

N° d'ordre: 29/2011-M/CH
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE

« HOUARI BOUMIDIENE »

Faculté de Chimie



MEMOIRE

Présenté Pour l'obtention du diplôme de MAGISTER

EN: CHIMIE

Spécialité : CHIMIE ORGANIQUE APPLIQUEE

Par : Melle IHADADENE Samira

Sujet :

**ETUDE COMPARATIVE DE L'ENANTIOSELECTIVITE DE QUELQUES
PHASES STATIONNAIRES CHIRALES (PSCs) A BASE DE CELLULOSE,
AMYLOSE ET CYCLODEXTRINE (CD) PAR LA CHROMATOGRAPHIE
LIQUIDE (HPLC)**

Soutenu le 19/06 /2011, devant le jury composé de:

M. A. SAADI, Maître de Conférences/A à USTHB	Président
Mlle F. TAZEROUTI, Professeur USTHB	Directeur de thèse
Mme N. BENNAMANE, Maître de Conférences/A à USTHB	Examineur
M. A. BOUDINA, Maître de conférences/A à USTHB	Examineur

Remerciements

*Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au laboratoire d'analyse organique Fonctionnelle de la Faculté de Chimie à l'université des sciences et de la technologie HOUARI BOUMEDIENNE (U.S.T.H.B), dirigé par le professeur **A. BAALIOUAMER**.*

*Je remercie Monsieur le Doyen, le Professeur **CHATER** pour m'avoir permis de préparer mon magister à la faculté de chimie ainsi que le Professeur **A. BAALIMOUMER** de m'avoir accueillie dans son laboratoire.*

*Cette thèse a été réalisée sous la direction du Professeur **F. TAZEROUTI**, Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour la confiance qu'elle m'a toujours accordée, son encadrement scientifique et ses qualités humaines qui m'ont permis de réaliser sereinement cette thèse.*

Je souhaite exprimer toute ma gratitude envers les membres du jury qui ont bien voulu consacrer à ma thèse une partie de leur temps.

*Je prie Monsieur **A. SAADI**, maître de conférence à U.S.T.H. B. de croire à ma respectueuse reconnaissance pour avoir accepté de présider le Jury de cette thèse.*

*Je tiens à remercier vivement M. **A. DOUDINA**, Maître de conférences, d'avoir bien voulu juger ce travail.*

*J'exprime mes profonds remerciements à M^{me} **N. BENNAMANE**, Maître de conférences à la faculté de Chimie, pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de participer à ce jury.*

J'exprime mes remerciements à tous mes collègues du laboratoire ainsi qu'aux collègues du C.R.A.P.C pour l'aide et l'atmosphère amicale que j'ai trouvé parmi eux.

Je souhaite aussi remercier Madame K. LADJI, Maître de conférences B et membre du laboratoire pour son aide précieuse.

Je tiens à remercier ma mère, mon fiancé, mes sœurs, mes frères qui m'ont soutenu et encouragée.

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION GENERALE	1

Chapitre I : GENERALITES

I.1. Qu'est-ce que la chiralité ?	4
I.2. Historique	5
I.3. Impact biologique et économique	6
I.4. Les techniques de séparations chirales.....	8
I.4.1. Les techniques classiques	8
a. Séparation chirale par cristallisation	8
i. La résolution classique par cristallisation diastéréomérique	8
ii. La cristallisation directe.....	8
b. Le dédoublement spontanée.....	8
c. La résolution cinétique	8
I.4.2. Les techniques chromatographiques et électrophorétiques	9
a. La chromatographie sur couche mince (CCM).....	9
b. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)	9
c. La chromatographie liquide à haute performance (CLHP).....	10
d. L'électrophorèse capillaire (EC).....	13
I.5. Autres techniques	13
a. La chromatographie à fluide supercritique(CFS)	13
b. L'électrochromatographie capillaire	13
c. La chromatographie à contre courant (CCC).....	14
d. La chromatographie à lit mobile simulé (SMB)	14
e. La RMN (résonance magnétique nucléaire)	14
f. Les membranes chirales	14

I.6. Les phases stationnaires chirales (PSCs)	15
I.6.1. Les PSCs à base de cyclodextrines.....	15
I.6.2. Les PSCs à base d'antibiotiques.....	18
I.6.3. Les PSCs à base de protéines	22
I.6.4. Les PSCs à base de cellulose et d'amylose	23
I.6.5. Les PSC _s de type Pirkle.....	25
I.6.6. Les PSC _s à base d'échange de ligand.....	25
I.6.7. Les PSC _s à base d'éthers couronnes.....	26
<i>Chapitre II: LA SEPARATION CHIRALE EN MODE NORMAL SUR LA COLONNE A BASE DE CELLULOSE</i>	
II.1. Introduction	32
II.2. Résultats et discussion.....	34
II.2.1. Test de la phase stationnaire à base de tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) cellulose (CHIRALCEL OD-H).....	35
a. Effet de l'ajout de modifiants anioniques et cationiques	41
b. Effet de la composition de la phase mobile sur la rétention	41
c. Effet de la structure du soluté sur la résolution chirale.....	45
d. Effet de la nature de l'alcool sur la résolution chirale	46
II.3. Conclusion	49
<i>Chapitre III : LA SEPARATION CHIRALE EN MODE NORMAL SUR LA COLONNE A BASE D'AMYLOSE</i>	
III.1. Introduction	52
III.2. Résultats et discussion	53

III.2.1. Test de la phase stationnaire à base de tris (3,5dimethylphenylcarbamate)	
amylose (Nucleocel α)	54
a. Effet de l'ajout de modifiants anioniques et cationiques	59
b. Effet de la composition de la phase mobile sur la rétention	59
c. Effet de la structure du soluté sur la résolution chirale.....	62
III.2.2. Comparaison de l'énantiosélectivité des deux colonnes Chiralcel OD-H	
et Nucleocel α à celle à base de β -cyclodextrine en mode normal	63
III.3. Conclusion	70

Chapitre IV : LA SEPARATION CHIRALE EN MODE ORGANIQUE

POLAIRE SUR LA COLONNE A BASE D'AMYLOSE

IV.1. Introduction	73
IV.2. Résultats et discussion	74
IV.2.1. Test de la phase stationnaire à base de tris (3,5dimethylphenylcarbamate)	
amylose (nucleocel α)	74
a. Effet de la polarité du solvant organique sur la séparation chirale	78
b. Effet de la nature de l'alcool.....	83
c. Effet de la composition de la phase mobile	88
IV.3. Conclusion	91
CONCLUSION GENERALE	94
ANNAXE A : Structure des produits testés	96
ANNAXE B : Références bibliographiques.....	100

Liste des abréviations

PSC	Phase stationnaire chirale
CH₃CN	Acétonitrile
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance
CPG	Chromatographie en Phase gazeuse
CCM	Chromatographie sur couche mince
FDA	Food and Drug Administration
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
Rs	Facteur de résolution
k'	Facteur de rétention
TEA	Triéthylamine
TFA	Acide trifluoroacétique
DEA	Diéthylamine
SFC	Chromatographie à fluide supercritique
EtOH	Ethanol
MeOH	Méthanol
tr	Temps de rétention
α	Facteur de sélectivité
CGTase	Cyclodextrine-glycosyltransférase
CD	Cyclodextrine
EC	Electrophorèse capillaire

Liste des figures

Chapitre I

Figure 1	Exemples d'objets chiraux	4
Figure 2	Le pourcentage des articles publiés sur différentes classes thérapeutiques, entre 1996 et 2009	7
Figure 3	les Composants d'exécution définis par C.Horvath	12
Figure 4	Structure de α , β , γ cyclodextrine	16
Figure 5	Structure tridimensionnelle de la β cyclodextrine	16
Figure 6	Exemple de mécanisme d'inclusion dans la cavité de la cyclodextrine	17
Figure 7	Publications liées aux cyclodextrines (en blanc) et à leurs applications pharmaceutiques (en noire)	17
Figure 8	Structure chimique de quelques antibiotiques utilisés comme PSCs	20
Figure 9	Structures de la cellulose, amylose et Triacétate de cellulose (CTA-1).	23
Figure 10	La représentation graphique de la structure tridimensionnelle du complexe diastéréoisomérique formé entre les énantiomères R et S de l' α -phényléthylamine et la PSC chirale 18crown-6-éther	26

Chapitre II

Figure 1	La structure de la tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) cellulose	34
Figure 2	Exemples de chromatogrammes de lorazepam, benzoïne, lormetazepam et propranolol et de quelques produits optiquement actifs obtenus sur la chiralcel OD-H (phase mobile: Hexane/Ethanol et Hexane/Ethanol/Diéthylamine; 0.5 mL mn ⁻¹ ; λ_{254nm})	40

Figure 3	L'effet de l'éthanol sur les facteurs de rétention de la benzoïne et soluté 15 sur la colonne chiralcel OD-H (phase mobile: hexane/éthanol, 0.5ml mn ⁻¹ , λ ₂₅₄)	42
Figure 4	Effet de la composition de la phase mobile sur les facteurs de rétention de la benzoïne et oxazepam sur la chiralcel OD-H. (Phase mobile: Hexane/Ethanol, 0.5 mL mn ⁻¹ , λ ₂₅₄).	43
Figure 5	Effet de la composition de la phase mobile en éthanol sur la sélectivité et sur la résolution des produits 15 et oxazepam sur la Chiralcel OD-H. (Phase mobile: hexane/éthanol, 0.5 mL mn ⁻¹ , λ ₂₅₄)	44
Figure 6	L'effet de la composition de la phase mobile sur le soluté 1 et Le naproxène sur la chiralcel OD-H. (Hexane/Ethanol et Hexane /Ethanol/Acide trifluoroacétique; 0.5 mL mn ⁻¹ ; λ _{254nm})	45
Figure 7	Variation de la sélectivité en fonction de la nature de l'alcool sur la Chiralcel OD-H (phase mobile: hexane/éthanol: 80/20, Heptane /2-propanol: 80/20, 1mL mn ⁻¹ , λ _{254nm}).	47
Figure 8	Variation de la résolution en fonction de la nature de l'alcool sur Chiralcel OD-H (phase mobile: hexane/éthanol: 80/20, 0.5mL mn ⁻¹ , λ _{254nm} . Heptane /2-propanol: 80/20, 1mL mn ⁻¹ , λ _{254nm})	47

Chapitre III

Figure 1	La structure du tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) amylose	53
Figure 2	Exemple de quelques chromatogrammes de produits chiraux testés sur la colonne Nucleocel α. (Phase mobile: Hexane/2 propanol/TFA pour le kétoprofène; 0.5mL mn ⁻¹ ; λ _{254nm} et Heptane/2-propanol pour les solutés 2-4, 15 et la benzoïne ; 0.5mL mn ⁻¹ ; λ _{254nm})	58

Figure 3	Effet de la composition de la phase mobile en 2-propanol sur la sélectivité et sur la résolution des produits 4 et 6 sur la colonne Nucléocel alpha. (Phase mobile: Heptane/2-propanol; 0.5mL mn ⁻¹ ; λ _{254nm}).	60
Figure 4	L'influence de la quantité du 2-propanol dans la phase mobile sur la séparation des énantiomères du soluté 12 sur la colonne Nucleocel α. (Phase mobile: Hexane/ 2-propanol/ acide trifluoroacétique ; 0.5mL mn ⁻¹ ; λ _{254nm}).	61
Figure 5	L'effet du pourcentage de 2-propanol sur la rétention des solutés 13, 14, 12 sur une colonne Nucleocel α. (Phase mobile: Hexane/2-propanol/Acide trifluoroacétique; 0.5mL mn ⁻¹ ; λ _{254nm} et Heptane/ 2-propanol; 0.5mL mn ⁻¹ ; λ _{254nm}) .	62
Figure 6	Séparation de quelques produits pharmaceutiques optiquement actifs sur les 3 PSCs.	67
Figure 7	La variation de la sélectivité des produits pharmaceutiques optiquement actifs sur les 3 phases stationnaires chirales.	68
Figure 8	Chromatogrammes des énantiomères de soluté 3, Propranolol et Kétoprofène sur une colonne à base de cellulose (à gauche) et à base d'amylose (à droite). (Phase mobile: Hexane/alcool (Ethanol ou 2-propanol) ; 0.5 mL mn ⁻¹ ; λ _{254nm}).	69
Chapitre IV		
Figure 1	Exemples de chromatogrammes obtenus en mode organique polaire sur la colonne Nucleocel α. (Phase mobile: 2-propanol /ACN ; 0.5mL mn ⁻¹ ; λ _{254nm}).	77
Figure 2	Variation du facteur de rétention en fonction de la nature de la phase mobile de quelques solutés sur la Nucleocel α. (Phase mobile: méthanol, éthanol, acetonitrile ; 0.5mL mn ⁻¹ ; λ _{254nm}	81
Figure 3	Effet du solvant organique sur la résolution des solutés 5 et 7. (Colonne Nucleocel α ; 0.5mL mn ⁻¹ ; λ _{254nm}).	82

Figure 4	Variation de la sélectivité en fonction de la nature de l'alcool sur la colonne à base d'amylose. (Phase mobile: méthanol ou éthanol/CH ₃ CN, 0.5 mL min ⁻¹ ; λ _{254nm}).	87
Figure 5	Variation de la résolution en fonction de la nature de l'alcool sur la colonne nucleocel α. (Phase mobile: méthanol ou éthanol/CH ₃ CN, 0.5 mL min ⁻¹ ; λ _{254nm}).	87
Figure 6	Influence de la composition de la phase mobile en acétonitrile sur les facteurs de rétention des produits : 1, 15, Oxazepam sur la colonne à base d'amylose. (2- propanol /ACN ; 0.5mL mn ⁻¹ ; λ _{254nm}).	88
Figure 7	Influence de la composition de la phase mobile en acétonitrile sur la résolution des produits: lormetazepam, Lorazepam, Temazepam et soluté 2 sur la Nucleocel α. (2- propanol /ACN; 0.5mL mn ⁻¹ ; λ _{254nm}).	89
Figure 8	Influence de la composition de la phase mobile en acétonitrile sur la sélectivité de lorazepam sur la colonne à base d'amylose. (2-propanol /ACN ; 0.5mL mn ⁻¹ ; λ _{254nm}).	89
Figure 9	Effet de la composition de la phase mobile (MeOH/ACN) sur l'énantioséparation du soluté 5 sur la Nucleocel α. (0.5mL mn ⁻¹ ; λ _{254nm}).	90

Liste des tableaux

Chapitre II

Tableau I	Séparation des produits optiquement actifs sur la phase stationnaire à base de tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) cellulose (CHIRALCEL OD-H)	36
Tableau II	Effet de la nature de l'alcool sur la sélectivité et la résolution obtenues sur la Chiralcel OD H en mode normal	48

Chapitre III

Tableau I	Analyse des produits optiquement actifs sur la phase stationnaire à base d'amylose en utilisant le mode normal	55
Tableau II	Comparaison de l'énantiosélectivité des deux colonnes chiralcel OD-H et Nucleocel α à celle à base de HP- β -cyclodextrine en mode normal	64

Chapitre IV

Tableau I	Séparation des produits optiquement actifs sur la phase stationnaire à base d'amylose en mode organique polaire.	75
Tableau II	Effet de la polarité du solvant organique sur la séparation chirale sur la colonne à base d'amylose.	79
Tableau III	Effet de la nature de l'alcool sur la résolution	84

INTRODUCTION GENERALE

Introduction

Les composés énantiomériques purs tels que les produits pharmaceutiques ont attiré un grand intérêt technologique depuis que Pasteur a séparé pour la première fois les cristaux chiraux du sel de tartrate en 1848 [1,2]. Aussi, l'importance des médicaments chiraux développés sous forme d'un seul énantiomère n'a cessé d'augmenter ces dernières années. L'avantage d'un seul énantiomère par rapport au racémique réside principalement dans la différence entre leurs propriétés biologiques. En effet, il existe dans la plupart des médicaments chiraux, une seule forme énantiomérique qui possède l'activité biologique alors que l'autre forme peut être inactive ou même toxique. Il existe trois types de méthodes pour l'obtention d'un seul énantiomère : la synthèse asymétrique, le dédoublement enzymatique et la chromatographie chirale. Cette dernière a pris récemment un essor remarquable grâce au développement des phases stationnaires chirales fiables, disponibles sur le marché et ayant un large spectre d'applications qui peut aller de l'analyse à la production à grande échelle [3].

Parmi ces phases stationnaires chirales, nous pouvons distinguer celles à base de polysaccharides considérées comme l'une des phases stationnaires les plus utilisées et les plus performantes en chromatographie liquide [4].

Depuis le début des années 90, la FDA (Food and Drug Administration) a publié une directive pour les molécules chirales exigeant que seul l'isomère thérapeutiquement actif doit être commercialisé. Ainsi, la séparation des énantiomères a gagné un rôle essentiel dans toutes les étapes du développement des médicaments. Par conséquent, le développement de ces séparations est essentiellement dû à la chromatographie liquide (CL), l'électrophorèse capillaire (EC) et la chromatographie gazeuse. La CL est devenue utile non seulement pour déterminer la pureté optique des énantiomères mais également pour préparer des énantio-pures, aussi, elle demeure la technique la plus populaire parce qu'elle offre plusieurs avantages pratiques [5-7]:

- (i) Reproductibilité élevée de la colonne
- (ii) Large applicabilité pour les composés de polarités différentes.
- (iii) Un grand nombre de phases stationnaires chirales disponibles dans le commerce.

Introduction Générale

Dans le cadre de notre travail, nous nous sommes fixés comme objectifs le test de quelques phases stationnaires chirales à base de dérivées de polysaccharides, et cela dans le but d'évaluer leur performance, stabilité, efficacité et éventuellement leurs limites d'utilisation.

Dans la première partie de ce travail, nous avons testé la colonne à base de cellulose dérivée pour la séparation chirale de solutés racémiques optiquement actifs en mode normal. Nous avons également tenté d'optimiser les séparations chirales en jouant sur différents facteurs pouvant influencer sur l'énantiosélectivité de la phase stationnaire.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons testé la colonne à base d'amylose dérivée, en mode normal, avec une phase mobile constituée d'un mélange (alcool/alcane), nous avons également étudié l'influence d'ajout de modifiants anioniques et cationiques, de la composition de la phase mobile, l'effet de la structure du soluté et la nature de l'alcool sur le pouvoir énantiodiscriminatoire de cette phase stationnaire.

La dernière partie de ce travail a été consacrée à la résolution chirale en mode organique polaire sur la colonne à base d'amylose dérivée. Nous avons ainsi étudié différents paramètres qui pourraient nous permettre d'améliorer la séparation chirale des produits testés tels que l'effet de la composition de la phase mobile, la nature de l'alcool,...etc.

Dans chaque partie de ce travail, nous avons tenté d'expliquer le mécanisme de la reconnaissance chirale de chaque phase stationnaire vis-à-vis des solutés injectés.

- [1] M. Parschau, U. Ellerbeck, K-H. Ernst, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2010, **354**, 240.
- [2] P. Paik, A. Gedanken, Y. Mastai, *Microporous and Mesoporous Materials*, 2010, **129**, 82.
- [3] C. Suteu, *STP. PHARMA. PRATIQUES*, 2004, **14**, 293.
- [4] J. Y. Jin, W. Lee, *Bull. Korean. Chem. Soc*, 2008, **29**, 491.
- [5] S. G. Hiriyanna, K. Basavaiah, V. Dhayanithi, H. N. Pati, *Chromatographia*, 2008, **68**, 501.
- [6] L. Li, S. Zhou, L. Jin, C. Zhang, W. Liu, *J. Chromatogr. B*, 2010, **878**, 1266.
- [7] Y. Xiang, G. W. Sluggett, *J. Pharm. Biomed. Anal*, 2010, **53**, 878.

Chapitre I : Généralités

I.1. Qu'est ce que la chiralité:

Le terme chiralité est dérivé du grec « Khier », signifiant main (dominance manuelle) [1]. C'est une propriété géométrique d'un objet d'être non superposable avec son image dans un miroir. Un tel objet n'a aucun élément de symétrie [2]. Le meilleur exemple de chiralité est notre main, tel que cela est présenté sur la figure 1 :

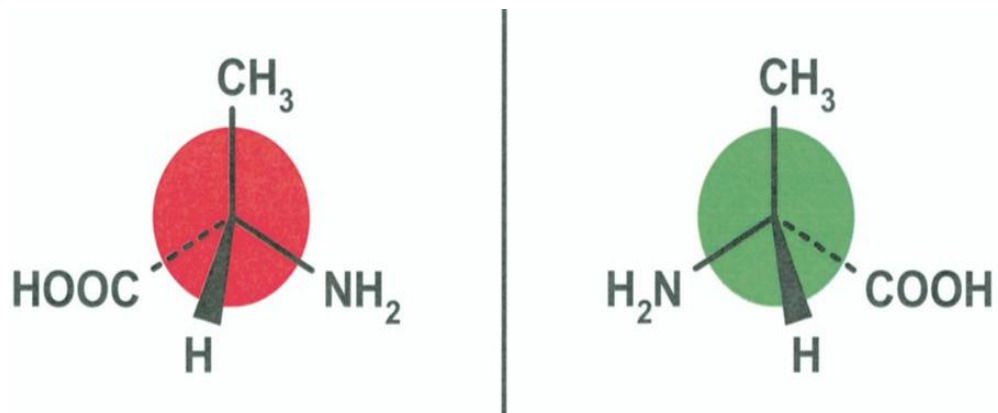
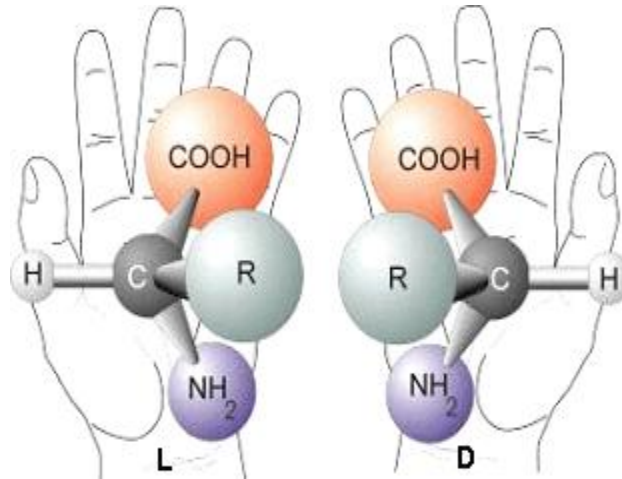


Figure1: Exemples d'objets chiraux

Deux stéréo-isomères (non superposable par simple rotation) sont dits énantiomères, antipodes ou isomères optiques si et seulement si, ils sont image l'un par rapport à l'autre dans un miroir. La molécule est dite alors chirale [3].

Les énantiomères possèdent des propriétés physiques et chimiques identiques dans un environnement achiral mais présentent ces propriétés différemment dans un environnement chiral, tel que les systèmes biologiques [4].

Deux énantiomères font tourner le plan de polarisation de la lumière en sens opposé l'un de l'autre. On les désigne donc par les signes (+) ou (-) selon la déviation du plan de polarisation de la lumière vers la droite (dextrogyre(d)) ou vers la gauche (lévogyre (L)) [3].

I.2. Historique:

Le physicien et le chimiste Irlandais Robert Boyle (1627-1691) et le chimiste Russe Dimitri Mendeleïev (1834-1907) pressentirent l'existence d'une relation entre l'aspect macroscopique d'un solide et sa constitution microscopique. Mais c'est grâce aux physiciens que les problèmes posés par la dissymétrie cristalline et la dissymétrie moléculaire sont mis à jour. En 1808, un jeune polytechnicien Etienne-Louis Malus (1775-1812) découvrit la polarisation de la lumière. Ses travaux furent poursuivis par l'astronome François Arago (1786-1853), puis quelques années plus tard par Jean Baptiste Biot (1774-1862). Ce dernier trouva vers 1815, que la déviation de la lumière se produit soit vers la gauche soit vers la droite [5].

En 1848, la première séparation chirale par Pasteur a répété la cristallisation du sel d'ammonium de l'acide tartrique et séparé deux formes de cristaux. Comme conclusion à ses travaux, Louis Pasteur écrit : les différentes molécules (+) et (-) de l'acide tartrique étaient stéréoisomères et dissymétriques en nature [1,6].

En 1874, Le Bel et Vant'Hoff découvrirent qu'un carbone possédant quatre substituants différents, possédait deux structures différentes dans l'espace, images l'une de l'autre dans un miroir [7].

Enfin, en 1898, le physicien anglais Lord Kelvin donne le nom de « chiralité » à la propriété qui distingue les énantiomères d'une même molécule [5].

I.3. Impact biologique et économique:

L'importance de la chiralité n'a cessé d'augmenter durant ces dernières décennies. Ainsi, la chiralité des substances biologiquement actives est devenue un thème majeur dans la conception, la découverte et le développement de nouveaux médicaments dans l'industrie pharmaceutique [8].

Le marché mondial des technologies chirales a été estimé à 2.7 milliards de dollars américains en 2007, avec un taux de croissance annuel moyen de 10.8%. Ce fait, démontre la demande accrue pour produire des énantiomères dans la recherche et dans le domaine pharmaceutique. Dans cette industrie, très souvent, seul un énantiomère d'un médicament racémique chirale est le principe actif, alors que le deuxième énantiomère est dans le meilleur des cas moins efficace, totalement inefficace, ou dans le pire des cas toxique [9].

Tel a été le cas de la thalidomide, un sédatif proposé aux femmes enceintes dans les années 1960 afin de soulager leurs nausées. Si l'énantiomère (*S*) a donné l'effet attendu, l'énantiomère (*R*) a provoqué la malformation irréversible de nombreux enfants. Dès lors, les autorités sanitaires et réglementaires ont exigées lors du dépôt des droits d'exploitation d'un brevet, une documentation complète d'essais pharmacologiques, pharmacocinétiques et toxicologiques, tant sur le mélange racémique que sur chaque énantiomère pur [10,11].

En plus de l'industrie pharmaceutique, d'autres domaines sont concernés par les chiralités telles que l'agroalimentaire et l'environnement [10]. En effet, les saveurs ou les odeurs peuvent être dissemblables d'un énantiomère à l'autre. Les récepteurs olfactifs sont ainsi capables de distinguer les énantiomères de la carvone (odeurs de menthe ou de fenouil) et ceux du limonène (odeurs de citron ou d'orange). Dans le domaine de l'environnement, l'utilisation de stéréoisomères inactifs de quelques pesticides contribue seulement à augmenter le niveau de pollution (ex. Dichlorprop et Fluazifop-butyl).

Ainsi, dans le domaine pharmaceutique par exemple, plusieurs directives ont été publiées par la FDA (Food and Drug Administration) américaine pour le développement des médicaments stéréoisomériques soulignant l'importance de l'identification des stéréoisomères [12] (La figure 2).

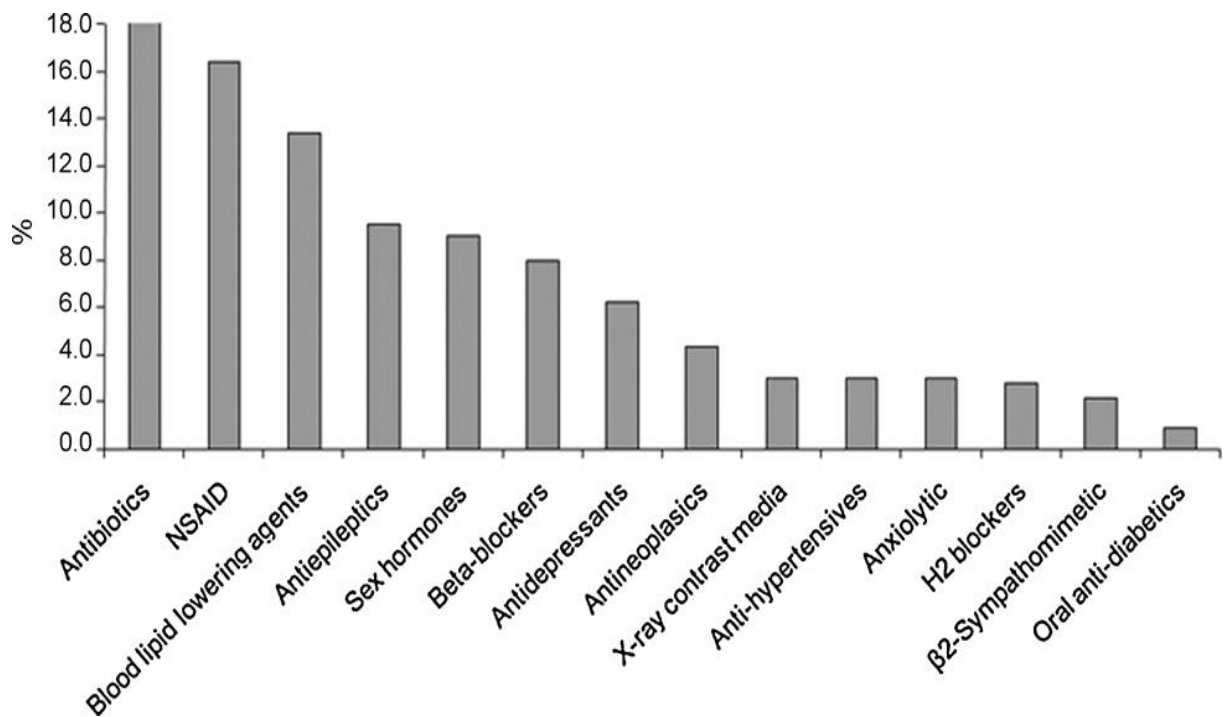


Figure 2: Le pourcentage des articles publiés sur différentes classes thérapeutiques, entre 1996 et 2009 [12].

La législation exige l'étude détaillée des effets et des conséquences pharmacologiques des deux énantiomères d'un médicament. En 2002, les revenus mondiaux des produits chiraux ont atteint 7 milliards de dollars américain et 9.5 milliards de dollars américain en 2005. Par contre les ventes globales des médicaments d'un seul énantiomère ont atteint 14.94 milliards de dollars américains après la fin de 2009 avec un taux de croissance annuel moyen de 11.4% [13-14].

I.4. Les techniques de séparations chirales:

Il existe plusieurs méthodes pour la séparation des produits chiraux telles que les techniques chromatographiques, l'électrophorèse capillaire, recristallisation, la chromatographie à lit mobile simulée (SMB)etc [6,15]. Parmi les techniques les plus importantes nous citons:

I.4.1. Les techniques classiques:

Au tout début de la découverte de l'énantiomère, il n'y avait que quelques méthodes principales introduites par Louis Pasteur:

a. Séparation chirale par cristallisation:

Elle est toujours la plus importante dans des productions de large échelle à cause de sa simplicité. Il y a deux méthodes principales de cristallisation [4]:

i. La résolution classique par cristallisation diastéréomérique:

Une substance racémique consiste à former les sels à l'aide d'un agent de dédoublement chirale [16]. Elle est largement employée dans l'industrie pharmaceutique pour produire la majorité des molécules chirales qui ne sont pas dérivées des produits naturels. Dans ce processus un énantiomère est converti en diastéréomère.

ii. La cristallisation directe:

Elle inclut la cristallisation simultanée et la cristallisation préférentielle. Bien que la cristallisation directe soit une technique alternative et un processus prometteur [4].

b. Le dédoublement spontané:

Ce type de dédoublement a été énormément utilisé à l'échelle industrielle pour la préparation des acides aminés non naturels. Nous citons par exemple le dédoublement par entraînement de la N-acétyl-D-leucine [16].

c. La résolution cinétique:

Le processus a été identifié comme une méthode pratique pour isoler l'énantiomère simple de son mélange racémique. Les produits chiraux produits s'appliquent principalement à la synthèse des produits pharmaceutiques et des produits chimiques [17].

I.4.2. Les techniques chromatographiques et électrophorétiques:

L'élaboration des méthodes pour la séparation chirale analytique sur une échelle préparatoire a attiré une grande attention pendant les deux dernières décennies. Les méthodes chromatographiques telles que la chromatographie en phase gazeuse, chromatographie liquide à haut performance (CLHP), chromatographie liquide supercritique, et la chromatographie sur couche mince ont été développées par l'utilisation de différents principes chiraux de séparation [18].

a. La chromatographie sur couche mince (CCM):

C'est une technique utile nécessitant un coût minimal avec une résolution et une précision limitées [20].

Dans la chromatographie sur couche mince, on peut utiliser l'une des trois techniques pour la séparation des énantiomères [18]:

a- La séparation directe en employant les phases stationnaires chirales, effectuées par la formation des diastereoisomères d'association.

b- Séparation par des phases stationnaires ordinaires au moyen d'additifs chiraux dans l'éluant.

c- Séparation par des phases stationnaires achirales par l'intermédiaire des dérivés diastereoisomères à former après une réaction d'échantillon avec un réactif chiral.

b. La chromatographie en phase gazeuse (CPG):

La chromatographie en phase gazeuse appartient à l'ensemble des techniques de chromatographie sur colonne [21].

Elle est parmi les techniques les plus utilisées pour la séparation des énantiomères et la séparation des composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par un chauffage sans décomposition [21, 22].

La première séparation chirale des énantiomères réussie par CPG sur une phase stationnaire chirale, a été rapportée par GIL-Av et al à l'institut de Weizman de la science pendant la fin des années 1960 [22].

Elle permet ainsi, l'analyse de mélange de nature très complexes et de volatilité très diverse. Son domaine essentiel est l'analyse de composés organiques. Elle a donné lieu néanmoins à des applications importantes en chimie inorganique.

Jusqu'au début de la présente décennie (1990), les colonnes les plus utilisées étaient « les colonnes remplies » ; ce sont le plus souvent des colonnes en métal [21].

Parmi ses avantages nous citerons [22]:

a- Les contaminants et les impuretés peuvent être séparés des solutés et les compositions énantiomériques.

b- Les choix sensibles des systèmes de solvants, les modificateurs et le gradient d'élution qui caractérisent des séparations de CLHP ne sont pas nécessaires pour la CPG.

c. La chromatographie liquide à haute performance (CLHP):

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) est une technique analytique souple employée couramment pour l'analyse des produits pharmaceutiques, les biomolécules, et beaucoup de composés organiques et ioniques. Cette technique est une forme moderne de CL, pour cela on emploie les colonnes de petites particules par lesquelles la phase mobile est pompée sous haute pression [23].

La résolution chromatographique par l'intermédiaire de la chromatographie liquide sous haute performance a été utilisée durant les 20 dernières années [24].

Deux approches sont mises en œuvre :

Une approche indirecte par dérivatation des énantiomères avec un réactif chiral, puis séparation des diastéreoisomères formés sur une colonne achirale par la chromatographie liquide ou par l'électrophorèse capillaire [25].

Une approche directe qui consiste à utiliser directement des phases stationnaires chirales ou des additifs chiraux à la phase mobile [26], et dans ce cas les trois modes de phases mobiles peuvent être utilisés:

a) mode normal:

La phase mobile est constituée d'un solvant non polaire tel que: hexane, heptane en addition avec un modifiant polaire (méthanol, éthanol....) [27].

La chromatographie en phase normale demeure la méthode de choix pour un chimiste organique [28].

b) mode inverse:

Dans ce cas la phase stationnaire est non polaire et la phase mobile est relativement polaire.

Un solvant polaire tel que l'eau, s'élue plus lentement qu'un solvant moins polaire comme l'acétonitrile [29]. Ainsi, les composés polaires sont plus élués que les composés non polaires.

Parmi les avantages du mode inverse, nous citerons, la bonne solubilité des composés polaires, préparation plus facile de témoin à partir de sérum ou de plasma, et utilisation des solvants moins coûteux [30].

c- Mode organique polaire:

Ce mode a été introduit pour la première fois par Armstrong où seuls les solvants organiques polaires comme le méthanol, éthanol, acétonitrile ou leurs combinaisons sont utilisés dans la phase mobile [31].

Dans l'industrie pharmaceutique moderne, la chromatographie liquide à haute performance est l'outil analytique principal et intégral appliqué dans toutes les étapes de découverte, de développement, et de production de médicaments [27]. Cette technique demeure la technique la plus populaire parce qu'elle offre plusieurs avantages pratiques tels que la reproductibilité élevée de la colonne, large applicabilité à différents types de composés de polarités différentes sans oublier le grand nombre de phases stationnaires chirales disponibles dans le commerce (PSCs). La figure 3 schématise d'une manière générale tous ces avantages [32]:

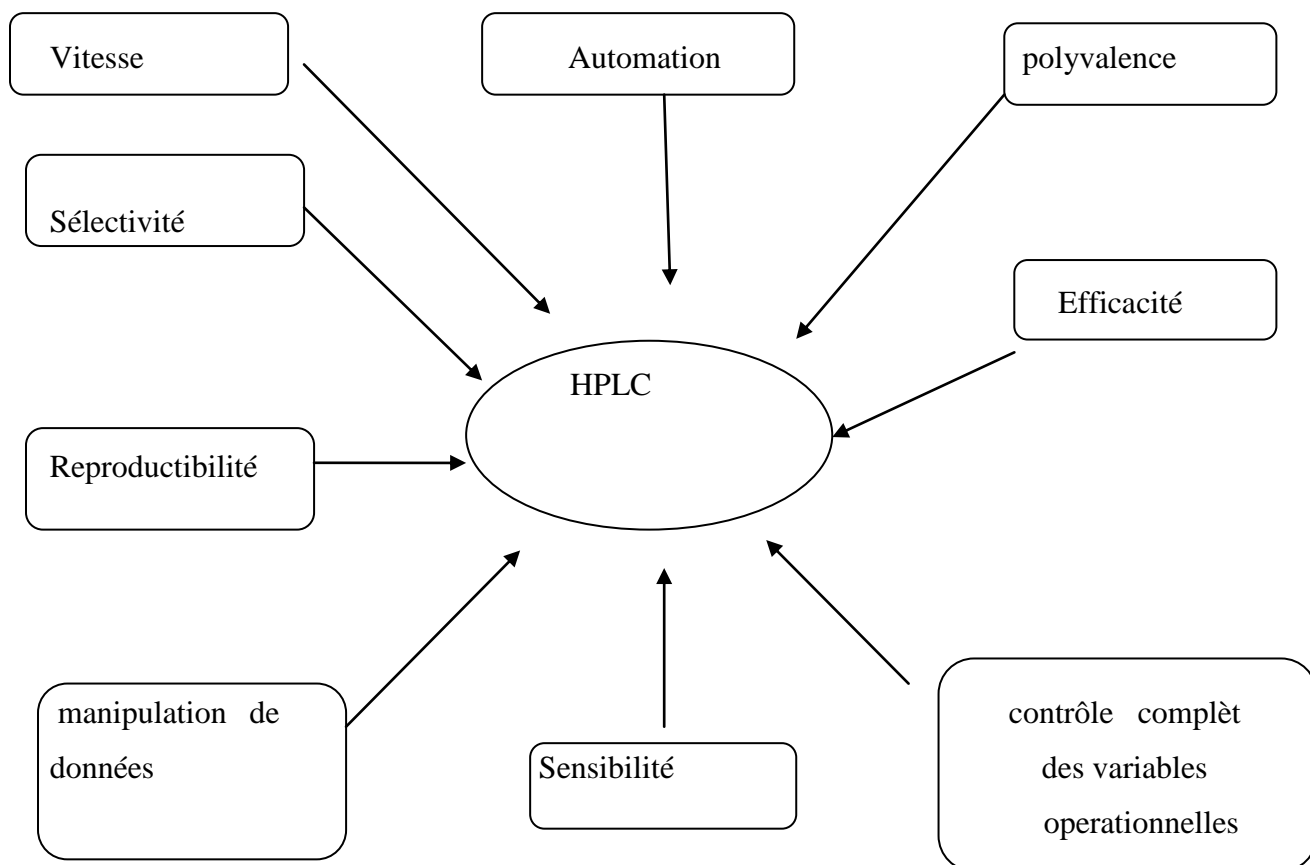


Figure 3: les Composants d'exécution définis par C.Horvath [27].

En raison des améliorations des instruments de la CLHP et la disponibilité commerciale des phases stationnaires chirales (PSCs), son utilisation a connu un essor considérable pendant les trois dernières décennies. Récemment, la CLHP est devenue utile non seulement pour déterminer la pureté optique des énantiomères mais également pour préparer des énantiopures. Jusqu'ici, plus de 100 PSCs sont commercialisées et approximativement 99% des séparations énantiomériques ont été effectuées par CLHP sur diverses PSCs [22].

La CL-SM (spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide) est actuellement très utilisée pour l'analyse des produits pharmaceutiques chiraux et leurs métabolites dans les échantillons biologiques et ceci grâce à sa sensibilité, sa vitesse et sa spécificité [33].

d. L'électrophorèse capillaire (EC):

C'est la méthode de choix dans le domaine de la préparation et de l'analyse énantiomérique. Elle possède plusieurs caractéristiques intéressantes telles que l'efficacité de séparation, la facilité d'utilisation et la durée d'analyse [22].

En général, les cyclodextrines sont les principaux agents de reconnaissance chirale utilisés en raison de leurs propriétés complexantes, de leur transparence dans le domaine UV et des faibles quantités requises pour une analyse [25].

Bien que l'EC a été à l'origine consacrée à l'analyse biologique des macromolécules, elle a été également utilisée pour la séparation d'autres composés comme les médicaments chiraux, vitamines, pesticides, colorants, ions minéraux, acides organiques et agents tensio-actifs [6].

L'EC offre un certain nombre d'avantages en comparaison avec les techniques chromatographiques [6]:

- Une petite quantité d'échantillon
- Efficacité et résolution de séparation élevées
- Mécanisme de séparation simple
- Séparation rapide et quantitative

I.5. Autres techniques:

De nombreuses techniques se sont illustrées dans le domaine de l'énantioséparation telles que :

a. *La chromatographie à fluide supercritique(CFS):*

C'est une technique puissante utilisée pour des séparations chirales, en raison de ses avantages inhérents tels que la diffusion élevée et une basse viscosité [34]. Dans cette technique la phase mobile contient plus de 60% de CO₂ [24].

b. *L'électrochromatographie capillaire:*

Elle est habituellement caractérisée comme technologie hybride obtenue par le mélange des principes chromatographiques et électrophorétiques [35]. Des phases stationnaires chirales (PSCs) connues pour la CLHP peuvent être employées à l'ECC [36].

Elle fournit une haute résolution, une courte durée d'analyse et une basse consommation de la phase mobile. Elle offre une sélectivité plus large et une facilité de séparation des composés neutres et chargés [6].

c. La chromatographie à contre courant (CCC):

C'est une technique chromatographie liquide-liquide dans laquelle la phase stationnaire et la phase mobile se composent de deux solvants ou solution non miscible [37]. La séparation des énantiomères par la CCC comporte l'addition d'un sélecteur chiral approprié à une des phases du système solvant biphasé utilisé. Son utilisation la plus importante est la chromatographie préparatoire [38].

d. La chromatographie à lit mobile simulé (SMB):

La chromatographie de SMB a été de plus en plus appliquée à la séparation des substances pures dans la chimie pharmaceutique et fine, des industries biotechnologiques, à toutes les unités de production [39,40].

L'utilisation croissante du SMB comme unité universelle dans l'industrie pharmaceutique, comme procédé de chromatographie vise et aide à séparer deux ou plusieurs constituants chimiques très voisins, qui se trouvent initialement mélangés [39,49].

e. La RMN (résonance magnétique nucléaire):

La technique RMN est utilisée pour déterminer la configuration absolue [41], et la pureté optique des échantillons énantiomériques. Elle est utilisée également dans le but de prédire la résolution énantiomérique en chromatographie ou en électrophorèse [42].

f. ***Les membranes chirales:*** Ce sélecteur peut être un acide aminé, un polymère, un polypeptide, ou une protéine. Il peut être incorporé à la membrane par l'impression moléculaire du sélecteur [43].

I.6. Les phases stationnaires chirales (PSCs):

Le développement et l'application de nouvelles phases stationnaires chirales (PSCs) avec une grande énantiosélectivité pour séparer les molécules chirales est l'un des domaines les plus actifs de la chromatographie liquide (CL) [44].

Les sélecteurs chiraux utilisés dans ces PSCs incluent les dérivés de polysaccharide, les dérivés de cyclodextrine, les antibiotiques macrocycliques, les protéines, les composés d'échange de ligand, l'éther de couronne, les polymères et les composés de type Pirkle [45].

Le classement des PSCs dépend de la nature de l'interaction spécifique des phases mobiles et des solutés avec la phase stationnaire [46]. On distingue quelques types majeurs de phases stationnaires chirales pour la chromatographie liquide :

I.6.1. Les PSCs à base de cyclodextrines:

Les cyclodextrines (ou **CDs**) sont des oligosaccharides cycliques naturels, non réducteurs constituées de 6, 7, 8, 9 et 10 unités de D.glucopiraneses correspondant aux α , β , γ , δ , ϵ cyclodextrines respectivement reliées entre elles par des liaisons de type (α -1,4) [47-49].

Elles sont obtenues à partir de l'amidon par action du bacillus amylose de macerans ou à partir des réactions de transglycosylation dans lesquelles des résidus glucosyliques sont employés comme accepteur en formant des cyclodextrines (CDs) comme produit principal à l'aide d'une enzyme : la cyclodextrine glucanotransférase (ou CGTase) [43,1]. Ainsi Les cyclodextrines (CDs) sont des produits de la dégradation enzymatique de l'amidon [50]. Les structures les plus connues des CDs sont illustrées dans les figures 4 et 5.

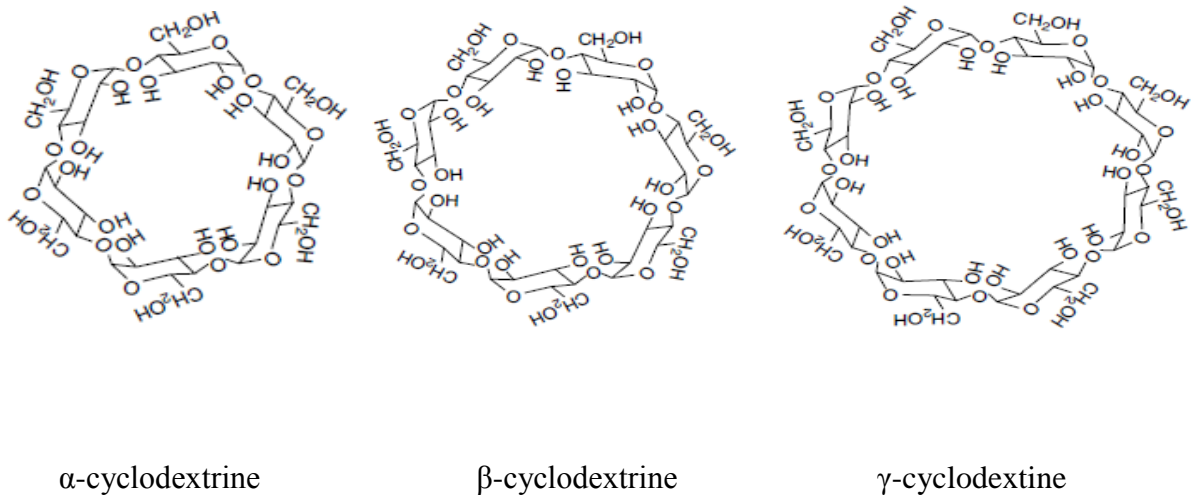


Figure 4: Structure de α , β , γ cyclodextrine

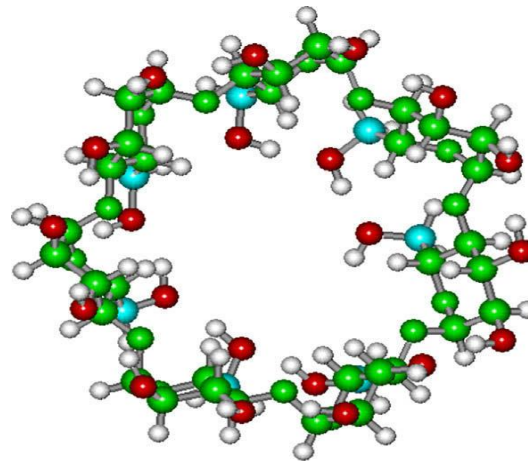


Figure 5: Structure tridimensionnelle de la β -cyclodextrine

La première PSC contenant des cyclodextrines liées chimiquement au gel de silice a été développée par Armstrong et De Mond en 1984 [6].

En raison de la conformation chaise du glucopiranosse, les unités de CD prennent la forme d'un cône tronqué ou d'un cylindre parfait. Les fonctions hydroxyles sont orientées vers l'extérieur du cylindre avec les groupes d'hydroxyles primaires des résidus de sucre sur le bord étroit du cône et les groupes d'hydroxyles secondaires sur le bord plus large. La cavité centrale est garnie des carbones et des oxygènes [48].

La surface interne hydrophobique permet la formation des complexes d'inclusion avec une grande variété de composés tels que les acides aminés aromatiques [52]. (Figure 6)

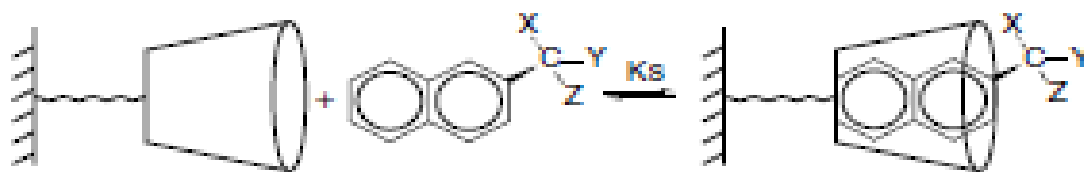


Figure 6: Exemple de mécanisme d'inclusion dans la cavité de la cyclodextrine.

La figure 7 représente l'application de la PSC à base de CD sur les produits pharmaceutiques

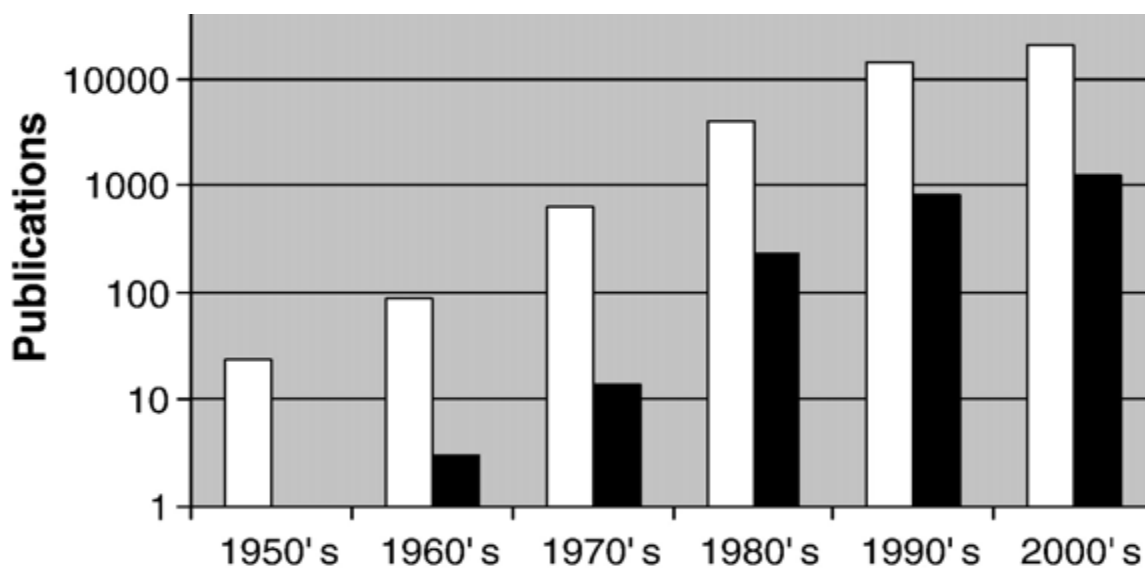


Figure 7: Publications liées aux cyclodextrines (en blanc) et à leurs applications pharmaceutiques (en noire) [48].

Pour une séparation chirale les PSCs à base de CDs possèdent la sélectivité spécifique pour résoudre des problèmes en chromatographie par leurs diverses interactions disponibles. Les CDs garantissent plusieurs types d'interactions telles que [22,26, 53] :

- Les interactions dipôle-dipôle
- Les liaisons d'hydrogène.
- La répulsion stérique.
- L'inclusion du groupe hydrophobe des molécules dans la cavité.
- Les forces de van der waals.
- Les interactions ioniques.
- Effet de solvatation.

L'application des cyclodextrines (CDs) en chromatographie liquide sous haute performance comme additif chiral dans la phase mobile ou bien comme phase stationnaire chirale (PSC) à la séparation des isomères optiques a suscité une grande attention[54].

Une des applications les plus remarquables des CDs est son utilisation comme porteurs de soluté dans la CLHP et la chromatographie ionique. En effet, la β -CD permet la solubilisation, la stabilisation, et le transport des solutés hydrophobes, elle possède également plusieurs avantages pharmacologiques tels que la réduction d'effets secondaires non désirés [44,51].

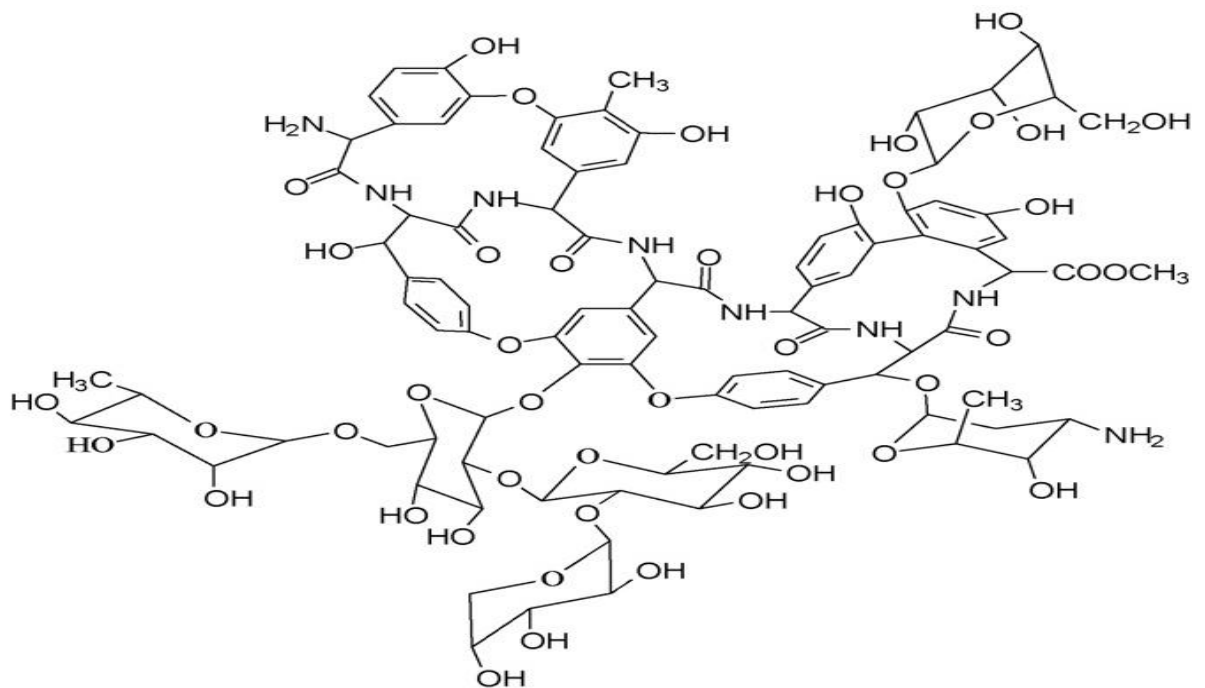
I.6.2. Les PSCs à base d'antibiotiques:

Inspiré par les possibilités stéréosélectives d'inclusion des cyclodextrines, Armstrong et al élucidaient d'autres composés macrocycliques naturels avec des propriétés de complexation d'inclusion en tant que sélecteurs chiraux mettant en évidence une nouvelle classe de PSCs à base d'antibiotiques macrocycliques [55].

L'efficacité des antibiotiques macrocycliques comme sélecteur chiral en comparaison avec d'autres sélecteurs chiraux, est dû essentiellement à leur utilisation en mode normal et inverse avec une grande stabilité et capacité [56].

Ainsi, les phases stationnaires chirales à base de teicoplanine et ristocetine A indique une sélectivité élevée pour la séparation des énantiomères d'acide aminé, alors que, les PSCs à base de vancomycine Chirobiotic V n'ont aucune énantiosélectivité par rapport à ces substances [57].

Toutes les PSCs antibiotiques de glycopéptides macrocycliques sont des PSCs multimodales [55].



RISTOCETINE A

Figure 8: Structure chimique de quelques antibiotiques utilisés comme PSCs.

La première PSC de cette classe présentée par Armstrong et al en 1994, a été la vancomycine liée à la silice. Plus tard, un certain nombre d'analogues structuraux de cette famille antibiotique de glycopeptide a été proposé. Il s'agit notamment des PSCs à base de : vancomycine, teicoplanine, ristocetine-A et l'aglycone du teicoplanine (Fig.8), qui sont de nos jours commercialisées par la société ASTEC et de Supelco sous les noms commerciaux Chirobiotic V, Chirobiotic T, Chirobiotic R et TAG respectivement [55].

Ce type de PSCs est appliqué à l'énantioséparation des produits pharmaceutiques, telles que les anti-inflammatoires non stéroïdiens NSAIDs (l'ibuprofène, ketoprofène, flurbiprofène), anticoagulant (warfarine), les β -bloquants (pindolol, propranolol, atenolol, etc.), vaso-dilatateurs (bamethan), hormones (adrénaline, DOPA, ...etc) [58].

L'énantioséparation peut être possible par l'intermédiaire de différents mécanismes [59]:

- La répulsion stérique
- Les interactions électrostatiques
- Les interactions hydrophobes par la formation du complexe d'inclusion
- Les liaisons d'hydrogènes
- Les interactions dipôles-dipôles

Ces glycopeptides possèdent notamment [23]:

- ✓ Un nombre important de centres de chiralité (18 carbones asymétriques pour la vancomycine, 20 carbones asymétriques pour la teicoplanine)
- ✓ De nombreux sites (acides, basiques, ioniques et donneur d'électrons π et des groupements ioniques chiraux (une amine secondaire et un acide pour la vancomycine).
- ✓ Leur bonne stabilité en phase aqueuse ou organique.
- ✓ Des noyaux aromatiques (5 pour la vancomycine) propices aux interactions π - π et créant des ponts entre les cavités.

La ristocetine A macrocyclique en covalence collé de glycopeptide a été appliquée la première fois comme PSC pour l'énantioséparation par Ekborg-Ott et al et sa masse moléculaire est de 2066, et possède 38 centres stéréogènes [55].

La vancomycine a été employée comme additif dans la phase mobile et comme sélecteur chiral de la phase stationnaire.

L'avoparcine existe sous deux formes α et β avoparcine, avec des masses moléculaires du 1908 et 1943 respectivement. Cet antibiotique de glycopeptide contient également 7 anneaux aromatiques, 4 parties phénoliques, 5 chaînes latérales d'hydrate de carbone, 16 groupes hydroxyle, un acide carboxylique, 2 amines primaires, une amine secondaire, 6 tringleries d'amide, 2 atomes de chlore dans le β -avoparcine (seulement une dans le α -avoparcine), et 32 centres stéréogènes [59].

Le teicoplanine A implique structurellement cinq composés semblables (T-A2-1-T-A2-5) différents dans le nombre d'atomes de carbone et de groupes de substituant sur la chaîne latérale d'acide gras attachée au sucre aminé [59].

La vancomycine, rifamycine B et thiostrepton étaient les premiers antibiotiques macrocycliques évalués comme PSCs dans la CLHP [59].

I.6.3. Les PSCs à base de protéines:

Les protéines sont constituées d'acides aminés et de glycoprotéines, en plus des parties de sucre qui sont chirales. Plusieurs protéines ont été employées comme PSCs [70]; parmi elles, nous pouvons citer: α -Acide glycoprotéine (AGP) qui est appliquée pour la séparation des énantiomères de plusieurs anti-inflammatoires non stéroïdiens et cardiovasculaires. Cellobiohydrolase I CBH utilisée de préférence pour la séparation des composés chiraux basiques tels que les β -bloquants. La protéine ovomucoïde (OV), l'albumine du sérum humain(HSA), l'albumine du sérum bovin (BSA) et l'albumine du sérum porcine(PSA) pour la séparation de propranolol [26, 55].

Les interactions mises en jeu par ce type de phases stationnaires sont [26]:

- ✓ Les liaisons hydrogène
- ✓ Les interactions électrostatiques
- ✓ Les interactions hydrophobes
- ✓ Les interactions ioniques
- ✓ La formation de complexe d'inclusion

Cependant, durant ces dernières années l'application de ces PSCs a diminué parce qu'elles sont moins stables et plus coûteuse par rapport aux autres PSCs. De plus, elles ne sont utilisées qu'en mode inverse. En outre, les PSCs à base de protéines ne sont pas pratique pour des applications quantitatives car elles montrent une plus basse capacité comparées aux autres PSCs [20].

I.6.4. Les PSCs à base de cellulose et d'amylose:

Les polysaccharides tels que la cellulose (1) et l'amylose (2) sont parmi les biopolymères optiquement actifs les plus abondants avec des structures parfaitement définies (figure 9) [60].

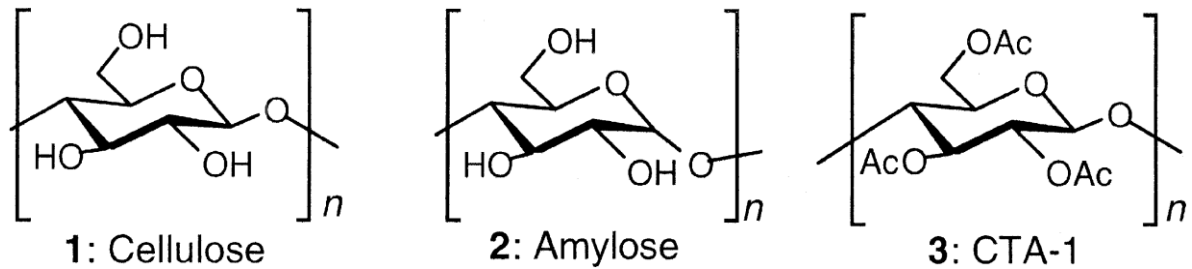


Figure 9: Structures de la cellulose, amylose et Triacétate de cellulose

(CTA-1)

La première PSC dérivée des polysaccharides est le triacétate de cellulose microcristalline (CTA-I) sous sa forme pure de polymère développée par Hesse et Hagel en 1973 [61].

La cellulose est un biopolymère cristallin qui existe sous forme de mélange de deux formes cristallines α et β cellulose, composée d'un poly- β -D-1,4 glycopiranosé linéaire [62,63].

En raison de leur abondance dans la nature, les chercheurs les ont utilisés intensivement dans diverses applications [64].

Le mécanisme de séparation des énantiomères est commandé par [62,65] :

- ✓ Les interactions dipôle-dipôle
- ✓ Les interactions π - π
- ✓ Les liaisons d'hydrogène
- ✓ L'effet stérique
- ✓ Les interactions de van der waals

En fait, il est difficile de réaliser la dissolution de cellulose sans modification chimique ou dérivatisation en raison de la longueur de la chaîne

rigide et les fortes liaisons d'hydrogène intermoléculaire et intramoléculaire [66].

Les dérivés polysaccharides, tels que les phénylcarbammates, les benzoates de cellulose et d'amylose, montrent une grande reconnaissance chirale dans une large gamme des composés chiraux. Elles ont été utilisées couramment en tant que phases stationnaires chirales (PSCs) pour la chromatographie liquide à haute performance pour séparer les énantiomères.

Le second type de ces PSCs est l'amylose, qui est un polymère linéaire constitué d'un poly α -D-1,4 glucose avec une petite chaîne latérale [68].

Récemment, l'amylose (3.5-diméthylphénylcarbammate) est devenu disponible dans le commerce sous le nom de Chiralpak IA (Daicel), qui a été alors transformée à la cellulose (3.5-diméthylphénylcarbammate) pour produire Chiralpak IB [67].

Les dérivés polysaccharides sont des PSCs multimodal. Ces PSCs sont stables, très efficaces et maintenant commercialisées sous le nom commun Chiralcel et Chiralpak (Daicel). Ces phases stationnaires sont devenues très populaires aujourd'hui puisque elles dominent plusieurs applications dans le domaine pharmaceutique en raison de leur polyvalence [20-70].

La capacité de reconnaissance chirale des dérivés de polysaccharide, tels que les phénylcarbammates et les benzoates, dépend de manière significative de la nature et de la position du substituant sur les parties phényliques. Ces substituants peuvent changer la structure et la polarité locale des dérivés de polysaccharide. Plus de 90% des déterminations de l'excès énantiomérique par la chromatographie liquide à haute performance (CLHP), est exécutée par l'application des polysaccharides comme PSCs [69]. Ainsi, plus de 80% des molécules chirales actuellement disponibles sur le marché peuvent être séparées par trois genres de polysaccharide qui ont des caractéristiques complémentaires [45].

I.6.5. Les PSCs de type Pirkle:

Les PSCs en brosse appelées également « PSCs de Pirkle » ont été inventées par le groupe Pirkle depuis le début des années 80 [26].

Ces PSCs sont constituées d'un sélecteur chiral greffé de manière covalente sur un support de silice par l'intermédiaire d'un spacer achirale. Le greffon est composé d'un acide aminé dérivé par un groupement à caractère donneur (naphtyle) ou accepteur (dinitro-3,5 benzoyl) d'électrons π [25].

Cette classe de PSC est constituée de sélecteur chiral à faible poids moléculaire [55].

Généralement, elles sont utilisées en mode normal. Quelques séparations en mode inverse ont été effectuées, en particulier pour les composés ioniques et fortement polaires, tels que les acides carboxyliques [20]. Parmi leurs avantages nous citerons leur simple utilisation et une énantiosélectivité et capacité élevées; cependant, leur utilisation est limitée à l'énantioséparation des composés aromatiques.

Ces PSCs exigent des interactions de type π - π entre la PSC et le soluté, les liaisons hydrogène et les interactions dipôle-dipôles. Ces interactions sont favorisées dans les solvants apolaires [20].

D'autres phases stationnaires chirales existent, mais leur application est moins fréquente. Parmi elles nous citerons :

I.6.6. Les PSCs à base d'échange de ligand:

Les PSCs à base d'échange de ligand se composent d'un ligand chiral bidenté immobilisé sur une colonne. Pour réaliser l'énantioséparation, une molécule chirale doit pouvoir former un complexe de coordination avec un ion en métal de transition, tel que le cuivre (II) comme additif dans la phase mobile aqueuse. Ces PSCs fournissent une excellente énantiorésolution pour les acides aminés et leurs dérivés, les hydantoïnes et les alcools aminés [20].

I.6.7. Les PSC_s à base d'éthers couronnes:

Ce sont des polyéthers macrocycliques, parmi eux, seul le 18-C₆H₄ a été efficace comme sélecteur chiral pour les PSCs à base d'éthers couronnes. (Figure 10).

Les interactions entre le soluté et la PSC sont basées sur [26,53] : La formation de complexe d'inclusion, les liaisons hydrogène entre les trois atomes d'hydrogène attachés à l'atome d'azote des solutés, les interactions dipôles-dipôles.

Ces PSCs sont efficaces pour la résolution des amines primaires [26], comportant principalement les acides aminés, les esters et les amides d'acide aminé, les alcools aminés et les solutés chiraux avec une fonction aminée primaire libre [55].

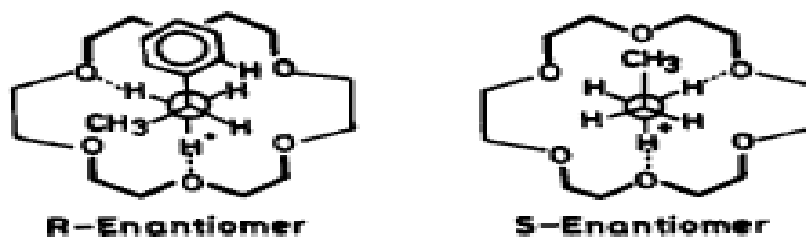


Figure 10: La représentation graphique de la structure tridimensionnelle du complexe diastéréoisomérique formé entre les énantiomères R et S de l'α-phényléthylamine et la PSC chirale 18crown-6-éther.

Références bibliographiques:

- [1] I. Ali, H. Y. Aboul-Enein, Chiral Pollutants: Distribution, Toxicity and Analysis by Chromatography and Capillary Electrophoresis, John Wiley and Sons, Ltd., 2004, 3.
- [2] V. A. DAVANKOV, Pure and App. Chem, 1997, **69**, 1472.
- [3] M. Haroun, Phases stationnaires chirales à base de teicoplanine et d'aminoglycosides pour la séparation d'énantiomères d'acides aminés. Thèse de Doctorat, Université Joseph Fourier, Grenoble1, 2007, 16.
- [4] A. Svang-Ariyaskul, W. J. Koros, R.W. Rousseau, Chemical Engineering Science, 2009, **64**, 1980.
- [5] D. R. Bobbitt, S. W. Linder, Trends Anal.chem, 2001, **20(3)**, 111.
- [6] P. Kapnissi, Analytical Separations Using Packed and Opentubular Capillary Electrochromatography, thèse de doctorat, 2004, University of Cyprus, 1.
- [7] T. W. G. Solomons, C. B. Fryhle, Chimie Organique, Modulo, Mont-Royal, 2000, 170.
- [8] M. L. Calabro, D. Raneri, S. Tommasini, R. Ficarra, S. Alcaro, A. Gallelli, N. Micale, M. Zappalà, P. Ficarra, J. Chromatogr. B, 2006, **838**, 56.
- [9] A. Ghanem, M. N. Aboul-Enein, A. El-Azzouny, M. F. El-Beairy, J. Chromatogr. A, 2010, **1217**, 1063.
- [10] M. L. Lorin, Intérêt du détecteur à dichroïsme circulaire en chromatographie liquide et du détecteur conductimétrique à couplage capacitif en électrophorèse capillaire pour l'analyse de molécules chirales, thèse de doctorat, Université d'ORLÉANS, 2008, 1.
- [11] J. Ye, J. Wu, W. Liu, Trends in Analytical Chemistry, 2009, **28**, 1148.
- [12] T. Wang, R. M. Wenslow, Jr, J. Chromatogr. A, 2003, **1015**, 99.
- [13] A. Ghanem, H. Hoenen, H. Y. Aboul-Enein, Talanta, 2006, **68**, 602.
- [14] J. L. Martinez, Environmental Pollution, 2009, **157**, 2893.

- [15] P. Paik, A. Gedanken, Y. Mastai, *Microporous and Mesoporous Materials*, 2010, **129**, 82.
- [16] A. Collet, J. Crassous, J-P Dutasta, L. Guy, *Molécules chirales Stéréochimie et propriétés*, 2006, 203.
- [17] W. J. Choi, K. Y. Lee, S. H. Kang, S. B. Lee, *Separation and Purification Technology*, 2007, **53**, 178.
- [18] G. Gübitz, M. G. Schmid, *Chiral Separations Methods and Protocols*, Totowa, New Jersey, 2004, **243**, 31.
- [19] M. Zhao, X-L. Xu, Y-D. Jiang, W-Z. Sun, W-F. Wang, L-M. Yuan, *J. Membrane Science*, 2009, **336**, 149.
- [20] Y. Zhang, D-R. Wu, D. B. Wang - Iverson, A. A. Tymiak, D. D. T, 2005, **10**, 572.
- [21] J. trenchant, *Manuel Pratique De Chromatographie en phase gazeuse*, Masson Paris Milan, Barcelone, 4.
- [22] L. Li, S. Zhou, L. Jin, C. Zhang, W. Liu, *J. Chromatogr. B*, 2010, **878**, 1266.
- [23] M. W. Dong, *Modern HPLC For Practicing Scientists*, Wiley-Interscience, New Jersey, 2006, 2.
- [24] L. Miller, M. Potter, *J. Chromatogr. B*, 2008, **875**, 230.
- [25] P. Morin, *Annales pharmaceutiques Françaises*, 2009, **67**, 243.
- [26] Z. Wang, J. Ouyang, W. R. G. Baeyens, *J. Chromatogr. B*, 2008, **862**, 10.
- [27] Y. Kazakevich, R. Lobrutto, *HPLC for pharmaceutical scientists*, Wiley-interscience, 2007, 11.
- [28] M. Z. Kagan, *J. Chromatogr. A*, 2001, **918**, 293.
- [29] V. R. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 4th ed, John Wiley & Sons, 2004, 7 .
- [30] K. Tachibana, A. Ohnishi, *J. Chromatogr. A*, 2001, **906**, 128.
- [31] N. Matthijs, M. Maftouh , Y. V. Heyden, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1111**, 49.

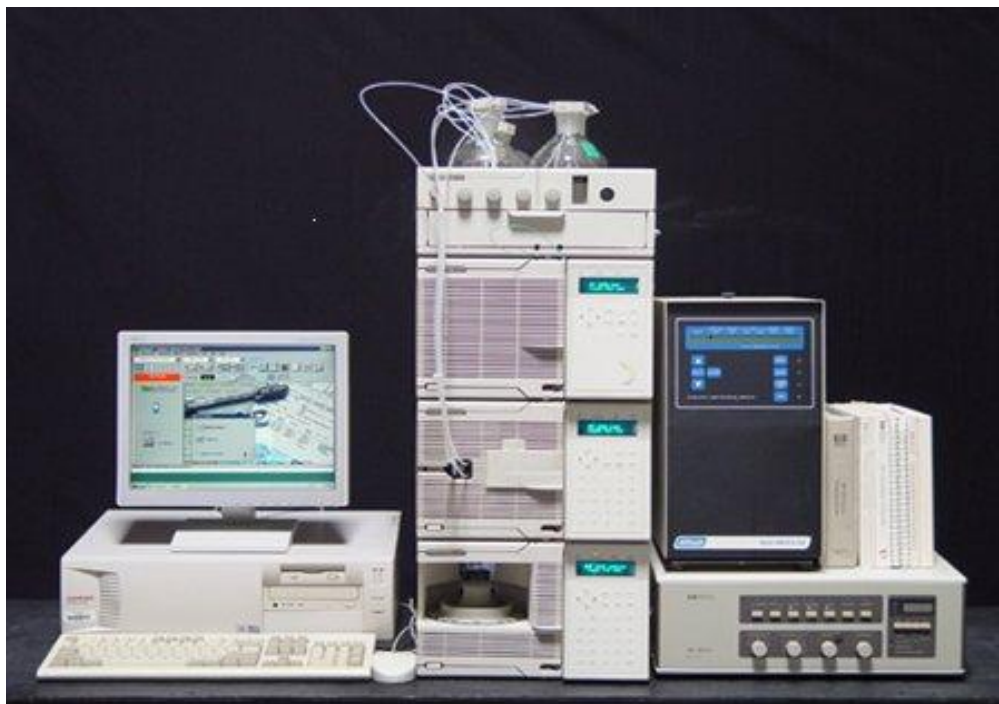
- [32] Y. Xiang, G. W. Sluggett, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2010, **53**, 878.
- [33] S. Perez, D. Barcelo, *Trends in Analytical Chemistry*, 2008, **27**, 837.
- [34] W. W. Barnhart, K. H. Gahm, Z. Hua, W. Goetzinger, *J. Chromatogr. B*, 2008, **875**, 217.
- [35] M. Lämmerhofer, *J. Chromatogr. A*, 2005, **1068**, 32.
- [36] G. Gübitz, M. G. Schmid, *J. Chromatogr. A*, 2008, **1204**, 141.
- [37] N. Rubio, S. Ignatova, C. Minguillón, I. A. Sutherland, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 8505.
- [38] E. Pérez, M. J. Santos, C. Minguillon, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1107**, 165.
- [39] J. M. M. Araújo, R. C. R. Rodrigues, M. F. J. Eusébio, J. P. B. Mota, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 5407.
- [40] M. ALAMIR, J. P. CORRIOU, *Commande Non Linéaire D'un Lit Mobile Simulé*, Laboratoire d'Automatique de Grenoble et des Sciences du Génie Chimique. Lorraine, Nancy.
- [41] C. Roussel, A. D. Rio, J. Pierrot-Sanders, P. Piras, N. Vanthuynne, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1037**, 314.
- [42] G. Uccello-Barretta, L. Vanni, F. Balzano, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 939.
- [43] K. Rahman, R. M. Illias, O. Hassan, N. A. N. Mahmood, N. A. A. Rashid, *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, **39**, 74.
- [44] R-Q. Wang, T-T. Ong, S-Ch. Ng, *J. Chromatogr. A*, 2008, **1203**, 185.
- [45] W. Lao, J. Gan, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1117**, 184.
- [46] R. M. Smith, A. Marton, *Pure & Appl. Chem*, 1997, **69**, 1476.
- [47] J. Zhao, D - Q. Lin, Y-Ch. Wang, S-J. Yao, *Carbohydrate Polymers*, 2010, **80**, 1085.
- [48] M. E. Brewster, T. Loftsson, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, **59**, 646.
- [49] P. R. Santagapita, L. G. Brizuela, M. F. Mazzobre, H. L. Ramirez, H. R. Corti, R. V. Santana, M. P. Buera, *Carbohydrate Polymers*, 2011, **83**, 203.

- [50] S. Ma, S. Shen, N. Haddad, W. Tang, J. Wang, H. Lee, N. Yee, Ch. Senanayake, N. Grinberg, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 1232.
- [51] Y. Zhao, Z. Guo, Y. Zhang, X. Xue, Q. Xu, X. Li, X. Liang, Y. Zhang, *Talanta*, 2009, **78**, 916.
- [52] K. Si Ahmed, F. Tazerouti, A.Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B.Y. Meklati, *Chromatographia*, 2005, **62**, 572.
- [53] I. Ali, K. Kumerer, H. Y. Aboul-Enein, *Chromatographia*, 2006, **63**, 303.
- [54] I. W. Kim, H. M. Choi, H. J. Yoon, J. H. Park, *Analytica Chimica Acta*, 2006, **569**, 151.
- [55] M. Lammerhofer, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 838.
- [56] M. M. Hefnawy, M. A. Sultan, M. M. Al-Shehri, *J. Chromatogr. B*, 2007, **856**, 329.
- [57] S. M. Staroverov, M. A. Kuznetsov, P. N. Nesterenko, G. G. Vasiarov, G. S. Katrukha, G. B. Fedorova, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1108**, 263.
- [58] A. F. Prokhorova, E. N. Shapovalova, O. A. Shpigun, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2010, **53**, 1171.
- [59] I. Ilisz, R. Berkecz, A. Péter, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 1846.
- [60] E. Yashima, *J. Chromatogr. A*, 2001, **906**, 106.
- [61] X. Chen, Ch. Yamamoto, Y. Okamoto, *Pure. Appl. Chem*, 2007, **79**, 1563.
- [62] M. Wada, M. Ike, K. Tokuyasu, *Polymer Degradation and Stability*, 2010, **95**, 543.
- [63] G. Agoda-Tandjawa, S. Durand, S. Berot, C. Blassel, C. Gaillard, C. Garnier, J.-L. Doublier, *Carbohydrate Polymers*, 2010, **80**, 677.
- [64] A. K. Siddhanta, K. Prasad, R. Meena, G. Prasad, G. K. Mehta, M. U. Chhatbar, M. D. Oza, S. Kumar, N. D. Sanandiya, *Bioresource Technology*, 2009, **100**, 6669.
- [65] I. Ali, V. D. Gaitonde, H. Y. Aboul-Enein, A. Hussain, *Talanta*, 2009, **78**, 461.
- [66] S. Zhang, F-X Li, J-y Yu, Y-L Hsieh, *Carbohydrate Polymers*, 2010, **81**, 668.
- [67] X-M. Chen, Ch. Yamamoto, Y. Okamoto, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1104**, 62.

- [68] G. Hu, Ch. Burton, Ch. Yang, *Journal of Cereal Science*, 2010, **51**, 35.
- [69] J. Shen, T. Ikai, Y. Okamoto, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 1041.
- [70] J. Haginaka, *J. Chromatogr. B*, 2008, **875**, 13.

Chapitre II:

La séparation chirale en mode normal sur la colonne à base de cellulose



II.1. Introduction

Récemment la chiralité a gagné beaucoup d'attention dans la recherche pharmaceutique. Les substances de médicaments administrés comme mélange racémique peuvent avoir des effets secondaires graves dus à l'activité du distome, c'est à dire l'énantiomère qui peut n'avoir aucune activité thérapeutique. Ce même énantiomère peut avoir un effet antagonique ou même toxique une fois exposé aux environnements chiraux. En raison des différences pharmacologiques, pharmacocinétiques et toxicologiques entre le distomer et son eutomer dans un environnement chiral, tel que le corps humain, l'analyse chirale est devenue essentielle dans le développement de la recherche des produits pharmaceutiques [1].

La séparation des énantiomères joue un rôle très important en chromatographie liquide à haute performance (CLHP). C'est l'une des techniques de séparation les plus puissantes et généralement les plus appliquées pour des buts qualitatives et quantitatives [2].

Le choix correct de la phase stationnaire chirale (PSC) en chromatographie liquide détermine le succès ou l'échec d'une séparation énantiosélective et chromatographique. Depuis leur introduction à la séparation chirale, les PSCs à base de dérivés de cellulose et d'amylose ont prouvé leur utilité en tant que sélecteurs chiraux en chromatographie liquide [3].

Les phases stationnaires chirales (PSCs) à base des dérivés de Polysaccharides introduites par Okamoto et al ont été identifiées comme des matériaux les plus puissants pour la séparation chromatographique des énantiomères dans des applications analytiques et quantitatives dues à leur large champ d'application [4,5]. Cependant, ces PSCs ne sont pas compatibles à tous les solvants en mode normal [6,7].

La capacité d'identification par les dérivés de polysaccharide, tels que les phénylcarbammates et les benzoates, dépend de manière significative de la nature et de la position du substituant sur les parties phényliques. Ces substituants peuvent changer la structure et la polarité locale des dérivés polysaccharides [8].

Chapitre II: La séparation chirale en mode normal sur la colonne à base de cellulose

La discrimination chirale des PSCs à base de polysaccharides provient des interactions complexes (qui n'ont pas été entièrement élucidées) avec les solutés. En résumé, une combinaison des interactions hydrophiles (par exemple liaison hydrogène), des interactions dipôle-dipôle et les interactions π - π) sont censées expliquer le processus d'identification des molécules [9-11].

Dans notre travail, nous avons testé plusieurs familles de produits optiquement actifs, tels que les produits pharmaceutiques, les herbicides ainsi que d'autres solutés chiraux (les structures en annexe A) sur une colonne à base de tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) cellulose en mode normal avec une phase mobile constituée du mélange Hexane/Ethanol. Afin d'améliorer la résolution des énantiomères, nous avons étudié l'effet de la structure du soluté, de la composition de la phase mobile ainsi que la nature de l'alcool sur la résolution chirale.

II.2. Résultats et discussion:

La figure 1, représente la structure de la PSC à base de cellulose et testée dans cette partie en mode normal. Il s'agit de la tris-(3,5-diméthylphenylcarbamate) cellulose liée au gel de silice et dont le nom commercial correspondant à CHIRALCEL OD-H.

Parmi les produits pharmaceutiques testés dans ce travail nous avons: les benzodiazépines, les anticoagulants, les β -bloquants et les anti-inflammatoires non stéroïdiens. La structures de chaque soluté est présentée en annexe A. La phase mobile utilisée est un mélange d'hexane et d'éthanol.

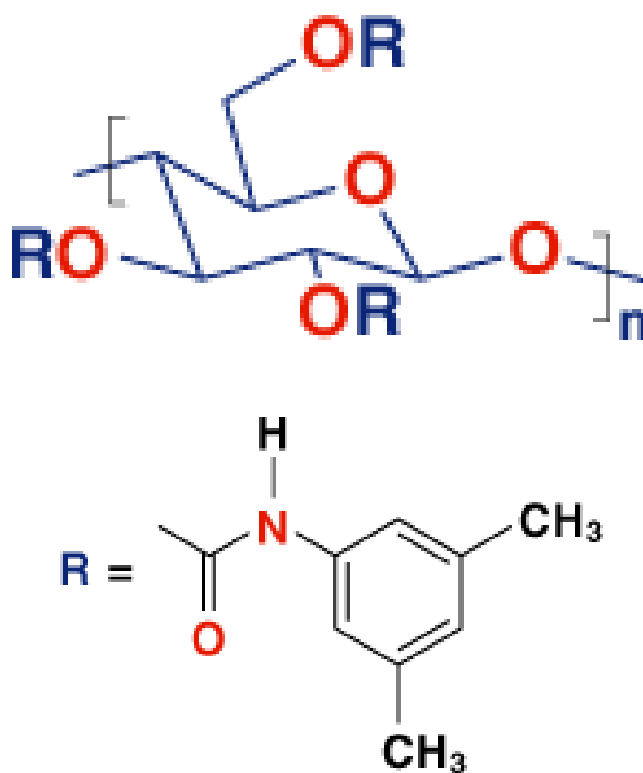


Figure 1: La structure de la tris (3,5-diméthylphenylcarbamate) cellulose

Pour chaque soluté nous avons calculé les facteurs de rétention des deux énantiomères (1,2) (dans le cas où il y a séparation k'_1 : premier énantiomère élué, k'_2 : le second énantiomère), la sélectivité (α) (3) et la résolution (R_s) (4), et cela en utilisant les relations suivantes :

$$k'_1 = (tr_1 - tr_0) / tr_0 \quad (1)$$

$$k'_2 = (tr_2 - tr_0) / tr_0 \quad (2)$$

$$\alpha = k'_1 / k'_2 \quad (3)$$

$$R_s = 2(t_{r2} - t_{r1}) / (w_1 + w_2) \quad (4)$$

Avec :

tr_1 et tr_2 : temps de rétention des deux énantiomères.

tr_0 : temps mort (obtenu avec un soluté non retenu comme le tri-tertiobutyl-benzène TTB).

w_1 et w_2 : la largeur du pic à la base.

II.2.1. Test de la phase stationnaire à base de tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) cellulose (CHIRALCEL OD-H):

Le tableau I représente les temps de rétention, les facteurs de rétention, la sélectivité et la résolution obtenus lors du test des produits optiquement actifs sur la phase stationnaire à base de tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) cellulose (CHIRALCEL OD-H).

Le mélange hexane-éthanol a été choisi comme phase mobile. Cette condition a été extrêmement efficace pour l'énantioséparation, qui est due à la simplicité de miscibilité de l'éluant et par conséquent à la grande énantiosélectivité des solutés [12,13].

Chapitre II: La séparation chirale en mode normal sur la colonne à base de cellulose

Tableau I : Séparation des produits optiquement actifs sur la phase stationnaire à base de tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) cellulose (CHIRALCEL OD-H)							
produits	Phase mobile	tr ₁	K ₁	tr ₂	K ₂	α	R _s
1	80/20 ^a	6.53	0.76	-	-	-	-
	90/10 ^a	8.93	1.58	9.18	1.65	1.05	-
	70/30 ^d	2.70	0.57	-	-	-	-
	98/2 ^a	27.40	6.92	28.54	7.25	1.05	-
2	80/20 ^a	5.60	0.51	6.93	0.87	1.71	4.14
	90/10 ^a	5.79	0.67	7.38	1.13	1.69	4.73
	70/30 ^d	2.61	0.52	3.19	0.86	1.65	3.07
3	80/20 ^a	5.85	0.58	6.04	0.63	1.08	-
	90/10 ^a	6.36	0.84	-	-	-	-
	70/30 ^d	2.80	0.63	-	-	-	-
	98/2 ^d	4.06	1.43	-	-	-	-
4	80/20 ^a	7.03	0.90	7.49	1.02	1.14	1.01
	90/10 ^a	11.17	2.23	12.16	2.51	1.19	1.31
	98/2 ^d	19.05	10.41	21.19	11.69	1.12	1.46
5	80/20 ^a	22.91	5.19	24.83	5.71	1.10	1.15
	90/10 ^a	49.17	13.21	52.53	14.18	1.07	0.81
6	80/20 ^a	34.61	8.35	41.15	10.12	1.21	2.40
7	80/20 ^a	16.50	3.46	21.50	4.18	1.39	3.88
	90/10 ^a	30.56	7.83	40.96	10.84	1.38	3.13
8	80/20 ^a	18.48	4.00	27.49	6.43	1.61	5.65
9	80/20 ^a	21.14	4.71	30.48	7.24	1.54	4.67
	90/10 ^a	45.75	12.22	69.07	18.96	1.55	5.33
10	80/20/0.1 ^c	2.07	0.21	-	-	-	-
11	80/20/0.1 ^c	2.06	0.21	-	-	-	-
12	80/20/0.1 ^c	2.15	0.27	-	-	-	-
13	80/20/0.1 ^c	2.02	0.19	-	-	-	-
	90/10/0.1 ^c	2.26	0.33	-	-	-	-

Chapitre II: La séparation chirale en mode normal sur la colonne à base de cellulose

Tableau I : suite							
Produits	Phase mobile	tr_1	k'_1	tr_2	k_2	α	R_s
14	80/20/0.1 ^c	2.15	0.27	2.28	0.34	1.28	-
	90/10/0.1 ^c	2.54	0.50	2.78	0.64	1.29	1.25
15	80/20 ^a	6.08	0.64	7.30	0.97	1.51	3.47
	90/10 ^a	6.59	0.91	8.07	1.33	1.47	4.08
	70/30 ^d	2.81	0.63	3.31	0.92	1.46	2.40
	98/2 ^a	8.95	1.68	11.86	2.55	1.52	5.88
	98/2 ^d	4.58	1.74	5.98	2.58	1.48	4.33
Fluazifop-butyl	80/20 ^a	5.08	0.37	-	-	-	-
	90/10 ^a	5.61	0.62	-	-	-	-
	98/2 ^a	8.61	1.58	-	-	-	-
Haloxifop-éthoxyéthyl	80/20 ^a	4.98	0.35	-	-	-	-
	70/30 ^d	2.26	0.31	-	-	-	-
Lorazepam	80/20 ^a	11.05	1.99	16.31	3.41	1.72	5.30
	90/10 ^a	22.57	5.52	35.38	9.23	1.67	6.39
Lormetazepam	80/20 ^a	14.08	2.81	15.93	3.30	1.18	1.82
	90/10 ^a	26.93	6.78	31.47	8.09	1.19	2.12
Oxazepam	80/20 ^a	11.00	1.97	12.54	2.39	1.21	1.72
	90/10 ^a	23.56	5.81	28.13	7.13	1.23	2.40
	70/30 ^d	3.67	1.13	4.09	1.38	1.22	1.18
	98/2 ^a	21.64	5.48	31.42	8.41	1.53	7.45
Temazepam	80/20 ^a	12.84	2.47	14.03	2.80	1.13	1.39
	90/10 ^a	23.93	5.92	26.36	6.62	1.12	1.51
	98/2 ^d	44.30	25.53	47.42	27.39	1.07	-
Warfarine	80/20/0.1 ^b	3.14	0.95	5.25	2.26	2.38	6.65
	90/10/0.1 ^b	4.53	1.71	9.07	4.43	2.59	9.09
Benzoïne	80/20 ^a	7.56	1.05	9.60	1.60	1.51	4.91
	90/10 ^a	10.31	1.98	13.58	2.93	1.48	6.02
	70/30 ^d	3.05	0.77	3.72	1.16	1.50	3.25
	98/2 ^a	20.40	5.11	29.48	7.83	1.53	7.55

Chapitre II: La séparation chirale en mode normal sur la colonne à base de cellulose

Tableau I: suite							
Produits	Phase mobile	t_{r1}	k'_1	t_{r2}	k'_2	α	R_s
Propranolol	80/20/0.1 ^b	3.43	1.13	4.18	1.60	1.41	2.79
	90/10/0.1 ^b	5.01	2.00	6.75	3.04	1.51	4.67
Atenolol	80/20/0.1 ^b	5.32	2.30	6.43	2.98	1.30	2.15
Verapamil	80/20/0.1 ^b	3.36	1.09	-	-	-	-
Tertatolol	80/20/0.1 ^b	2.54	0.58	4.80	1.98	3.42	8.44
Salbutamol	80/20/0.1 ^b	2.36	0.47	-	-	-	-
Naproxéne	80/20/0.1 ^c	2.70	0.60	2.90	0.70	1.20	0.95
	90/10/0.1 ^c	3.50	1.06	3.84	1.26	1.19	1.36
Ketoprofène	80/20/0.1 ^c	2.61	0.54	-	-	-	-
Ibuprofène	80/20/0.1 ^c	1.98	0.17	-	-	-	-
	90/10/0.1 ^c	2.22	0.30	-	-	-	-
Mecoprop	80/20/0.1 ^c	2.023	0.19	-	-	-	-
	90/10/0.1 ^c	2.273	0.34	-	-	-	-

^a: Hexane/Ethanol; 0.5 mL mn⁻¹; λ_{254nm}

^b: Hexane/Ethanol/Diéthylamine ; 0.5 mL mn⁻¹; λ_{254nm}

^c: Hexane/Ethanol/Acide trifluoroacétique; 0.5 mL mn⁻¹; λ_{254nm}

^d: Hexane/Ethanol ; 1mL mn⁻¹ ; λ_{254nm}

Chapitre II: La séparation chirale en mode normal sur la colonne à base de cellulose

Sur 32 solutés testés, 19 composés ont été totalement séparés. Il s'agit des produits (2, 4-9, 14 et 15), les benzodiazépines, les β -bloquants, benzoïne, warfarine et le naproxène.

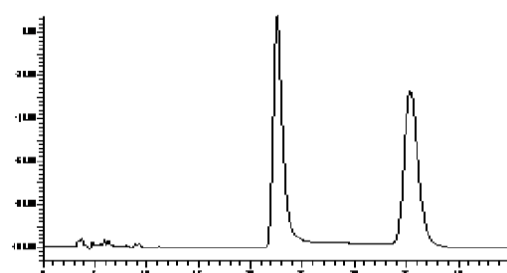
Les énantiomères des β -bloquants tels que l'atenolol, propranolol, tertatolol ont été bien séparés sur la colonne Chiralcel OD-H. Cette résolution est probablement due aux liaisons hydrogène et les interactions de type π - π entre la PSC et les solutés [14].

Les benzodiazépines sont très fortement retenues, ce qui explique les fortes interactions π - π entre le noyau aromatique de la PSC et la partie phénylique des composés analysés, ainsi que les interactions dipôle-dipôle entre les fonctions carbamates de la PSC et les solutés [15].

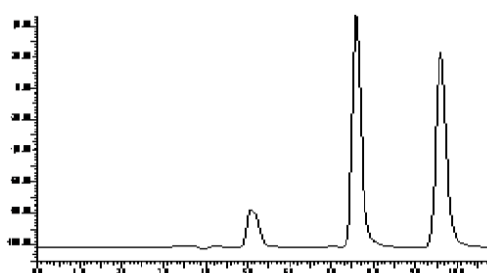
La séparation chirale du produit 14 est due essentiellement aux interactions dipôle-dipôle, liaisons hydrogène entre les atomes électronégatifs et la PSC et les interactions π - π entre les noyaux aromatiques de chaque soluté optique et la PSC [16].

Parmi les chromatogrammes obtenus, nous présentons quelques exemples sur la figure (2).

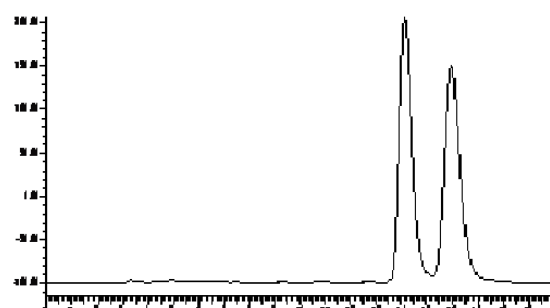
lorazepam



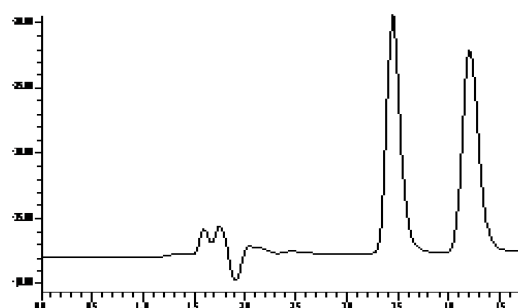
Benzoïne



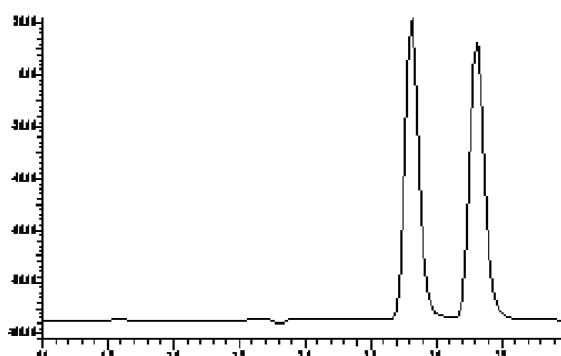
Lormetazepam (80/20)



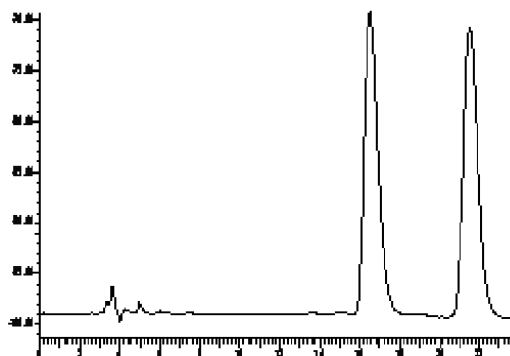
Propranolol (80/20)



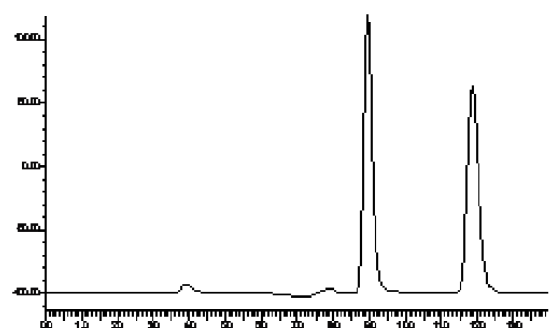
Soluté 3 (70hexane-30ethanol)



Soluté 7 (80/20)



Soluté 15



Soluté 6

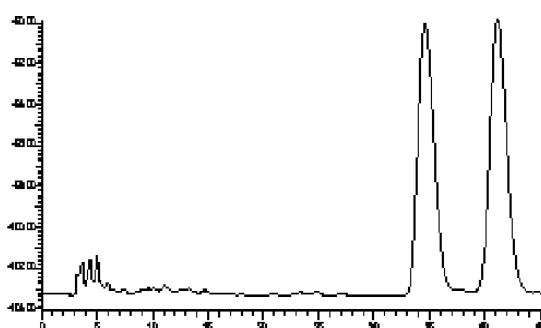


Figure 2: Exemples de chromatogrammes de lorazepam, benzoïne, lormetazepam et propranolol et de quelques produits optiquement actifs obtenus sur la chiralcel OD-H (phase mobile: Hexane/Ethanol et Hexane/Ethanol/Diéthylamine; 0.5 mL mn^{-1} ; $\lambda_{254\text{nm}}$).

a. Effet de l'ajout de modifiants anioniques et cationiques:

Les additifs acides et basiques de la phase mobile sont utilisés couramment avec les phases stationnaires chirales à base des polysaccharides pour minimiser les interactions avec les groupements silanols résiduels, afin de donner une meilleure forme du signal et une plus grande résolution des composés chiraux. En mode normal, il est bien connu que l'addition des additifs polaires comme la triéthylamine (TEA) et l'acide trifluoroacétique (TFA) à la phase mobile est nécessaire pour la séparation des énantiomères basiques (tels que les β -bloquants) ou acides (tels que les herbicides et les anti-inflammatoires non stéroïdiens) [10,18.19].

Quant à la diéthylamine, elle est ajoutée dans le but de masquer les groupements silanol qui peuvent impliquer des interactions secondaires avec le soluté et réduire ainsi la sélectivité vis-à-vis du soluté optiquement actif et induire une asymétrie du pic. Dans notre travail l'utilisation de la DEA a permis la séparation des β -bloquants (propranolol, atenolol et tertatolol).

b. Effet de la composition de la phase mobile sur la rétention:

La figure 3 démontre l'effet de l'éthanol sur la rétention de la benzoïne et du soluté 15.

Ainsi, en augmentant la composition en éthanol dans la phase mobile, ce dernier entre en compétition avec le soluté pour la formation de liaisons hydrogène avec la PSC. D'une manière primordiale, l'environnement stérique de la cavité chirale de la PSC peut être changé avec différents modificateurs d'alcool [17], ce qui se traduit par l'élution rapide des solutés, et ainsi la coélution des énantiomères.

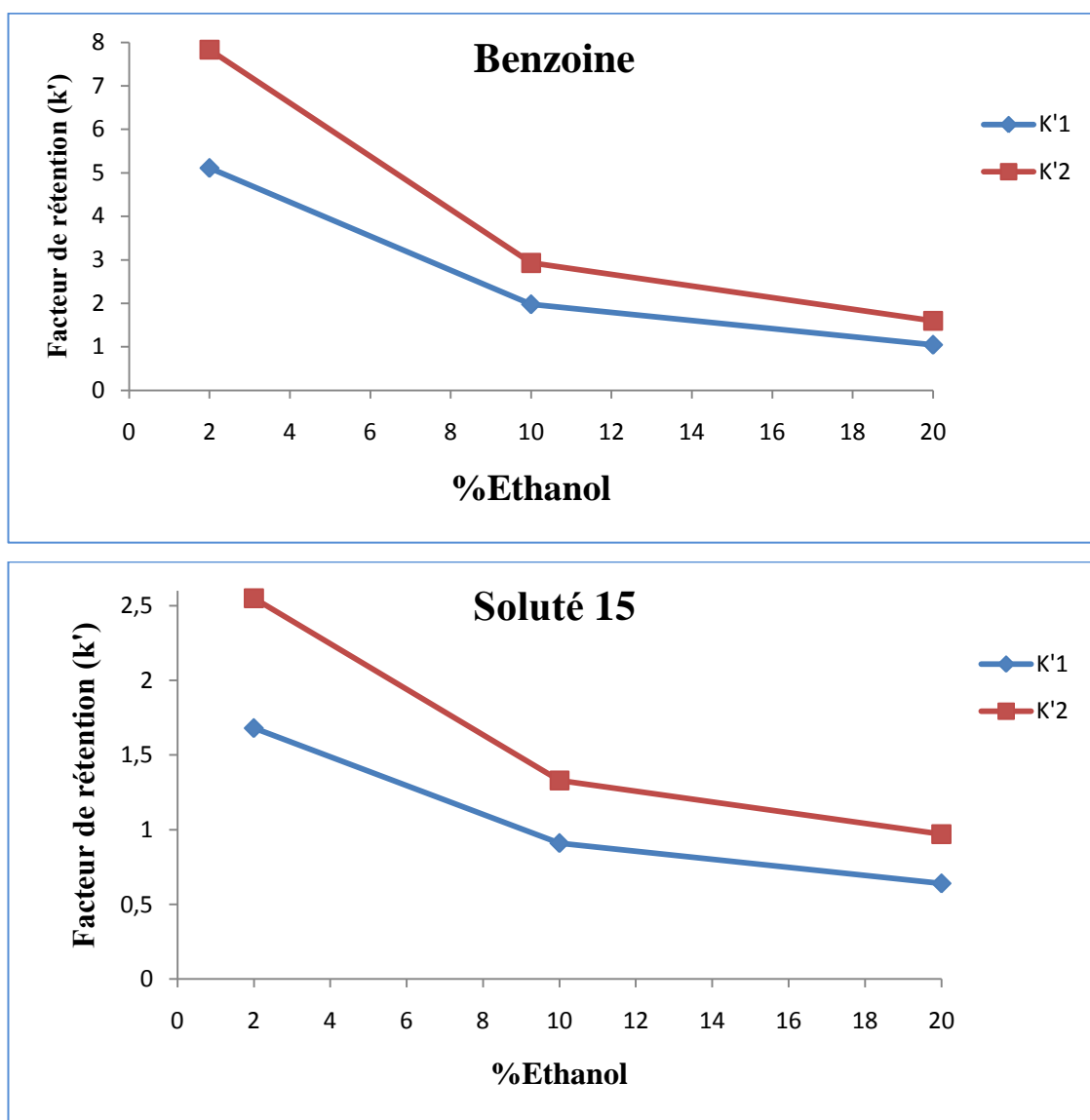


Figure 3 : L'effet de l'éthanol sur les facteurs de rétention de la benzoine et soluté 15 sur la colonne chiralcel OD-H (phase mobile: hexane/éthanol, 0.5ml mn⁻¹, λ_{254}).

Sur la figure 4, nous pouvons observer l'influence de la composition de la phase mobile sur les facteurs de rétention. Nous pouvons constater pour les énantiomères oxazepam et benzoine que l'addition de 10% d'hexane dans la phase mobile augmente les temps de rétention et par conséquent l'énantiorésolution (tableau I), à la différence de l'éthanol, confirmant la participation des interactions d'hydrogènes entre les solutés et le sélecteur chiral [20].

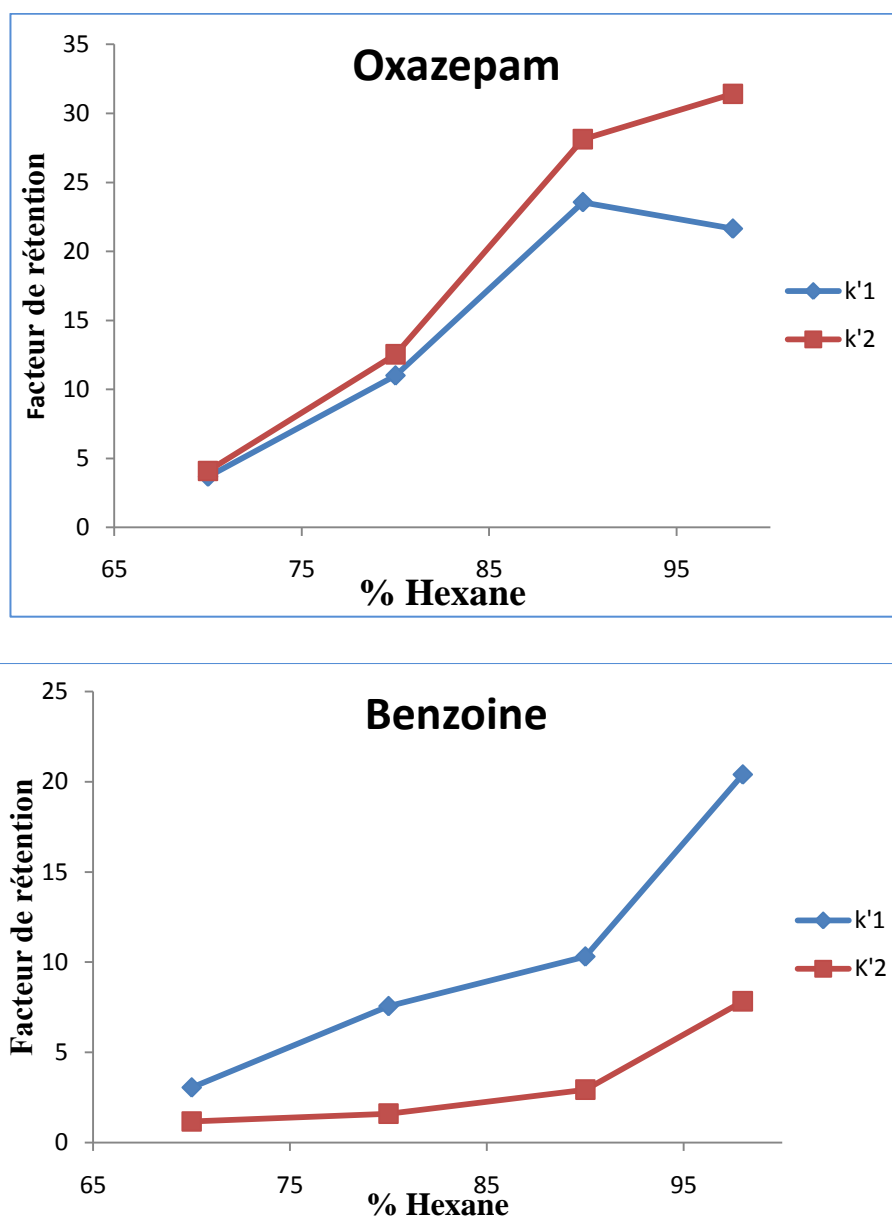


Figure 4: Effet de la composition de la phase mobile sur les facteurs de rétention de la benzoïne et oxazepam sur la chiralcel OD-H. (Phase mobile: Hexane/Ethanol, 0.5 mL mn⁻¹, λ_{254}).

La séparation des benzodiazépines a été testée sur la phase stationnaire chiralcel OD-H. Il s'agit du lorazepam, oxazepam, temazepam et lormetazepam. Le tableau I montre une séparation totale de cette famille sur cette PSC. Cette résolution est probablement due aux interactions de types liaison hydrogène entre les groupements N-H du groupement carbamate de la PSC et les groupements carbonyles des benzodiazépines, en plus des interactions additionnelles de type dipôle-dipôle se produisant entre les groupements polaires des solutés et des carbonyles du sélecteur chiral [21].

La figure 5 représente l'effet de la composition de la phase mobile sur la résolution et la sélectivité.

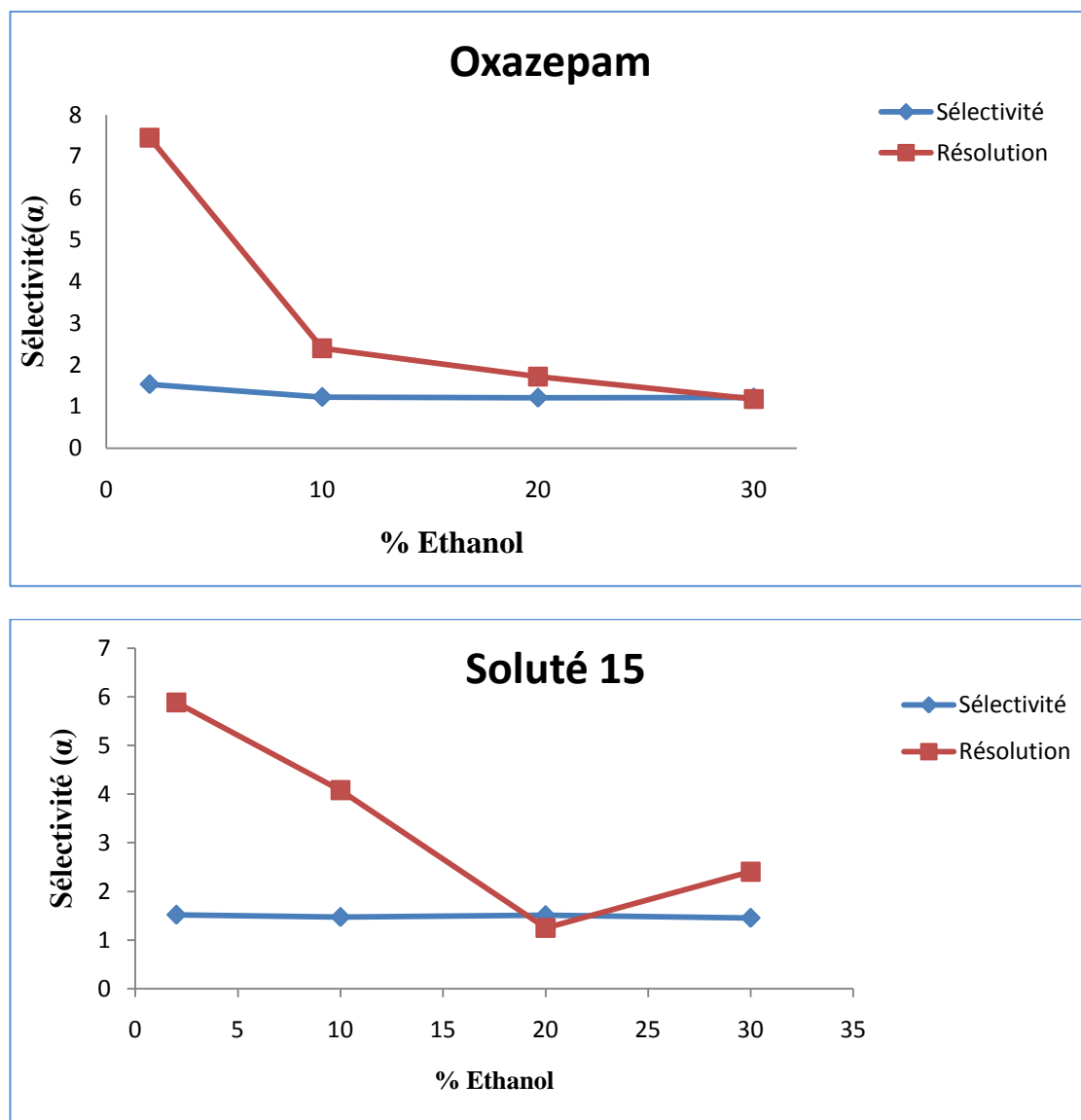
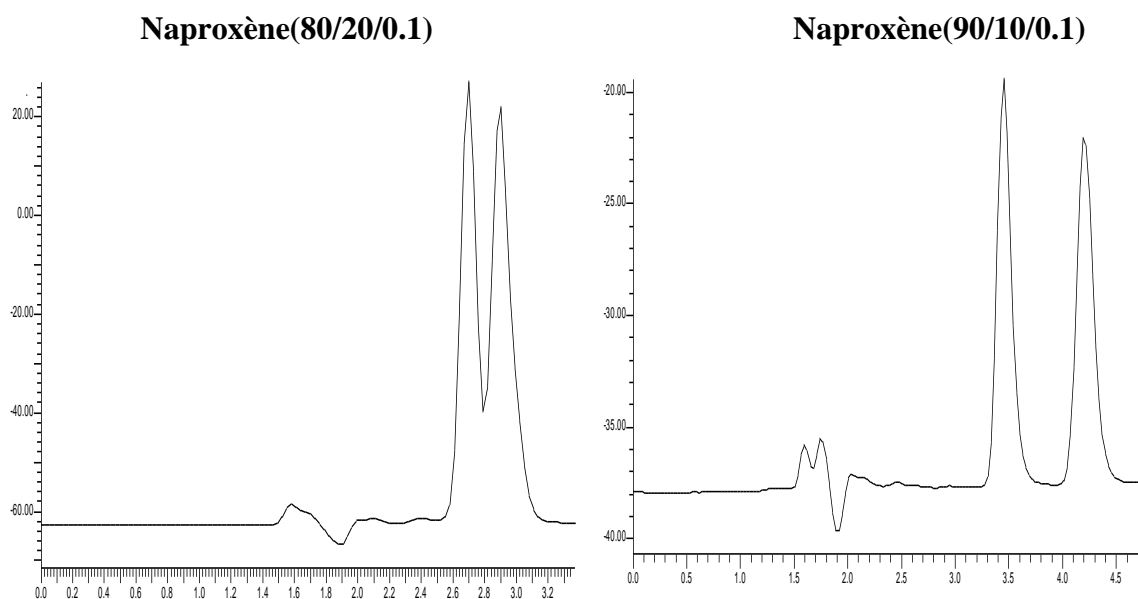


Figure 5: Effet de la composition de la phase mobile en éthanol sur la sélectivité et sur la résolution des produits 15 et oxazepam sur la chiralcel OD-H. (Phase mobile: hexane/éthanol, 0.5 mL mn^{-1} , λ_{254}).

Un exemple de chromatogrammes obtenus de quelques solutés chiraux est représenté sur la figure 6.



Soluté 1

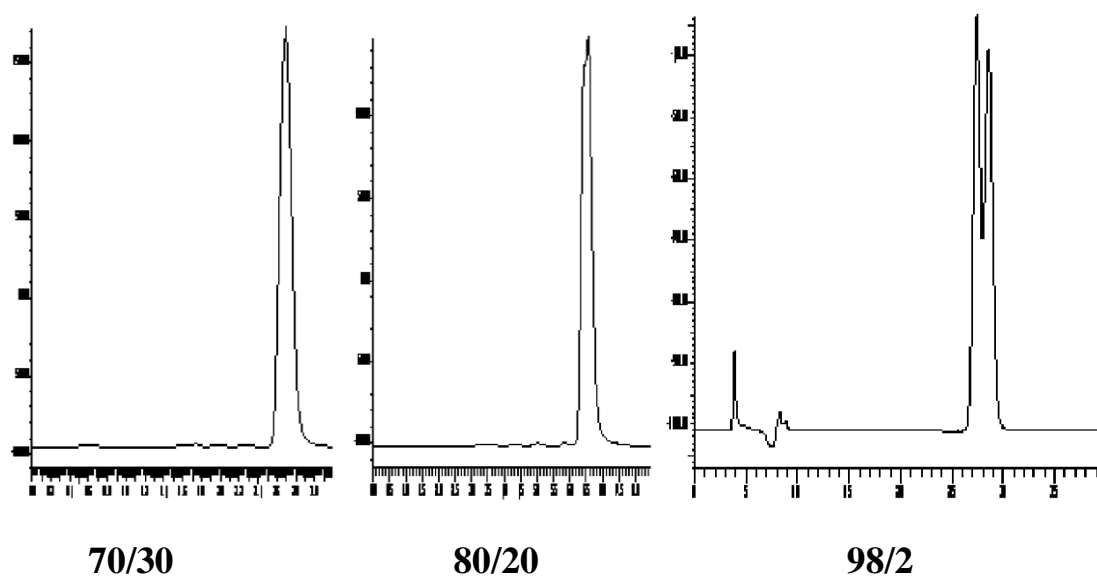


Figure 6: L'effet de la composition de la phase mobile sur le soluté 1 et le naproxène sur la chiralcel OD-H (Hexane/Ethanol et Hexane/Ethanol/Acide trifluoroacétique; 0.5 mL mn^{-1} ; $\lambda_{254\text{nm}}$).

c. Effet de la structure du soluté sur la résolution chirale:

Lorsqu'on compare les structures des cinq produits séparés : 5-9, nous pouvons noter qu'ils portent tous des groupements 3,5-dinitrobenzoylé. Ces groupements sont susceptibles de former des liaisons de type π - π très fortes avec le groupement phényle de la cellulose, alors que le groupement carbamate de ces solutés forme à son tour des

liaisons hydrogène avec celui de la phase stationnaire, ce qui explique l'énantioséparation de ce type de composés.

Pour le produit 2, la séparation chirale est probablement due à l'existence des liaisons d'hydrogène entre les groupes NH de la tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) cellulose et l'atome d'oxygène du trans stilbène oxide (soluté 2) [22]. D'un autre côté, la présence d'un chlore en position para (soluté 3) ne permet pas la résolution des deux énantiomères de ce soluté. Ainsi, la présence d'un atome plus volumineux que l'hydrogène provoquerait un encombrement stérique empêchant ainsi la séparation chirale du soluté 3.

Les facteurs stériques d'un soluté jouent un rôle important dans le mécanisme de séparation chirale. Ceci est clairement observé dans les différents facteurs de rétention des cinq produits (5-9) [22].

Pour le produit 4, la séparation chirale est due probablement aux liaisons d'hydrogène entre le OH du soluté et les groupements C=O et N-H du polymère de la PSC et les interactions π - π avec le groupe phényle de polymère [22].

d. Effet de la nature de l'alcool sur la résolution chirale:

Les modificateurs d'alcool utilisés dans la phase mobile en mode normal ont une influence sur la sélectivité de la PSC à base de polysaccharides. Dans le cas du Lorazepam par exemple, $\alpha=1.53$ avec le 2-propanol alors qu'avec l'éthanol $\alpha=1.67$.

La figure 7 montre la variation de la sélectivité en fonction de la nature de l'alcool. Cette différence de sélectivité, d'après certains auteurs, est due probablement au changement d'environnement stérique des cavités chirales par les différents modificateurs d'alcool [23,24].

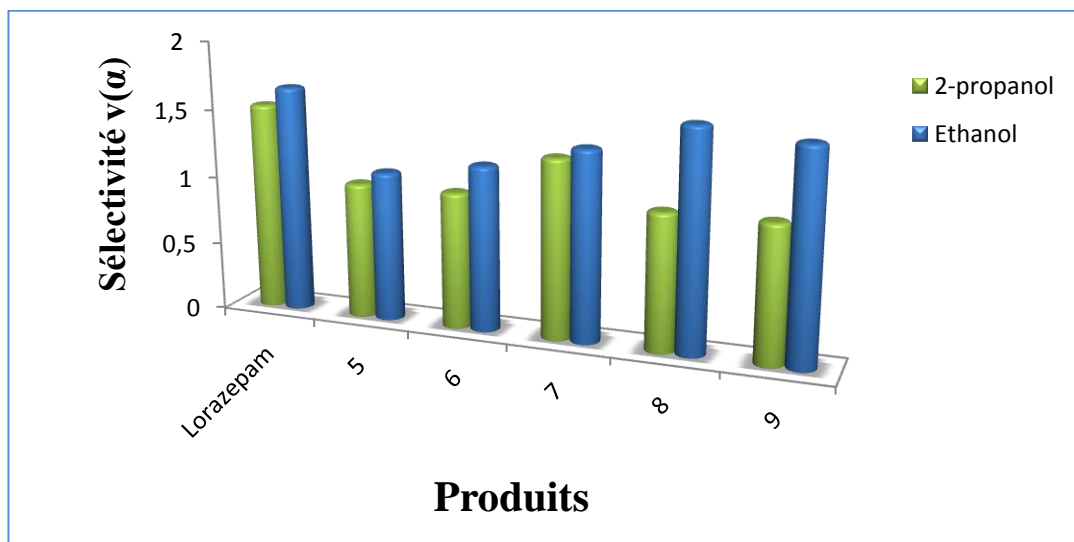


Figure 7: Variation de la sélectivité en fonction de la nature de l'alcool sur la Chiralcel OD-H (phase mobile : hexane/éthanol: 80/20, 0.5mL mn⁻¹, λ_{254nm} . Heptane /2-propanol: 80/20, 1mL mn⁻¹, λ_{254nm})

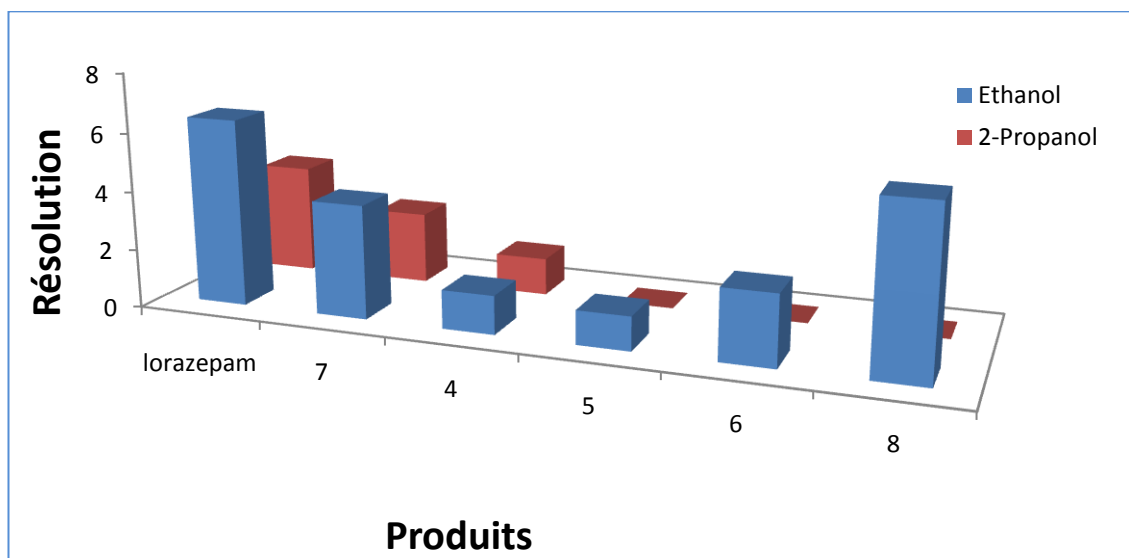


Figure 8: Variation de la résolution en fonction de la nature de l'alcool sur Chiralcel OD-H (phase mobile: hexane/éthanol: 80/20, 0.5mL mn⁻¹, λ_{254nm} . Heptane /2-propanol: 80/20, 1mL mn⁻¹, λ_{254nm})

Chapitre II: La séparation chirale en mode normal sur la colonne à base de cellulose

Le tableau II montre que certains solutés (5, 6, 8 et 9) ont été parfaitement résolus avec une phase mobile en éthanol, alors qu'avec le 2-propanol aucune séparation chirale n'a été obtenue pour ces mêmes produits. La figure 8 démontre l'effet de la nature de l'alcool sur la résolution chirale.

Tableau II : Effet de la nature de l'alcool sur la sélectivité et la résolution obtenues sur la Chiralcel OD H en mode normal					
produits	Phase mobile	k'_1	k'_2	α	R_s
3	98/2 ^a	2.27	2.79	1.23	2.34
	98/2 ^c	1.43	-	-	-
4	90/10 ^a	3.93	4.50	1.14	1.27
	90/10 ^b	2.23	2.51	1.13	1.31
5	80/20 ^a	11.20	11.20	1.00	0.00
	80/20 ^b	5.19	5.710	1.10	1.15
6	80/20 ^a	19.09	19.09	1.00	0.00
	80/20 ^b	8.35	10.12	1.21	2.40
7	80/20 ^a	8.12	10.62	1.31	2.45
	80/20 ^b	3.46	4.81	1.39	3.88
8	80/20 ^a	4.03	4.03	1.00	0.00
	80/20 ^b	4.00	6.43	1.61	5.65
9	80/20 ^a	10.10	10.10	1.00	0.00
	80/20 ^b	4.71	7.24	1.54	4.67
Lorazepam	90/10 ^a	9.30	14.28	1.53	3.75
	90/10 ^b	5.52	9.23	1.67	6.39
Oxazepam	90/10 ^a	9.33	12.63	1.35	2.65
	90/10 ^b	5.81	7.13	1.23	2.40

^a : Heptane/2-propanol, 1 mL min⁻¹, λ_{254nm}

^b : Hexane/Ethanol; 0.5 mL mn⁻¹; λ_{254nm}

^c : Hexane/Ethanol ; 1mL mn⁻¹ ; λ_{254nm}

II.3. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons rapporté la séparation des énantiomères sur la PSC à base de tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) cellulose en mode normal par la chromatographie liquide à haute performance.

Cette colonne (chiralcel OD-H), en plus de sa stabilité, a permis la séparation de quinze composés optiquement actifs. Il s'agit des produits (2, 6-9, 15), les benzodiazépines, les β -bloquants, benzoïne et warfarine. Quatre autres composés ont été partiellement séparés tels que le 4, 5, 14 ainsi que le naproxène.

Nous avons également démontré les effets déterminants de la composition de la phase mobile, la structure des solutés, ainsi que la nature de l'alcool utilisé.

Ces résultats ont confirmé qu'un changement de structure du soluté peut avoir une influence conséquente sur la résolution des énantiomères d'un couple donné.

Références bibliographiques:

- [1] H. Ates, D. Mangelings, Y. V. Heyden, *J. chromatogr. B*, 2008, **875**, 57.
- [2] Y. Ming, L. Zhao, H. Zhang, Y. Shi, Y. Li, *Chromatographia*, 2006, **64**, 273.
- [3] A. Ghanem, H. Hoenen, H. Y. Aboul-Enein, *Talanta*, 2006, **68**, 603.
- [4] T. Zhang, Ch. Kientzy, P. Franco, A. Ohnishi, Y. Kagamihara, H. Kurosawa, J. *Chromatogr. A*, 2005, **1075**, 65.
- [5] R. B. Kasat, N- H. L. Wang, E. I. Franses, *J. chromatogr. A*, 2008, **1190**, 110.
- [6] N. Matthijs, C. Perrin, M. Maftouh, D.L. Massart, Y. V. Heyden, *J. chromatogr. A*, 2004, **1041**, 120.
- [7] J. Y. Jin, W. Lee, *Bull. Korean Chem. Soc*, 2008, **29**, 491.
- [8] J. Shen, T. Ikai, Y. Okamoto, *J. chromatogr. A*, 2010, **1217**, 1041.
- [9] N. Mesplet, Y. Saito, P. Morin, L. A. Agrofoglio, *J. chromatogr. A*, 2003, **983**, 117.
- [10] L. Zhou, Ch. Welch, C. Lee, X. Gong, V. Antonucci, Z. Ge, *J. Pharm. Biomed. Anal*, 2009, **49**, 964.
- [11] E. Perez, M. J. Santos, C. Minguillon, *J. chromatogr. A*, 2006, **1107**, 166.
- [12] L. Xiu-Juan, Z. Liang, M. Yong-Fei, P. Xian-Zhi, Z. Yong-Zhang, Ch. Li-Ren, *Chin. J. Anal. Chem*, 2007, **35**, 516.
- [13] Y. Liu, H. Zou, *J. chromatogr. A*, 2008, **1178**, 123.
- [14] Z. Wang, J. Ouyang, W. R.G. Baeyens, *J. chromatogr. B*, 2008, **862**, 5.
- [15] M. L. Calabro, D. Raneri, S. Tommasini, R. Ficarra, S. Alcaro, A. Gallelli, N. Micale, M. Zappala, P. Ficarra, *J. chromatogr. B*, 2006, **838**, 58.
- [16] P. Chunxiu, S. Baochun, Z. Xuejun, Z. Datong, X. Xiuzhu, *Chin. J. Anal. Chem*, 2006, **34**, 160.
- [17] F. Zhan, G. Yu, B. Yao, X. Guo, T. Liang, M. Yu, Q. Zeng, W. Weng, *J. chromatogr. A*, 2010, 4.

Chapitre II: La séparation chirale en mode normal sur la colonne à base de cellulose

- [18] R. W. Stringham, Y. K. Ye, J. Chromatogr. A, 2006, **1101**, 86.
- [19] N. Matthijs, M. Maftouh, Y. V. Heyden, J. chromatogr. A, 2006, **1111**, 50.
- [20] K. S. S. Dossou, P. Chiap, B. Chankvetadze, A-C. Servais, M. Fillet, J. Crommen, J. chromatogr. A, 2009, **1216**, 7453.
- [21] S. Fanali, G. D’Orazio, K. Lomsadze, B. Chankvetadze, J. chromatogr. B, 2008, **875**, 300.
- [22] R. B. Kasat, S. Y. Wee, J. X. Loh, N-H L. Wang, E. I. Franses, J. chromatogr. B, 2008, **875**, 83.
- [23] T. Wang, R. M. Wenslow, Jr, J. chromatogr. A, 2003, **1015**, 100.
- [24] I. Ilisz, Z. Pataj, R. Berkecz, I. Szatmari, F. Fülöp, A. Péter, J. chromatogr. A, 2010, **1217**, 2983.

Chapitre III:

La séparation chirale en mode normal sur la colonne à base d'amylose



III.1. Introduction

Parmi les polysaccharides utilisés en CLHP, le tris-(3,5-diméthylphénylcarbamate) amylose est le meilleur dérivé utilisé dans la séparation chirale et le plus efficace pour beaucoup de mélanges racémiques tels que les alcools aromatiques et aminés, les acides carboxyliques racémiques, les β -bloquants et les amides. Cependant, ce dérivé n'est pas compatible avec tous les solvants. Parmi les solvants connus sous le nom de solvants interdits en CL, il y a l'acétate d'éthyle (EtOAc), le tétrahydrofurane (THF), l'éther tert-butyle méthylique (MtBE), le dichlorométhane (DCM) et le chloroforme pour lesquels les dérivés de polysaccharides eux-mêmes sont dissous ou gonflés et ne peuvent donc pas être utilisés comme éluants [1,2].

L'avantage de ce type de PSC est leur stabilité, leur simplicité de préparation [3]. La capacité d'identification des dérivés de polysaccharides, tels que des phénylcarbmates et des benzoates, dépend de manière significative de la nature et de la position des substituants sur les parties phényliques. Ces substituants peuvent changer la structure et la polarité locale des dérivés de polysaccharide [4].

L'identification chirale n'est pas simplement due aux liaisons d'hydrogène et des interactions π - π mais également due à la cavité chirale et la configuration spécifique des phases stationnaires qui sont responsables des différentes interactions entre la PSC et l'énantiomère [5].

Dans cette partie, nous avons testé différentes familles de produits optiquement actifs (structures en annexe A) sur la colonne Nucleocel α (tris-(3,5-diméthylphénylcarbamate) amylose) en mode normal. Nous avons étudié l'effet de la structure du soluté sur la séparation chirale, de la composition de la phase mobile et de la nature du modifiant organique. Diverses combinaisons de hexane/2-propanol et hexane/éthanol ont été employés comme phase mobile dans nos efforts initiaux dans la séparation en mode normal [6].

III.2. Résultats et discussion

La figure 1 représente la structure du tris-(3,5-diméthylphénylcarbamate) amylose testée dans cette partie en mode normal.

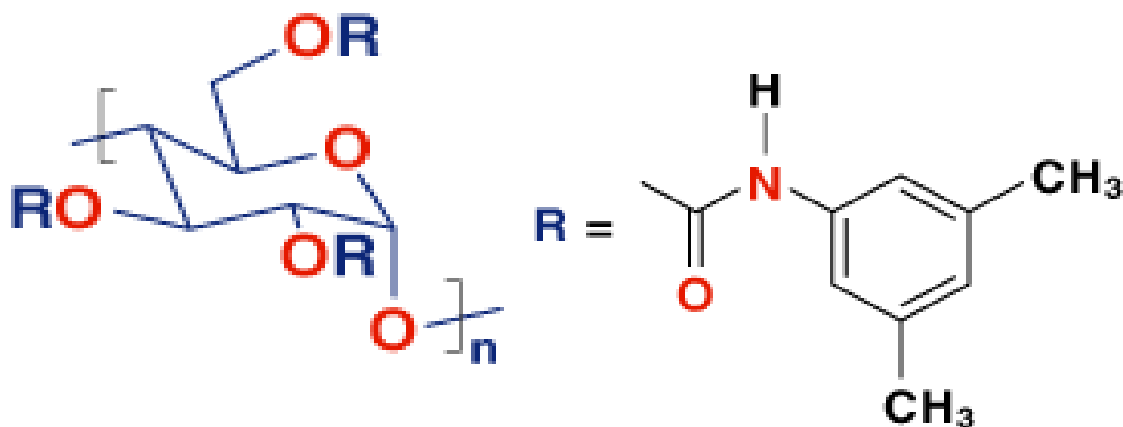


Figure 1 : La structure du tris-(3,5-diméthylphénylcarbamate) amylose

Pour chaque soluté nous avons calculé les facteurs de rétention (1,2) des énantiomères, de sélectivité (α) (3) et de résolution (R_s) (4) en utilisant les relations suivantes :

$$k'_1 = \frac{tr_1 - tr_0}{tr_0} \quad (1)$$

$$k'_2 = \frac{tr_2 - tr_0}{tr_0} \quad (2)$$

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad (3)$$

$$R_s = \frac{2(tr_2 - tr_1)}{w_1 + w_2} \quad (4)$$

Avec :

tr_1 et tr_2 : temps de rétention des deux énantiomères.

tr_0 : temps mort (obtenu avec un soluté non retenu TTB).

k'_1 et k'_2 : facteurs de rétention des énantiomères 1 et 2.

w_1 et w_2 : largeurs mesurées à la base du pic de chaque énantiomère.

III.2.1. Test de la phase stationnaire à base de tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) amylose (Nucleocel α)

Le tableau I représente les temps de rétention, les facteurs de rétention, de sélectivité et de résolutions obtenus lors du test des produits optiquement actifs sur la phase stationnaire à base d'amylose en mode normal. Les phases mobiles sont constituées de l'alcane (heptane ou hexane)/2-propanol pour les produits neutres et l'alcane (heptane ou hexane)/2-propanol/base ou acide pour les produits basiques et acides respectivement.

Ainsi, sur les 32 produits testés, sept ont été parfaitement séparés. Il s'agit de deux benzodiazépines: Lorazepam et Lormetazepam, la Benzoïne et les solutés : 2-4,6. Cette séparation est due essentiellement aux interactions π - π entre le noyau aromatique de la phase stationnaire et la partie phénylique des composés analysés, ainsi que les interactions dipôle-dipôle entre les fonctions carbamates de la PSC et les solutés, sans oublier les liaisons hydrogène [7,8]. Certains composés quand à eux ont été partiellement séparés il s'agit de produits 1, 5, 8, 9, 15, vérapamil, des herbicides tels que : Haloxyfop-éthoxyéthyl, Fluazifop-butyl, Mecoprop ainsi que les solutés 10, 12, 14, et quelques β -bloquants tels que le propranolol, salbutamol et Tertatolol.

En mode normal les composés acides (tels que les herbicides et les anti-inflammatoires non stéroïdiens) ou basiques (tels que les β -bloquants) ne sont pas élués, mais grâce à l'ajout d'une petite quantité d'un modifiant anionique tels que la diéthylamine (DEA) ou la triéthylamine (TEA) leur élution devient possible ; de plus l'ajout de ce type de base diminue l'étalement des pics, et masque les groupements silanols qui peuvent par des interactions non spécifiques provoquer une forte rétention du soluté [9,10].

Les phases stationnaires chirales à base de tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) amylose ont été considérées comme site polaire grâce à la fonction carbamate, qui peut agir principalement avec des énantiomères par des liaisons hydrogène intermoléculaire [11].

Chapitre III: La séparation chirale en mode normal sur la colonne à base de l'amylose

Tableau I: Analyse des produits optiquement actifs sur la phase stationnaire à base d'amylose en utilisant le mode normal							
produits	Phase mobile	tr₁	k₁	tr₂	k₂	α	R_s
1	30/70 ^a	4.45	0.42	4.88	0.56	1.33	-
	40/60 ^a	4.55	0.40	-	-	-	-
	50/50 ^a	4.70	0.45	-	-	-	-
2	30/70 ^a	5.27	0.68	-	-	-	-
	50/50 ^a	5.55	0.71	9.82	2.02	2.86	3.40
3	30/70 ^a	6.07	0.93	10.90	2.47	2.65	5.36
	40/60 ^a	5.87	0.81	10.42	2.22	2.73	6.95
	50/50 ^a	5.82	0.79	10.06	2.10	2.64	4.21
4	30/70 ^a	8.21	1.61	11.56	2.68	1.66	2.05
	40/60 ^a	8.54	1.64	11.23	2.47	1.51	2.62
	50/50 ^a	9.45	1.91	12.42	2.82	1.48	2.78
5	30/70 ^a	5.08	0.62	-	-	-	-
	40/60 ^a	5.41	0.67	5.78	0.79	1.17	-
	50/50 ^a	5.90	0.82	-	-	-	-
6	30/70 ^a	7.39	1.35	8.25	1.63	1.20	0.87
	40/60 ^a	7.89	1.43	9.33	1.88	1.31	1.85
	50/50 ^a	8.22	1.53	9.87	2.04	1.33	1.47
7	30/70 ^a	5.22	0.66	-	-	-	-
	40/60 ^a	5.47	0.69	-	-	-	-
	50/50 ^a	5.76	0.77	-	-	-	-
8	30/70 ^a	5.35	0.70	5.79	0.84	1.20	-
	50/50 ^a	7.29	1.24	8.09	1.47	1.19	-
9	30/70 ^a	5.30	0.69	5.74	0.83	1.21	-
	40/60 ^a	5.71	0.76	6.26	0.93	1.22	-
	50/50 ^a	5.93	0.82	6.38	0.96	1.17	-
10	40/60/0.1 ^c	3.93	0.13	4.33	0.24	1.90	-
	70/30/0.2 ^b	4.43	0.21	5.10	0.39	1.87	<1
	55/45/0.2 ^b	4.16	0.07	4.64	0.20	2.68	-
11	40/60/0.1 ^c	4.04	0.16	-	-	-	-
	55/45/0.2 ^b	4.08	0.05	-	-	-	-
12	40/60/0.1 ^c	4.05	0.16	4.28	0.23	1.41	-
	70/30/0.2 ^b	4.69	0.28	5.19	0.42	1.49	-
	55/45/0.2 ^b	4.28	0.11	4.64	0.20	1.87	-

Chapitre III: La séparation chirale en mode normal sur la colonne à base de l'amylose

Tableau I : suite							
Produits	Phase mobile	tr ₁	k ₁	tr ₂	k ₂	α	R _s
13	90/10/0.1 ^b	5.70	0.77	-	-	-	-
	40/60/0.1 ^c	4.01	0.15	-	-	-	-
	70/30/0.2 ^b	4.43	0.21	-	-	-	-
	55/45/0.2 ^b	4.12	0.07	-	-	-	-
14	90/10/0.1 ^b	5.60	0.74	6.25	0.94	1.27	0.93
	40/60/0.1 ^c	3.93	0.12	-	-	-	-
	70/30/0.2 ^b	4.32	0.18	4.61	0.26	1.43	-
	55/45/0.2 ^b	4.16	0.08	-	-	-	-
15	30/70 ^a	5.13	0.63	6.35	1.02	1.61	1.49
	40/60 ^a	4.95	0.53	6.10	0.88	1.67	-
	50/50 ^a	4.84	0.49	5.12	0.58	1.18	-
Benzoïne	30/70 ^a	8.34	1.66	9.82	2.13	1.29	1.23
	40/60 ^a	8.53	1.63	10.06	2.10	1.29	2.09
Haloxifop-éthoxyéthyl	30/70 ^a	4.99	0.59	5.34	0.70	1.16	-
	50/50 ^a	4.92	0.51	5.18	0.59	1.16	-
Fluazifop-butyl	30/70 ^a	5.01	0.60	5.31	0.69	1.16	-
	40/60 ^a	5.02	0.55	-	-	-	-
	50/50 ^a	4.84	0.49	5.12	0.58	1.18	-
Lorazepam	30/70 ^a	7.13	1.27	12.61	3.02	2.38	2.77
	40/60 ^a	6.86	1.12	13.00	3.01	2.70	4.78
	50/50 ^a	8.14	1.50	14.73	3.53	2.35	2.01
Lormetazepam	40/60 ^a	12.24	2.78	26.51	7.18	2.58	8.08
	50/50 ^a	19.08	4.87	41.69	11.83	2.43	8.43
Temazepam	30/70 ^a	12.19	2.88	-	-	-	-
	40/60 ^a	12.81	2.96	-	-	-	-
	50/50 ^a	13.84	3.26	-	-	-	-
Oxazepam	30/70 ^a	5.28	0.68	-	-	-	-
Warfarine	40/60/0.1 ^d	5.19	0.68	-	-	-	-
	45/55/0.1 ^d	5.15	0.37	-	-	-	-
	55/45/0.1 ^d	6.40	0.72	-	-	-	-
Naproxène	90/10/0.1 ^b	13.06	3.06	14.01	3.35	1.10	-
	40/60/0.1 ^c	5.34	0.53	-	-	-	-
	70/30/0.2 ^b	6.52	0.78	7.10	0.94	1.20	-
	55/45/0.2 ^b	5.47	0.41	5.89	0.52	1.26	-

Chapitre III: La séparation chirale en mode normal sur la colonne à base de l'amylose

Tableau I : suite							
produits	Phase mobile	t_{r1}	k_1	t_{r2}	k_2	α	R_s
Ibuprofène	90/10/0.1 ^b	5.49	0.70	6.13	0.90	1.28	-
	40/60/0.1 ^c	3.63	0.04	4.07	0.17	4.18	-
	70/30/0.2 ^b	4.05	0.11	4.32	0.18	1.71	-
Kétoprofène	90/10/0.1 ^b	15.58	3.84	18.63	4.79	1.25	1.00
	40/60/0.1 ^c	4.97	0.42	5.39	0.54	1.28	-
	70/30/0.2 ^b	6.59	0.80	7.49	1.05	1.31	-
Mecoprop	90/10/0.1 ^b	5.41	0.68	7.15	1.22	1.79	<1
	40/60/0.1 ^c	3.93	0.13	4.26	0.22	1.76	-
	70/30/0.2 ^b	4.34	0.19	5.00	0.37	1.96	<1
	55/45/0.2 ^b	4.01	0.04	4.39	0.13	3.68	-
Atenolol	40/60/0.1 ^d	5.24	0.69	-	-	-	-
	45/55/0.1 ^d	5.26	0.40	-	-	-	-
	55/45/0.1 ^d	6.07	0.63	-	-	-	-
Propranolol	40/60/0.1 ^d	4.21	0.36	4.51	0.45	1.27	-
	45/55/0.1 ^d	4.15	0.11	4.58	0.22	2.09	-
	55/45/0.1 ^d	4.30	0.16	4.71	0.27	1.71	-
Salbutamol	40/60/0.1 ^d	4.09	0.32	4.44	0.43	1.36	-
	45/55/0.1 ^d	4.33	0.15	-	-	-	-
	55/45/0.1 ^d	4.66	0.25	-	-	-	-
Tertatolol	40/60/0.1 ^d	4.44	0.43	4.95	0.60	1.38	-
	45/55/0.1 ^d	4.36	0.16	4.75	0.27	1.65	-
	55/45/0.1 ^d	4.97	0.34	-	-	-	-
Verapamil	40/60/0.1 ^d	4.90	0.58	-	-	-	-
	45/55/0.1 ^d	4.81	0.28	5.06	0.35	1.24	-
	55/45/0.1 ^d	5.04	0.35	5.36	0.44	1.25	-

^a : Heptane/ 2-propanol ; 0.5mL mn⁻¹ ; λ_{254nm}

^b : Hexane/ 2-propanol/ trifluoroacétique ; 0.5mL mn⁻¹ ; λ_{254nm}

^c : Heptane/2-propanol/ trifluoroacétique ; 0.5mL mn⁻¹ ; λ_{254nm}

^d : Hexane/2-propanol / Diethylamine ; 0.5 mL mn⁻¹; λ_{254nm}

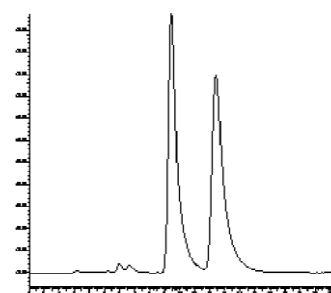
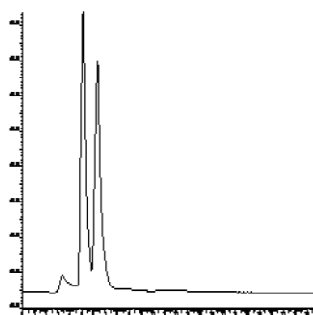
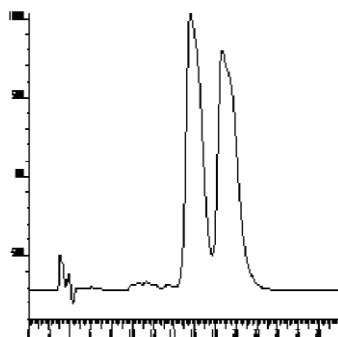
Chapitre III: La séparation chirale en mode normal sur la colonne à base de l'amylose

La figure 2 représente quelques exemples de chromatogrammes obtenus sur la nucleocel α en mode normal. Quand aux anti-inflammatoires non-stéroïdiens, leurs groupements carboxyles (C=O) peuvent former facilement des liaisons hydrogène avec le groupement NH du dérivé de l'amylose [7, 12]. D'autre part, des interactions de type dipôles-dipôles peuvent avoir lieu entre la partie aromatique de la PSC et la partie phénylique des composés analysés [8]. Ce qui explique la séparation partielle du naproxène, l'ibuprofène et le ketoprofène.

Kétoprofène

Soluté 15

Soluté 4



Soluté 3

Soluté 2

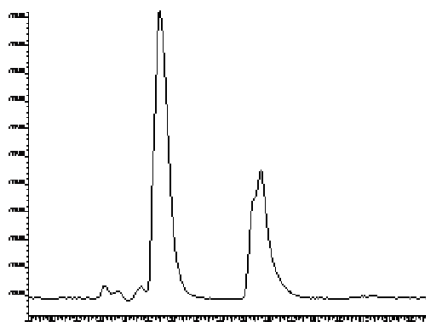
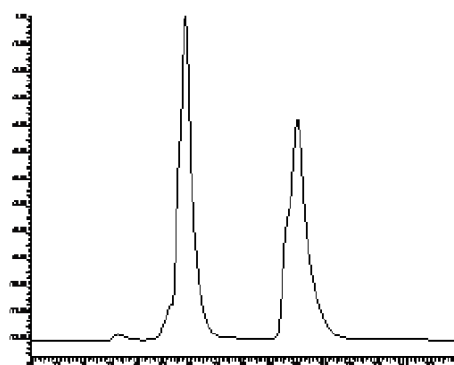


Figure 2: Exemple de quelques chromatogrammes de produits chiraux testés sur la colonne Nucleocel α . (Phase mobile : Hexane/2-propanol/TFA pour le kétoprofène; 0.5mL mn^{-1} ; $\lambda_{254\text{nm}}$ et Heptane/ 2-propanol pour les solutés 2-4, 15 et la benzoïne ; 0.5mL mn^{-1} ; $\lambda_{254\text{nm}}$).

a. Effet de l'ajout de modifiants anioniques et cationiques:

L'acide trifluoroacétique (THF) est un additif acide employé pour augmenter la sélectivité en raison de leur capacité de changer l'adsorption non spécifique [9,13,14]. Elle peut aller jusqu'à $\alpha=4.18$ pour l'ibuprofène.

L'effet des additifs de la phase mobile peut être attribué à divers mécanismes ; ces additifs chiraux peuvent activer ou bloquer l'interaction entre les solutés et la phase stationnaire. Ils peuvent agir avec le soluté dans la phase mobile pour former un mélange de diastéréomères, qui peuvent avoir différente sélectivité vis à vis de la phase stationnaire [3].

b. Effet de la composition de la phase mobile sur la rétention:

L'effet de la concentration du 2-propanol dans la phase mobile sur la rétention et la résolution des composés testés est présenté dans le tableau I.

La figure 3, représente la variation de la sélectivité et de la résolution en fonction de la composition de la phase mobile en 2-propanol. Il est clair que la quantité d'alcool utilisée dans la phase mobile affecte faiblement la sélectivité chirale des PSCs à base de polysaccharides [15], alors que la résolution change de manière significative avec l'augmentation du pourcentage en 2-propanol. Ce phénomène est comparable à celui observé avec les facteurs de rétention qui diminuent avec la quantité de l'alcool dans la phase (figure 4) à cause des interactions concurrentielles du solvant avec le soluté pour la formation des liaisons hydrogène avec les sites chiraux polaires de la phase stationnaire[16,10].

Par conséquent, ces résultats montrent clairement qu'un modificateur organique polaire augmente la rétention selon Lyman et Swork de Stringham, indiquant le comportement en mode normal où les interactions de type liaisons hydrogène sont gérées par la nature et la proportion du modificateur organique [9].

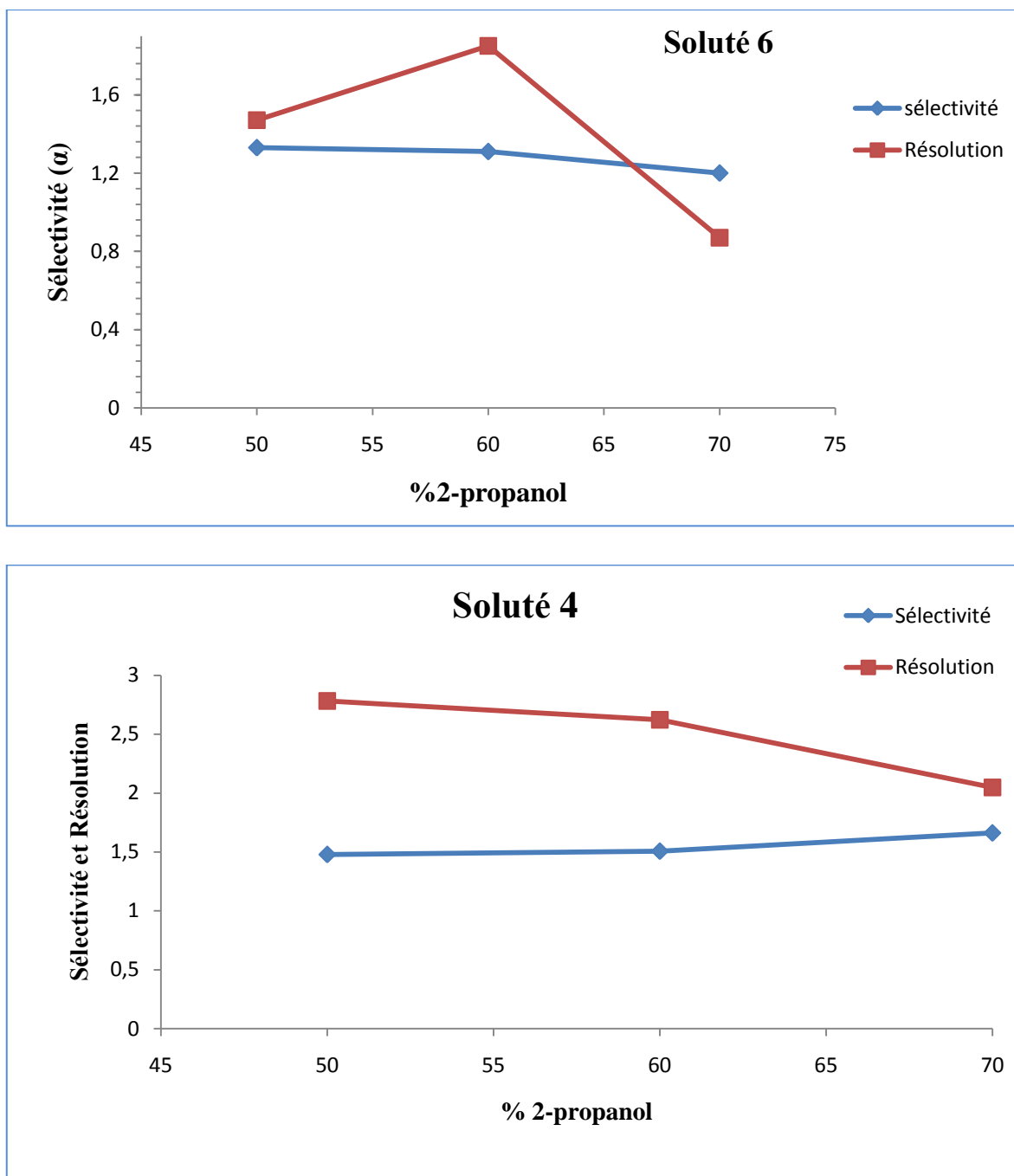


Figure 3 : Effet de la composition de la phase mobile en 2-propanol sur la sélectivité et sur la résolution des produits 4 et 6 sur la colonne Nucléocel alpha. (Phase mobile : Heptane/ 2-propanol ; 0.5mL mn⁻¹ ; λ_{254nm}).

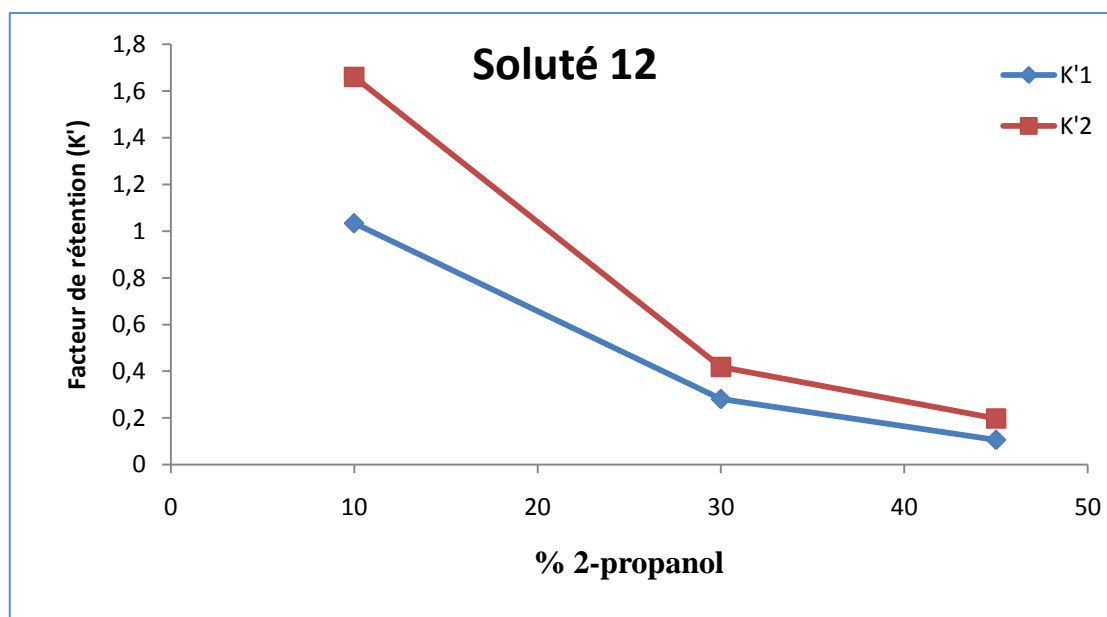


Figure 4 : L'influence de la quantité du 2-propanol dans la phase mobile sur la séparation des énantiomères du soluté 12 sur la colonne Nucleocel α . (Phase mobile : Hexane/ 2-propanol/ acide trifluoroacétique ; 0.5mL mn^{-1} ; $\lambda_{254\text{nm}}$)

La figure 5, présente un autre exemple sur l'influence de la concentration de 2-propanol sur la rétention ainsi que l'énantioséparation de quelques produits. Ainsi, l'augmentation de la quantité de 2-propanol de 10 à 30% a comme conséquence une diminution rapide des facteurs de rétention (k'). Lorsque la concentration de 2-propanol atteint 30%(v/v), ce dernier entre en compétition avec le soluté où l'effet maximum de 2-propanol est atteint et par conséquent aucun effet sur la rétention n'est observé [17].

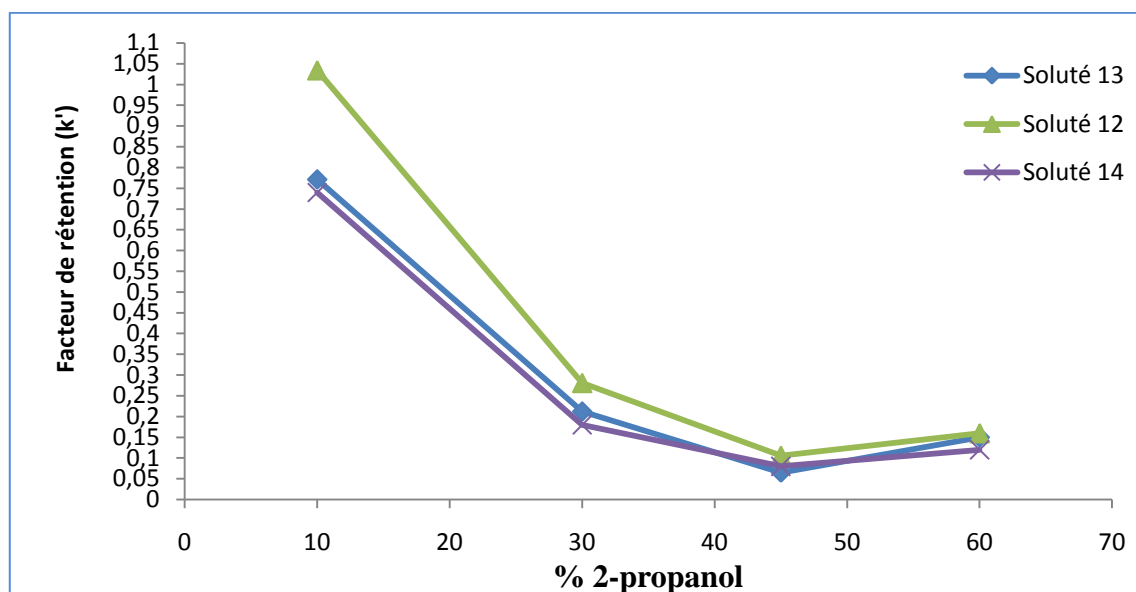


Figure 5: L'effet du pourcentage de 2-propanol sur la rétention des solutés 13, 14, 12 sur une colonne Nucleocel α . (Phase mobile: Hexane/2-propanol/Acide trifluoroacétique; $0,5\text{mL mn}^{-1}$; $\lambda_{254\text{nm}}$ et Heptane/ 2-propanol; $0,5\text{mL mn}^{-1}$; $\lambda_{254\text{nm}}$).

c. Effet de la structure du soluté sur la résolution chirale:

Dans le cas des PSCs à base de dérivés de polysaccharides, le lien du soluté avec la PSC est réalisé par les interactions entre les solutés et les groupes polaires des fonctions carbamates des PSCs. Les solutés peuvent se lier aux groupes carbamates sur la PSC formant des diastéromères grâce à [8, 6,18] :

- ❖ la liaison hydrogène
- ❖ les interactions dipôles-dipôles.
- ❖ Les interactions π - π
- ❖ Les facteurs stériques peuvent jouer un rôle important.
- ❖ Les interactions de Van der Waals.

Ainsi, en plus de formation des diastéromères, les solutés portent des groupements susceptibles de générer ce type d'interactions [19].

Parmi les 4 benzodiazépines testées dans ce travail, seul le lorazepam et lormetazepam ont été séparés. La substitution d'un chlore par l'hydrogène en position ortho est la raison probable de la coéllution des énantiomères de l'oxazepam et Temazepam [20].

Pour le produit 5, sa structure ne diffère de celle du 6 et 7, que par la substitution de CH_3 par $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ et $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (annexe A). Ainsi le soluté 6 a été mieux séparé, ceci est peut être due à son groupement phényle, qui de par sa taille et sa structure, aura tendance à effectuer des interactions de type π - π avec le groupe aromatique de la PSC [16]. Par contre pour le produit 5, il subirait une inclusion partielle dans la cavité hélicoïdale de l'amylose, ce qui expliquerait sa résolution partielle.

Ainsi, il apparait clairement qu'un simple changement de structure (une substitution par exemple) peut facilement perturber le mécanisme moléculaire d'identification chirale dans une série de solutés de structures analogues sur la PSC à base de polysaccharide [18].

III.2.2. Comparaison de l'énantiosélectivité des deux colonnes Chiralcel OD- H et Nucleocel α à celle à base de β -cyclodextrine en mode normal

Cette étude a été consacrée à la comparaison de l'énantiosélectivité des colonnes à base de polysaccharides (cellulose et amylose) à celle à base de β -cyclodextrine. En effet, la phényl-hydroxypropyl β -CD liée à la silice (HP- β -CD) a été préparée et évaluée au laboratoire par notre équipe [21]. Ces trois colonnes ont été testées en mode normal en utilisant le mélange binaire alcane (heptane ou hexane)/alcool (éthanol ou 2-propanol). Une dizaine de solutés a été testée sur ces phases stationnaires chirales, parmi lesquels des produits pharmaceutiques tels que les benzodiazépines (Lorazepam, Oxazepam, Temazepam, Lormétazepam). Le tableau II regroupe les valeurs des facteurs de rétention k' , de sélectivité α et de résolution R_s obtenues à différentes compositions de phase mobile pour chaque soluté racémique.

Parmi les 21 solutés racémiques injectés sur les 3 phases stationnaires chirales, 14 produits ont été totalement séparés sur la phase Chiralcel OD-H, il s'agit des benzodiazépines et des solutés : 2, 6-9, 15, Propranolol, tertanolol et Benzoïne alors que sur la phase Nucleocel α , 7 composés ont été séparés. Concernant la colonne HP- β -CD, nous avons noté que 4 couples d'énantiomères ont été totalement séparés, alors que 5 autres solutés ont été partiellement séparés.

Chapitre III: La séparation chirale en mode normal sur la colonne à base de l'amylose

Tableau : Comparaison de la sélectivité chirale des 3 phases stationnaires chirales Chiralcel OD-H, Nucleocel α et HP- β -CD en mode normal						
Solutés	Colonne	Phase mobile	k' ₁	k' ₂	α	R _s
1	HP- β -CD	98/2 ^a	2.08	2.16	1.04	-
	Chiralcel OD-H	98/2 ^b	6.92	7.25	1.05	-
	Nucleocel α	30/70 ^c	0.42	0.56	1.33	-
2	HP- β -CD	98/2 ^a	0.17	0.17	1.00	0.00
	Chiralcel OD-H	90/10 ^b	0.67	1.13	1.69	4.73
	Nucleocel α	50/50 ^c	0.71	2.02	2.86	3.40
3	HP- β -CD	80/20 ^a	0.19	0.31	1.62	1.49
	Chiralcel OD-H	80/20 ^b	0.58	0.63	1.08	-
	Nucleocel α	40/60 ^c	0.81	2.22	2.73	6.95
4	HP- β -CD	98/2 ^a	3.38	4.01	1.19	1.57
	Chiralcel OD-H	90/10 ^b	2.23	2.51	1.19	1.31
	Nucleocel α	50/50 ^c	1.91	2.82	1.48	2.78
5	HP- β -CD	80/20 ^a	1.89	2.07	1.09	0.99
	Chiralcel OD-H	80/20 ^b	5.19	5.71	1.10	1.15
	Nucleocel α	40/60 ^c	0.67	0.79	1.17	-
6	HP- β -CD	90/10 ^a	4.02	6.49	1.62	5.65
	Chiralcel OD-H	80/20 ^b	8.35	10.12	1.21	2.40
	Nucleocel α	40/60 ^c	1.43	1.88	1.31	1.85
7	HP- β -CD	80/20 ^a	1.40	1.56	1.11	1.04
	Chiralcel OD-H	80/20 ^b	3.46	4.81	1.39	3.88
	Nucleocel α	50/50 ^c	0.77	0.77	1.00	-
8	HP- β -CD	98/2 ^a	19.74	24.9	1.26	2.63
	Chiralcel OD-H	80/20 ^b	4.00	6.43	1.61	5.65
	Nucleocel α	30/70 ^c	0.70	0.84	1.20	-
9	HP- β -CD	80/20 ^a	1.24	1.5	1.21	-
	Chiralcel OD-H	80/20 ^b	4.71	7.24	1.54	4.67
	Nucleocel α	40/60 ^c	0.76	0.93	1.22	-
15	HP- β -CD	90/10 ^a	1.15	1.30	1.14	0.97
	Chiralcel OD-H	98/2 ^b	1.68	2.55	1.52	5.88
	Nucleocel α	30/70 ^c	0.63	1.02	1.61	1.49
Lorazepam	HP- β -CD	90/10 ^a	4.45	5.22	1.17	1.71
	Chiralcel OD-H	90/10 ^b	5.52	9.23	1.67	6.39
	Nucleocel α	40/60 ^c	1.12	3.01	2.70	4.78
Oxazepam	HP- β -CD	90/10 ^a	4.13	4.97	1.20	1.94
	Chiralcel OD-H	90/10 ^b	5.81	7.13	1.23	2.40
	Nucleocel α	30/70 ^c	0.68	0.68	1.00	0.00

Chapitre III: La séparation chirale en mode normal sur la colonne à base de l'amylose

Tableau II: suite

Solutés	Colonne	Phase mobile	k' ₁	k' ₂	α	R _s
Temazepam	HP- β -CD	80/20 ^a	2.91	3.19	1.09	0.89
	Chiralcel OD-H	90/10 ^b	5.92	6.62	1.12	1.51
	Nucleocel α	50/50 ^c	3.26	3.26	1.00	0.00
Lormetazepam	HP- β -CD	90/10 ^a	5.95	5.95	1.00	0.00
	Chiralcel OD-H	90/10 ^b	6.78	8.09	1.19	2.12
	Nucleocel α	50/50 ^c	4.87	11.83	2.43	8.43
Benzoïne	HP- β -CD	-	-	-	-	-
	Chiralcel OD-H	98/2 ^b	5.11	7.83	1.53	7.55
	Nucleocel α	40/60 ^c	1.63	2.10	1.29	2.09
Propranolol	HP- β -CD	80/20/0.1 ^d	1.73	1.82	1.05	-
	Chiralcel OD-H	90/10/0.1 ^e	2.00	3.04	1.51	4.67
	Nucleocel α	55/45/0.1 ^f	0.16	0.27	1.71	-
Atenolol	HP- β -CD	-	-	-	-	-
	Chiralcel OD-H	80/20/0.1 ^e	2.30	2.98	1.30	2.15
	Nucleocel α	55/45/0.1 ^f	0.63	0.63	1.00	0.00
Tertatolol	HP- β -CD	90/10/0.1 ^d	4.34	4.34	1.00	0.00
	Chiralcel OD-H	80/20/0.1 ^e	0.58	1.98	3.42	8.44
	Nucleocel α	45/55/0.1 ^f	0.16	0.27	1.65	-
Naproxéne	HP- β -CD	98/2/0.5 ^g	1.81	1.81	1.00	0.00
	Chiralcel OD-H	90/10/0.1 ^h	1.06	1.26	1.19	1.36
	Nucleocel α	70/30/0.2 ⁱ	0.78	0.94	1.20	-
Kétoprofène	HP- β -CD	98/2/0.5 ^g	2.76	2.76	1.00	0.00
	Chiralcel OD-H	80/20/0.1 ^h	0.54	0.54	1.00	0.00
	Nucleocel α	90/10/0.1 ⁱ	3.84	4.79	1.25	1.00
Ibuprofène	HP- β -CD	98/2/0.5 ^g	0.67	0.67	1.00	0.00
	Chiralcel OD-H	90/10/0.1 ^h	0.30	0.30	1.00	0.00
	Nucleocel α	90/10/0.1 ⁱ	0.70	0.90	1.28	-

HP- β -CD: Phényl-hydroxypropyl- β - cyclodextrine

^a : Heptane/2-PrOH, 1 mL min⁻¹; $\lambda_{254\text{nm}}$

^b : Hexane/Ethanol; 0.5 mL mn⁻¹; $\lambda_{254\text{nm}}$

^c : Heptane/ 2-propanol ; 0.5mL mn⁻¹ ; $\lambda_{254\text{nm}}$

^d : Heptane/2-PrOH/Diethylamine, 1 mL min⁻¹; $\lambda_{230\text{nm}}$

^e : hexane/Ethanol/Diethylamide ; 0.5 mL mn⁻¹; $\lambda_{210\text{nm}}$

^f : Hexane/2-propanol / Diethylamine ; 0.5 mL mn⁻¹; $\lambda_{254\text{nm}}$

^g : Heptane/2-PrOH; 0.5 mL mn⁻¹; $\lambda_{254\text{nm}}$

^h : hexane/ethanol/Acide trifluoroacétique; 0.5 mL mn⁻¹; $\lambda_{254\text{nm}}$

ⁱ : Hexane/ 2-propanol/ trifluoroacétique ; 0.5mL mn⁻¹ ; $\lambda_{254\text{nm}}$

Chapitre III: La séparation chirale en mode normal sur la colonne à base de l'amylose

Ainsi, pour les solutés 5-7 leur séparation est due essentiellement aux interactions π - π entre la partie 3,5-dinitrobenzoyl et les groupes phényles des PSCs, les interactions dipôles-dipôles et les liaisons d'hydrogène entre les groupements carbamates des solutés et ceux des PSCs [22].

La séparation des benzodiazépines (lorazepam, oxazepam, témazepam et lormetazepam) a été testée sur les 3 phases stationnaires chirales. Le tableau II montre la séparation de deux solutés (lorazepam, oxazepam) de cette famille obtenue sur la colonne (HP- β -CD). La phase Nucleocel α n'a pu séparer que les énantiomères du lorazepam et de lormetazepam, alors que la colonne Chiralcel OD-H a montré une séparation satisfaisante des 4 solutés racémiques. Dans cette série, 2 facteurs sont responsables du mécanisme d'interaction entre le soluté et la phase stationnaire: la substitution d'un atome d'hydrogène sur la fonction amide par un méthyle et la présence d'un atome de chlore en position *ortho* sur le noyau aromatique du soluté. Dans le lormetazepam, la fonction amide substituée par le méthyle ne peut pas former de liaisons hydrogène alors que le noyau aromatique ortho-substitué par l'hydrogène est moins électronégatif que le chlore, le résultat obtenu est la coélution des 2 énantiomères [22].

Nous avons étudié également dans ce travail l'énantiosélectivité de plusieurs β -bloquants adrénergiques. Il est connu que cette famille de produits a plusieurs utilisations cliniques [23]. Comme nous pouvons le constater à partir de leur structure (annexe A), les β -bloquants sont chiraux et leurs énantiomères ont des effets cliniques différents. Par exemple, l'un des isomères du propranolol qui est plus actif dans la régulation du rythme ventriculaire est beaucoup moins actif en tant que β -bloquant [24]. En raison de ces actions différentes de chaque énantiomère, l'intérêt de la séparation chirale des agents β -bloquants ne fait que croître.

Comme nous pouvons le constater à partir du tableau II, parmi les 3 PSCs, seule la PSC Chiralcel OD-H a conduit à de meilleurs résultats concernant cette famille de produits. Cela explique que les dérivés de polysaccharides montrent une haute identification chirale à une large gamme des composés chiraux [2] (Figure 6). Dans le cas où le noyau aromatique est substitué par un groupement capable de former des liaisons hydrogène, cette influence supplémentaire augmente l'énantiosélectivité.

D'une manière générale, la comparaison des k' des solutés analysés montre que les solutés polaires sont les plus retenus. Les liaisons hydrogène semblent être les interactions les plus importantes mises en jeu dans le mécanisme de rétention.

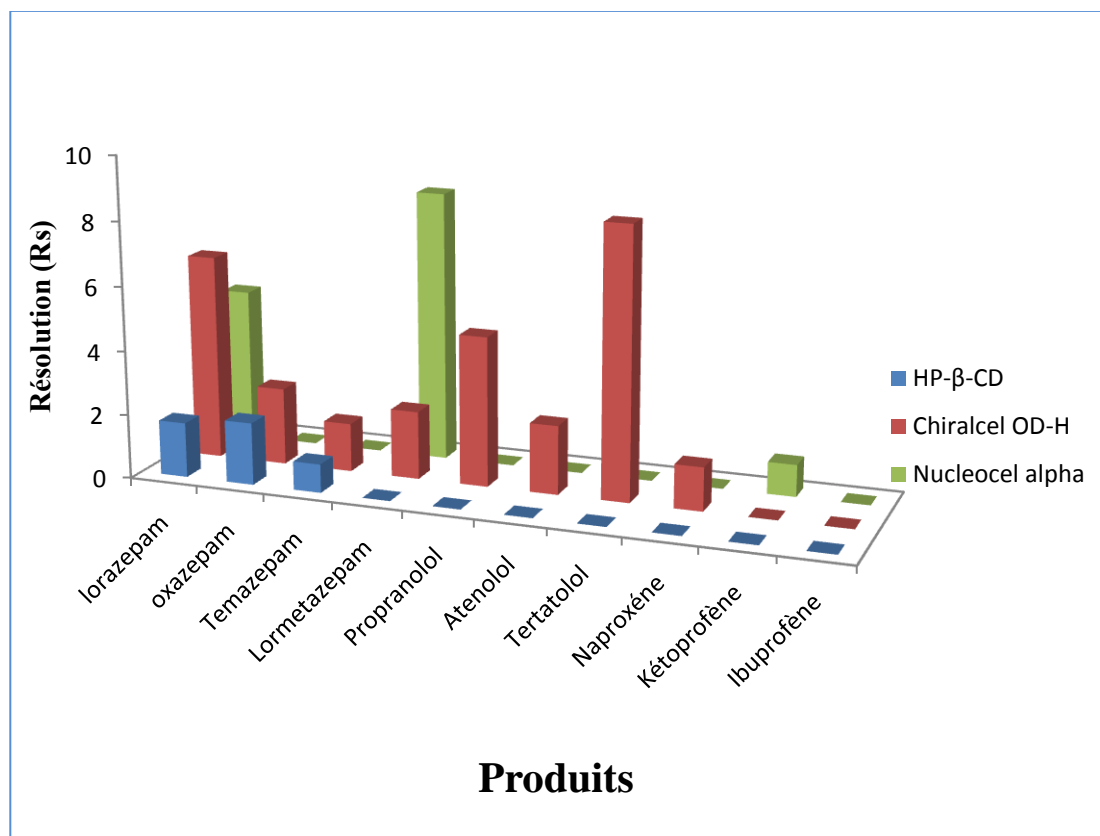


Figure 6: Séparation de quelques produits pharmaceutiques optiquement actifs sur les 3 PSCs.

D'un autre côté, le groupe lié sur les deux PSCs à base des polysaccharides est identique, les différents comportements de deux PSCs devraient être dus à des différences conformationnelles entre les deux PSCs. Ceci suggère que la rétention des corps dissous dépend non seulement des groupes de dérivatisation sur la PSC, mais dépend également de la structure détaillée de la PSC [25].

La figure 7 représente la variation de la sélectivité des produits pharmaceutiques optiquement actifs sur les 3 phases stationnaires chirale.

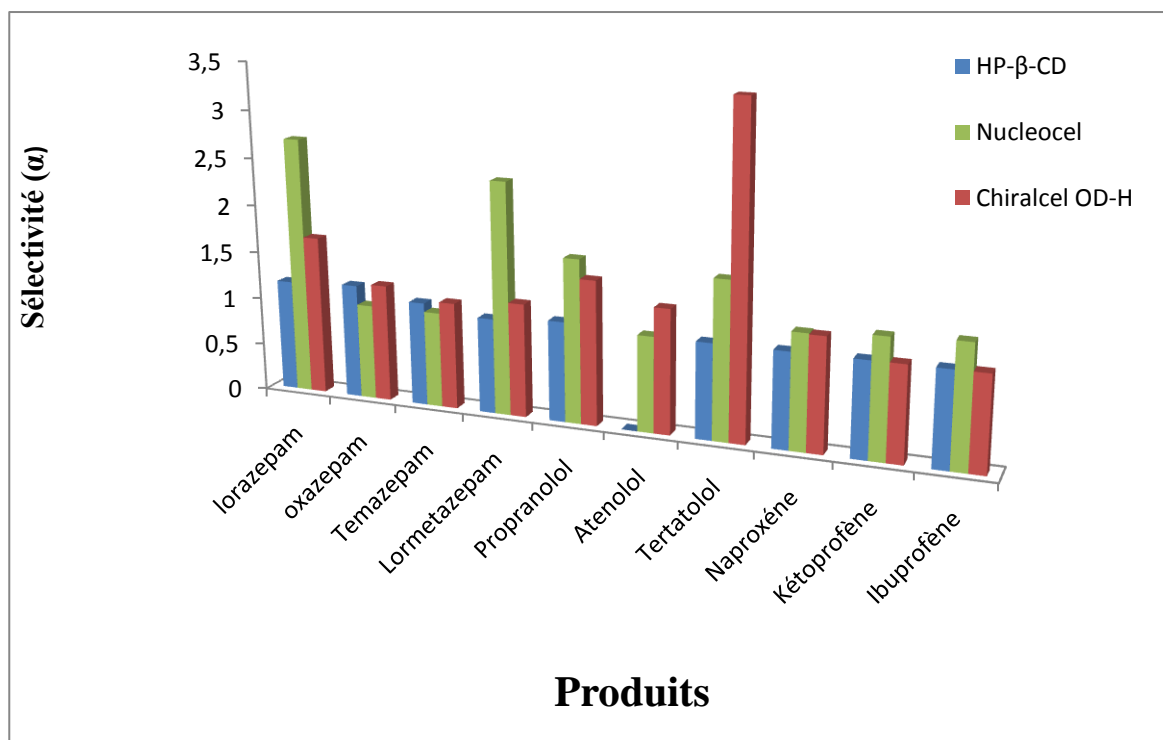
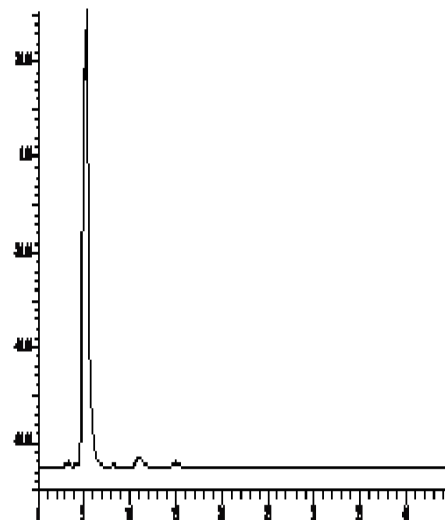
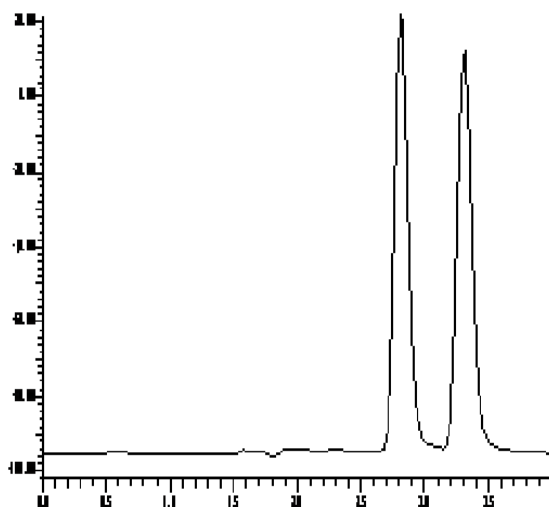


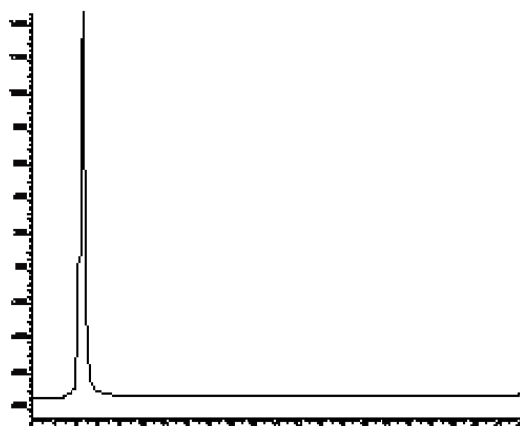
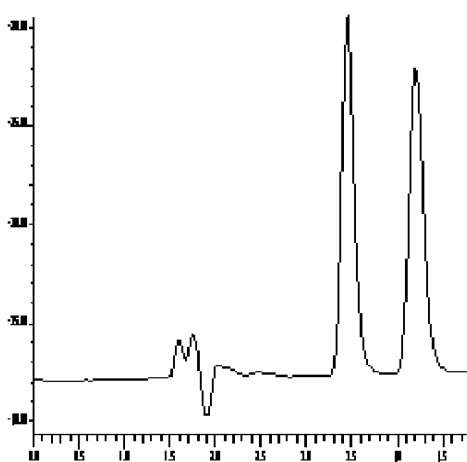
Figure 7: La variation de la sélectivité des produits pharmaceutiques optiquement actifs sur les 3 phases stationnaires chirale.

La figure 8 représente les chromatogrammes de quelques solutés sur les deux PSCs à base de dérivé des polysaccharides.

Soluté 3



Propranolol



Kétoprofène

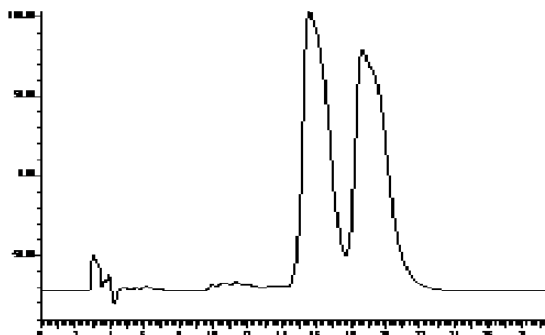
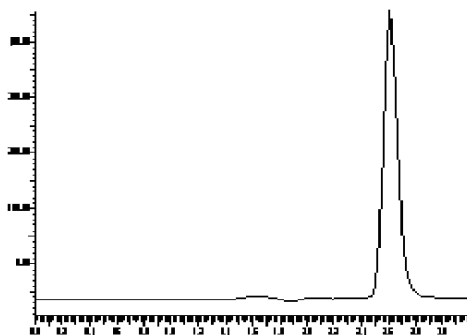


Figure 8 : Chromatogrammes des énantiomères de soluté 3, Propranolol et Kétoprofène sur une colonne à base de cellulose (à gauche) et à base d'amylose (à droite). (Phase mobile : Hexane/alcool (Ethanol ou 2-propanol) ; 0.5 mL mn⁻¹; $\lambda_{254\text{nm}}$).

III.3. Conclusion

Dans cette partie, nous avons testé la colonne chirale à base de tris (3,5 diméthylphénylcarbamate) amylose en mode normal, pour la séparation des produits chiraux. Aussi, nous avons étudié les différents paramètres pouvant influencer sur la séparation chirale, dans le but d'optimiser au mieux la résolution de ces solutés chiraux. Nous avons également tenté d'expliquer les mécanismes et les interactions mises en jeu lors de la séparation chirale, et cela sur la base des structures tridimensionnelles des solutés séparés et de la phase stationnaire utilisée.

Ainsi, le test de cette phase stationnaire a permis la séparation totale de sept solutés optiquement actifs parmi eux il y a eu le lorazepam et lormetazepam, ainsi que la Benzoïne. Dix huit solutés optiquement actifs ont été séparés, parmi eux les herbicides (Haloxypop-éthoxyéthyl, Fluazifop-butyl, Mecoprop, 10, 12, 14), les anti-inflammatoire non stéroïdiens (Naproxène, Ibuprofène, Ketoprofène), les β -bloquants (Propranolol, salbutamol, Tertatolol), les solutés 1, 5, 8, 9, 15 et Verapamil.

Pour les phases stationnaires chirales HP- β -CD, Chiralcel OD-H et Nucleocel α , testées en mode normal, les meilleurs résultats ont été obtenus sur la phase stationnaire à base de cellulose (Chiralcel OD-H), suivie de la Nucleocel α enfin de la phase HP- β -cyclodextrine. Cette différence d'énantiosélectivité entre la phase Chiralcel OD-H et la Nucleocel α montre le rôle important des différences conformationnelles dans le mécanisme de la reconnaissance chirale. Nous avons montré, d'autre part, que la reconnaissance chirale en mode normal est due essentiellement aux interactions de types π - π , dipôle-dipôle et les liaisons hydrogène. Néanmoins, les trois PSCs ont montré une certaine complémentarité quant à la séparation de certains produits.

Références bibliographiques

- [1] A. Ghanem, H. Hoenen, H. Y. Aboul-Enein, *Talanta*, 2006, **68**, 602-603.
- [2] X-M. Chen, Ch. Yamamoto, Y. Okamoto, *J. chromatogr. A*, 2006, **1104**, 62.
- [3] Z. Wang, J. Ouyang, W. R.G. Baeyens, *J. chromatogr. B*, 2008, **862**, 5.
- [4] J. hen, T. Ikai, Y. Okamoto, *J. chromatogr. A*, 2010, **1217**, 1041.
- [5] H. Y. Aboul-Enein, I. Ali, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2001, **48**, 186.
- [6] M. Khan, B. Viswanathan, D. S. Rao, R. Reddy, *J. chromatogr. B*, 2007, **846**, 120.
- [7] L. Zhou, C. Welch, C. Lee, X. Gong, V. Antonucci, Z. Ge, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009, **49**, 964.
- [8] M. L. Calabro, D. Raneri, S. Tommasini, R. Ficarra, S. Alcaro, A. Gallelli, N. Micale, M. Zappala, P. Ficarra, *J. chromatogr. B*, 2006, **838**, 58.
- [9] K. S. S. Dossou, P. Chiap, B. Chankvetadze, A - C. Servais, M. Fillet, J. Crommen, *J. chromatogr. A*, 2009, **1216**, 7453.
- [10] C. B. Castells, P. W. Carr, *J. chromatogr. A*, 2000, **904**, 27.
- [11] L-M. Yuan, *Separation and Purification Technology*, 2008, **63**, 704.
- [12] R. B. Kasat, N- H. L. Wang, E. I. Franses, *J. chromatogr. A*, 2008, **1190**, 113.
- [13] J. Yang, J. Guan, L. Pan, K. Jiang, M. Cheng, F. Li, *anal. Chim. Acta*, 2008, **610**, 265.
- [14] R. W. Stringham, Y. K. Ye, *J. chromatogr. A*, 2006, **1101**, 86.
- [15] T. Wang, R. M. Wenslow, Jr, *J. chromatogr. A*, 2003, **1015**, 102.
- [16] F. Zhan, G. Yu, Bixia Yao, X. Guo, T. Liang, M. Yu, Q. Zeng, W. Weng, *J. chromatogr. A*, 2010, **1217**, 4281.
- [17] Y. Ming, L. Zhao, H. Zhang, Y. Shi, Y. Li, *Chromatographia*, 2006, **64**, 275.
- [18] M. Lämmerhofer, R. Pell, M. Mahut, M. Richter, S. Schiesel, H. Zettl, M. Dittrich, M. Schubert-Zsilavec, W. Lindner, *J. chromatogr. A*, 2010, **1217**, 1039.
- [19] T. Wang, Y. W. Chen, A. Vailaya, *J. chromatogr. A*, 2000, **902**, 348.

Chapitre III: *La séparation chirale en mode normal sur la colonne à base de l'amylose*

- [20] E. Stern, L. Goossens, C. Vaccher, J.-P. Bonte, P. Depreux, J.-P. Henichart, J.-F. Goossens, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008, **46**, 850.
- [21] K. Si-Ahmed, F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, 514.
- [22] F. Tazerouti, *Synthèse, caractérisation et application des phases stationnaires chirales en chromatographie liquide*, thèse de Doctorat, 2001, ALGER, U.S.T.H.B.
- [23] J. Bojarski, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2002, **54**, 198.
- [24] A. A. El-Emam, F. F. Belal, M. A. Moustafa, S. M. El-Ashry, D. T. El-Sherbiny, S. H. Hansen, *Il Farmaco*, 2003, **58**, 1178.
- [25] T. Wang, Y. W. Chen, *J. chromatogr. A*, 1999, **855**, 420.

Chapitre IV:

La séparation chirale en mode organique polaire sur la colonne à base d'amylose

IV.1. Introduction

Les dérivées des polysaccharides sont des PSCs multimodales et peuvent être employés en mode normal, inverse et en mode organique polaire [1,2]. Ces PSCs ont démontré une haute résolution pour différentes classes de solutés en mode organique polaire [3].

Le mode organique polaire offre une alternative quand aucune énantiomérisation n'est réalisée avec le mode normal ou inverse. En effet, les solvants organiques purs peuvent fournir une meilleure solubilité pour certains solutés, ils peuvent être facilement évaporés et sont moins dangereux et pour la santé et pour l'environnement par rapport aux solvants apolaires utilisés en mode normal [4].

Le mode organique polaire a été utilisé pour la première fois par Armstrong et al. Il consiste à l'utilisation des solvants organiques polaires uniquement comme, phase mobile sans utilisation de l'eau. Nous utilisons habituellement le méthanol (MeOH), éthanol (EtOH), acétonitrile (CH₃CN) ou leurs combinaisons [5]. L'acétonitrile a été également utilisée en tant que solvant principal avec les additifs basiques et acides en mode organique polaire [6].

Le mode organique polaire a été développé pour la séparation des paires d'énantiomères possédant deux groupes fonctionnels capable de faire des interactions électrostatiques. Ces groupes seront situés près du centre stéréogénique [7,8].

Pour une séparation réalisée en mode organique polaire, le solvant polaire pur est utilisé pour les composés de nature neutre. Cependant, 0.1% de DEA est souvent ajouté au solvant polaire pour la résolution des énantiomères des composés basiques tandis que la phase mobile peut contenir 0.1% de TFA pour les composés de nature acide [9].

Dans notre travail, nous avons testé plusieurs familles de produits optiquement actifs, tels que les produits pharmaceutiques, les herbicides ainsi que d'autres solutés chiraux (les structures en annexe A). Nous avons étudié l'effet de la polarité, de la composition de la phase mobile et la nature de l'alcool sur la résolution chirale.

IV.2. Résultats et discussion

La séparation des produits optiquement actifs, en mode organique polaire, a été effectuée sur la colonne à base d'amylose (Nucleocel α). Pour chaque soluté nous avons calculé les facteurs de rétention des deux énantiomères (k'_1 , k'_2), de sélectivité (α) et de résolution (R_s). Toutes les analyses ont été réalisées à température ambiante. Les structures des solutés injectés sont représentées en annexe A.

IV.2.1. Test de la phase stationnaire à base de tris-(3,5 diméthylphénylcarbamate) amylose (Nucleocel α)

Dans cette partie, nous avons testé les différentes familles de produits chiraux sur la Nucleocel α en mode organique polaire. Les résultats chromatographiques obtenus avec ce mode de phase mobile sont présentés dans le tableau I. Avec une phase mobile constituée d'acétonitrile et de 2-propanol à différentes concentrations, il n'y a que 8 composés sur 17 qui ont été résolus. Il s'agit des produits 2, 3, 6, 15, ainsi que les 4 benzodiazépines: Lorazepam, Lormetazepam, Temazepam et Oxazepam. Leurs chromatogrammes sont présentés dans la figure 1. Cette discrimination chirale est due probablement aux interactions π - π entre le noyau aromatiques des solutés et celle de la PSC et les interactions dipôles-dipôles. D'autre part, neuf produits ont été partiellement séparés, tels que les herbicides (Fluazifop-butyl, Haloxyfop-éthoxyéthyl), Benzoïne et les solutés (1, 4-8).

L'acétonitrile et le méthanol représentent les solvants utilisés en mode organique polaire. L'acétonitrile est un solvant aprotique qui est connu pour perturber les interactions aromatiques π - π , alors que le méthanol est un solvant protique qui peut interagir pour former les liaisons de type hydrogène [10].

**Chapitre IV: La séparation chirale en mode organique polaire sur la
colonne à base d'amylose**

**Tableau I : Séparation des produits optiquement actifs sur la phase stationnaire à
base d'amylose en mode organique polaire**

Produits	Phase mobile	tr₁	k'₁	tr₂	k'₂	α	R_s
1	10/90	4.73	0.48	-	-	-	-
	30/70	3.92	0.23	-	-	-	-
	50/50	3.80	0.18	-	-	-	-
	60/40	3.62	0.17	3.83	0.23	1.40	-
	70/30	3.79	0.18	-	-	-	-
2	50/50	3.72	0.16	5.38	0.67	4.27	2.47
	60/40	3.71	0.19	4.94	0.59	3.04	1.63
	70/30	4.04	0.25	6.61	1.05	4.16	3.68
3	30/70	3.77	0.18	7.10	1.22	6.79	4.32
	50/50	3.80	0.18	6.87	1.13	6.32	4.01
	70/30	4.18	0.30	6.85	1.13	3.78	3.62
4	10/90	3.73	0.17	3.99	0.25	1.47	-
	30/70	3.58	0.12	-	-	-	-
	50/50	3.53	0.10	-	-	-	-
	60/40	3.51	0.13	3.70	0.19	1.47	-
	70/30	3.65	0.13	4.00	0.24	1.83	-
5	10/90	3.78	0.18	-	-	-	-
	30/70	3.36	0.05	-	-	-	-
	50/50	3.43	0.07	-	-	-	-
	60/40	3.27	0.05	3.49	0.12	2.36	-
	70/30	3.49	0.09	-	-	-	-
6	10/90	4.62	0.45	6.641	1.08	2.41	1.90
	30/70	3.79	0.19	-	-	-	-
	50/50	3.76	0.17	-	-	-	-
	60/40	3.63	0.17	3.852	0.24	1.42	-
	70/30	3.91	0.21	-	-	-	-
7	10/90	3.32	0.04	3.58	0.12	2.94	-
	30/70	3.41	0.07	-	-	-	-
	50/50	3.40	0.05	-	-	-	-
	60/40	3.35	0.08	-	-	-	-
	70/30	3.58	0.11	-	-	-	-
8	10/90	3.74	0.17	4.04	0.27	1.53	-
	30/70	3.53	0.11	-	-	-	-
	50/50	3.50	0.09	-	-	-	-
	60/40	3.46	0.11	-	-	-	-
	70/30	3.71	0.15	-	-	-	-

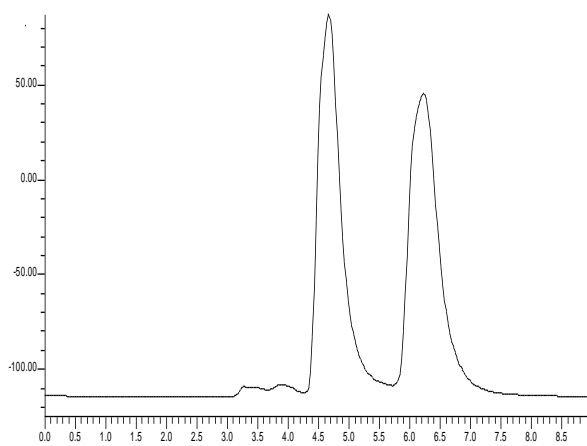
**Chapitre IV: La séparation chirale en mode organique polaire sur la
colonne à base d'amylose**

<i>Tableau I : suite</i>							
produits	Phase mobile	tr ₁	k ₁	tr ₂	k ₂	α	R _s
9	10/90	3.88	0.22	-	-	-	-
	30/70	3.59	0.13	-	-	-	-
	50/50	3.61	0.12	-	-	-	-
	60/40	3.58	0.15	-	-	-	-
15	10/90	5.08	0.59	5.42	0.70	1.18	-
	30/70	4.18	0.31	-	-	-	-
	50/50	4.09	0.27	-	-	-	-
	60/40	3.81	0.22	4.15	0.33	1.48	-
	70/30	4.00	0.24	4.56	0.41	1.72	0.88
Benzoïne	10/90	3.94	0.24	4.21	0.32	1.36	-
	30/70	3.81	0.19	-	-	-	-
	50/50	3.90	0.21	-	-	-	-
	60/40	4.01	0.29	-	-	-	-
	70/30	4.31	0.34	-	-	-	-
Fluazifop- butyl	10/90	3.41	0.07	-	-	-	-
	30/70	3.40	0.07	-	-	-	-
	60/40	3.26	0.05	3.46	0.11	2.25	-
	70/30	3.57	0.11	-	-	-	-
Haloxifop- éthoxyéthyl	10/90	3.20	0.00	-	-	-	-
	30/70	3.10	0.00	3.22	0.01	-	-
	60/40	3.21	0.03	3.52	0.13	4.02	-
	70/30	3.38	0.05	-	-	-	-
Oxazepam	10/90	4.76	0.49	5.73	0.80	1.61	0.98
	30/70	4.01	0.26	4.56	0.43	1.67	0.77
	50/50	3.88	0.21	4.35	0.35	1.70	0.69
Lorazepam	10/90	6.39	1.00	8.68	1.72	1.72	1.95
	30/70	4.94	0.55	6.44	1.02	1.85	1.81
	50/50	4.67	0.45	6.22	0.93	2.08	2.03
	60/40	4.08	0.32	5.33	0.71	2.29	1.44
	70/30	4.29	0.33	6.16	0.91	2.74	2.44
Lormetazepam	50/50	4.13	0.28	7.87	1.44	5.12	4.18
	60/40	4.19	0.35	6.71	1.16	3.32	3.51
	70/30	4.38	0.36	8.23	1.56	4.30	3.25
Temazepam	50/50	5.15	0.60	10.68	2.32	3.86	4.99
	60/40	4.81	0.55	8.72	1.80	3.30	3.45
	70/30	5.66	0.76	13.33	3.14	4.14	4.81

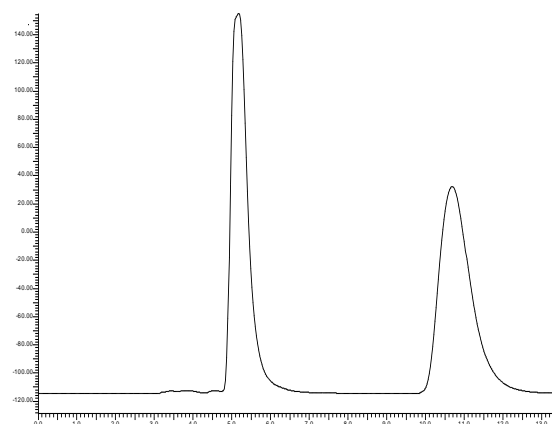
Phase mobile : 2- propanol /ACN ; 0.5 mL mn⁻¹ ; λ_{254nm}

**Chapitre IV: La séparation chirale en mode organique polaire sur la
colonne à base d'amylose**

Lorazepam (50isop-50ACN)



Temazepam



Lormetazepam

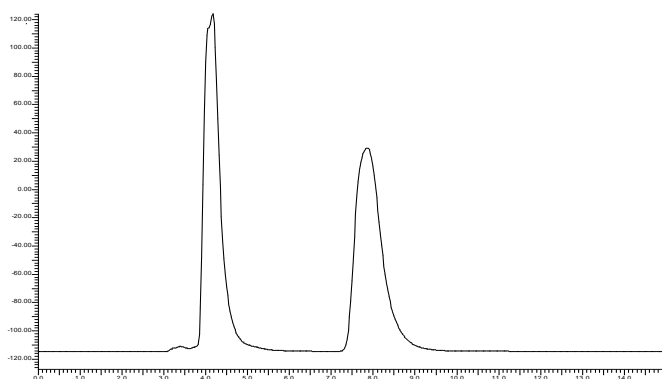


Figure 1: Exemples de chromatogrammes obtenus en mode organique polaire sur la colonne Nucleocel α . (Phase mobile: 2- propanol /ACN ; 0.5mL mn^{-1} ; $\lambda_{254\text{nm}}$).

Chapitre IV: *La séparation chirale en mode organique polaire sur la colonne à base d'amylose*

a. Effet de la polarité du solvant organique sur la séparation chirale:

Grace aux groupements carbamates de la phase stationnaire, la séparation chirale sera favorisée que ce soit en mode normal ou en mode organique polaire, et cela grâce aux interactions entre les solutés et les groupes polaires de carbamate. Dans cette étude, les interactions π - π peuvent être importantes entre les noyaux phényles des solutés et la PSC [11,12].

Le tableau II résume les différents résultats obtenus avec les trois types de solvants (méthanol, éthanol, acétonitrile).

Ce que nous pouvons noter c'est qu'avec une phase mobile constituée de 100% méthanol, sept solutés racémiques ont été séparés : les produits 2, 3, 5, 6, 7, 15, Lorazepam et Lormetazepam. Avec une phase mobile à base d'acétonitrile presque aucun de ces produits n'a pu être séparé mis à part le Lormetazepam, Temazepam et les produits 5, 15 qui ont été partiellement séparés. Ceci démontre que le mécanisme de séparation dépend énormément de la polarité de la phase mobile [13,14]. Nous constatons ainsi que l'utilisation de l'acétonitrile a eu comme conséquence, une diminution des facteurs de rétention ainsi que la résolution de la majorité des solutés étudiés [15].

Ainsi, lorsque le solvant est aprotique la résolution énantiomérique est perdue et lorsque la phase mobile est trop polaire, la rétention diminue, ce qui empêche la séparation chirale [11]. La figure 2 démontre l'effet de la nature de la phase mobile.

**Chapitre IV: La séparation chirale en mode organique polaire sur la
colonne à base d'amylose**

Tableau II : Effet de la polarité du solvant organique sur la séparation chirale sur la colonne à base d'amylose

Produits	Phase mobile	tr ₁	k' ₁	tr ₂	k' ₂	α	R _s
1	100 ^a	4.22	0.25	-	-	-	-
	100 ^b	3.95	0.24	-	-	-	-
	100 ^c	4.20	0.25	-	-	-	-
2	100 ^a	8.12	1.41	13.56	3.02	2.14	2.92
	100 ^c	4.47	0.32	-	-	-	-
3	100 ^a	7.80	1.32	18.08	4.37	3.32	4.49
	100 ^c	4.72	0.40	5.17	0.53	1.33	-
4	100 ^a	4.15	0.23	4.76	0.41	1.78	-
	100 ^b	4.84	0.52	-	-	-	-
	100 ^c	3.77	0.12	-	-	-	-
5	100 ^a	7.14	1.12	11.28	2.35	2.10	2.63
	100 ^c	4.80	0.42	6.25	0.85	2.01	1.31
6	100 ^a	14.55	3.32	29.94	7.89	2.38	4.12
	100 ^c	8.16	1.42	-	-	-	-
7	100 ^a	5.32	0.58	7.81	1.32	2.28	2.23
	100 ^b	5.19	0.63	6.43	1.01	1.62	1.76
	100 ^c	4.06	0.20	4.35	0.29	1.42	-
8	100 ^a	5.45	0.62	6.58	0.95	1.54	1.02
	100 ^b	4.72	0.48	5.49	0.72	1.50	0.91
	100 ^c	4.48	0.33	5.10	0.51	1.56	-
9	100 ^a	6.41	0.90	-	-	-	-
	100 ^b	5.27	0.65	-	-	-	-
	100 ^c	5.36	0.59	-	-	-	-
15	100 ^a	6.98	1.07	13.10	2.89	2.69	3.55
	100 ^b	5.67	0.78	9.22	1.89	2.44	4.46
	100 ^c	5.40	0.60	6.96	1.07	1.77	1.46
Haloxypop-éthoxyéthyl	100 ^a	4.71	0.40	5.12	0.52	1.30	-
	100 ^b	4.79	0.50	-	-	-	-
	100 ^c	3.39	0.01	-	-	-	-
Lorazepam	100 ^a	5.93	0.76	7.10	1.11	1.46	0.72
	100 ^b	7.07	1.22	7.91	1.48	1.22	-
	100 ^c	9.62	1.85	-	-	-	-

**Chapitre IV: La séparation chirale en mode organique polaire sur la
colonne à base d'amylose**

Tableau III : suite

produit	Phase mobile	tr₁	k'₁	tr₂	k'₂	α	R_s
Lormetazepam	100 ^a	5.82	0.73	8.44	1.50	2.07	1.83
	100 ^c	6.21	0.84	8.73	1.59	1.89	1.79
Benzoine	100 ^a	5.53	0.64	-	-	-	-
	100 ^c	4.67	0.39	-	-	-	-
Temazepam	100 ^a	8.02	1.38	-	-	-	-
	100 ^c	7.38	1.19	9.00	1.67	1.40	1.00
Fluazifop-butyl	100 ^a	5.90	0.75	-	-	-	-
	100 ^b	4.70	0.47	-	-	-	-
	100 ^c	3.76	0.11	-	-	-	-
Oxazepam	100 ^a	4.50	0.33	-	-	-	-

^a : Méthanol ; 0.5mL mn⁻¹ ; λ_{254nm}
^b : Ethanol ; 0.5mL mn⁻¹ ; λ_{254nm}
^c : Acétonitrile ; 0.5mL mn⁻¹ ; λ_{254nm}

Chapitre IV: La séparation chirale en mode organique polaire sur la colonne à base d'amylose

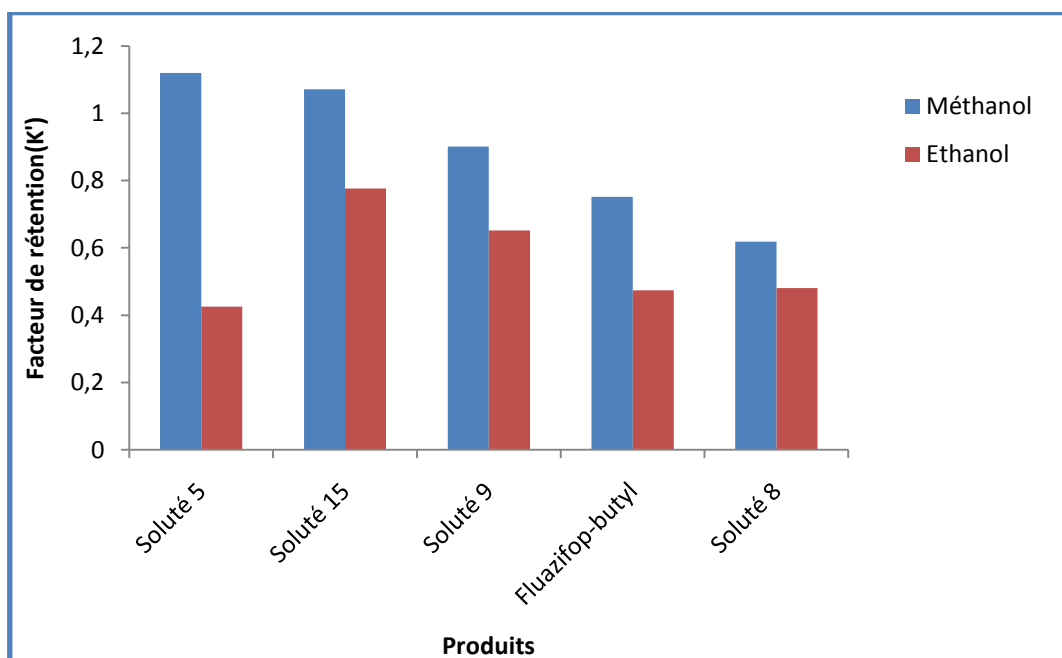
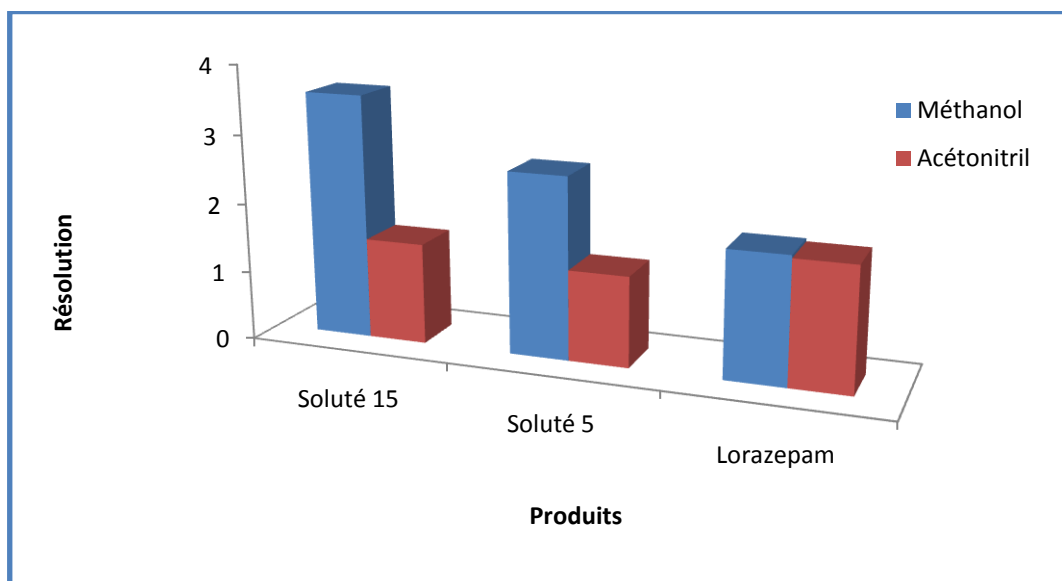
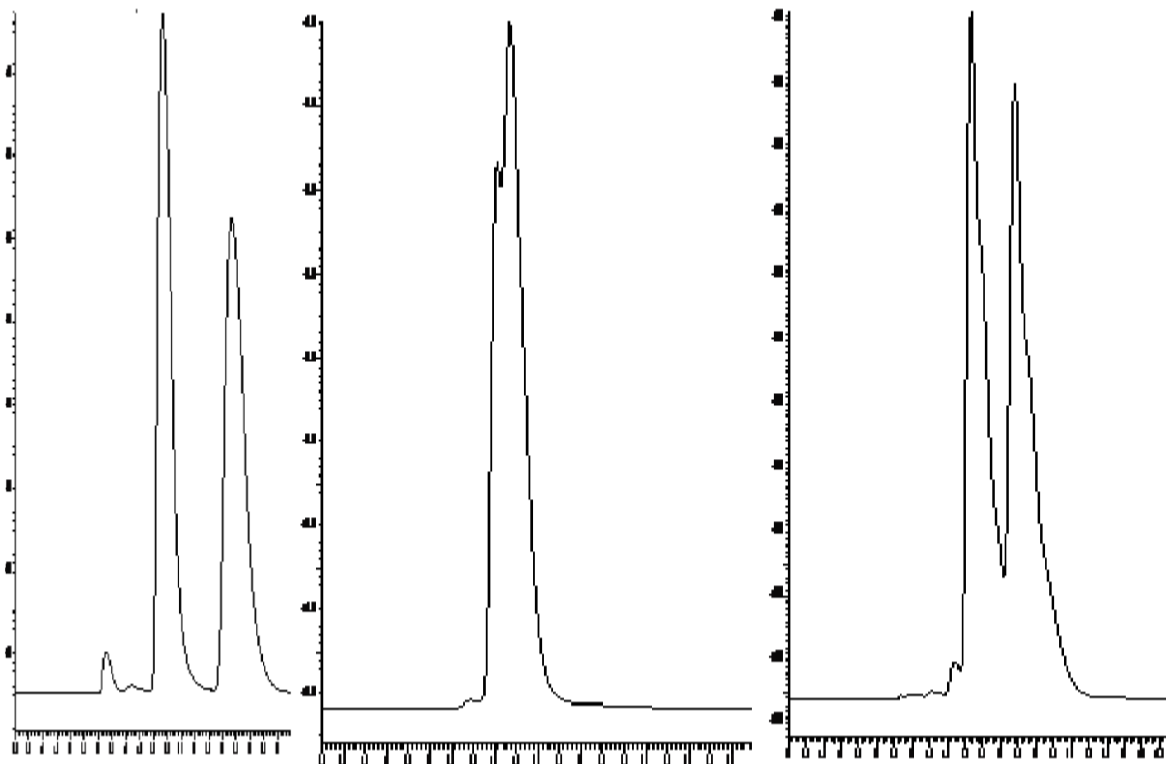


Figure 2: Variation du facteur de rétention en fonction de la nature de la phase mobile de quelques solutés sur la Nucleocel α . (Phase mobile: méthanol, éthanol, acétonitrile ; 0.5mL mn^{-1} ; $\lambda_{254\text{nm}}$).

Les chromatogrammes des produits testés avec les 3 types de solvants sont présentés sur la figure 3.

Soluté 7

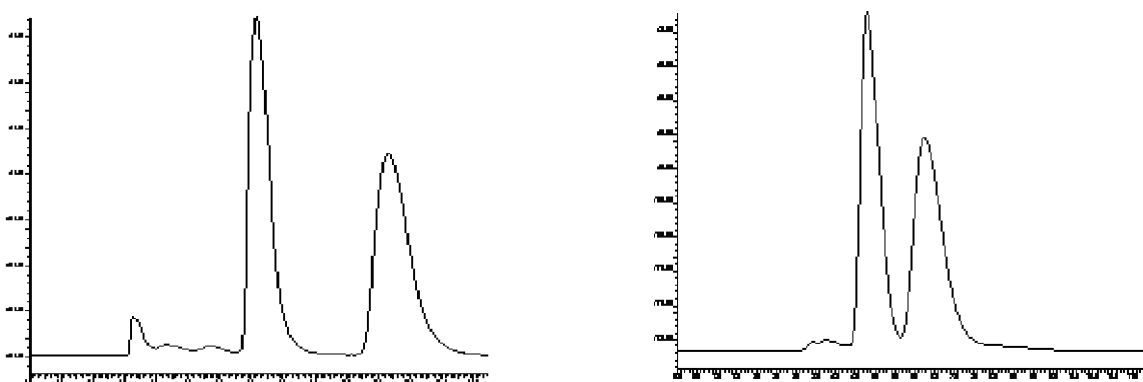


100% Méthanol

100% Acétonitrile

100% Ethanol

Soluté 5



100% Méthanol

100% Acétonitrile

Figure 3: Effet du solvant organique sur la résolution des solutés 5 et 7. (Colonne nucleocel α ; 0.5mL mn^{-1} ; $\lambda_{254\text{nm}}$).

Chapitre IV: *La séparation chirale en mode organique polaire sur la colonne à base d'amylose*

b. Effet de la nature d'alcool:

L'utilisation de l'éthanol à la place du méthanol a conduit à des changements significatifs dans le système chromatographique [16]. Les résultats chromatographiques obtenus sont présentés dans le tableau III. Nous pouvons noter que sur 17 solutés testés six composés ont été résolus, il s'agit des produits (2, 3, 5, 6, 15) et Lormetazepam, alors que, les produits : 7, 8 et Lorazepam ont été partiellement séparés avec une phase mobile à base de méthanol. Avec une phase mobile à base d'éthanol, six produits ont été partiellement séparés, il s'agit des composés: 2, 3, 6, 15, deux benzodiazépines (Lormetazepam et Temazepam).

En mode organique polaire, la meilleure résolution a été obtenue avec l'éthanol et l'énantiosélectivité est généralement diminué comme suit : éthanol >propanol >methanol > acétonitrile [17]. La figure 4 représente l'effet de la nature de l'alcool sur la sélectivité de quelques solutés.

Pour les compositions 90/10, 85/15 et 10/90 en acétonitrile, lorsqu'on passe de l'éthanol au méthanol, on remarque que la sélectivité de la phase stationnaire diminue de manière significative [18] à l'exception des produits 5 et 15. Ce phénomène peut être dû à l'encombrement stérique du modificateur organique dans la phase mobile. Les alcools primaires pourraient rentrer dans la cavité de la PSC plus facilement que les autres alcools plus encombrants [19].

Sur la figure 5, nous pouvons observer l'influence de la nature de l'alcool sur la résolution des solutés étudiés. Nous pouvons constater que la résolution dépend de la structure et du type du solvant choisi, c'est à dire méthanol, éthanol ou acétonitrile [20]. Aussi, il apparait clairement que tous les composés ont de meilleures résolutions avec l'éthanol comme modifiant organique [14,19].

**Chapitre IV: La séparation chirale en mode organique polaire sur la
colonne à base d'amylose**

Tableau III: effet de la nature de l'alcool sur la résolution

produit	Phase mobile	tr ₁	k ₁	tr ₂	k ₂	α	R _s
1	90/10 ^a	3.99	0.20	-	-	-	-
	90/10 ^b	3.74	0.16	-	-	-	-
	85/15 ^a	3.94	0.18	-	-	-	-
	85/15 ^b	3.76	0.18	-	-	-	-
	10/90 ^a	3.94	0.19	-	-	-	-
	10/90 ^b	4.13	0.23	-	-	-	-
2	90/10 ^a	6.27	0.88	9.39	1.81	2.07	2.55
	90/10 ^b	4.78	0.49	8.07	1.50	3.10	3.42
	85/15 ^a	6.02	0.80	9.00	1.69	2.11	2.61
	85/15 ^b	4.66	0.48	7.40	1.36	2.81	3.57
	10/90 ^a	4.33	0.31	-	-	-	-
	10/90 ^b	4.06	0.22	4.74	0.42	1.94	1.09
3	90/10 ^a	6.19	0.85	11.98	2.59	3.03	4.08
	90/10 ^b	4.79	0.49	9.72	2.02	4.14	4.92
	85/15 ^a	5.88	0.76	11.27	2.37	3.12	4.35
	85/15 ^b	4.70	0.50	9.02	1.87	3.77	5.32
	10/90 ^a	4.47	0.35	4.96	0.50	1.42	-
	10/90 ^b	4.26	0.28	5.54	0.66	2.39	1.97
4	90/10 ^a	3.87	0.16	-	-	-	-
	90/10 ^b	3.78	0.17	-	-	-	-
	85/15 ^a	3.77	1.13	-	-	-	-
	85/15 ^b	3.73	0.19	-	-	-	-
	10/90 ^a	3.60	0.09	-	-	-	-
	10/90 ^b	3.77	0.12	-	-	-	-
5	90/10 ^a	5.53	0.65	7.26	1.17	1.79	1.65
	90/10 ^b	5.14	0.60	-	-	-	-
	85/15 ^a	5.26	0.58	6.62	0.98	1.71	1.52
	85/15 ^b	4.85	0.54	-	-	-	-
	10/90 ^a	4.35	0.31	4.90	0.48	1.52	0.86
	10/90 ^b	4.55	0.36	-	-	-	-
6	90/10 ^a	8.78	1.63	16.46	3.93	2.41	3.84
	90/10 ^b	7.03	1.18	14.28	3.43	2.90	4.47
	85/15 ^a	7.68	1.30	13.91	3.17	2.44	4.09
	85/15 ^b	6.26	1.00	11.71	2.73	2.74	5.16
	10/90 ^a	5.89	0.78	6.44	0.94	1.21	-
	10/90 ^b	6.19	0.85	10.90	2.26	2.65	3.22

**Chapitre IV: La séparation chirale en mode organique polaire sur la
colonne à base d'amylose**

Tableau III : suite							
produit	Phase mobile	tr ₁	k ₁	tr ₂	k ₂	α	R _s
7	90/10 ^a	4.44	0.33	5.63	0.68	2.08	1.42
	90/10 ^b	4.12	0.28	4.77	0.48	1.72	0.95
	85/15 ^a	4.25	0.27	5.12	0.53	1.97	1.19
	85/15 ^b	3.96	0.26	4.47	0.42	1.63	0.81
	10/90 ^a	3.82	0.16	-	-	-	-
	10/90 ^b	3.94	0.18	-	-	-	-
8	90/10 ^a	4.62	0.39	5.23	0.57	1.47	-
	90/10 ^b	4.09	0.27	4.48	0.39	1.45	-
	85/15 ^a	4.46	0.33	4.91	0.47	1.40	-
	85/15 ^b	4.03	0.28	4.31	0.37	1.31	-
	10/90 ^a	4.17	0.26	-	-	-	-
	10/90 ^b	4.08	0.22	-	-	-	-
9	90/10 ^a	5.37	0.61	-	-	-	-
	90/10 ^b	4.41	0.37	-	-	-	-
	85/15 ^a	5.02	0.50	-	-	-	-
	85/15 ^b	4.33	0.38	-	-	-	-
	10/90 ^a	4.44	0.34	4.80	0.45	1.32	-
	10/90 ^b	4.38	0.31	-	-	-	-
15	90/10 ^a	5.79	0.73	8.94	1.68	2.29	2.71
	90/10 ^b	4.75	0.48	6.29	0.95	2.01	2.06
	85/15 ^a	5.47	0.64	7.95	1.38	2.17	2.76
	85/15 ^b	4.67	0.49	5.94	0.89	1.83	1.92
	10/90 ^a	4.68	0.41	6.03	0.82	1.99	2.14
	10/90 ^b	4.71	0.41	6.11	0.83	2.02	1.99
Benzoine	90/10 ^a	4.73	0.42	-	-	-	-
	90/10 ^b	4.87	0.51	-	-	-	-
	85/15 ^a	4.55	0.36	-	-	-	-
	85/15 ^b	4.75	0.51	-	-	-	-
	10/90 ^a	4.19	0.27	-	-	-	-
	10/90 ^b	4.28	0.28	-	-	-	-
Haloxypop-éthoxyéthyl	90/10 ^a	4.11	0.23	-	-	-	-
	90/10 ^b	3.79	0.18	-	-	-	-
	85/15 ^a	3.85	0.15	-	-	-	-
	85/15 ^b	3.63	0.16	-	-	-	-
	10/90 ^a	3.35	0.01	-	-	-	-
	10/90 ^b	3.30	0.00	-	-	-	-

**Chapitre IV: La séparation chirale en mode organique polaire sur la
colonne à base d'amylose**

Tableau III : suite

produit	Phase mobile	tr ₁	k ₁	tr ₂	k ₂	α	R _s
Fluazifop-butyl	90/10 ^a	4.56	0.37	-	-	-	-
	90/10 ^b	3.80	0.18	-	-	-	-
	85/15 ^a	4.28	0.28	-	-	-	-
	85/15 ^b	3.73	0.19	-	-	-	-
	10/90 ^a	3.53	0.07	-	-	-	-
	10/90 ^b	3.47	0.04	-	-	-	-
Lorazepam	90/10 ^a	5.05	0.51	5.52	0.65	1.28	-
	90/10 ^b	5.45	0.69	6.33	0.97	1.39	-
	85/15 ^a	4.79	0.43	5.16	0.55	1.25	-
	85/15 ^b	5.08	0.62	5.85	0.86	1.40	0.87
	10/90 ^a	5.75	0.74	-	-	-	-
	10/90 ^b	5.85	0.75	6.19	0.85	1.13	-
Lormetazepam	90/10 ^a	4.97	0.49	6.80	1.03	2.12	1.71
	90/10 ^b	5.11	0.59	9.77	2.03	3.46	4.27
	85/15 ^a	4.69	0.40	6.34	0.90	2.23	1.93
	85/15 ^b	4.88	0.55	8.75	1.79	3.23	4.19
	10/90 ^a	4.98	0.50	6.33	0.91	1.81	1.74
	10/90 ^b	4.87	0.46	7.07	1.12	2.43	2.77
Temazepam	90/10 ^a	6.38	0.91	-	-	-	-
	90/10 ^b	7.51	1.33	10.10	2.14	1.60	1.85
	85/15 ^a	6.24	0.87	-	-	-	-
	85/15 ^b	6.81	1.17	9.16	1.92	1.64	2.24
	10/90 ^a	5.63	0.70	6.11	0.85	1.21	-
	10/90 ^b	5.83	0.74	6.94	1.08	1.45	1.37
Oxazepam	90/10 ^a	4.14	0.24	-	-	-	-
	90/10 ^b	4.23	0.31	-	-	-	-
	85/15 ^a	4.01	0.20	-	-	-	-
	10/90 ^a	4.67	0.41	5.20	0.57	1.39	-
	10/90 ^b	5.05	0.51	-	-	-	-

^a: Méthanol/Acétonitrile ; 0.5mL mn⁻¹ ; λ_{254nm}
^b: Ethanol/Acétonitrile ; 0.5mL mn⁻¹ ; λ_{254nm}

Chapitre IV: La séparation chirale en mode organique polaire sur la colonne à base d'amylose

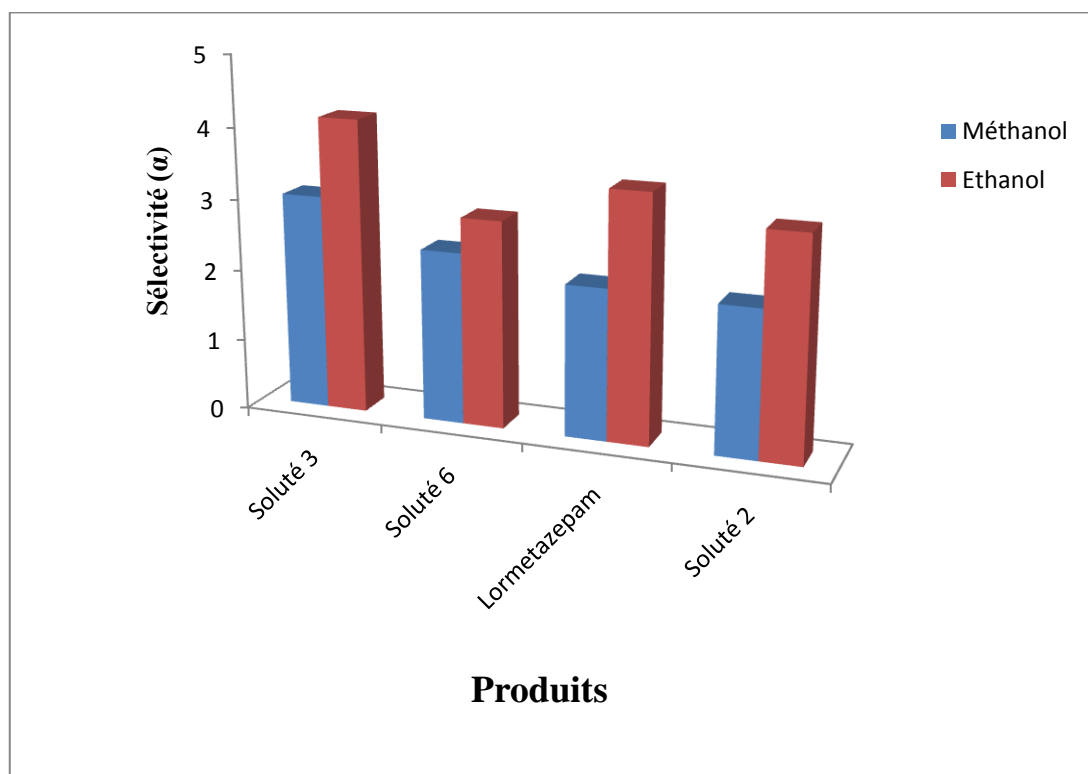


Figure 4: Variation de la sélectivité en fonction de la nature de l'alcool sur la colonne à base d'amylose. (Phase mobile: méthanol ou éthanol/ CH_3CN , 0.5 mL min^{-1} ; $\lambda_{254\text{nm}}$).

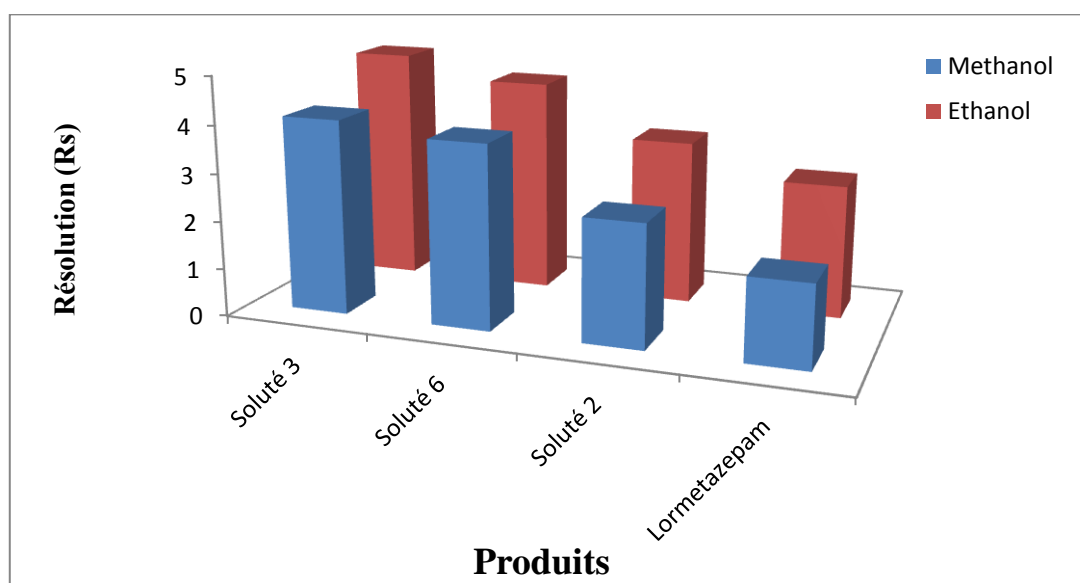


Figure 5: Variation de la résolution en fonction de la nature de l'alcool sur la colonne nucleocel α . (Phase mobile : méthanol ou éthanol/ CH_3CN , 0.5 mL min^{-1} ; $\lambda_{254\text{nm}}$).

c. Effet de la composition de la phase mobile:

D'une manière générale le facteur de rétention des composés étudiés augmente avec l'augmentation de la polarité de la phase mobile. Ceci prouve que les interactions dipôles-dipôles, les interactions π - π entre les noyaux aromatiques des solutés et les groupes phényle de la PSC sont impliqués dans la séparation chirale [21].

Comme nous pouvons le constater sur la figure 6, les facteurs de rétention augmentent considérablement avec l'augmentation de la quantité d'acétonitrile dans la phase mobile. Ce comportement peut être expliqué par le fait que le 2-propanol peut concurrencer les solutés pour former des liaisons hydrogène avec la phase stationnaire chirale [22].

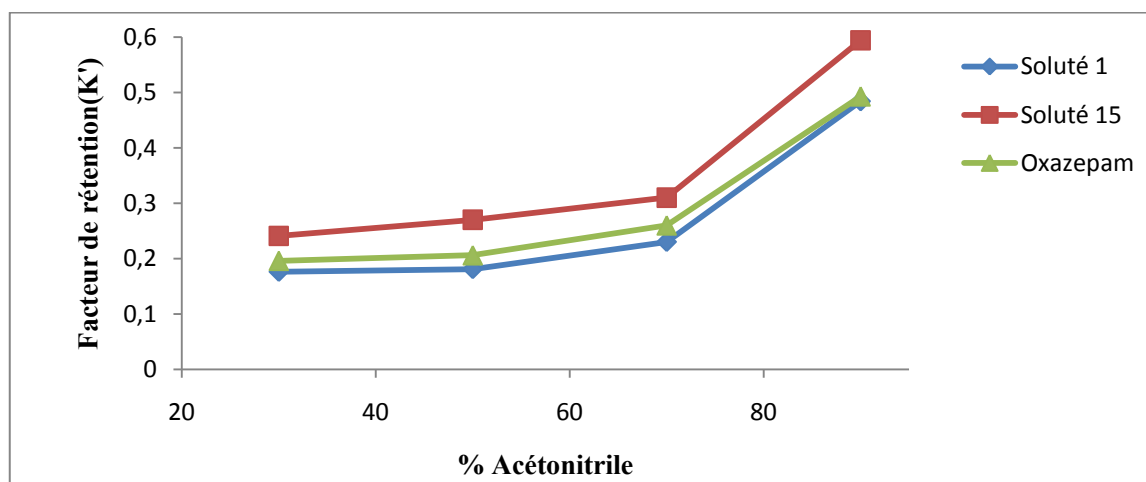


Figure 6: Influence de la composition de la phase mobile en acétonitrile sur les facteurs de rétention des produits : 1, 15, Oxazepam sur la colonne à base d'amylose. (2-propanol /ACN ; 0.5mL mn^{-1} ; $\lambda_{254\text{nm}}$).

La figure 7 représente l'effet de l'acétonitrile dans la phase mobile sur la résolution de quelques solutés optiquement actifs.

Chapitre IV: La séparation chirale en mode organique polaire sur la colonne à base d'amylose

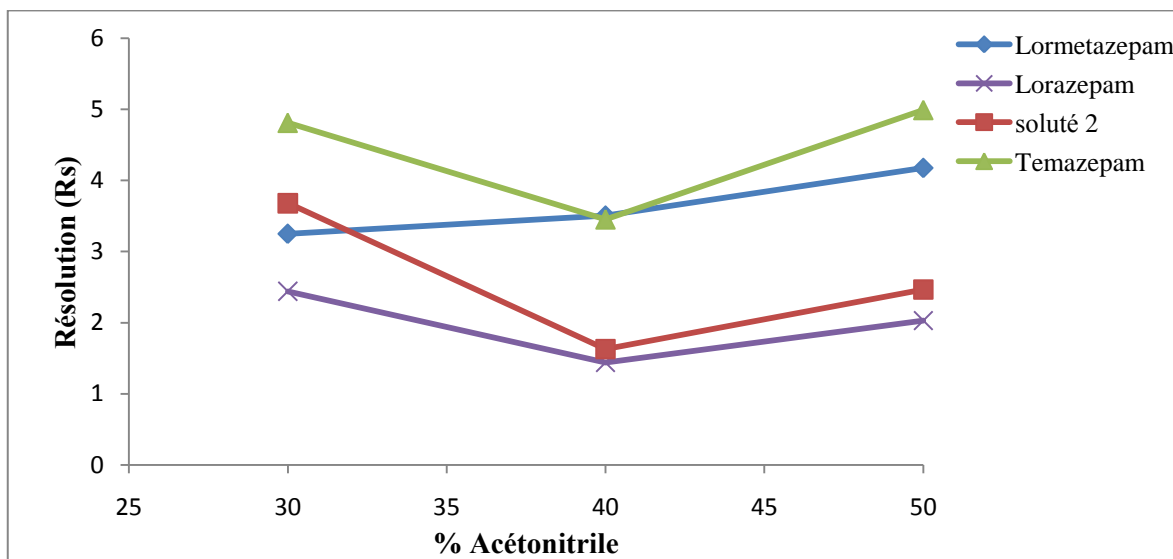


Figure 7: Influence de la composition de la phase mobile en acétonitrile sur la résolution des produits : lormetazepam, Lorazepam, Temazepam et soluté 2 sur la colonne Nucleocel α . (2- propanol /ACN ; 0.5mL mn^{-1} ; $\lambda_{254\text{nm}}$).

Un autre résultat intéressant est le comportement du Lorazepam (figure 8) où la résolution et la sélectivité augmentent avec l'augmentation de la quantité du 2-propanol dans la phase mobile.

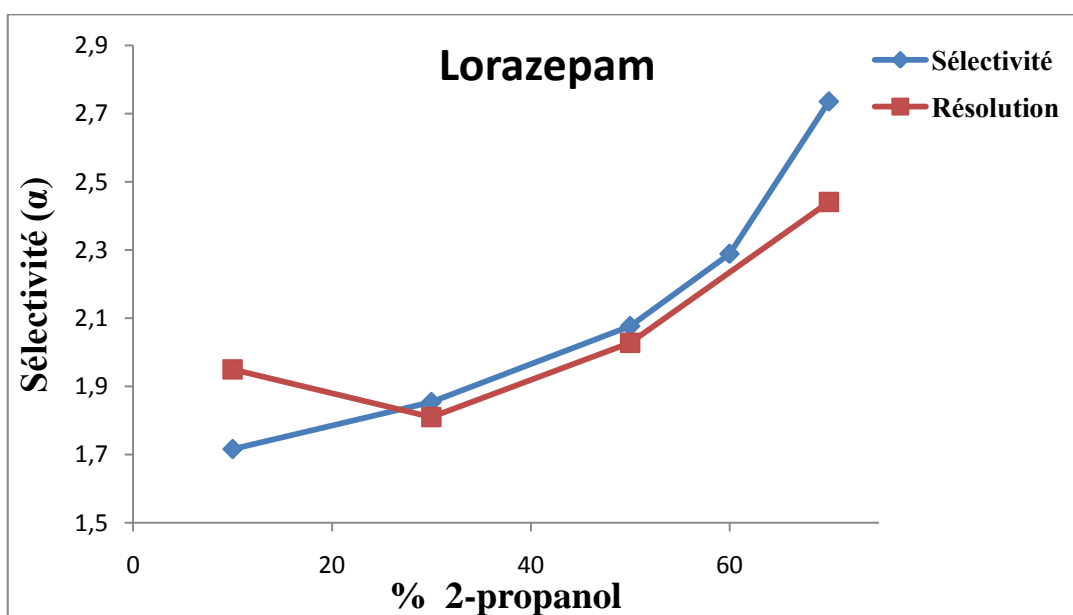


Figure 8: Influence de la composition de la phase mobile en acétonitrile sur la sélectivité de lorazepam sur la colonne à base d'amylose. (2- propanol /ACN ; 0.5mL mn^{-1} ; $\lambda_{254\text{nm}}$).

Chapitre IV: *La séparation chirale en mode organique polaire sur la colonne à base d'amylose*

La figure 9 nous donne les chromatogrammes du soluté 5 avec différentes composition de phase mobile.

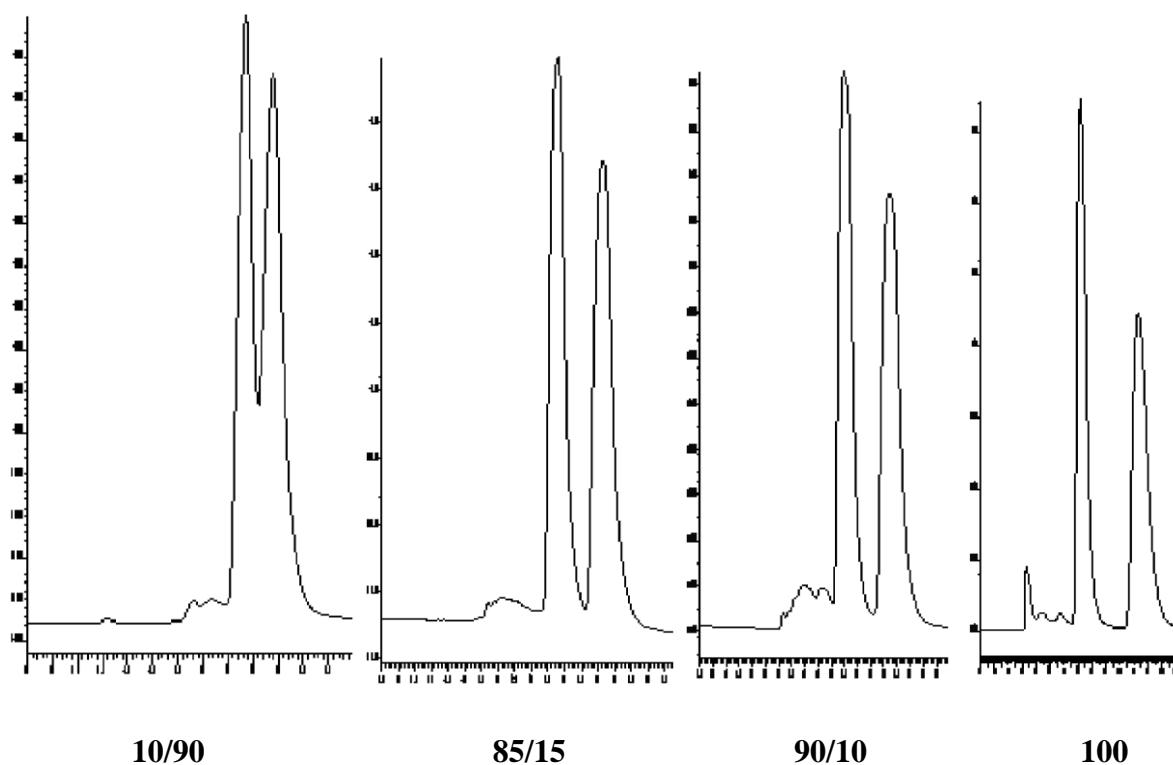


Figure 9: Effet de la composition de la phase mobile (MeOH/ACN) sur l'énantioséparation du soluté 5 sur la Nucleocel α (0.5mL mn^{-1} ; $\lambda_{254\text{nm}}$).

IV.3. Conclusion

Dans cette partie, nous avons testé la colonne chirale tris-(3,5 diméthylphénylcarbamate) amylose en mode organique polaire. Nous avons ainsi étudié les différents paramètres pouvant influencer sur la séparation chirale : la composition de la phase mobile et la nature de l'alcool utilisé. Nous avons également tenté d'expliquer les mécanismes et les interactions mises en jeu lors de la séparation chirale.

Ainsi, le test de la phase stationnaire a permis la séparation totale de six couples d'énantiomères, parmi eux trois benzodiazépines (Temazepam, Lorazepam et Lormetazepam) et les solutés 2, 3 et 6, alors que les autres ont été partiellement séparés en utilisant le mélange 2-propanol/Acétonitrile.

Avec une phase mobile constituée de méthanol/acétonitrile, une séparation totale de cinq solutés chiraux : 2, 3, 6, 15 et Lormetazepam a été obtenue et une séparation partielle a été observée pour les six autres solutés.

D'autre part, avec une phase mobile constituée d'éthanol/acétonitrile, une séparation de neuf solutés chiraux a été effectuée, parmi eux les trois benzodiazépines (Lormetazepam, Lorazepam et Temazepam) ceci a démontré l'importance de la nature du modifiant organique dans la phase mobile.

Références bibliographiques :

- [1] J. Y. Jin, W. Lee, Bull. Korean. Chem. Soc, 2008, **29**, 491.
- [2] K. R. A. Belaz, Q. B. Cass, R. V. Oliveira, Talanta, 2008, **76**, 149.
- [3] J. Zheng, W. Bragg, J. Hou, N. Lin, S. Chandrasekaran, S. A. Shamsi, J. Chromatogr. A, 2009, **1216**, 858.
- [4] H. Ates, D. Mangelings, Y. V. Heyden, J. Chromatogr. B, 2008, **875**, 58.
- [5] N. Matthijs, M. Maftouh, Y. V. Heyden, J. Chromatogr. A, 2006, **1111**, 49.
- [6] K. S. S. Dossou, P. Chiap, B. Chankvetadze, A-C. Servais, M. Fillet, J. Crommen, J. Chromatogr. A, 2009, **1216**, 7451.
- [7] M. M. Hefnawy, M. A. Sultan, M. M. Al-Shehri, J. Chromatogr. B, 2007, **856**, 329.
- [8] B. Kafkova, Z. Bosakova, E. Tesarova, P. Coufal, J. Chromatogr. A, 2005, **1088**, 87.
- [9] T. Zhang, D. Nguyen, P. Franco, J. Chromatogr. A, 2010, **1217**, 1049.
- [10] C. V. Hoffmann, M. Laemmerhofer, W. Lindner, J. Chromatogr. A, 2007, **1161**, 248.
- [11] Z-D. Zhai, Y-P. Shi, T. Wang, A. Chim. Acta, 2005, **550**, 125.
- [12] H. Ates, D. Mangelings, Y. V. Heyden, J. Pharm. Biomed. Anal, 2008, **48**, 290.
- [13] L. Li, S. Zhou, L. Jin, Ch. Zhang, W. Liu, J. Chromatogr. B, 2010, **878**, 1271.
- [14] R. Nageswara Rao, D. Nagaraju, A. Narasaraju, J. Pharm. Biomed. Anal, 2006, **40**, 340.
- [15] R. Cirilli, A. Simonelli, R. Ferretti, A. Bolasco, P. Chimenti, D. Secci, E. Maccioni, F. La Torre, J. Chromatogr. A, 2006, **1101**, 202.
- [16] A. Bielejewska, K. Duszcyk, K. Kulig, B. Malawska, M. Miśkiewicz, A. Leś, J. Zukowski, J. Chromatogr. A, 2007, **1173**, 54.
- [17] R. Cirilli, S. Alcaro, R. Fioravanti, D. Secci, S. Fiore, F. L. Torre, F. Ortuso, J. Chromatogr. A, 2009, **1216**, 4675.

**Chapitre IV: *La séparation chirale en mode organique polaire sur la
colonne à base d'amylose***

- [18] I. Ilisz, Z. Pataj, R. Berkecz, I. Szatmári, F. Fülöp, A. Péter, J. Chromatogr. A, 2010, **1217**, 2983.
- [19] R. N. Rao, A. N. Raju, D. Nagaraju, J. Pharm. Biomed. Anal, 2006, **42**, 350.
- [20] L. Thunberg, J. Hashemi, S. Andersson, J. Chromatogr. B, 2008, **875**, 76.
- [21] S. Fanali, G. D'Orazio, K. Lomsadze, B. Chankvetadze, J. Chromatogr. B, 2008, **875**, 299.
- [22] P. Sun, D. W. Armstrong, J. Chromatogr. A, 2010, **4904**, 4916.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Nous nous sommes intéressés dans ce travail à la séparation de plusieurs produits optiquement actifs sur des colonnes à base de dérivés de cellulose et d'amylose, par la chromatographie liquide à haute performance. Deux modes de phase mobile ont été utilisés à savoir le mode normal et le mode organique polaire. Nous avons étudié l'influence de la nature et de la composition de la phase mobile ainsi que l'effet de l'ajout d'un modifiant cationique et anionique sur le pouvoir énanti discriminatoire de ces phases stationnaires.

La séparation chirale en mode normal sur la colonne à base de tris-(3,5-diméthylphénylcarbamate) cellulose chiralcel OD-H, a permis la séparation de quinze composés optiquement actifs parmi eux les produits pharmaceutiques tels que les benzodiazépines, les β -bloquants et la warfarine. Quatre autres composés ont été partiellement séparés tels que le naproxène et les solutés 4, 5, 14.

Quand, au test de la phase stationnaire à base de tris-(3,5 diméthylphénylcarbamate) amylose en mode normal, sept solutés optiquement actifs ont été résolus il s'agit des produits 2, 3, 4, 6, les benzodiazépines (Lorazepam et Lormetazepam) et la Benzoïne.

En mode organique polaire, le test de la phase stationnaire chirale à base de l'amylose a permis une résolution totale de huit composés sur 17 solutés testés. Parmi eux les quatre benzodiazépines: Lorazepam, Lormetazepam, Temazepam et Oxazepam.

Les résultats obtenus ont montré que les colonnes testées dans ce travail sont complémentaire puisque certains mélanges racémiques sont résolus sur une phase et non pas sur l'autre. En effet, la colonne à base d'amylose étudiée en mode normal et organique polaire a permis de conclure que les benzodiazépines sont tous résolus en mode organique polaire en utilisant la phase mobile 2-propanol/Acétonitrile. Alors que la colonne à base de cellulose donnait de meilleures résolutions en mode normal avec le mélange Hexane/Ethanol où tous les β -bloquants ont été parfaitement résolus avec des facteurs de résolutions allant jusqu'à $R_s=8.44$.

Enfin, la reconnaissance chirale des deux colonnes Chiralcel OD-H et Nucleocel α a été comparée à la phase stationnaire chirale à base de béta cyclodextrine (HP- β -CD), préparée antérieurement par notre équipe du laboratoire et ceci en mode normal. Les résultats obtenus ont montré que les meilleurs séparations ont été obtenues sur la phase stationnaire à base de cellulose (Chiralcel OD-H), suivie de la Nucleocel α enfin de la phase HP- β -cyclodextrine. Cette différence d'énantiosélectivité entre la phase Chiralcel OD-H et la

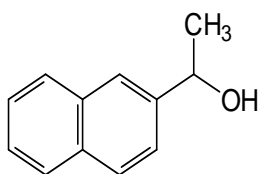
Conclusion générale

Nucleocel α montre le rôle important des différences conformationnelles dans le mécanisme de la reconnaissance chirale. Nous avons montré, d'autre part, que la reconnaissance chirale en mode normal est due essentiellement aux interactions de types π - π , dipôle-dipôle et les liaisons hydrogène. Néanmoins, les trois PSCs ont montré une certaine complémentarité quant à la séparation de certains produits.

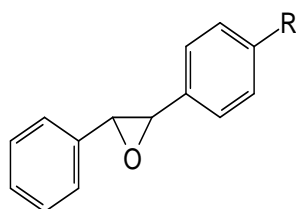
ANNEXE A

Structures des produits testés

I- Les produits optiquement actifs

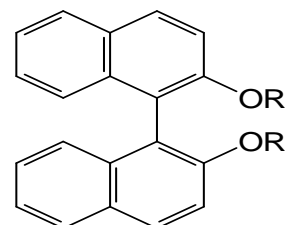


1

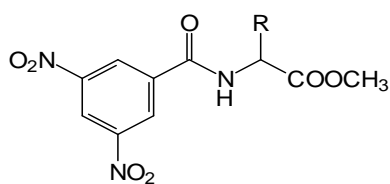


2: R=H

3: R=Cl



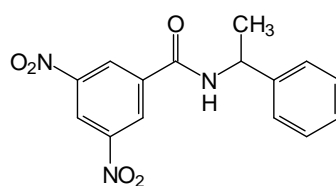
4: R=H



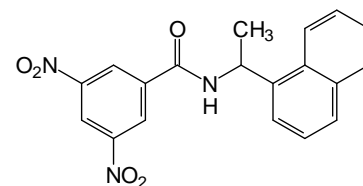
5: R=CH₃

6: R=CH₂C₆H₅

7: R=CH(CH₃)₂

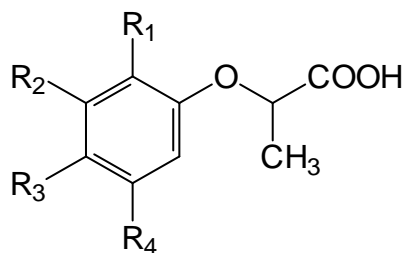


8



9

II-les herbicides



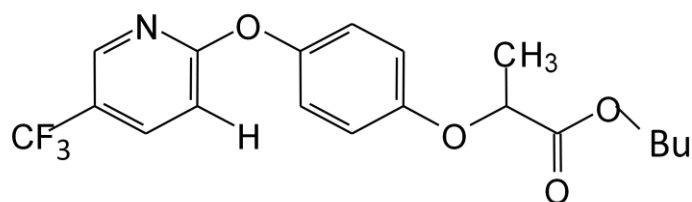
10: R1=R3=R4=Cl, R2=H; Silvex

11: R2=Cl, R1=R3=R4=H; acide 3-chloro-phenoxypropionique

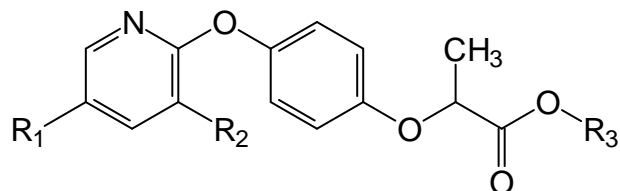
12: R3=Cl, R1=R2=R4=H; acide 4-chloro-phenoxypropionique

13: R1=CH3; R3=Cl, R2=R4=H; mecoprop

14: R1=Cl, R2=R3=R4=H; acide 2-chloro-phenoxypropionique



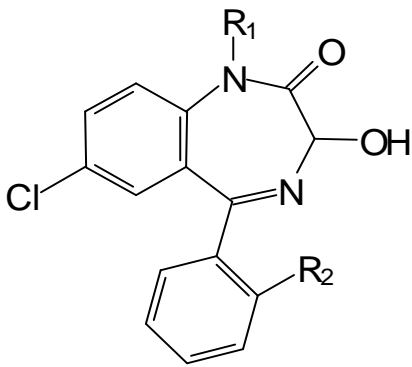
Fluazifop-buthyl



R1=CF₃, R2=Cl, R3= (CH₂)₂OEt; haloxyfop-éthoxyéthyl

III-Les produits pharmaceutiques

1-les benzodiazépines



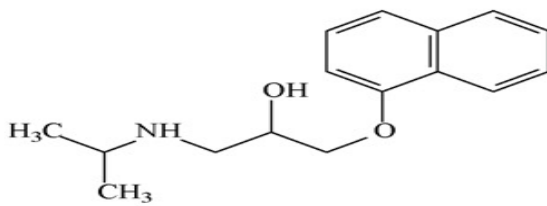
R₁=H, R₂=Cl, lorazepam

R₁=R₂=H, oxazepam

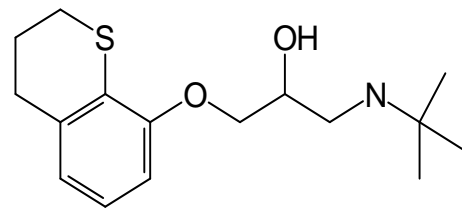
R₁=CH₃, R₂=H, temazepam

R₁=CH₃, R₂=Cl, lormetazepam

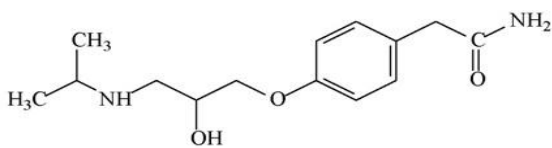
2-les β-bloquants



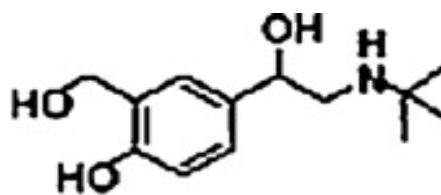
Propranolol



Tertatolol

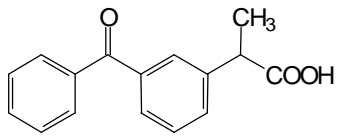


Atenolol

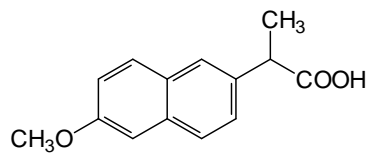


Salbutamol

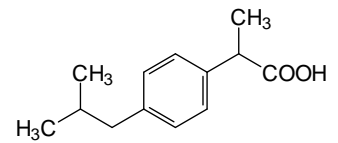
3-les anti-inflammatoires non stéroïdiens



Kétoprofène

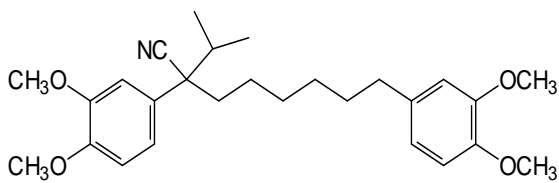


Naproxène

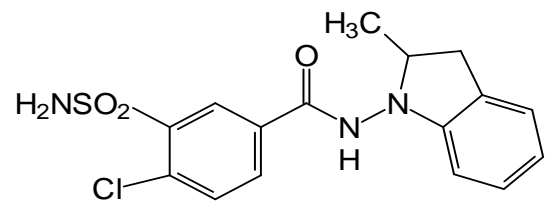


Ibuprofène

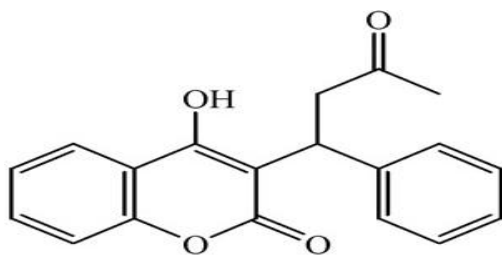
4-Divers



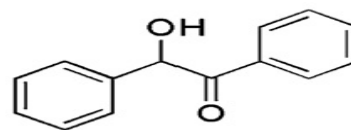
Verapamil



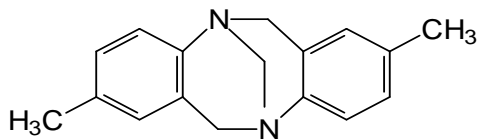
Indapamide



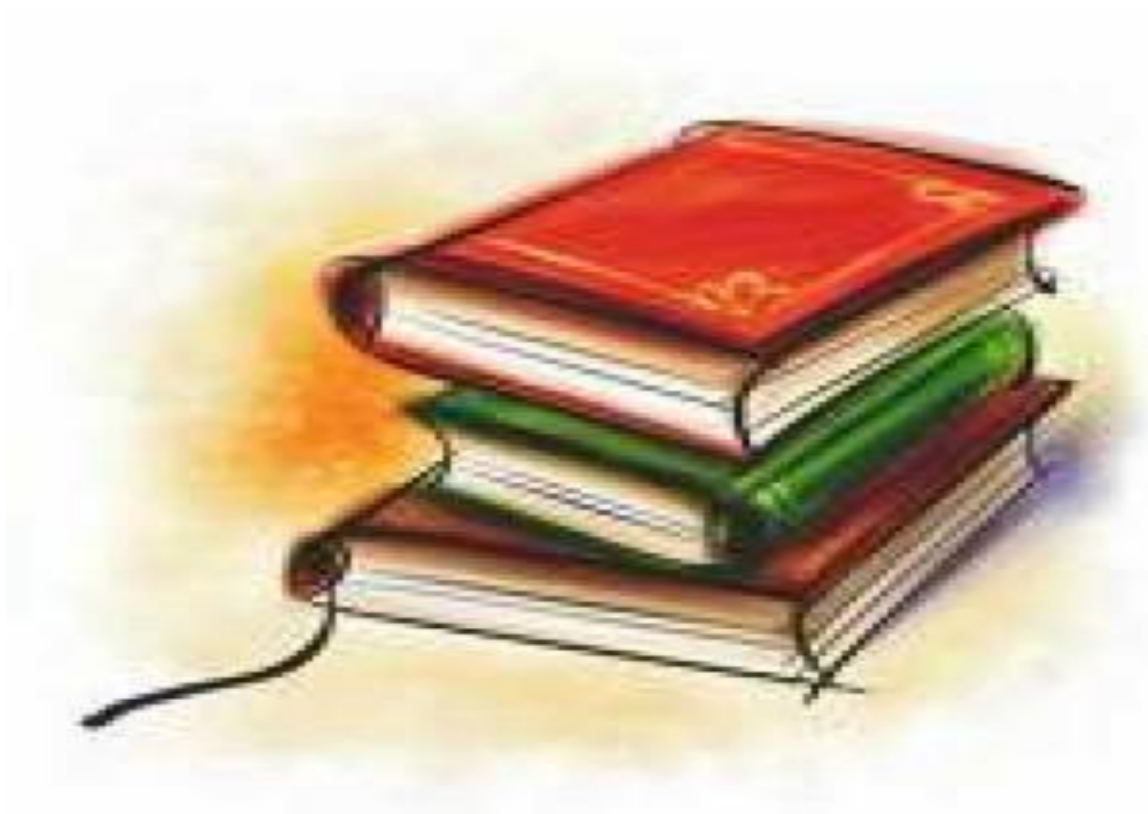
Warfarin



benzoin



ANNEXE B



Références bibliographiques utilisées dans ce travail :

Introduction

- [1] M. Parschau, U. Ellerbeck, K-H. Ernst, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, 2010, **354**, 240.
- [2] P. Paik, A. Gedanken, Y. Mastai, Microporous and Mesoporous Materials, 2010, **129**, 82.
- [3] C. Suteu, STP. PHARMA. PRATIQUES, 2004, **14**, 293.
- [4] J. Y. Jin, W. Lee, Bull. Korean. Chem. Soc, 2008, **29**, 491.
- [5] S. G. Hiriyanna, K. Basavaiah, V. Dhayanithi, H. N. Pati, Chromatographia, 2008, **68**, 501.
- [6] L. Li, S. Zhou, L. Jin, C. Zhang, W. Liu, J. Chromatogr. B, 2010, **878**, 1266.
- [7] Y. Xiang, G. W. Sluggett, J. Pharm. Biomed. Ana, 2010, **53**, 878.

Chapitre I: Généralités

- [1] I. Ali, H. Y. Aboul-Enein, Chiral Pollutants: Distribution, Toxicity and Analysis by Chromatography and Capillary Electrophoresis, John Wiley and Sons, Ltd, 2004, 221.
- [2] V. A. DAVANKOV, Pure and App. Chem, 1997, **69**, 1472.
- [3] M. Haroun, Phases stationnaires chirales à base de teicoplanine et d'aminoglycosides pour la séparation d'énantiomères d'acides aminés. Thèse de Doctorat, 2007, Université Joseph Fourier, Grenoble1, 18.
- [4] A. Svang-Ariyaskul, W. J. Koros, R.W. Rousseau, Chemical Engineering Science, 2009, **64**, 1980.
- [5] D. R. Bobbitt, S.W. Linder, Trends Anal. Chem, 2001, **20(3)**, 111.
- [6] C. P. Kapnissi, Analytical Separations Using Packed and Opentubular Capillary Electrochromatography, thèse de doctorat, 2004, University of Cyprus, 38.
- [7] T. W. G. Solomons, C. B. Fryhle, Chimie Organique, Modula, Mont-Royal, 2000, 170.
- [8] M. L. Calabro, D. Raneri, S. Tommasini, R. Ficarra, S. Alcaro, A. Gallelli, N. Micale, M. Zappalà, P. Ficarra, J. Chromatogr. B, 2006, **838**, 56.
- [9] A. Ghanem, M. N. Aboul-Enein, A. El-Azzouny, M. F. El-Beairy, J. Chromatogr. A, 2010, **1217**, 1063.
- [10] M. L. Lorin, Intérêt du détecteur à dichroïsme circulaire en chromatographie liquide et du détecteur conductimétrique à couplage capacitif en électrophorèse capillaire pour l'analyse de molécules chirales, thèse de doctorat, Université d'ORLÉANS, 2008, 16.

- [11] J. Ye, J. Wu, W. Liu, *Trends in Analytical Chemistry*, 2009, **28**, 1148.
- [12] T. Wang, R. M. Wenslow, Jr, *J. Chromatogr. A*, 2003, **1015**, 99.
- [13] A. Ghanem, H. Hoenen, H. Y. Aboul-Enein, *Talanta*, 2006, **68**, 602.
- [14] J. L. Martinez, *Environmental Pollution*, 2009, **157**, 2893.
- [15] P. Paik, A. Gedanken, Y. Mastai, *Microporous and Mesoporous Materials*, 2010, **129**, 82.
- [16] A. Collet, J. Crassous, J-P Dutasta, L. Guy, *Molécules chirales Stéréochimie et propriétés*, 2006, 204.
- [17] W. J. Choi, K. Y. Lee, S. H. Kang, S. B. Lee, *Separation and Purification Technology*, 2007, **53**, 178.
- [18] G. Gübitz, M. G. Schmid, *Chiral Separations Methods and Protocols*, Totowa, New Jersey, 2004, **243**, 31.
- [19] M. Zhao, X-L. Xu, Y-D. Jiang, W-Z. Sun, W-F. Wang, L-M. Yuan, *J. Membrane Science*, 2009, **336**, 149.
- [20] Y. Zhang, D-R. Wu, D. B. Wang - Iverson, A. A. Tymiak, D. D. T, 2005, **10**, 575.
- [21] J. trenchant, *Manuel Pratique De Chromatographie en phase gazeuse*, Masson Paris Milan, Barcelone, 4.
- [22] L. Li, S. Zhou, L. Jin, C. Zhang, W. Liu, *J. Chromatogr. B*, 2010, **878**, 1266.
- [23] M. W. Dong, *Modern HPLC For Practicing Scientists*, Wiley-Interscience, New Jersey, 2006, 2.
- [24] L. Miller, M. Potter, *J. Chromatogr. B*, 2008, **875**, 230.
- [25] P. Morin, *Annales pharmaceutiques Françaises*, 2009, **67**, 243.
- [26] Z. Wang, J. Ouyang, W. R. G. Baeyens, *J. Chromatogr. B*, 2008, **862**, 1.
- [27] Y. Kazakevich, R. Lobrutto, *HPLC for pharmaceutical scientists*, Wiley-interscience, 2007, 3.
- [28] M. Z. Kagan, *J. Chromatogr. A*, 2001, **918**, 293.
- [29] V. R. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 4th ed, John Wiley & Sons, 2004, 7 .
- [30] K. Tachibana, A. Ohnishi, *J. Chromatogr. A*, 2001, **906**, 128.
- [31] N. Matthijs, M. Maftouh , Y. V. Heyden, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1111**, 49.
- [32] Y. Xiang, G. W. Sluggett, *J. Pharm. Biomed. Anal*, 2010, **53**, 878.
- [33] S. Perez, D. Barcelo, *Trends in Analytical Chemistry*, 2008, **27**, 837.
- [34] W. W. Barnhart, K. H. Gahm, Z. Hua, W. Goetzinger, *J. Chromatogr. B*, 2008, **875**, 217.
- [35] M. Lämmerhofer, *J. Chromatogr. A*, 2005, **1068**, 32.

- [36] G. Gübitz, M. G. Schmid, *J. Chromatogr. A*, 2008, **1204**, 141.
- [37] N. Rubio, S. Ignatova, C. Minguillón, I. A. Sutherland, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 8505.
- [38] E. Pérez, M. J. Santos, C. Minguillon, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1107**, 165.
- [39] J. M. M. Araújo, R. C. R. Rodrigues, M. F. J. Eusébio, J. P. B. Mota, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 5407.
- [40] M. ALAMIR, J. P. CORRIOU, *Commande Non Linéaire D'un Lit Mobile Simulé*, Laboratoire d'Automatique de Grenoble et des Sciences du Génie Chimique. Lorraine, Nancy.
- [41] C. Roussel, A. D. Rio, J. Pierrot-Sanders, P. Piras, N. Vanthuynne, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1037**, 314.
- [42] G. Uccello-Barretta, L. Vanni, F. Balzano, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 939.
- [43] K. Rahman, R. M. Illias, O. Hassan, N. A. N. Mahmood, N. A. A. Rashid, *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, **39**, 74.
- [44] R-Q. Wang, T-T. Ong, S-Ch. Ng, *J. Chromatogr. A*, 2008, **1203**, 185.
- [45] W. Lao, J. Gan, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1117**, 184.
- [46] R. M. Smith, A. Marton, *Pure & Appl. Chem*, 1997, **69**, 1476.
- [47] J. Zhao, D - Q. Lin, Y-Ch Wang, S-J Yao, *Carbohydrate Polymers*, 2010, **80**, 1085.
- [48] M. E. Brewster, T. Loftsson, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, **59**, 646.
- [49] P. R. Santagapita, L. G. Brizuela, M. F. Mazzobre, H. L. Ramirez, H. R. Corti, R. V. Santana, M. P. Buera, *Carbohydrate Polymers*, 2011, **83**, 203.
- [50] S. Ma, S. Shen, N. Haddad, W. Tang, J. Wang, H. Lee, N. Yee, Ch. Senanayake, N. Grinberg, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 1232.
- [51] Y. Zhao, Z. Guo, Y. Zhang, X. Xue, Q. Xu, X. Li, X. Liang, Y. Zhang, *Talanta*, 2009, **78**, 916.
- [52] K. Si Ahmed, F. Tazerouti, A.Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B.Y. Meklati, *Chromatographia*, 2005, **62**, 572.
- [53] I. Ali, K. Kumerer, H. Y. Aboul-Enein, *Chromatographia*, 2006, **63**, 299.
- [54] I. W. Kim, H. M. Choi, H. J. Yoon, J. H. Park, *Analytica Chimica Acta*, 2006, **569**, 151.
- [55] M. Lammerhofer, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 838.
- [56] M. M. Hefnawy, M. A. Sultan, M. M. Al-Shehri, *J. Chromatogr. B*, 2007, **856**, 329.
- [57] S. M. Staroverov, M. A. Kuznetsov, P. N. Nesterenko, G. G. Vasiarov, G. S. Katrukha, G. B. Fedorova, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1108**, 263.

- [58] A. F. Prokhorova, E. N. Shapovalova, O. A. Shpigun, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010, **53**, 1171.
- [59] I. Ilisz, R. Berkecz, A. Péter, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 1846.
- [60] E. Yashima, *J. Chromatogr. A*, 2001, **906**, 106.
- [61] X. Chen, Ch. Yamamoto, Y. Okamoto, *Pure Appl. Chem*, 2007, **79**, 1563.
- [62] M. Wada, M. Ike, K. Tokuyasu, *Polymer Degradation and Stability*, 2010, **95**, 543.
- [63] G. Agoda-Tandjawa, S. Durand, S. Berot, C. Blassel, C. Gaillard, C. Garnier, J.-L. Dublier, *Carbohydrate Polymers*, 2010, **80**, 677.
- [64] A. K. Siddhanta, K. Prasad, R. Meena, G. Prasad, G. K. Mehta, M. U. Chhatbar, M. D. Oza, S. Kumar, N. D. Sanandiya, *Bioresource Technology*, 2009, **100**, 6669.
- [65] I. Ali, V. D. Gaitonde, H. Y. Aboul-Enein, A. Hussain, *Talanta*, 2009, **78**, 461.
- [66] S. Zhang, F-X Li, J-y Yu, Y-L Hsieh, *Carbohydrate Polymers*, 2010, **81**, 668.
- [67] X-M. Chen, Ch. Yamamoto, Y. Okamoto, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1104**, 62.
- [68] G. Hu, Ch. Burton, Ch. Yang, *Journal of Cereal Science*, 2010, **51**, 35.
- [69] J. Shen, T. Ikai, Y. Okamoto, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 1041.
- [70] J. Haginaka, *J. Chromatogr. B*, 2008, **875**, 13.

Chapitre II : la séparation chirale en mode normal sur la colonne à base de cellulose

- [1] H. Ates, D. Mangelings, Y. V. Heyden, *J. chromatogr. B*, 2008, **875**, 57.
- [2] Y. Ming, L. Zhao, H. Zhang, Y. Shi, Y. Li, *Chromatographia*, 2006, **64**, 273.
- [3] A. Ghanem, H. Hoenen, H. Y. Aboul-Enein, *Talanta*, 2006, **68**, 603.
- [4] T. Zhang, Ch. Kientzy, P. Franco, A. Ohnishi, Y. Kagamihara, H. Kurosawa, *J. Chromatogr. A*, 2005, **1075**, 65.
- [5] R. B. Kasat, N- H. L. Wang, E. I. Franses, *J. chromatogr. A*, 2008, **1190**, 110.
- [6] N. Matthijs, C. Perrin, M. Maftouh, D.L. Massart, Y. V. Heyden, *J. chromatogr. A*, 2004, **1041**, 120.
- [7] J. Y. Jin, W. Lee, *Bull. Korean Chem. Soc*, 2008, **29**, 491.
- [8] J. Shen, T. Ikai, Y. Okamoto, *J. chromatogr. A*, 2010, **1217**, 1041.
- [9] N. Mesplet, Y. Saito, P. Morin, L. A. Agrofoglio, *J. chromatogr. A*, 2003, **983**, 117.
- [10] L. Zhou, Ch. Welch, C. Lee, X. Gong, V. Antonucci, Z. Ge, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2009, **49**, 964.
- [11] E. Perez, M. J. Santos, C. Minguillon, *J. chromatogr. A*, 2006, **1107**, 166.
- [12] L. Xiu-Juan, Z. Liang, M. Yong-Fei, P. Xian-Zhi, Z. Yong-Zhang, Ch. Li-Ren, *Chin. J. Anal. Chem*, 2007, **35**, 516.
- [13] Y. Liu, H. Zou, *J. chromatogr. A*, 2008, **1178**, 123.

- [14] Z. Wang, J. Ouyang, W. R.G. Baeyens, *J. chromatogr. B*, 2008, **862**, 5.
- [15] M. L. Calabro, D. Raneri, S. Tommasini, R. Ficarra, S. Alcaro, A. Gallelli, N. Micale, M. Zappala, P. Ficarra, *J. chromatogr. B*, 2006, **838**, 58.
- [16] P. Chunxiu, S. Baochun, Z. Xuejun, Z. Datong, X. Xiuzhu, *Chin. J. Anal. Chem*, 2006, **34**, 160.
- [17] F. Zhan, G. Yu, B. Yao, X. Guo, T. Liang, M. Yu, Q. Zeng, W. Weng, *J. chromatogr. A*, 2010, 4.
- [18] R. W. Stringham, Y. K. Ye, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1101**, 86.
- [19] N. Matthijs, M. Maftouh, Y. V. Heyden, *J. chromatogr. A*, 2006, **1111**, 50.
- [20] K. S. S. Dossou, P. Chiap, B. Chankvetadze, A-C. Servais, M. Fillet, J. Crommen, *J. chromatogr. A*, 2009, **1216**, 7453.
- [21] S. Fanali, G. D'Orazio, K. Lomsadze, B. Chankvetadze, *J. chromatogr. B*, 2008, **875**, 300.
- [22] R. B. Kasat, S. Y. Wee, J. X. Loh, N-H L. Wang, E. I. Franses, *J. chromatogr. B*, 2008, **875**, 83.
- [23] T. Wang, R. M. Wenslow, Jr, *J. chromatogr. A*, 2003, **1015**, 100.
- [24] I. Ilisz, Z. Pataj, R. Berkecz, I. Szatmari, F. Fülöp, A. Péter, *J. chromatogr. A*, 2010, **1217**, 2983.

Chapitre III: la séparation chirale en mode normal sur la colonne à base d'amylose

- [1] A. Ghanem, H. Hoenen, H. Y. Aboul-Enein, *Talanta*, 2006, **68**, 602.
- [2] X-M. Chen, Ch. Yamamoto, Y. Okamoto, *J. chromatogr. A*, 2006, **1104**, 62.
- [3] T. Wang, Y. W. Chen, A. Vailaya, *J. chromatogr. A*, 2000, **902**, 348.
- [4] J. hen, T. Ikai, Y. Okamoto, *J. chromatogr. A*, 2010, **1217**, 1041.
- [5] H. Y. Aboul-Enein, I. Ali, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2001, **48**, 186.
- [6] L. Zhou, C. Welch, C. Lee, X. Gong, V. Antonucci, Z. Ge, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009, **49**, 964.
- [7] K. S. S. Dossou, P. Chiap, B. Chankvetadze, A - C. Servais, M. Fillet, J. Crommen, *J. chromatogr. A*, 2009, **1216**, 7451.
- [8] C. B. Castells, P. W. Carr, *J. chromatogr. A*, 2000, **904**, 23.
- [9] L-M. Yuan, *Separation and Purification Technology*, 2008, **63**, 704.
- [10] R. B. Kasat, N- H. L. Wang, E. I. Franses, *J. chromatogr. A*, 2008, **1190**, 113.
- [11] M. L. Calabro, D. Raneri, S. Tommasini, R. Ficarra, S. Alcaro, A. Gallelli, N. Micale, M. Zappala, P. Ficarra, *J. chromatogr. B*, 2006, **838**, 58.

- [12] J. Yang, J. Guan, L. Pan, K. Jiang, M. Cheng, F. Li, *anal. Chim. Acta*, 2008, **610**, 265.
- [13] R. W. Stringham, Y. K. Ye, *J. chromatogr. A*, 2006, **1101**, 86.
- [14] Z. Wang, J. Ouyang, W. R.G. Baeyens, *J. chromatogr. B*, 2008, **862**, 5.
- [15] T. Wang, R. M. Wenslow, Jr, *J. chromatogr. A*, 2003, **1015**, 102.
- [16] F. Zhan, G. Yu, Bixia Yao, X. Guo, T. Liang, M. Yu, Q. Zeng, W. Weng, *J. chromatogr. A*, 2010, **1217**, 4281.
- [17] Y. Ming, L. Zhao, H. Zhang, Y. Shi, Y. Li, *Chromatographia*, 2006, **64**, 275.
- [18] M. Lämmerhofer, R. Pell, M. Mahut, M. Richter, S. Schiesel, H. Zettl, M. Dittrich, M. Schubert-Zsilavec, W. Lindner, *J. chromatogr. A*, 2010, **1217**, 1039.
- [19] M. Khan, B. Viswanathan, D. S. Rao, R. Reddy, *J. chromatogr. B*, 2007, **846**, 120.
- [20] E. Stern, L. Goossens, C. Vaccher, J.-P. Bonte, P. Depreux, J.-P. Henichart, J.-F. Goossens, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008, **46**, 850.
- [21] K. Si-Ahmed, F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, 514.
- [22] F. Tazerouti, Synthèse, caractérisation et application des phases stationnaires chirales en chromatographie liquide, thèse de Doctorat, 2001, ALGER, U.S.T.H.B.
- [23] J. Bojarski, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2002, **54**, 198.
- [24] A. A. El-Emam, F. F. Belal, M. A. Moustafa, S. M. El-Ashry, D. T. El-Sherbiny, S. H. Hansen, *Il Farmaco*, 2003, **58**, 1178.
- [25] T. Wang, Y. W. Chen, *J. chromatogr. A*, 1999, **855**, 420.

Chapitre IV : la séparation chirale en mode organique polaire sur la colonne à base d'amylose

- [1] J. Y. Jin, W. Lee, *Bull. Korean. Chem. Soc.*, 2008, **29**, 491.
- [2] K. R. A. Belaz, Q. B. Cass, R. V. Oliveira, *Talanta*, 2008, **76**, 149.
- [3] J. Zheng, W. Bragg, J. Hou, N. Lin, S. Chandrasekaran, S. A. Shamsi, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 858.
- [4] H. Ates, D. Mangelings, Y. V. Heyden, *J. Chromatogr. B*, 2008, **875**, 58.
- [5] N. Matthijs, M. Maftouh, Y. V. Heyden, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1111**, 49.
- [6] K. S. S. Dossou, P. Chiap, B. Chankvetadze, A-C. Servais, M. Fillet, J. Crommen, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 7451.
- [7] M. M. Hefnawy, M. A. Sultan, M. M. Al-Shehri, *J. Chromatogr. B*, 2007, **856**, 329.
- [8] B. Kafkova, Z. Bosakova, E. Tesarova, P. Coufal, *J. Chromatogr. A*, 2005, **1088**, 87.
- [9] T. Zhang, D. Nguyen, P. Franco, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 1049.
- [10] C. V. Hoffmann, M. Laemmerhofer, W. Lindner, *J. Chromatogr. A*, 2007, **1161**, 248.

- [11] Z-D. Zhai, Y-P. Shi, T. Wang, A. Chim. Acta, 2005, **550**, 125.
- [12] H. Ates, D. Mangelings, Y. V. Heyden, J. Pharm. Biomed. Anal, 2008, **48**, 290.
- [13] L. Li, S. Zhou, L. Jin, Ch. Zhang, W. Liu, J. Chromatogr. B, 2010, **878**, 1271.
- [14] R. Nageswara Rao, D. Nagaraju, A. Narasaraju, J. Pharm. Biomed. Anal, 2006, **40**, 340.
- [15] R. Cirilli, A. Simonelli, R. Ferretti, A. Bolasco, P. Chimenti, D. Secci, E. Maccioni, F. La Torre, J. Chromatogr. A, 2006, **1101**, 202.
- [16] A. Bielejewska, K. Duszczyk, K. Kulig, B. Malawska, M. Miśkiewicz, A. Leś, J. Zukowski, J. Chromatogr. A, 2007, **1173**, 54.
- [17] R. Cirilli, S. Alcaro, R. Fioravanti, D. Secci, S. Fiore, F. L. Torre, F. Ortuso, J. Chromatogr. A, 2009, **1216**, 4675.
- [18] I. Ilisz, Z. Pataj, R. Berkecz, I. Szatmári, F. Fülöp, A. Péter, J. Chromatogr. A, 2010, **1217**, 2983.
- [19] R. N. Rao, A. N. Raju, D. Nagaraju, J. Pharm. Biomed. Anal, 2006, **42**, 350.
- [20] L. Thunberg, J. Hashemi, S. Andersson, J. Chromatogr. B, 2008, **875**, 76.
- [21] S. Fanali, G. D'Orazio, K. Lomsadze, B. Chankvetadze, J. Chromatogr. B, 2008, **875**, 299.
- [22] P. Sun, D. W. Armstrong, J. Chromatogr. A, 2010, **4904**, 4916.