

Separation et Identification de Dix-huit Benzo (e) Diazepines 1-4 Par Chromatographie En Couche Mince

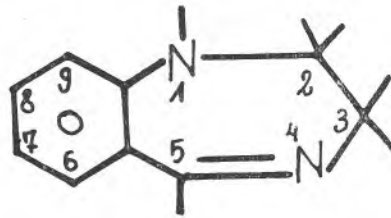
Onsekiz, 1-4 Benzo (e) Diazepin'in İnce Tabaka Kromatografisi İle
Ayrılmaları ve Teşhisleri

B. PERROT* D. MICHON** G. BOURGEOIS*** A. BRACHET-LIERMAIN** M. BERTUCAT

Les Auteurs étudient la séparation par chromatographie sur couche mince de dix huit benzodiazepines 1-4. Trois solvants sont retenus.

I. Introduction

Parmi les médicaments utilisés en neuropsychiatrie, les dérivés à cycle azépinique ou diazépinique ont une grande importance. Notre étude porte sur dix huit composés benzo (e) diazépiniques 1 - 4 commercialisés ou en pases de l'être, dont nous donnons ci-dessous la numérotation générale et les formules :



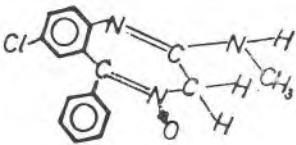
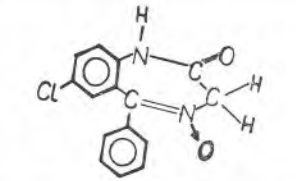
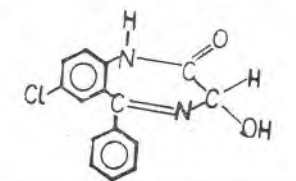
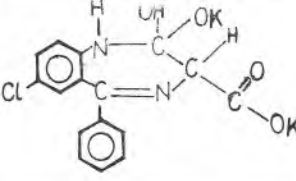
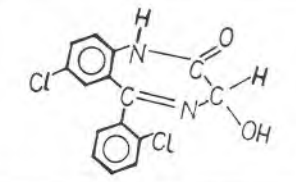
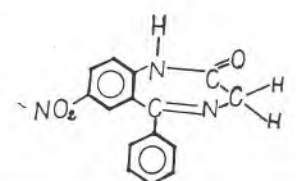
Redaksiyona verildiği tarih : 8 Mayıs 1975.

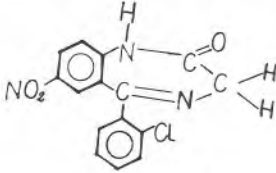
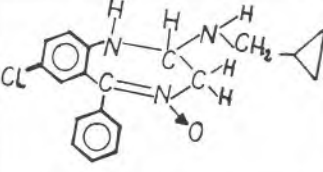
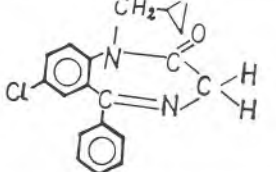
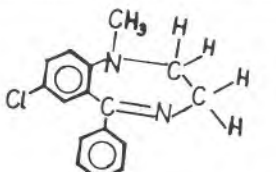
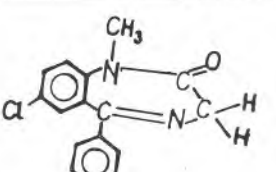
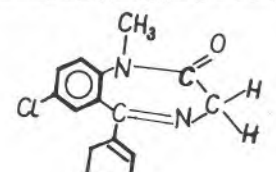
* Farmasötik Kimya Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi

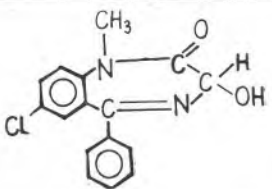
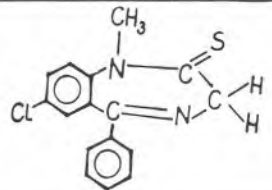
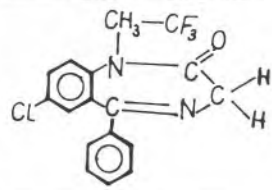
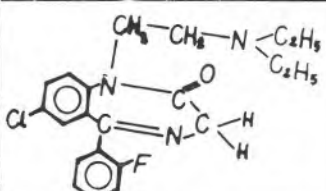
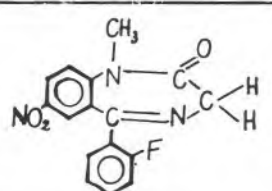
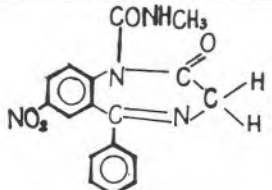
** Hôpital des Enfants, Bordeaux, France

*** Faculte des Sciences, Bordeaux, France

Tableau I : Formules

N°	Formule	Nom chimique	Nom de spécialité
1		7 - chloro - 2 - éthylamino - 5 phényl - 3H 1,4 benzodiazépine 4 Oxide CHLORDIAZEPOXIDE (RO - 5 - 0690) anxiolytique	Librium Librax Limbatril Pentrium Timosin
2		7 - chloro - 5 phényl - 2 oxo - 2,3- dihydro 1 H 1,4 benzodiazépine 4 - oxide DEMOXEPAM (RO - 5 - 2092) anxiolytique	
3		7 - chloro - 3 - hydroxy - 5 - phényl - 1, 3 - dihydro - 2 H-1,4 benzodiazépine - 2 - one OXAZEPAM (8092 CB) anxiolytique	Seresta Serax Praxiten Adumbran
4		Sel dipotassique du 7 - chloro - 2,2 - hydroxy - 5 phenyl - 3 car- boxyl - 2,3 dihydro - 1 H 1,4 ben- zodiazépine CLORAZEPATE (4306 CB) anxiolytique	Tranxéne Tranxilium
5		7-chloro - 5(2 chlorophényl) - 2,3-dihydro-3-hydroxy - 1 H - 1,4 benzodiazépine - 2-one LORAZEPAM	Tavor Temesta
6		7-nitro - 5-phényl - 1,3-dihydro - 2 H-1,4 benzodiazépine - 2-one NITRAZEPAM (RO-4-5360) hypnotique	Mogadon Mogadon

7		<p>7 nitro - 5-(2 chlorophényl) - 1,3-dihydro - 2 H-1, 4 benzodiazepine - 2-one CLONAZEPAM (RO-5-4023) anticonvulsivant</p>	Rivotril
8		<p>7-chloro - 2 (cyclopropylmethyl) amino - 5-phén - 1, 3-dihydro - 1, 4 benzodiazepine 4 oxide CYPRAZEPAM (W 3623)</p>	
9		<p>7-chloro - 1-(cyclopropylméthyl) - 1,3 - dihydro - 5 - phényl - 2 - H-1,4 benzodiazepine - 2-one PRAZEPAM (W 4020) anxiolytique</p>	
10		<p>7-chloro - 2,3-dihydro - 1-méthyl - 5-phényl-1-H,4 benzodiazepine MEDAZEPAM anxiolytique</p>	Nobrium
11		<p>7-chloro - 2,3-dihydro - 1-méthyl - 5 - cyclohexényl - 1 H-1,4 benzodiazepine - 2-one TETRAZEPAM Myorelaxant</p>	Myolastan
12		<p>7-chloro - 1,3-dihydro - 1-méthyl - 5-phényl - 2 -H-1,4 benzodiazepine - 2-one DIAZEPAM (RO-5-2807) anxiolytique</p>	Valium Evidan Auparin Noan

13		<p>7-chloro - 2,3-dihydro - 1-méthyl - 5-phényl - 3-hydroxy - 1,4 benzodiazepine - 2-one TEMAZEPAM (RO-5-5345) anticonvulsivant</p>	Levanxol
14		<p>7-chloro - 1,3 dihydro - 1-méthyl - 5 phényl - 2 H-1,4 benzodiazepine - 2 thione SULAZEPAM (W 3676)</p>	
15		<p>7-chloro - 1,3-dihydro - 2 H-1-(2 trifluoroéthyl) - 5-phényl - 1,4-benzodiazepine - 2 one SCH 12.041 HALAZEPAM</p>	
16		<p>7-chloro - 2,3-dihydro - 1-diéthyl - amimoéthyl - 5 - (2-fluorophényl) - 1,4 benzodiazepine - 2 -one FLURAZEPAM (RO-5-69013)</p>	Dalmane
17		<p>7 nitro - 2,3 dihydro - 1méthyl - 5 (2 fluoro - phényl) - 1,4 benzodiazepine - 2 one FLUNIDAZEPAM</p>	
18		<p>7-nitro - 2,3-dihydro - 1 H - 5 - phényl - 2-oxo - N-méthyl - 1,4 benzodiazepine - 1-carboxamide D 58 SI hypnotique</p>	

I. Travaux Anterieurs

La séparation chromatographique de certains produits, nitrazépam, Diazépam Médazépam, Oxazépam, Clorazépate, Chlordiazépo- xide a été très étudiée mais ces travaux concernent non seulement les substances mais aussi leurs métabolites et leurs produits d'hyd- rolyse acide.

Dans les tableaux qui suivent nous indiquons les systèmes ter- naires et quaternaires déjà utilisés avec les Rf correspondant aux dérivés étudiés. Nous n'avons pas indiqué les solvants simples, mé- thanol, acétone, benzène ni les solvants binaires, ceux-ci n'ayant été utilisés que pour la séparation de deux ou trois composés seulement. A noter que pour un même système de solvants les Rf sont parfois différents. Dalas (8) a signalé toutes les causes pouvant expliquer ces différences. C'est pourquoi la valeur des Rf doit être notée avec circonspection (Tableaux II, III).

Nature des réactifs utilisés comme révélateurs

Ceux-ci sont très nombreux comme le montre le tableau ci des- sous :

- a) Fluorescence en ultra violet
 - elle peut être spontanée (34)
 - si on utilise un marqueur fluorescent pour préparer la couche mince, on peut visualiser les spots après migration soit à 254 nm (1, 2, 3, 5, 7, 11, 12, 15, 16, 17, 22, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 32, 34, 36, 41) soit à 244 nm (3) soit à 366 nm (21,25)
- b) Réactif de Dragendorff modifié (1, 2, 14, 17, 30, 31, 29, 32)
- c) Réactif de Bratton - Marshall (2, 5, 19, 22, 24, 32, 34)

Tableau I

Support	SOLVANTS (mélanges exprimés en Vol/Vol)	PRODUITS										Réf.
		1	2	3	4	6	9	10	11	12		
		Rf										
Kieselgel G	chloroforme - acétone - méthanol 70:20:10			0,58								43
Kieselgel G	chloroforme - acétone - méthanol 55:35:10			0,68								43
Kieselgel G	chloroforme - méthanol - ac. acétique 94:5:1			0,33								43
Kieselgel G	chloroforme - méthanol - ac. acétique 88:10:2			0,68								43
Silicagel G	chloroforme - méthanol - ac. acétique 15:4:1			0,74			0,93					13
Silicagel DF5	chloroforme - méthanol - toluène 10:1:9	0,13	0,04	0,08		0,10				0,37		2
Silicagel G	chloroforme - heptane - éthanol 10:10:1			0,02			0,37					13
Silicagel G	chloroforme - heptane - éthanol 5:5:1	X		X								23,24
Kieselgel G	chloroforme - heptane - éthanol 10:10:1			X								22
Silicagel G	chloroforme - heptane - éthanol 10:10:1	X		X								24
Kieselgel GF 254	chloroforme - acétone - ac. acétique 70:20:10			0,64								43
Kieselgel G	chloroforme - acétone - diéthylamine 50:40:10			0,82								43
Kieselgel G	chloroforme - cyclohexane - diéthylamine 40:50:10			0,13								43
Kieselgel G	chloroforme - isopropanol - ammoniacque 45:45:10			0,62								43
Silicagel G	méthanol - acétone - triéthanolamine 10:10:3	0,85										17,33
Kieselgel G	méthanol - chlorure d'éthylène - NH ₃ conc 10:90:1					0,54						5
Kieselgel GF 254	méthanol - chlorure d'éthylène - NH ₃ conc 10:90:1					0,66						34
Kieselgel G	méthanol - acétone - triéthanolamine 10:10:0,3	0,85										1

Tableau II

Support	SOLVANTS (mélanges exprimés en Vol/Vol)	PRODUITS										Réf.
		1	2	3	4	6	9	10	11	12		
		Rf										
Silicagel G	acétone - méthanol - ammoniac conc. 50:50:1	0,82								0,90		40
Kieselgel G	tétrachlorure de carbone - acétone - méthanol 55:10:35			0,56								43
Kieselgel G	tétrachlorure de carbone - acétone - méthanol 55:35:10			0,48								43
Kieselgel G	benzène - acétone - méthanol 55:35:10			0,66								43
Kieselgel G	benzène - ac. acétique - hydroxide de tétrabutyl ammonium 80:10:10			0,52								43
Kieselgel G	benzène - acétone - diéthylamine 70:20:10			0,29								43
Silicagel G	benzène - acétate d'éthyle - ac. acétique 16:4:1			0,24			0,52					13
Silicagel SG 41	benzène - pyridine - ac. acétique 80:5:2	X		X								23
Kieselgel G	benzène - éthanol - ammoniac 25 % 50:10:5	0,64										31
Silicagel G	benzène - éthanol - ammoniac 12 N 95:15:5	0,11		0,08						0,68		44
Kieselgel G	toluène - hydroxide de tétrabutyl ammonium - méthanol 85:10:5			0,46								43
Kieselgel G	toluène - hydroxide de tétrabutylammonium méthanol 80:10:5			0,51								43
Silicagel DSF 5	toluène - nitrométhane - méthanol 11:8:1	0,11	0,12	0,14		0,23				0,26		2
Kieselgel GF 254	toluène - acétone - ammoniac conc 50:50:1					0,52						5,34
Kieselgel GF 254	acétate d'éthyle - n propanol - diéthylamine 70:30:1					0,70						5
Kieselgel GF 254	acétate d'éthyle - npropanol - diéthylamine 70:30:1					0,91						34
Silicagel G + NaOH O,I N	cyclohexane - diéthylamine - benzène 75:20:15	0,07		0,03						0,34		44
Silicagel G + KOH O,I M	cyclohexane - benzène - diéthylamine 75:15:10									0,33		14

Tableau III

Support	SOLVANTS (exprimés en Vol/Vol)	PRODUITS											Réf.
		1	2	3	4	6	9	10	11	12	13		
		Rf											
Kieselgel GF 254	cyclohexane - benzène - diéthylamine 80:15:15	X		X		X		0.5		X		14	
Kieselgel MN	n-butyl ester — n-butanol — ac. acétique 8:4:1	X		X								23	
Kieselgel G	isopropanol - ammoniac - eau 75:17:8			0.73								43	
Kieselgel G	acétate d'éthyle - méthanol - ac. acétique 80:20:10			0.84								43	
Silicagel G	benzène - ether de pétrole - acétone - ammoniac 35:35:35:1	0.26								0.70		40	
Silicagel G	n butanol-ac. acétique - méthanol: eau 10:5:5:2	0.72										40	
Silicagel G	toluène-acétate d'éthyle-butanol-eau 10:5:5:2			0.21			0.60					13	
Kieselgel GF 254	dioxane - benzène - hexane - ammoniac conc. 45:50:70:5			X		X		X		X		41	
CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE													
Silicagel G/F	1) chloroforme - heptane - éthanol 10:10:1			0.09				0.45		0.38	0.29	12	
	2) chloroforme - acétone sur extrait urinaire 90:10			0.08				0.45		0.41	0.34		
Silicagel G	1) chloroforme - heptane - éthanol 10:10:1			0.11				0.49		0.43	0.30	12	
	2) chloroforme - acétone 90:10			0.08				0.42		0.39	0.33		
Silicagel G	1) chloroforme - heptane - éthanol 10:10:1									X	X	11	
	2) chloroforme - heptane - ac. acétique - ethanol 5:5:1:0,3		X	X									
Silicagel G	1) chloroforme - acétone 90:10									X	X	35	
	2) chloroforme - heptane - éthanol 10:10:1		X	X									
	1) heptane - chloroforme - éthanol 10:10:1									X	X	35	
	2) isopropanol - ammoniac conc. 20:1		X	X									
	1) heptane - chloroforme - éthanol 10:10:1									X	X	35	
2) heptane - chloroforme - ac. acétique - ethanol 5:5:1:0,3		X	X										

- d) Réaction de diazocopulation dérivée de la réaction de Bratton - Marschall (20, 21, 25, 30)
- e) Réactif au sulfate cérique en milieu sulfurique (2, 40, 43)
- f) Réactif combiné au sulfate cérique et réactif de Dragendorff (2)
- g) Réactif à l'iodoplatinate de potassium (15, 17, 29)
- h) Réactif au chlore - orthotoluidine (2, 34)
- i) Réactif au permanganate de potassium (29, 31)
- j) Réactif au bichromate de potassium sulfurique à 5 % (7)
- k) Réactif d'Ehrlich (34)
- l) Réactif au diméthylaminobenzaldéhyde (44, 29)
- m) Réactif à l'iode en solution méthanolique à 1 % (14, 35)
- n) Réactif au furfural en milieu acétonique (41)
- o) Réactif au furfural sulfurique (29, 44)
- p) Réactif de Forrest (7, 29, 44)
- q) Réactif de Mandelin (14, 44)
- r) Réactif de Folon - Ciocalteau (34, 44)
- s) Réactif au nitrite de Sodium aqueux à 5 % + réactif de Dragendorff (14)
- t) Solution aqueuse de Fast rouge G à 0,5 % (14)
- u) Réactif à base de chlorure de zinc et d'acide perchlorique (43)
- v) Réactif à base d'acide trichloracétique et de chloroforme (43)
- w) Réactif à base de trichlorure d'antimoine et d'acide acétique (43)
- x) Réactif à la vanilline en milieu sulfurique (43)
- y) Réactif à la cinamaldéhyde en milieu chlorhydrique (44)

- z) Réactif à l'acide orthophosphorique (27, 43)
- a') Réactif au furfural suivi d'acide sulfurique en milieu alcoolique (41)
- b') Réactif à l'acide sulfurique à 10 % dans l'éthanol (31)
- c') Réactif à l'acide nitrique dans l'éthanol (31)
- d') méthodes radioactives
 - soit les produits sont marqués au C₁₄ et on prend le cliché sur un film radiosensible (23, 42)
 - soit les produits sont marqués et on passe le chromatogramme dans un appareil détecteur type Packard ou autre (13, 24)

III — Séparation et Identification de 18 benzodiazépines 1,4.

Les produits étudiés étaient sous la forme de base ou de sel.

I) Conditions opératoires

Nous avons utilisé comme support tantôt le Silicagel Prolabo (Ref 24/354), tantôt le Kieselgel GF 254 (Merck), tantôt le Kieselgel G Merck en couche mince de 20x20 centimètres sur une épaisseur de 0.3 mm. Nous activons les plaques une demi - heure à 110°C et nous refroidissons en présence d'un déshydratant (type CaCl₂ et Actigel). L'analyse se passe à la température de la pièce (21°C ± 2°C) La migration du solvant à partir de la ligne de départ est de 15 à 16 centimètres. Les produits sont solubilisés soit dans le méthanol, soit dans le chloroforme, selon leur meilleur solvant. On dépose environ dix à vingt microgrammes de chaque composé. Les substances sont solubilisées de la façon suivante : (Tableau IV)

Tableau : IV

No	Substances	Solvants
1	Chlordiazépoxyde	méthanol
2	Demoxèpam	chloroforme
3	Oxazepam	méthanol
4	Clorazépate	méthanol
5	Lorazépam	méthanol
6	Nitrazépam	chloroforme
7	Clonazépam	chloroforme
8	Cyprazépam	chloroforme
9	Prazépam	chloroforme
10	Médazépam	Chloroforme
11	Tétrazépam	Chloroforme
12	Diazépam	Chloroforme
13	Témazépam	Chloroforme
14	Sulazépam	Chloroforme
15	Sch 12.041	Chloroforme
16	Flurazépam	méthanol
17	Flunidazépam	méthanol
18	D 58 SI	Chloroforme

2) Chromatographie proprement dite

La littérature nous a fourni un certain nombre de données

a) solvants expérimentés

Quelques uns d'entre eux ont été utilisés en effet pour des travaux sur les Dibenzazépines ou les Dibenzodiazépines ou d'autres substances chimiques. Nous rappellerons pour ceux-là la référence où ils ont été trouvés. Quant aux commentaires, ils s'appliquent exclusivement à notre travail (séparation de dix huit produits).

Tableau V.

Support	Solvants	Proportion	Commentaires	Ref
Sil. Po	méthanol - chloroforme - ammoniacque conc.	75:25:1,5	mauvais	18
Sil. Po	méthanol - acétone - ammoniacque conc.	50:50:1	mauvais	10
				40
Sil. Po	méthanol - acétone - diéthylamine	100:100:3	mauvais	6
Sil. Po	méthanol - acétone - diéthylamine	100:100:3	mauvais	1
				38
KGF 254	méthanol - acétone - diéthylamine ethyl acétate	50:45:3:2	mauvais	
Sil. Po	chloroforme - méthanol	9:1	mauvais	44
Sil. Po	chloroforme - acétone	9:1	mauvais	3.12
				15
				30
				32
Sil. Po	chloroforme - acétone - méthanol	70:25:5	mauvais	
Sil. Po	chloroforme - méthanol - ac. acétique	90:10:1	mauvais	7
Sil. Po	chloroforme - méthanol - ac. acétique	15:4:1	mauvais	13
Sil. Po	chloroforme - acétate d'éthyle - acide acétique	70:40:0,5	bon	
KGF 254	chloroforme - acétate d'éthyle - acide acétique	70:40:0,5	bon	
Sil. Po	chloroforme - acétone - ammoniacque conc.	50:50:1	mauvais	7
Sil. Po	chloroforme - isopropanol ammoniacque conc.	45:45:10	mauvais	43
Sil. Po	chloroforme - heptane - éthanol	10:10:1	mauvais	11
				12
				13
				22
				24
				35

Support	Solvants	Proportion	Commentaires	Ref
Sil. Po	chloroforme - heptane - éthanol	50:50:5	mauvais	
Sil. Po	chloroforme - heptane - isobutanol	50:50:10	mauvais	
Sil. Po	chloroforme - heptane - éthanol acide acétique	5:5:0,3:1	mauvais	11
KGF 254	chloroforme-n propanol - méthanol - eau	10:10:5:2	mauvais	35
Sil. Po	éthanol - pyridine - dioxane - eau	50:20:25:5	mauvais	37
KGF 254	éter - acétone - acétate d'éthyle - diéthylamine	85:11:2:2	bon pour séparation de 6 et 7	
KGF 254	éter - acétone - acétate d'éthyle - diéthylamine	80:10:5:5	moyenne	
KGF 254	éter - acétone - acétate d'éthyle - diéthylamine	50:45:2:4	bon pour séparation de 6 et 7	
KGF 254	éter - acétone - acétate d'éthyle - diéthylamine	35:35:25:4	mauvaise	
KGF 254	éter - acétone - acétate d'éthyle - éthanolamine	50:45:3:1	mauvaise	
KGF 254	éter - cyclohexane - méthanol	54:43:23	bon pour séparation de 6 et 7	
Sil. Po	acétone - eau - ammoniacque	50:10:10	mauvaise	7
	acétone - éther - acétate d'éthyle - diéthylamine	80:20:4:4	mauvais	
	benzène - acétone - ammoniacque	85:10:5	mauvais	37
KGF 254 + Na ₂ CO ₃ 0,1 M	acétate d'éthyle - cyclohexane méthanol	54:43:22	bon pour séparation de 3 et 5	
KGF 254 + Na ₂ CO ₃ 0,1 M	acétate d'éthyle - acétone - éther - acide acétique	54:43:22:1	mauvais	

KGF 254 + Na ₂ CO ₃ 0,1 M Sil. Po	acétate d'éthyle - méthanol - ammoniacque acétate d'éthyle - cyclohexane - méthanol - acide acétique	54:43:22:0.5 80:30:10	mauvais mauvais bon pour séparation de 6 et 7 mauvais	
KGF 254 KGF 254	n butanol - acide oxalique 0.5 % acétate de butyle - acide acétique	50:50 80:2	mauvais assez bon	
KGF 254 KGF 254 KGF 254 KGF 254	acétate de butyle - acide acétique acétate de butyle - chloroforme - acide acétique acétate de butyle - benzène - acide acétique acétate de butyle - éther - acide acétique	80:8 60:20:2 70:23:7 70:23:7	mauvais mauvais mauvais assez bon	
KGF 254 KGF 254 Sil. Po Sil. Po Sil. Po Sil. Po Sil. Po Sil. Po KGF 254 Sil. Po Sil. Po Sil. Po Sil. Po KGF 254 Sil. Po	acétate de butyle - éther - acide acétique acétate de butyle - cyclohexane - méthanol - phénol - eau benzène - éthanol - ammoniacque 12 N benzène - éthanol - ammoniacque 25 % benzène - acétone - ammoniacque 25 % benzène - acétone - ammoniacque benzène - méthanol - ammoniacque benzène - dioxane - ammoniacque benzène - acétone - diéthylamine benzène - acétate d'éthyle - acide acétique benzène - acide acétique benzène - acétate d'éthyle benzène - acétone - éthanolamine benzène - acétone - éthanolamine benzène - éther de pétrole - acétone - ammonia- que conc.	47:46:7 54:43:22 80:20 95:15:15 50:10:5 50:10:5 50:10:10 90:10:1 75:20:5 70:22:7 16:4:1 90:10 80:20 100:35:1 100:25:1 35:35:35:1	médiocre mauvais mauvais mauvais mauvais mauvais mauvais mauvais mauvais mauvais mauvais mauvais bon bon mauvais	44 31 9 7 39 13 43 40

Support	Solvants	Proportion	Commentaires	Ref
Sil. Po	benzène - méthyléthylcétone - diméthylformamide	100:15:5	mauvais	
Sil. Po	benzène - acétone - acétate d'éthyle	100:15:1	mauvais	
Sil. Po	benzène - acétone - ammoniacque	80:20:1	mauvais	
Sil. Po	benzène - dioxane - acide acétique	90:20:1	mauvais	
Sil. Po	benzène - dioxane - éthanol - ammoniacque	50:40:5:5	mauvais	37
Sil. Po	chclohexane - éthanol	85:15	mauvais	37
KGF 254	cyclohexane - méthanol - acétone	54:23:43	mauvais	
KGF 254	cyclohexane - chloroforme - diméthylformamide	10:10:10	mauvais	
Sil. Po	cyclohexane - acétone - diméthylformamide	100:30:0.5	médiocre	
Sil. Po	cyclohexane - méthyléthylcétone - diméthylformamide	100:30:1	mauvais	
Sil. Po	cyclohexane - acétone - ammoniacque		mauvais	
Sil. Po	cyclohexane - diéthylamine - benzène	75:20:15	mauvais	44
KGF 254	cyclohexane - acétate d'éthyle - méthanol	45:40:15	mauvais	
KG				
KGF 254	cyclohexane - acétate d'éthyle - méthanol	60:35:10	mauvais	
KG				
KGF 254	cyclohexane - acétate d'éthyle - méthanol	60:40:5	bon pour	
KG			3, 5, 6, 7	
KGF 254	cyclohexane - acétate d'éthyle - méthanol	60:40:4	médiocre	
KGF 254	cyclohexane - acétate d'éthyle - méthanol	60:40:4.5	excellent	
KG			pour 3, 5, 6, 7	
Sil. Po	heptane - acétate d'éthyle - acide acétique	50:30:1	mauvais	

De cette longue liste de solvants essayés, nous avons retenu trois d'entre eux qui permettent de séparer le mieux possible les dix huit produits.

- cyclohexane : acétate d'éthyle: méthanol 60:40:4.5 (a)
- benzène : acétone: éthanolamine 100:35:1 (b)
- chloroforme : acétate d'éthyle : acide acétique 70:40:0.5 (c)

Nous n'avons pas fait figurer dans ce tableau toutes les recherches de proportion inhérente à ces trois solvants Le solvant (a) a été essentiellement déterminé pour la séparation chromatographique des substances 3 et 5 d'une part et 6 et 7 d'autre part. En effet quelque soit le système de solvants utilisés, ces substances ont tendance à migrer ensemble. Ceci s'explique par le fait qu'entre les substances prises deux à deux, un seul atome de chlore différencie les molécules!

Nous avons pratiqué dans un premier temps des chromatographies en utilisant comme solvant les systèmes (b) et (c). Puis ne pouvant obtenir une séparation parfaite des composés 3 et 5,6 et 7, le système (a) nous a permis de pallier cet ennui, grâce à une chromatographie bidimensionnelle.

— En première dimension, chromatographie avec le système de solvants (a) des produits 3,5,6,7 en mélange.

— En deuxième dimension, chromatographie avec les systèmes de solvants (b) et (c). Pour l'expérimentation proprement dite nous avons utilisé comme support le Kieselgel GF 254 Merck qui nous rendait plus facile l'identification des spots des drogues.

Enfin signalons que nous avons pu séparer distinctement à partir d'un mélange, quinze des produits étudiés grâce aux systèmes de solvants (b) et (c).

b) Résultats

Nous présentons les trois chromatogrammes suivants:

— Celui obtenu avec le système des solvants (b) sur les produits pris isolément les uns des autres.

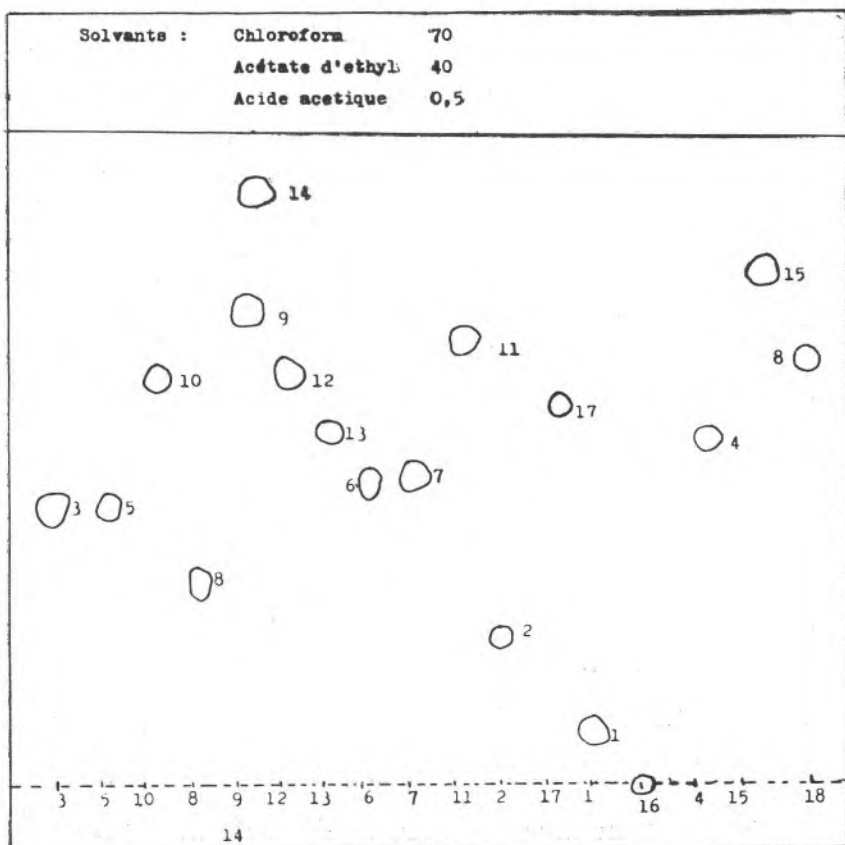
— Celui obtenu avec le système de solvants (a) sur les produits pris isolément les uns des autres.

— Celui de la chromatographie bidimensionnelle obtenu avec les systèmes de solvants (a) puis (c) selon les modalités données plus haut.

En outre, nous publions les deux chromatogrammes réalisés sur le mélange de quinze des substances avec les systèmes des solvants (b) et (c).

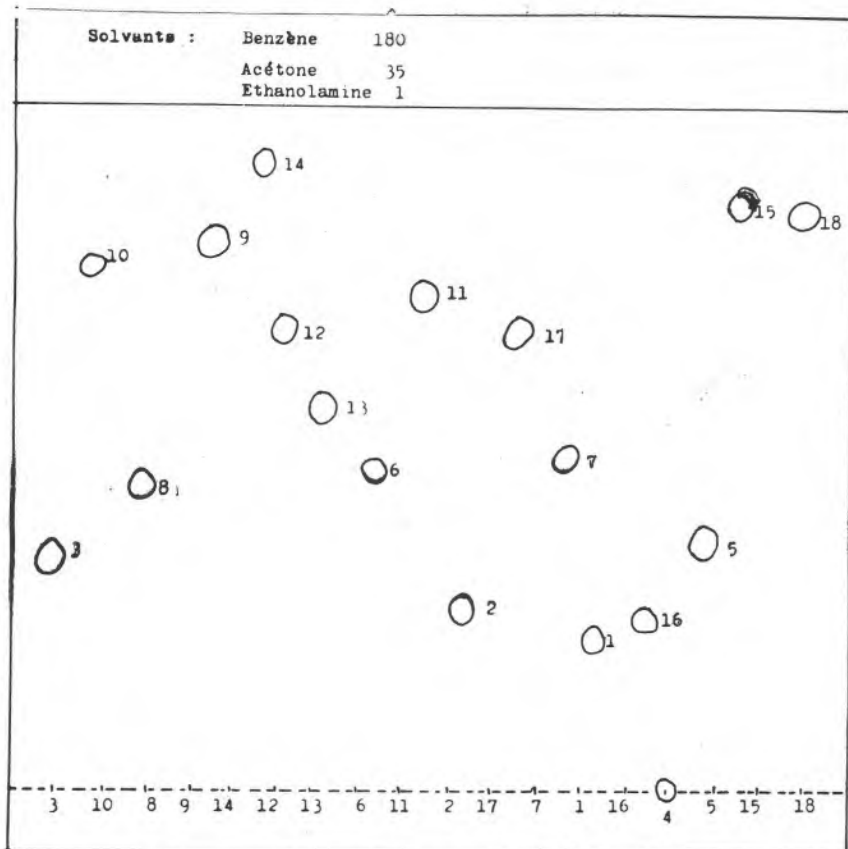
Enfin, on trouvera un tableau des Rf approximatifs des produits dans les systèmes de solvants (b) et (c).

Chromatogramme des dix huit produits pris isolément :



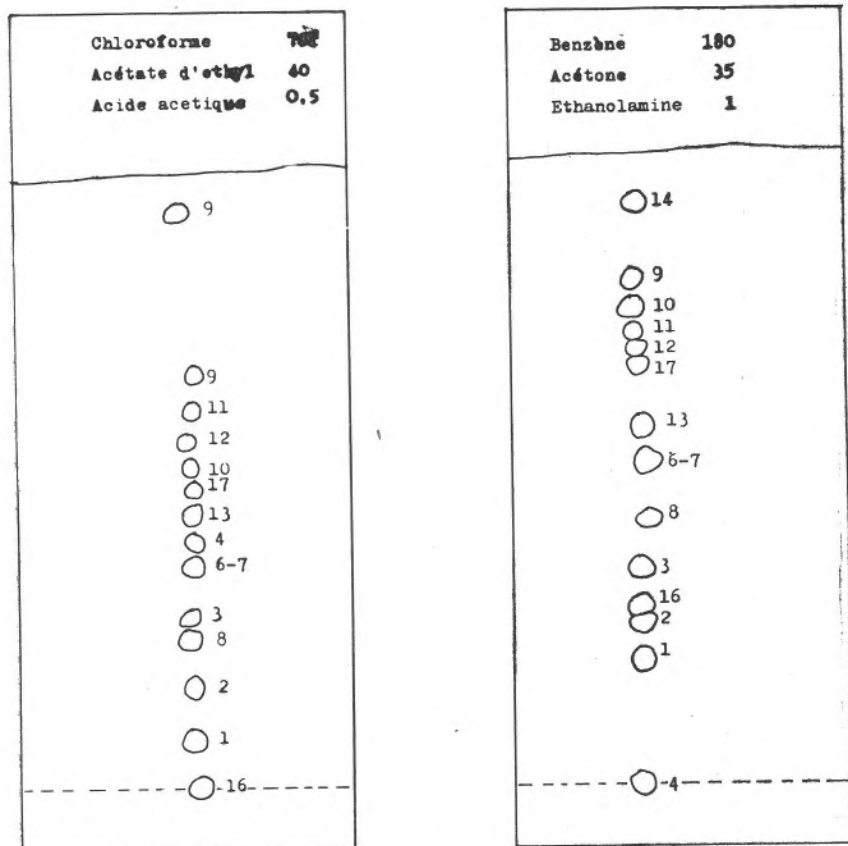
Comme nous le constatons, le solvant (c) ne permet pas de séparer distinctement les produits 3 — 5 et 6 — 7 et dans une certaine mesure les substances 10, 12, 18. Le système de solvants (b) le rend possible.

Chromatogramme des dix huit produits pris isolément :



- | | | |
|----------------------|-------------------|------------------|
| 1 — Chlordiazépoxyde | 2 — Démoxépam | 3 — Oxazépam |
| 4 — Clorazépate | 5 — Lorazépam | 6 — Nitrazépam |
| 7 — Clonazépam | 8 — Cyprazépam | 9 — Prazépam |
| 10 — Médazépam | 11 — Tétrazépam | 12 — Diazépam |
| 13 — Témazépam | 14 — Sulazépam | 15 — Sch. 12.041 |
| 16 — Flurazépam | 17 — Flunidazépam | 18 — D.58 SI |

Les substances 3 — 5 et 6 — 7 sont mal séparées. Par contre, les autres produits le sont assez bien, hormis 12 — 17 et 2 — 16.



Chromatogrammes

d'un mélange de quinze des produits étudiés

Le solvant (a) n'a pas d'intérêt en dehors de la séparation des produits 3 — 5 et 6 — 7 qu'il rend possible; nous ne donnerons donc pas le calque du chromatogramme obtenu. Il n'en est pas

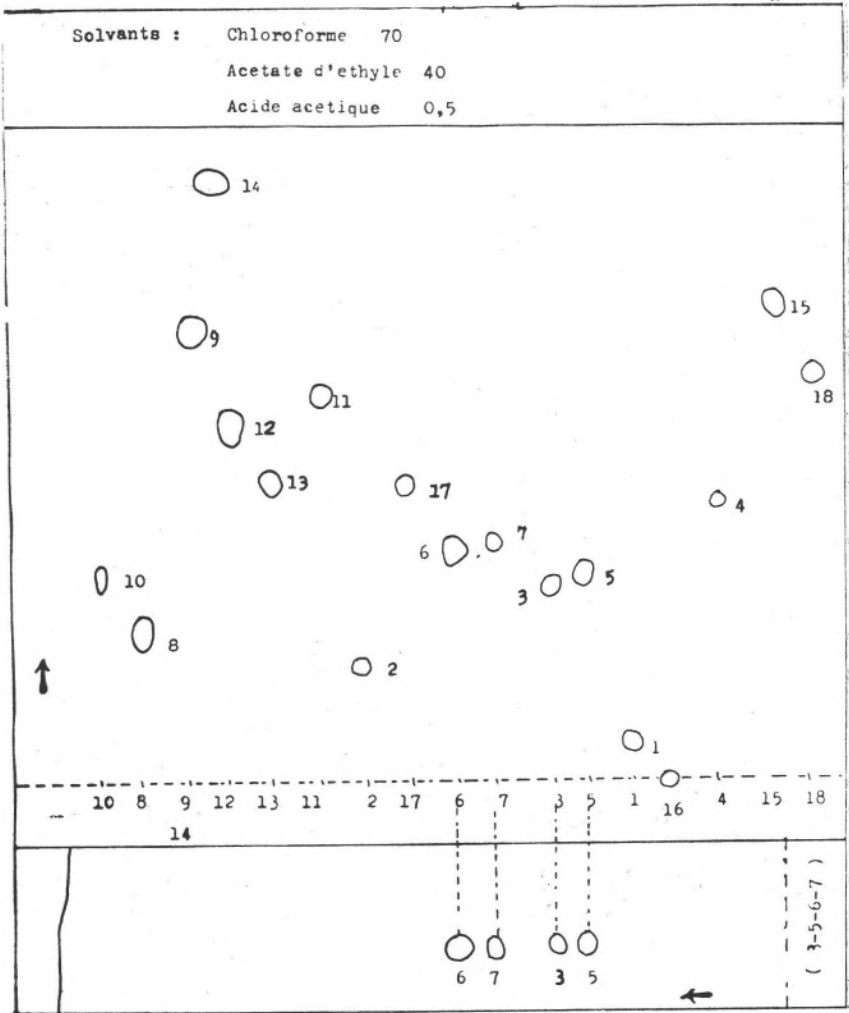
de même de la chromatographie bidimensionnelle dont nous reproduisons le résultat à la page suivante. Rappelons l'expérimentation.

Nous avons choisi pour support le Kieselgel GF 254. Il rend plus aisé la distinction des spots. Les conditions opératoires sont identiques à celles déjà énoncées. On réalise la première chromatographie dans le système de solvants (a) sur un mélange des quatre produits suivants : 3-5-6-7 dans leur solvant respectif déjà cité. Puis on pose les spots des autres substances sur la ligne de migration des quatre drogues séparées dans la première dimension. La deuxième chromatographie a été menée tantôt avec le système de solvants (b) tantôt avec le système de solvants (c). Le solvant (c) semblant donner des résultats plus fiables, nous avons donc retenu ce chromatogramme.

Produits	solvant B	Solvant C
Chlordiazépoxyde	22	10
Demoxepam	27	20
Oxazepam	35	40
Clorazepam	0	51
Lorazepam	37	41
Nitrazepam	48	46,5
Clonazepam	41	35
Cyprazepam	51	48
Prazepam	82,5	74
Médazepam	79	62
Tétrazepam	74	70
Diazepam	69	65
Sulazepam	57	55
Sch. 12. 041	94	94
Témazepam	87	77
Flurazepam	25	0
Flunidazepam	68	59
D. 58 SI	85	68

Nous trouverons ci-contre le tableau des Rf approximatifs des substances étudiées dans les deux systèmes de solvant (b) et (c).

Nous appuierons enfin notre travail par le chromatogramme montrant la séparation des dix huit benzodiazépines étudiées par chromatographie bidimensionnelle en couche mince.



Chromatographie Bidimensionnelle

3) Réactifs révélateurs utilisés

a) Composition et étude expérimentale

Bien que nous nous soyons servis le plus souvent de Kieselgel, pourvu d'un marqueur fluorescent, nous avons tout de même recherché un réactif révélateur susceptible de colorer distinctement les spots chromatographiques.

Quinze réactifs ont été testés. Nous rappellerons entre parenthèse les réactif que ont déjà été utilisés à quelques différences près soit de composition, soit de proportion.

— Réactif 1 (15, 17, 29) : **pulvérisation du mélange**

Hexachlorure de platine à 10 % 10 ml

Iodure de potassium à 4 % (Riedel - De haen) 250 ml

Eau distillée Q.S. 500 ml

— Réactif 2 : pulvérisation du mélange, puis porter dix minutes à l'étuve.

Ammoniaque 5 N (Merck) 30 ml

Nitrate d'argent à 50 % (Riedel-De haen) 30 ml

— Réactif 3 : pulvérisation du mélange

Sulfate de Cérium (Fluka) 1 g

Acide sulfurique 2 N (Merck) 100 ml

— Réactif 4 (29, 44) : pulvérisation du mélange

paradiméthylaminobenzaldéhyde (B.D.H.) 1,5 g

Ethanol 95° 75 ml

Ammoniaque concentré (Merck) 25 ml

— Réactif 5 (7) : pulvérisation du mélange

Bichromate de potassium (Riedel-De haen) 5 g

Acide sulfurique à 40 % (Merck) Q.S. 100 ml

— Réactif 6 (7, 29, 44) : Réactif de Forrest

Acide sulfurique à 30 % en volume (Merck) 25 ml

Bichromate de potassium à 2 % (Riedel-De haen) 25 ml

Acide nitrique à 50 % en volume (Merck) 25 ml

Acide perchlorique à 20 % en volume (Prolabo) 25 ml

— Réactif 7 (2, 5, 19, 22, 24, 32, 34) : réaction de Bratton - Marshall Pulvérisation d'acide chlorhydrique 2 N. Laisser une heure à l'étuve à 100°C. Pulvériser ensuite dans l'ordre: nitrite de sodium 0.5 % dans acide chlorhydrique 0,5 N, solution aqueuse de α -naphtylethylène diamine 0.1 % (Prolabo)

— Réactif 8 : réactif FPN; pulvérisation du mélange extemporané

perchlorure de fer à 5 % (Riedel - De haen) 5 ml

acide perchlorique à 70 % 1 mol.)	}	45 ml
eau distillée 5 vol.)		

acide nitrique conc. (Merck) 1 vol.)	}	50 ml
eau distillée 1 vol.)		

— Réactif 9 : Réactif de Mandelin (14): pulvérisation du mélange vanadate d'ammonium 1 g

acide sulfurique conc. (Merck) 100 ml

— Réactif 10 : réactif E.P. (29, 44): pulvérisation du mélange paradiméthylaminobenzaldéhyde 0,25g dissous dans mélange:

Acide acétique glacial 50 g

Acide orthophosphorique 85 % 5 g

eau distillée 20 ml

— Réactif 11 : réactif au furfural (29, 41, 44)

Solution A (Furfural (Prolabo) 1 ml

acétone (Riedel-De haen) 99 ml

Solution B acide sulfurique conc. (Merck) 4 ml

acétone (Riedel-De haen) 96 ml

pulvérisation de la solution A, puis de la solution B .

— Réactif 12 : (29, 31)

permanganate de potassium 0.02 M

— Réactif 13 : pulvérisation du mélange

Solution A nitrate de bismuth 1,7 g	}	20 ml
acide acétique glacial 100 ml		

Solution B idoure de potasisum 40 g	}	5 ml
eau distillée 100 ml		

eau distillée 70 ml

— Réactif 14 : pulvérisation du mélange

sulfate de cuivre à 10 % (Riedel-De haen) 50 ml

ammoniaque à 2 % 10 ml

— Réactif 15 : réactif de Roux

nitroprussiate de sodium à 10 % (Riedel-De haen) 100 ml

hydroxyde de sodium à 33 % (Merck) 2 ml

permanganate de potassium 0.1 N 5 ml

Les réactifs ont été pulvérisés sur les plaques chromatographiques sèches. La lecture a été faite une heure après.

b) Résultats obtenus

Nous les résumerons dans les tableaux suivants. On a porté horizontalement les réactifs et verticalement les substances.

Substances	Réactif 1 (1 heure après)		Réactif 2 (1 heure après)		Réactif 3 (1 heure après)		Réactif 4 (1 heure après)	
	Kieselgel G	KGF 254	Kieselgel G	KGF 254	Kieselgel G	KGF 254	Kieselgel G	KGF 254
Chlordiazépoxyde	—	blanc	—	—	—	—	—	rose pâle
Demoxépam	violet - rose	rose - brun	—	—	—	—	rose	rose
Oxazépam	violet - rose	violet - rose	—	—	—	—	—	jaune pâle
Clorzépate	—	—	—	—	—	—	—	—
Lorazépam	violet - rose	rose - violet	—	—	—	—	—	—
Nitrazépam	violet	violet - rose	Jaune	—	—	—	Jaune très pâle	jaune pâle
Clonazépam	violet - rose	rose pâle	Jaune	Jaune	Jaune très pâle	Jaune très pâle	—	—
Cyprazépam	violet foncé	violet foncé	—	—	—	—	jaune pâle	jaune pâle
Prazépam	jaune	jaune	—	—	Jaune très pâle	jaune pâle	—	—
Médazépam	brun	brun	orange	orange	jaune orange	jaune orange	orange	orange
Tétrazépam	violet - rose	rose - brun	—	—	—	—	Jaune très pâle	—
Diazépam	jaune	rose - jaune	—	—	Jaune très pâle	jaune pâle	—	—
Temazépam	violet - rose	violet - rose	—	—	Jaune très pâle	jaune pâle	—	—
Sulazépam	jaune	jaune	noir	brun - noir	jaune citron	jaune citron	jaune citron	jaune citron
Sch. 12.041	violet très pâle	rose	—	—	—	—	—	—
Flurazépam	violet	blanc	—	—	Jaune très pâle	—	—	—
Flunidazépam	violet très pâle	—	—	—	—	—	—	—
D 58 St	rose	rose	—	—	—	—	—	—

Sustances	Réactif 5 (1 heure après)		Réactif 6 (1 heure après)		Réactif 7 (1 heure après)		Réactif 8 (1 heure après)	
	Kieselgel G	KGF 254	Kieselgel G	KGF 254	Kieselgel G	KGF 254	Kieselgel G	KGF 254
Chlordiazépoxyde	—	—	blanc	blanc	violet très pâle	violet pâle	—	—
Démoxépam	—	—	verdâtre	brun - vert	violet clair	violet clair	orange très pâle	jaune très pâle
Oxazépam	—	—	jaune très pâle	—	violet foncé	jaune très pâle	jaune très pâle	jaune très pâle
Clorzépate	—	—	—	—	jaune très pâle	jaune très pâle	jaune très pâle	—
Lorazépam	—	—	—	—	orange	orange	—	violet très pâle
Nitrozépam	—	—	—	—	violet foncé	violet foncé	jaune très pâle	violet très pâle
Clonazépam	—	—	—	—	violet clair	violet clair	jaune très pâle	—
Cyprazépam	—	—	blanc	blanc	violet clair	violet clair	—	—
Prazépam	—	—	jaune très pâle	jaune très pâle	—	—	jaune très pâle	jaune très pâle
Médazépam	orange	orange	orange	orange	orange - jaune	orange - jauné	orange	orange
Tétrazépam	—	orange pâle	—	blanc	violet clair	violet clair	jaune très pâle	orange très pâle
Diazépam	—	—	jaune très pâle	jaune pâle	—	—	jaune très pâle	jaune très pâle
Témazépam	—	—	jaune	—	—	—	jaune très pâle	jaune très pâle
Sulazépam	jaune - orange	jaune - orange	jaune vert	jaune citron	—	—	jaune	jaune citron
Sch. 12.041	—	—	jaunâtre	jaunâtre	—	—	—	—
Flurazépam	—	—	jaune	jaune très pâle	—	—	jaune très pâle	jaune très pâle
Flunidazépam	—	—	—	—	—	—	—	—
D. 58 SI	—	—	—	—	rose violet	rose violet	—	jaunâtre

Substances	Réactif 9 (1 heure après)		Réactif 10 (1 heure après)		Réactif 11 (1 heure après)		Réactif 12 (1 heure après)	
	Kieselgel G	KGF 254	Kieselgel G	KGF 254	Kieselgel G	KGF 254	Kieselgel G	KGF 254
Chlordiazépoxyde	—	—	—	—	—	—	jaune pâle	jaune
Démoxépam	—	—	jaune pâle	jaune très pâle	—	—	jaune pâle	jaune
Oxazépam	—	—	—	—	jaune pâle	jaunâtre	jaune pâle	jaune orange
Clorazépate	—	—	—	—	jaune pâle	—	jaune pâle	—
Lorazépam	—	—	—	—	jaune pâle	jaunâtre	—	—
Nitrazépam	—	—	jaune très pâle	—	jaune	jaune	jaune pâle	jaune
Clonazépam	—	—	—	—	—	jaune	jaune pâle	jaune
Cyprazépam	—	—	—	—	—	—	jaune brun	jaune orange
Prazépam	jaune très pâle	—	jaune pâle	jaune pâle	—	—	jaune	jaune
Médazépam	orange	orange	orange	orange	orange	orange	jaune orange	orange
Tétrazépam	—	—	jaune très pâle	—	—	—	jaune pâle	blanc
Diazépam	jaune très pâle	jaune pâle	jaune très pâle	jaune très pâle	—	jaunâtre	jaune	jaune
Témazépam	jaune citron	jaune	jaune très pâle	jaune très pâle	—	—	blanc	blanc
Sulazépam	jaune citron	jaune citron	jaune citron	jaune citron	jaune citron	jaune	jaune citron	jaune
Sch. 12.041	—	—	—	—	—	—	—	—
Flurazépam	orangé pâle	orangé jaune	—	—	orangé	—	jaune brun	jaune
Flunidazépam	—	—	—	—	—	—	jaune pâle	jaune
D. 58 SÍ	—	—	—	—	jaunâtre	—	—	jaune rosé

Substances	Réactif 13 (1 heure après)		Réactif 14 (1 heure après)		Réactif 15 (1 heure après)	
	Kieselgel G	KGF 254	Kieselgel G	KGF 254	Kieselgel G	KGF 254
Chlordiazépoxide	orange très pâle	Rose très pâle	—	—	—	—
Démoxepam	rose orangé	orangé	—	—	orangé pâle	—
Clonazépam	rose orangé	orangé très pâle	—	—	—	—
Lorazépate	orangé pâle	rose orangé	—	—	—	—
Lorazépam	rose pâle	rose orangé	—	—	—	—
Nitrazépam	rose	rose	—	—	—	—
Clonazépam	rose très pâle	rose très pâle	—	—	—	—
Cyprazépam	rose	orangé clair	—	—	—	—
Prazépam	rose	rose orangé	—	—	—	—
Médazépam	orangé	orangé	orangé	orangé	orangé	orangé
Tétrazépam	rose orangé	rose orangé	—	—	—	—
Diazépam	rose orangé	rose orangé	—	—	—	—
Témazépam	rose	rose	—	—	—	—
Sulazépam	orangé clair	jaune	jaune	jaune	jaune vert	jaune
Sch. 12.041	rose orangé	orangé pâle	—	—	—	—
Flurazépam	rose pâle	rose pâle	—	—	orangé pâle	—
Flunidazépam	rose très pâle	—	—	—	—	—
D. 58 SI	rose orangé	orangé	—	—	—	—

RESUME

Après un rappel des travaux antérieurs nous avons réalisé la séparation

1) de 15 benzodiazépines par chromatographie en couche mince monodimensionnelle grâce à l'utilisation de deux solvants

Chloroforme: Ethyl acétate: Acide acétique 70:40:0.5

Benzène : Acetone: Ethanolamine 100:35:1

2) de 18 benzodiazépines par chromatographie en couche mince bidimensionnelle grace aux deux solvants déjà cités et à un troisieme solvant

Cyclohexane : Ethyl acetate: Methanol 60:40:4,5

Nous avons ensuite testé quinze révélateurs susceptibles de permettre l'identification des dérivés étudiés. Les réactifs iodoplatinique et de Dragendorff, en dehors de la lumière ultra - violette, semblent les meilleurs.

ÖZET

Bu konuda yapılan yapılan çalışmaların incelenmesinden sonra,

1) Uygun solvan sistemi olarak Kloroform: Etil asetat: Asetik asit (70:40:0.5) ve Benzen: Aseton: Etanolamin (100:35:1) kullanılarak 15 benzodiazepin'in tek yönlü ince tabaka kromatografisi ile ayırımı gerçekleştirildi.

2) Yukarıdaki iki solvan sistemine ilaveten üçüncü bir solvan sistemi olarak Sikloheksan: Etil asetat: Metanol (60:40:4,5) kullanılmak suretiyle çift yönlü ince tabaka kromatografisi yoluyla 18 benzodiazepin'in ayırımı sağlandı.

3) İncelenen türevlerin tanımı amacıyla 15 revelatör denendi, en uygun revelatörlerin Dragendorff ve İodoplatinat reaktifleri olduğu anlaşıldı. Ayrıca teşhiste ultraviyole ışığından da yararlanılabileceği ortaya kondu.

REMERCIEMENT

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à Messieurs les Docteurs Mario PONTE et ENJALBERT ainsi qu' aux différents laboratoires qui, mettant gracieusement à notre disposition les composés nécessaires à notre expérimentation, nous ont permis de réaliser ces travaux ;

Laboratoires Carlo ERBA (Milan, Istanbul); Clin, Comar, Byla (Paris); Roche (Paris, Istanbul); Schering Corporation (U.S.A); Schiaparelli (Italie); Takeda (Osaka, Japon); Ugo Ravizza (Italie); Warner Lambert Research Institute, research affiliate of Warner Chilcott Laboratories (Morris Plain, U.S.A); Wyeth Pharma GmbH (Münster, R.F.A);

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 — Baumler, J., Rippstein, S., *Helv. Chim. Acta*, **44**, 7-2, 208-9 (1961).
- 2 — Beckstead, H.D., Smith, J.S. *Arzneim. Forsch.*, **21**, 12-2, 003-06 (1971).
- 3 — Besserer, K., Hensler, S., Kohler, E., Mallach, J., *Arzneim. Forsch.*, **21**, 12-2, 003-06 (1971).
- 4 — Beyer, K.H., *Deutsch. Apothek. Zeit.*, **105**, 2, 1529 (1965).
- 5 — Beyer, K.H., Sadee, W., *Arch. Pharm.*, **302**, 152-57 (1969).
- 6 — Bourdon, R., Feger, J., Krikorian, A., Linee, P., *Ann. Biol. Clin.*, **21**, 3-4, 187-218 (1963).
- 7 — Castagnou, R., Artiges, A., *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **107**, 73-78 (1968).
- 8 — Dallas, M.E.J., *J. Chrom.*, **17**, 267-77 (1965).
- 9 — Danhier, A., *J. Pharm. Belg.*, **46**, 9-10, 385-400 (1964)
- 10 — Deminaux, J. P., Badinand, A., *Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon*, **10**, 3, 112-25 (1966).
- 11 — De Silva, J.A.F., Koechlin, B.N., Bader, G., *J. Pharm. Sc.*, **55**, 692-702 (1966).
- 12 — De Silva, J.A.F., Puglisi, C.V., *Analytic. Chem.*, **42**, 14, 1725-36 (1970).
- 13 — Di Carlo, F. J., Crew, M.C., Melgar, M.D., Haynes, L.J., *J. Pharm. Sc.*, **58**, 8, 960-2 (1969).
- 14 — Fie, W.W., *Analyt. Chem.*, **38**, 12, 1967-1701 (1969).
- 15 — Gendi, S.E.L., Kisser, W., Machata, G., *J. Chrom.*, **23**, 2-22, Table: 35 (1966).
- 16 — Grafe, G., *Deutsch. Apothek. Zeit.*, **112**, 1, 8-13 (1972).
- 17 — Halot, D., *Prod. Hrob. Pharm.*, **25**, 2-3, 106-109 (1970).
- 18 — Hermann Lab. Geigy, Basel, Suisse
- 19 — Heyndrickx, A., De Leenheer, A., *Fram. Tijdsch.*, **5**, 2466-54 (1971).
- 20 — Hirtz, Met. Analyt. Recherch. Metabolism. Medic., Masson et Cie, 81-85 (1968).
- 21 — Kamm, G., Baier, R., *Arzneim. Forsch.*, **19**, 2, 213-15 (1969).
- 22 — Kamm, G., Kelm, R., *Arzneim. Forsch.*, **19**, 10, 1959-62 (1969).
- 23 — Kimmel, H.B., Walkenstein, S.S., *J. Pharm. Sc.*, **56**, 4, 538-9 (1967).
- 24 — Koechlin, B.A., Schwartz, M.A., Krol, G., Oberhansli, W., *J. Pharm. Exp. Thérap.*, **148**, 3, 399-411 (1965).
- 25 — Lafargue, P., Meunier, J., Lemontey, Y., *J. Chrom.*, **62**, 3, 423-29 (1971).
- 26 — Lafargue, P., Pont, P., Meunier, J., *Ann. Pharm. Fran.*, **28**, 5, 343-54 (1970)

B. PERROT - D. MISHON - G. BOURGEOIS - A. BRACHET-LIERMAIN - M. BERTUCAT

- 27 — Lauffer, S., Schemid, E., *Arzneim. Forsch.*, **19**, 5, 740-1 (1969).
- 28 — Marca, J., Muhlemann, H., *Pharm. Acta. Helv.*, **9**, 588-69 (1971).
- 29 — Noirfalise, A. *J. Chrom.*, **20**, 61-77 (1965).
- 30 — Oelschlager, H., Volke, J., Lim, G.T., Frank, U., *Arzneim. Forsch.*, **16**, 288-87 (1966).
- 31 — Pauluss, w., Hoch, W., Keymer, R., *Arzneim. Forsch.*, **13**, 7, 609-10 (1963).
- 32 — Pribilla, O., *Arzneim. Forsch.*, **15**, 10, 1148-52 (1965).
- 33 — Randerath, K., *Chrom. Couch. Min.*, Gauthiers-villars, Paris (1964).
- 34 — Rieder, J., *Arzneim.Forsch.*, **10**, 1034-48 (1965).
- 35 — Schwartz, M.A., Koechlin, B.A., Postma, E., Palmer, S., Krol, G., *J. Pharm. Exp. Thérap.*, **149**, 3, 423-35 (1965).
- 36 — Schwartz, M.A., Postma, E., *J. Pharm. Sc.*, **55**, 1358-62 (1966).
- 37 — Stahl, E., Schroters, G., Kraft, G., Reny, G., *Die Pharmazie*, **11**, 633 (1956).
- 38 — Sunshine, I. *Nature*, **199**, 1103-4 (1963).
- 39 — Thomas, J.J., Dryon, L., *J. Pham. Belg.*, **481**, (1964).
- 40 — Thomas, J.J., Dryon, L., *J. Pharm. Belg.*, 163-87 (1967).
- 41 — Unterhalt, B., Reinhold, K., *Deutsch. Apothek. Zeit.*, **III**, **46**, 1773-77 (1971).
R.A., *J. Pharm. Sc.*, **53**, 1181-6 (1964).
- 43 — Weist, F.R., *Arzneim. Forsch.*, **18**, I, 87-89 (1968).
- 44 — Zingales, I., *J. Chrom.*, **31**, 405-19 (1967).