

Mise Au Point D'une Méthode de Dosage de L'I. N. P. E. A.

İ. N. P. E. A.'nın Miktar Tayini Yönteminin Araştırılması

Seçkin ÖZDEN* Pierre LEVILLAIN** Michel BERTUCAT*

Dans le cadre d'une étude plus générale sur les béta-bloquants, nous avons cherché à mettre au point une méthode de dosage de l'I. N. P. E. A. (chlorhydrate de l-p-nitrophényl-2-isopropyl-aminoé-thanol). Ce produit en effet, est très utilisé dans les troubles cardiaques causés par les stress et est présenté actuellement en Turquie sous 2 formes galéniques : comprimés et ampoules. Il existe peu de méthodes de dosage pour ce composé. Nous avons donc recherché une technique susceptible d'être étendue à l'ensemble des béta - bloquants. C'est pourquoi nous avons choisi une réaction de la fonction amine et finalement opté pour la formation d'une paire d'ion avec un colorant anionique: le bleu de bromophénol.

ETUDE EXPERIMENTALE

A — Choix du Colorant

De nombreux colorants du type des sulfone-phtaléines ont été utilisés pour doser les amines (1). Toutefois dans une étude systématique (2) on a montré que les colorants les mieux adaptés à ce genre de dosage étaient classés par ordre décroissant d'intérêt : bleu de bromothymol, vert de bromocrésol, bleu de bromophénol, pourpre de bromocrésol et bleu de thymol Nous avons donc essayé initialement ces différents colorants en les faisant réagir sur une solution d'I.N.P.E.A et en extrayant le produit formé par différents solvants organiques non miscibles à l'eau.

Ce test nous a permis de constater que, contrairement aux données de la littérature, c'était avec le bleu de bromophénol que nous avions les solutions les plus fortement colorées. Nous avons donc, sans études complémentaires, sélectionné ce corps comme

Redaksiyona verdiği tarih 7.Ekim.1975

* Farmasötik Kimya Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi

** Analitik Kimya Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi

réactif. Il faut toutefois noter que, des différents colorants étudiés c'est celui qui possède le pK_a le plus bas (4 environ contre 5 à 8 pour les autres colorants). Comme nous le verrons ultérieurement, la réaction est plus sensible en milieu acide c'est pourquoi il y a sans doute intérêt à utiliser un colorant restant sous forme anionique même pour des pH relativement bas.

B — Etude de la réaction en phase aqueuse

Pour étudier les différentes étapes de la réaction en phase aqueuse nous avons opéré selon le protocole général suivant, que nous avons ensuite adapté aux différentes études que nous voulions effectuer.

A 0.2 ml d'une solution aqueuse $10^{-3}M$ d'I.N.P.E.A., nous avons ajouté 2.8 ml d'eau distillée, 1 ml d'une solution tampon et 1 ml d'une solution $2.5 \cdot 10^{-3}M$ de bleu de bromophénol. Après mélange, nous avons ensuite extrait par un solvant organique (le plus souvent acétate d'éthyle ou chloroforme). Par ailleurs nous avons préparé une solution identique, mais ne renfermant pas d'I.N.P.E.A. pour constituer le témoin des réactifs.

1) Influence du pH

Pour cette étude nous avons fait varier le pH du milieu de réaction à l'aide d'un tampon acide acétique-acétate de sodium ou d'un tampon acide citrique-phosphate disodique permettant de couvrir la zone de pH comprise entre 2.6 et 5.5 environ.

L'extraction a été effectuée par 15 ml de chloroforme. Les résultats sont rassemblés sur la Figure 1.

On peut noter :

a) que le témoin des réactifs n'est pas coloré, sauf en milieu très acide (courbe 1) inférieur à pH 3.2.

b) que le pH donnant une coloration maximum pour la solution étudiée est compris entre 3 et 3.5 (courbe 2).

Compte tenu de ces données nous avons choisi de travailler à un pH voisin de 3.5 pour éviter une interférence éventuelle due à une coloration témoin. Le tampon acide acétique-acétate nous ayant fourni des résultats légèrement supérieurs, nous l'avons finalement adopté.

2) Influence du volume de la phase aqueuse

Pour effectuer cette étude, nous avons fait varier de 0 à 5 ml le volume d'eau distillée initialement prévu (2.8 ml), le volume total

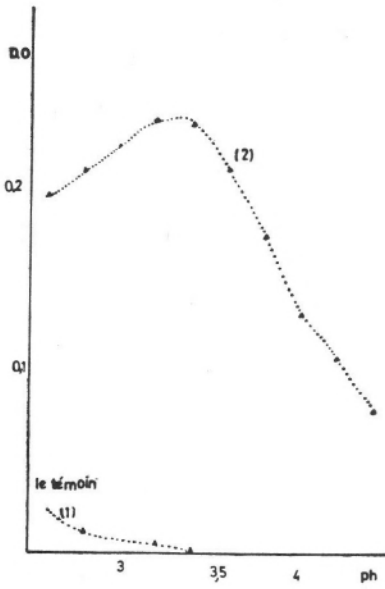


Fig. 1. Influence du pH

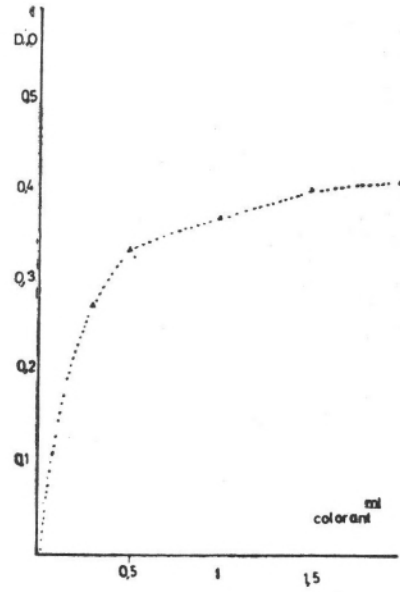


Fig. 3. Influence de la concentration en colorant

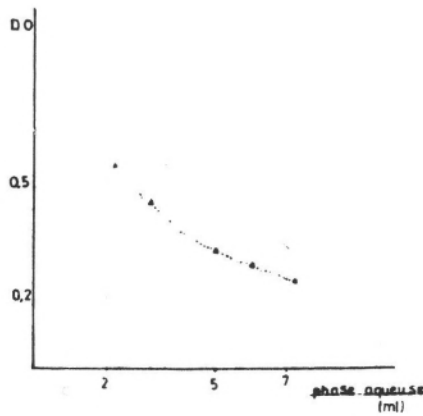


Fig. 2. Influence du volume de la phase aqueuse

de phase aqueuse variant ainsi de 2.2 à 7.2 ml. Nous avons opéré l'extraction par 5 ml de chloroforme. Les résultats sont rassemblés dans la Figure 2.

On peut noter qu'un accroissement du volume de la phase aqueuse entraîne une diminution importante de l'absorption de la phase organique ce qui traduit une solubilité marquée dans la phase aqueuse ou une dissociation de la paire d'ions formée.

Pour augmenter la sensibilité de la réaction, on est donc tenté de diminuer ce volume. Cependant des phénomènes parasites (vraisemblablement associations moléculaires) peuvent se produire lorsque le volume se trouve réduit, entraînant des perturbations dans la réaction. Ceci nous a amené à opérer sous un volume final de 5 ml pour la phase aqueuse.

3) Influence de la concentration en colorant

Pour étudier cette influence nous avons fait varier le volume de solution de bleu de bromophénol de 0.3 à 2 ml (la concentration finale de la phase aqueuse variant de 2.77 à $8.33 \cdot 10^{-4} \text{M}$). L'extraction a été effectuée par 5 ml de chloroforme. Les résultats sont rassemblés Figure 3.

On note qu'un accroissement de la concentration en colorant entraîne une augmentation importante de la coloration de la phase organique (sans que la coloration des témoins varie de manière significative). Ceci traduit donc l'instabilité de la paire d'ion formée, l'équilibre se trouvant déplacé par un excès de réactif. Toutefois la présence d'une concentration importante du colorant peut entraîner des phénomènes d'association moléculaire perturbant les dosages. Nous avons donc finalement préféré utiliser une concentration finale $5 \cdot 10^{-4} \text{M}$, correspondant à l'utilisation d'un ml de la solution de colorant.

C — Etude de l'Extraction

1) Choix du solvant

Le solvant utilisé doit à priori être insoluble dans l'eau et extraire la paire d'ion sans extraire le bleu de bromophénol.

Après un premier essai, 4 des 12 solvants essayés ont retenu notre attention : benzène, chloroforme, acétate d'éthyle et acétate de butyle.

Les esters permettant d'obtenir des colorations intenses même pour de faibles quantités de produit, nous avons cherché tout d'abord à les utiliser. Cependant des difficultés très importantes se sont présentées : impossibilité d'obtenir des mesures respectant la loi de Beer-Lambert, déplacement du maximum du spectre d'absorption etc., Ces phénomènes sont en général à rattacher à des possibilités d'interaction moléculaire variant avec la concentration en réactif, la constante diélectrique du milieu etc., et empêchent l'obtention de dosages valables.

Le benzène donnant des colorations très faibles nous avons finalement opté pour le chloroforme.

2) Volume du solvant organique

Pour choisir le volume de solvant organique à employer nous avons dû tenir compte de 2 données :

a) L'intensité de la coloration décroît lorsque le volume du solvant utilisé augmente (Figure 4). Il semble donc logique d'utiliser un volume aussi faible que possible pour accroître la sensibilité de la technique.

b) Toutefois lorsque ce volume est trop faible la loi de Beer - Lambert n'est plus respectée. Ce phénomène s'observe (quoique moins marqué que dans l'acétate de butyle mais pour les mêmes raisons) pour des volumes de solvant inférieurs à 10 ml. Pour des volumes supérieurs on observe par contre une bonne linéarité des courbes reliant le densité optique à la concentration.

D — Mesure spectrophotométrique

D'après le spectre obtenu (spectrophotomètre Unicam SP 1700, cuve de 1 cm de traversée), nous pouvons constater que le maximum est situé à 412 nm (Figure 5).

METHODE DE DOSAGE ET APPLICATION

En fonction des données précédentes nous pouvons proposer la méthode suivante pour une solution à doser renfermant moins de 250 mg par litre d'I.N.P.E.A.

A — Réactifs**R1) Solution de bleu de bromophénol $2.5 \cdot 10^{-3} M$**

Dissoudre 167.5 mg de colorant dans environ 10 ml d'éthanol puis compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.

R2) Solution tampon

Solution a : acide acétique 0,1 M obtenu par dissolution de 1.5 g d'acide acétique (1.43 ml) dans l'eau distillée : q.s.p. 250 ml.

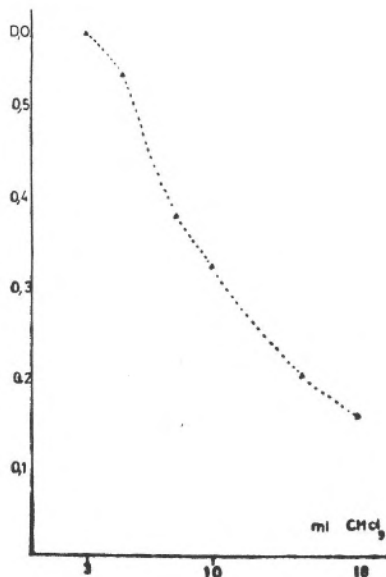


Fig. 4. Influence du volume de solvant extracteur

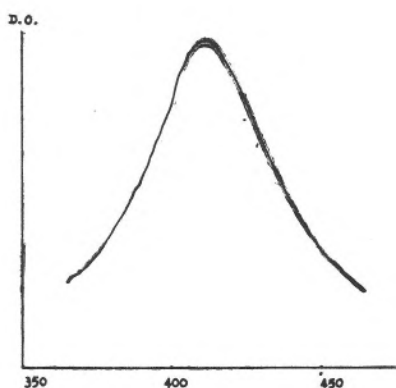


Fig. 5. Mesure spectrophotométrique

Solution b : acétate de sodium 0.1 M obtenu par dissolution de 3.4 g d'acétate de sodium dans l'eau distillée q.s.p. 250 ml.

Pour obtenir le tampon, mélanger 9 volumes de solution a et 1 volume de solution b.

B — Mode opératoire

Solution à doser	1 ml
eau distillée	2 ml
solution tampon (R2)	1 ml
solution de colorant (R1)	1 ml

Mélanger, attendre 5 minutes. Ajouter 15 ml de chloroforme et agiter pendant 1 minute.

Laisser les phases se décanter. Au besoin, faciliter la séparation en centrifugeant pendant 5 à 10 minutes jusqu'à obtention d'un surnageant limpide.

Lire la densité optique du surnageant à 412 nm en réglant le 100 % de transmission sur une solution ne renfermant pas d'I.N.P.E.A., traitée dans les mêmes conditions.

L'étalonnage peut être effectué à partir d'une solution renfermant 250 mg par litre d'I.N.P.E.A

C — Contrôle de la méthode

1) linéarité : Comme on peut le constater la linéarité de la courbe est très bonne (Figure 6).

2) sensibilité : d'après la courbe obtenue on peut fixer à $5 \mu\text{g}$ dans 1 ml. la quantité de substance qu'il est possible de doser avec une bonne précision.

3) reproductibilité : pour tester la reproductibilité nous avons effectué successivement deux courbes d'étalonnage. Comme le montre la figure 6, les résultats obtenus sont très satisfaisants.

D — Applications

Nous avons appliqué notre méthode au contrôle des ampoules et des comprimés d'I.N.P.E.A.

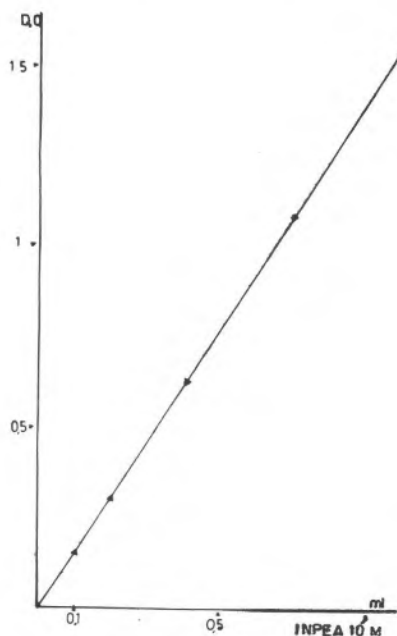


Fig. 6. Contrôle de la linéarité et de la reproductibilité de la méthode

Pour les ampoules : nous avons prélevé 0,5 ou 1 ml de la solution.

Pour les comprimés : nous avons extrait le produit en écrasant 5 comprimés (renfermant 50 mg d'I.N.P.E.A. par unité) dans un mortier et en extrayant le produit par de l'eau distillée, ajoutée par petite quantité. Après filtration, le volume était complété à 100 ml puis 10 ml de la solution obtenue sont dilués à 100 ml. Nous avons effectuée le dosage sur 0,5 ou 1 ml de cette solution.

Par ailleurs, nous avons vérifié que les différents excipients utilisés ne perturbaient pas la réaction.

Nous avons ainsi trouvé une teneur de 45 mg par comprimé et 45,5 mg par ampoule.

CONCLUSION

La méthode que nous proposons pour le dosage de l'I.N.P.E.A., est simple, rapide, et présente une sensibilité comme une reproductibilité très satisfaisante.

Elle s'applique aux différentes spécialités, renfermant ce médicament, vendues en Turquie car les différents excipients n'interfèrent pas dans la réaction.

RESUME

Nous proposons une méthode colorimétrique de dosage de l'I.N.P.E.A. basée sur la formation d'une paire d'ions avec le bleu de Bromophénol. Le produit obtenu est extrait par le chloroforme et dosé à 412 nm. Nous avons étudié l'influence des conditions opératoires et appliqué la méthode proposée au dosage du produit dans des ampoules et des comprimés.

ÖZET

Beta-blokan maddelerden biri olan İ.N.P.E.A.'nın kolorimetrik olarak miktar tayini metodu araştırıldı. Bulunan metodun temeli Bromofenol mavisi ile iyon çifti oluşumudur. Bu renk reaksiyon sonucu teşekkül eden madde kloroform ile tüketildi. 412 nm de maksimum absorpsiyon ölçüldü. Ayrıca çalışma koşullarının bu renk reaksiyonu üzerinde olan etkileri araştırıldı.

Böylece bulunan bu miktar tayini metodu İ.N.P.E.A. ampul ve tabletlerine uygulandı.

Nous exprimons nos remerciements aux laboratoires Selvi (Milano) et Santa Farma (İstanbul) pour leur don d'I.N.P.E.A. pur et sous forme de spécialité.

B I B L I O G R A P H I E

1. Higuchi, T., Bodin, J. I. : Alkaloids and other basic nitrogenous compounds. Chapter VIII, p. 413-418 in : Higuchi, T. et Brochmann-Hanssen, E. - *Pharmaceutical Analysis*, New York and London Interscience, (1961).
2. Das Gupta, V. : Selection of a dye and organic solvent for the analysis of amines - **Canadian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 5 (2), 44 1970).