

Séparation et Identification par Chromatographie en Couche Mince des Médicaments Anticoagulants

Antikoagülan Tesirli İlaçların İnce Tabaka Kromatografisi ile
Ayırım ve Teşhisleri

Seçkin ÖZDEN, Tuncel ÖZDEN, Michel BERTUCAT*

Les dérivés anti-vitamine, K, ordinairement appelés anticoagulants, sont constitués de deux grands groupes chimiques :

- les coumarines, symétriques ou asymétriques
- les 2 phényl indane 1,3 diones.

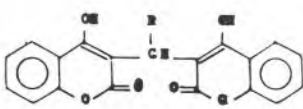
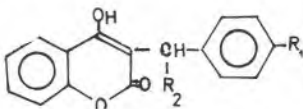
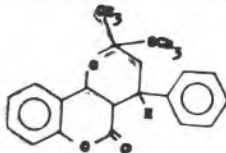
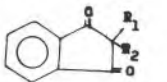
Particulièrement utilisés dans tous les phénomènes thrombotiques il nous a semblé utile dans le cadre du contrôle des médicaments de pouvoir le cas échéant séparer et identifier ces composés par chromatographie en couche mince.

Différents auteurs (1 à 9) ont déjà utilisé cette technique, mais ordinairement ils ne l'ont appliquée qu'à un nombre restreint de dérivés. Notre travail a porté sur 11 dérivés coumariniques et 8 dérivés phénylindanediones dont nous donnons les formules et dénominations commerciales dans le Tableau I.

Redaksiyona verildiği tarih : 8. Mayıs, 1975

* Farmasötik Kimya Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi,

Tableau I — Formules

Dérivé coumariniques symétriques Formule générale	R		Dénomination chimique	Spécialité
	<ul style="list-style-type: none"> — H — COOC₂H₅ — CH₂OCH₃ — CH₂CH₂SCH₃ 		Dicoumarol Ethyl Biscoumacétate Coumétarol	Tromexane Dicoumoxyl Propentan Thiocoumar
Dérivé coumariniques symétriques	R ₁	R ₂	Dénomination chimique	Spécialité
	<ul style="list-style-type: none"> — H — I — NO₂ — Cl — H 	<ul style="list-style-type: none"> — CH₂COCH₃ » » » — C₂H₅ 	Coumadine Acénocoumarol Coumachlore Phenprocoumine	Warfarine Coumadine Adoïsine (sel de diméthyl aminoéthanol) Diocoumine Sintrom Tomorin Marcoumar
			Cyclocoumarol	Cumopyran
Dérivés type Phénylindanedione Formule générale	R ₁	R ₂	Dénomination chimique	Spécialité
	<ul style="list-style-type: none"> — C₆H₅ — C₆H₄-Cl(p) — C₆H₄-Br(p) — C₆H₄-F(p) — C₆H₄CF₃ — C₆H₄-OCH₃(p) — C₆H₅ — CO - CH(C₆H₅)₂ 	<ul style="list-style-type: none"> — H — H — H — H — H — H — — H 	Phenindione Chlorophenindione Bromophenindione Fluorophenindione Fluindarol Anisylindione Oxazindione Diphacinone	Pindione Indaliton Fluidane Previscan Unidone Miradon Amplidione Dipaxin

Nos recherches ont comporté trois parties :

- Séparation des dérivés coumariniques
- Séparation des dérivés phénylindanediones
- Séparation des dérivés coumariniques et phénylindanediones mélangés

Avant d'envisager ces trois stades nous exposerons les conditions opératoires, celles-ci étant identiques pour les trois.

1°) Les substances pures ont été dissoutes dans le méthanol à la concentration de 2 mg/ml. Les dépôts ont varié entre 10 et 15 microlitres.

A remarquer que les dérivés coumariniques donnent des solutions incolores, alors que dans le cas des dérivés phénylindanediones les solutions sont colorées :

- couleur orangée : Bromophénindione, Fluindarol, Oxazidione
- couleur rouge : Phénindione, Fluorophénindione, Chlorophénindione, Anisindione.

2°) Les plaques ont été préparées avec le Kieselgel GF 254 Merck selon la technique décrite par Stahl (10), (épaisseur 0,3 millimètre) avec activation à 110°C pendant 30 minutes.

3°) Révélateurs

Nous avons appliqué un certain nombre de révélateurs dont les compositions ont été données par Stahl (10)

Les résultats en sont exprimés dans le Tableau II.

4°) Solvants

Dans un premier temps nous avons d'abord expérimenté les solvants cités dans la littérature et dont nous donnons les principales compositions :

Tableau II : Révélateurs

Composés	REACTIFS					
	2,6 - dibromo — p - benzoquinone chlorimide 110°C	Anisaldehyde	FeCl ₃ 5 %	p-dimethyl amino benzaldehyde	Iode (solution chloroformique) puis amidon	Acide Sulfanilique diazoté
Dicoumarol	Orange	Violet	Blanc	—	Bleu	Blanc
Ethyl Biscoumacetate	Marron	»	Marron rose	—	»	Marron - rose
Coumetarol	Orange	»	»	—	»	»
Propentan	Rose	»	»	—	»	»
Coumadine	Vert-marron	»	Blanc	—	»	Blanc
Adoisine	Jaune marron	»	»	—	»	»
Diocoumine	Vert-orange	»	»	—	»	«
Acenocoumarol	Vert-marron	»	»	—	»	Marron - rose
Coumachlore	Rose pale	»	»	—	»	Blanc
Phenprocoumine	Bleu verdâtre	»	»	—	»	»
Cyclocoumarol	Vert - marron	»	»	—	»	»
Phenindione	Jaune	Violet très pale	»	—	»	»
Chlorophenindione	Jaune	»	»	—	»	»
Bromophenindione	Jaune	»	»	—	»	»
Fluorophenindione	Jaune	»	«	—	»	»
Fluidarol	Jaune	»	«	—	»	»
Anisindione	Jaune	»	«	—	»	»
Oxazidione	Jaune	»	»	—	»	»
Diphacinone	Jaune	»	»	—	»	»

- Méthanol : chloroforme: acide acétique 3.5:150:1.5
- Méthanol : chloroforme: diéthylamine 15:150:1.7
- Benzène saturé en acide formique: méthyléthylcétone 160:8
- Ether : acide acétique 99:1
- Ether : chloroforme : acétone 60:30:1
- Ether : éthyle acétate : acide acétique 80:30:1
- Ether : benzène: acétone 60:30:10
- Ether : benzène: acide acétique 60:40:1
- Ether : benzène: acétone: acide acétique 60:50:10:1
- n. Butanol : n. pentanol saturé par l'ammoniaque à 25 % 1:1
- Dioxane : xylène: toluène: isopropanol: ammoniaque 1:21:4:2
- Ethyl acétate : méthyléthylcétone : acide formique : eau 5:3:1:1
- Toluène : ethyl formiate: acide formique 5:4:1
- Acétone: 2,2,4, - triméthylpentane: eau 100:40:1
- Acétone : ethyl acétate : ether de pétrole : eau 100:100:33:3,5
- Acetone : 4-méthyl-2-pentanone : ether de pétrole 60:20:20
- Chloroforme : benzène : acétylacétone : acide formique 49:48:1:2
- Chloroforme : methanol 97:3

Nous avons ensuite passé en revue les solvants suivants :

a) solvants simples

Ether; Cyclohexane; Acétone; Ether de pétrole; Dioxane; Dichlorométhane; Butyl acétate

b) solvants binaires

- Benzène : acétone 90:10 ; 60:40
- Benzène : méthanol 97:3 ; 95:5 ; 90:10 ; 80:25
- Chloroforme : acétone 95:5 ; 90:7,5 ; 90:10 ; 80:20
- Chloroforme : ethyl acétate 80:20
- Dichlorométhane; méthanol 100:2 ; 100:5
- Ether : acide acétique 99:1
- Ether : chloroforme 95:5
- n. Hexane : méthanol 80:20
- n. Hexane : acétone 60:40
- Cyclohexane : acétone 70:30 ; 50:50
- Ethyl acétate : pyridine 98:2
- Ethyl acétate : méthanol 90:10
- Ether de pétrole : acétone 70:30 ; 60:40 ; 50:50 ; 40:60 ; 20:80
- Butyl acétate : n. butanol 95:5
- Butyl acétate : n. propanol 97:5
- Butyl acétate : isopropanol 97:5

Les solvants suivants ont été essayés avec les plaques préparées suivant la technique déjà citée et avec des plaques préparées avec le Kieselgel GF 254 et une solution de Na_2CO_3 à 10 %

- Chloroforme : méthanol 97:3
- Ether : benzène : acétone 50:40:10 ; 70:20:10 ; 60:35:7

B-Discussion

1°) Séparation des dérivés coumariniques

Quatre solvants sont à retenir :

- Solvant 1 : Butyl acétate : n. butanol 95:5
 - Solvant 2 : Butyl acétate : isopropanol 97:5
 - Solvant 2 : Butyl acétate : isopropanol 97:5
 - Solvant 4 : Dichlorométhane : méthanol 100:5
- Nous donnons dans le tableau III les Rf obtenus avec ces solvants.

Tableau III. Rf des dérivés coumariniques

Dérivés	n°	Solvants (Rfx100)			
		1	2	3	4
Dicoumarol	1	24	22	20	15
Ethyl Biscoumacétate	2	9	7	7	7
Coumétarol	3	13	13	14	4
Propentan	4	58	56	47	11
Coumadine	5	81	74	74	64
Adoisine	6	78	70	70	46
Diocoumine	7	75	67	66	68
Acénocoumarol	8	33	38	34	38
Coumachlore	9	72	63	63	59
Phenprocoumine	10	91	84	82	61
Cyclocoumarol	11	96	91	93	89

La séparation des dérivés anticoagulants à structure coumarinique est donc possible facilement en utilisant un de ces solvants.

2°) Séparation des dérivés phénylindanediones

La séparation est plus facile et six solvants permettent de réaliser celle-ci.

- Solvant 5 — Benzène méthanol 80:25
- Solvant 6 — Benzène : acétone 60:40
- Solvant 7 — Chloroforme : acétone 90:7.5
- Solvant 8 — Chloroforme : acétone 90:10
- Solvant 9 — Chloroforme : acétone 80:20
- Solvant 10 — Ether : benzène : acétone 60:30:10

Le tableau IV donne les Rf obtenus avec ces solvants.

Tableau, IV. Rf des dérivés Phénylindanediones

Dérivés	n°	Solvants (Rfx100)					
		5	6	7	8	9	10
Phénindione	1	44	75	64	65	67	54
Chlorophénindione	2	18	36	25	24	28	17
Bromophénindione	3	28	28	37	45	39	10
Fluorophénindione	4	32	52	60	59	63	38
Fluindarol	5	14	14	5	6	6	6
Anisindione	6	60	83	74	73	77	60
Oxazidione	7	73	95	83	80	93	92
Diphacinone	8	76	57	9	10	13	29

3°) Séparation des dérivés coumariniques et phénylindanediones mélangés

Aucun des solvants essayés ne nous a permis de séparer en un seul chromatogramme les 19 dérivés. Il est donc nécessaire d'opérer en réalisant deux chromatogrammes, l'un avec un des quatre solvants permettant la différenciation des composés coumariniques, l'autre avec un des six solvants permettant l'identification des

composés phénylindanediones. Nous avons déterminé les tables d'interférence des dérivés phénylindanediones par rapport aux solvants pour coumarines et vice-versa. (Tableaux V et VI

Tableau V. Interférence des dérivés Phénylindanediones avec les solvants pour coumarines

Composés	Solvants Rf x 100			
	1	2	3	4
Phenindione	64	69	56	82
Chlorophenindione	32	29	31	68
Bromophenindione	23	15	18	62
Fluorophénindione	56	19	43	83
Fluindarol	22	45	13	51
Anisindione	63	71	58	81
Oxazidione	90	92	86	78
Diphacinone	72	44	55	11

TABLEAU VI. Interférence des dérivés coumariniques avec les solvants pour dérivés Phénylindanediones

Composés	Solvants Rf x 100					
	1	2	3	4	5	6
Dicoumarol	60	0	0	5	7	0
Ethyl Biscoumacétate	41	0	0	0	0	0
Coumétarol	58	0	0	0	0	0
Propentan	56	0	0	0	0	0
Coumadine	59	88	62	69	80	72
Adoisine	70	91	59	64	80	82
Diocoumine	71	88	58	68	72	82
Acénocoumarol	55	70	36	40	55	60
Coumachlore	56	83	57	57	61	72
Phenprocoumine	57	85	72	70	79	72
Cyclocoumarol	71	92	64	81	86	84

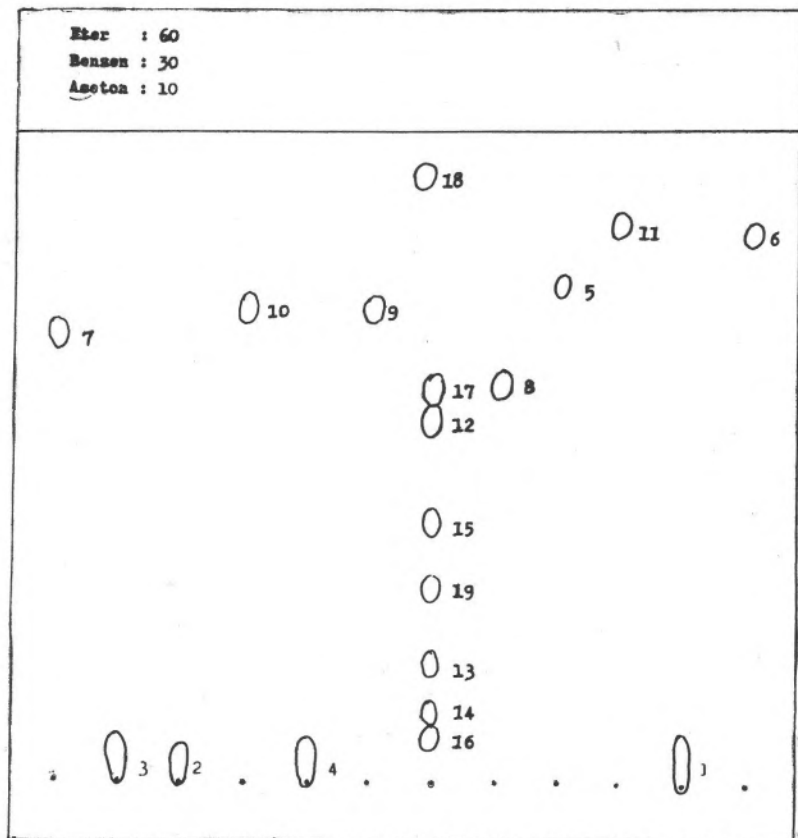


Fig 1: Intérférence de Phenylindandiones avec les dérivés coumariniques

- | | | |
|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| 1) Dicoumarol | 2) Tromexan | 3) Dicoumoxyyl |
| 4) Thiocoumar | 5) Warfarine | 6) Adoisine |
| 7) Dicoumine | 8) Acenocoumarol | 9) Coumachlore |
| 10) Phenprocoumin | 11) Cyclocoumarol | 12) Phenindione |
| 13) Chlorophenindione | 14) Bromophenindione | 15) Fluorophenindione |
| 16) Fluindarol | 17) Anisindione | 18) Oxazidione |
| 19) Diphacinone | | |

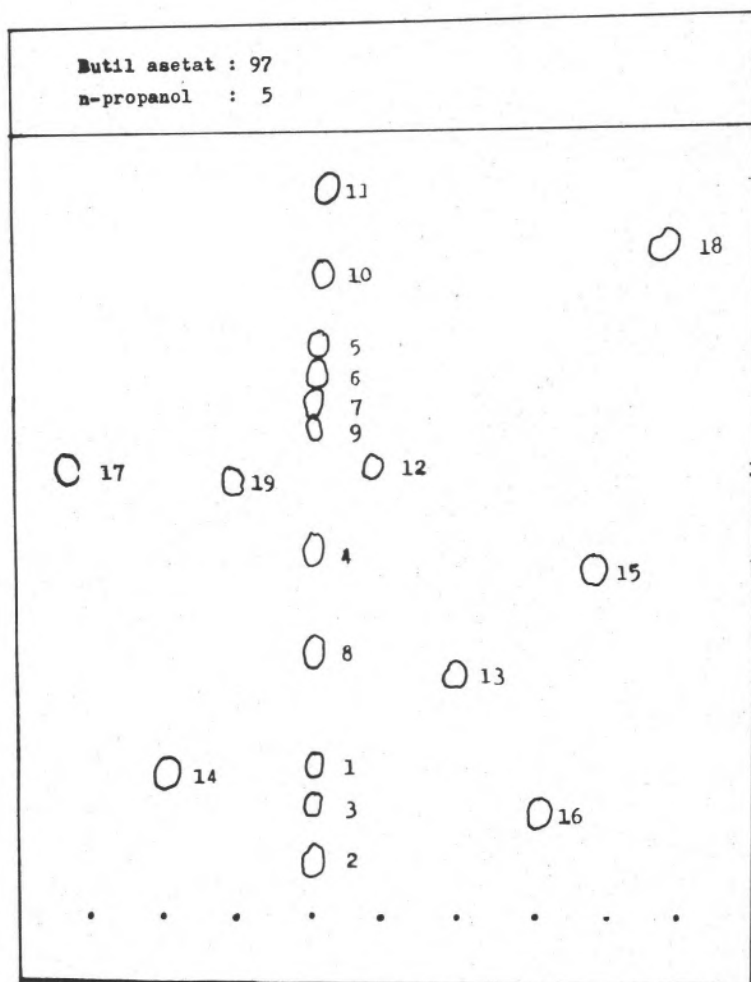


Fig. 2 : Intérférence des coumariniques avec les dérivés phenylindandiones

- | | | |
|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| 1) Dicoumarol | 2) Tromexan | 3) Dicoumoxyl |
| 4) Thiocoumar | 5) Warfarine | 6) Adoisine |
| 7) Diocoumine | 8) Acenocoumarol | 9) Coumachlore |
| 10) Phenprocoumin | 11) Cyclocoumarol | 12) Phenindione |
| 13) Chlorophenindione | 14) Bromophenindione | 15) Fluorophenindione |
| 16) Fluindarol | 17) Anisindione | 18) Oxazidione |
| 19) Diphacinone | | |

A noter que le fait que les solutions méthanoliques des dérivés Phénylindanediones sont colorées, facilite les recherches. En effet dans le cas d'une solution méthanolique d'extraction incolore il y a probabilité de n'être en présence que de dérivés coumariniques. On opère donc de suite avec un des solvants du tableau III.

Par le jeu de deux solvants il est donc possible de séparer les composés anticoagulants.

CONCLUSION

Les nombreux solvants étudiés ne permettent pas de séparer en un seul chromatogramme tous les dérivés anticoagulants. L'emploi de deux solvants permet de pallier cet inconvénient.

RÉSUMÉ

Les auteurs ont étudié la séparation par chromatographie en couche mince de 11 dérivés coumariniques et de 8 dérivés phénylindanediones anticoagulants. Un protocole permettant d'identifier ces dérivés a été mis au point grâce à l'utilisation de deux solvants.

Ö Z E T

Bu çalışmada antikoagulan tesire sahip 8 tane fenilindandion ve 11 tane kumarin yapısındaki türevin ince tabaka kromatografisi ile ayırımlarına çalışıldı ve iki değişik solvan sistemi kullanmak suretiyle bu türevlerin ayırımlarının ve teşhislerinin yapılabileceği saptandı. Bu solvan sistemlerinden birinin fenilindandion türevleri, diğerinin ise kumarin türevleri için kullanılması gerekmektedir.

Nous tenons à exprimer nos remerciements aux laboratoires Abbott, Aldina Biosedra, Brocades Delalande, Endo, Geigy, Labaz-Derol, Roche, Valpan, Zambelletti, qui nous ont permis de réaliser ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) Copenhaver, J.H., Carver, M.J., **J. Chromatog**, **16**, 229-31 (1964)
- 2) Daenens, P., Van Boven, M., **J. Chromatog**, **57**, n°2, 319-22 (1971).
- 3) French, W. N., Wehrli, A., **Can. Pharm. J**, **98**, 174 (1965).
- 4) Kamn, G., **Arzneim. Forsch**, **17**, 1202 (1967).
- 5) Kamn, G., *ibid.*, **18**, 1336-37 (1968).
- 6) Lau Cam, C.A., Chu-fong, I., **J. Pharm. Sci**, **61**, n°8, 1303-306 (1972).
- 7) Rainaut, J. L., Benoit, A., **J. Pharm. Belg.**, **21**, n°5-6, 293-98 (1966).
- 8) Heish, J., Barnfleth, H., Rheinbay, J., **Pharmazeutische Zeitung**, **108**, n°36, 1183 - 84 (1963).
- 9) Ruessel, H.A., **Z. Anal Chem.**, **250** (2), 125-26 (1970).
- 10) Stahl, E., *Dünnschicht - Chromatographie*, Springer - Verlag, Berlin, Heidelberg (1967).