

Article original / Original article

Évaluation d'une méthode de dosage de la clozapine par spectrophotométrie UV

Evaluation of a method of dosage of clozapine by UV spectrophotometry

Hassen Teyeb*, Wahiba Douki, Mohamed Fadhel Najjar

Laboratoire de Biochimie-Toxicologie, CHU Fattouma Bourguiba de Monastir, 5000 Monastir, Tunisie

Résumé – La clozapine, principal neuroleptique indiqué dans le traitement de la schizophrénie résistante, est à l'origine de nombreux cas d'intoxications accidentelles ou volontaires, d'où l'intérêt de son dosage. Notre travail a pour objectif la mise au point d'une méthode de dosage permettant le diagnostic d'une intoxication par la clozapine. La méthode est basée sur la lecture de l'absorbance, à 365 nm, du produit de la réaction entre la clozapine et l'iode dans le dichlorométhane. Les résultats ont montré que cette méthode de dosage est linéaire de 15 à 400 mg/L ($r = 0,995$), avec une limite de détection de 10,42 mg/L. La précision et l'exactitude ont été meilleures dans la zone de 120 à 400 mg/L. Le rendement de l'extraction, par l'éther, à partir des urines est en moyenne de 77,7 %. Cette méthode permet le dosage de la clozapine dans les urines, les comprimés et dans les échantillons *post mortem* en cas d'intoxication mortelle à la clozapine.

Mots clés : Clozapine, spectrophotométrie UV, dichlorométhane, iode

Abstract – Clozapine, the principal neuroleptic indicated in the treatment of resistant schizophrenia, is implicated in many cases of accidental or voluntary intoxications. Thus, this drug should be dosed. In this work, the dosage of clozapine by UV spectrophotometry was studied to perfect a method allowing the diagnosis of intoxication or an overdose. The method is based on the reading of the absorbance of the product of the reaction between clozapine and iodine in dichloromethane at 365 nm. The results showed that this method is linear from 15 to 400 mg/L ($r = 0.995$), with a detection limit of 10.42 mg/L. Precision and accuracy were better between 120 and 400 mg/L. The extraction yield, by ether, from urine is on average 77.7%. This method allows the dosage of clozapine in urine, tablets and in *post mortem* samples in the case of clozapine fatal intoxication.

Key words: Clozapine, UV spectrophotometry, dichloromethane, iodine

Reçu le 3 avril 2011, accepté après modifications le 26 mai 2011

Publication en ligne le 17 août 2011

1 Introduction

Pour traiter la forme résistante de la schizophrénie, les psychiatres ont recours à la clozapine (Leponex®) dont l'efficacité reste capable d'apporter une amélioration clinique avec une posologie quotidienne ajustée. Ce médicament a été à l'origine de nombreux cas d'intoxications chez l'adulte et chez l'enfant, dont certaines étaient fatales [1–3]. Soixante-treize cas d'intoxication à la clozapine ont été enregistrés en Allemagne en 2005, dont 62 intoxications chez des adultes [4]. Dès lors, le dosage de ce médicament s'avère utile dans le diagnostic

d'une intoxication aiguë et la prise en charge du patient, ou dans un cadre médico-légal. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour le dosage de la clozapine, telles que la chromatographie liquide haute performance (HPLC), la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, la fluorimétrie, la voltamétrie, la densitométrie, et les méthodes électrophorétiques [5–14]. De même, de nombreuses méthodes spectrophotométriques ont été adaptées pour ce dosage [8, 11, 15–17]. Ces méthodes nécessitent moins de matériel et sont plus faciles à appliquer dans tout laboratoire.

Ce travail vise à développer une méthode spectrophotométrique, adaptable à chaque laboratoire, pour le dosage de la clozapine dans les matrices biologiques et les comprimés.

* Correspondance : Hassen Teyeb, teyeb.hassen@gmail.com

2 Matériel et méthodes

2.1 Matériel

Nous avons utilisé, comme solutions et matériels biologiques, des urines de sujets sains non traités par aucun médicament, une solution d'iode dans le dichlorométhane (DCM) à 5 g/L et une solution mère de clozapine dans le DCM à 1 g/L. Pour préparer cette dernière, un comprimé (Leponex® 100 mg, Novartis Pharma) a été broyé en poudre fine transférée dans une fiole de 100 mL. Après addition de 40 mL de DCM et agitation, nous avons complété jusqu'au volume, puis la solution a été filtrée.

2.2 Méthode

Dans le DCM, l'iode réagit avec la clozapine et donne un produit dont la coloration varie du violet au jaune orangé au fur et à mesure que la concentration en clozapine augmente. Dissous dans le DCM, l'iode et la clozapine absorbent respectivement à 501 et 290 nm. Le produit de la réaction a un maximum d'absorbance à 366 nm. La réaction a été étudiée selon le protocole suivant :

- introduire 1 mL de la solution de clozapine de concentration connue dans un tube à essai ;
- ajouter 1 mL de la solution d'iode ;
- compléter à 10 mL par le DCM et mélanger ;
- lire l'absorbance dans l'UV à 365 nm contre le blanc (DCM).

Pour l'étude du rendement de l'extraction, les échantillons urinaires contenant la clozapine ont été préparés par l'évaporation à sec de 1 mL de la solution de clozapine dans le DCM puis reprise par 1 mL d'urines ; 1 mL de NaOH (1 M) est ajouté et le mélange est agité au vortex pendant 2 minutes. Une extraction (2 fois) par 4 mL d'éther est faite, l'éther est récupéré dans un autre tube et évaporé. Le résidu est repris par 1 mL de DCM et le dosage est fait selon le protocole précédent.

2.2.1 Étude des caractéristiques de la méthode

Les caractéristiques de cette méthode mise au point ont été étudiées selon les recommandations de la Société française de biologie clinique (SFBC) [18].

Afin d'établir le domaine de linéarité de la méthode, nous avons étudié une gamme de concentrations de clozapine allant de 0,05 à 1000 mg/L. Pour déterminer la limite de détection (LD), nous avons réalisé 15 fois le dosage pour l'échantillon blanc (0 mg/L de clozapine) sachant que $LD = \text{moyenne (M) des blancs (n = 15)} + 3 \times \text{écart type (ET)}$.

Pour l'étude de la précision, nous avons répété 5 fois le dosage pour 5 concentrations étalées sur le domaine de la linéarité (50, 100, 150, 200 et 400 mg/L), puis nous avons établi le profil de précision représentant les coefficients de variation (CV) en fonction des concentrations :

$$CV (\%) = (ET/M) \times 100.$$

L'exactitude a été étudiée par la méthode de mélange pour différentes concentrations dispersées sur la gamme étudiée. Elle

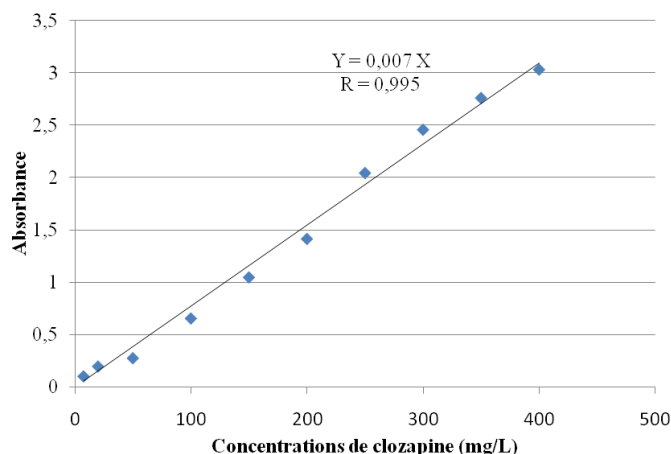


Fig. 1. Courbe d'étalonnage du dosage de la clozapine par spectrophotométrie UV.

consiste à préparer une solution à partir d'un mélange de deux volumes égaux de deux solutions de concentrations connues. Ainsi, la concentration à mesurer serait la moitié de la somme des deux concentrations mélangées, et ceci avec quatre niveaux de concentrations (15, 100, 150 et 300 mg/L).

Le rendement de la méthode est le rapport entre la concentration de la clozapine déterminée après extraction à partir des urines (valeur mesurée) et la même concentration déterminée sans extraction (valeur théorique) :

$$\text{Rendement (\%)} = (\text{valeur mesurée}/\text{valeur théorique}) \times 100.$$

Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm écart type et les comparaisons effectuées par le biais du coefficient d'exactitude :

$$(\text{CE (\%)} = [(\text{valeur mesurée} - \text{valeur théorique})/\text{valeur théorique}] \times 100).$$

Le CE exprime le degré d'inexactitude par rapport à la valeur théorique.

3 Résultats

La représentation des absorbances en fonction des concentrations de la clozapine a montré que la méthode est linéaire de 15 à 400 mg/L ($r = 0,995$) (figure 1).

La moyenne des absorbances du blanc était de 0,061 et l'ET égale à 0,0043. La valeur de l'absorbance correspondant à la LD est de 0,073, qui donne d'après la courbe d'étalonnage une LD égale à 10,42 mg/L.

Dans le profil de précision de la méthode spectrophotométrique, les CV étaient inférieurs à 10 % dans la zone de concentrations de 120 à 400 mg/L (figure 2).

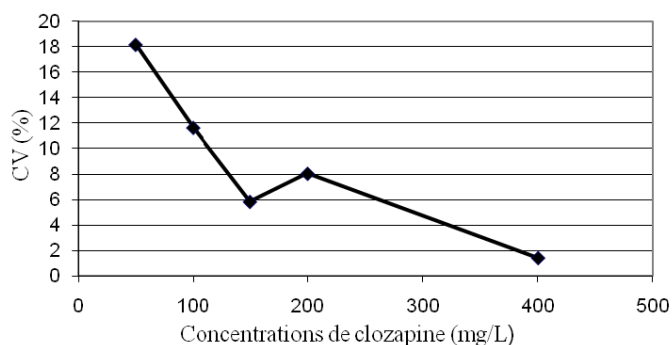
Le tableau I rapporte les coefficients d'exactitude pour chaque concentration étudiée. L'exactitude de la méthode était meilleure à la concentration de 300 mg/L. Le tableau II rapporte les rendements de l'extraction pour chaque concentration étudiée. Le rendement moyen de la méthode était de 77,7 % et supérieur à 75 % pour trois niveaux de concentrations.

Tableau I. Étude de l'exactitude (méthode de mélange).

C (mg/L)	15	100	150	300
A mesurée (n = 5)	0,162 ± 0,027	0,475 ± 0,013	0,743 ± 0,018	2,533 ± 0,081
A théorique (n = 5)	0,193 ± 0,008	0,652 ± 0,076	1,045 ± 0,070	2,545 ± 0,137
CE (%)	16,06 ± 15,34	27,14 ± 12,25	29,20 ± 3,05	3,09 ± 0,95

Tableau II. Étude du rendement de l'extraction de la clozapine à partir des urines.

C (mg/L)	50	200	300	400
A après extraction (n = 5)	0,239 ± 0,077	0,972 ± 0,068	1,938 ± 0,470	2,291 ± 0,107
A sans extraction (n = 5)	0,272 ± 0,026	1,413 ± 0,092	2,457 ± 0,135	3,032 ± 0,043
Rendement (%)	87,86 ± 20,27	68,78 ± 0,33	78,87 ± 14,84	75,56 ± 2,46

**Fig. 2.** Profil de précision de la méthode spectrophotométrique.

4 Discussion

Dans le DCM, l'iode et la clozapine sont très solubles. Leurs spectres montrent des maximums d'absorbance respectifs de 290 et 501 nm. Le produit de la réaction montre deux pics d'absorbance à 290 et 366 nm. Dans ce travail, la lecture de l'absorbance a été effectuée à 366 nm pour éviter l'interférence de la clozapine. La même réaction étudiée par Darwish *et al.* [8] dans le dichloroéthane montre des pics d'absorbance identiques. La méthode développée est linéaire de 15 à 400 mg/L. Sa précision est bonne pour des concentrations de 120 à 400 mg/L (CV < 10 %).

À des doses thérapeutiques, les concentrations sériques moyennes de clozapine se situent entre 0,1 à 0,8 mg/L [19]. Ainsi, la méthode développée n'est pas assez sensible pour être appliquée pour le suivi thérapeutique. Cependant, cette méthode peut permettre son dosage dans les urines. Ishii *et al.* [20] ont rapporté une concentration urinaire de 4,28 mg/L après 32 heures d'une intoxication par la clozapine. Dans une autre étude, la concentration urinaire de la clozapine était de 9,7 mg/L [21].

La LD de la méthode mise au point est nettement plus élevée que celles des méthodes utilisant l'iode dans le dichloroéthane, le 7,7,8,8-tétracyanoquinonediméthane, la 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-dibenzo-quinone ou le tétracyanoéthane, dont les LD sont respectivement de 1,12, 1,76, 2,22 et 0,95 mg/L [8]. Ces quatre méthodes de dosage de la clozapine ont un domaine de linéarité de 4 à 200 mg/L. Mohamed *et al.* [15] ont développé une méthode utilisant

le bromate de potassium dans l'acide perchlorique, caractérisée par une LD de 0,1 mg/L et un domaine de linéarité de 0 à 12 mg/L. Les trois réactions de Sastry *et al.* [16] utilisant l'acide chloranilique, le chlorhydrate de l'hydrazine 3-méthyl-2-benzothiazolinone en présence de sulfate d'ammonium cérique et le P-N,N-diméthylphenylenediamine dihydrochloride en présence d'hypochlorite de sodium ont montré des domaines de linéarité respectifs de 15 à 300, de 2 à 25 et de 10 à 120 mg/L. La méthode étudiée se caractérise par un domaine de linéarité plus étendu que ceux des méthodes spectrophotométriques mises au point par ces différents auteurs. Elle peut être appliquée pour le dosage de la clozapine dans les échantillons *post mortem* et dans les comprimés. En effet, une étude a montré une concentration urinaire *post mortem* de 245 mg/L [22]. Cette méthode s'avère ainsi utile dans le cadre d'expertise toxicologique. Elle peut être aussi utile pour le dosage du médicament dans les urines d'autant plus que l'étape d'extraction permet d'obtenir un rendement satisfaisant. La procédure utilisée pour l'extraction permet d'éliminer ses métabolites polaires présents dans les urines, tels que la clozapine-N-oxyde, permettant ainsi d'éviter toute interférence de ces métabolites. En cas de suspicion de concentrations élevées, une dilution de l'échantillon peut être envisagée.

5 Conclusion

Le dosage par spectrophotométrie UV de la clozapine constitue une méthode linéaire de 15 à 400 mg/L ($r = 0,995$). Elle est précise et exacte dans la zone de 120 à 400 mg/L. Après extraction à partir des urines, le rendement est satisfaisant, égal en moyenne à 77,7 %. Cette méthode permet donc le dosage de la clozapine dans les comprimés, dans les urines dans les cas d'intoxication, ou encore dans les échantillons prélevés *post mortem* en cas d'intoxication mortelle à la clozapine.

Conflits d'intérêts. Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts.

Références

1. Flanagan RJ, Spencer EP, Morgan PE, Barnes TRE, Dunk L. Suspected clozapine poisoning in the UK/Eire, 1992–2003. *Forensic Sci Int.* 2005; 155: 91–99.
2. Mady S, Wax P, Wang D, Goetz C, Hadley C, Love R. Pediatric clozapine intoxication. *Am J Emerg Med.* 1996; 14(5): 462–463.
3. Keller T, Miki A, Binda S, Dirnhofer R. Fatal overdose of clozapine. *Forensic Sci Int.* 1997; 86: 119–125.
4. Van Velzen AG, Fijen JW, De Vries I, Meulenbelt J. Intoxication with the antipsychotic drug clozapine concentration before and after a deliberate overdose. *Toxicol Lett.* 2006; 164S: S1–S324.
5. Weigmann H, Härtter S, Maehrlein S, Kiefer W, Krämer G, Dannhardt G, Hiemke C. Simultaneous determination of olanzapine, clozapine and demethylated metabolites in serum by on-line column-switching high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr Biomed Sci Appl.* 2001; 759(1): 63–71.
6. Cirimele V, Kintz P, Gosselin O, Ludes B. Clozapine dose-concentration relationships in plasma, hair and sweat specimens of schizophrenic patients. *Forensic Sci Int.* 2000; 107: 289–300.
7. Shen M, Xiang Wu H, Shen B, Huang Z. Detection of antidepressant and antipsychotic drugs in human hair. *Forensic Sci Int.* 2002; 126: 153–161.
8. Darwish I, Abdel-Wadood H, Abdel-Latif N. Validated spectrophotometric and fluorimetric methods for analysis of clozapine in tablets and urine. *Ann Chim.* 2005; 95(5): 345–356.
9. Hammam E, Tawfik A, Ghoneim MM. Adsorptive stripping voltammetric quantification of the antipsychotic drug clozapine in bulk form, pharmaceutical formulation and human serum at a mercury electrode. *J Pharm Biomed Anal.* 2004; 36(1): 149–156.
10. Özkan SA, Senturk Z. Study on the determination of clozapine by voltammetry. *Analisis.* 1996; 24(3): 73–75.
11. Hasan NY, Elkawy MA, Elzeany BE, Wagieh NE. Stability indicating methods for the determination of clozapine. *J Pharm Biomed Anal.* 2002; 30(1): 35–47.
12. Hillaert S, Snoeck L, Van den Bossche W. Optimization and validation of a capillary zone electrophoretic method for the simultaneous analysis of four atypical antipsychotics. *J Chromatogr A.* 2004; 1033(2): 357–362.
13. Raggi MA, Bugamelli F, Mandrioli R, Sabbioni C, Volterra V, Fanali S. Rapid capillary electrophoretic method for the determination of clozapine and desmethylclozapine in human plasma. *J Chromatogr A.* 2001; 916: 289–296.
14. Jin W, Xu Q, Li W. Determination of clozapine by capillary zone electrophoresis following end-column amperometric detection with simplified capillary/electrode alignment. *Electrophoresis.* 2000; 21(7): 1415–1420.
15. Mohamed AA, Al-Ghannam SM. Spectrophotometric determination of clozapine based on its oxidation with bromate in a micellar medium. *Farmaco.* 2004; 59(11): 907–911.
16. Sastry CSP, Rekha TV, Satyanarayana A. Spectrophotometric determination of clozapine in pharmaceuticals. *Mikrochim Acta.* 1998; 128: 201–205.
17. Taha EA, Soliman SM, Abdellatef HE, Ayad MM. Colorimetric methods for the determination of some tricyclic antidepressant drugs in their pure and dosage forms. *Mikrochim Acta.* 2002; 140: 175–182.
18. Vassault A, Grafmeyer D, De Graeve J, Cohen R, Beaudonnet A. Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques. *Ann Biol Clin.* 1999; 57(6): 685–695.
19. Khan AY, Preskorn SH. Examining concentration-dependent toxicity of clozapine: role of therapeutic drug monitoring. *J Psychiatr Pract.* 2005; 11(5): 289–301.
20. Ishii A, Mizoguchi K, Kageoka M, Seno H, Kumazawa T, Suzuki O. Nonfatal suicidal intoxication by clozapine. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1997; 35(2): 195–197.
21. Weigmann H, Bierbrauer J, Hartter S, Hiemke C. Automated determination of clozapine and major metabolites in serum and urine. *Ther Drug Monit.* 1997; 19(4): 480–488.
22. Fucci N, Romano B, Zirilli A. Acute intoxication with orphenadrine and clozapine. *Forensic Sci Int.* 2001; 123(1): 13–16.