

Procédés de Diagnose et de Dosage des Dérivés Dibenzo 1,4 diazépin 11 ones

Dibenzo 1,4 diazépin 11 on Türevlerinin Teşhis ve Miktar Tayini
Metotları

Tuncel ÖZDEN* A. BRACHET-LIERMAIN** Michel BERTUCAT*

Dans le cadre d'une étude sur la diagnose et la séparation des dérivés tricycliques à activité psychotrope ou antihistaminique, nous avons envisagé l'étude analytique des dérivés à noyau dibenzo 1,4 diazépin 11 one ou benzopyridino 1,4 diazépin 11 one.

Ces dérivés sont au nombre de quatre. Nous en donnons dans le Tableau I les formules et les dénominations commerciales courantes.

Les travaux sur les caractères analytiques de ces dérivés sont peu nombreux, et surtout consacrés à l'identification du Dibenzépine par chromatographie en couche mince.

Nous avons divisé nos travaux en trois parties :

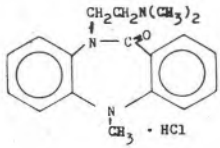
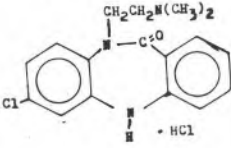
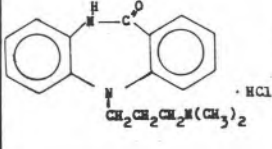
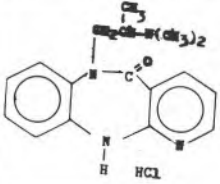
- I) Examen des caractères physiques.
- II) Examen des caractères chimiques :
 - 1°) Réactions qualitatives
 - 2°) Réactions quantitatives

Redaksiyona verildiği tarih : 6. Mayıs. 1975

* Farmasötik Kimya Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi

** Hopital des Enfants, 33000 Bordeaux, France

TABLEAU I. — FORMULES

Formules	Dénomination chimique et activité	Nom commercial
	Dibenzépíne (psychotrope)	Novéril
	Clobenzépám (Antihistaminique)	Tarpan
	Propizépíne (Psychotrope)	
	UPJOHN U. 17660 (Antihistaminique)	Vagran 50

III) Identification et séparation par chromatographie en couche mince

I) Caractères physiques des Dibenzo 1,4 diazépín 11 ones

Les quatre composés sont utilisés sous forme de chlorhydrate. Ce sont des poudres cristallines blanches sauf le Propizépíne qui est jaune pâle, à saveur amère.

Point de fusion (Banc de Köfler) :

Dibenzépine HCl : 240°C Clobenzépam HCl : 247°C

Propizépine HCl : 218 — 220°C U. 17660 HCl : 223 — 224°C

Ces quatre dérivés sont solubles dans l'eau, le méthanol, l'éthanol et le chloroforme.

Spectres d'absorption dans l'ultra-violet :

Les spectres des quatre composés présentent les mêmes caractéristiques avec un maximum entre 220 nm et 230 nm et un épaulement à 240 nm pour le Dibenzépine le Propizépine et le U. 17660.

Maxima

Dibenzépine	:	226 nm	Clobenzépam	:	230 nm
Propizépine	:	220 nm	U. 17660	:	224 nm

II) Caractères chimiques

Nous avons envisagé les possibilités soit d'identification, soit de dosage des dérivés.

A) Réactions qualitatives

Nous avons appliqué à ces dérivés un certain nombre de réactifs simples permettant la diagnose soit sur le produit pur (poudre cristalline), soit sur le produit en solution aqueuse. L'ensemble des résultats est consigné dans le Tableau II.

Composition des réactifs utilisés :

- 1°) Réactif acétocitrique : Acide citrique 1 g; Acide acétique 10 ml; Anhydride acétique 90 ml

Tableau II — Reactions colorées

Réactif	DIBENZEPINE		CLOBENZEPAM		PROPIZEPINE		U 17660	
	Poudre	Solution aqueuse 2 ml	Poudre	Solution aqueuse 2ml	Poudre	Solution aqueuse 2 ml	Poudre	Solution aqueuse 2 ml
H ₂ SO ₄ Concentré 2 ml	Incolore	Incolore	Incolore	Jaune brun	Jaune	Jaune	Incolore	Vert
HNO ₃ Concentré 2 ml	Jaune	Jaune	Jaune	Jaune	Jaune	Jaune	Jaune	Jaune
Réactif Marquis (H ₂ SO ₄ formolé)	Incolore	Incolore	Incolore	Vert Pâle	Jaune pâle	Jaune pâle	Incolore	Vert Pâle
Réactif Phosphocérique	Bleu	Rouge	Bleu	Marron	Incolore	Incolore	Jaune vert	Jaune rouge
Réactif Xanthidrol	Violet clair	—	Violet foncé	—	Vert Jaunatre	—	Vert emeraude	—
Réactif acéticitrique	Violet rouge	—	Violet rouge	—	Violet rouge	—	Violet rouge	—

Le réactif peut être utilisé 12 heures après sa préparation. Mettre dans un tube à essai 3 ml de réactif et quelques milligrammes du produit à examiner. Porter au bain marie bouillant pendant 10 minutes.

- 2°) Réactif au xanthidrol (10) : Xanthidrol 20 mg; Acide chlorhydrique 1 ml; Acide acétique Q.S 100 ml.
Même mode opératoire qu'au 1° mais laisser en contact au bain - marie pendant 40 minutes.
- 3°) Réactif phosphocérique (7) : Sulfate de cérium 0,632 g; Ammoniaque 15 gouttes; Eau 10 ml; Acide phosphorique 80 ml. Après agitation compléter à 100 ml avec l'acide phosphorique.

2°) Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse est devenue depuis quelques années une méthode courante et pratique à la fois de détection et de dosage. Clarke (2) signale pour le Dibenzépine l'emploi du 3 % XE 60 silicon nitril polymère comme phase stationnaire.

Nous avons réalisé la séparation des quatre dérivés en opérant dans les conditions suivantes :

— Appareil Chromatographe Hewlett Packard 5750 à détecteur à ionisation de flamme

— Colonne inox, longueur 2 m

— Support : Gas chrom Q = 80.100 meshes

— Phase stationnaire : OV₁ 3 %
 OV 225 3 %

— Température : — Four 230°C

— Injecteur 280°C

— Détecteur 280°C

- Gaz vecteur — Azote 28 ml/mn; Hydrogène 25 ml/mn
- Air 250 ml/mn
- Les produits injectés étaient dissous dans du chloroforme.

Résultats

L'usage de l'OV 1 ne permet pas la séparation du Dibenzépíne et du Propizépíne. Par contre comme le montre le chromatogramme (Figure 1) en opérant avec l'OV 225 il est possible d'identifier les quatre dérivés Une application quantitative doit pouvoir être envisagée.

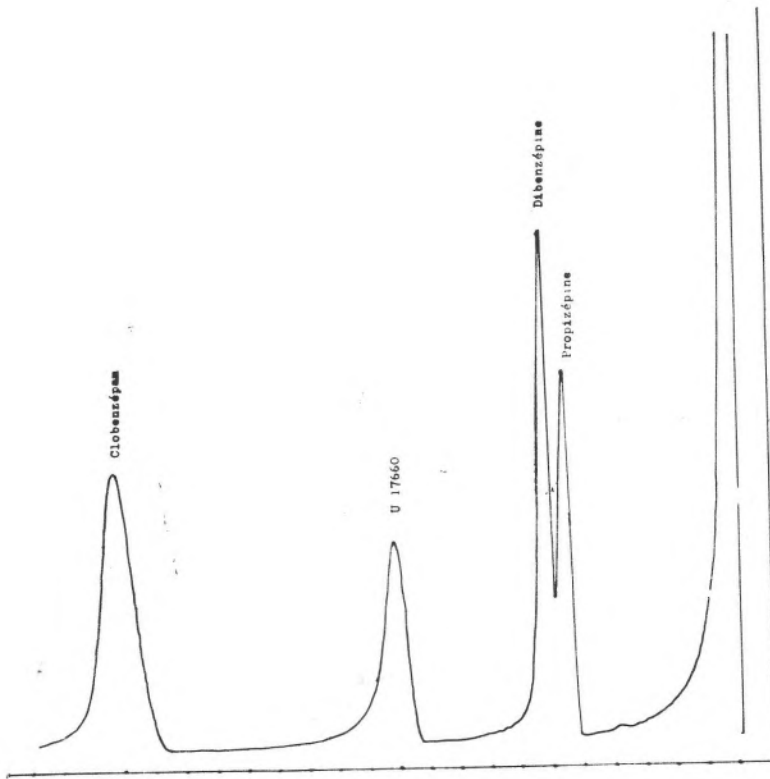


Fig. 1 — Chromatogramme en phase gazeuse

B) Réactions quantitatives

Les possibilités de dosage sont nombreuses soit par titrimétrie, soit par colorimétrie.

1°) Titrimétrie

L'acide perchlorique en milieu acétique, en présence de Cristal-violet ou d' α -naphtylbenzéine comme indicateurs, est le réactif le plus employé et donne d'excellents résultats (± 0.5 %).

A noter que le Propizépine se comporte comme bibasique.

Nous avons appliqué cette technique au Clobenzépam et au Dibenzépine sous forme de spécialités (comprimés), et avons obtenu les résultats suivants :

Composés	Spécialités	Trouvé	Théorie	%
Dibenzépine	Novéril	76.4 mg	80 mg	95.5
Clobenzépam	Tarpan	37.92 mg	40 mg	94.8

Malheureusement l'acide perchlorique présente le désavantage de n'être pas applicable directement aux produits en solution aqueuse. Yalçındağ indique l'emploi possible du Sodium Laurylsulfate (11) dans ce cas.

2°) Colorimétrie

Les méthodes colorimétriques permettent de réaliser facilement le dosage de ces composés soit sous forme de comprimés, soit sous forme de solutions.

Les méthodes que nous avons utilisées sont basées sur des réactions de la fonction amine, en particulier la formation d'une paire d'ion avec un colorant anionique (9).

Parmi les colorants habituellement employés à cet effet, nous avons sélectionné la Tropéoline 00 et le Bleu de Bromophénol. Ce dernier dans un travail précédent (9) nous avait permis de doser avec précision l'INPEA dans plusieurs spécialités.

L'usage de la Tropéoline 00 est cité par Haussler (5,6) en particulier pour le dosage des alcaloïdes, et par Comi (3) pour celui du Difepanol. Gauch et Modestin dosent le Dibenzépíne dans le plasma par cette méthode en opérant à pH 4,6 (4).

Conditions opératoires

1°) Nous avons déterminé dans un premier temps le pH permettant d'avoir un maximum de coloration. Les courbes d'intensité en fonction du pH montrent qu'en règle générale pour ces quatre composés le meilleur pH se situe à pH 4,1. C'est donc ce pH que nous avons adopté pour effectuer nos dosages.

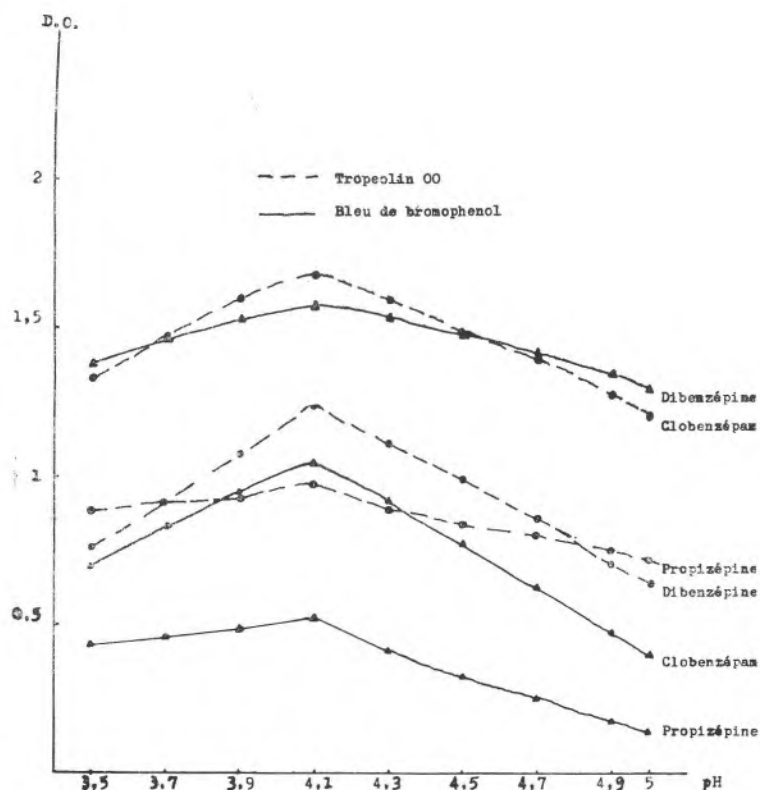


Figure 2 — Influence du pH

2°) Mesures spectrophotométriques

D'après les spectres obtenus, les maxima de réaction se situent à

— 412 nm (dosage par le bleu de bromophénol) (Figure 3)

— 546 nm (dosage par la tropéoline 00) (Figure 4)

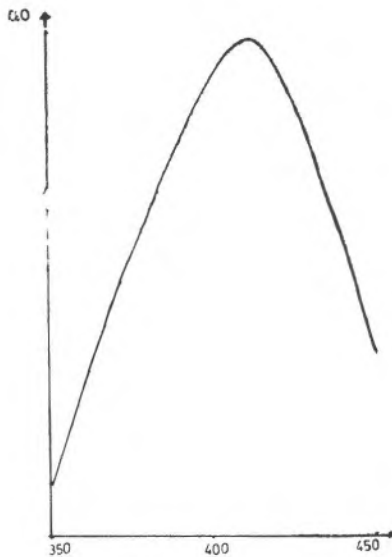


Figure 3

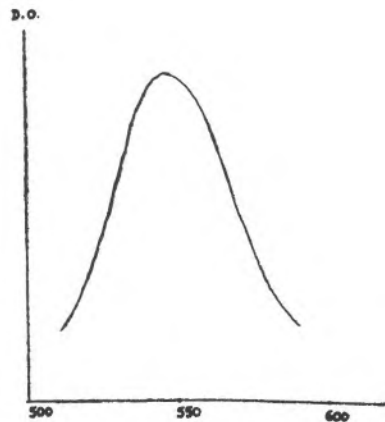


Figure 4

3°) Techniques utilisées

a) Tropéoline 00

Solution à doser	1 ml
Eau distillée	2 ml
Tropéoline 00	1,5 ml (solution aqueuse à 50 mg %)
Tampon pH 4,1	1,5 ml (Sodium acétate - acide acétique)
Dichlorométhane	10 ml

Après agitation et décantation, mesurer 5 ml de la phase dichlorométhane, ajouter 0.5 ml de méthanol sulfurique à 1 %. Lire à 546 nm par rapport à un blanc sans produit.

L'étalonnage est effectué à partir d'une solution à 100 mg/litre du produit à doser.

b) Bleu de bromophénol

Solution à doser	1 ml
Eau distillée	2 ml
Tampon pH 4,1	1 ml
Bleu de bromophénol	1 ml (solution 2.5×10^{-3} M)

Après mélange, attendre 5 minutes, puis ajouter 15 ml de chloroforme et agiter. Laisser décanter et mesurer la densité optique du surnageant à 412 nm en réglant le 100 % de transmission sur une solution ne renfermant pas de produit, traitée dans les mêmes conditions. L'étalonnage se fait grâce à une solution du produit à doser, à la concentration de 200 mg/litre.

4°) Résultats obtenus

Ces méthodes sont applicables pour des concentrations variant de 5 à 100 microgrammes par ml pour la Tropéoline 00 de 5 à 200 microgrammes par ml pour le bleu de bromophénol

Nous avons appliqué ces techniques au contrôle des comprimés et ampoules de Novéril et comprimés de Tarpan. (Tableau III)

Tableau III Résultats des dosages

Spécialités	Théorie	trouvé				HClO ₄ en %
		Tropéoline 00		Bleu de Bromophénol		
		mg	%	mg	%	
Novéril						
comprimés	80 mg	77.1	96.3	76.8	96	95.5
ampoules	40 mg	42.6	106.5	42.4	106	
Tarpan						
comprimés	40 mg	38	95	38.04	95.1	94.8

III) Séparation chromatographique

La chromatographie en couche mince est une méthode très utilisée actuellement pour l'identification et la séparation des composés.

C'est ainsi que le Dibenzépine a été séparé d'autres molécules psychotropes (Dibenzoazépines, Benzodiazépines, etc) grâce à cette méthode (1, 2, 4, 8). Parmi les solvants utilisés dans ce but citons :

- Benzène : acétone: diéthylamine 50:10:5
- Benzène acétone: ammoniacque à 25 % 50:10:10
- Benzène : acétone: acide acétique 50:50:0.5
- Ether : acétone: ethyle acétate: diéthylamine 85:11:2:2
- n. Butanol : toluène : méthanol : eau : acide acétique
22:48:18:7:5 30:30:16:14:10
- Méthanol : cyclohexane: methyle acétate 17.8:33.6:48.6 (en poids)
- Méthanol : ammoniacque 100:1.5
- n.Heptane : chloroforme: ethanol à 95° 65:35:6

Yalçındağ (11) signale pour l'identification du Clobenzépam l'utilisation du mélange Acétone: méthanol: ammoniacque 50:50:1

Malheureusement dans le cas d'un mélange des quatre dérivés dibenzo. 1,4 diazépines, ces solvants ne nous ont pas donné satisfaction. C'est pourquoi nous avons donc essayé un certain nombre de solvants différents de ceux déjà cités.

- Benzène : acétone: ethanolamine 70:30:1
- Benzène : ethyle acétate: méthanol 50:40:20
- Cyclohexane : acide acétique 99:1
- Ethyle acétate : ethanol: diméthylformamide 70:10:10
- n.Pentanol : ethanol: ammoniacque 80:10:10 et 80:10:15
- Isobutanol : ethanol: ammoniacque 80:10:10
- Ether de pétrole : butyle acétate: ethanol 40:25:15
- Dioxane : ether de pétrole: formamide 60:30:10
- Chloroforme : ethyle acétate: acide acétique 70:30:2
- Cyclohexane : ethyle acétate: méthanol 55:40:5 ; 55:40:15
40:35:30 ; 40:40:30

Deux solvants peuvent être retenues. Ce sont

— Solvant 1: n.Hexane: ethyle acétate: méthanol 40:40:40

— Solvant 2: Tétrachlorure de carbone: isobutanol: méthylethylecétone: ammoniacque 50:40:25:2

Nous donnons dans le tableau IV les Rf obtenus avec ces deux solvants

Tableau IV - Rf

Dérivés	Solvant 1 (Rf x 100)	Solvant 2 (Rf x 100)
Clobenzépam	44	87
Dibenzépíne	37	83
Propizépíne	26	79
U. 17660	8	26

Protocole expérimental

Les plaques ont été réalisés avec le Kiesegel G. F 254 Merck (épaisseur 0,3 mm avec activation à 110°C).

Les produits ont été dissous dans le méthanol à la concentration de 2 mg/ml.

La révélation des chromatogrammes s'est faite soit par examen en lumière ultra - violette à 254 nm, soit par des réactifs chimiques. Le Tableau V donne les résultats obtenus avec ces derniers.

Tableau V. - Colorations des spots chromatographiques

Composés	Réactifs			
	Forrest	Dragendorff	Phospho cérique	Cérium sulfate
Clobenzépam	Rose	orangé	Bleu	Marron
Propizépine	Gris noir	orangé	Marron	Marron
Dibenzépine	—	orangé	—	Marron
U.17660	Jaune*	—	brun	Violet

* La coloration n'est pas immédiate

Les réactifs Vanilline sulfurique, para Diméthylaminobenzaldéhyde ne nous ont donné aucun résultat.

Dans le cas des spécialités l'extraction se fait par le méthanol ou le chloroforme à partir des comprimés. Dans le cas des ampoules, le soluté est dilué avec du méthanol.

CONCLUSION

Nous avons envisagé les différents caractères analytiques des dérivés Dibenzo 1,4 diazépine 11 ones. L'identification peut se faire soit par des réactions colorées, soit par chromatographie en couche mince ou en phase gazeuse. Les méthodes colorimétriques de dosage présentent l'avantage de s'adapter aux formes pharmaceutiques existantes.

RESUME

Les caractéristiques physiques et chimiques de 4 dérivés Dibenzo 1,4 diazépine 11 ones sont passées en revue. Les méthodes de dosage sont décrites, les méthodes colorimétriques pouvant s'appliquer directement à toutes les formes pharmaceutiques existantes. L'identification et la séparation par chromatographie en couche mince ou par phase gazeuse sont envisagées.

ÖZET

Bu çalışmada 4 tane Dibenzo 1,4 diazépín II on yapısındaki türevin fiziksel ve kimyasal özellikleri incelendi. İnce Tabaka ve Gaz Kromatografisi metodu ile teşhis ve ayırımları sağlandı. Ayrıca iki çeşit kolorimetrik metotla miktar tayinlerinin yapılabileceği saptandı ve bu metotlar bu türevleri içeren farmasötik preparatlara uygulandı.

Nous exprimons nos remerciements aux Laboratoires Upjohn, Upsa, Wander, qui, en mettant à notre disposition les différents composés nécessaires à notre expérimentation, nous ont permis de réaliser celle-ci.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) Castagnou, R., Artigues, A., - **Bull. Soc. Pharm. Bordeaux**, **107**, 73 - 73 (1968).
- 2) Clarke, E.G.C., - *Isolation and Identification of Drugs*, The Pharmaceutical Press (1971).
- 3) Comi, G., Chiarini, L., Guadagnum, G., **Bull. Chim. Farm.**, **113**, 583 - 89 (1974).
- 4) Gauch, R., Modestin J., **Arzneim. Forsch.**, **23**, n°5, 637 - 90 (1973).
- 5) Häussler, A., **Arzneim. Forsch.**, **6** 142 (1956).
- 6) Häussler, A., Haidu, P., **Arzneim Forsch.**, **12**, 411 - 13, (1962).
- 7) Lemontey, Y., Meunier, J., Lafargue, P., **Clin. Chim. Acta.**, **30**, 712 - 19 (1970).
- 8) Marca, Ja., Muhlemann, H., **Pharm. Acta. Helv.** **46**, 558 - 69, (1971).
- 9) Özden, S., Levillain, P., Bertucat, M., **J. Fac. Pharm. Ankara** (sous presse).
- 10) Pesez, M., Poirier, P., Bartos, J., *Pratique de l'analyse organique colorimétrique*, Masson Edit. (1966).
- 11) Yalçındağ, O., **Deutsch. Apoth. Zeit.** **85** (1970).