

CHROMBIO. 4745

Note

Dosage du nitrazépam inchangé dans le plasma par chromatographie en phase gazeuse

YVES MARLIAC* et SALEH BARAZI

Laboratoire de Toxicologie, Faculté de Pharmacie, Université de Bordeaux II, Bordeaux (France)

(Reçu le 19 octobre 1988; manuscrit modifié reçu le 9 février 1989)

Les benzodiazépines comptent parmi les agents thérapeutiques les plus utilisés dans le monde. Le nitrazépam est une des plus ancienne molécule de cette famille médicamenteuse. Sa forme inchangée induit les effets hypnotiques recherchés [1] alors que ses deux principaux métabolites, le 7-aminonitrazépam et le 7-acétamidonitrazépam, sont réputés inactifs [2,3].

Au cours de traitements prolongés les taux plasmatiques subissent de grandes variations interindividuelles [4] et doivent être contrôlés régulièrement. Il est nécessaire alors de disposer d'une méthode simple et performante pour la détermination du nitrazépam inchangé dans le plasma.

Cette note se propose de décrire une méthode basée sur l'utilisation de la chromatographie gaz-liquide et du détecteur spécifique azote-phosphore. La technique proposée a été appliquée à quelques cas cliniques intéressant les domaines de la pharmacologie et de la toxicologie.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Appareillage et paramètres chromatographiques

Chromatographe gaz-liquide: Hewlett-Packard Modèle 5710-A, équipé d'un détecteur double azote-phosphore, ionisation de flamme Modèle 18789-A fonctionnant en mode détecteur azote-phosphore. Intégrateur: Modèle 3390 A (Hewlett-Packard, Toulouse, France). Colonne en verre: 183 cm × 2 mm avec

OV-25 à 2% sur HP Chromosorb W AW DMCS, 100–120 mesh (Hewlett-Packard). Gaz vecteur: azote U (22 ml/min); gaz détecteurs: air médical (60 ml/min), hydrogène (6 ml/min).

L'injecteur est chauffé à 250°C et le détecteur à 350°C; le four est utilisé en programmation de température de 200°C à 260°C avec un taux de progression de 4°C/min et un arrêt de 4 min à la température finale (260°C).

Les réactifs

Le benzène et l'acétone sont des produits R.P. Normapur pour analyses (Prolabo, Paris, France). Le nitrazépam a été obtenu de Roche (Neuilly-sur-Seine, France) et le clobazam de Diamant (Paris, France). Le clobazam est utilisé en tant que benzodiazépine de référence. La solution tampon à pH 9 a été préparée à partir de Titrisol-Tampon référence 9889 (E. Merck, Darmstadt, R.F.A.).

Des solutions standards de nitrazépam et clobazam ont été préparées dans de l'acétone (1 mg/ml), placées dans des flacons de verre coloré et stockées à une température de -20°C.

Les solutions filles nécessaires aux besoins de l'établissement des courbes de calibration ont été préparées à partir des solutions mères précédentes par dilutions acétoniques adéquates.

Procédé général d'extraction

Dans un tube à fond rond de 20 ml sont déposés successivement 0.5 ml de plasma du patient et 2 ml de la solution tampon à pH 9. Le mélange est assuré par une agitation de 10 s avec l'agitateur à vibration 'Atex'.

Le benzène (8 ml) est ensuite versé dans le tube et l'extraction du nitrazépam est assurée par une période d'agitation de trois fois 30 s. La séparation des phases est réalisée par une double centrifugation de 5 min à 1500 g.

Le surnageant (5 ml) est récupéré et placé dans un tube de verre à fond conique auquel on ajoute 2 ml de la solution acétonique de la benzodiazépine de référence (le clobazam). Une agitation de 5 s précède l'étape d'évaporation qui s'effectue au bain marie à 35°C sous flux d'azote.

Après avoir ramené le tube à la température ambiante, le résidu est repris par 50 µl du solvant d'injection, le benzène. Une agitation de 10 s permet d'optimiser la redissolution des produits. Quelques microlitres (5 µl) sont injectés dans le chromatographe.

Courbes de calibration

Les courbes de calibration ont été obtenues grâce à l'analyse de parties aliquotes de plasma (au pH 9) enrichies de quantités croissantes de nitrazépam dans trois gammes de concentration (20–100, 200–1000 et 2000–10 000 ng/ml).

Le traitement statistique des résultats nous a permis d'établir, pour chacune

TABLEAU I

EVALUATION DE LA LINÉARITÉ

Gamme (ng/ml)	r	r^2	Équation
20-100	0,998	0,996	$y = -35,48 + 6,75x$
200-1000	0,998	0,997	$y = -32,67 + 0,62x$
2000-10 000	0,9973	0,993	$y = -36,55 + 0,07x$

des trois gammes de concentration, l'existence d'une régression linéaire (Tableau I).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Evaluation de la méthode

Nous avons choisi de déterminer le nitrazépam sous sa forme inchangée. La méthode proposée utilise le détecteur spécifique azote-phosphore, il permet d'obtenir une bonne sélectivité et une grande sensibilité des produits détectés. Lors de notre étude nous n'avons pas rencontré avec ce détecteur de cas de saturation ou de non linéarité.

Les chromatogrammes types obtenus avec l'injection d'une quantité connue de nitrazépam et de la benzodiazépine de référence (Fig. 1) et l'analyse d'un échantillon de plasma témoin (Fig. 2) montrent que les interférences des produits endogènes ne sont pas à craindre.

Le coefficient de corrélation et de détermination ainsi que les équations des droites de régression du nitrazépam pour chacune des trois gammes exploitées sont répertoriés dans le Tableau I.

L'examen des résultats permet de conclure que la méthode proposée est relativement précise. La valeur de l'écart type (σ) reflète cette bonne précision: $\sigma = 7,44\%$.

La reproductibilité est exprimée par le coefficient de variation (C.V.). Ce facteur de calcul statistique couvre les variations introduites par la répétition des analyses pour chaque point des droites de régression ($n = 54$) et leur étalement dans le temps (496 jours). La reproductibilité de la méthode est appréciable: C.V. = 7,65%.

Le taux de récupération moyen, au pH étudié, est de 97,25%.

Les temps de rétention respectifs du nitrazépam et du clobazam sont, dans les conditions chromatographiques retenues, de 17,51 et 13,23 min. Il faut en moyenne 1,5 h pour obtenir un résultat qualitatif et quantitatif. Ce délai est compatible avec les objectifs analytiques d'ordre pharmacologique et même toxicologique.

L'association de la chromatographie gaz-liquide et du détecteur thermo-

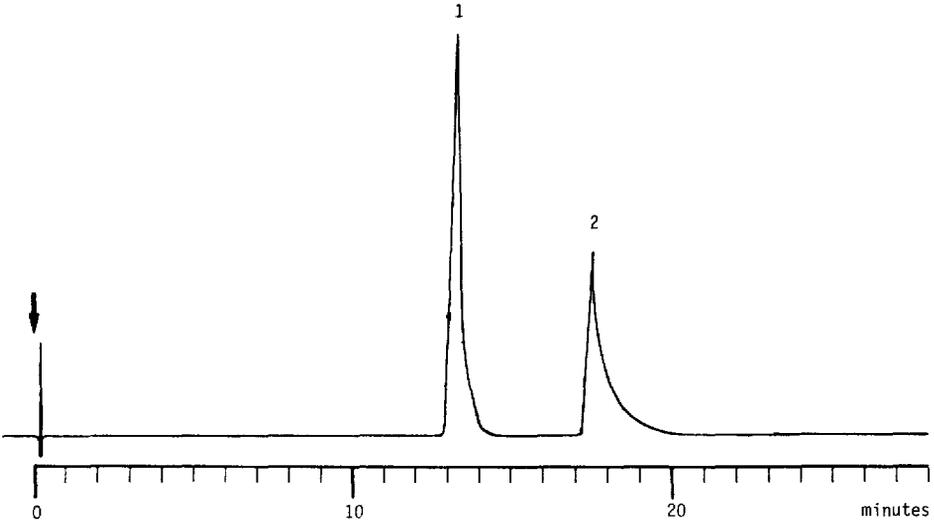


Fig. 1. Chromatogramme obtenu sur une colonne à 2% OV-25 pour une solution contenant les deux benzodiazépines à concentration égale. Pics: 1 = clobazam; 2 = nitrazépam.

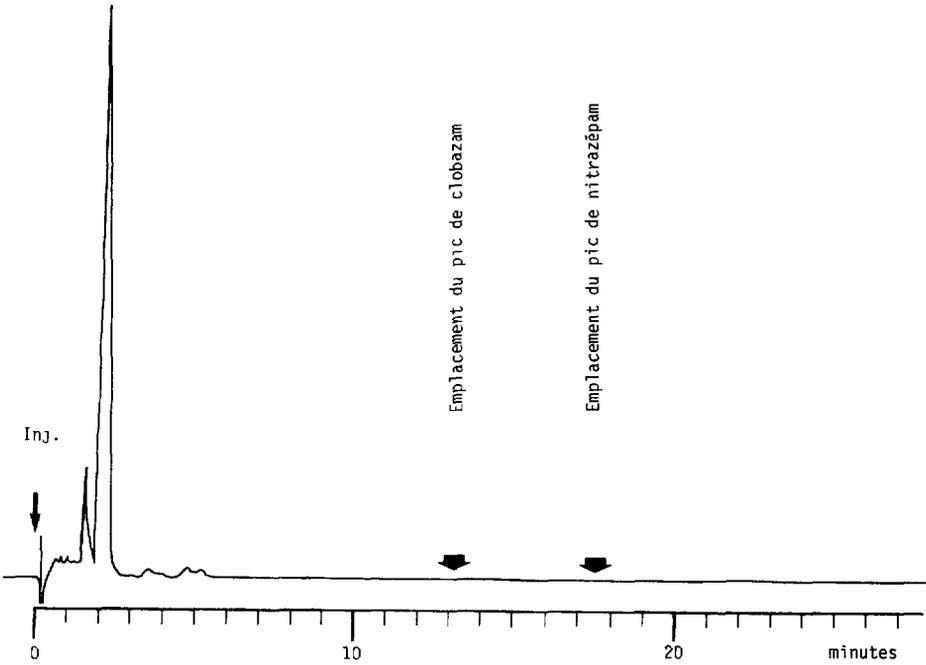


Fig. 2. Chromatogramme type d'un plasma témoin. Extraction: benzène à pH 9; conditions chromatographiques standards.

ionique azote-phosphore permet de déterminer des taux plasmatiques en nitrazépam assez faibles, largement supérieurs aux taux plasmatiques moyens qui correspondent aux doses capables d'induire les premiers effets pharmacologiques.

Notre méthode d'analyse permet l'évaluation qualitative et quantitative, sous leur forme inchangée, d'onze benzodiazépines commercialisées en France [5]. Elle ne permet pas, cependant, de doser le chlórdiazépoxyde et de son métabolite déméthylé ni de séparer le tétrazépam du lorazépam [5].

Nous avons adapté la méthode proposée pour la rendre applicable à la détermination du nitrazépam dans les urines. Dans ce cas il faut réaliser, avant l'extraction, une hydrolyse enzymatique pour libérer la benzodiazépine de ces formes conjuguées.

Applications cliniques

Nous avons utilisé des échantillons biologiques variés provenant de centres hospitaliers ou d'hôpitaux psychiatriques spécialisés. La méthode a été appliquée à la détermination du nitrazépam sur ces prélèvements obtenus de personnes traitées par ce médicament ou l'ayant absorbé intentionnellement.

L'effet hypnotique du nitrazépam est dépendant à la fois de sa cinétique de distribution et d'élimination. Ces données sont bien établies [6,7] et se caractérisent par une rapide absorption et une lente élimination [8]. Les prises répétées de ce médicament sont à l'origine des fréquents cas d'abus et de surdosages observés [9].

Nous constatons que pour des traitements répétés aux doses usuelles les taux plasmatiques de nitrazépam inchangé peuvent subir de grandes variations interindividuelles (Tableau IIa et c). Les valeurs moyennes d'environ 30 et 50 ng/ml pour les traitements prolongés de 5 et 10 mg par jour restent conformes aux données de la littérature [6].

Lorsque les benzodiazépines sont seules en cause, l'intoxication est relativement bénigne [10-12] et le suicide devient même difficile [13]; dans les cas d'absorption volontaire d'une dose excessive, la mortalité est rare voire nulle [10-13].

Le taux plasmatique du nitrazépam inchangé peut atteindre des valeurs élevées: 1250 ng/ml pour le cas d'absorption volontaire d'une dose excessive que nous avons mentionné (Tableau IIb). L'évolution de ce cas est restée favorable avec la mise en place d'un traitement symptomatique.

Les benzodiazépines peuvent être administrées en association avec d'autres médicaments. Ceux que nous avons mentionnés dans le Tableau II n'interfèrent pas avec le dosage du nitrazépam.

Lorsque le nitrazépam est associé à d'autres benzodiazépines nous avons pu montrer que leur détermination respective sous leur forme inchangée est possible en appliquant les conditions chromatographiques retenues. Notre méthode permet de déterminer aussi, pour les cas cliniques 8 et 9, les taux plas-

TABLEAU II

APPLICATION DE LA MÉTHODE AU DOSAGE DU NITRAZÉPAM DANS LES FLUIDES BIOLOGIQUES

(a) Absorption de nitrazépam seul à doses thérapeutiques

Cas	Voie	Dernière prise (h)	Durée du traitement (jours)	Dose administrée		Médicaments associés	Taux plasmatique (ng/ml)
				mg par jour	mg/kg		
1	Orale	10	35	5	0,067	Lithium,	34
2	Orale	10	15	5	0,083	phénobarbital	26
3	Orale	10	20	5	0,093	Méprobamate,	57
4	Orale	10	3 à 4	10	0,118	phénobarbital	55
5	Rectale	18	75	10	0,20	Thioridazine, cyamémazine	67
						Fluphénazine, nortriptyline	
						Phanquinon, clioquinol	

(b) Absorption volontaire d'une dose excessive de nitrazépam

Cas	Voie	Durée de l'exposition (h)	Dose présumée absorbée	Taux plasmatique (ng/ml)	Taux urinaire (ng/ml)
6	Orale	15 20	80 × 5 mg 6,45 mg/kg	1350	1800

(c) Nitrazépam associé à une autre benzodiazépine à doses thérapeutiques

Cas	Composé	Voie	Dernière prise (h)	Durée du traitement (jours)	Dose administrée		Taux plasmatique (ng/ml)
					mg par jour	mg/kg	
<i>Nitrazépam (N) et clobazam (C)</i>							
7	N	Orale	10	15	5	0,088	27
	C	Orale	10	30	20	0,351	345
<i>Nitrazépam (N) et diazépam (D)</i>							
8	N	Rectale	15	3	10	0,135	19
	D	Orale	4	15	3 × 10	0,405	— ^a
9	N	Orale	10	10	5	0,081	25
	D	Orale	10	20	5	0,081	— ^a
<i>Nitrazépam (N) et lorazépam (L)</i>							
10	N	Orale	12	21	5	0,074	24
	L	Orale	18	21	2 × 1,25	0,037	35
<i>Nitrazépam (N) et oxazépam (O)</i>							
11	N	Rectale	10	7	10	0,125	65
	O	Orale	10	10	2 × 50	1,25	1370
12	N	Orale	N.C. ^b	10	5	0,072	17
	O	Orale	N.C. ^b	17	3 × 25	1,09	630

^aVoir la discussion.^bN.C. = non communiqué.

TABLEAU III

PARAMÈTRES CHROMATOGRAPHIQUES DES BENZODIAZÉPINES ASSOCIÉES AU NITRAZÉPAM ET APPLICATION DE LA MÉTHODE À LA DÉTERMINATION DES TAUX PLASMATIQUES DES CAS 8 et 9

Composé	Temps de rétention absolus (min)	Taux plasmatique (ng/ml)	
		Cas 8	Cas 9
Clobazam	13,23		
Lorazépam	9,83		
Nitrazépam	17,51	19	25
Diazépam	10,50	1745	110
Nordiazépam	12,47	1640	180
Oxazépam	8,25	Traces	-
Témazépam	15,57	-	-

matiques de métabolites actifs du diazépam: le nordiazépam, l'oxazépam et le témazépam (Tableau III).

BIBLIOGRAPHIE

- 1 D.J. Greenblatt, R.I. Shader et D.R. Abernethy, *N. Engl. J. Med.*, 409 (1983) 354, 410.
- 2 D.M. Hailey, *J. Chromatogr.*, 98 (1974) 527.
- 3 L. Kangas, *J. Chromatogr.*, 136 (1977) 259.
- 4 A.G. de Boer, J. Röst-Kaiser, H. Bracht et D.D. Breimer, *J. Chromatogr.*, 145 (1978) 105.
- 5 S. Barazi et M. Bonini, *J. Chromatogr.*, 202 (1980) 473.
- 6 D.D. Breimer, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 8 (1979) 7S.
- 7 D.D. Breimer, H. Bracht et A.G. de Boer, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 4 (1977) 709.
- 8 A. Locniskar, D.J. Greenblatt et H.R. Ochs, *J. Chromatogr.*, 337 (1985) 131.
- 9 S. Chapallaz, *J. Suisse Pharm.*, 111 (1973) 95.
- 10 D.J. Greenblatt, M.D. Allen, B.J. Noel et R.I. Shader, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 21 (1977) 497.
- 11 P. Jatlow, *Clin. Chem.*, 18 (1972) 516.
- 12 A. Viala, J.P. Cano et A. Angeletti-Philippe, *J. Eur. Toxicol.*, 2 (1972) 109.
- 13 K. Salomon, *N.Y. State J. Med.*, 78 (1978) 91.