Chromatogr.*, 274 (1983) 179.
- 6 J. Y. Chang et E. H. Creaser, *J. Chromatogr.*, 116 (1976) 215.
- 7 J. Y. Chang et E. H. Creaser, *J. Chromatogr.*, 132 (1977) 303.
- 8 R. Rosset, M. Caudé et A. Jardy, *Manuel Pratique de Chromatographie en Phase Liquide*, Masson, Paris, 1982, 2ème ed., p. 101.
- 9 H. G. Mendelbaum, F. Madaule et M. Desgranges, *Bull. Soc. Chim.*, 5 (1973) 1619.
- 10 P. Haefelfinger, *J. Chromatogr.*, 218 (1981) 73.