

## Short Communication

# Séparation d'amidines $N-N'$ -substituées par chromatographie liquide haute-performance en phase inversée: recherche de certaines impuretés de synthèse

M. HANOCQ\*, R. FUKS et G. LEFEBVRE

*Institut de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles, Campus Plaine, Bd du Triomphe CP 205/1, 1050 Bruxelles, Belgique*

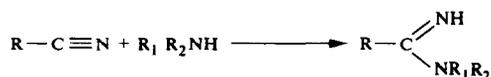
---

**Keywords:** *Amidine derivatives; high-performance liquid chromatography; ion-pair; reversed-phase.*

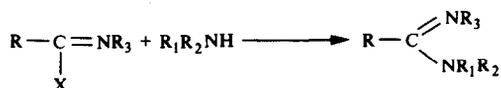
---

### Introduction

La fonction amidine a déjà fait l'objet de diverses monographies et revues [1–4]. Récemment, la recherche de nouveaux agents chimiothérapeutiques a conduit à la synthèse d'un grand nombre d'amidines [1, 5, 6] parmi lesquelles les benzamidines [7–10] et des pyrrole amidines [11]. Leur synthèse repose sur deux principes généraux: le premier consiste à additionner une amine sur un nitrile:



le second à procéder à un déplacement nucléophile d'une imine judicieusement substituée à l'aide d'une amine:



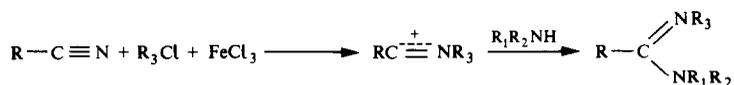
où X = Cl, OR<sub>4</sub>, SR<sub>4</sub> et OSO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>.

---

\* To whom correspondence should be addressed.

Seule la seconde méthode permet d'obtenir des amidines *N,N'*-substituées. Le radical R doit être de préférence de nature aromatique, la formation de chlorure d'imidoyle par chloruration des amides avec  $\text{PCl}_5$  par exemple, produisant des réactions secondaires d' $\alpha$ -halogénéation et/ou de self-condensation [12].

Pour pallier cet inconvénient, l'un d'entre-nous a mis au point une méthode générale de synthèse des amidines *N,N'*-substituées à partir des nitriles via les sels de nitrilium correspondants [13–17]:



Cette technique s'est avérée particulièrement utile, la formation du sel de nitrilium rendant l'atome de carbone du nitrile fortement électrophile tout en conservant une hybridation sp, c'est-à-dire, sans contrainte stérique. L'addition nucléophile de l'amine s'effectue dès lors dans des conditions expérimentales douces avec des rendements satisfaisants, tout en évitant les réactions secondaires indésirables.

Une série d'amidines originales, acétamidines, acrylamidines, métacrylamidines et chloracrylamidines ont été ainsi synthétisées dans le but de rechercher une activité oncostatique éventuelle. Certaines benzamidines *N-N'*-disubstituées par des radicaux aliphatiques [7] ou aromatiques [18, 19] ont déjà été étudiées d'un point de vue pharmacologique alors qu'aucun travail n'a été consacré à ces nouvelles molécules.

Dans le présent travail, nous envisageons l'aspect analytique par chromatographie liquide haute performance en faisant appel à la technique par appariement d'ions, par ailleurs souvent recommandée dans la littérature [20–22]. A notre connaissance, aucune étude n'a jusqu'à présent été consacrée à ce problème.

## Partie Experimentale

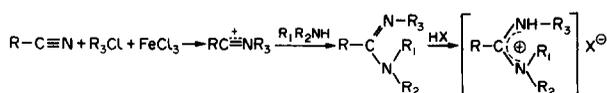
### Réactifs

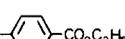
Les différents sels d'amidinium (chlorhydrate ou perchlorate) ont été recristallisés dans un mélange éthanol-éther diéthylique dépéroxydé (Tableau 1). Leur pureté a été vérifiée par chromatographie en couche mince ainsi que par l'analyse élémentaire carbone, hydrogène, azote; les résultats de cette dernière correspondent aux valeurs théoriques.

Les réactifs utilisés sont de qualité Merck P.A. à l'exception de l'acétonitrile (Rathburn Chemicals Ltd, Walkerburn, Scotland, UK; HPLC grade S).

La phase mobile chromatographique est constituée d'un mélange acétonitrile — tampon acide phosphorique-phosphate (20:80 v/v) et de 0.6 mM d'octylsulfate de sodium. Pour ce faire, on prépare tout d'abord un tampon monohydrogénophosphate-dihydrogénophosphate de sodium 0.05 M et de pH 6.00. Après avoir ajusté la force ionique à 0.4 M à l'aide de KCl en suivant un algorithme mis au point précédemment [23], on dilue de moitié. On ajoute ensuite l'acétonitrile, le contre-ion organique (*n*-octylsulfate de sodium) et on ajuste le pH à 2.5 à l'aide d'acide phosphorique concentré (85% v/v). Le solvant est ensuite filtré sur membrane micropore.

**Tableau 1**  
Structure des sels d'amidinium étudiés



Dérivé N°	X <sup>-</sup>	Substituents			
		R	R <sub>3</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
1	Cl <sup>-</sup>	-CH <sub>3</sub>	isopropyle		H
2	Cl <sup>-</sup>	-CH <sub>3</sub>	tertiobutyle		H
3	Cl <sup>-</sup>	-CH <sub>3</sub>	tertiobutyle		H
4	ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	CH <sub>2</sub> =CH-	tertiobutyle		H
5	Cl <sup>-</sup>		tertiobutyle		H
6	Cl <sup>-</sup>		tertiobutyle		H
7	Cl <sup>-</sup>		tertiobutyle		H
8	ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>		tertiobutyle		
9	ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>		tertiobutyle		H
10	Cl <sup>-</sup>		tertiobutyle		H
11	ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>		tertiobutyle	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>
12	Cl <sup>-</sup>		tertiobutyle		H
13	Cl <sup>-</sup>		tertiobutyle		H

### Appareillage et conditions expérimentales

Il a été fait usage d'un chromatographe liquide Perkin-Elmer modèle 1220 équipé d'une vanne d'injection Rhéodyne 7105 et d'un détecteur UV-visible LC 55. La colonne (250 × 4 mm) a été remplie, par nos soins, par voie humide et sous pression, de phase  $\mu$ Bondapak-C<sub>18</sub> (10  $\mu$ m) (Waters) à l'aide de la pompe Chromatem (Touzart et Matignon, France). Le débit de la phase mobile a été fixé à 1 ml/min et la température à 50°C. La détection est effectuée à 205 nm.

Les amidines destinées à l'analyse sont dissoutes dans de l'eau bidistillée éventuellement additionnée de méthanol (1 mg/ml). Selon l'absorbance des dérivés, des volumes de 1 à 6  $\mu$ l sont alors injectés. Une procédure identique a été suivie pour caractériser certaines impuretés de synthèse.

## Résultats et Discussion

En général, la chromatographie en phase inverse est applicable à la séparation de solutés très peu, ou non-polaires. Elle permet également l'examen d'espèces ionisées (cas des sels d'amidinium étudiés), principalement par la méthode par appariement d'ions. Aussi, est-ce à cette technique que nous nous sommes adressés.

Une étude systématique de l'influence de divers paramètres sur les temps de rétention a permis de fixer les conditions expérimentales optimales de manière à obtenir endéans des temps d'analyse relativement courts, une excellente séparation et une résolution parfaite. Pour ce faire, nous avons choisi trois acétamidines (temps de rétention petits) ainsi qu'une chloracrylamidine (temps de rétention plus important). Après un bref examen spectral, la longueur d'onde du spectrophotomètre a été fixée à 205 nm, permettant ainsi la détection des amidines substituées tant par des radicaux aromatiques qu'aliphatiques.

### *Influence du pH*

Le pH du solvant a été modifié par la quantité d'acide phosphorique concentré ajouté, les autres facteurs chromatographiques restant constants. Les résultats rassemblés au Tableau 2 montrent une importante augmentation des  $k'$  consécutive à l'élévation de pH. Or, dans le domaine de pH étudié (2.5–3.3), les amidines dont les  $pK_a$  sont compris entre 7.5 et 12 [24] sont totalement protonées. L'influence du pH devrait donc être négligeable; l'expérience montre qu'il n'en est rien. Cette augmentation du  $k'$  doit, selon nous, plutôt être expliquée par la diminution de la force ionique du solvant, qu'entraîne l'élévation de pH; il a été en effet constaté qu'une augmentation de force ionique provoque une diminution des  $k'$  [22, 25].

### *Concentration d'octylsulfate de sodium*

Dans une seconde série d'expériences, nous avons, toute chose égale d'ailleurs, fait varier la quantité de contre-ion présente dans la phase mobile. Il apparaît nettement (Tableau 2) qu'une augmentation de cette dernière entraîne une légère augmentation des  $k'$ . Nous avons finalement, compte tenu des autres résultats, choisi une concentration égale à 0.6 mM.

### *Influence du pourcentage en acétonitrile*

Le troisième paramètre étudié a été le pourcentage en acétonitrile de l'éluant. Ce dernier a été varié de 15 à 22%, les autres paramètres restant constants.

Les résultats expérimentaux illustrent le rôle classique du pourcentage de solvant organique dans la phase mobile chromatographique. Il apparaît comme un des facteurs dont une légère modification, entraîne une variation importante des  $k'$  (Tableau 2). En présence de 15% v/v d'acétonitrile, l'élution est lente ( $k'$  de l'ordre de 25) et les pics sont notablement élargis. Par contre, dès que la concentration atteint 22% v/v, si les quatre dérivés repris au Tableau 2 sont encore parfaitement séparés, il n'en va plus de même des autres sels d'amidinium considérés. C'est pourquoi la teneur en acétonitrile a été fixée à 20% v/v, seule concentration intermédiaire qui a permis une excellente séparation dans un temps minimum.

**Tableau 2**  
Influence des différents paramètres sur les facteurs de capacité  $k'$

Paramètres		$k'^*$			
		Dérivé 1	Dérivé 2	Dérivé 3	Dérivé 12
Acetonitrile (% v/v)	15	26.22	14.32	22.33	28.13
	18	14.07	8.03	11.33	16.19
	20	6.85	4.29	5.90	9.57
	22	6.25	3.99	5.15	8.36
<i>n</i> -Octylsulfate de sodium (mM)	0.4	6.09	3.80	5.26	8.69
	0.5	6.52	4.07	5.56	9.32
	0.6	6.85	4.29	5.90	9.57
	0.8	7.98	4.78	6.47	10.44
pH	2.50	6.85	4.29	5.90	9.57
	2.65	11.46	6.55	10.05	15.29
	2.75	11.77	6.85	10.25	16.94
	3.00	12.00	6.89	10.32	24.55
	3.28	12.29	7.20	10.52	32.54

\* Moyenne d'au moins trois essais.

### *Influence de la température*

Il est évident que le facteur température ne joue, en général, qu'un rôle accessoire en chromatographie liquide. Dans le cas envisagé, la température est cependant apparue comme un paramètre non négligeable qui a permis d'augmenter l'efficacité et la résolution du système tout en diminuant les valeurs des temps de rétention. Un autre avantage de la température à laquelle les analyses ont été effectuées (50°C) réside dans l'augmentation de la symétrie des différents pics, vraisemblablement suite à une meilleure linéarité de l'isotherme de partage.

Les conditions mises au point ont permis de résoudre le problème. Le Tableau 4 l'ensemble des amidines étudiées. Leur temps de rétention, leur facteur de capacité ainsi que la limite de détection sont rassemblés au Tableau 3. D'autre part, à titre d'exemple, la Figure 1 montre un chromatogramme obtenu en suivant le mode opératoire décrit. Signalons préliminairement que la réponse du détecteur est linéaire pour des concentrations comprises, suivant des dérivés, entre 0.1 et 60 µg.

### *Recherche de certaines impuretés de synthèse*

Comme nous l'avons signalé au cours de l'introduction, les amidines faisant l'objet de ce travail sont destinées à être testées comme agents antitumoraux. Ceci implique donc l'obtention de produits purs. Les impuretés à rechercher, compte tenu du schéma de synthèse que nous avons brièvement rappelé, sont essentiellement l'amine libre et le nitrile de départ.

Les conditions mises au point ont permis de résoudre le problème. Le Tableau 4 présente les  $k'$  des amines et nitriles libres correspondant aux amidines étudiées et leur limite de détection à l'exception des substances qui ne présentent aucune absorbance en UV et qui n'ont pu dès lors être détectées.

La comparaison des Tableaux 3 et 4 permet de constater que le solvant préconisé offre l'avantage d'une analyse rapide, tout en séparant chaque amidine de ses impuretés correspondantes. A titre d'exemple, la Figure 2 montre le tracé obtenu lors de l'analyse d'une acrylamidine.

**Tableau 3**  
Paramètres chromatographiques des sels d'amidinium étudiés

Dérivé No.	Temps de rétention (s)		Facteur de capacité*		Limite de détection† (pg)
	$\bar{t}_R$ ‡	$\sigma$ §	$\bar{k}'$	$\sigma$	
1	1333.5	17.4	6.85	0.06	71
2	898.8	12.1	4.29	0.04	47
3	1172.0	15.1	5.90	0.05	88
4	799.1	8.7	3.71	0.03	82
5	1495.3	4.4	7.81	0.02	166
6	810.0	6.3	3.77	0.04	101
7	1182.4	5.0	5.96	0.06	119
8	1370.5	11.4	7.07	0.11	343
9	2102.0	14.9	11.38	0.11	230
10	1608.6	6.5	8.47	0.15	146
11	948.7	6.6	4.59	0.04	343
12	1794.5	13.4	9.57	0.12	238
13	1160.8	6.5	5.83	0.05	166

\* Les facteurs de capacité ont été calculés classiquement à partir des temps de rétention des sels d'amidinium  $\bar{t}_R$  et du temps de rétention d'un dérivé non retenu,  $t_0$  (solution de nitrate de potassium à 1 mg/ml,  $t_0 = 169.8$  s,  $\sigma = 3.4$  s).

† Calculée en tenant compte de 3 fois l'intensité du bruit de fond.

‡ Moyenne d'au moins quatre essais.

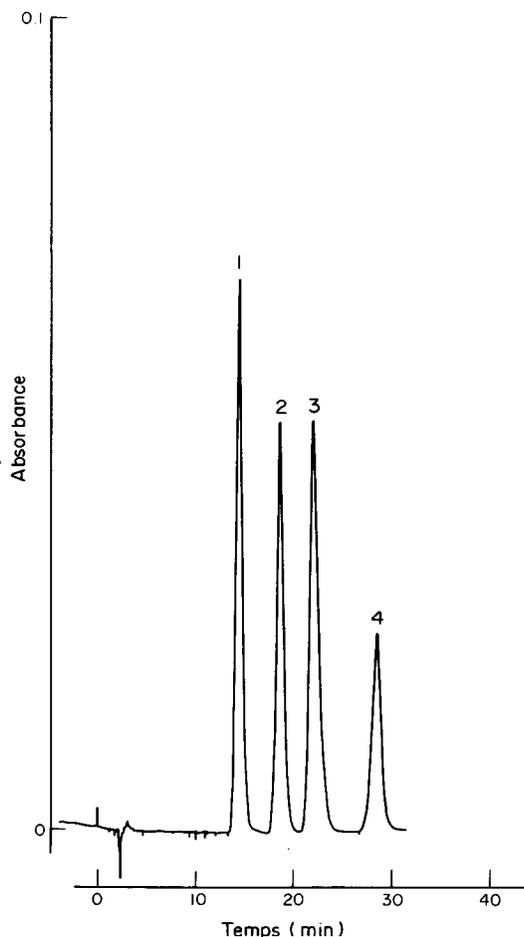
§ Déviation standard,  $\sigma$ .

**Tableau 4**  
Paramètres chromatographiques de certaines impuretés de synthèse des différentes amidines

Dérivé No.	Amine libre			Nitrile libre		
	$\bar{k}'$ ‡	$\sigma$ §	Limite de détection (pg)	$\bar{k}'$	$\sigma$	Limite de détection† (pg)
1	9.64	0.02	58	—	—	—
2	1.27	0.01	20	—	—	—
3	5.30	0.01	66	—	—	—
4	0.47	0.01	38	0.78	0.01	17
5	1.97	0.01	48	1.92	0.01	16
6	0.29	0.01	14	1.92	0.01	16
7	0.57	0.01	29	1.92	0.01	16
8	—	—	—	1.92	0.01	16
9	5.30	0.01	66	1.92	0.01	16
10	1.27	0.01	20	1.92	0.01	16
11	—	—	—	2.84	0.01	43
12	4.80	0.01	38	2.84	0.01	43
13	0.57	0.01	29	2.84	0.01	43

†, ‡, § cf. Tableau 3.

Le chlorure d'isobutyle ou de ter-butyle ne présente pas d'absorbance en ultraviolet. Il ne constitue cependant pas une impureté à rechercher, compte tenu de la technique utilisée en fin de synthèse (évaporation sous vide).



**Figure 1**

Séparation d'acétamidines et de chloracrylamidines. 1, Dérivé 2 (2.9  $\mu\text{g}$ ); 2, dérivé 3 (3.9  $\mu\text{g}$ ); 3, dérivé 1 (3.2  $\mu\text{g}$ ); 4, dérivé 12 (5.2  $\mu\text{g}$ ) (selon Tableau 1).

Conditions opératoires: voir partie expérimentale.

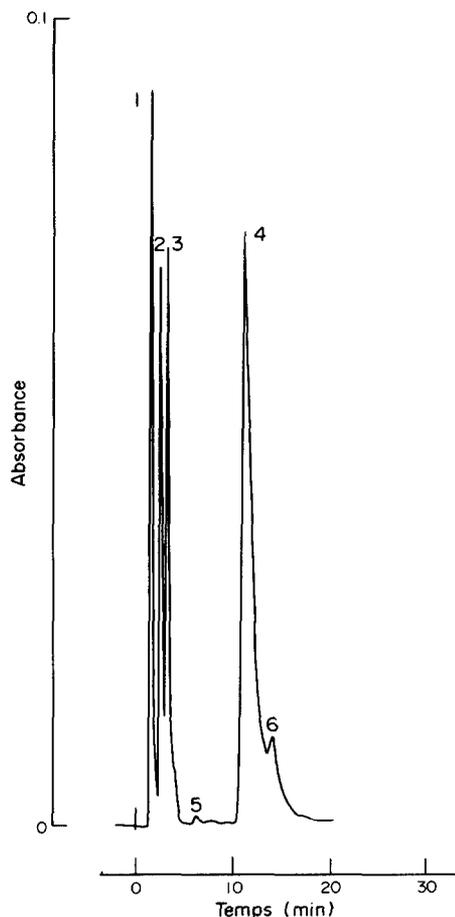
## Conclusion

Les résultats présentés dans ce travail illustrent la possibilité de séparer des amidines diverses (acétamidine, acrylamidine, méthacrylamidine, chloracrylamidine) par chromatographie liquide haute performance par appariement d'ions. Le solvant mis au point a également permis une recherche tant qualitative que quantitative de certaines impuretés de synthèse.

*Remerciements:* Nous remercions vivement le Ministère de l'Émloi et du Travail pour l'aide qu'il nous a apportée (Projet CST No. 7362).

## Bibliographie

- [1] A. Kreutzenberger, *Arzneim. Forsch.* **11**, 356-445 (1968).
- [2] S. Patai (Ed.), *The Chemistry of Amidines and Imidates*. John Wiley, London, (1975).
- [3] D. Barton, *Comprehensive Organic Chemistry*, Vol. 2, p. 495. Pergamon Press, Oxford, (1979).
- [4] P. A. S. Smith, *Open Chain Nitrogen Compounds*, Vol. 1, p. 177. Benjamin, New York, (1965).
- [5] Cf. Réf. 2, pp. 255 et 283.
- [6] M. Bialer, B. Yagen et R. Mechoulam, *J. Med. Chem.* **22**, 1296-1301 (1979).
- [7] G. Narcisse, F. Huguet et al., *Ann. Pharm. Fr.* **37**, 325-330 (1979).

**Figure 2**

Exemple de recherche d'impuretés de synthèse dans un sel d'amidinium. 1, Nitrate de sodium (1.5  $\mu\text{g}$ ); 2, orthométhoxyaniline (2.4  $\mu\text{g}$ ); 3, acrylonitrile (1.05  $\mu\text{g}$ ); 4, dérivé 4 (5.3  $\mu\text{g}$ ); 5 et 6, impuretés non identifiées.

Conditions opératoires; voir partie expérimentale.

- [8] C. Hansch et M. M. Yoshimoto, *J. Med. Chem.* **17**, 1160–1167 (1974).
- [9] D. Labes et V. Hagen, *Pharmazie* **34**, 554–556 (1979).
- [10] D. Labes et V. Hagen, *Pharmazie* **34**, 649–653 (1979).
- [11] M. Bialer, B. Yagen et R. Mechoulam, *J. Med. Chem.* **23**, 1144–1148 (1980).
- [12] R. Bonnet, *Chemistry of Carbon–Nitrogen Double Bond* (S. Patai, Ed.), Chap. 13, pp. 604 et 618. Interscience, London (1970).
- [13] R. Fuks, *Tetrahedron* **29**, 2147–2151 (1973).
- [14] R. Fuks, *Eur. Polym. J.* **9**, 835–845 (1973).
- [15] M. Strebelle et R. Fuks, *Bull. Soc. Chim. Belg.* **87**, 717–720 (1978).
- [16] M. Van Den Bril et R. Fuks, *Bull. Soc. Chim. Belg.* **89**, 433–439 (1980).
- [17] R. Fuks, B. Caillau, M. Van Den Bril et M. Hanocq, *Bull. Soc. Chim. Belg.* (à paraître).
- [18] G. Raynaud et C. Gouret, *Ann. Pharm. Fr.* **30**, 735–743 (1972).
- [19] N. Sinton, J. Rodia *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* **71**, 3990–3992 (1949).
- [20] B. A. Bidlingmeyer, *J. Chromatogr. Sci.* **18**, 525–539 (1980).
- [21] P. R. Brown et A. M. Krstulovic, *Anal. Biochem.* **99**, 1–21 (1979).
- [22] N. Verbièse-Genard, M. Hanocq, M. van Damme et L. Molle, *Int. J. Pharm.* **2**, 155–166 (1979).
- [23] M. van Damme, M. Hanocq et L. Molle, *J. Pharm. Belg.* **34**, 5–12 (1979).
- [24] M. Hanocq, M. van Damme et R. Fuks (résultats non publiés).
- [25] R. A. Hartwick et P. R. Brown, *J. Chromatogr.* **126**, 679–686 (1976).

[Received for review 14 May 1982; revised manuscript received 8 July 1982]