

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE
HOUARI BOUMEDIENNE



MEMOIRE Présenté
Pour l'obtention du diplôme de :

MAGISTER

En : CHIMIE
Spécialité : Chimie Organique Appliquée

Par : **M^{lle} Kahina SI AHMED**

Sujet :

**SEPARATION DE PRODUITS OPTIQUEMENT ACTIFS
SUR PHASES STATIONNAIRES CHIRALES EN
CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE**

Soutenu publiquement le 08 Mars 2004, devant le jury composé de :

M. M. HAMDI	Professeur (U.S.T.H.B.)	Président
M^{lle} F. TAZEROUTI	Maître de conférences (U.S.T.H.B.)	Directeur de Thèse
M^{me} B. DJERDJOURI	Professeur (U.S.T.H.B.)	Examineur
M^{me} S. GUERMOUCHE	Professeur (U.S.T.H.B.)	Examineur
M. B. Y. MEKLATI	Professeur (U.S.T.H.B.)	Examineur

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé 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 M. A. BAALIOUAMER, Professeur de chimie à l'U.S.T.H.B. Qu'il me soit permis de lui exprimer mes remerciements pour m'avoir accueillie dans son laboratoire sans oublier son aide précieuse et ses encouragements.

Je tiens tout particulièrement à remercier M. B. Y. MEKLATI, Professeur et Directeur du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyse Physico-chimiques (CRAPC) pour son aide matérielle, ses encouragements et également d'avoir accepté de juger ce travail.

Je ne saurais trouver les mots qui exprimeront toute ma gratitude à M^{lle} F. TAZEROUTI, Maître de Conférences à l'U.S.T.H.B. pour m'avoir dirigée tout au long de ce travail, pour l'aide précieuse, les conseils éclairés et les encouragements qu'elle n'a cessé de me prodiguer, pour avoir cru en moi et pour m'avoir toujours encouragée à aller de l'avant, qu'elle trouve ici l'expression de ma plus profonde reconnaissance.

Je suis également très heureuse de témoigner ma gratitude à M. A. Y. BAJAH-HADJ-AHMED, Professeur à l'U.S.T.H.B. Je tiens à le remercier très chaleureusement pour avoir cru en moi, pour son aide précieuse, ses conseils éclairés et ses encouragements qu'il m'a sans cesse prodigués. Sans lui, ce travail n'aurait pas abouti.

Je tiens à remercier vivement M. le Professeur M. HAMDI d'avoir bien voulu accepter de présider le jury de cette thèse.

J'exprime mes profonds remerciements à M^{me} le Professeur B. DJERDJOURI (Faculté des sciences Biologiques de l'U.S.T.H.B.) pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de participer à ce jury.

Je suis très heureuse de témoigner ma gratitude à M^{me} le Professeur S. GUERMOUCHE du laboratoire de Chromatographie (U.S.T.H.B.). Je tiens à la remercier vivement pour nous avoir permis d'effectuer des analyses sur le chromatographe liquide avec détecteur à barrettes de diodes, et d'avoir bien voulu juger ce travail.

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 trouvée parmi eux.

Je dédie enfin ce travail à mes très chers parents, à mes deux sœurs, à toute ma famille qui m'a soutenue et encouragée ainsi qu'à tous mes amis.

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	1
Chapitre I : GENERALITES	3
I- Qu'est-ce que la chiralité?	3
II- Historique	4
III- Impact biologique et économique	4
IV- Les techniques de séparations chirales	8
IV-1 Les techniques classiques.....	8
IV-1-1 La résolution spontanée.....	9
IV-1-2 La résolution enzymatique.....	9
IV-1-3 La formation de diastéréoisomères.....	9
IV-2 Les techniques chromatographiques et électrophorétiques.....	9
IV-2-1 La chromatographie sur couche mince (CCM).....	10
IV-2-2 La chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	10
IV-2-3 La chromatographie liquide à haute performance (CLHP).....	11
IV-2-4 L'électrophorèse capillaire (EC).....	14
IV-3 Autres techniques.....	14
V- Les phases stationnaires chirales (PSCs)	15
➤ Les PSCs type Pirkle.....	16
➤ Les PSCs à base de cellulose et d'amylose.....	17
➤ Les PSCs à base de cyclodextrines.....	19
➤ Les PSCs à base d'antibiotiques.....	22
➤ Les PSCs à base de protéines.....	24
Chapitre II : LA SEPARATION CHIRALE EN MODE NORMAL	26
I- Introduction	26
II- Résultats et discussion	28
II-1 Test de la phase stationnaire à base de β -cyclodextrine non dérivée (colonne A).....	31
II-2 Test de la phase stationnaire à base d'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (colonne B).....	32

	Pages
II-3 Test de la phase stationnaire à base de phényl-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (colonne C).....	38
II-3-a Effet de la composition de la phase mobile sur la rétention.....	44
II-3-b Effet de la structure du soluté sur la résolution chirale.....	48
II-3-c Effet de la nature de l'alcool sur la résolution chirale.....	49
II-3-d Effet de l'ajout de modifiants anioniques et cationiques.....	51
II-3-e Effet du débit sur la résolution chirale.....	51
III- Conclusion	54
 Chapitre III: LA SEPARATION CHIRALE EN MODE ORGANIQUE POLAIRE	 55
I- Introduction	55
II- Résultats et discussion	58
II-1 Test de la phase stationnaire à base de β -cyclodextrine non dérivée (colonne A)..	60
II-2 Test de la phase stationnaire à base d'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (colonne B).....	62
II-3 Test de la phase stationnaire à base de phényl-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (colonne C).....	65
III- Conclusion	70
 Chapitre IV : LA SEPARATION CHIRALE EN MODE INVERSE	 71
I- Introduction	71
II- Résultats et discussion	72
II-1 Test de la phase stationnaire à base de β -cyclodextrine non dérivée (colonne A)..	74
II-1-a Effet de la composition de la phase mobile sur la rétention.....	78
II-1-b Effet du pH sur la résolution énantiomérique.....	80
II-2 Test de la phase stationnaire à base d'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (colonne B).....	81
II-2-a Effet de la composition de la phase mobile sur la résolution chirale.....	88
II-2-b Effet de la structure du soluté sur la résolution chirale.....	89
II-2-c Effet de la nature du modifiant organique sur la séparation chirale.....	91
II-2-d Effet du remplacement du tampon par l'eau sur la résolution chirale.....	101
II-2-e L'influence du débit sur la sélectivité et la résolution.....	104
II-3 Test de la phase stationnaire à base de phényl-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (colonne C).....	107
II-3-a Effet de la composition de la phase mobile sur la séparation chirale.....	112
II-3-b Effet du modifiant organique sur la résolution chirale.....	113
II-3-c Influence de la structure du soluté sur la résolution chirale.....	116
II-3-d Influence du débit sur la séparation chirale.....	116

	Pages
III- Conclusion.....	118
CONCLUSION GENERALE.....	119
ANNEXE A : Structure des produits testés.....	121
ANNEXE B : Références bibliographiques.....	125
ANNEXE C : Conditions d'analyse.....	132

Liste des abréviations

α	Facteur de sélectivité
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
ASTEC	Advanced Separation Technologies Inc.
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CD	Cyclodextrine
CGTase	Cyclodextrine-glycosyltransférase
CH₃CN	Acétonitrile
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
DEA	Diéthylamine
EC	Electrophorèse capillaire
EtOH	Ethanol
FDA	Food and Drug Administration
Fig.	Figure
HOAc	Acide Acétique
k'	Facteur de rétention
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
MeOH	Méthanol
MOP	Mode Organique Polaire
PCB	Polychlorobiphényle
2-PrOH	2-propanol
PSC	Phase Stationnaire Chirale
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
Rs	Facteur de résolution
SFC	Chromatographie à fluide supercritique
TEA	Triéthylamine
TFA	Acide trifluoroacétique
tr	Temps de rétention
UV	Ultra-Violet
VIH	Virus d'Immunodéficience Humaine

INTRODUCTION

La chiralité a été introduite pour la première fois par Louis Pasteur en 1848.¹ Elle se reflète dans l'aptitude des organismes vivants à reconnaître une entité moléculaire grâce à sa structure tridimensionnelle.

La chiralité et la vie sont étroitement liées. Effectivement, des molécules essentielles à la vie tels que les protéines, les acides nucléiques (ADN et ARN) et les polysaccharides sont optiquement actives.

Des exemples de chiralité sont aussi observés à l'échelle macrocosmique avec les galaxies spirales qui se distinguent les unes des autres grâce à leur sens de récession.²

Les organismes vivants démontrent souvent des réactions physiologiques différentes vis-à-vis des deux énantiomères, en particulier vis-à-vis des produits pharmaceutiques chiraux. Ainsi, des recherches poussées et des études approfondies des comportements pharmacocinétiques, pharmacodynamiques, physiologiques, toxicologiques et métaboliques des deux énantiomères sont devenues une nécessité dans l'industrie pharmaceutique.³

Depuis le début des années 90, La FDA (Food and Drug Administration) a encouragé les compagnies pharmaceutiques à développer des médicaments énantiopurs. Bien que la majorité des médicaments commercialisés sur le marché soit racémique, nous pouvons constater une véritable prise de conscience de la part des firmes pharmaceutiques, de manière à ce que le développement de nouveaux médicaments soit devenu inconcevable sans faire référence à la chiralité. Ainsi, le développement de nouvelles techniques de séparations chirales est devenu une véritable nécessité. La résolution énantiomérique par chromatographie liquide à haute performance a considérablement évolué ces deux dernières décennies, cette technique est considérée comme l'une des méthodes les plus performantes que ce soit à l'échelle analytique ou à l'échelle préparative. L'apparition de nouvelles phases stationnaires chirales efficaces est la principale raison de l'intérêt suscité par la chromatographie liquide.⁴

[1] L. Pasteur, *Ann. Chim. Phys.*, 1848, **24**, 442

[2] D. K. Kondepudi, D. J. Durand, *Chirality*, 2001, **13**, 351

[3] T. Kubota, C. Yamamoto, Y. Okamoto, *Chirality*, 2002, **14**, 372

[4] K. Muhlbachler, K. Kaczmarek, A. Seidel-Morgenstern, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, 2002, **955**, 35

Parmi ces phases stationnaires nous pouvons distinguer celles à base de β -cyclodextrines considérées comme l'une des phases stationnaires les plus utilisées et les plus performantes en chromatographie liquide.⁵

Dans le cadre de notre travail, nous nous sommes fixés comme objectif le test de trois phases stationnaires chirales à base de β -cyclodextrine synthétisées au sein de notre laboratoire, 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 ces trois colonnes pour la séparation chirale de produits optiquement actifs en mode de phase normal. Nous avons également tenté d'optimiser les séparations chirales en jouant sur différents facteurs pouvant influencer l'énantiosélectivité de chaque phase stationnaire.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons tenté de tester ces mêmes colonnes en mode organique polaire, ce mode constitué d'un mélange (acétonitrile/méthanol/acide/base) a été introduit par D. W. Armstrong.⁶

La dernière partie de ce travail a été consacrée à la résolution chirale en mode de phase inverse. Nous avons ainsi étudié différents paramètres qui pourraient nous permettre d'optimiser la séparation chirale tels que l'effet du solvant, du débit, tampon...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.

[5] T. J. Ward, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 2863

[6] D. W. Armstrong, *Direct Enantiomeric Separations in Liquid Chromatography and Gas Chromatography*, edited by H. J. Issaq, *Century of Separation Science*, Marcel Dekker, New York, 2002, Chapitre 33

Chapitre I

GENERALITES

I- Qu'est-ce que la chiralité ?

La chiralité est un mot dérivé du grec « *kheir* », qui veut dire main. C'est la spécificité de deux molécules organiques, identiques en tout point, mais dont les images ne sont pas superposables.¹ L'exemple le plus simple pour illustrer cette propriété est nos deux mains, tel que cela est présenté sur la figure 1 :

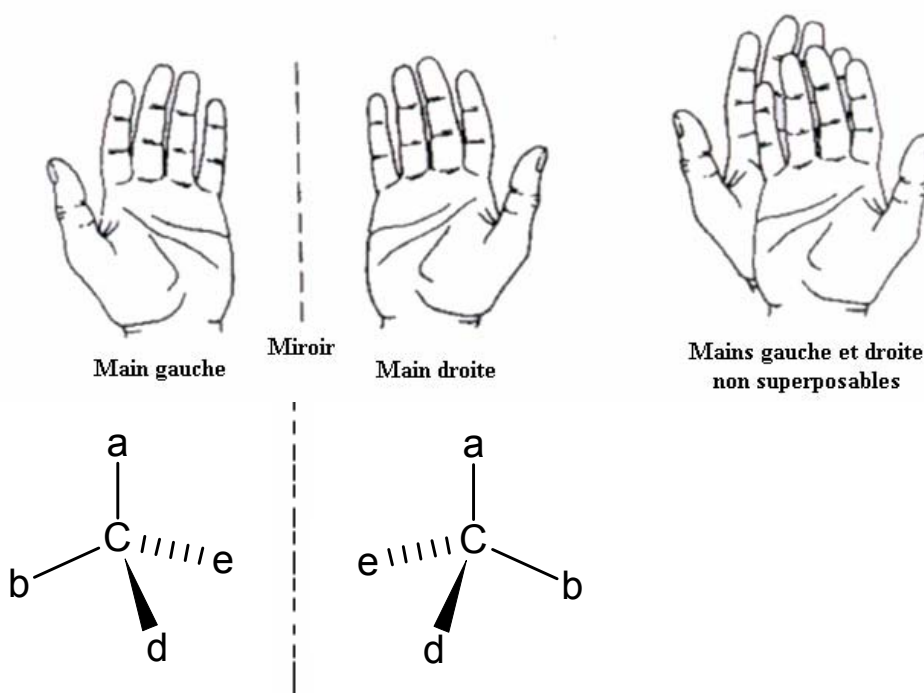


Figure 1 : Exemples d'objets chiraux

Les molécules dites chirales peuvent exister sous forme de deux entités différentes appelées : énantiomères, isomères optiques ou antipodes. Ce dernier terme n'a plus sa place dans notre langage de chimistes d'après Kurt Mislow qui publia tous récemment un article traitant de la terminologie en stéréochimie.²

Les énantiomères ont les mêmes propriétés physico-chimiques, sauf vis-à-vis du sens de rotation du plan de la lumière polarisée.³

[1] U. Selditz, *Separability of Racemates in Chiral Chromatography. Attempts to explain Chiral Recognition through Structure-Retention Relationships*, Thèse de Doctorat, 1998, Groningen Utrecht Institute for Drug Exploration, Netherlands.

[2] K. Mislow, *Chirality*, 2002, **14**, 126

[3] Reference citée dans: T. E. Beesley, R. P. Scott, *Chiral Chromatography*. New York: John Wiley & Sons; 1998. 506 p

Si le plan de la lumière est dévié dans le sens gauche, on dit que la molécule est lévogyre « l », par contre si la rotation se fait dans l'autre sens, la molécule est alors dite dextrogyre « d ».⁴

Les deux formes énantiomériques se comportent de manière similaire dans un environnement achiral mais dès qu'elles se trouvent dans un milieu chiral, tels que les liquides physiologiques, elles se comportent de manière totalement différente voire antagoniste,^{5,6} d'où l'importance de la séparation chirale.

II- Historique:

Le concept de chiralité a été introduit pour la première fois en 1815 par Jean Baptiste Biot lorsqu'il observa la rotation du plan de la lumière polarisée par les molécules du α -quartz.³

Toutefois, la première séparation chirale s'est faite en 1848, par Louis Pasteur, considéré comme le pionnier et le précurseur de cette science, lorsqu'il réussit à séparer les cristaux des deux formes énantiomériques L et D du tartrate d'ammonium,⁷ et cela uniquement à l'aide d'une pince manuelle. Comme conclusion à ses travaux, Louis Pasteur écrit : « La plupart des produits organiques naturels, des produits essentiels à la vie, sont asymétriques et possèdent une asymétrie telle que leurs images ne soient pas superposables ».¹

A cette découverte s'ajoutent, en 1874, celles de Vant' Hoff et Le Bel, qui expliquèrent le phénomène de la rotation optique, par l'existence d'un atome de carbone asymétrique.^{4,5}

Ceci permit à Fischer, plus tard, d'établir pour la première fois la stéréochimie des isomères optiques, ainsi que la configuration du (+) glucose, ce qui lui valut d'ailleurs l'obtention du prix Nobel de chimie en 1902. L'hypothèse de Fischer a pu être confirmée grâce aux travaux de Bijvoet, qui utilisa pour cela la cristallographie par les rayons X.³

III- Impact biologique et économique :

Jusqu'au début des années soixante, le point de vue général s'accordait sur le fait, qu'un seul énantiomère est biologiquement actif, et que l'autre forme énantiomérique, n'est qu'un diluant pour la forme active, d'où l'administration des médicaments chiraux sous forme d'un mélange racémique.⁷

[4] S. Amllennmark, *Chromatographic Enantioseparation, methods and application, second edition*, Ellis Horwood Series in analytical chemistry; 1991. 282 p

[5] F. Tazerouti, *Synthèse, caractérisation et application des phases stationnaires chirales en chromatographie liquide*, Thèse de Doctorat, 2001, ALGER, U.S.T.H.B.

[6] G. Götmär, N. Robinat Albareda, T. Fornstedt, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 2950

[7] D. R. Bobbitt, S. W. Linder, *Trends Anal. Chem.*, 2001, **20(3)**, 111

Cette hypothèse assez simpliste, s'avéra être tragiquement erronée, lorsque la thalidomide, prescrite pour atténuer les nausées matinales chez la femme enceinte, a causé des malformations congénitales dans les années soixante. Dans ce cas précis, l'énantiomère non thérapeutique s'est révélé être un tératogène puissant.⁸

Dés lors, les différences des réactivités biologiques des deux isomères optiques ont été mises en lumière, et depuis, la nécessité de mener des études pharmacologiques sur les isomères optiques séparément, ainsi que la production de molécules actives énantiopures sont devenues un des grands défis modernes pour les chimistes,⁷ sachant que plus de 60% des médicaments produits ou en cours de développement sont optiquement actifs.⁹

C'est pour cette raison qu'Ariens émit, en 1983, le concept qui fût adopté par tous, stipulant qu'« un composé pharmaceutique chiral doit être considéré comme une combinaison de deux médicaments différents ».¹⁰

En 1992, la FDA (Food and Drug Administration) américaine a publié un document guide suggérant que le développement de nouveaux médicaments chiraux, doit être impérativement complété par la caractérisation et la détermination des propriétés pharmacodynamiques, pharmacocinétiques et toxicologiques de chaque énantiomère.¹¹⁻¹⁴

L'intérêt économique suscité par la chiralité, est tel qu'en l'an 2000, la part du marché mondial de la chimie fine chirale a été estimée à 6.63 milliards de dollars et atteindra les 16 milliards de dollars en 2007 (Fig.2).¹⁰ L'industrie pharmaceutique est considérée comme la principale source et le moteur de cette croissance.¹⁵

Ces chiffres sont beaucoup plus impressionnants lorsqu'on parle en terme de production de produits pharmaceutiques énantiopurs. En 2000, elle a été estimée à 123 milliards de dollars (Fig.3).¹⁴

- [8] Y. Kubo, N. Hirota, S. Maeda, S. Tokita, *Anal. Sci.*, 1998, **14**, 183
- [9] T. E. Beestley, J. T. Lee, *Recent Developments in LC Column Technology*, June 2003
- [10] B. Chankvetadze, *J. Sep. Sci.*, 2001, **24**, 691
- [11] K. Muhlbachler, K. Kaczmarek, A. Seidel-Morgenstern, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, 2002, **955**, 35
- [12] H. Y. Aboul-Enein, I. Ali, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2001, **370**, 951
- [13] H. Y. Aboul-Enein, I. Ali, *J. Sep. Sci.*, 2001, **24**, 831
- [14] N. M. Mair, P. Franco, W. Lindner, *J. Chromatogr. A*, 2001, **906**, 3
- [15] M. Xu, E. Brahmachary, M. Janco, F. H. Ling, *J. Chromatogr. A*, 2001, **928**, 25

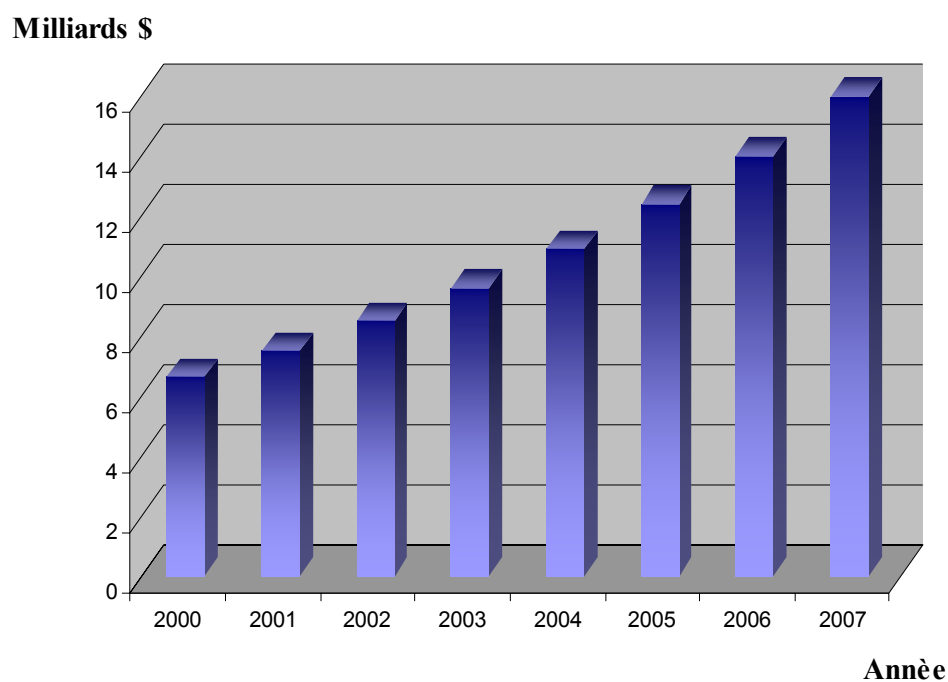


Figure 2: Evolution du marché mondial de la chimie fine chirale

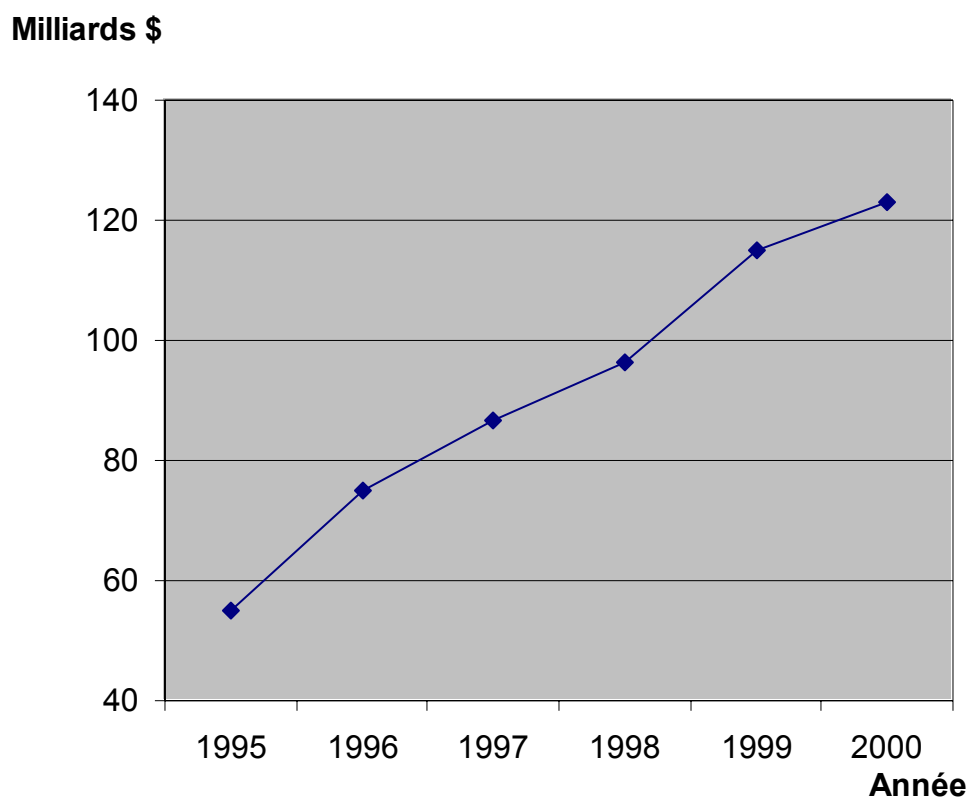


Figure 3 : Evolution du marché mondial de la vente des médicaments énantiopures

Par ailleurs, parmi les 500 meilleures ventes de médicaments, plus de 50% sont à base d'un seul énantiomère (Fig.4),^{14,16} parmi cette frange, les antibiotiques et les cardiovasculaires occupent la première place (Fig.5).¹⁷

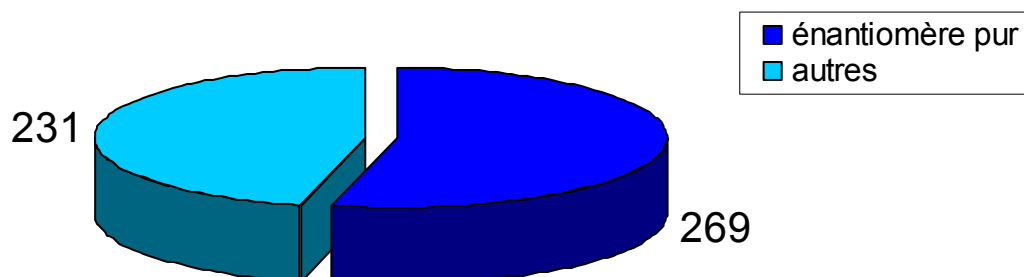


Figure 4 : Proportion des médicaments énantiopurs parmi les 500 meilleures ventes

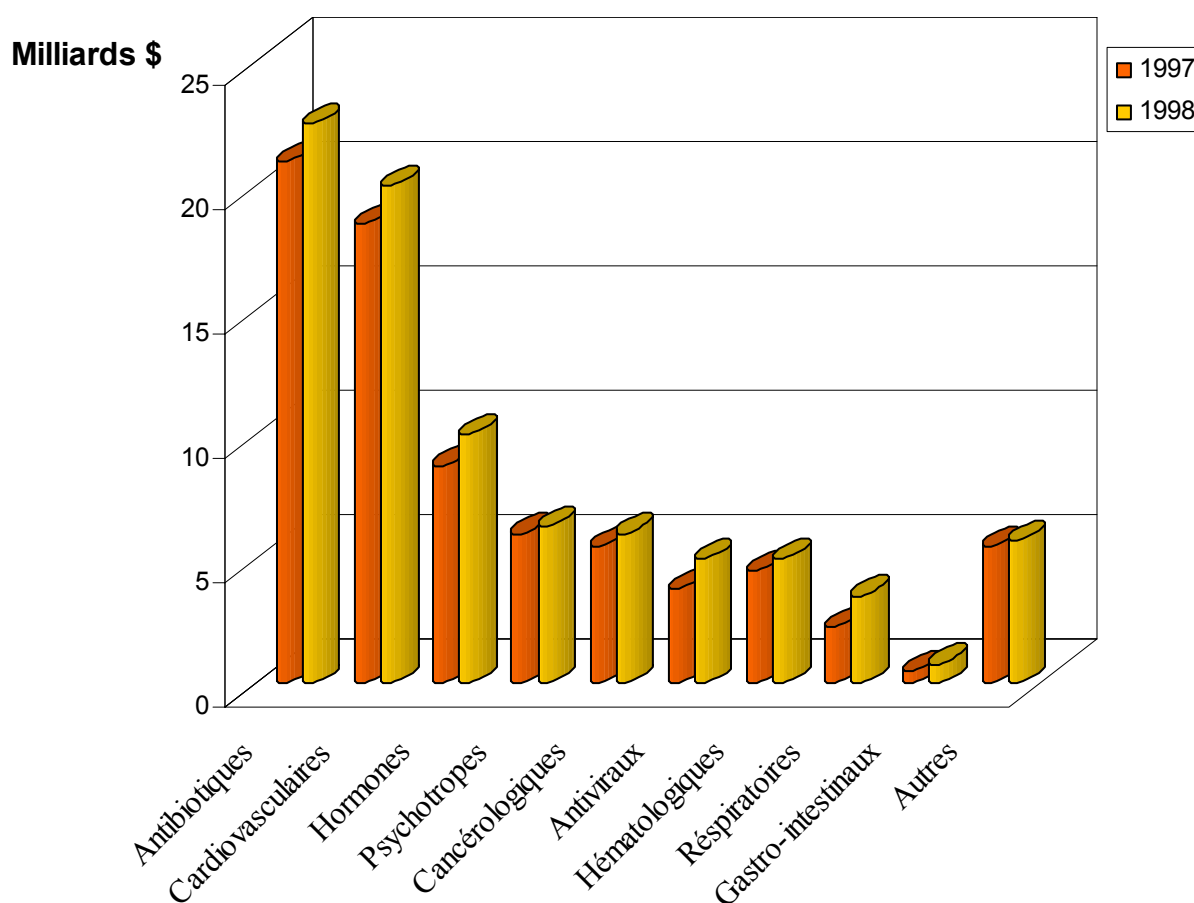


Figure 5 : Les produits pharmaceutiques les plus vendus entre 1997 et 1998.

[16] M. Wedig, S. Laug, T. Christians, M. Thunhorst, U. Holzgrabe, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, **27**, 531

[17] H. J. Federsel, *Chirality*, 2003, **15**, S128

En plus des produits pharmaceutiques, d'autres domaines sont concernés par la séparation chirale ; nous pouvons citer à titre d'exemple :

- ✚ L'agroalimentaire tels que les arômes et les fragrances.^{18,19}
- ✚ L'environnement avec la séparation des herbicides et les pesticides dont les polychlorobiphényles (PCBs)²⁰ ainsi que les organophosphorés.²¹
- ✚ La médecine légale, dans le but de contrôler la production illicite de quelques substances narcotiques.²²
- ✚ Les huiles essentielles, afin de déterminer leurs propriétés régionales ainsi que leurs origines, car la nature nous offre des produits énantiomériques, donc la présence d'un mélange racémique signifie généralement que le produit est soit altéré soit il est d'origine synthétique.²³
- ✚ Datation des fossiles et détermination du taux d'acide aminé dans le sol.²⁴
- ✚ Analyse d'échantillons extraterrestres (fragments de comètes ou du sol martien) dont le but est de déterminer l'origine de la vie.²⁵
- ✚ Etude et caractérisation des phéromones influençant le comportement des insectes.^{26,27}

IV- Les techniques de séparations chirales :

Depuis Louis Pasteur jusqu'à nos jours, le progrès qu'a connu la séparation chirale est plus qu'impressionnant.⁴ Le nombre de techniques de séparation est si important que nous n'allons en citer que les plus importantes et les plus communes, et cela en essayant de respecter autant que possible l'ordre chronologique de leur apparition :

IV-1- Les techniques classiques :

Au tout début de la découverte de l'énantioséparation, il y a eu trois méthodes principales introduites par Louis Pasteur:

- [18] E. Brenna, C. Fuganti, S. Serra, *Tetrahedron : Asymmetry*, 2003, **14**, 1
- [19] H. Y. Aboul-Enein, M. D. Efstatiade, G. E. Baiulescu, *Electrophoresis*, 1999, **20**, 2686
- [20] A. Jaus, M. Oehme, *J. Chromatogr. A*, 2001, **905**, 59
- [21] J. J. Ellington, J. J. Evans, K. B. Prickett, W. L. Champion Jr, *J. Chromatogr. A*, 2001, **928**, 145
- [22] Y. Makino, Y. Urano, T. Nagano, *J. Chromatogr. A*, 2002, **947**, 151
- [23] S.C. Ng, T. T. Ong, P. Fu, C. B. Ching, *J. Chromatogr. A*, 2002, **968**, 31
- [24] B. Glaser, W. Amelung, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2002, **16**, 891
- [25] C. Rodier, C. Laurent, C. Szopa, R. Sternberg, F. Raulin, *Chirality*, 2002, **14**, 527
- [26] P. Y. Hayes, M. T. Fletcher, S. Chow, M. J. McGrath, *Chirality*, 2003, **15**, S116
- [27] A. Khirman, A. Kh. Margaryan, W. F. Schmidt, *Tetrahedron*, 2003, **59**, 5475

IV-1-1 La résolution spontanée :

Cette technique consiste à séparer manuellement et avec une simple pince, les cristaux énantiomorphes des deux énantiomères. Cependant, malgré sa simplicité, cette méthode est fastidieuse et n'est applicable que pour les sels dont les cristaux des deux énantiomères cristallisent dans deux systèmes différents.²⁸

IV-1-2 La résolution enzymatique :

C'est une technique qui est toujours d'actualité du moment que c'est l'une des très rares méthodes offrant des taux de pureté avoisinant les 100%. Ceci est dû à la sélectivité et à la stéréospécificité de l'enzyme qui agit sur un seul énantiomère, même si ce dernier est présent en quantité minime dans un mélange énantiomérique. De plus c'est une technique écologique. Cependant à l'échelle préparative, on a besoin de quantités importantes, et vu le coût élevé de la matière première, autrement dit : les enzymes, les chercheurs ont dû faire appel à d'autres techniques de séparation moins coûteuses.²⁸

IV-1-3 La formation de diastéréoisomères :

Par l'action d'un agent dérivant chirale sur les deux énantiomères, on obtient des diastéréoisomères, qui peuvent être facilement séparés par les méthodes conventionnelles, telles que la cristallisation fractionnée, la distillation...etc.

Néanmoins cette méthode nécessite des réactifs très purs et des conditions opératoires douces, pour avoir un bon rendement.²⁸

Pendant près d'un siècle, ces trois méthodes étaient les seules à être utilisées dans le domaine de la séparation chirale, jusqu'à l'arrivée de la chromatographie qui a littéralement révolutionné la résolution chirale.

IV-2 Les techniques chromatographiques et électrophorétiques:

De nos jours, les techniques chromatographiques et électrophorétiques, sont considérées comme étant des méthodes efficaces.¹⁴ Leur simplicité et leur efficacité leur ont octroyé un succès grandissant dans le domaine de la séparation chirale. Parmi ces techniques, nous citerons:

[28] B. Feibush, N. Grinberg, in: M. Zief, L. J. Crane (Eds.), *Chromatographic Chiral Separations*, *Chromatographic Science Series*, Vol.40, Marcel Dekker, New York, 1988, p. 1, Chapitre 1

IV-2-1 La chromatographie sur couche mince (CCM) :

C'est l'une des plus anciennes techniques chromatographiques. Le sélecteur chiral peut être utilisé aussi bien dans la phase mobile (exemple : α -cyclodextrine),²⁹ que dans la phase stationnaire (exemple : β -cyclodextrine, cellulose, vancomycine...).³⁰

Cette technique a permis la séparation de nombreux composés chiraux tels que les binaphtols et les acides aminés.³¹

IV-2-2 La chromatographie en phase gazeuse (CPG) :

Durant les années soixante, la CPG était la seule méthode qui donnait des résultats satisfaisants. La première phase stationnaire chirale fût élaborée en 1966, elle était à base d'acides aminés acylés et d'ester de dipeptide.^{3,32}

Durant la période 2000-2002, le nombre de publications impliquant la CPG, a augmenté de huit fois, cela est dû à l'apparition de nouvelles phases stationnaires chirales dont celles à base d'acides aminés, mais surtout celles à base de cyclodextrines, qui reste la phase stationnaire chirale la plus utilisée en CPG.³⁰

La CPG n'est pas seulement une technique analytique, elle est aussi préparative, d'où l'intérêt qu'elle ne cesse de susciter jusqu'à ce jour. En effet, c'est une technique qui combine : efficacité, sensibilité et reproductibilité.³³ Elle sépare très bien les méthamphétamines, amphétamine et déprényle,³³ les anesthésiants par inhalation (volatiles) tel que l'isoflurane,³⁴ ainsi que les pesticides et les herbicides.^{20,35}

Quant aux produits polaires qui possèdent une volatilité modérée, il leur faut des températures élevées ce qui diminue la sélectivité chirale de la phase stationnaire.³⁶

[29] E. Schneiderman, A. M. Stalcup, *J. Chromatogr. B*, 2000, **745**, 99

[30] T. J. Ward, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 2863

[31] Q. Debg, S. Kang, Q. Zhu, Z. Xu, *American Laboratory*, 1999, July, 43

[32] D. W. Armstrong, *Direct Enantiomeric Separations in Liquid Chromatography and Gas Chromatography*, edited by H. J. Issaq, *Century of Separation Science*, Marcel Dekker, New York, 2002, Chapitre 33

[33] D. W. Armstrong, K. L. Rundlett, U. B. Nair, *Current Separations*, 1996, **15(2)**, 57

[34] R. Schmidt, H. G. Wahl, H. Häberle, H.-J. Dieterich, V. Schurig, *Chirality*, 1999, **11**, 206

[35] F. Sánchez-Rasero, M. B. Matallo, G. Dios, E. Romero, A. Peña, *J. Chromatogr. A*, 1998, **799**, 355

[36] Z. Juvancz, *Trends Anal. Chem.*, 2002, **21(5)**, 379

IV-2-3 La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) :

Ce n'est que depuis les années soixante-dix, que la résolution chirale en chromatographie liquide est devenue aussi envisageable et prometteuse qu'en chromatographie gazeuse.³² Cette méthode nous offre un choix de phases stationnaires chirales innombrables, la possibilité d'utiliser une phase mobile chirale...etc., autant de paramètres possibles afin d'optimiser la séparation en CLHP, ce qui explique son succès dans le domaine de l'énantioséparation.^{37,38} La séparation chirale en chromatographie liquide, se divise en deux grandes méthodes: La méthode indirecte et la méthode directe.³⁹

La méthode indirecte nécessite au préalable, la dérivation des énantiomères avec un agent chirale. La séparation des deux diastéréoisomères ainsi formés se fera sur une colonne achirale classique.⁴⁰ Cette méthode requiert, néanmoins, la pureté de l'agent chirale.⁴¹ De nombreux composés optiquement actifs ont pu être séparés via cette méthode notamment les produits pharmaceutiques tel que le pirlindole⁴².

Quant à la méthode directe, la caractérisation chirale est obtenue soit : par l'action d'une phase mobile chirale contenant un sélecteur chirale, en utilisant une phase stationnaire achirale, soit grâce à une phase stationnaire chirale,⁴³ et dans ce cas là trois modes de phases mobiles peuvent être utilisés :

- 1- Mode normal : phase mobile constituée majoritairement d'un solvant apolaire tel que l'hexane ou l'heptane mélangé à un alcool tel que l'isopropanol.
- 2- Mode inverse : dans ce cas la phase mobile est à base d'une solution aqueuse mélangée à un solvant organique.
- 3- Mode organique polaire : récemment introduit par D. W. Armstrong, où l'on utilise comme phase mobile des solvants organiques polaires.³²

[37] H. Wang, J. L. Gu, H. F. Hu, R. J. Dai, T. H. Ding, R. N. Fu, *Anal. Chim. Acta.*, 1998, **359**, 39

[38] S. C. Ng, L. Chen, L. F. Zhang, C. B. Ching, *Tetrahedron Letters*, 2002, **43**, 677

[39] H. Y. Aboul-Enein, *J. Chromatogr. A*, 2001, **906**, 185

[40] Y.-J. Wu, M.-M. Ma, S. Zeng, *Journal of Zhejiang University SCIENCE*, 2004, **5(2)**, 226

[41] J. Szymura-Oleksiak, M. Walczak, J. Bojarski, H.Y. Aboul-Enein, *Chirality*, 1999, **11**, 267

[42] P. De Tullio, A. Ceccato, J. F. Liégeois, B. Pirotte, A. Felikidis, M. Stachow, *Chirality*, 1999, **11**, 261

[43] M. H. Iha, A. S. Martinez, P. S. Bonato, *J. Chromatogr. B*, 2002, **767**, 1

La CLHP est une méthode analytique utilisable aussi bien à l'échelle semi préparative et préparative,^{44,45} ce qui la rend très intéressante dans le domaine biomédical.

Ce que nous pouvons noter, c'est la diversité des détecteurs utilisés en chromatographie liquide énantiosélective, tels que l'ultraviolet et le fluorimètre. Ce dernier peut dans certains cas, améliorer jusqu'à trois fois la sensibilité du système,^{33,46,47} cependant la dérivation du soluté est nécessaire. Nous pouvons également noter l'utilisation du détecteur électrochimique.^{48,49}

La LC-MS (spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide) est considérée comme la meilleure technique de détection pour les échantillons biologiques.⁵⁰⁻⁵³ Le dichroïsme circulaire permet également une bonne détection ainsi que la détermination de la forme (+) ou (–) de l'énantiomère,⁵⁴⁻⁵⁶ de même que le polarimètre.^{7,21}

La figure 6, représente un protocole d'utilisation directe ou indirecte pour une séparation chirale en chromatographie liquide à haute performance.

- [44] J. Oxelbark, S. Claeson, *Tetrahedron : Asymmetry*, 2002, **13**, 2235
- [45] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, G. Dewynter, J. L. Montero, *Algerian Journal of Advanced Materials*, 1998, **2**, 69
- [46] J. Haginaka, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, **27**, 357
- [47] M. A. Schwarz, P. C. Hauser, *J. Chromatogr. A*, 2001, **928**, 225
- [48] F. Pellati, S. Benvenuti, M. Melegari, F. Firenzuoli, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, **29**, 1113
- [49] K. M. Fried, A. E. Young, S. U. Yasuda, I. W. Wainer, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, **27**, 479
- [50] C. J. Welch, M. H. Kress, M. Beconi, *Chirality*, 2003, **15**, 143
- [51] J. Zukowski, M. Brightwell, V. De Biasi, *Chirality*, 2003, **15**, 600
- [52] U. Heinemann, G. Blaschke, N. Knebel, *J. Chromatogr. B*, 2003, **793**, 389
- [53] A. Motoyama, A. Suzuki, O. Shiota, R. Namba, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, **28**, 97
- [54] R. Lukae, A. J. Clark, S. Khalid, A. Rodger, A. Snedden, P. M. Rodger, *Journal of Molecular liquids*, 2002, **98-99**, 411
- [55] M. G. Quaglia, A. Mai, G. Sbardella, M. Artico, R. Ragno, *Chirality*, 2001, **13**, 75
- [56] M. G. Finn, *Chirality*, 2002, **14**, 534

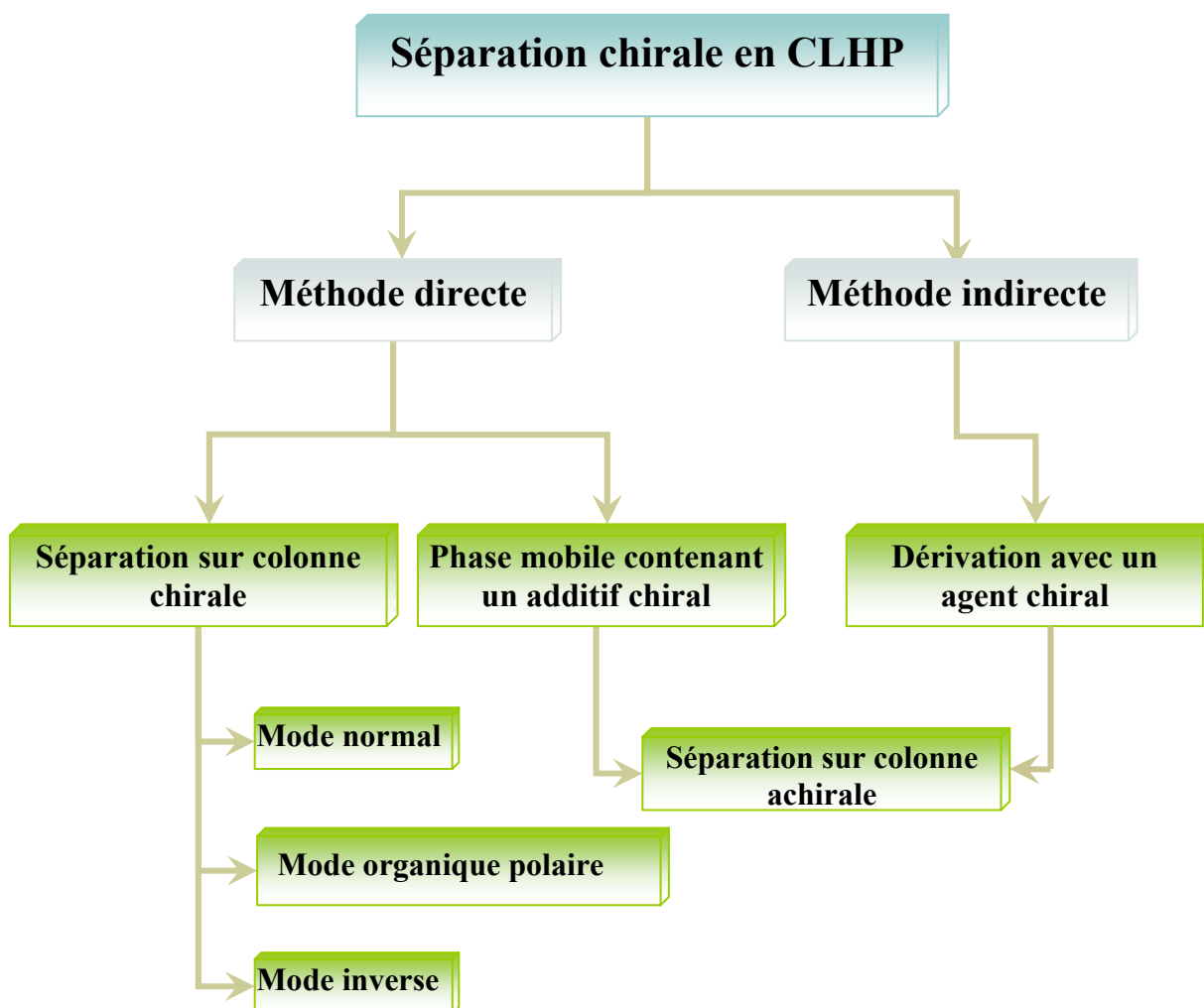


Figure 6 : Schéma résumant les méthodes de séparations chirales en chromatographie liquide à haute performance.

IV-2-4 L'électrophorèse capillaire (EC) :

A l'échelle analytique, c'est la méthode de choix pour la séparation chirale. En effet, un grand nombre de travaux utilisant cette technique ont été publiés ces dernières années.^{30,37,57-61} Cette technique englobe la haute efficacité de la chromatographie gazeuse et l'universalité de la chromatographie liquide.³⁷ Le seul inconvénient de cette méthode analytique est la non reproductibilité et le manque de sensibilité.^{10,57}

En général, le type de sélecteur chirale ajouté à la phase mobile est la cyclodextrine et ses dérivés,⁵⁸ surtout celles qui sont chargées telles que la carboxyméthyl- β -cyclodextrine et la sulfate- β -cyclodextrine.⁵⁹ L'héparine, les protéines, les antibiotiques et les éthers couronnes ont également été utilisés comme additifs chiraux en électrophorèse capillaire.^{30,37} C'est ainsi que s'est effectuée la séparation chirale des phénothiazines (agents neuroleptiques antipsychotiques),⁶⁰ les anti-inflammatoires non stéroïdiens,⁶¹ les psychotropes⁵⁸ et l'azelastine (anti-allergique).⁵²

IV-3 Autres techniques :

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

- ❖ La chromatographie à fluide supercritique (SFC) : cette technique est dite écologique, car sa phase mobile est majoritairement constituée de CO₂, au lieu des solvants organiques conventionnels.^{14,50,62}
- ❖ L'électrochromatographie capillaire (ECC) : cette méthode est prédite, par grand nombre de chercheurs, pour remplacer la CLHP.³⁶ Cette technique utilise elle aussi des phases stationnaires chirales telles que les cyclodextrines et les celluloses.^{57,63}
- ❖ La chromatographie à contre courant (CCC).^{14,29}

[57] M. Kato, T. Toyo'oka, *Chromatography*, 2001, **22(3)**, 159

[58] C. Hellriegel, H. Händel, M. Wedig, S. Steinhauer, F. Sörgel, K. Albert, U. Holzgrabe, *J. Chromatogr. A*, 2001, **914**, 315

[59] M. Zhou, J. T. Stewart, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, **30**, 443

[60] C. E. Lin, K. H. Chen, *J. Chromatogr. A*, 2001, **930**, 155

[61] C. Simo, A. Gallardo, J. San Roman, C. Barbas, A. Cifuentes, *J. Chromatogr. B*, 2002, **767**, 35

[62] A. Salvador, B. Herbreteau, M. Dreux, A. Karlsson, O. Gyllenhaal, *J. Chromatogr. A*, 2001, **929**, 101

[63] M. Girod, B. Chankvetadze, Y. Okamoto, G. Blaschke, *J. Sep. Sci.*, 2001, **24**, 27

- ❖ La chromatographie à lit mobile simulé (SMB): c'est une technique préparative industrielle, qui utilise plusieurs colonnes chirales en série, et une alimentation continue en phase mobile et en soluté.^{10,64}
- ❖ La RMN (résonance magnétique nucléaire) : Elle peut être utilisée soit dans le but de prédire la résolution énantiomérique en chromatographie ou en électrophorèse,⁶⁵ soit afin d'expliquer le mécanisme de la caractérisation chirale,⁶⁶ ou alors pour déterminer la pureté optique des échantillons énantiomériques.^{67,68}
- ❖ Les membranes chirales :¹⁴ Elles peuvent être à base de cyclodextrine²⁹ ou de cellulose.⁶⁹

V- Les phases stationnaires chirales (PSCs) :

La séparation chirale en CLHP a connu un grand succès, lors de l'introduction des phases stationnaires chirales par Okamoto avec les PSCs celluloses³⁹ et Pirkle avec les PSCs en brosse.¹ Mais le point culminant de ce succès a été atteint avec l'apparition des PSCs innovatrices à base de cyclodextrines développées par D. W. Armstrong.³²

Depuis, le nombre de PSCs ne cesse d'augmenter ; ainsi, il existe de nos jours plus d'une centaine de phases stationnaires chirales commercialisées.^{39,70,71}

Dans le but de classer ces PSCs, plusieurs tentatives ont été menées. Il y a eu celle de I. Wainer qui classa les PSCs suivant le type d'interaction entre le soluté et la phase.⁵ On distingue ainsi cinq (5) types majeurs de phases stationnaires chirales pour la chromatographie liquide :

[64] E. Frankotte, T. Leutert, L. La Vacchia, F. Ossola, P. Richert, A. Schmidt, *Chirality*, 2002, **14**, 313

[65] A. Laverde Jr, G. J. A. Da Conceição, S. C. N. Queiroz, *Magn. Reson. Chem.*, 2002, **40**, 433

[66] C. Yamamoto, E. Yashima, Y. Okamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1999, **72**, 1815

[67] A. Torrens, J. A. Castrillo, J. Frigola, L. Salgado, J. Redondo, *Chirality*, 1999, **11**, 63

[68] N. Fadnavis, V. Bhaskar, A. Deshpande, U. Bhalerao, *Anal. Chim. Acta.*, 2001, **441**, 297

[69] E. Yashima, Y. Okamoto, *Chiral recognition mechanism of polysaccharides chiral stationary phases*, in: H. Y. Aboul-Enein and I. W. Wainer (Ed.), *The Impact of Stereochemistry on Drug Development and Use*, Chemical Analysis Series, Vol. 142, Jons Wiley & Sons, 1997, chapitre 12

[70] E. Yashima, *J. Chromatogr. A*, 2001, **906**, 105

[71] T. Kubota, C. Yamamoto, Y. Okamoto, *Chirality*, 2002, **14**, 372

✦ Les PSCs type Pirkle :

Elles sont à base de petites molécules chirales, qui agissent indépendamment les unes des autres. C'est les premières PSCs à être utilisées, elles ont été développées par Bill Pirkle et sont à base d'acides aminés dérivés contenant des groupements aromatiques (Fig.7).³²

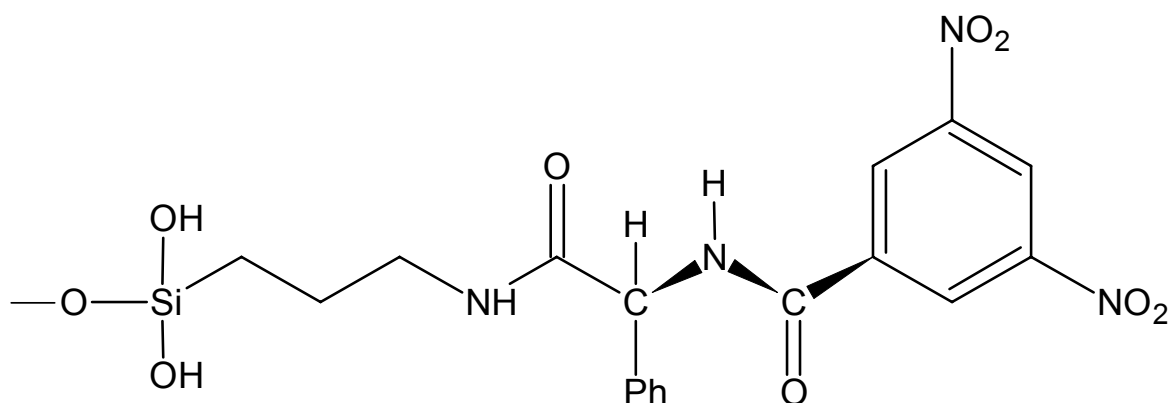


Figure 7 : PSC type Pirkle : N-(3,5-dinitrobenzoyl) phénylglycine liée au gel de silice.

La séparation chirale est principalement due à la complémentarité spatiale du soluté avec la phase stationnaire. Les interactions mises en jeu dans ce type de PSCs sont : les liaisons hydrogène, les interactions de type π - π , les interactions dipole-dipole et les interactions stériques.^{32,55,72}

Ces PSCs sont stables, disponibles sur le marché à des prix raisonnables, elles séparent très bien de nombreux composés optiquement actifs tels que les acides aminés,⁷³ le MC-1047 (un inhibiteur puissant de la multiplication du VIH dans les cellules contaminées),⁵⁵ les anti-inflammatoires non stéroïdiens⁷⁴ et les β -bloquants.^{75,76}

[72] M. M. Hefnawy, J. T. Stewart, *Anal. Lett.*, 1999, **32(1)**, 159

[73] B. Polak, W. Golkiewicz, *Chromatographia*, 2002, **56**, 323

[74] L. Skalova, R. Kral, B. Szotakova, Y. N. Babu, L. Pichard Garcia, V. Wsol, *Chirality*, 2003, **15**, 433

[75] Z. Chilmonezyk, H. Ksycinka, H. Y. Aboul-Enein, W. J. Lee, *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, 2001, **24(16)**, 2505

[76] H. Y. Aboul-Enein, I. A. Al-Duraibi, *Enantiomer*, 1999, **4**, 451

✦ Les PSCs à base de cellulose et d'amylose :

La cellulose est un polymère cristallin, composé d'un poly- β -D-1,4-glucoside linéaire (d'où le nom polysaccharide) (Fig.8).⁷⁷ La cellulose non dérivée démontre un faible pouvoir de résolution. De ce fait sa dérivation avec des groupements polaires a permis d'avoir des phases qui présentent un spectre d'application particulièrement étendu et une efficacité extrêmement élevée, aussi bien pour les applications analytiques que pour les applications préparatives.^{70,78}

C'est au début des années quatre-vingt, qu'Okamoto développa la première cellulose triacetate,¹ qui a été commercialisée par la firme Daicel.⁷⁹ Depuis, un grand nombre de phases stationnaires à base de cellulose est commercialisé (Chiralcel OB, Chiralcel OC, ... etc.)

Le mécanisme de la séparation chirale, implique les interactions attractives (les liaisons hydrogène, les interactions de type π - π , les interactions de type Van der Waals et les interactions dipole-dipole) suivies d'un agencement stérique du soluté à l'intérieur de la cavité chirale.^{1,39,80}

Le second type de ces PSCs est l'amylose, constitué d'un poly- α -D-1,4-glucose hélicoïdal (Fig.8). Elle se comporte de manière similaire à la cellulose tandis que leurs propriétés énantiosélectives sont différentes (à cause de leurs conformations différentes),⁸¹ ce qui leur confère une certaine complémentarité.⁸²

Le pouvoir de reconnaissance chirale de ces phases est directement lié à la nature des substituants introduits au niveau des groupes hydroxyles des unités glucosides du polysaccharide, cette caractéristique a été exploitée pour moduler leur énantiosélectivité.⁸³

- [77] H. Y. Aboul-Enein, I. Ali, M. G. Schmid, V. Jetcheva, O. Gecse, G. Gubitz, *Analytical Letters*, 2001, **34(7)**, 1107
- [78] H. Y. Aboul-Enein, I. Ali, G. Gubitz, C. Simons, P. J. Nicholls, *Chirality*, 2000, **12**, 727
- [79] M. L. De La Puente, C. T. White, A. Rivera-Sagredo, J. Reilly, *J. Chromatogr. A*, 2003, **983**, 101
- [80] C. Roussel, B. Bonnet, A. Piederriere, C. Suteu, *Chirality*, 2001, **13**, 56
- [81] C. L. Narayana, T. Suresh, S. Mahender Rao, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, **32**, 21
- [82] C. Perrin, V. A. Vu, N. Matthijs, M. Maftouh, *J. Chromatogr. A*, 2002, **947**, 69
- [83] Z. Chilmonczyk, H. Ksycinska, M. Mazgajska, H. Y. Aboul-Enein, *Chirality*, 1999, **11**, 790

En outre, l'énantiosélectivité de cette classe de phases stationnaires est largement affectée par le type de phase mobile utilisée.⁵ Malheureusement, un grand nombre des dérivés de polysaccharides sont plus ou moins solubles dans la plupart des solvants organiques.⁸⁴ Cette propriété réduit considérablement le choix de la phase mobile et par conséquent les possibilités d'améliorer la séparation chirale.

L'efficacité de ces PSCs est telle que la Chiralcel OD (cellulose tris(3,5-diméthylphenylcarbamate)) et la Chiralcel AD (amylose tris(3,5-diméthylphenylcarbamate)) séparent environ 84% des molécules chirales que nous pouvons rencontrer ainsi que 80% des médicaments chiraux disponibles sur le marché,^{39,82} parmi eux nous pouvons citer : Les β -bloquants,^{41,43,85} les anti-inflammatoires non stéroïdiens,⁸⁴ les analgésiques,⁶⁷ ainsi que les insecticides⁸⁶ et les fongicides.⁸⁷

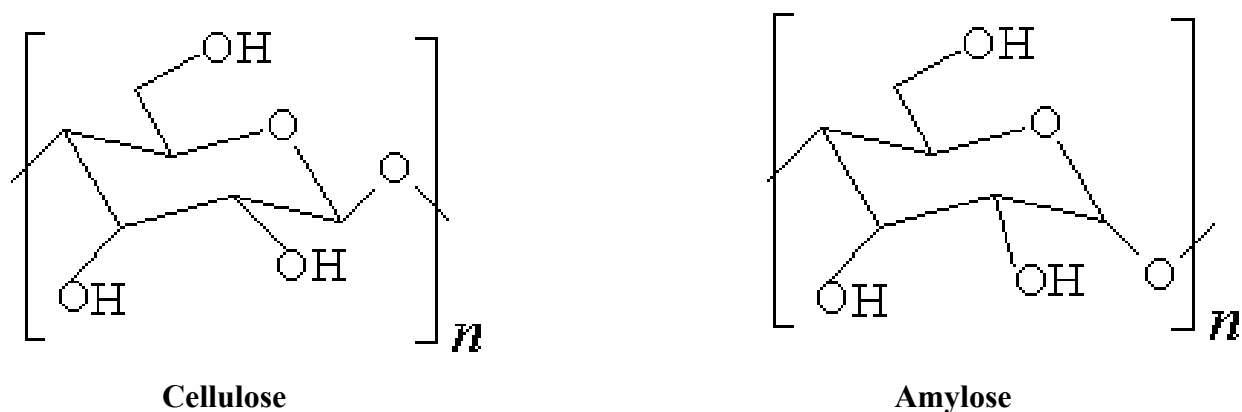


Figure 8: Structures de la cellulose et de l'amylose.

[84] J. Garcés, P. Franco, L. Oliveros, C. Minguillon, *Tetrahedron : Asymmetry*, 2003, **14**, 1179

[85] M. G. Schmid, O. Gecse, Z. Szabo, F. Kilar, G. Gubitz, I. Ali, H. Y. Aboul-Enein, *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol*, 2001, **24(16)**, 2493

[86] B. H. Kim, S. U. Lee, K. T. Kim, *Chirality*, 2003, **15**, 276

[87] T. Spitzer, E. Yashima, Y. Okamoto, *Chirality*, 1999, **11**, 195

➤ Les PSCs à base de cyclodextrines :

Les cyclodextrines (ou **CDs**) sont des oligosaccharides cycliques naturels, non réducteurs, constituées de 6, 7 ou 8 unités de glucopiraneses correspondant aux α , β , γ cyclodextrines respectivement, reliées entre elles par des liaisons de type α -1,4 (Fig.9).^{88,89} Elles sont obtenues industriellement par dégradation enzymatique de l'amylase (forme linéaire de l'amidon) à l'aide d'une enzyme : la cyclodextrine-glycosyltransférase (ou CGTase).⁹⁰ La cyclodextrine adopte ainsi la forme d'un cylindre conique (Fig.10).⁹¹

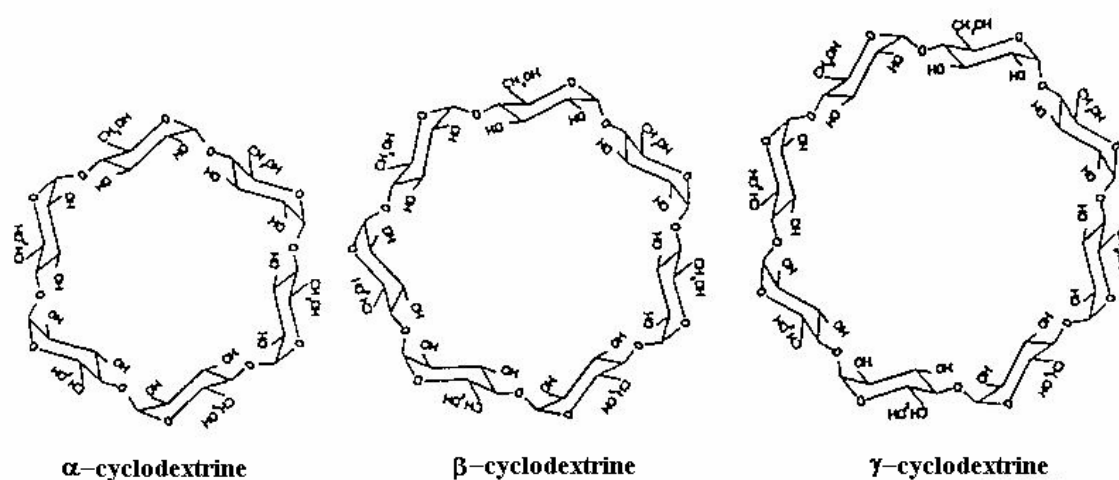


Figure 9 : structure des α , β , γ -cyclodextrine.

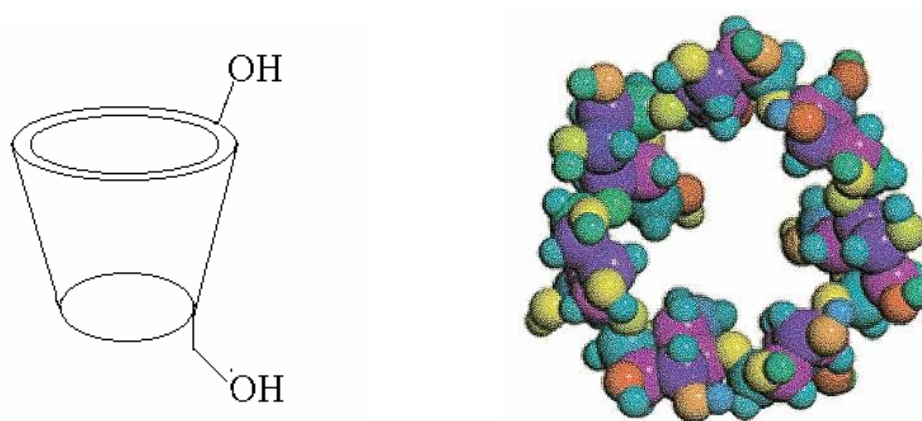


Figure 10: Forme tridimensionnelle de la β -cyclodextrine.

[88] S. Sforza, G. Galaverna, R. Corradini, A. Dossena, R. Marchelli, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2003, **14**, 124

[89] Y. C. Guillaume, J. F. Robert, C. Guinchard, *Talanta*, 2001, **55**, 263

[90] B. Perly, F. Pilard, *Les cyclodextrines et leur Applications*, CLEFS CEA, **35**, 1997

[91] L. Liu, Q. X. Guo, *j. Incl. Phenom*, 2002, **42**, 1

Ce type de PSCs a été développé par D. W. Armstrong au début des années quatre-vingt;³² et depuis, elles sont devenues les phases stationnaires les plus utilisées dans le domaine de la séparation chirale.^{30,57} La cavité de ces produits a la propriété de former des **complexes d'inclusion** avec des molécules organiques, notamment celles possédant des cycles aromatiques (Fig.11).^{92,93}

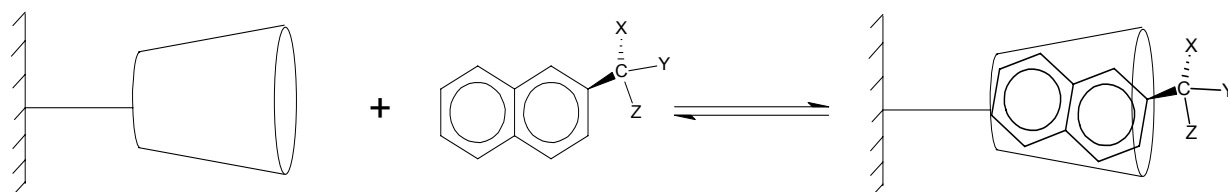


Figure 11: Exemple de mécanismes d'inclusion du naphthalène dans la cavité de la cyclodextrine.

L'extérieur des CDs est tapissé par les fonctions hydroxyles des unités glucose tandis que les atomes de carbone et d'hydrogène tapissent l'intérieur de la cavité. L'intérêt des CDs provient essentiellement du caractère hydrophobe de leur cavité (surface de contact avec la molécule invitée), la face externe étant hydrophile (surface de contact avec le solvant).³¹

Plusieurs contributions énergétiques ont été mises en évidence pour expliquer les interactions mises en jeu lors de la formation de complexes par les cyclodextrines.⁹¹ Ainsi, pour obtenir une résolution chirale trois points d'attache entre le sélecteur chiral et la molécule énantiomère sont nécessaires.⁵ Leur obtention nécessite que le sélecteur chiral interagisse avec une partie importante de la molécule invitée,⁹³ un cycle aromatique par exemple.

[92] S. Chen, *J. Chin. Chem. Soc.*, 2001, **48**, 751

[93] K. P. Lee, S. H. Choi, E. N. Ryu, J. J. Ryoo, J. H. Park, Y. Kim, M. H. Hyun, *Anal. Chem.*, 2002, **18**, 31

Ces 3 points d'interactions sont nécessaires pour obtenir une séparation chirale. Ces interactions reposent sur les contributions énergétiques suivantes:⁷

- L'adaptation stérique : par des changements conformationnels de la molécule invitée et/ou de la cyclodextrine (conformation induite) lors du processus d'inclusion.
- La formation de liaisons hydrogène.
- Les interactions de Van der Waals.
- Les interactions hydrophobes.
- Les interactions dipôle-dipôle

C'est l'action simultanée de ces interactions qui rendent effective l'inclusion spécifique. Ce phénomène d'inclusion-complexation ne fait intervenir aucune liaison covalente mais uniquement des liaisons électrostatiques.¹⁴

La nature relativement hydrophobe de la cavité de la cyclodextrine et son aptitude à accueillir d'autres molécules, sont à l'origine des principales applications envisagées pour ces molécules-cages. Ainsi, elles sont capables de solubiliser et de transporter un principe actif pharmaceutique dans le but de faciliter son accès au récepteur naturel.⁹⁰

En tant que phase stationnaire, la cyclodextrine a permis la séparation de plusieurs produits pharmaceutiques tels que les psychotropes,^{22,94} les analgésiques⁹⁵ et les antifongiques.⁹⁶ De nombreux acides aminés ont pu être également résolus via ce type de phases stationnaires.⁹⁷

[94] R. Herraez-Hernandez, P. Campins-Falco, *Anal. Chim. Acta.*, 2001, **434**, 315

[95] S. Rudaz, J. C. Veuthey, *Chirality*, 1999, **11**, 319

[96] H. Kim, E. Radwanski, R. Lovey, C. C. Lin, A. A. Nomeir, *Chirality*, 2002, **14**, 436

[97] Y. C. Guillaume, J. F. Robert, C. Guinchard, *Talanta*, 2001, **55**, 263

✦ Les PSCs à base d'antibiotiques :

Ces phases stationnaires chirales sont à base de glycopeptides macrocycliques. Tout comme les cyclodextrines, ces phases ont été introduites par D. W. Armstrong. Les trois types d'antibiotiques utilisés sont : la ristocetin-A, la vancomycine et la teicoplanine, ainsi que l'avoparcin, récemment développée. Leur noms commerciaux sont : CHIROBIOTIC R, CHIROBIOTIC V, CHIROBIOTIC T et CHIROBIOTIC A, respectivement. Ces PSCs sont utilisées en CLHP, aussi bien comme additif à la phase mobile, ou comme phases stationnaires chirales.³²

La figure 12 présente la structure de la ristocetine-A, la vancomycine et de la teicoplanine. Ces phases stationnaires sont de type multimodales, et sont donc stables avec plusieurs types de solvants. Leurs mécanismes d'interactions sont à base : d'interactions de type π - π , de liaisons hydrogène, de complexes par inclusion, d'interactions ioniques ainsi que de liaisons peptidiques.^{98,99}

La ristocetine-A est utilisée aussi bien en mode inverse qu'en mode organique polaire, c'est l'une des molécules les plus complexes évaluées jusqu'à ce jour, en tant que phase stationnaire chirale ; elle possède 38 centres chiraux, 7 cycles aromatiques entourant 4 cavités.¹⁰⁰

La teicoplanine a un poids moléculaire de 1185 et possède 20 centres chiraux, ce qui augmente les probabilités d'interactions stéréosélectives avec le soluté chiral. Cette colonne est aussi efficace en mode inverse qu'en mode normal et même en mode organique polaire.³

La vancomycine a un poids moléculaire de 1149 et 18 centres chiraux, cette colonne n'est efficace qu'en mode inverse ou en mode normal, mais pas en mode organique polaire.⁹⁸

L'avoparcine existe sous deux formes : α et β avec un poids moléculaire de 1909 et 1944 respectivement, et contient 32 centres stéréogènes.³

Dans ce type de phases, les cavités formées par l'agencement des cycles aromatiques, sont nettement moins profondes que celles de la cyclodextrine; ainsi, les complexes d'inclusion formés dans ce type de phases seront moins stables.³

[98] Z. Shen, S. Wang, R. Bakhtiar, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2002, **16**, 332

[99] G. Torok, A. Péter, D. W. Armstrong, D. Tourwé, G. Toth, J. Sapi, *Chirality*, 2001, **13**, 648

[100] A. Péter, G. Torok, D. W. Armstrong, G. Toth, D. Tourwé, *J. Chromatogr. A*, 2000, **904**, 1

Ce type de phases stationnaires chirales sépare très bien les produits pharmaceutiques tels que les anesthésiants¹⁰¹ et les anti-dépresseurs (fluoxétine ou Prozac[®]).⁹⁸

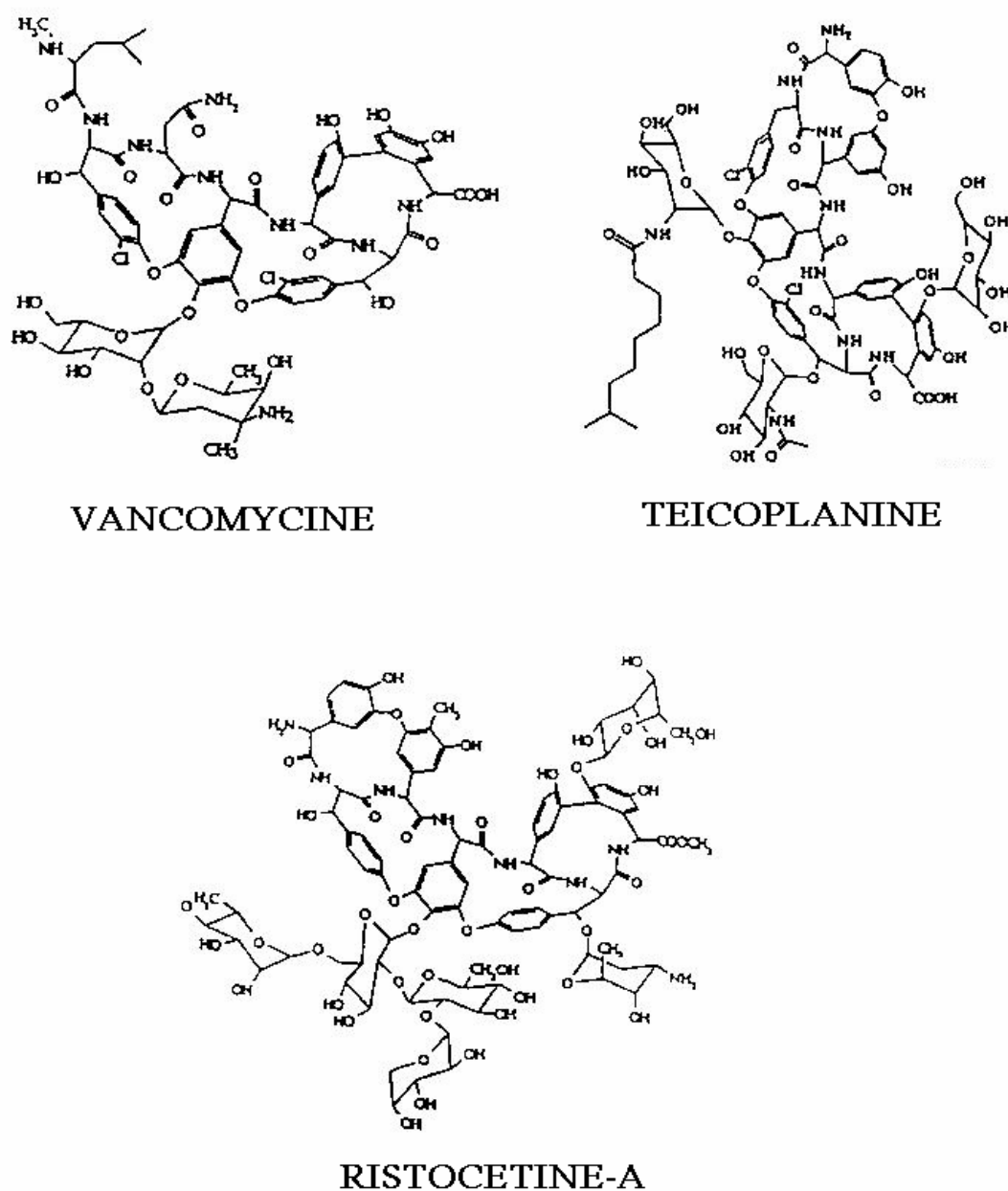


Figure 12: Structures de quelques antibiotiques utilisés comme phases stationnaires chirales en CLHP.

[101] C. Rustichelli, V. Ferioli, G. Gamberini, R. Stancanelli, *Chromatographia*, 2001, **54**, 731

✦ Les PSCs à base de protéines :

Les protéines sont des polymères naturels, composés d'unités chirales à base de L-aminoacides. Plusieurs protéines ont été utilisées comme phases stationnaires chirales, parmi elles nous pouvons citer : l' α -acide glycoprotéinique humain (α -AGP), l'albumine du sérum humain (HSA), l'albumine du sérum bovin (BSA), la protéine ovomucoïde (OV), ainsi que la cellobiohydrolase I (CBH I).⁶

Ces protéines ont une structure secondaire et tertiaire bien définies, ainsi que plusieurs sites susceptibles de former des liaisons énantiosélectives.

Les phases stationnaires à base de protéines sont souvent utilisées en mode inverse,⁸⁰ et cela dans le but d'éviter la dénaturation des protéines.

Durant les années quatre-vingt et le début des années quatre-vingt-dix, la colonne AGP était très populaire et cela grâce à sa capacité de séparer une large gamme de produits pharmaceutiques.⁶

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

- Les interactions stéréosélectives à base de complexes de type hôte-invité.
- Les liaisons hydrogène.
- Les interactions hydrophobes.
- Les interactions ioniques.

Néanmoins ces PSCs à base de protéines sont de moins en moins utilisées ces dernières années car mis à part leur coût très élevé, elles sont instables et ne fonctionnent qu'à l'échelle analytique.^{6,32}

Ainsi, ce type de phases a été utilisé pour la résolution de nombreux produits pharmaceutiques tels que la méthadone (analgésique),⁹⁵ l'ecstasy (substance psychoactive)¹⁰² ainsi que le flurbiprofène (anti-inflammatoires non stéroïdiens).¹⁰³

[102] M. Brunnenberg, K. A. Kovar, *J. Chromatogr. B*, 2001, **751**, 9

[103] B. K. Patel, J. Valentova, A. J. Hutt, *Chromatographia*, 2002, **55**, 135

D'autres phases stationnaires chirales existent, mais leur utilisation est moins fréquente, parmi elles nous citons :

- Les phases stationnaires à base d'éthers couronnes.³²
- Les phases stationnaires à base de complexes métalliques.¹
- Les phases stationnaires à base de polyacrylamide.¹⁰⁴

[104] G. Blaschke, in: M. Zief, L. J. Crane (Eds.), *Chromatographic Chiral Separations, Chromatographic Science Series*, Vol.40, Marcel Dekker, New York, 1988, p. 179, Chapitre 7

Chapitre II

LA SEPARATION CHIRALE EN MODE NORMAL

I- Introduction :

Jusqu'au tout début des années 80, la séparation chirale était considérée comme fastidieuse, difficile à réaliser et dans la majorité des cas, comme un problème insoluble.¹ Par conséquent l'énantioséparation fut souvent ignorée et évitée, le meilleur exemple qui peut être donné est la commercialisation des médicaments chiraux sous forme de mélanges racémiques alors que les effets thérapeutiques sont attribués à l'un des énantiomères seulement.²

Ceci ne tarda pas à changer, grâce à l'apparition des phases stationnaires chirales, dès lors la séparation chirale a connu un engouement indescriptible.³ Depuis, ce domaine ne cesse de s'enrichir et de se diversifier et se développa d'un simple domaine d'application à une véritable science.⁴

Les cyclodextrines sont très largement utilisées en tant que sélecteur chiral, que ce soit en chromatographie en phase gazeuse, en électrophorèse capillaire, ou en chromatographie liquide.^{5,6} En effet, les phases stationnaires à base de cyclodextrine et de cellulose sont les phases les plus utilisées en CLHP, que ce soit à l'échelle analytique ou à l'échelle préparative.^{7,8} La possibilité de modifier les groupements hydroxyles de la cyclodextrine a eu un grand impact sur la sélectivité de la phase stationnaire vis-à-vis des produits racémiques.^{6,9}

Dans les conditions chromatographiques du mode normal, la cavité hydrophobe sera occupée par un solvant apolaire tel que l'hexane ou l'heptane, ce qui rendra la cyclodextrine inapte à former des complexes d'inclusion à l'intérieur de sa cavité.¹⁰ Un alcool polaire tel que l'isopropanol ou l'éthanol est ajouté afin de moduler les liaisons hydrogène.¹¹

- [1] B. Chankvetadze, *J. Sep. Sci.*, 2001, **24**, 691
- [2] U. Holzgrabe, T. Christians, *J. Cap. Elec. And Microchip Tech.* 007, 2002, **1/2**, 23
- [3] D. W. Armstrong, *Direct Enantiomeric Separations in Liquid Chromatography and Gas Chromatography*, H. J. Issaq (Ed.), *Century of Separation Science*, Marcel Dekker, New York, 2002, Chapitre 33
- [4] N. M. Mair, P. Franco, W. Lindner, *J. Chromatogr. A*, 2001, **906**, 3
- [5] K. L. Park, K. H. Kim, S. H. Jung, H. M. Lim, C. H. Hong, J. S. Kang, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, **27**, 569
- [6] S.C. Ng, T. T. Ong, P. Fu, C. B. Ching, *J. Chromatogr. A*, 2002, **968**, 31
- [7] S. C. Ng, L. Chen, L. F. Zhang, C. B. Ching, *Tetrahedron Letters*, 2002, **43**, 677
- [8] T. J. Ward, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 2863
- [9] S. Sforza, G. Galaverna, R. Corradini, A. Dossena, R. Marchelli, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2003, **14**, 124
- [10] T. Hargitai, Y. Kaida, Y. Okamoto, *J. Chromatogr.*, 1993, **628**, 11
- [11] T. E. Beestley, J. T. Lee, *Recent Developments in LC Column Technology*, June 2003

Le mécanisme de caractérisation chirale en mode normal est attribué à la formation d'un complexe de transition diastéréomérique entre le sélecteur chiral et le soluté, et non à la formation d'un complexe d'inclusion.^{12,13}

L'efficacité de la séparation peut se refléter dans la différence de l'énergie de formation des complexes de transition entre les deux énantiomères : plus cette différence est grande meilleure est l'énantioséparation.^{14,15}

Parmi les interactions qui peuvent conduire à la formation d'un complexe diastéréomérique nous pouvons citer : les liaisons hydrogène, les interactions de type π - π , les interactions dipole-dipole ou les interactions dues aux effets stériques.^{14,16,17}

Ainsi, pour que la séparation chirale soit efficace, les structures tridimensionnelles du soluté et de la phase stationnaire chirale devraient être complémentaires, de manière à ce qu'il y ait au minimum trois interactions préférentielles principales.^{14,17-19}

Dans notre travail, nous avons testé plusieurs familles de produits optiquement actifs, parmi elles nous avons les produits pharmaceutiques, les herbicides ainsi que d'autres solutés chiraux (structures en annexe A). Nous avons étudié l'effet de la nature du substituant de la phase stationnaire, l'effet de la composition et de la nature des constituants de la phase mobile ainsi que l'effet du débit sur la résolution chirale (pour les conditions d'analyse voir annexe C).

[12] D. W. Armstrong, M. Hilton, L. Coffin, *LC-GC*, 1992, **2**, 647

[13] A. Schuster, C. Götte, G. Bernhardt, A. Buschauer, *Chirality*, 2001, **13**, 285

[14] C. H. Lin, C. E. Lin, C. C. Chen, L. F. Liao, *J. Chin. Chem. Soc.*, 2001, **48**, 1069

[15] M. M. Hefnawy, J. T. Stewart, *Anal. Lett.*, 1999, **32(1)**, 159

[16] M. G. Schmid, O. Gecse, Z. Szabo, F. Kilar, G. Gubitz, I. Ali, H. Y. Aboul-Enein, *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, 2001, **24(16)**, 2493

[17] F. Tazerouti, *Synthèse, caractérisation et application des phases stationnaires chirales en chromatographie liquide*, Thèse de Doctorat, 2001, ALGER, U.S.T.H.B.

[18] J. M. Finn, in: M. Zief, L. J. Crane (Eds.), *Chromatographic Chiral Separations, Chromatographic Science Series*, Vol.40, Marcel Dekker, New York, 1988, p. 53, Chapitre 3

[19] Chiral Separation. *A Guide to using cyclodextrin bonded phases for liquid chromatography*, ASTEC, Advanced Separation Technologies Inc., USA, 1997

II- Résultats et discussion :

La figure 1 représente les structures des 3 PSCs préparées au laboratoire^{17,20} et testées dans cette partie en mode normal. Il s'agit de la β -cyclodextrine non substituée liée à la surface de la silice par une réaction de silylation en utilisant un spacer (l'isocyanatopropyltriéthoxysilane) (colonne A), l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine liée à la silice (colonne B) et la phényl-hydroxypropyl- β -cyclodextrine liée à la silice (colonne C).

Les trois phases stationnaires ont été remplies dans des tubes en acier inoxydable par la méthode conventionnelle « suspension diluée »²⁰. Les trois colonnes remplies ont les mêmes dimensions à savoir 15 cm de longueur et 4.6 mm de diamètre interne. Après conditionnement de chaque colonne avec de l'heptane, le nombre de plateaux théoriques a été évalué pour chaque colonne et donné sur le tableau I.

Plusieurs solutés optiquement actifs ont été testés, parmi eux les produits pharmaceutiques tels que : les benzodiazépines, les anticoagulants, les β -bloquants et les anti-inflammatoires non stéroïdiens, ainsi que les herbicides. La structure de chaque soluté est présentée en annexe A. La phase mobile utilisée est un mélange d'heptane et d'isopropanol.

Afin d'optimiser au mieux la séparation et dans le but de gagner du temps, nous nous sommes inspirés du protocole proposé par ASTEC¹⁹ (Advanced Separation Technologies Inc.), une firme américaine qui produit et commercialise des PSCs parmi elles celles à base de β -CD connues sous le nom de Cyclobond (Fig.2).

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

$$k'_1 = \frac{tr_1 - tr_0}{tr_0}, k'_2 = \frac{tr_2 - tr_0}{tr_0}, \alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \text{ et } R_s = \frac{2(tr_2 - tr_1)}{w_1 + w_2}$$

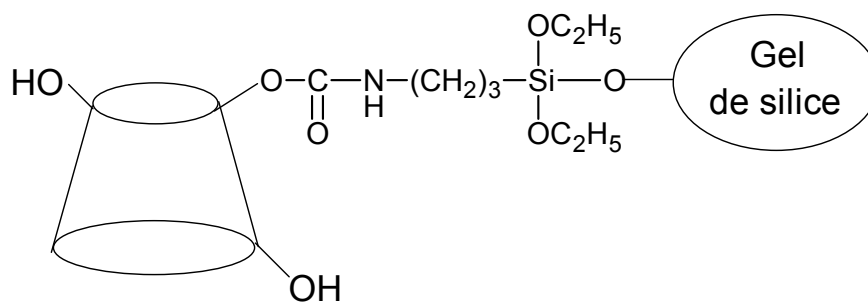
Avec:

tr_1 et tr_2 : Temps de rétention des deux énantiomères

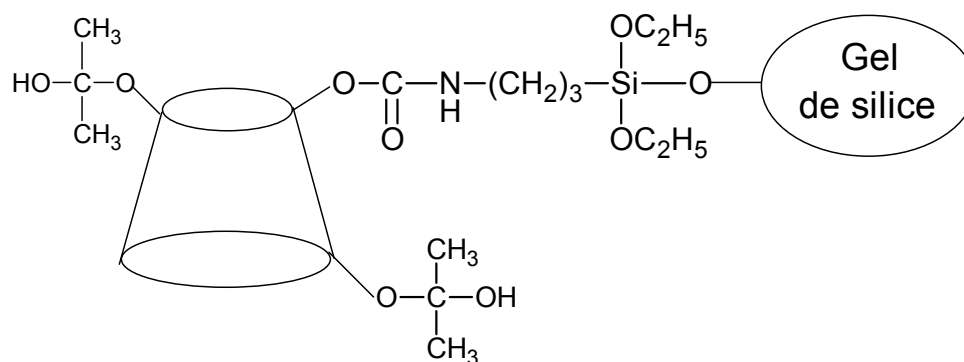
tr_0 : Temps mort (obtenu avec un soluté non retenu)

w_1 et w_2 : Largeurs à la base du pic

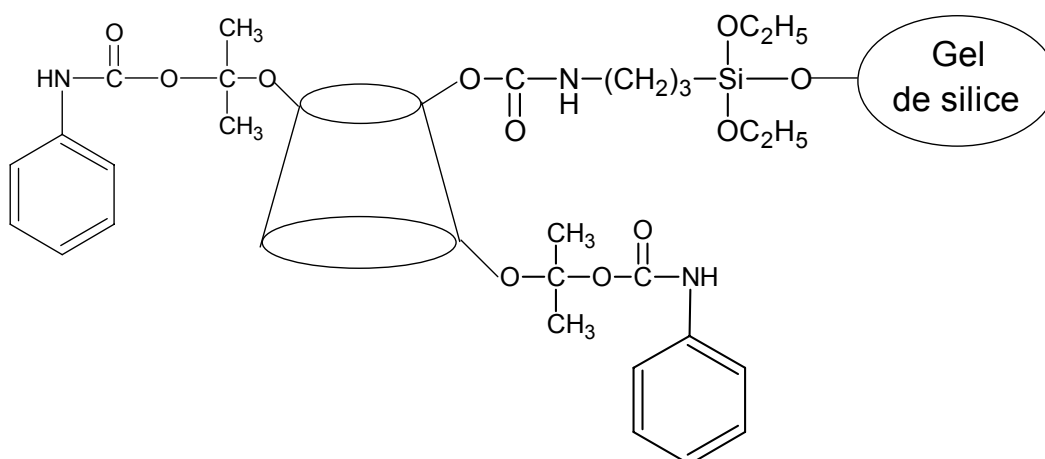
[20] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, G. Dewynter, J. L. Montero, *Algerian Journal of Advanced Materials*, 1998, **2**, 69



β -cyclodextrine liée à la silice par l'isocyanatopropyltriéthoxysilane (colonne A).



2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine liée à la silice par l'isocyanatopropyltriéthoxysilane (colonne B).



Phénylcarbamate-hydroxypropyl- β -cyclodextrine liée à la silice par l'isocyanatopropyltriéthoxysilane (colonne C).

Figure 1 : Structures des phases stationnaires A, B et C.

Tableau I : Caractéristique des trois colonnes remplies

Colonne	Soluté	Conditions	N*
A	tri-tertiobutyl-benzène	100% Heptane, 0.3 ml/mn	1742
B	tri-tertiobutyl-benzène	100% Heptane, 1 ml/mn	7097
C	tri-tertiobutyl-benzène	100% Heptane, 1 ml/mn	5561

*N : Nombre de plateaux théoriques calculés suivant la relation suivante : $N = 5.54 \left(\frac{t_r}{\delta} \right)^2$

Avec : t_r = Temps de rétention du Tri-tertiobutyl-benzène

δ = Largeur du pic à mi-hauteur

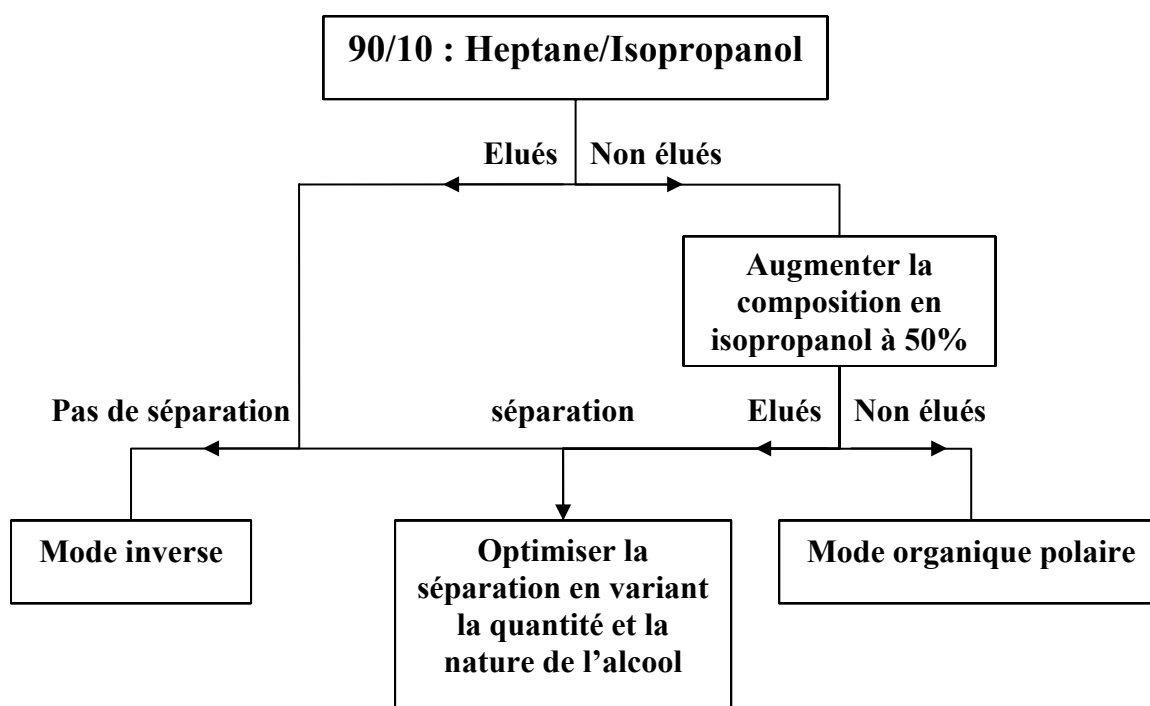


Figure 2 : Protocole proposé par ASTEC¹⁹ pour optimiser la séparation chirale en mode normal.

II-1 Test de la phase stationnaire à base de β -cyclodextrine non dérivée (colonne A) :

Le test de cette phase stationnaire en mode normal a été négatif, puisque les produits ont été très retenus, ce qui conduisait à l'étalement des pics en plus des fluctuations de la ligne de base ce qui rendait la phase stationnaire très instable.

Ce comportement confirme l'hypothèse de Daniel W. Armstrong concernant le fait que les phases stationnaires à base de β -cyclodextrine non dérivée, n'étaient efficaces qu'en mode inverse.^{3,13}

Ceci peut être expliqué par le fait qu'en mode normal, la cavité hydrophobe de la cyclodextrine a tendance à être occupée par le solvant apolaire (heptane), par conséquent le mécanisme de la résolution chirale ne dépendra pas de la formation d'un complexe d'inclusion, ça sera plutôt grâce à la formation de complexes diastéréomériques,^{17,21} et cela grâce à des interactions attractives qui peuvent être :^{4,16}

- Des interactions de type π - π .
- Des interactions de Van der Waals.
- Des interactions dipole-dipole.
- Des liaisons hydrogène.
- Les interactions liées aux effets stériques.

Ce type d'interactions n'est possible qu'avec des phases stationnaires portant des groupements aromatiques et des groupements carbamates ou amines,²² ce qui n'est pas le cas de cette phase stationnaire (colonne A).

Il est largement admis que la présence d'un solvant organique apolaire ou aprotique, fait que le mécanisme de rétention des phases stationnaires à base de cyclodextrine soit principalement dû à la formation de liaisons hydrogène entre le soluté et les groupements hydroxyles primaires et secondaires de la phase stationnaire, de manière à ce qu'aucune résolution chirale ne puisse s'effectuer en mode normal.²³

[21] C. Yamamoto, E. Yashima, Y. Okamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1999, **72**, 1815

[22] Z. Chilmonczyk, H. Ksycinska, M. Mazgajska, H. Y. Aboul-Enein, *Chirality*, 1999, **11**, 790

[23] G. Félix, C. Cachau, A. Thienpont, M.-H. Souldard, *Chromatographia*, 1996, **42** (9/10), 583

Ainsi, les résultats obtenus sur cette phase sont en accord avec la bibliographie qui suggère plutôt l'utilisation de ce type de colonne, en mode organique polaire ou alors en mode inverse.^{24,25}

II-2 Test de la phase stationnaire à base d'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (colonne B) :

Grâce à la dérivation des groupements hydroxyles de la cyclodextrine en groupements hydroxypropyles, cette phase est devenue plus réactive et cela pour deux raisons : la première c'est l'élargissement de la cavité qui pourra ainsi accueillir des molécules plus grandes, la seconde est la possibilité de former des liaisons hydrogène entre le soluté et le groupement hydroxypropyle.^{19,26}

Cependant, comme l'a souligné Daglish¹⁸ avec la règle des trois points d'interaction, il faut qu'il y ait au minimum trois interactions entre le soluté et la phase stationnaire pour que la caractérisation chirale puisse se réaliser. Etant donné qu'en mode normal l'inclusion du soluté dans la cavité n'est pas possible, comme cela a été démontré pour la colonne A, et que les seules interactions possibles sont les liaisons hydrogène entre le soluté et les groupements hydroxyles résiduels de la cyclodextrine, la règle des trois points n'a que peu de chances d'être respectée.

Le tableau II représente les temps de rétentions, les facteurs de capacité, de sélectivité et de résolution obtenus lors du test des produits optiquement actifs sur la phase stationnaire à base d'hydroxypropyl- β -cyclodextrine en mode normal.

Nous pouvons noter que pour la majorité des solutés la rétention est trop faible, ce qui peut (en plus des raisons énumérées précédemment) expliquer le fait qu'il n'y ait pas de séparations chirales.

Pour les produits 4 et 8, la rétention doit être due à des interactions non stéréosélectives avec les groupements silanols ce qui explique la coélution de leurs deux énantiomères.²⁶ Quand aux produits 7 et 15 ils n'ont carrément pas été élués.

Ainsi, aucun produit n'a pu être séparé dans ces conditions chromatographiques, malgré la variation de la composition de la phase mobile.

[24] Y. Nakamura, S. Takeuchi, K. Okumura, Y. Ohgo, *Tetrahedron Letters*, 2003, **44**, 6221

[25] I. A. Anan'eva, E. N. Shapovalova, S. A. Lopatin, O. A. Shpigun, V. P. Varlamov, V. A. Davankov, D. W. Armstrong, *J. Anal. Chem*, 2002, **57(4)**, 393

[26] S. Rudaz, J. C. Veuthey, *Chirality*, 1999, **11**, 319

Tableau II : Analyse des produits optiquement actifs sur la phase stationnaire à base d'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (colonne B) en utilisant le mélange binaire heptane/2-propanol.

Produits	Phase mobile	tr ₁	k' ₁	tr ₂	k' ₂	α	Rs
1	80/20 ^a	2,49	0,32	2,49	0,32	1,00	0,00
	98/2 ^a	5,65	1,94	5,65	1,94	1,00	0,00
2	80/20 ^a	2,47	0,31	2,47	0,31	1,00	0,00
	98/2 ^a	5,42	1,82	5,42	1,82	1,00	0,00
3	80/20 ^a	3,39	0,79	3,39	0,79	1,00	0,00
	98/2 ^a	9,94	4,18	9,94	4,18	1,00	0,00
4	80/20 ^a	3,22	0,70	3,22	0,70	1,00	0,00
	98/2 ^a	16,85	7,78	16,85	7,78	1,00	0,00
5	80/20 ^a	2,70	0,43	2,70	0,43	1,00	0,00
	98/2 ^a	8,72	3,54	8,72	3,54	1,00	0,00
6	80/20 ^a	2,54	0,34	2,54	0,34	1,00	0,00
	98/2 ^a	6,18	2,22	6,18	2,22	1,00	0,00
7	80/20 ^a	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e
8	80/20 ^a	2,59	0,37	2,59	0,37	1,00	0,00
	98/2 ^a	11,79	5,14	11,79	5,14	1,00	0,00
9	80/20 ^a	2,56	0,35	2,56	0,35	1,00	0,00
	98/2 ^a	9,81	4,11	9,81	4,11	1,00	0,00
10	80/20 ^a	2,07	0,10	2,07	0,10	1,00	0,00
	98/2 ^a	2,19	0,14	2,19	0,14	1,00	0,00
11	80/20 ^a	2,05	0,08	2,05	0,08	1,00	0,00
	98/2 ^a	2,10	0,09	2,10	0,09	1,00	0,00
12	80/20 ^a	2,02	0,07	2,02	0,07	1,00	0,00
	98/2 ^a	2,06	0,07	2,06	0,07	1,00	0,00
13	80/20 ^a	3,34	0,77	3,34	0,77	1,00	0,00
	98/2 ^a	6,86	2,57	6,86	2,57	1,00	0,00
14	80/20 ^a	2,24	0,19	2,24	0,19	1,00	0,00
	98/2 ^a	4,18	1,18	4,18	1,18	1,00	0,00
15	80/20 ^a	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e

Tableau II : Suite							
Produits	Phase mobile	tr ₁	k' ₁	tr ₂	k' ₂	α	Rs
16	90/10/0,5 ^b	4,77	0,26	4,77	0,26	1,00	0,00
	98/2/0,5 ^b	5,74	0,50	5,74	0,50	1,00	0,00
17	90/10/0,5 ^b	4,56	0,21	4,56	0,21	1,00	0,00
	98/2/0,5 ^b	5,26	0,37	5,26	0,37	1,00	0,00
18	90/10/0,5 ^b	4,65	0,23	4,65	0,23	1,00	0,00
	98/2/0,5 ^b	6,44	0,68	6,44	0,68	1,00	0,00
19	90/10/0,5 ^b	4,70	0,24	4,70	0,24	1,00	0,00
	98/2/0,5 ^b	6,37	0,66	6,37	0,66	1,00	0,00
20	90/10/0,5 ^b	4,62	0,22	4,62	0,22	1,00	0,00
	98/2/0,5 ^b	6,32	0,65	6,32	0,65	1,00	0,00
21	90/10/0,5 ^b	4,45	0,18	4,45	0,18	1,00	0,00
	98/2/0,5 ^b	5,78	0,51	5,78	0,51	1,00	0,00
22	90/10/0,5 ^b	5,71	0,51	5,71	0,51	1,00	0,00
	98/2/0,5 ^b	6,16	0,61	6,16	0,61	1,00	0,00
Fluazifop-butyl	80/20 ^a	2,06	0,09	2,06	0,09	1,00	0,00
	98/2 ^a	2,15	0,12	2,15	0,12	1,00	0,00
Haloxypop-éthoxyéthyl	80/20 ^a	2,23	0,18	2,23	0,18	1,00	0,00
	98/2 ^a	3,00	0,56	3,00	0,56	1,00	0,00
Benzoine	80/20 ^a	2,54	0,34	2,54	0,34	1,00	0,00
	98/2 ^a	2,13	0,11	2,13	0,11	1,00	0,00
Lorazepam	80/20 ^a	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e
Lormetazepam	80/20 ^a	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e
Oxazepam	80/20 ^a	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e
Temazepam	80/20 ^a	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e
Warfarine	80/20 ^a	27,00	13,29	27,00	13,29	1,00	0,00
Propranolol	80/20/01 ^c	8,58	3,54	8,58	3,54	1,00	0,00
	90/10/0,1 ^c	9,67	4,09	9,67	4,09	1,00	0,00

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 tel que l'acide trifluoroacétique (TFA) pour les composés acides ou d'un modifiant cationique tel que la diéthylamine (DEA) pour les composés basiques, leur élution devient possible ; de plus l'ajout de la diéthylamine diminue l'étalement des pics, et masque les groupements silanols qui peuvent par des interactions non stéréosélectives conduire à une forte rétention du soluté.²⁷

Pour la warfarine, malgré sa forte rétention aucune séparation n'a été observée, ceci peut être expliqué par le fait que cette rétention soit due à des interactions achirales, qui peuvent se produire entre les énantiomères et les groupements silanols de la phase stationnaire,^{28,29} le même cas a été observé pour les produits 4 et 8.

Dans le cas de cette deuxième colonne: l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine, le manque de groupements pouvant conduire à la formation d'un complexe π - π entre la phase stationnaire et le soluté, a empêché la résolution chirale.³⁰

A cause du caractère acide des herbicides, l'ajout de TFA est impératif pour l'élution de ces composés,³¹ sauf que leur élution est trop rapide pour permettre aux différentes interactions stéréosélectives de s'effectuer.³²

Nous pouvons noter que même à 98% en heptane, le fluazifop-butyl et l'haloxyfop-éthoxyéthyl ne sont pas retenus et ont des temps de rétention avoisinant celui du temps mort.

Par contre à 100% d'heptane, on remarque que les produits ne sont pas élués, ce qui veut dire que la présence d'un alcool même en très faible quantité, est nécessaire pour permettre l'élution des solutés.

La figure 3 démontre l'effet de l'isopropanol sur la rétention des différents produits.

Ainsi, en augmentant la composition de la phase mobile en isopropanol, ce dernier entre en compétition avec le soluté pour la formation de liaisons hydrogène avec la phase stationnaire,³³ ce qui se traduit par l'élution rapide des solutés, et ainsi la coélution des deux énantiomères.

[27] C. Perrin, V. A. Vu, N. Matthijs, M. Maftouh, *J. Chromatogr. A*, 2002, **947**, 69

[28] P. S. Bonato, R. Bortocan, C. M. Gaitani, F. O. Paías, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2002, **13(2)**, 190

[29] U. Skogsberg, S. Allenmark, *J. Chromatogr. A*, 2001, **921**, 161

[30] Y. Gong, H. K. Lee, *J. Sep. Sci.*, 2003, **26**, 515

[31] B. K. Patel, J. Valentova, A. J. Hutt, *Chromatographia*, 2002, **55**, 135

[32] R. Herraéz-Hernández, P. Campins-Falco, *Anal. Chim. Acta.*, 2001, **434**, 315

[33] H.Y. Aboul-Enein, I. A. Al-Duraibi, *Enantiomer*, 1999, **4**, 451

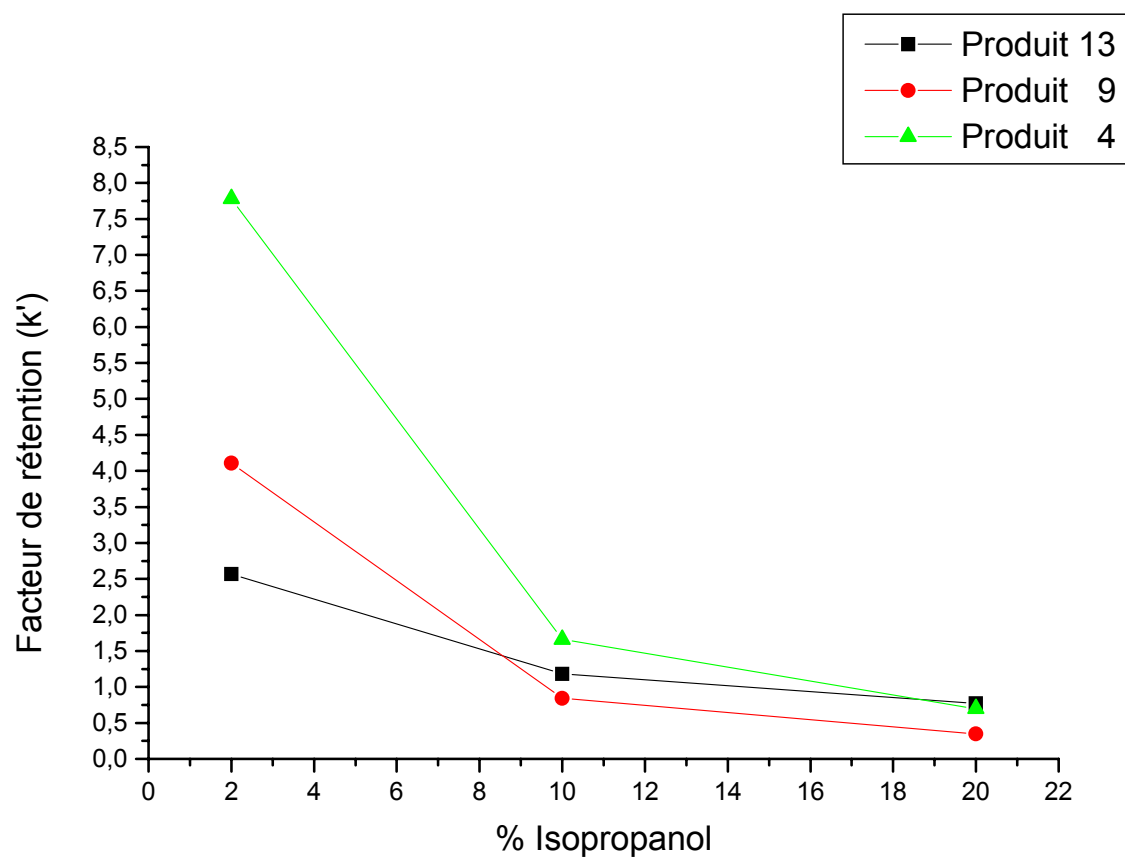


Figure 3 : Effet de l'isopropanol sur la rétention des solutés optiquement actifs sur la colonne B. (Phase mobile: heptane/isopropanol, 1ml/mn, $\lambda_{254\text{nm}}$).

II-3 Test de la phase stationnaire à base de phényl-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (colonne C):

Contrairement aux colonnes précédentes A et B, la phase stationnaire à base de phényl-hydroxypropyl- β -cyclodextrine porte en plus des groupements carbamates des groupements aromatiques, qui peuvent générer des opportunités pour la formation de complexes diastéréomériques.³

Les cyclodextrines portant des fonctions aromatiques et carbamates sont très utilisées en mode normal,^{3,12} elles ont un comportement similaire aux phases stationnaires de type Pirkle.^{12,17}

Cette colonne est dite de type multimodal et cela est dû à sa stabilité et son efficacité dans les trois modes de phase mobile notamment en mode normal.^{12,34}

Les résultats chromatographiques obtenus sur cette colonne pour le test des produits optiquement actifs sont présentés dans le tableau III. Ainsi, les produits : 1, 4, 5, 6, 8, 9, 14 ainsi que la benzoïne ont été séparés sur cette phase. Leurs chromatogrammes sont présentés sur les figures 4 et 5.

Les produits 1 et 14 ne sont que partiellement résolus et cela avec un fort pourcentage en heptane (98%). Les produits 4, 5 et 6 sont les solutés qui ont été le mieux séparés, notamment le produit 4 qui a été totalement résolu avec 100% en isopropanol ($R_s = 3,54$).

En ce qui concerne les autres solutés racémiques, leur temps de rétention sont trop faibles pour permettre leur résolution, ce qui explique la coélution de leurs deux énantiomères.

[34] J. Zukowski, *Chirality*, 1998, **10**, 362

Tableau III : Séparation des solutés racémiques sur la phase stationnaire à base de phényl-hydroxypropyl- β -cyclodextrine en utilisant le mélange binaire heptane/2-propanol ou heptane/Ethanol							
Produits	Phase mobile	tr ₁	k' ₁	tr ₂	k' ₂	α	Rs
1	90/10 ^a	4,43	1,43	4,43	1,43	1,00	0,00
	90/10 ^b	4,46	1,56	4,46	1,56	1,00	0,00
	98/2 ^a	11,65	5,30	12,50	5,76	1,09	0,85
2	90/10 ^a	3,51	0,93	3,51	0,93	1,00	0,00
	90/10 ^b	3,58	1,06	3,58	1,06	1,00	0,00
	98/2 ^a	8,70	3,70	8,70	3,70	1,00	0,00
3	90/10 ^a	6,99	2,84	6,99	2,84	1,00	0,00
	90/10 ^b	6,30	2,62	6,30	2,62	1,00	0,00
	98/2 ^a	16,84	8,10	16,84	8,10	1,00	0,00
4	90/10 ^a	17,18	8,44	25,34	12,92	1,53	3,54
	90/10 ^b	10,50	5,03	12,52	6,20	1,23	2,79
5	90/10 ^a	17,60	8,67	22,42	11,32	1,31	1,79
	90/10 ^b	11,31	5,50	12,82	6,37	1,16	2,16
6	0/100 ^a	2,65	0,48	2,77	0,55	1,14	0,49
	0/100 ^b	2,20	0,23	2,20	0,23	1,00	0,00
	90/10 ^a	10,51	4,77	11,46	5,30	1,11	1,19
	90/10 ^b	7,42	3,26	7,90	3,54	1,08	1,10
7	80/20 ^a	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e
8	90/10 ^a	13,86	6,62	15,50	7,52	1,14	1,33
	90/10 ^b	7,74	3,45	8,14	3,68	1,07	0,78
9	90/10 ^a	13,49	6,41	14,48	6,96	1,08	0,89
	90/10 ^b	8,45	3,86	8,88	4,10	1,06	0,78
10	90/10 ^a	5,43	1,98	5,43	1,98	1,00	0,00
	90/10 ^b	5,37	2,09	5,37	2,09	1,00	0,00
11	90/10 ^a	2,26	0,24	2,26	0,24	1,00	0,00
	90/10 ^b	2,26	0,30	2,26	0,30	1,00	0,00
12	90/10 ^a	2,31	0,27	2,31	0,27	1,00	0,00
	90/10 ^b	2,33	0,34	2,33	0,34	1,00	0,00
13	90/10 ^a	4,27	1,35	4,27	1,35	1,00	0,00
	90/10 ^b	3,46	0,99	3,46	0,99	1,00	0,00

Tableau III : Suite							
Produits	Phase mobile	tr ₁	k' ₁	tr ₂	k' ₂	α	Rs
14	90/10 ^a	3,11	0,71	3,11	0,71	1,00	0,00
	90/10 ^b	3,47	0,99	3,47	0,99	1,00	0,00
	98/2 ^a	7,36	2,98	7,61	3,11	1,05	0,33
15	90/10 ^a	4,58	1,52	4,58	1,52	1,00	0,00
	90/10 ^b	4,71	1,71	4,71	1,71	1,00	0,00
16	90/10/0,5 ^c	5,29	0,47	5,29	0,47	1,00	0,00
	98/2/0,5 ^c	8,08	1,23	8,08	1,23	1,00	0,00
17	90/10/0,5 ^c	5,28	0,46	5,28	0,46	1,00	0,00
	98/2/0,5 ^c	8,02	1,21	8,02	1,21	1,00	0,00
18	90/10/0,5 ^c	5,07	0,40	5,07	0,40	1,00	0,00
	98/2/0,5 ^c	7,50	1,07	7,50	1,07	1,00	0,00
19	90/10/0,5 ^c	5,21	0,44	5,21	0,44	1,00	0,00
	98/2/0,5 ^c	8,02	1,21	8,02	1,21	1,00	0,00
20	90/10/0,5 ^c	5,02	0,39	5,02	0,39	1,00	0,00
	98/2/0,5 ^c	7,45	1,05	7,45	1,05	1,00	0,00
21	90/10/0,5 ^c	4,75	0,32	4,75	0,32	1,00	0,00
	98/2/0,5 ^c	6,34	0,75	6,34	0,75	1,00	0,00
22	90/10/0,5 ^c	4,79	0,33	4,79	0,33	1,00	0,00
	98/2/0,5 ^c	6,71	0,85	6,71	0,85	1,00	0,00
Fluazifop-butyl	90/10 ^a	2,52	0,38	2,52	0,38	1,00	0,00
	90/10 ^b	2,58	0,48	2,58	0,48	1,00	0,00
Haloxifop-éthoxyéthyl	90/10 ^a	2,96	0,63	2,96	0,63	1,00	0,00
	90/10 ^b	2,86	0,64	2,86	0,64	1,00	0,00
Benzoine	90/10 ^a	4,13	1,27	4,13	1,27	1,00	0,00
	90/10 ^b	4,22	1,43	4,22	1,43	1,00	0,00
	98/2	6,89	2,72	7,04	2,81	1,03	0,14
Lorazepam	90/10 ^a	24,19	12,29	24,19	12,29	1,00	0,00
	90/10 ^b	15,18	7,72	15,18	7,72	1,00	0,00
Lormetazepam	80/20 ^a	13,10	6,32	13,10	6,32	1,00	0,00
	90/10 ^a	25,58	13,05	25,58	13,05	1,00	0,00

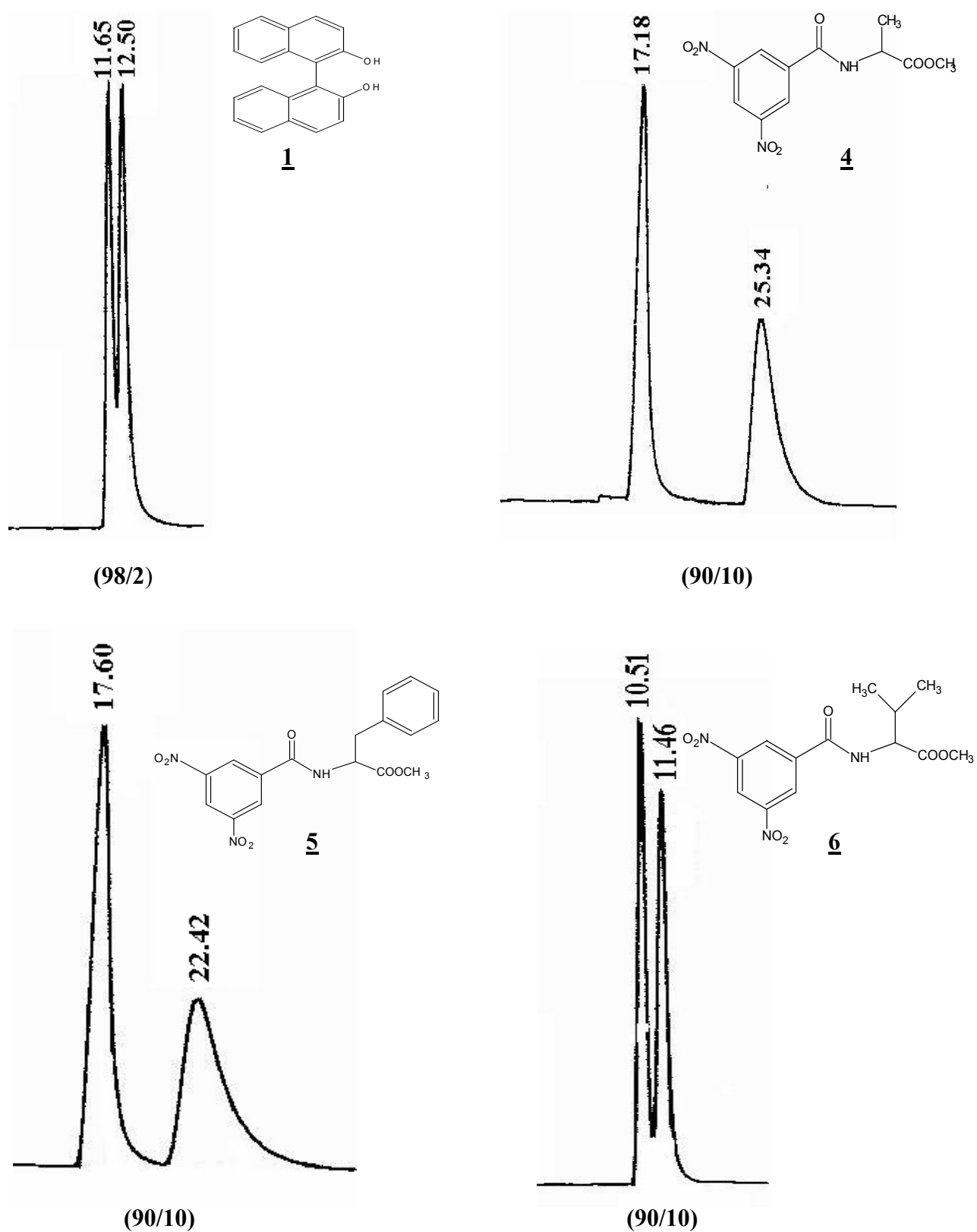


Figure 4 : Exemples de chromatogrammes de quelques produits testés sur la colonne C.

(Phase mobile : heptane/isopropanol, 1ml/mn, $\lambda_{254\text{nm}}$).

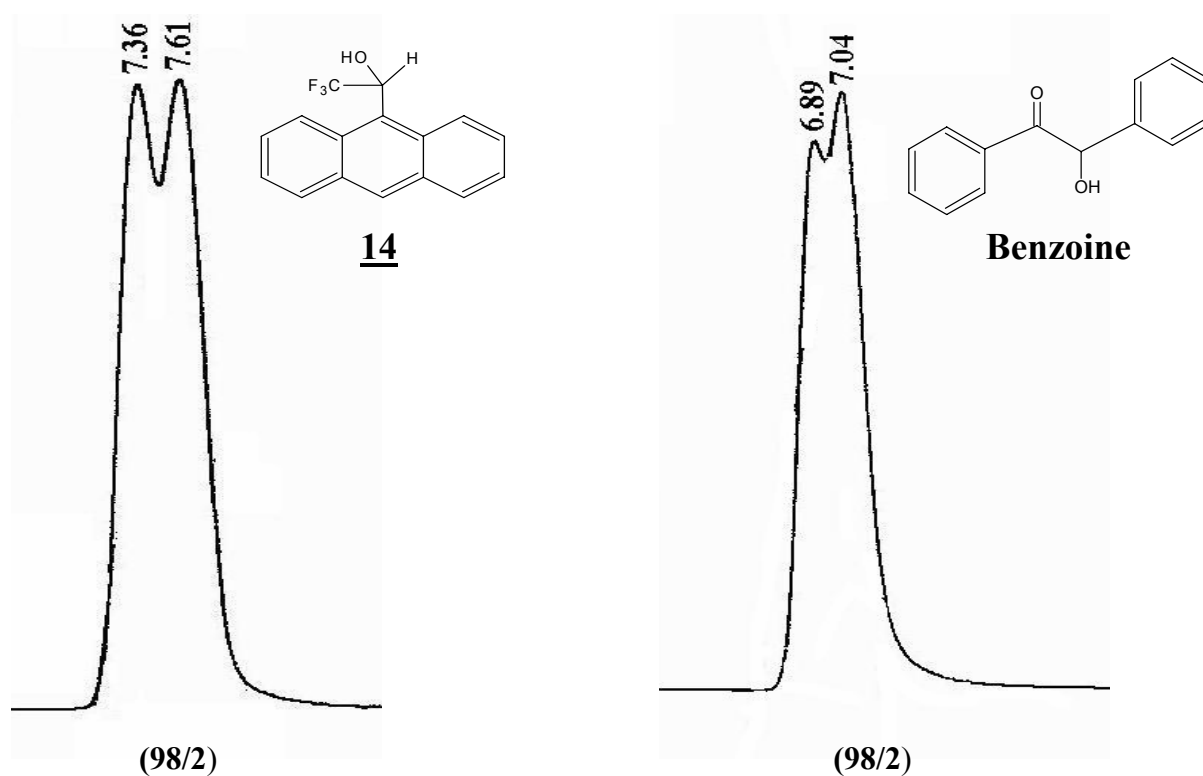


Figure 5 : Chromatogrammes du produit **14** et de la benzoine testés sur la colonne C.
(Phase mobile : heptane/isopropanol, 1ml/mn, $\lambda_{254\text{nm}}$).

II-3-a Effet de la composition de la phase mobile sur la rétention :

Les facteurs de capacité diminuent avec l'enrichissement de la phase mobile en alcool.³⁵ La figure 6 nous montre l'influence de la concentration de l'isopropanol sur la rétention ainsi que l'énantioséparation du produit 5. Nous pouvons noter qu'à partir de 30% en isopropanol, la sélectivité diminue rapidement, ce qui prouverait que l'alcool entre en compétition avec le soluté pour former des liaisons hydrogène avec la phase stationnaire, ce qui minimise les chances de former des complexes diastéréomériques entre le soluté et la phase stationnaire.³³ Ce phénomène a été également constaté lors du test des deux phases stationnaires (A et B).

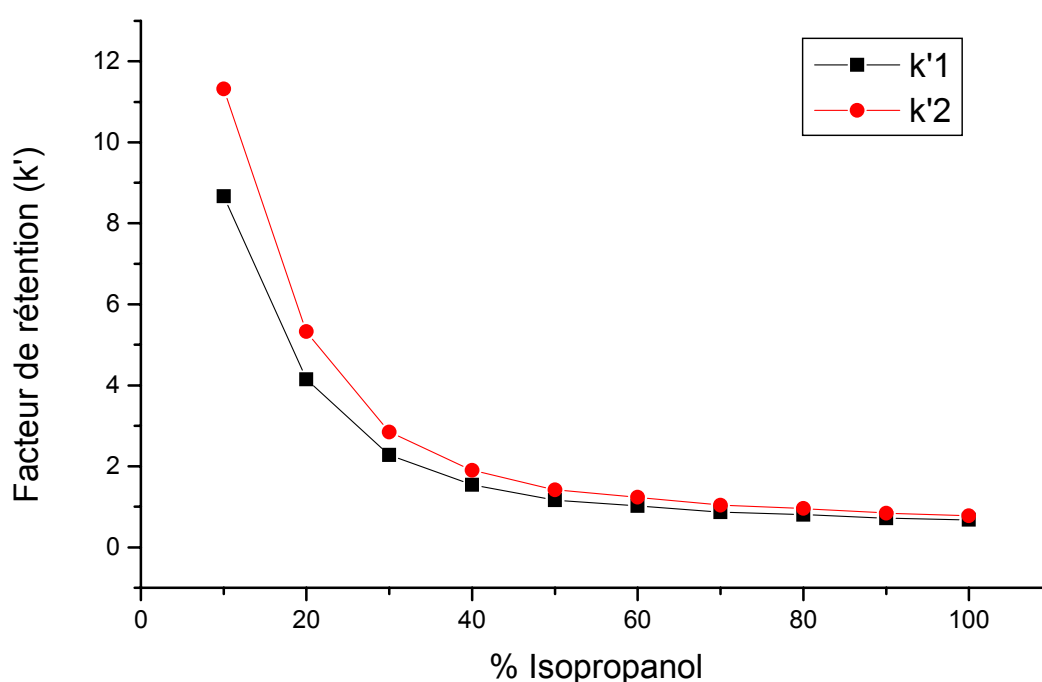


Figure 6: L'influence de la composition de la phase mobile sur la séparation des énantiomères du soluté 5 sur la colonne C. (Phase mobile : heptane/isopropanol, 1 ml/mn, $\lambda_{254\text{nm}}$).

La résolution des solutés 1 et 14 nécessite un fort pourcentage en heptane, et ceci pour que les énantiomères passent plus de temps dans la phase stationnaire pour que la caractérisation chirale puisse s'effectuer. Néanmoins des phases mobiles à base d'heptane uniquement, ne permettent pas l'élution de ces deux composés. Donc en résumé la présence de l'isopropanol même en quantité minimale, est une condition nécessaire pour l'élution des solutés optiquement actifs, ce qui confirme l'importance des liaisons hydrogène dans le mécanisme de résolution chirale.^{15,36}

La figure 7 nous donne la variation de la sélectivité et de la résolution en fonction de la composition de la phase mobile en isopropanol.

Il est clair que le pourcentage en alcool n'a qu'une très faible influence sur la sélectivité, ce qui n'est pas le cas pour la résolution qui diminue de manière significative avec l'augmentation du pourcentage en isopropanol.³⁷ Ce phénomène est comparable à celui observé avec les facteurs de rétention qui diminuaient à cause de l'effet compétitif de l'alcool avec le soluté, pour la formation de liaisons hydrogène avec les sites actifs de la phase stationnaire. Ces sites actifs peuvent être aussi des sites non stéréosélectifs, tels que les groupements silanols résiduels de la silice, de ce fait la diminution de la rétention ne sera pas accompagnée par une altération de la sélectivité.²⁸ Ce qui explique sa constance vis à vis de l'augmentation de l'isopropanol (figure 7).

La figure 8 nous donne l'évolution de la séparation chirale du produit 8 en fonction de la composition de la phase mobile en isopropanol.

[36] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, P. Franco, C. Minguillon, *Chirality*, 2002, **14**, 59

[37] M. Péter, A. Péter, J. Van Der Eycken, P. Cosmos, G. Bernath, F. Fulop, *J. Chromatogr. A*, 1998, **816**, 123

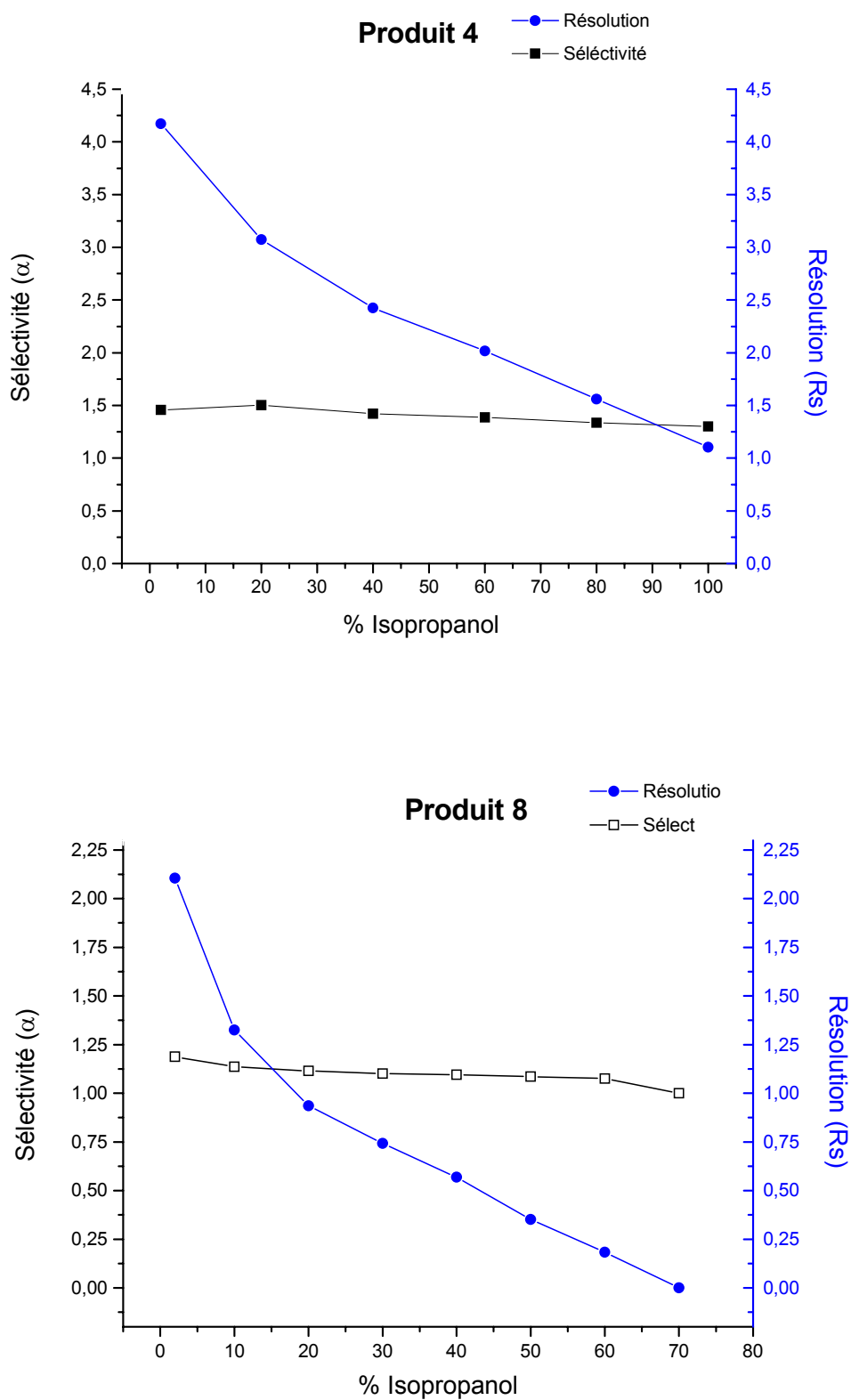


Figure 7: Effet de la composition de la phase mobile en isopropanol sur la sélectivité et sur la résolution des produits 4 et 8 sur la colonne C. (Phase mobile : heptane/isopropanol, 1 ml/mn, $\lambda_{254\text{nm}}$).

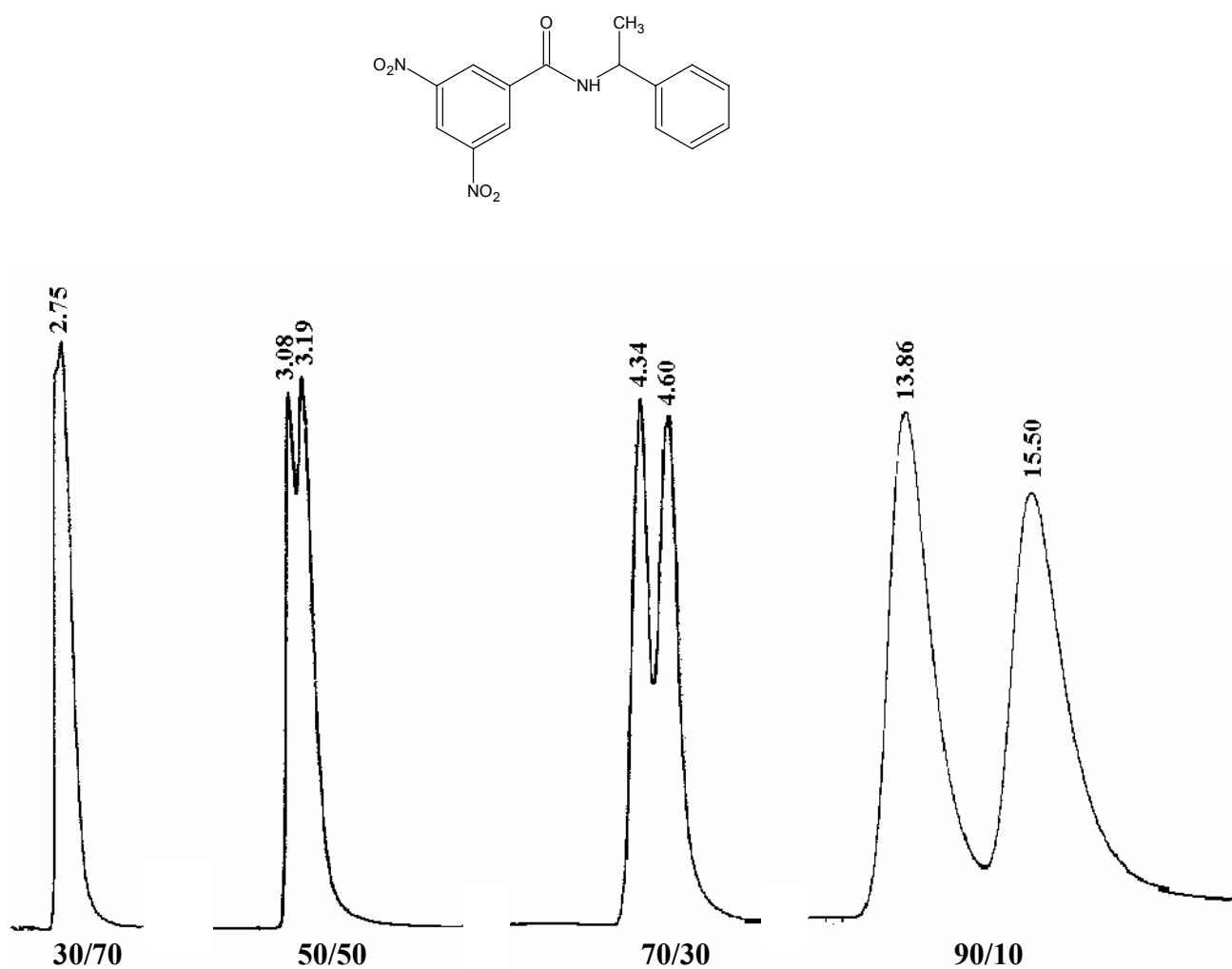


Figure 8 : Effet de la composition de la phase mobile (heptane/isopropanol) sur la résolution des énantiomères du produit 8 sur la colonne C. (Débit : 1 ml/mn, $\lambda_{254\text{nm}}$).

II-3-b Effet de la structure du soluté sur la résolution chirale:

Lorsqu'on compare les structures des cinq produits séparés : 4, 5, 6, 8 et 9, nous pouvons noter qu'ils portent tous des groupements 3,5-dinitrobenzoyle. Ces groupements sont susceptibles de former des liaisons de type π - π très fortes avec le groupement phényle de la cyclodextrine, 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.³⁸

Quant aux produits 10 et 9, on constate que si on substitue l'atome d'azote par un oxygène, cela a pour effet d'empêcher l'énantiosélectivité et de diminuer la rétention. Ceci indique que l'azote participerait à la formation des trois interactions nécessaires pour que la caractérisation chirale puisse se faire tel que le stipule Daglish.¹⁸

Pour le produit 1, nous pouvons supposer que c'est grâce aux 2 groupements naphthyle que la séparation chirale a pu se faire. Mais lorsqu'on substitue les 2 OH du produit 1 par des NH₂ (produit 3), la séparation chirale ne se fait plus cela peut être expliqué par le fait que l'oxygène est plus électronégatif que l'azote donc il formera des liaisons hydrogène plus fortes. Ainsi, il devient évident qu'un simple changement dans la structure du soluté peut largement affecter la séparation chirale.³⁵

Wainer et al, ont démontré que les facteurs stériques d'un soluté jouent un rôle très important dans le mécanisme de séparation chirale.³⁸ Ceci est clairement observé dans la différence des facteurs de rétention des cinq produits (4, 5, 6, 8 et 9). De plus, l'effet donneur des groupements méthyles altère l'acidité du groupement amide qui ne pourra plus former de liaisons hydrogène suffisamment fortes, ce qui réduira la sélectivité de la phase stationnaire vis-à-vis de ce type de soluté (produit 6).

La polarité de l'azote basique, augmente avec l'effet électron-donneur du groupement adjacent, ce qui améliore la sélectivité, par contre si les groupements adjacents sont électron-accepteurs, la polarité de l'azote se trouve diminuée et par conséquent la sélectivité est altérée.³³

[38] T. Wang, Y. W. Chen, *J. Chromatogr. A*, 1999, **855**, 411

II-3-c Effet de la nature de l'alcool sur la résolution chirale:

Le remplacement de l'isopropanol par l'éthanol a conduit à des changements significatifs dans le système chromatographique.²⁷ Notons qu'il y a séparation chirale pour les trois produits 4, 5 et 6 même avec une phase mobile à 100% en 2-propanol, et une résolution complète pour le produit 4, alors qu'avec une phase mobile à base d'éthanol le produit 4 est le seul à être partiellement séparé.

Pour la composition 90/10 en heptane, lorsqu'on passe de l'isopropanol à l'éthanol, on remarque que la sélectivité de la phase stationnaire diminue de manière significative,³⁷ quant à la résolution, sa variation est représentée sur la figure 9. Ainsi, il paraît clair que mis à part le produit 5, tous les composés ont de meilleures résolutions avec l'isopropanol comme modifiant organique.^{27,39}

La figure 10 nous donne les chromatogrammes du produit 8, obtenus avec la composition 90/10 en heptane/2-propanol et heptane/éthanol.

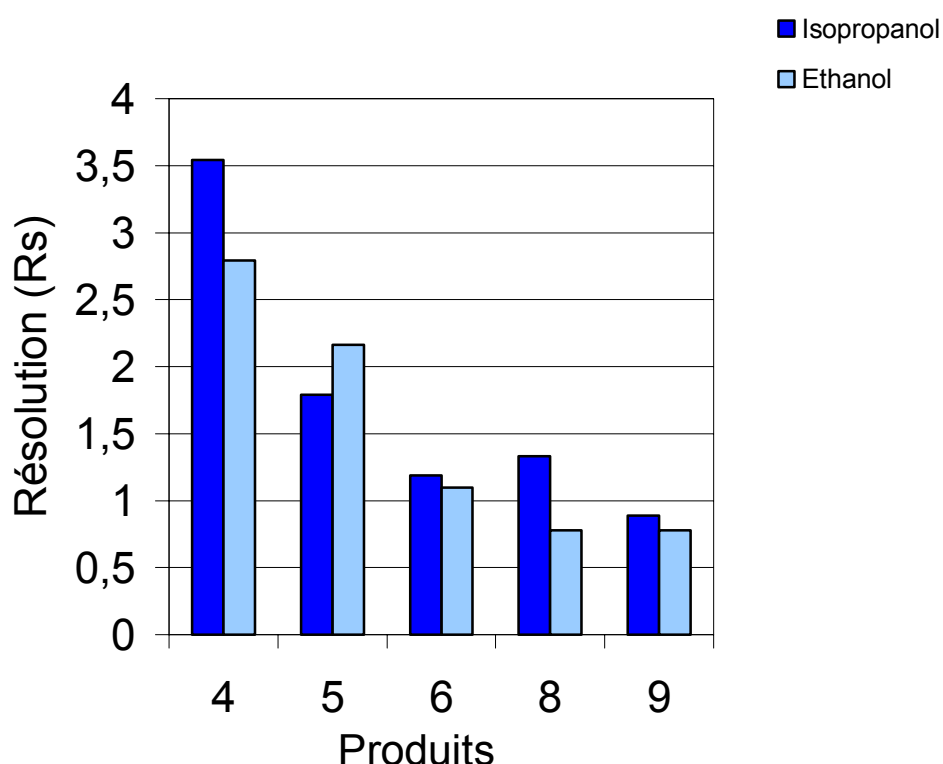


Figure 9: Variation de la résolution en fonction de la nature de l'alcool. Colonne C.

(Phase mobile : heptane/isopropanol : 90/10, 1 ml/mn, $\lambda_{254\text{nm}}$).

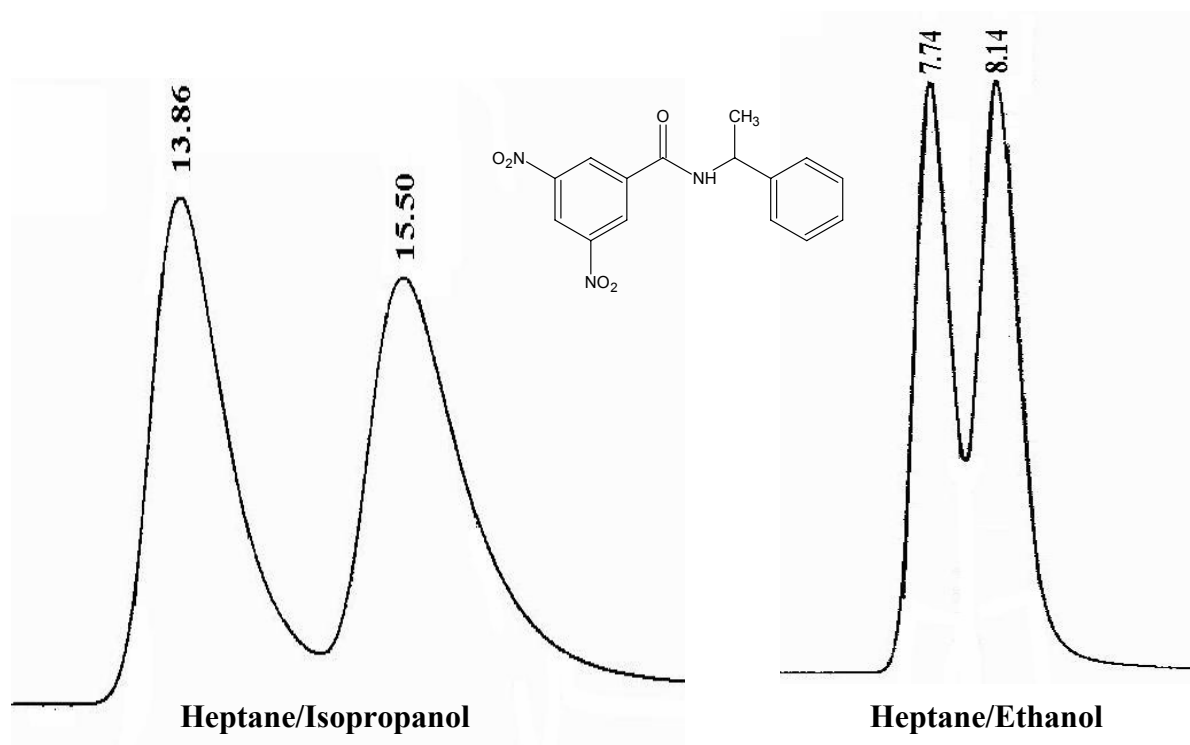


Figure 10 : Effet de la nature de l'alcool utilisé sur la séparation énantiomérique du produit 8 sur la colonne C. (Phase mobile: heptane/alcool: 90/10, 1 ml/mn, $\lambda_{254\text{nm}}$).

Ce comportement peut être expliqué par la différence de polarité des deux alcools.³⁸ Ainsi, l'isopropanol (indice de polarité p' 3.9) est moins polaire que l'éthanol (indice de polarité p' 4.3),^{38,40} les produits seront alors élués plus rapidement avec l'éthanol et la résolution sera altérée. Même avec les colonnes à base de tris (3,5-diméthylphenylcarbamate) cellulose, l'utilisation de l'EtOH au lieu du 2-PrOH conduit à une altération importante de la résolution.³⁸ Ce qui veut dire que la polarité du solvant est un paramètre déterminant dans le mécanisme de résolution chirale.

Ainsi, il devient important de noter que l'environnement chiral n'est pas le seul à influencer la caractérisation chirale en mode normal, mais aussi les facteurs achiraux telle que la structure du modifiant organique.²⁷

[40] C. L. Narayana, T. Suresh, S. Mahender Rao, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, **32**, 21

II-3-d Effet de l'ajout de modifiants anioniques et cationiques :

L'ajout d'un modifiant cationique tel que la diéthylamine (DEA) aux produits pharmaceutiques portants des groupements amines tels que les β -bloquants, ou d'un modifiant anionique tel que l'acide trifluoroacétique (TFA) pour les produits portants des groupements acides (herbicides acides ou anti-inflammatoires non stéroïdiens) est essentiel pour leur élution et éventuellement leur résolution.²⁷

Ainsi, l'acide trifluoroacétique a pour objet de diminuer l'étalement des pics et de favoriser la formation de liaisons hydrogène, et cela de manière à améliorer les performances du système chromatographique.³¹ En effet, l'ajout d'un acide agit de manière à ce que le groupement carbonyle du soluté racémique, soit sous sa forme ionisée, ce qui facilitera la formation de liaisons hydrogène avec le groupement carbamate du sélecteur chirale,⁴¹ ceci pourrait expliquer la résolution du naproxène (Tableau III).

Quant à la diéthylamine, elle est ajoutée dans le but de masquer les groupements silanols 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;²⁶ ces interactions secondaires vont augmenter la rétention du soluté sans que la reconnaissance chirale ne puisse avoir lieu. Dans notre cas l'utilisation de la DEA a permis l'élution des β -bloquants, mais pas leur résolution, ceci peut être dû au fait que les groupements mis en jeu dans les interactions entre la phase stationnaire et le soluté ne soient pas stéréospécifiques.

II-3-e Effet du débit sur la résolution chirale:

Nous avons fait varier le débit pour cinq produits chiraux : 4, 5, 6, 8, 9. Les résultats obtenus sont présentés sur le tableau IV.

Nous avons pu constater que le débit n'a aucun effet sur la sélectivité, mais que les meilleures résolutions sont obtenues avec un débit de 0.2 ml/mn.

Ainsi, avec l'augmentation du débit, le soluté passe plus de temps dans la phase stationnaire ce qui permet au complexe d'inclusion de se former, ce qui explique l'amélioration de la résolution des deux énantiomères.

[41] F. Leonelli, B. Garofalo, L. M. Migneco, R. M. Bettolo, *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, 2003, **26(3)**, 401

Tableau IV: Effet du débit sur la sélectivité et la résolution de différents solutés sur la colonne C.*							
Produits	Débit (ml/mn)	tr ₁	k' ₁	tr ₂	k' ₂	α	Rs
4	1,2	4,42	2,01	5,66	2,85	1,42	2,92
	1	5,35	2,01	6,96	2,91	1,45	3,03
	0,8	6,84	2,08	8,85	2,99	1,44	3,03
	0,6	9,30	2,16	12,11	3,12	1,44	2,88
	0,4	13,93	2,14	18,09	3,08	1,44	3,03
	0,2	27,86	2,13	36,16	3,07	1,44	3,46
5	1,2	4,78	2,25	5,54	2,77	1,23	1,32
	1	5,84	2,28	6,85	2,85	1,25	1,39
	0,8	7,47	2,36	8,74	2,94	1,24	1,41
	0,6	10,24	2,48	12,08	3,11	1,25	1,53
	0,4	15,25	2,44	17,87	3,03	1,24	1,48
	0,2	30,48	2,43	35,66	3,01	1,24	1,62
6	1,2	3,62	1,46	3,86	1,63	1,11	0,91
	1	4,39	1,47	4,70	1,64	1,12	1,13
	0,8	5,52	1,49	5,89	1,65	1,11	0,99
	0,6	7,57	1,57	8,10	1,76	1,11	0,96
	0,4	11,31	1,55	12,10	1,73	1,11	1,09
	0,2	22,65	1,55	24,24	1,73	1,12	1,22
8	1,2	3,60	1,45	3,82	1,60	1,10	0,70
	1	4,34	1,44	4,60	1,58	1,10	0,74
	0,8	5,49	1,47	5,82	1,62	1,10	0,75
	0,6	7,46	1,54	7,94	1,70	1,11	0,80
	0,4	11,20	1,53	11,93	1,69	1,11	0,88
	0,2	22,43	1,52	23,89	1,69	1,11	1,01
9	1,2	3,70	1,52	3,86	1,63	1,07	0,42
	1	4,46	1,51	4,64	1,61	1,07	0,44
	0,8	5,64	1,54	5,88	1,65	1,07	0,51
	0,6	7,69	1,62	8,04	1,73	1,07	0,64
	0,4	11,50	1,60	12,05	1,72	1,08	0,68
	0,2	23,06	1,59	24,14	1,72	1,08	0,70
* Phase mobile : heptane/isopropanol :70/30, λ_{254nm} .							

La figure 11, nous donne la variation de la sélectivité et de la résolution des deux produits 4 et 9 vis-à-vis du débit. Il est à noter que la sélectivité n'est pas influencée par le débit dans les deux cas. Concernant la résolution, nous pouvons constater d'une manière générale qu'elle augmente progressivement avec la diminution du débit.²⁶

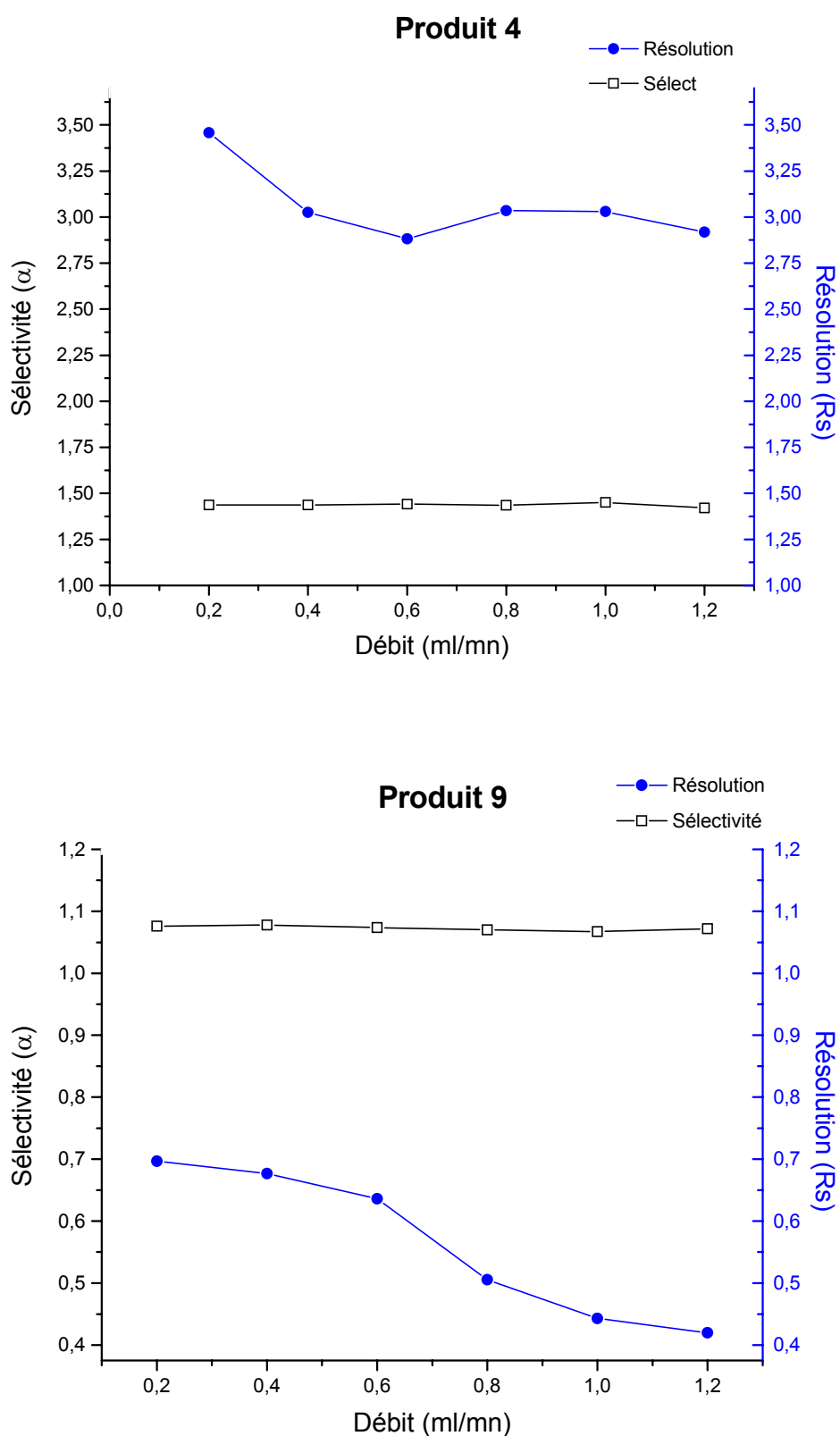


Figure 11: Variation de la sélectivité et de la résolution en fonction du débit pour les produits 4 et 9. (Colonne C, phase mobile : heptane/isopropanol : 70/30, $\lambda_{254\text{nm}}$).

III- Conclusion :

Lors du test d'une colonne, le mode normal est étudié en premier, car c'est le mode qui permet de garder les propriétés chromatographiques de la colonne intactes à la fin du test.

Mise à part la colonne à base de β -cyclodextrine non dérivée, les deux autres colonnes : l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine et la phényl-hydroxypropyl- β -cyclodextrine, se sont montrées très stables durant ce mode, mais les séparations chirales n'ont été obtenues que sur la troisième colonne : la phényl-hydroxypropyl- β -cyclodextrine.

Ceci confirme que la présence de groupements aromatiques et carbamates dans la phase stationnaire est nécessaire pour qu'elle puisse être efficace en mode normal. Nous pouvons expliquer cela par le fait que ces groupements sont susceptibles de générer des interactions attractives avec le soluté, dans le but de former des complexes diastéréomériques nécessaires pour la reconnaissance chirale.

Cependant, comme cela a été démontré dans ce travail, les interactions attractives préférentielles peuvent ne pas être les seuls facteurs déterminants de la séparation chirale, les interactions stériques entre les substituants adjacents au centre chirale du soluté et la phase stationnaire peuvent jouer un rôle significatif dans la caractérisation chirale.

Ainsi, sur la colonne C, nous avons pu séparer neuf (9) produits optiquement actifs parmi eux des produits pharmaceutiques tels que les anti-inflammatoires non stéroïdiens. Nous avons également démontré les effets déterminants de la composition de la phase mobile, du débit ainsi que de la nature de l'alcool utilisé, dont la polarité est considérée comme un facteur clé dans le mécanisme de résolution chirale.

Chapitre III

LA SEPARATION CHIRALE EN MODE ORGANIQUE POLAIRE

I- Introduction :

Les phases stationnaires à base de cyclodextrine sont un outil universel dans le domaine de la séparation énantiomérique en chromatographie liquide.^{1,2} Elles sont stables et peuvent être utilisées avec une large gamme de solvants, que ce soit en mode inverse, normal ou en mode organique polaire.^{1,3}

Le mode organique polaire (MOP) a été introduit en 1987 par D. W. Armstrong qui le développa en premier lieu pour les phases stationnaires à base de β -cyclodextrine⁴ dans le but d'obtenir de meilleures séparations chirales.^{5,6} Par la suite, ce mode se généralisa pour d'autres types de phases stationnaires tels que les protéines⁷ et les antibiotiques macrocycliques.^{5,8}

Le MOP est considéré comme étant une approche alternative pour les séparations énantiosélectives particulières pouvant se produire sur les phases stationnaires à base de cyclodextrine. Ce mode est plus proche du mode normal que du mode inverse.^{5,6} La phase mobile peut être constituée : d'un solvant organique pur,³ tel que l'éthanol, l'acétonitrile ou l'isopropanol, ou alors le cas le plus utilisé:^{5,9} un mélange majoritaire d'acétonitrile et une petite quantité de méthanol, auquel on ajoute l'acide acétique et la triéthylamine,^{3,6} dans le but de diminuer la rétention et d'augmenter la sélectivité. Le rapport acide/base est considéré comme un facteur clé pour l'amélioration de l'énantioséparation.^{6,10,11}

Les principales interactions mises en jeu dans le mode organique polaire sont:^{6,12}

- Les liaisons hydrogène.
- Les interactions de type stérique.
- Les interactions de type π - π .
- Les interactions dipole-dipole.

- [1] E. Schneiderman, A. M. Stalcup, *J. Chromatogr. B*, 2000, **745**, 99
[2] Z. Juvancz, *Trends Anal. Chem.*, 2002, **21(5)**, 379
[3] D. W. Armstrong, M. Hilton, L. Coffin, *LC-GC*, 1992, **9**, 647
[4] T. E. Beestley, J. T. Lee, *Recent Developments in LC Column Technology*, June 2003
[5] D. W. Armstrong, *Direct Enantiomeric Separations in Liquid Chromatography and Gas Chromatography*, edited by H. J. Issaq, *Century of Separation Science*, Marcel Dekker, New York, 2002, Chapitre 33
[6] A. Péter, G. Torok, D. W. Armstrong, G. Toth, D. Tourwé, *J. Chromatogr. A*, 2000, **904**, 1
[7] C. Rustichelli, V. Ferioli, G. Gamberini, R. Stancanelli, *Chromatographia*, 2001, **54**, 731
[8] M. H. Iha, A. S. Martinez, P. S. Bonato, *J. Chromatogr. B*, 2002, **767**, 1
[9] G. Félix, C. Cachau, A. Thienpont, M.-H. Soulard, *Chromatographia*, 1996, **42(9/10)**, 583
[10] Chiral Separation. *A Guide to using cyclodextrin bonded phases for liquid chromatography*, ASTEC, Advanced Separation Technologies Inc., USA, 1997
[11] A. Peter, J. Kaman, F. Fülöp, J. Van Der Eycken, *J. Chromatogr. A*, 2001, **919**, 79
[12] G. Torok, A. Péter, D. W. Armstrong, D. Tourwé, G. Toth, J. Sapi, *Chirality*, 2001, **13**, 648

En milieu organique aqueux, les cyclodextrines forment des complexes d'inclusion de type hôte-invité,¹³⁻¹⁵ avec des molécules, des ions ou des solvants,⁵ et cela grâce à la cavité interne de la cyclodextrine qui a tendance à être plus hydrophobe que son extérieur.^{1,15} La majorité des molécules non polaires préfèrent ainsi se loger dans la cavité de la cyclodextrine tel que cela est présenté sur la figure 1.

Ainsi, l'utilisation d'un solvant polaire organique aprotique tel que l'acétonitrile, peut prévenir la formation d'un complexe d'inclusion entre la cyclodextrine et le soluté.⁵

L'acétonitrile (composant principal de la phase mobile), a tendance à occuper la cavité de la cyclodextrine et accentue ainsi les liaisons hydrogène entre les groupements hydroxyles de la cyclodextrine et les groupements fonctionnels du soluté susceptibles de former des liaisons hydrogène.⁹ Un solvant protique tel que le méthanol peut être ajouté, afin de contrôler la rétention des composés trop retenus.⁵

De petites quantités d'acide acétique (HOAc) et de triéthylamine (TEA) sont ajoutées pour contrôler la protonation du soluté et améliorer ainsi l'énantiosélectivité.^{9,5}

Dans ce mode, le soluté est supposé se placer au sommet de la structure de la cyclodextrine de manière à maximiser les liaisons hydrogène^{5,9} (Fig.1).

Les composés chiraux contenant deux groupements susceptibles de générer des liaisons hydrogène (dont l'un serait en position α ou β du centre stéréogène) ainsi qu'un groupement volumineux de type aromatique, sont souvent résolus via cette approche.^{3,10}

- [13] F. Tazerouti, *Synthèse, caractérisation et application des phases stationnaires chirales en chromatographie liquide*, Thèse de Doctorat, 2001, ALGER, U.S.T.H.B.
- [14] Y. Gong, H. K. Lee, *J. Sep. Sci.*, 2003, **26**, 515
- [15] N. Grobuschek, L. Sriphong, M. G. Schmid, T. Lorand, H. Y. Aboul-Enein, G. Gubitz, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2002, **53**, 25
- [16] M. A. Schwarz, P. C. Hauser, *J. Chromatogr. A*, 2001, **928**, 225

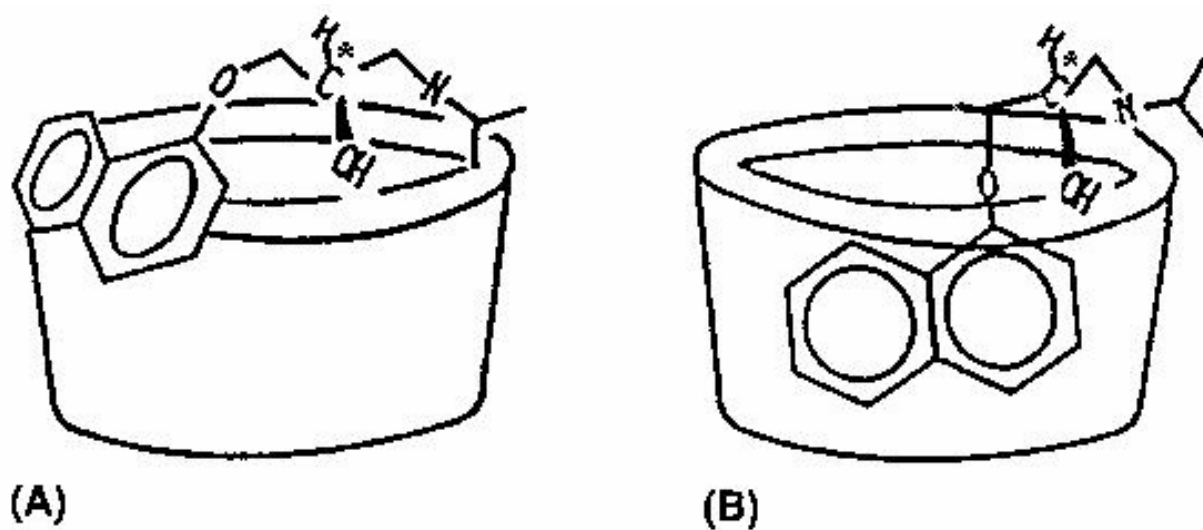


Figure 1 : Schéma simplifié illustrant les deux mécanismes de rétention énantiosélectives de la β -cyclodextrine non dérivée vis-à-vis du propranolol : (A) mode organique polaire ; (B) mode inverse.

II- Résultats et discussion :

La séparation des produits optiquement actifs, en mode organique polaire, a été effectuée sur les trois colonnes : la β -cyclodextrine non dérivée (colonne A), l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (colonne B) et la phényl-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (colonne C).

Le choix de la phase mobile, s'est fait en se basant sur la littérature et en utilisant un protocole expérimental proposé par ASTEC (Advanced Separation Technologies Inc.; firme qui produit et qui commercialise les phases stationnaires chirales à base de cyclodextrines)¹⁰ (Fig.2).

Nous avons commencé le test avec la phase mobile: acétonitrile/méthanol/acide acétique/triéthylamine: 95/5/0.3/0.2, pour les colonnes A et B, quant à la colonne C, avant d'utiliser cette phase mobile, nous avons testé plusieurs solvants organiques purs tels que l'isopropanol, l'éthanol et l'acétonitrile.

Le débit utilisé pour la colonne (A) est de 0.3 ml/mn et de 1 ml/mn pour les deux autres colonnes (B et C)*.

Pour chaque colonne nous avons calculé les facteurs de rétention des deux énantiomères (k'_1 , k'_2), de sélectivité (α) et de résolution (R_s), et cela en utilisant les relations suivantes:

$$k'_1 = \frac{tr_1 - tr_0}{tr_0}, \quad k'_2 = \frac{tr_2 - tr_0}{tr_0}, \quad \alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad \text{et} \quad R_s = \frac{2(tr_2 - tr_1)}{w_1 + w_2}$$

Avec:

tr_1 et tr_2 : temps de rétention des énantiomères.

tr_0 : temps mort.

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.

* Cf. Annexe C pour les conditions d'analyse.

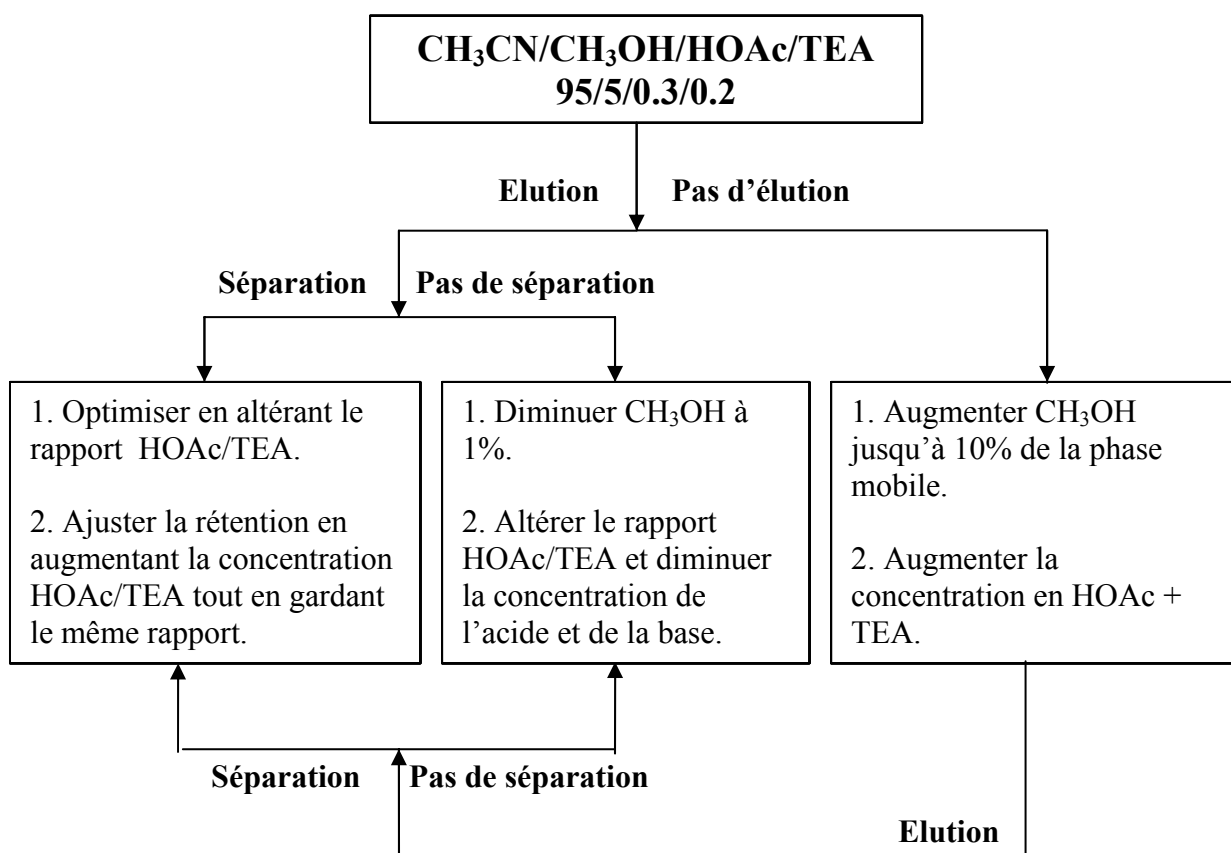


Figure 2 : Protocole proposé par ASTEC¹⁰ pour le test des colonnes à base de cyclodextrine en mode organique polaire (CH_3CN : Acétonitrile, CH_3OH : Méthanol, HOAc: Acide acétique, TEA: Triéthylamine)

II-1 Test de la phase stationnaire à base de β -cyclodextrine non dérivée (colonne A):

Les résultats obtenus sur cette colonne sont présentés sur le tableau I :

Tableau I : Analyse des produits optiquement actifs sur la colonne A en mode organique polaire.							
Produits	CH ₃ CN/MeOH/HOAc/TEA [*]	tr ₁	k ₁	tr ₂	k ₂	α	Rs
1 ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	7,63	0,24	7,63	0,24	1,00	0,00
2 ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	7,70	0,25	7,70	0,25	1,00	0,00
4 ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	6,67	0,08	6,67	0,08	1,00	0,00
5 ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	6,54	0,06	6,54	0,06	1,00	0,00
6 ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	6,48	0,05	6,48	0,05	1,00	0,00
7 ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	6,75	0,10	6,75	0,10	1,00	0,00
8 ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	6,86	0,11	6,86	0,11	1,00	0,00
9 ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	6,57	0,07	6,57	0,07	1,00	0,00
11 ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	6,66	0,08	6,66	0,08	1,00	0,00
12 ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	6,70	0,09	6,70	0,09	1,00	0,00
13 ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	7,92	0,29	7,92	0,29	1,00	0,00
16 ^b	95 / 5 / 0,3 / 0,2	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t
17 ^b	95 / 5 / 0,3 / 0,2	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t
18 ^b	95 / 5 / 0,3 / 0,2	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t
19 ^b	95 / 5 / 0,3 / 0,2	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t
20 ^c	95 / 5 / 0,3 / 0,2	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t
21 ^d	95 / 5 / 0,3 / 0,2	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t
22 ^c	95 / 5 / 0,3 / 0,2	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t

Tableau I : Suite

Produits	CH ₃ CN/MeOH/HOAc/TEA *	tr ₁	k ₁	tr ₂	k ₂	α	Rs
Fluazifop-butyl ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	6,22	0,01	6,22	0,01	1,00	0,00
Haloxifop-éthoxyéthyl ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	6,16	0,00	6,16	0,00	-	-
Benzoïne ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	6,98	0,13	6,98	0,13	1,00	0,00
Lorazepam ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	9,42	0,53	9,42	0,53	1,00	0,00
Lormetazepam ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	7,54	0,22	7,54	0,22	1,00	0,00
Oxazepam ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	9,17	0,49	9,17	0,49	1,00	0,00
Temazepam ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	7,49	0,22	7,49	0,22	1,00	0,00
Warfarine ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	6,74	0,09	6,74	0,09	1,00	0,00
Propranolol ^c	95 / 5 / 0,3 / 0,2	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t
Tertatolol ^b	95 / 5 / 0,3 / 0,2	33,81	4,49	33,81	4,49	1,00	0,00
Verapamil ^c	95 / 5 / 0,3 / 0,2	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t
Indapamide ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	8,14	0,32	8,14	0,32	1,00	0,00
Naproxène ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	22,86	2,71	22,86	2,71	1,00	0,00
Ketoprofène ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	21,07	2,42	21,07	2,42	1,00	0,00
Ibuprofène ^c	95 / 5 / 0,3 / 0,2	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t

* : Acétonitrile/méthanol/acide acétique/triéthylamine: 95/5/0.3/0.2; 0.3 ml/mn

^a: λ_{254nm}. ^b: λ_{220 nm}. ^c: λ_{230 nm}. ^d: λ_{206 nm}. ^e: λ_{200 nm}.

n.t : non testé

Les résultats obtenus montrent que les solutés sont élués trop rapidement pour permettre une quelconque séparation chirale, même en utilisant des phases mobiles constituées uniquement d'acétonitrile.

De plus, cette colonne s'est montrée très instable lors de l'utilisation de l'acide acétique et de la triéthylamine. En effet, ces derniers présentent une absorbance UV pour les faibles longueurs d'onde, ce qui n'a pas permis le test des solutés absorbants à des longueurs d'onde inférieures à 254 nm tels que les acides propioniques (les herbicides et les anti-inflammatoires non stéroïdiens) qui absorbent à 220 nm ou à 200 nm, ainsi que les β -bloquants et la verapamil (230 nm).

II-2 Test de la phase stationnaire à base d'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (colonne B):

Grâce aux groupements hydroxypropyles de cette phase stationnaire, les chances de formation de liaisons hydrogène essentielles pour la résolution chirale, sont augmentées,¹⁷ ce qui est sensé favoriser la formation des complexes diastéréomériques. Cependant lors du test des solutés racémiques, sur cette colonne aucune séparation chirale n'a pu être obtenue (le tableau II). Il est à noter que même avec 100% en acétonitrile, les produits sont élués trop rapidement, pour permettre une reconnaissance chirale.

[17] S. Rudaz, J. C. Veuthey, *Chirality*, 1999, **11**, 319

Tableau II : Test des produits optiquement actifs sur la colonne B en mode organique polaire.

Produits	CH ₃ CN/MeOH/HOAc/TEA [*]	tr ₁	k ₁	tr ₂	k' ₂	α	Rs
1 ^a	95/5/0,3/0,2	2,14	0,12	2,14	0,12	1,00	0,00
2 ^a	95/5/0,3/0,2	2,10	0,10	2,10	0,10	1,00	0,00
3 ^a	95/5/0,3/0,2	2,02	0,06	2,02	0,06	1,00	0,00
4 ^a	95/5/0,3/0,2	1,94	0,02	1,94	0,02	1,00	0,00
5 ^a	95/5/0,3/0,2	1,93	0,01	1,93	0,01	1,00	0,00
6 ^a	95/5/0,3/0,2	1,93	0,01	1,93	0,01	1,00	0,00
7 ^a	95/5/0,3/0,2	2,82	0,48	2,82	0,48	1,00	0,00
8 ^a	95/5/0,3/0,2	1,94	0,02	1,94	0,02	1,00	0,00
9 ^a	95/5/0,3/0,2	1,94	0,02	1,94	0,02	1,00	0,00
10 ^a	95/5/0,3/0,2	1,93	0,01	1,93	0,01	1,00	0,00
11 ^a	95/5/0,3/0,2	1,97	0,03	1,97	0,03	1,00	0,00
12 ^a	95/5/0,3/0,2	1,97	0,03	1,97	0,03	1,00	0,00
13 ^a	95/5/0,3/0,2	2,19	0,15	2,19	0,15	1,00	0,00
14 ^a	95/5/0,3/0,2	2,02	0,06	2,02	0,06	1,00	0,00
15 ^a	95/5/0,3/0,2	1,99	0,04	1,99	0,04	1,00	0,00
16 ^b	95/5/0,3/0,2	4,46	1,34	4,46	1,34	1,00	0,00
17 ^b	95/5/0,3/0,2	4,67	1,45	4,67	1,45	1,00	0,00
18 ^b	95/5/0,3/0,2	4,53	1,37	4,53	1,37	1,00	0,00
19 ^b	95/5/0,3/0,2	4,95	1,59	4,95	1,59	1,00	0,00
20 ^c	95/5/0,3/0,2	4,27	1,24	4,27	1,24	1,00	0,00
21 ^d	95/5/0,3/0,2	3,40	0,78	3,40	0,78	1,00	0,00
22 ^c	95/5/0,3/0,2	4,66	1,44	4,66	1,44	1,00	0,00

Tableau II : Suite

Produits	CH ₃ CN/MeOH/HOAc/TEA *	tr ₁	k ₁	tr ₂	k' ₂	α	Rs
Fluazifop-butyl ^a	95/5/0,3/0,2	1,89	-0,01	1,89	-0,01	1,00	0,00
Haloxifop-éthoxyéthyl ^a	95/5/0,3/0,2	1,89	-0,01	1,89	-0,01	1,00	0,00
Benzoïne ^a	95/5/0,3/0,2	1,99	0,04	1,99	0,04	1,00	0,00
Lorazepam ^a	95/5/0,3/0,2	2,23	0,17	2,23	0,17	1,00	0,00
Lormetazepam ^a	95/5/0,3/0,2	2,08	0,09	2,08	0,09	1,00	0,00
Oxazepam ^a	95/5/0,3/0,2	2,22	0,16	2,22	0,16	1,00	0,00
Temazepam ^a	95/5/0,3/0,2	2,07	0,08	2,07	0,08	1,00	0,00
Warfarine ^a	95/5/0,3/0,2	1,81	-0,05	1,81	-0,05	1,00	0,00
Propranol ^c	95/5/0,3/0,2	8,69	3,55	8,69	3,55	1,00	0,00
Tertatolol ^a	95/5/0,3/0,2	6,78	2,55	6,78	2,55	1,00	0,00
Verapamil ^c	95/5/0,3/0,2	3,34	0,75	3,34	0,75	1,00	0,00
Indapamide ^a	95/5/0,3/0,2	2,09	0,09	2,09	0,09	1,00	0,00
Naproxène ^a	95/5/0,3/0,2	5,20	1,72	5,20	1,72	1,00	0,00
Ketorofène ^a	95/5/0,3/0,2	5,02	1,63	5,02	1,63	1,00	0,00
Ibuprofène ^e	95/5/0,3/0,2	4,65	1,43	4,65	1,43	1,00	0,00
Nicardipine ^a	95/5/0,3/0,2	2,06	0,08	2,06	0,08	1,00	0,00

* : Acétonitrile/méthanol/acide acétique/triéthylamine: 95/5/0.3/0.2; 1 ml/mn

^a: λ_{254nm}. ^b: λ_{220 nm}. ^c: λ_{230 nm}. ^d: λ_{206 nm}. ^e: λ_{200 nm}.

II-3 Test de la phase stationnaire à base de phényl-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (colonne C) :

Grâce aux groupements carbamates et aromatiques de la phase stationnaire, la séparation chirale sera favorisée que ce soit en mode normal ou en mode organique polaire, et cela du fait que ces groupements sont susceptibles de générer des interactions attractives nécessaires pour la formation du complexe diastéréomérique.^{13,18}

Ce que nous pouvons noter c'est qu'avec une phase mobile constituée d'isopropanol pur, trois solutés racémiques ont été séparés : les produits 4, 5 et 6, alors qu'avec l'éthanol (plus polaire que l'isopropanol) seul le produit 4 a été partiellement séparé. Avec une phase mobile à base d'acétonitrile, aucun de ces produits (4, 5 ou 6) n'a pu être séparé, alors que le produit 13 a été partiellement séparé. Ceci démontre encore une fois que le mécanisme de séparation dépend énormément de la polarité de la phase mobile.^{19,20}

En résumé, 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.

Le tableau III, résume les différents résultats obtenus, avec les trois types de solvants (isopropanol, éthanol et acétonitrile).

Tableau III : Effet de la polarité du solvant organique sur la séparation chirale sur la colonne C, 1 ml/mn, λ_{254nm} .							
Produits	Phase mobile	tr ₁	k ₁	tr ₂	k' ₂	α	Rs
4	100% 2-PrOH	2,75	0,54	3,04	0,70	1,30	1,10
	100% EtOH	2,26	0,26	2,28	0,27	1,04	0,07
	100% CH ₃ CN	2,10	0,12	2,10	0,12	1,00	0,00
5	100% 2-PrOH	3,01	0,68	3,19	0,78	1,15	0,55
	100% EtOH	2,36	0,32	2,36	0,32	1,00	0,00
	100% CH ₃ CN	2,06	0,10	2,06	0,10	1,00	0,00
6	100% 2-PrOH	2,65	0,48	2,77	0,55	1,14	0,49
	100% EtOH	2,20	0,23	2,20	0,23	1,00	0,00
	100% CH ₃ CN	2,01	0,07	2,01	0,07	1,00	0,00
7	100% i-PrOH	2,59	0,45	2,59	0,45	1,00	0,00
	100% EtOH	2,36	0,32	2,36	0,32	1,00	0,00
	100% CH ₃ CN	5,22	1,78	5,85	2,11	1,19	0,79

[18] A. Anan'eva, E. N. Shapovalova, S. A. Lopatin, O. A. Shpigun, V. P. Varlamov, V. A. Davankov, D. W. Armstrong, *J. Anal. Chem.*, 2002, **57**(4), 393

[19] C. L. Narayana, T. Suresh, S. Mahender Rao, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, **32**, 21

[20] M. Péter, A. Péter, J. Van Der Eycken, P. Cosmos, G. Bernath, F. Fulop, *J. Chromatogr. A*, 1998, **816**, 123

Les chromatogrammes du produit 4 testé avec les 3 types de solvants sont présentés sur la figure 3.

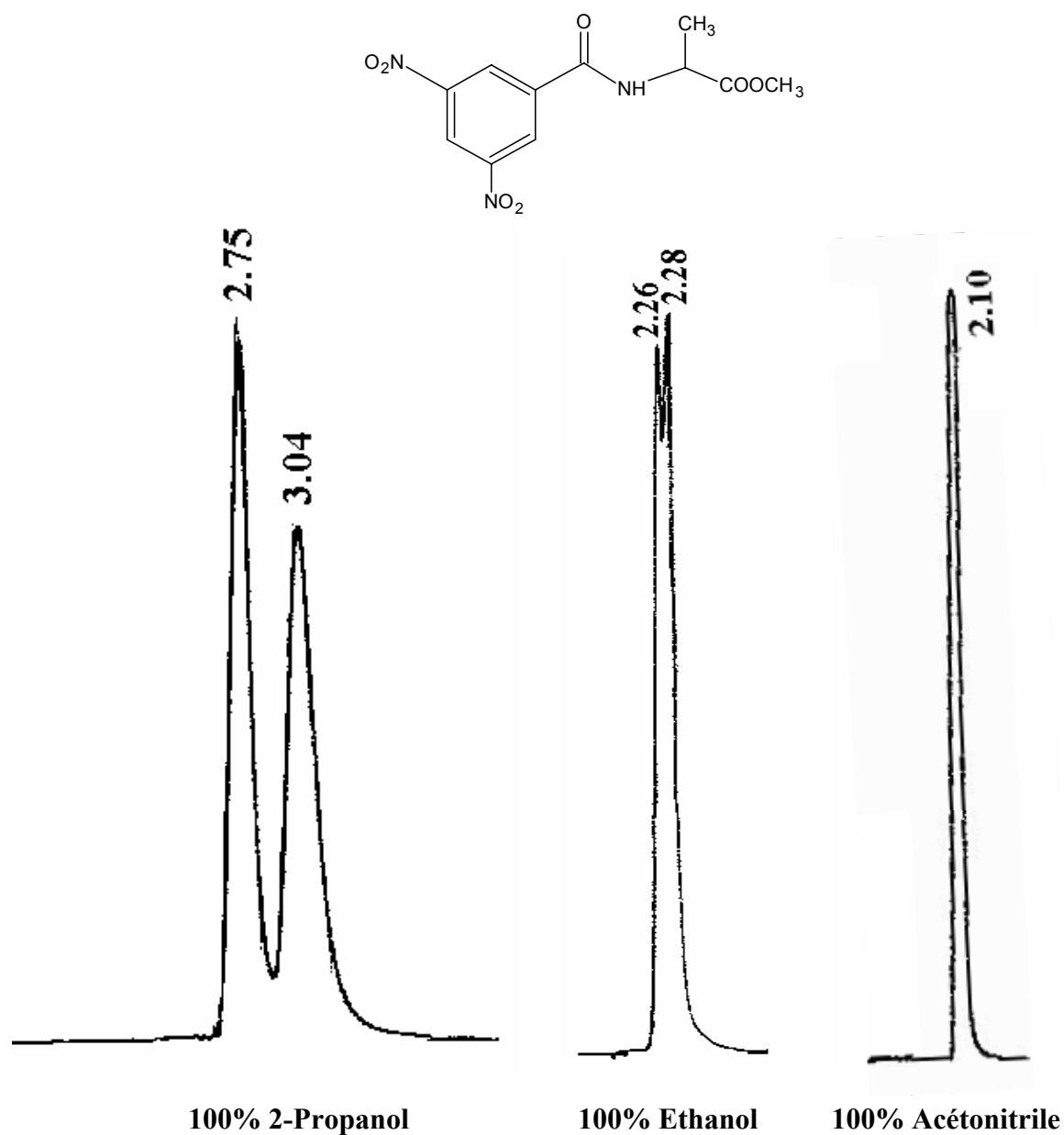


Figure 3 : Variation de la résolution du produit 4 en fonction de la nature du solvant organique. (Colonne C, 1 ml/mn, λ_{254} nm).

Le tableau IV regroupe les résultats obtenus avec la phase mobile CH₃CN/MeOH/HOAc/TEA.

Tableau IV : Séparation des solutés racémiques sur la colonne C en mode organique polaire.							
Produits	CH ₃ CN/MeOH/HOAc/TEA *	tr ₁	k ₁	tr ₂	k ₂	α	Rs
1 ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	2,16	0,19	2,16	0,19	1,00	0,00
2 ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	2,06	0,14	2,06	0,14	1,00	0,00
3 ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	2,06	0,14	2,06	0,14	1,00	0,00
4 ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	1,98	0,09	1,98	0,09	1,00	0,00
5 ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	2,02	0,12	2,02	0,12	1,00	0,00
6 ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	1,94	0,07	1,94	0,07	1,00	0,00
7 ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	3,14	0,73	3,14	0,73	1,00	0,00
8 ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	2,00	0,10	2,00	0,10	1,00	0,00
9 ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	2,03	0,12	2,03	0,12	1,00	0,00
10 ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	2,02	0,12	2,02	0,12	1,00	0,00
11 ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	1,97	0,09	1,97	0,09	1,00	0,00
12 ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	1,94	0,07	1,94	0,07	1,00	0,00
13 ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	2,29	0,27	2,29	0,27	1,00	0,00
14 ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	2,03	0,12	2,03	0,12	1,00	0,00
15 ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	2,00	0,10	2,00	0,10	1,00	0,00
16 ^b	95 / 5 / 0,3 / 0,2	5,12	1,83	5,12	1,83	1,00	0,00
17 ^b	95 / 5 / 0,3 / 0,2	4,70	1,60	4,70	1,60	1,00	0,00
18 ^b	95 / 5 / 0,3 / 0,2	4,56	1,52	4,56	1,52	1,00	0,00
19 ^b	95 / 5 / 0,3 / 0,2	4,98	1,75	4,98	1,75	1,00	0,00
20 ^c	95 / 5 / 0,3 / 0,2	4,36	1,41	4,36	1,41	1,00	0,00

Tableau IV : Suite

Produits	CH ₃ CN/MeOH/ HOAc /TEA *	tr ₁	k ₁	tr ₂	k ₂	α	Rs
21 ^d	95 / 5 / 0,3 / 0,2	3,53	0,95	3,53	0,95	1,00	0,00
22 ^c	95 / 5 / 0,3 / 0,2	4,72	1,61	4,72	1,61	1,00	0,00
Fluazifop-butyl ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	1,84	0,02	1,84	0,02	1,00	0,00
Haloxifop-éthoxyéthyl ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	1,84	0,02	1,84	0,02	1,00	0,00
Benzoïne ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	2,01	0,11	2,01	0,11	1,00	0,00
Lorazepam^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	2,42	0,34	2,54	0,40	1,20	0,80
	98 / 02 / 0,12 / 0,08	2,62	0,41	2,78	0,49	1,21	0,91
Lormetazepam ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	2,20	0,22	2,20	0,22	1,00	0,00
Oxazepam^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	2,38	0,31	2,38	0,31	1,00	0,00
	98 / 02 / 0,12 / 0,08	2,58	0,39	2,68	0,44	1,14	0,50
Temazepam ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	2,18	0,20	2,18	0,20	1,00	0,00
Warfarine ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	1,90	0,05	1,90	0,05	1,00	0,00
Propranolol ^c	95 / 5 / 0,3 / 0,2	9,22	4,09	9,22	4,09	1,00	0,00
Tertatolol ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	7,34	3,06	7,34	3,06	1,00	0,00
Verapamil ^c	95 / 5 / 0,3 / 0,2	3,02	0,67	3,02	0,67	1,00	0,00
Indapamide ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	2,10	0,16	2,10	0,16	1,00	0,00
Naproxène ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	5,50	2,04	5,50	2,04	1,00	0,00
Ketoprofène ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	5,26	1,91	5,26	1,91	1,00	0,00
Ibuprofène ^c	95 / 5 / 0,3 / 0,2	4,50	1,49	4,50	1,49	1,00	0,00
Nicardipine ^a	95 / 5 / 0,3 / 0,2	2,06	0,14	2,06	0,14	1,00	0,00

* : Acétonitrile/méthanol/acide acétique/triéthylamine; 1 ml/mn

^a: λ_{254nm} · ^b: λ_{220 nm} · ^c: λ_{230 nm} · ^d: λ_{206 nm} · ^e: λ_{200 nm} ·

Sur les 38 solutés testés avec la phase mobile CH₃CN/MeOH/HOAc/TEA, seuls le lorazepam et l'oxazepam ont été partiellement séparés sur la colonne C (α = 1.21 et 1.14 respectivement). Leurs chromatogrammes sont présentés sur la figure 4.

La coélution des deux énantiomères de la temazepam et du lormetazepam peut être due à la méthylation de leur azote qui semble participer au mécanisme de résolution chirale par la formation de liaisons hydrogène avec la phase stationnaire.

Ainsi, lorsqu'on diminue les concentrations en acide acétique et en triéthylamine, les facteurs de rétention augmentent,¹¹ et par conséquent la résolution énantiomérique augmente.

Dans ce cas de figure, le mécanisme de la reconnaissance chirale doit être dû à la formation de liaisons hydrogène et/ou d'interactions de types π - π , entre les énantiomères et les groupements carbamates et aromatiques de la phase stationnaire,¹¹ ce qui explique l'importance de la concentration et du rapport acide/base, considérés comme les principaux régulateurs de ce type d'interactions.

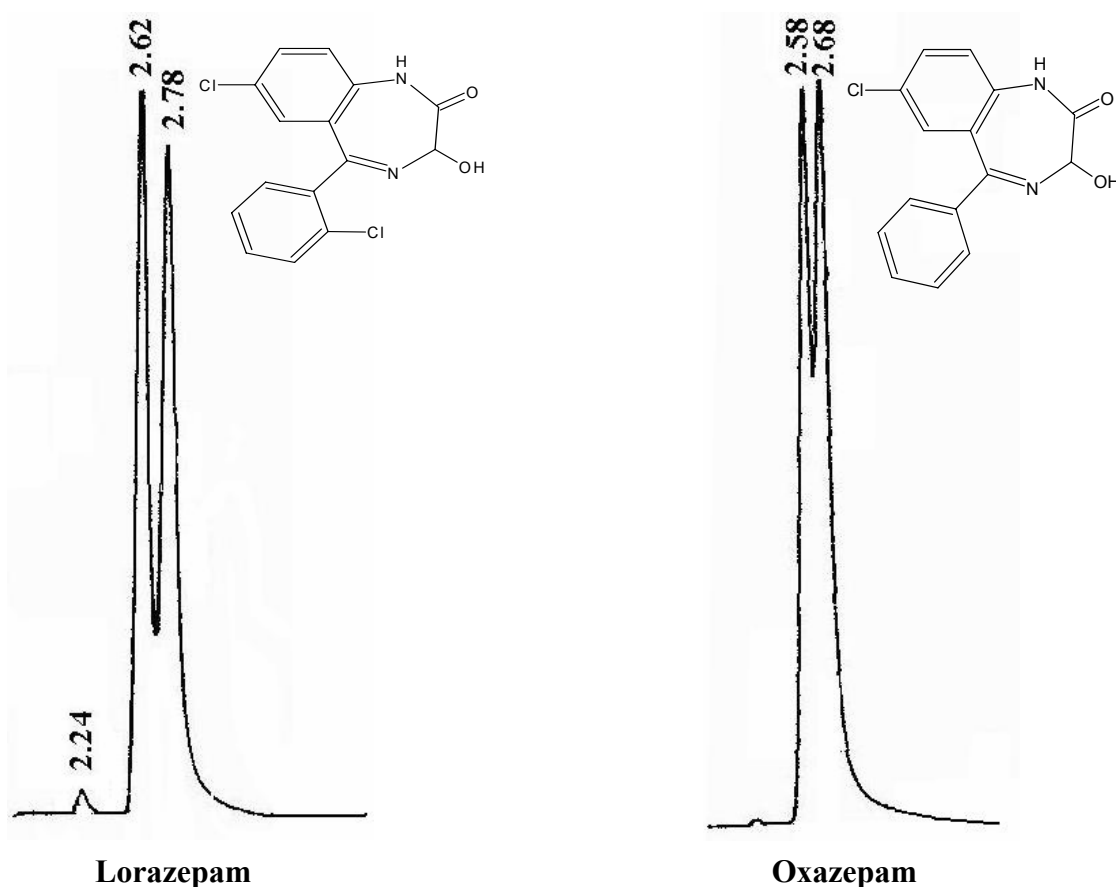


Figure 4 : Chromatogrammes des énantiomères du lorazepam et de l'oxazepam. (Colonne C, phase mobile : CH₃CN/MeOH/HOAc/TEA : 98 / 02 / 0,12 / 0,08, 1ml/mn, $\lambda_{254\text{nm}}$).

III- Conclusion :

Les deux premières colonnes : la β -cyclodextrine non dérivée et l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine, n'ont donné aucun résultat dans les conditions chromatographiques du mode organique polaire, et cela à cause de l'élution trop rapide des produits empêchant les interactions stéréosélectives de s'effectuer, de plus la β -cyclodextrine non dérivée s'est avérée très instable lors de l'ajout des acides et des bases, ce qui n'a pas permis de tester tous les produits optiquement actifs.

Quant à la troisième colonne : la phényl-hydroxypropyl- β -cyclodextrine, en plus de sa stabilité, elle a permis la séparation de six produits optiquement actifs ; il s'agit des solutés 4, 5, 6, 7, le lorazepam et l'oxazepam.

Nous avons pu noter la reproductibilité des séparations chirales obtenues sur la colonne C, et cela même après le passage de plusieurs autres solvants, ce qui confirme la multimodalité³ de cette phase stationnaire.

Chapitre IV

LA SEPARATION CHIRALE EN MODE INVERSE

I- Introduction :

C'est en mode inverse que les phases stationnaires à base de cyclodextrine sont les plus utilisées,¹ car c'est en milieu aqueux que ces molécules, dites « intelligentes »,² peuvent former des complexes d'inclusion. C'est grâce à cette propriété inédite,³ que les phases stationnaires à base de cyclodextrine ont connu un vif succès dans le domaine de la séparation chirale. Ce n'est qu'au milieu des années 80 que le concept d'inclusion ainsi que le mécanisme de la séparation chirale de ce type de phases furent assimilés.⁴

Cette aptitude à accueillir dans leurs cavités d'autres molécules de manière très sélective, a fait des cyclodextrines le sélecteur chiral le plus utilisé que se soit pour les techniques chromatographiques^{5,6} ou pour les techniques électrophorétiques.⁷

De nos jours, la majorité des séparations chirales en chromatographie liquide à haute performance reportées dans la littérature ont été réalisées avec des phases stationnaires à base de β -cyclodextrine.^{8,9,10}

La sélectivité et l'efficacité de la séparation chirale en chromatographie liquide, dépendent des propriétés de la phase stationnaire et de la composition de l'éluant.¹

Ainsi, en mode inverse, le mécanisme de la caractérisation chirale des cyclodextrines résulte de l'action concertée des interactions hydrophobes entre le soluté et l'intérieur de la cavité de la cyclodextrine, avec la formation de liaisons hydrogène entre les groupements polaires du soluté et les groupements hydroxyles de la cyclodextrine.¹¹

La stabilité du complexe d'inclusion dépend de la taille et de la polarité de la cyclodextrine, ainsi que de la manière par laquelle le soluté entre dans la cavité.⁸

- [1] A. Anan'eva, E. N. Shapovalova, S. A. Lopatin, O. A. Shpigun, V. P. Varlamov, V. A. Davankov, D. W. Armstrong, *J. Anal. Chem.*, 2002, **57(4)**, 393
- [2] B. Perly, F. Pilard, *Les cyclodextrines et leur Applications*, CLEFS CEA, **35**, 1997
- [3] E. Schneiderman, A. M. Stalcup, *J. Chromatogr. B*, 2000, **745**, 99
- [4] D. W. Armstrong, *Direct Enantiomeric Separations in Liquid Chromatography and Gas Chromatography*, edited by H. J. Issaq, *Century of Separation Science*, Marcel Dekker, New York, 2002, chapitre 33
- [5] S. C. Ng, T. T. Ong, P. Fu, C. B. Ching, *J. Chromatogr. A*, 2002, **968**, 31
- [6] M. Kato, T. Toyo'oka, *Chromatography*, 2001, **22(3)**, 159
- [7] O. Lecnik, M. G. Schmid, C. O. Kappe, G. Gübitz, *Electrophoresis*, 2001, **22**, 3198
- [8] F. Leonelli, B. Garofalo, L. M. Migneco, R. M. Bettolo, *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, 2003, **26(3)**, 401
- [9] Z. Juvancz, *Trends Anal. Chem.*, 2002, **21(5)**, 379
- [10] Y. C. Guillaume, J. F. Robert, C. Guinchart, *Talanta*, 2001, **55**, 263
- [11] M. D. Beeson, G. Vigh, *J. Chromatogr.*, 1993, **634**, 197

En d'autres termes, si les énantiomères forment des complexes d'inclusion et si des interactions stéréosélectives entre le centre chiral (ou les substituants adjacents au centre chiral) et les groupements hydroxyles de la cyclodextrine sont établies, alors la résolution chirale peut être obtenue.^{8,12,13}

Dans le but d'optimiser les performances du système chromatographique, nous avons étudié l'effet de la structure du soluté sur la séparation chirale, de la composition de la phase mobile, de la nature du modifiant organique et de la solution aqueuse utilisée, du pH du milieu ainsi que du débit de la phase mobile (les conditions d'analyse sont décrites en annexe C).

II- Résultats et discussion :

Le test des trois colonnes s'est fait suivant le protocole proposé par ASTEC¹⁴ (Advanced Separation Technologies Inc.) et schématisé sur la figure 1. Ce protocole nous permet d'avoir un gain de temps ainsi qu'une vue d'ensemble des différents paramètres pouvant améliorer ou altérer l'énantioséparation.

Pour les deux premières colonnes : la β -cyclodextrine non dérivée (colonne A) et l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (colonne B), la phase mobile initiale utilisée est un mélange d'acétonitrile et de tampon phosphate NaH_2PO_4 , de concentration 20 mmol et de pH 4,6.

Pour la phase phényl-hydroxypropyl β -cyclodextrine (colonne C), nous avons remplacé le tampon par l'eau et cela dans le but de préserver la colonne et de prolonger sa durée de vie.

[12] T. Y. Kim, H. J. Kim, *J. Chromatogr. A*, 2001, **933**, 83

[13] M. M. Hefnawy, J. T. Stewart, *Anal. Lett.*, 1999, **32(1)**, 159

[14] Chiral Separation. *A Guide to using cyclodextrin bonded phases for liquid chromatography*, ASTEC, Advanced Separation Technologies Inc., USA, 1997

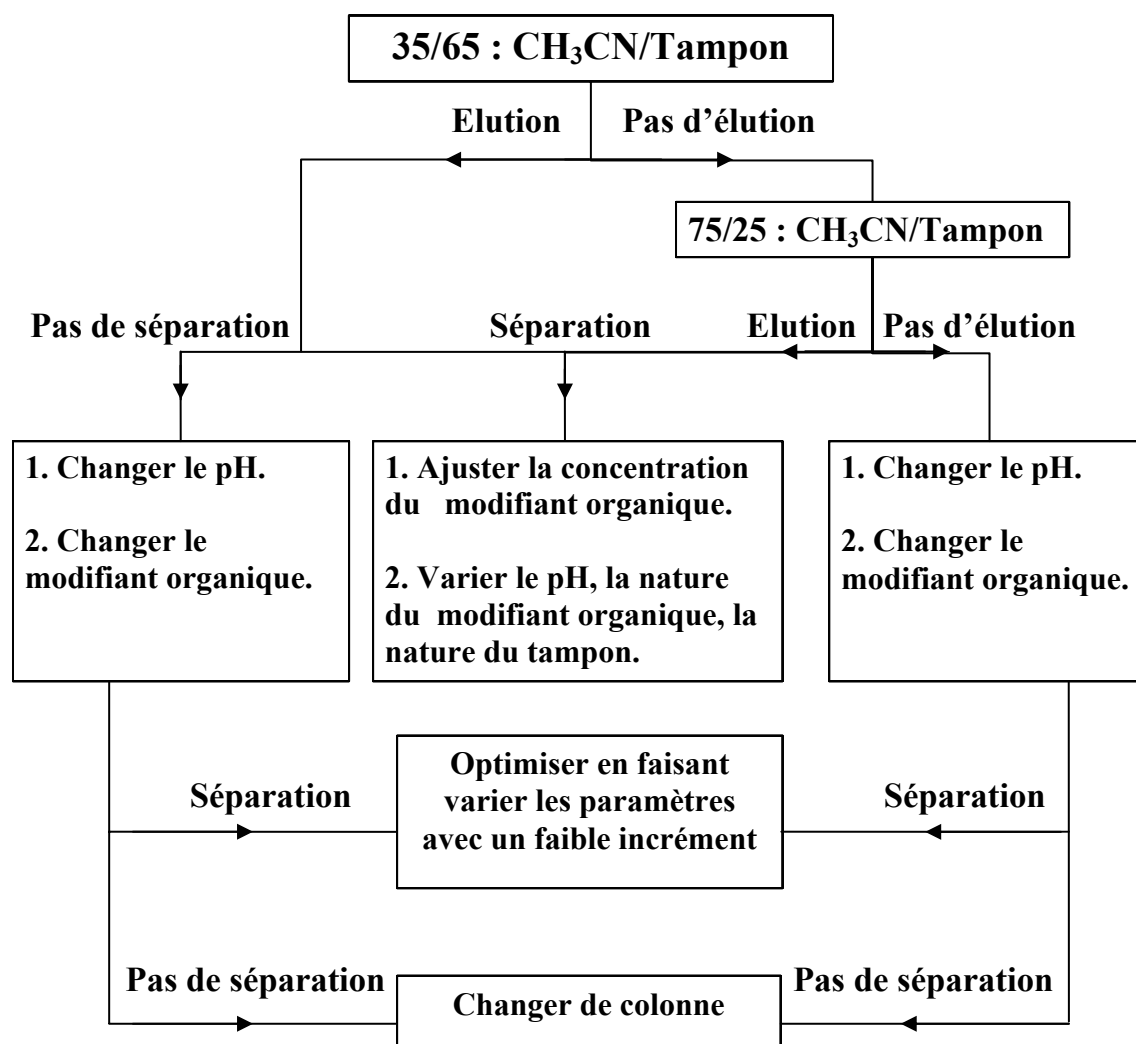


Figure 1 : Protocole proposé par ASTEC¹⁴ pour le test des colonnes à base de cyclodextrine en mode inverse (CH₃CN : Acétonitrile).

Le débit utilisé pour la colonne A est de 0.3 ml/mn et de 1 ml/mn pour les deux autres colonnes (B et C).

Pour chaque colonne nous avons calculé les facteurs de rétention des deux énantiomères (k'_1 et k'_2), de sélectivité (α) et de résolution (R_s), en utilisant les relations suivantes:

$$k'_1 = \frac{tr_1 - tr_0}{tr_0}, k'_2 = \frac{tr_2 - tr_0}{tr_0}, \alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \text{ et } R_s = \frac{2(tr_2 - tr_1)}{w_1 + w_2}$$

Avec:

tr_1 et tr_2 : temps de rétention des énantiomères

tr_0 : temps mort

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

Toutes les analyses ont été réalisées à température ambiante. Les structures des solutés injectés sont présentées en annexe A.

II-1 Test de la phase stationnaire à base de β -cyclodextrine non dérivée (colonne A) :

Les résultats chromatographiques obtenus avec cette colonne sont présentés dans le tableau I. Avec une phase mobile constituée d'acétonitrile et de tampon phosphate de pH 4.6, il n'y a que quatre composés séparés sur 32 solutés testés. Il s'agit du produit 12, la warfarine (un anticoagulant), ainsi que deux herbicides : le fluazifop-butyl et l'haloxyfop-éthoxyéthyl. Leurs chromatogrammes sont présentés dans la figure 2. Malgré la variation de la composition de la phase mobile aucun autre produit racémique n'a pu être séparé.

Tableau I: Séparation des produits optiquement actifs sur la phase stationnaire à base de β -Cyclodextrine non dérivée (colonne A)

Produits	Tampon/ CH_3CN^*	tr_1	k_1	tr_2	k_2	α	R_s
1 ^a	25/75	6,00	0,06	6,00	0,06	1,00	0,00
	75/25	32,14	3,85	32,14	3,85	1,00	0,00
2 ^a	25/75	6,94	0,23	6,94	0,23	1,00	0,00
	75/25	31,42	3,74	31,42	3,74	1,00	0,00
4 ^a	25/75	6,22	0,10	6,22	0,10	1,00	0,00
	75/25	17,55	1,65	17,55	1,65	1,00	0,00
5 ^a	25/75	6,03	0,07	6,03	0,07	1,00	0,00
	65/35	26,29	3,21	26,29	3,21	1,00	0,00
6 ^a	25/75	6,05	0,07	6,05	0,07	1,00	0,00
	75/25	38,35	4,78	38,35	4,78	1,00	0,00
8 ^a	25/75	6,21	0,10	6,21	0,10	1,00	0,00
	65/35	22,61	2,62	22,61	2,62	1,00	0,00
9 ^a	25/75	6,22	0,10	6,22	0,10	1,00	0,00
	50/50	20,11	1,58	20,11	1,58	1,00	0,00
11 ^a	25/75	6,26	0,11	6,26	0,11	1,00	0,00
	65/35	20,43	2,27	20,43	2,27	1,00	0,00
12 ^a	25/75	6,32	0,12	6,32	0,12	1,00	0,00
	65/35	20,94	2,36	30,61	3,91	1,66	2,36
13 ^a	25/75	7,50	0,33	7,50	0,33	1,00	0,00
	65/35	15,02	1,41	15,02	1,41	1,00	0,00
16 ^b	65/35	7,46	0,20	7,46	0,20	1,00	0,00
	75/25	8,30	0,25	8,30	0,25	1,00	0,00
17 ^b	65/35	7,92	0,27	7,92	0,27	1,00	0,00
	75/25	9,60	0,45	9,60	0,45	1,00	0,00
18 ^b	65/35	8,91	0,43	8,91	0,43	1,00	0,00
	75/25	11,70	0,76	11,70	0,76	1,00	0,00
19 ^b	65/35	9,34	0,50	9,34	0,50	1,00	0,00
	75/25	14,22	1,14	14,22	1,14	1,00	0,00
20 ^c	75/25	18,77	1,83	18,77	1,83	1,00	0,00

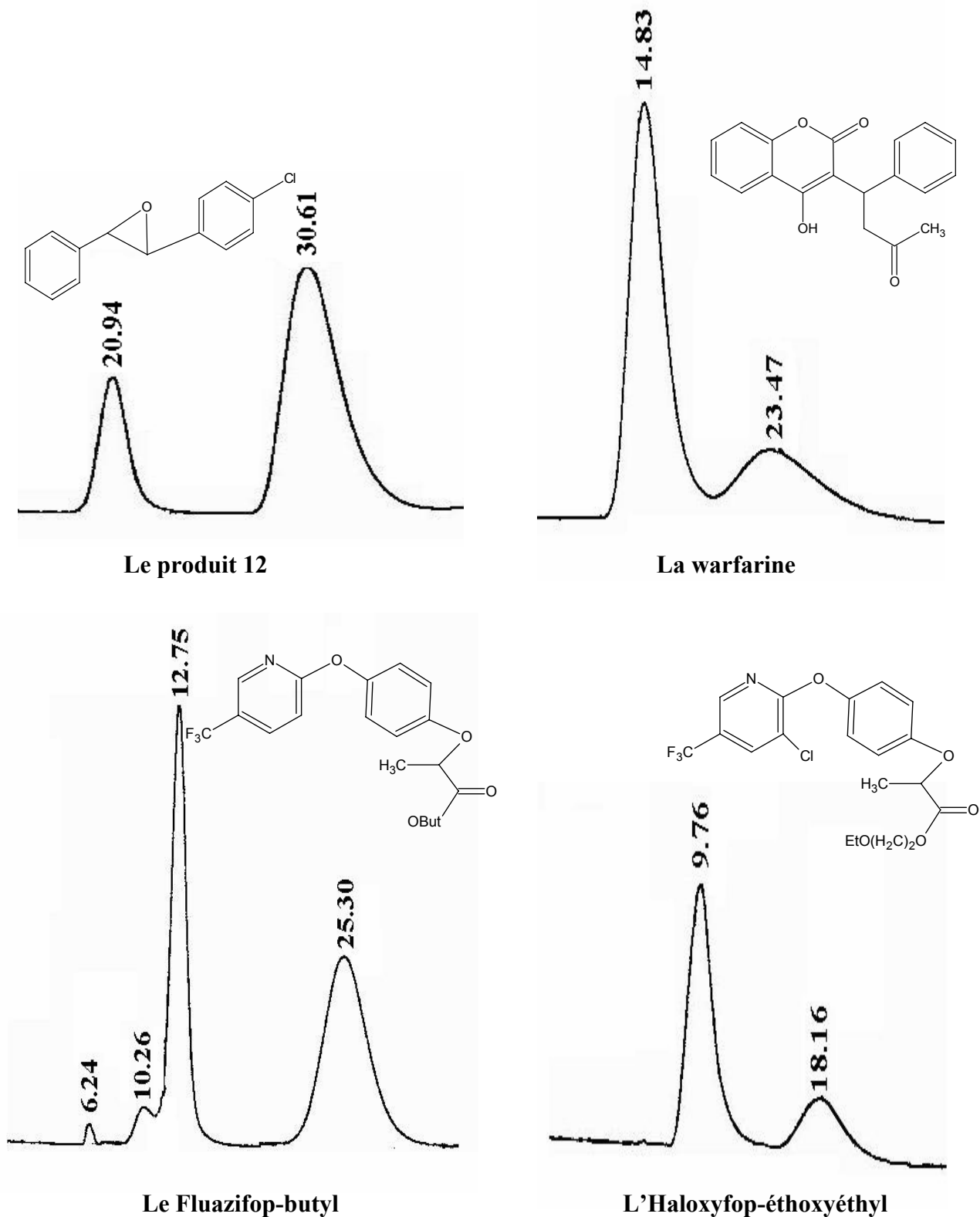


Figure 2 : Exemples de séparations chirales obtenues sur la colonne A (β -CD non dérivée).
(Phase mobile : Tampon/ CH_3CN : 65/35, débit : 0.3ml/mn, $\lambda_{254 \text{ nm}}$).

II-1-a Effet de la composition de la phase mobile sur la rétention:

Sur la figure 3, nous pouvons observer l'influence de la composition de la phase mobile sur les facteurs de rétention. Nous pouvons constater que le solvant organique (acétonitrile) a un effet négatif sur la rétention des solutés. Ce phénomène représente le comportement régulier de n'importe quel système chromatographique en mode inverse.^{11,15}

Lorsque le pourcentage en tampon augmente, la résolution est améliorée, nous pouvons voir cela sur la figure 4 avec les chromatogrammes du fluazifop-butyl pour différentes compositions de phases mobiles.

Plus les produits sont retenus, meilleure est la résolution, car les solutés ont tendance à passer plus de temps dans la phase stationnaire, ce qui leur permettrait de mieux interagir avec la cyclodextrine. Ainsi, il devient évident qu'une quantité importante de modifiant organique peut altérer la séparation chirale,¹⁶ comme cela a été vu pour la composition 25/75 en tampon/acétonitrile pour le fluazifop-butyl (Fig.4).

A. Bielejewska¹⁷ a énuméré 5 raisons afin d'expliquer l'effet du solvant organique, qui défavorise la formation du complexe d'inclusion entre le soluté et la cyclodextrine :

1. Les interactions hydrophobes diminuent avec l'ajout du modifiant organique alors qu'elles ont une contribution majeure dans la stabilité du complexe dans l'eau.
2. Les interactions de dispersion entre le solvant et le soluté déstabilisent elles aussi le complexe d'inclusion.
3. La 3^{ème} hypothèse invoque l'équilibre stœchiométrique incluant l'eau dans le complexe.
4. Le solvant organique est en compétition avec le soluté concernant l'inclusion à l'intérieur de la cavité.
5. Le solvant organique est lui aussi inclus avec le soluté dans la cavité de la cyclodextrine.

[15] A. Ceccato, P. Hubert, P. De Tullio, J.-F. Liégeois, A. Felikidis, J. Géczy, J. Crommen, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1998, **18**, 605

[16] K. Lemr, J. Seveik, D. Friedecky, A. Jonakova, D. Jirovsky, *Acta Univ. Palacki. Olomouc.*, 1999, *Chemica* **38**, 41

[17] A. Bielejewska, K. Duszezyk, D. Sybilska, *J. Chromatogr. A*, 2001, **931**, 81

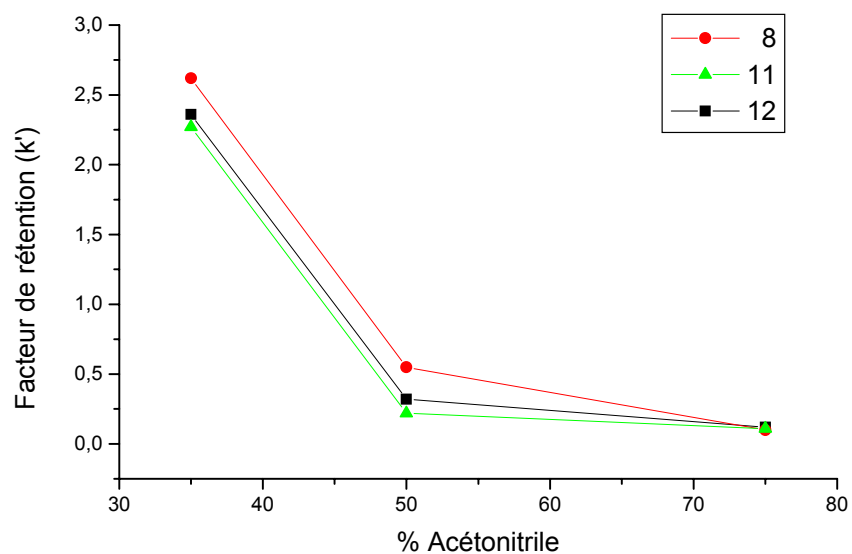


Figure 3 : Influence de la composition de la phase mobile en acétonitrile sur les facteurs de rétention des produits : 8, 11 et 12 sur la colonne A. (Phase mobile : Tampon / CH₃CN, 0.3ml/mn, λ_{254} nm).

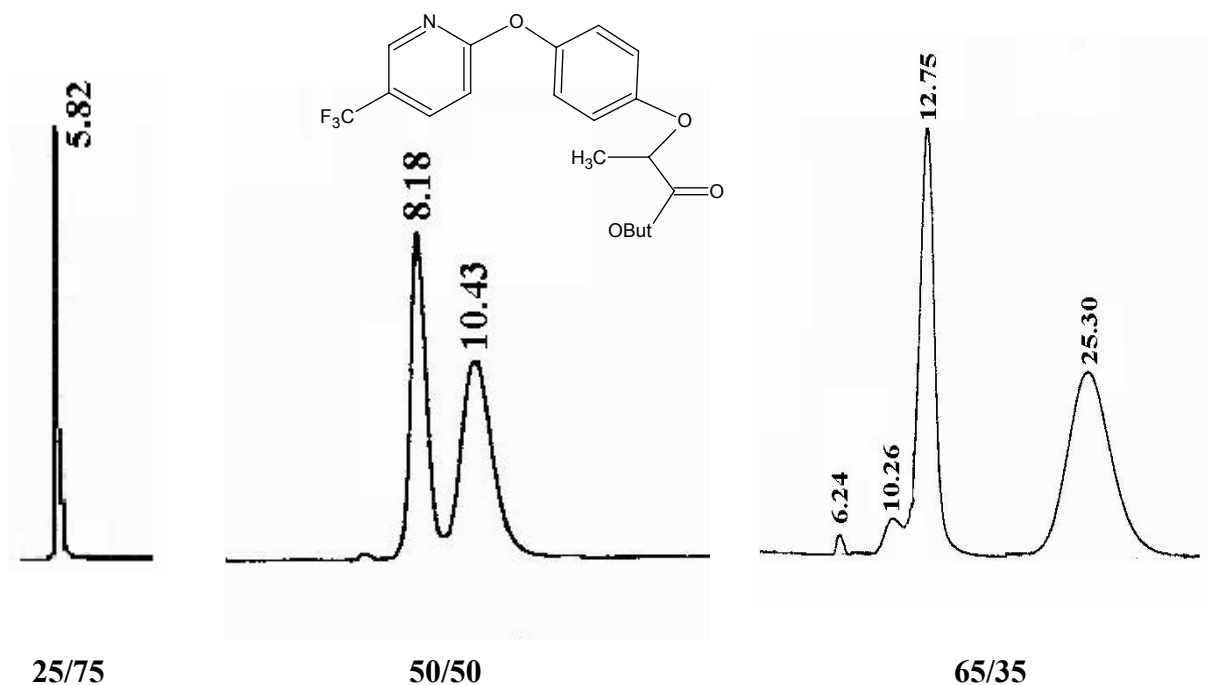


Figure 4 : Effet de la composition de la phase mobile (tampon/ CH₃CN) sur l'énantioséparation du fluazifop-butyl sur la colonne A. (0.3 ml/mn, λ_{254} nm).

Les herbicides acides sont très faiblement retenus, leurs temps de rétention avoisinent souvent celui du temps mort, ce qui explique la coélution de leur deux énantiomères empêchant ainsi leur séparation.

D'un autre côté, malgré la forte rétention de certains composés, tels que les β -bloquants pour des compositions enrichies en tampon, leur résolution n'a pas été obtenue, ce qui peut s'expliquer par plusieurs raisons :

- La rétention est due à des interactions non stéréosélectives entre le soluté et les groupements silanols.
- Le groupement stéréogène doit être éloigné du groupement hydrophobe qui sera inclus dans la cavité, ce qui l'empêchera de former des liaisons hydrogène avec les groupements hydroxyles de la cyclodextrine.
- La structure du soluté est telle qu'elle empêche son inclusion dans la cavité de la cyclodextrine.

II-1-b Effet du pH sur la résolution énantiomérique :

Dans le but d'étudier l'influence du pH du tampon sur l'énantioséparation, nous avons fait varier ce dernier en choisissant deux valeurs : 3.5 et 5.5.

Ces valeurs ont été choisies avec précaution, afin d'éviter la dénaturation de la phase stationnaire et cela en tenant compte que la cyclodextrine est stable dans le domaine de pH 3-14.¹⁴

Lorsqu'on a un pH de 3.5 (milieu acide), la rétention est augmentée,⁵ mais la résolution chirale est totalement perdue pour les 4 composés séparés antérieurement avec un pH de 4.6. Le phénomène de rétention peut être expliqué par le fait qu'en milieu acide, les groupements hydroxyles de la cyclodextrine sont protonés, ce qui favoriserait la formation de liaisons hydrogène, d'où la rétention plus élevée des solutés à un pH de 3.5.

Avec un pH de 5.5, la résolution est également perdue et les produits sont moins retenus, ceci peut être expliqué par le fait que lorsque le soluté est totalement ionisé, il aura tendance à se répartir dans la phase mobile aqueuse et sera ainsi moins retenu par la phase stationnaire.¹⁸

[18] C. Perrin, N. Matthijs, D. Mangelings, C. Granier-Loyaux, M. Maftouh, *J. Chromatogr. A*, 2002, **966**, 119

II-2 Test de la phase stationnaire à base d'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (colonne B) :

La substitution des groupements hydroxyles de la cyclodextrine par des groupements polaires a un grand impact sur la sélectivité de ce type de phases stationnaires vis-à-vis des produits optiquement actifs.⁵ Ainsi, grâce aux groupements hydroxypropyles, la cavité de la cyclodextrine s'élargit, ce qui lui permettra d'inclure des molécules plus volumineuses. A cela s'ajoute la disponibilité du groupement hydroxypropyle, qui favorisera de cette manière la formation de liaisons hydrogène avec le soluté.¹⁹

En chromatographie liquide, c'est la phase stationnaire la plus utilisée en mode inverse parmi les différentes classes de phases stationnaires chirales à base de cyclodextrine.^{4,20} L'hydroxypropyl- β -CD est également très utilisée en tant qu'additif à la phase mobile, en électrophorèse capillaire où elle a démontré à de nombreuses reprises son efficacité.²¹

Les résultats obtenus sur cette colonne avec le système : acétonitrile/tampon phosphate sont présentés dans le tableau II.

Ainsi, sur les 39 produits testés, 8 ont été séparés. Il s'agit de trois benzodiazépines : lorazepam, oxazepam et temazepam, deux anti-inflammatoires non stéroïdiens : naproxène et ibuprofène ainsi que les produits 3 et 23.

Les figures 5 et 6 nous montrent les différents chromatogrammes des séparations chirales obtenues sur la colonne B.

[19] S. Rudaz, J. C. Veuthey, *Chirality*, 1999, **11**, 319

[20] S. Chen, *J. Chin. Chem. Soc.*, 2001, **48**, 751

[21] C. E. Lin, K. H. Chen, *J. Chromatogr. A*, 2001, **930**, 155

Tableau II: Séparation des produits optiquement actifs sur la phase stationnaire à base d'hydroxypropyl- β -Cyclodextrine (colonne B)							
Produits	Tampon/CH ₃ CN*	tr ₁	k' ₁	tr ₂	k' ₂	α	Rs
1 ^a	95/5	4,49	1,08	4,49	1,08	1,00	0,00
	98/2	6,59	2,04	6,59	2,04	1,00	0,00
2 ^a	95/5	6,60	2,06	6,60	2,06	1,00	0,00
	98/2	9,29	3,28	9,29	3,28	1,00	0,00
3 ^a	95/5	5,90	1,73	7,16	2,31	1,34	0,57
	98/2	8,95	3,12	11,26	4,19	1,34	0,58
4 ^a	95/5	2,55	0,18	2,55	0,18	1,00	0,00
	98/2	2,96	0,36	2,96	0,36	1,00	0,00
5 ^a	98/2	5,26	1,42	5,26	1,42	1,00	0,00
6 ^a	98/2	3,70	0,71	3,70	0,71	1,00	0,00
7 ^a	98/2	2,42	0,12	2,42	0,12	1,00	0,00
8 ^a	98/2	5,10	1,35	5,10	1,35	1,00	0,00
9 ^a	90/10	3,95	0,89	3,95	0,89	1,00	0,00
	95/5	6,18	1,86	6,18	1,86	1,00	0,00
10 ^a	85/15	6,50	2,16	6,50	2,16	1,00	0,00
	90/10	13,71	5,56	13,71	5,56	1,00	0,00
11 ^a	95/5	13,74	5,36	13,74	5,36	1,00	0,00
	98/2	23,50	9,83	23,50	9,83	1,00	0,00
12 ^a	90/10	9,55	3,57	9,55	3,57	1,00	0,00
	95/5	19,47	8,01	19,47	8,01	1,00	0,00
13 ^a	90/10	7,06	2,38	7,06	2,38	1,00	0,00
	95/5	12,24	4,67	12,24	4,67	1,00	0,00
14 ^a	90/10	4,58	1,19	4,58	1,19	1,00	0,00
	95/5	8,53	2,95	8,53	2,95	1,00	0,00
15 ^a	95/5	5,20	1,41	5,20	1,41	1,00	0,00
	98/2	7,62	2,51	7,62	2,51	1,00	0,00
16 ^b	98/2	2,17	0,00	2,17	0,00	1,00	0,00
	100/0	2,24	0,00	2,24	0,00	1,00	0,00

Tableau II: Suite							
Produits	Tampon/CH ₃ CN*	tr ₁	k' ₁	tr ₂	k' ₂	α	Rs
17 ^b	98/2	2,22	0,02	2,22	0,02	1,00	0,00
18 ^b	98/2	2,58	0,19	2,58	0,19	1,00	0,00
19 ^b	98/2	2,80	0,29	2,80	0,29	1,00	0,00
20 ^c	90/10	2,35	0,12	2,35	0,12	1,00	0,00
	95/5	2,48	0,15	2,48	0,15	1,00	0,00
21 ^d	98/2	4,41	1,03	4,41	1,03	1,00	0,00
22 ^c	98/2	3,04	0,40	3,04	0,40	1,00	0,00
23^a	90/10	4.67	1.23	5.46	1.61	1.31	0.79
	98/2	15.81	6.25	19.97	8.16	1.31	1.30
Fluazifop-butyl ^a	90/10	8,25	2,95	8,25	2,95	1,00	0,00
	95/5	18,18	7,42	18,18	7,42	1,00	0,00
Haloxifop-éthoxyéthyl ^a	90/10	5,79	1,77	5,79	1,77	1,00	0,00
	95/5	11,63	4,38	11,63	4,38	1,00	0,00
Benzoine^a	98/2	7,05	2,25	7,59	2,50	1,11	0,33
	100/0	12,74	4,69	13,70	5,12	1,09	0,30
Lorazepam^a	95/5	3,72	0,72	5,20	1,41	1,95	2,55
	98/2	4,58	1,12	7,02	2,25	2,01	1,88
Lormetazepam ^a	98/2	6,42	1,96	6,42	1,96	1,00	0,00
Oxazepam^a	90/10	3,04	0,45	3,18	0,52	1,15	0,35
	98/2	4,82	1,23	5,43	1,51	1,23	0,44
Temazepam^a	90/10	3,17	0,52	3,33	0,59	1,15	0,40
	98/2	5,40	1,50	5,98	1,77	1,18	0,45
Warfarine ^a	98/2	9,62	3,43	9,62	3,43	1,00	0,00
Propranolol ^c	98/2	7,69	2,54	7,69	2,54	1,00	0,00
Tertatolol ^a	98/2	10,56	3,87	10,56	3,87	1,00	0,00
Verapamil ^c	90/10	5,68	1,72	5,68	1,72	1,00	0,00
	95/5	8,45	2,91	8,45	2,91	1,00	0,00

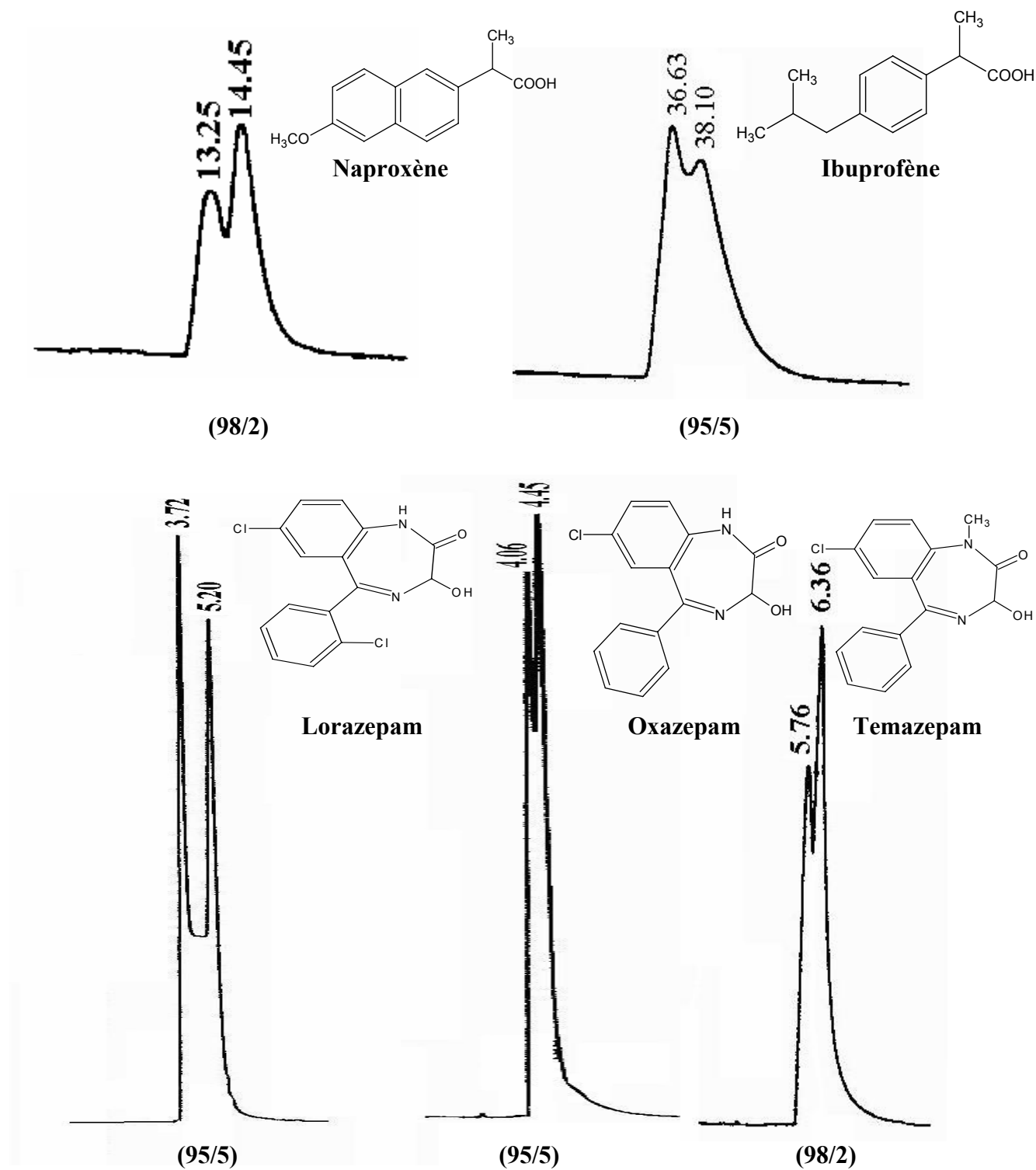


Figure 5 : Exemple de chromatogrammes de quelques produits pharmaceutiques optiquement actifs séparés sur la colonne B.

(Phase mobile : Tampon/CH₃CN, 1 ml/mn, $\lambda_{254\text{ nm}}$ (ibuprofène : $\lambda_{200\text{ nm}}$))

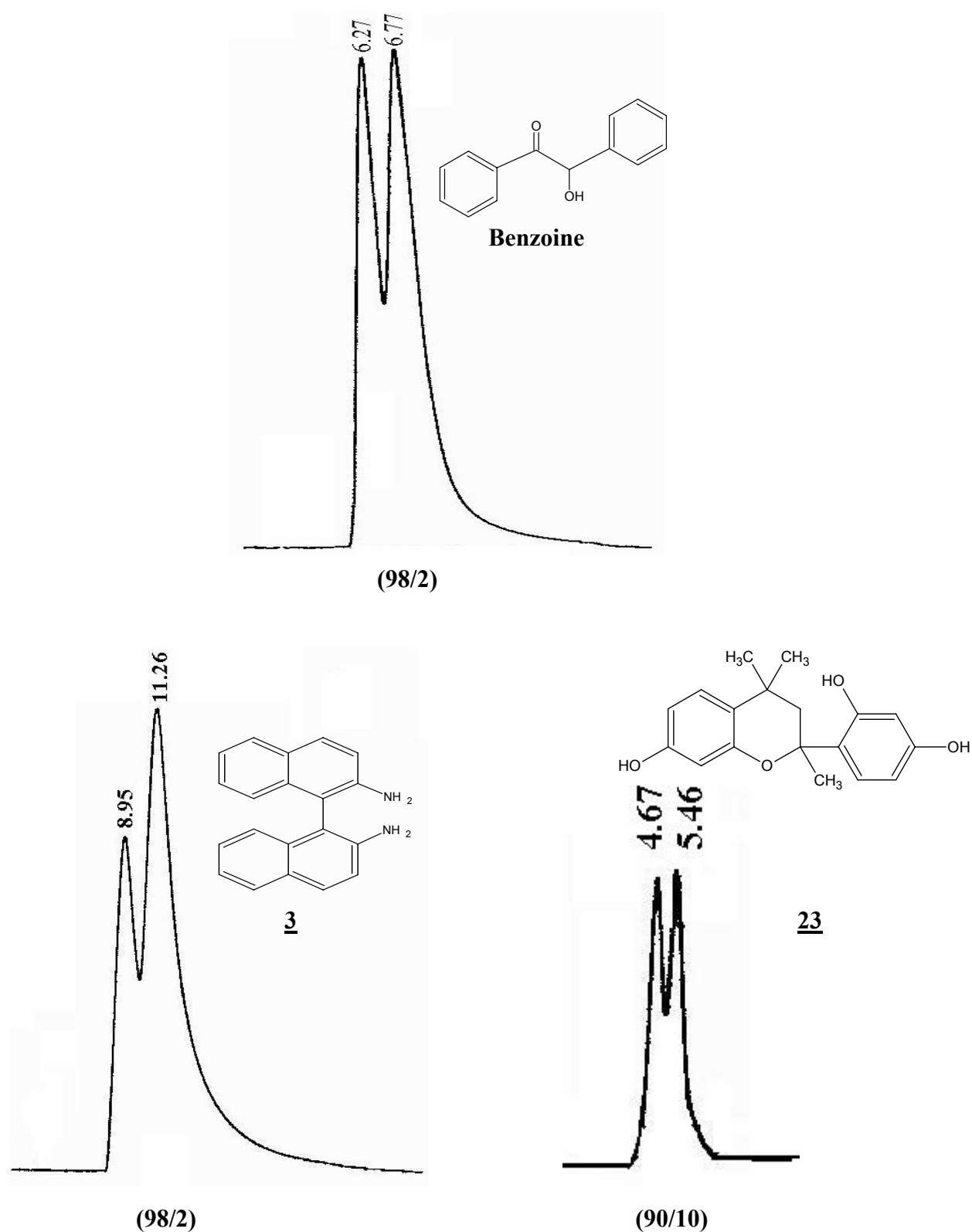


Figure 6 : Chromatogrammes des produits 3, 23 et la benzoine séparés sur la colonne B.
(Phase mobile : Tampon / CH₃CN, 1ml/mn, λ_{254} nm).

Nous constatons d'après les résultats obtenus (tableau I) que les facteurs de rétention augmentent avec la diminution de la quantité d'acétonitrile dans la phase mobile. Cette même constatation a été également soulevée pour la colonne A.

La figure 7 représente l'effet de la composition de la phase mobile sur la rétention de quelques produits testés sur la colonne B.

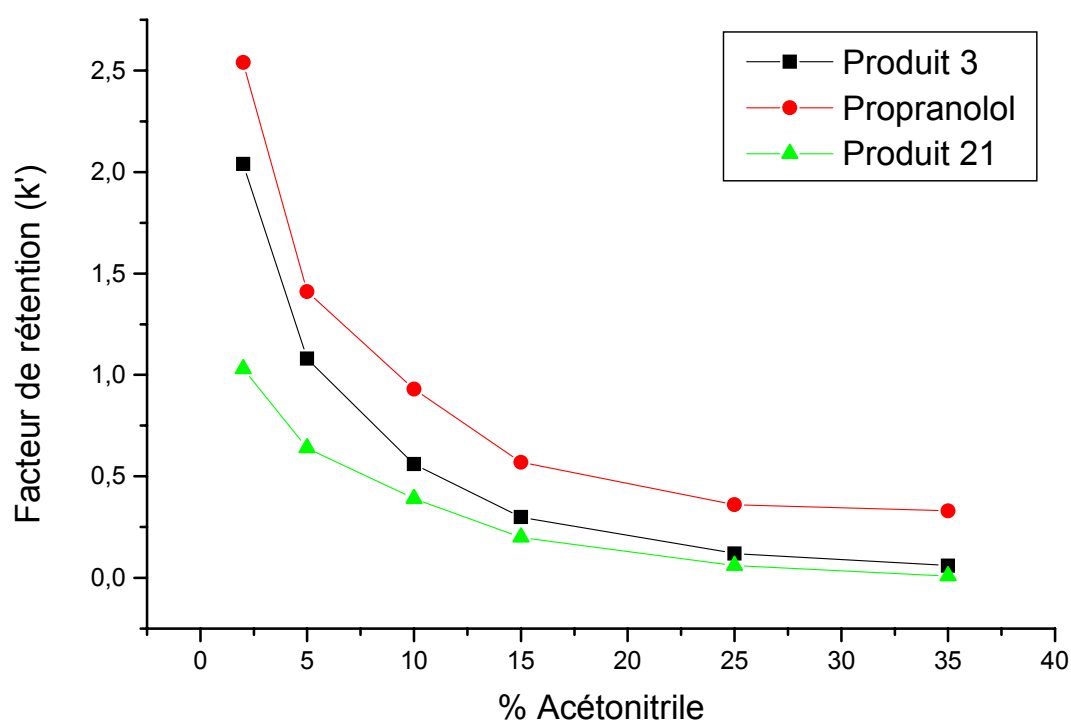


Figure 7 : Effet de la composition de la phase mobile sur la rétention.

(Phase mobile : Tampon / CH_3CN , 1 ml/mn, $\lambda_{254 \text{ nm}}$).

II-2-a Effet de la composition de la phase mobile sur la résolution chirale :

Tel que cela est présenté sur la figure 8, la résolution chirale est altérée par le solvant organique, donc plus la phase mobile est enrichie en tampon, meilleure est la séparation.¹⁹ Ce phénomène a été également observé avec la colonne à base de cyclodextrine non dérivée (colonne A). Pour des phases mobiles à forte composition en acétonitrile, ce dernier entre en compétition avec le soluté pour se loger dans la cavité, ce qui réduit considérablement les possibilités de former un complexe d'inclusion.²²

Par ailleurs, nous pouvons noter la faible influence du pourcentage du modifiant organique dans la phase mobile sur le facteur de sélectivité (α), contrairement à la résolution qui diminue de manière significative avec l'ajout de l'acétonitrile.

La résolution des énantiomères du lorazepam s'améliore avec l'augmentation du pourcentage de tampon dans la phase mobile, jusqu'à la composition 98/2 (Tampon/CH₃CN) où elle commence à diminuer. A 100% en tampon nous remarquons la coélution des deux énantiomères du lorazepam conduisant à la perte de la reconnaissance chirale. Ceci prouve que la présence du solvant organique est nécessaire pour que la séparation chirale puisse se faire.¹⁵

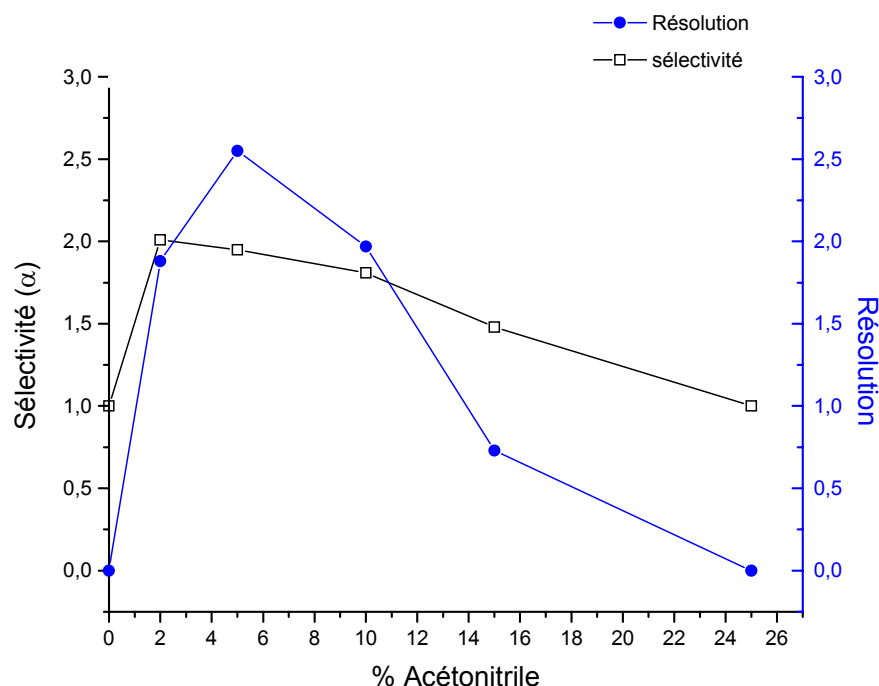


Figure 8 : Effet de la composition de la phase mobile sur la sélectivité et la résolution du lorazepam sur la colonne B. (Phase mobile : Tampon /CH₃CN, 1ml/mn, λ_{254} nm).

II-2-b Effet de la structure du soluté sur la résolution chirale:

Pour qu'une séparation chirale puisse se faire sur une phase stationnaire à base de cyclodextrine en mode inverse, la formation d'un complexe d'inclusion est une condition nécessaire.

Liu et Guo²³ ont décrit les différentes forces motrices qui interviennent lors de la complexation par inclusion dans les cyclodextrines.

Parmi ces forces, les plus probables sont :

- Interactions électrostatiques telles que les dipole-dipole, dipole-ion, ou encore de type ion-ion dans le cas où la cyclodextrine est substituée par des groupements ionisables tels que les sulfates ou les nitrates.
- Interactions de Van Der Waals.
- Interactions hydrophobes.
- Liaisons hydrogène.
- Interactions liées aux effets stériques.
- Interactions de transfert de charges.

Ainsi, en plus de l'inclusion, les solutés doivent porter des groupements susceptibles de générer ce type d'interactions.

Parmi les 4 benzodiazépines testés, le lormetazepam est le seul à ne pas être séparé, cela peut être expliqué par la substitution de l'hydrogène de la fonction amide par un groupement méthyle, ce qui confirmerait la contribution de l'azote dans la formation de liaison hydrogène avec les groupements hydroxyles de la cyclodextrine. L'ortho substitution du groupement phényle par un chlore, devrait aussi contribuer à une gêne stérique, empêchant ainsi la formation du complexe d'inclusion.²⁴ Ainsi, la coélution des énantiomères du lormetazepam rend compte de la contribution majeure de cette interaction dans le mécanisme de caractérisation chirale.

Bien que le temazepam porte lui aussi un groupement méthyle sur sa fonction amide, ceci n'a pas empêché sa résolution, d'un autre côté son groupement phényle ne porte pas de chlore qui pourrait gêner l'inclusion de la molécule à l'intérieur de la cavité.

[23] L. Liu, Q. X. Guo, *J. Incl. Phenom*, 2002, **42**, 1

[24] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, F. Pilar, C. Minguillon, *Chirality*, 2002, **14**, 59

D'après ces observations, nous pouvons supposer que les interactions mises en jeu dans le mécanisme de la caractérisation chirale du temazepam, sont différentes de celles qui contribuent dans le mécanisme de résolution du lorazepam et de l'oxazepam.

Pour le produit 3, sa structure ne diffère de celle du produit 1, que par la substitution des NH_2 par des OH (annexe A), ce qui a eu pour effet la perte de l'énantiosélectivité de ce dernier. Ceci peut être expliqué par le fait qu'en milieu légèrement acide (pH 4.6), l'oxygène très électronégatif a tendance à être protoné plus que l'azote, ce qui risque de créer une gêne stérique et empêcher ainsi l'inclusion de la molécule dans la cavité de la cyclodextrine.

Quand aux anti-inflammatoires non-stéroïdiens, leurs groupements carboxyles leur permet de former facilement des liaisons hydrogène avec les groupements hydroxypropyles de la cyclodextrine. Le naproxène et l'ibuprofène ont été partiellement séparés, ce qui n'est pas le cas du ketoprofène (tableau II). Ceci peut être expliqué par le fait que les structures respectives de l'ibuprofène et du naproxène sont telles qu'elles permettent leur inclusion dans la cavité de la cyclodextrine contrairement au ketoprofène, qui de par sa structure ne permet pas son inclusion, ceci est confirmé par ses faibles temps de rétention même avec des compositions enrichies en tampon.

Dans cette famille de produits, c'est le naproxène qui a été le mieux séparé, ceci est peut être dû à son groupement naphthalène, qui de par sa taille et sa structure, aura tendance à être aisément inclus dans la cavité de la β -cyclodextrine,¹⁰ par contre pour l'ibuprofène, il semblerait que le groupement isobutyle-phényle subisse une inclusion partielle dans la cavité de la cyclodextrine, ce qui explique sa résolution partielle.

Ainsi, il apparaît clairement qu'un simple changement dans la structure du soluté, peut avoir un effet négatif sur la sélectivité chirale.⁸

II-2-c Effet de la nature du modifiant organique sur la séparation chirale :

Les résultats obtenus lors de l'utilisation du méthanol à la place de l'acétonitrile comme solvant organique sont présentés dans le tableau III.

Les molécules du méthanol sont amphiprotiques,²⁰ ce qui veut dire qu'elles peuvent donner ou accepter des protons lors des liaisons hydrogène avec le soluté ou avec les groupements hydroxyles de la cyclodextrine, contrairement à l'acétonitrile qui est un solvant aprotique, et qui de par cette propriété se loge dans la cavité de la cyclodextrine la rendant ainsi inaccessible pour le soluté.

Tout comme avec l'acétonitrile, la rétention diminue avec l'ajout du méthanol, car les deux solvants sont considérés comme des déplaçants du soluté hors de la cavité de la cyclodextrine. Néanmoins, le méthanol a un effet déplaçant plus faible,⁵ ce qui explique des temps de rétention relativement plus élevés. Ce phénomène est bien illustré sur la figure 9.

D'une manière générale, tous les produits séparés avec CH₃CN ont été également séparés avec le MeOH, mis à part l'ibuprofène qui n'a été séparé qu'avec l'acétonitrile.

L'augmentation de la quantité du méthanol dans la phase mobile accompagne la diminution de la rétention, et cela à cause du phénomène de solvation, qui affaiblit l'adsorption du soluté sur la phase stationnaire.¹⁷

Tableau III: Utilisation du méthanol pour la séparation des produits optiquement actifs sur la colonne B.

Produits	Tampon/MeOH [*]	tr ₁	k' ₁	tr ₂	k' ₂	α	Rs
1 ^a	65/35	2,25	0,18	2,25	0,18	1,00	0,00
	90/10	4,84	1,29	4,84	1,29	1,00	0,00
2 ^a	65/35	2,81	0,47	2,81	0,47	1,00	0,00
	90/10	7,79	2,69	7,79	2,69	1,00	0,00
3 ^a	65/35	2,43	0,27	2,43	0,27	1,00	0,00
	75/25	2,98	0,51	3,21	0,62	1,23	0,24
	85/15	4,72	1,26	5,60	1,68	1,33	0,42
	90/10	5,74	1,72	7,02	2,33	1,35	0,41
	95/5	7,38	2,35	9,30	3,23	1,37	0,51
	98/2	8,54	2,86	10,91	3,94	1,37	0,40
4 ^a	65/35	2,07	0,08	2,07	0,08	1,00	0,00
	98/2	3,57	0,62	3,57	0,62	1,00	0,00
5 ^a	65/35	2,22	0,16	2,22	0,16	1,00	0,00
	98/2	6,32	1,86	6,32	1,86	1,00	0,00
6 ^a	65/35	2,08	0,09	2,08	0,09	1,00	0,00
	98/2	5,10	1,31	5,10	1,31	1,00	0,00
7 ^a	98/2	2,51	0,14	2,51	0,14	1,00	0,00
8 ^a	65/35	2,22	0,16	2,22	0,16	1,00	0,00
	95/5	5,19	1,36	5,19	1,36	1,00	0,00
9 ^a	65/35	2,38	0,25	2,38	0,25	1,00	0,00
	90/10	5,38	1,55	5,38	1,55	1,00	0,00
10 ^a	65/35	2,13	0,12	2,13	0,12	1,00	0,00
11 ^a	65/35	3,84	1,01	3,84	1,01	1,00	0,00
	90/10	18,29	7,67	18,29	7,67	1,00	0,00
12 ^a	65/35	4,08	1,14	4,08	1,14	1,00	0,00
	85/15	14,74	6,05	14,74	6,05	1,00	0,00
13 ^a	65/35	3,25	0,70	3,25	0,70	1,00	0,00
	85/15	10,54	4,04	10,54	4,04	1,00	0,00
14 ^a	65/35	2,50	0,31	2,50	0,31	1,00	0,00
	90/10	8,10	2,84	8,10	2,84	1,00	0,00

Tableau III: Suite							
Produits	Tampon/MeOH [*]	tr ₁	k' ₁	tr ₂	k' ₂	α	Rs
15 ^a	65/35	2,60	0,36	2,60	0,36	1,00	0,00
	95/5	6,96	2,16	6,96	2,16	1,00	0,00
16 ^b	65/35	1,91	0,00	1,91	0,00	1,00	0,00
	98/2	2,21	0,00	2,21	0,00	1,00	0,00
17 ^b	98/2	2,31	0,05	2,31	0,05	1,00	0,00
18 ^b	65/35	1,97	0,03	1,97	0,03	1,00	0,00
	98/2	2,71	0,23	2,71	0,23	1,00	0,00
19 ^b	65/35	2,02	0,06	2,02	0,06	1,00	0,00
	98/2	2,89	0,31	2,89	0,31	1,00	0,00
20 ^c	65/35	1,95	0,02	1,95	0,02	1,00	0,00
	98/2	2,94	0,33	2,94	0,33	1,00	0,00
21 ^d	65/35	2,14	0,12	2,14	0,12	1,00	0,00
	98/2	4,80	1,17	4,80	1,17	1,00	0,00
22 ^c	65/35	1,99	0,04	1,99	0,04	1,00	0,00
	98/2	3,20	0,45	3,20	0,45	1,00	0,00
Fluazifop-butyl ^a	65/35	2,85	0,49	2,85	0,49	1,00	0,00
	85/15	12,53	5,00	12,53	5,00	1,00	0,00
Haloxifop-éthoxyéthyl ^a	65/35	2,54	0,33	2,54	0,33	1,00	0,00
	85/15	7,63	2,65	7,63	2,65	1,00	0,00
Benzoine^a	75/25	2,51	0,27	2,51	0,27	1,00	0,00
	85/15	3,98	0,90	4,19	1,00	1,11	0,32
	90/10	5,20	1,46	5,20	1,46	1,00	0,00
	95/5	6,50	1,95	6,95	2,16	1,10	0,35
	98/2	7,85	2,55	8,47	2,83	1,11	<0,1
Lorazepam^a	65/35	2,21	0,16	2,34	0,23	1,43	0,43
	75/25	2,47	0,25	2,91	0,47	1,90	0,55
	85/15	3,09	0,48	4,16	0,99	2,07	1,19
	90/10	3,84	0,82	5,48	1,60	1,95	1,22
	95/5	5,30	1,41	7,72	2,51	1,78	1,01
	98/2	10,54	3,77	10,54	3,77	1,00	0,00
Lormetazepam ^a	65/35	2,24	0,17	2,24	0,17	1,00	0,00
	95/5	7,02	2,19	7,02	2,19	1,00	0,00

Tableau III: Suite							
Produits	Tampon/MeOH [*]	tr ₁	k' ₁	tr ₂	k' ₂	α	Rs
Oxazepam^a	75/25	2,54	0,28	2,54	0,28	1,00	0,00
	85/15	3,18	0,52	3,41	0,63	1,21	0,28
	90/10	3,89	0,84	4,19	0,99	1,17	0,23
	95/5	5,27	1,40	5,73	1,60	1,15	0,09
	98/2	7,48	2,38	7,48	2,38	1,00	0,00
Temazepam^a	75/25	2,65	0,34	2,65	0,34	1,00	0,00
	85/15	3,31	0,58	3,55	0,70	1,20	0,30
	90/10	4,49	1,13	4,49	1,13	1,00	0,00
	95/5	5,76	1,62	6,29	1,86	1,15	0,23
	98/2	8,46	2,83	8,46	2,83	1,00	0,00
Warfarine ^a	65/35	2,28	0,19	2,28	0,19	1,00	0,00
	90/10	7,02	2,33	7,02	2,33	1,00	0,00
Propranolol ^c	65/35	3,02	0,58	3,02	0,58	1,00	0,00
	95/5	8,86	3,03	8,86	3,03	1,00	0,00
Tertatolol ^a	65/35	3,08	0,61	3,08	0,61	1,00	0,00
	95/5	13,01	4,91	13,01	4,91	1,00	0,00
Verapamil ^c	65/35	3,17	0,66	3,17	0,66	1,00	0,00
	95/5	18,99	7,63	18,99	7,63	1,00	0,00
Indapamide ^a	65/35	2,10	0,10	2,10	0,10	1,00	0,00
	98/2	4,25	0,92	4,25	0,92	1,00	0,00
Naproxène^a	75/25	4,03	1,04	4,03	1,04	1,00	0,00
	85/15	7,19	2,44	7,65	2,66	1,09	0,33
	90/10	9,41	3,46	9,41	3,46	1,00	0,00
	95/5	12,90	4,86	14,07	5,40	1,11	0,35
	98/2	14,61	5,61	15,90	6,19	1,10	0,29
Ketoprofène ^a	65/35	2,19	0,15	2,19	0,15	1,00	0,00
	95/5	8,20	2,73	8,20	2,73	1,00	0,00
Ibuprofène ^c	65/35	5,50	1,88	5,50	1,88	1,00	0,00
	85/15	27,07	11,95	27,07	11,95	1,00	0,00
Nicardipine ^a	65/35	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e

^{*}: Tampon phosphate NaH₂PO₄, 20 mmol, pH 4.6/Méthanol; 1 ml/mn
^a: λ_{254nm}. ^b: λ_{220 nm}. ^c: λ_{230 nm}. ^d: λ_{206 nm}. ^e: λ_{200 nm}.
n.e: non élué.

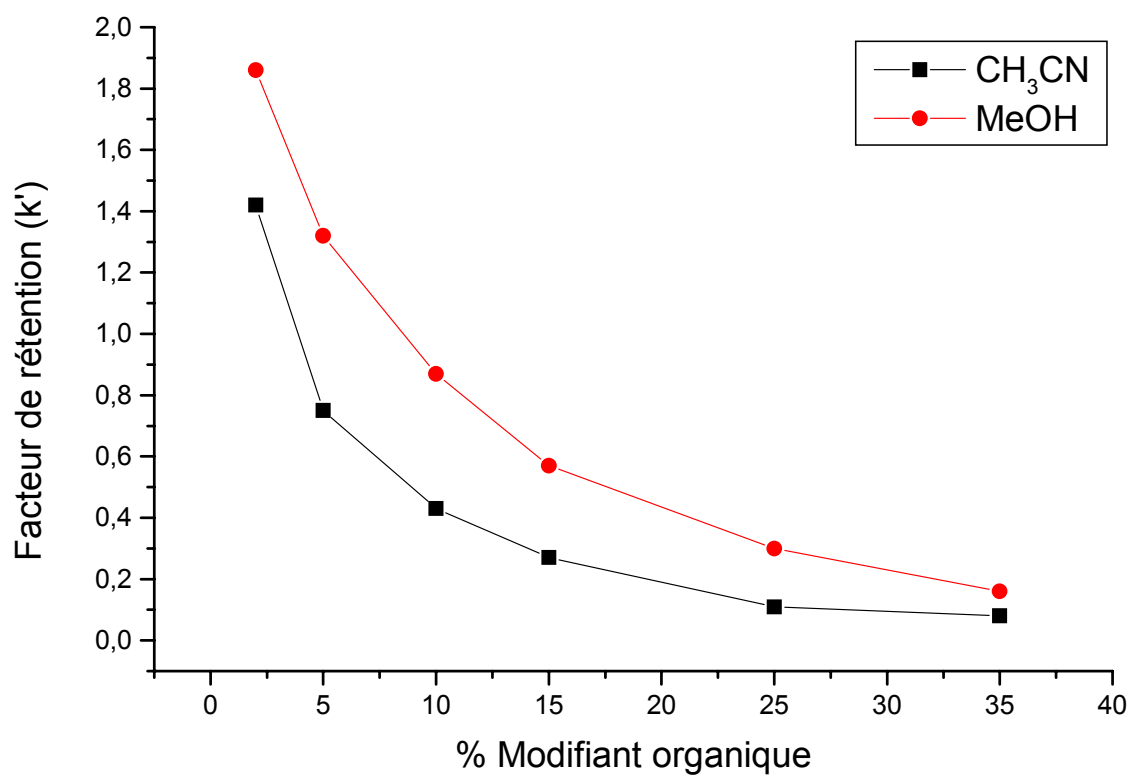


Figure 9 : Effet de l'acétonitrile et du méthanol sur la rétention du produit 5 séparé sur la colonne B. (Phase mobile : Tampon / modifiant organique, 1ml/mn, $\lambda_{254\text{nm}}$).

Ce qui semble caractériser l'utilisation du méthanol comme modifiant organique c'est la discontinuité des courbes de la sélectivité et de la résolution en fonction de la quantité de méthanol présente dans la phase mobile, contrairement à ce qui a été observé lors de l'utilisation de l'acétonitrile (Fig.10).

Avec le méthanol, il suffit d'une quantité plus petite en tampon, pour réaliser la séparation chirale, contrairement au cas où on utilise de l'acétonitrile comme solvant organique. Ainsi, pour le lorazepam à 65/35 en Tampon/MeOH, la séparation chirale est déjà accomplie, par contre avec l'acétonitrile, la séparation chirale requiert 85% de tampon. Ce même cas a été observé pour tous les autres solutés séparés énantiomériquement. Ce phénomène peut être expliqué par l'augmentation de la rétention lors de l'utilisation du méthanol.

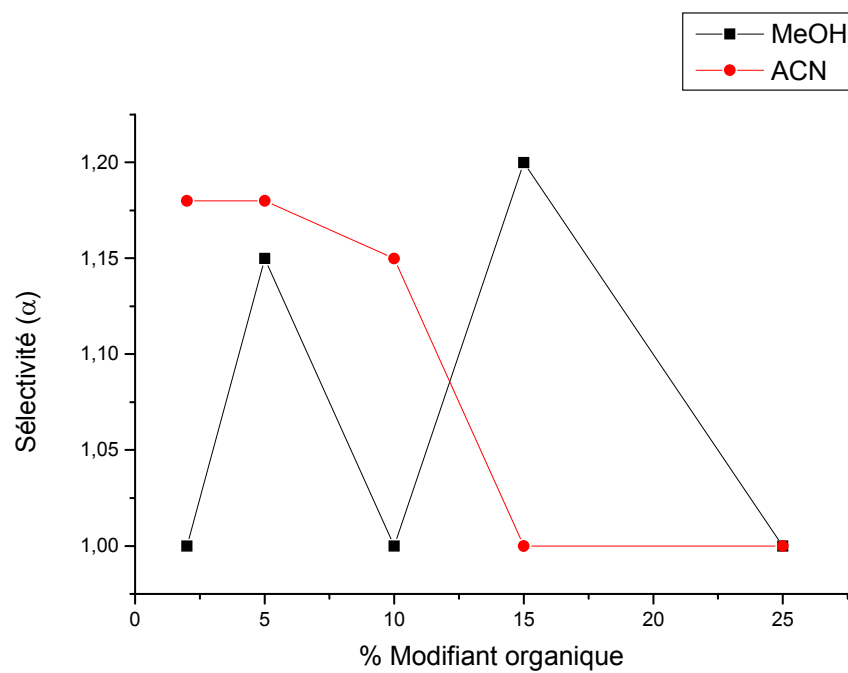
Nous pouvons noter qu'à 90% en tampon, la résolution chirale est totalement perdue pour un grand nombre de produits, tel que le naproxen, le temazepam ainsi que la benzoïne, ce comportement peut être expliqué par le changement du mécanisme de caractérisation chirale.

Bien que l'acétonitrile soit supposé diminuer la sensibilité du système,²⁵ il s'est avéré être un meilleur solvant que le MeOH, et cela car ce dernier a tendance à entrer en compétition avec le soluté pour la formation de liaisons hydrogène avec la phase stationnaire.²⁶ Ceci réduit l'affinité de cette dernière vis-à-vis du soluté, alors que l'acétonitrile favoriserait les interactions soluté-phase stationnaire.¹³ Sauf pour le naproxène dont la meilleure séparation a été obtenue à 85/15 avec le méthanol ; son chromatogramme est présenté dans la figure 11.

[25] K. M. Fried, A. E. Young, S. U. Yasuda, I. W. Wainer, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, **27**, 479

[26] A. Peter, J. Kaman, F. Fülöp, J. Van Der Eycken, *J. Chromatogr. A*, 2001, **919**, 79

(a)



(b)

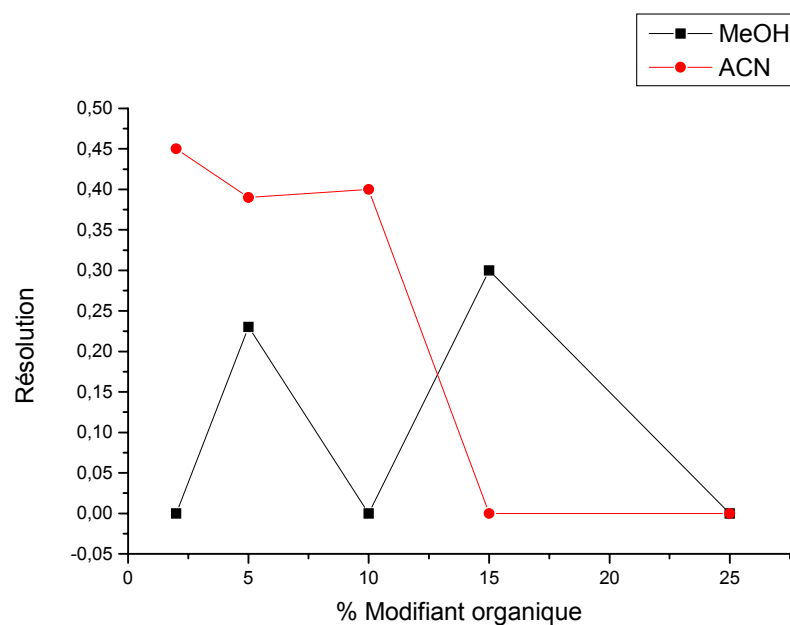


Figure 10 : Effet du méthanol et de l'acétonitrile sur la sélectivité (a) et la résolution (b) des énantiomères du Temazepam sur la colonne B. (Phase mobile : Tampon / modifiant organique, 1ml/mn, $\lambda_{254\text{ nm}}$).

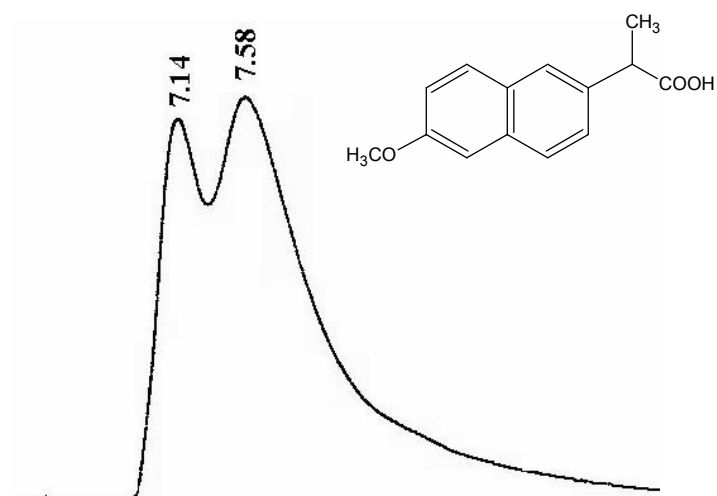


Figure 11 : Séparation partielle des énantiomères du naproxène sur la colonne B.

(Phase mobile : Tampon/MeOH : 85/15, 1 ml/mn, $\lambda_{254 \text{ nm}}$).

Pour mieux voir la différence de réponse du système chromatographique vis-à-vis des deux solvants organiques, nous avons représenté sur la figure 12 les chromatogrammes du lorazepam obtenus avec la composition 95/5 pour les deux cas de figure. Il apparaît clairement que l'acétonitrile permet une meilleure séparation par rapport au méthanol.^{26,27} ($R_s=2.55$)

Quand à l'ibuprofène, il n'est carrément plus séparé lors de l'utilisation du méthanol comme solvant organique.

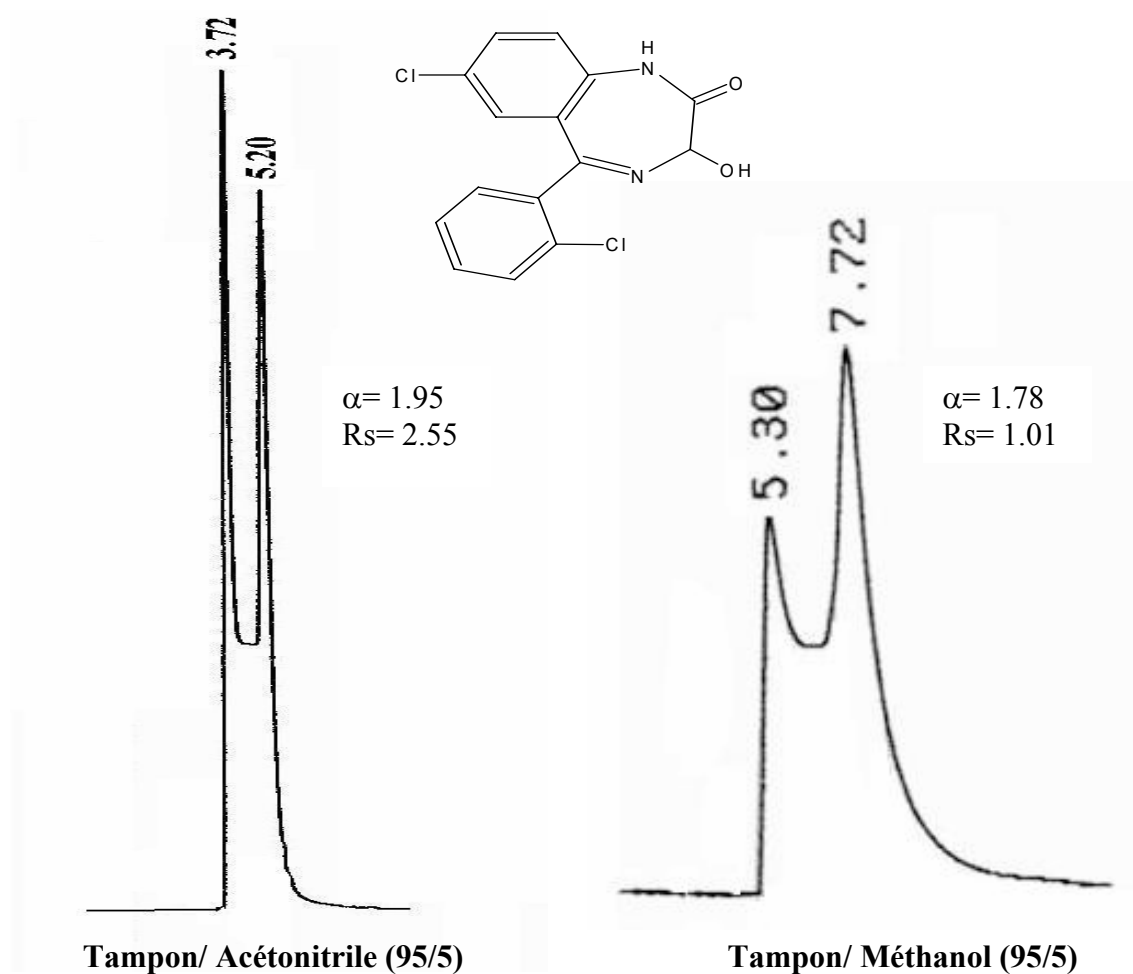
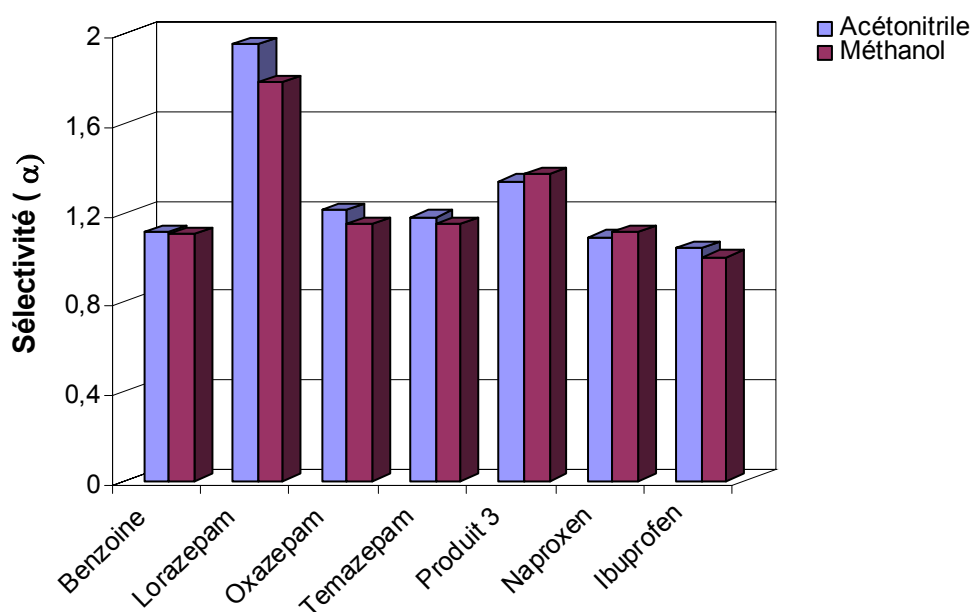


Figure 12 : Effet de la nature du modifiant organique sur la résolution du lorazepam sur la colonne B. (Phase mobile : Tampon/modifiant organique, 1ml/mn, λ_{254nm}).

[27] H. Y. Aboul-Enein, I. Ali, M. G. Schmid, V. Jetcheva, O. Gecse, G. Gubitz, *Analytical Letters*, 2001, **34**(7), 1107

Afin de mieux comparer l'effet du modifiant organique sur l'énantioséparation des produits optiquement actifs, la figure 13 représente l'effet de l'acétonitrile et du méthanol sur la résolution et la sélectivité des solutés. Il est clair que la résolution dépend de la nature du modifiant organique, contrairement à la sélectivité qui elle semble n'être que légèrement affectée par le changement du solvant organique.

(a)



(b)

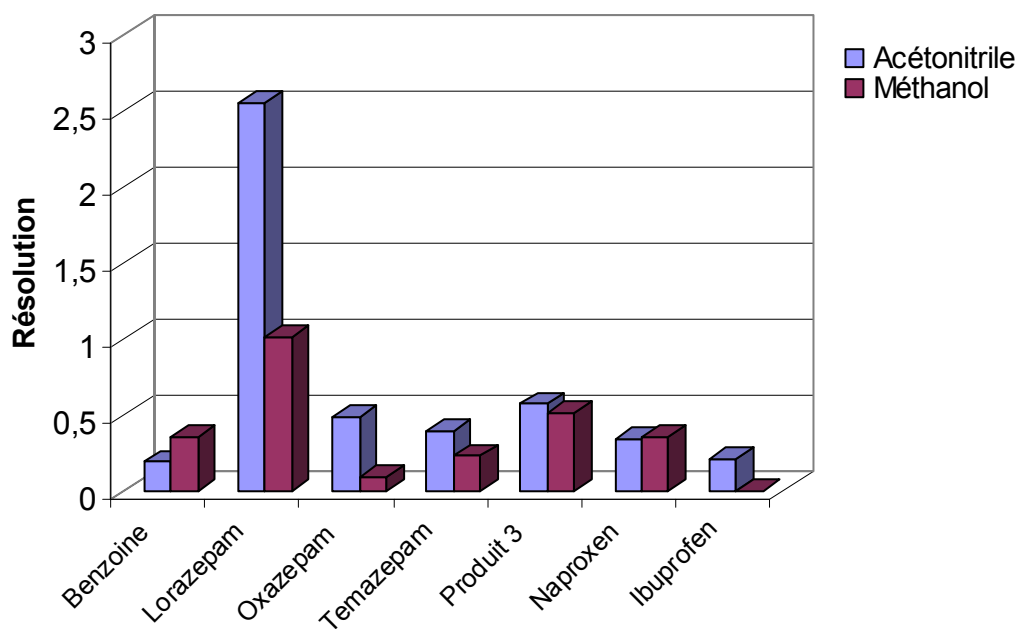


Figure 13 : Comparaison de l'effet de l'acétonitrile et du méthanol sur la sélectivité (a) et la résolution (b) des produits séparés sur la colonne B. (Phase mobile tampon/modifiant organique : 95/5, 1 ml/mn, $\lambda_{254\text{nm}}$).

II-2-d Effet du remplacement du tampon par l'eau sur la résolution chirale:

Les résultats chromatographiques liés au remplacement du tampon par l'eau dans la phase mobile sont présentés dans le tableau IV.

Lorsqu'on compare les tableaux I et IV, nous constatons l'existence de deux cas de figure distincts : le premier cas est observé avec les produits neutres tels que les solutés de 1 à 15 et les benzodiazépines, qui ont des temps de rétention plus importants lors de l'utilisation de la phase mobile : eau /acétonitrile, ce même comportement est observé de manière plus accentuée pour les β -bloquants.

Quant au deuxième cas, il englobe les composés acides tels que: Les solutés de 16 à 22, les herbicides et les anti-inflammatoires non stéroïdiens. Dans ce cas les facteurs de rétention sont inférieurs lors de l'utilisation de l'eau, ce qui explique l'altération de la résolution pour les composés initialement séparés avec la phase mobile tampon/acétonitrile.

Ceci est nettement observé dans le cas du naproxène et de l'ibuprofène, où l'énantioséparation est totalement perdue, lorsqu'on passe d'une phase mobile constituée de tampon à une phase mobile à base d'eau. La figure 14 illustre ces deux cas de figure.

En effet, en mode inverse les benzodiazépines, la benzoïne et le produit 3, considérés comme étant des composés neutres, peuvent être résolus avec un simple mélange constitué d'eau et d'acétonitrile,⁵ par contre les composés acides requièrent l'utilisation de solutions tamponnées et cela afin de réduire l'ionisation des solutés acides par la formation de paires d'ions entre le composé acide et l'anion phosphate du tampon.²⁸

Il est à noter que la sélectivité semble être moins affectée par ce changement que la résolution, ce qui confirme le fait que la sélectivité dépend uniquement de la polarité de la phase mobile ainsi que de l'habilité du soluté à former un complexe d'inclusion avec la cyclodextrine.

Un autre phénomène intéressant est la résolution partielle du produit 8, lorsque la phase mobile est constituée d'eau et d'acétonitrile, dans ce cas précis on peut dire que le tampon a eu un effet négatif sur la résolution de ce produit, contrairement aux autres composés neutres.²⁸

[28] P. S. Bonato, R. Bortocan, C. M. Gaitani, F. O. Paías, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2002, **13(2)**, 190

Tableau IV : Utilisation de la phase mobile eau/ CH₃CN pour la séparation de quelques produits optiquement actifs sur la colonne B

Produits	Eau/CH ₃ CN [*]	tr ₁	k' ₁	tr ₂	k' ₂	α	Rs
3 ^a	95/5	4,24	2,72	4,94	3,33	1,23	0,35
	98/2	7,59	5,38	9,78	7,21	1,34	0,50
4 ^a	98/2	2,52	1,12	2,52	1,12	1,00	0,00
5 ^a	98/2	4,36	2,66	4,36	2,66	1,00	0,00
6 ^a	98/2	3,14	1,64	3,14	1,64	1,00	0,00
8 ^a	98/2	4,15	2,49	4,74	2,98	1,20	<0,1
16 ^b	98/2	1,19	0,00	1,19	0,00	1,00	0,00
21 ^d	98/2	1,31	0,10	1,31	0,10	1,00	0,00
22 ^c	98/2	1,33	0,12	1,33	0,12	1,00	0,00
Benzoïne ^a	95/5	3,28	1,88	3,44	2,02	1,07	0,21
	98/2	5,59	3,70	6,00	4,04	1,09	0,32
Lorazepam ^a	95/5	2,62	1,30	3,53	2,10	1,61	1,32
	98/2	4,26	2,58	6,60	4,55	1,76	1,36
Lormetazepam ^a	98/2	5,56	3,67	5,56	3,67	1,00	0,00
Oxazepam ^a	95/5	2,76	1,42	3,01	1,64	1,15	0,42
	98/2	4,45	2,74	5,05	3,24	1,18	0,36
Temazepam ^a	95/5	2,86	1,51	3,07	1,69	1,12	0,28
	98/2	5,13	3,31	5,58	3,69	1,11	0,17
Warfarine ^a	98/2	3,55	1,98	3,55	1,98	1,00	0,00
Propranolol ^c	98/2	11,30	8,50	11,30	8,50	1,00	0,00
Indapamide ^a	98/2	3,31	1,78	3,31	1,78	1,00	0,00
Naproxène ^a	95/5	2,42	1,12	2,42	1,12	1,00	0,00
	98/2	2,58	1,17	2,58	1,17	1,00	0,00
Ketoprofène ^a	98/2	1,84	0,55	1,84	0,55	1,00	0,00
Ibuprofène ^e	95/5	4,59	3,03	4,59	3,03	1,00	0,00

*: Eau/Acétonitrile; 1 ml/mn

a. $\lambda_{254\text{nm}}$. b. $\lambda_{220\text{ nm}}$. c. $\lambda_{230\text{ nm}}$. d. $\lambda_{206\text{ nm}}$. e. $\lambda_{200\text{ nm}}$.

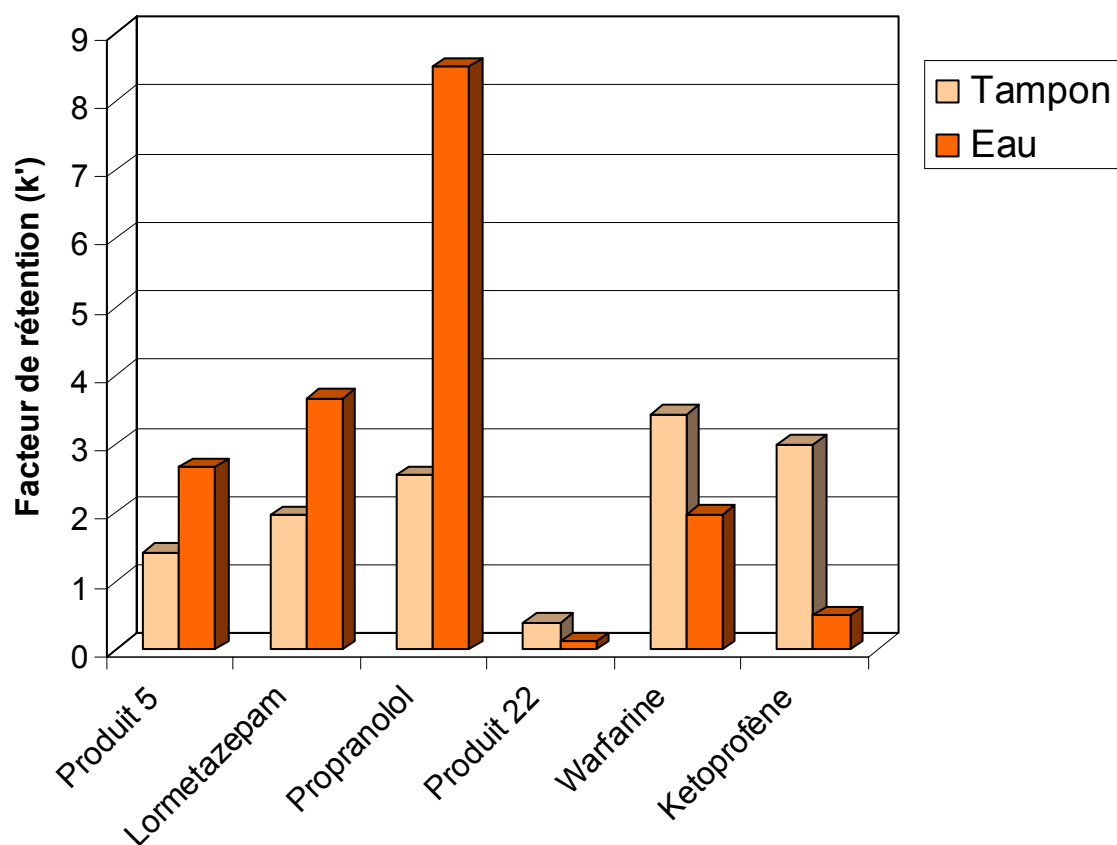


Figure 14 : Effet de la nature de la solution aqueuse sur la rétention de quelques produits optiquement actifs sur la colonne B. (Phase mobile : eau ou tampon/ CH₃CN, 1 ml/mn,

$\lambda_{254\text{nm}}$).

II-2-e L'influence du débit sur la sélectivité et la résolution :

Nous avons fait varier le débit pour la composition 98/2 en tampon/CH₃CN afin d'observer son influence sur les facteurs de sélectivité et de résolution (Tableau V).

D'une manière générale, lorsque le débit diminue la rétention des produits augmente, ce qui permet au soluté de passer plus de temps dans la phase stationnaire et de former un complexe d'inclusion avec la phase stationnaire, ce qui conduit à une sélectivité et une résolution meilleures.

Les figures 15 et 16 montrent que la sélectivité reste pratiquement constante malgré la variation du débit, à l'exception des benzodiazépines où elle est totalement perdue pour un débit de 0.2 ml/mn.

Quant à la résolution, on a observé deux cas, celui des benzodiazépines où elle diminue de manière continue jusqu'à ce qu'elle s'annule, ou alors pour le produit 3 et la benzoïne où un maximum de résolution est observé pour la valeur de 1 ml/mn, ce comportement pour le moins inhabituel a déjà été observé avec les colonnes à base de protéine.¹⁹

Des études du même type^{19,16} ont été menées sur une Cyclobond RSP et la Chiradex (deux colonnes à base de β -cyclodextrine, mais produites par deux firmes différentes) où la variation du débit a eu un effet différent sur les deux colonnes. Cela est peut être dû à la nature du spacer qui lie la cyclodextrine à la silice et à la méthode de fixation de la β -CD sur la surface de la silice.

Tableau V : Effet du débit sur la séparation chirale obtenue sur la colonne B, Phase mobile : Tampon phosphate/CH₃CN : 98/2, λ_{254} nm.

Produit	Débit (ml/mn)	tr ₁	k' ₁	tr ₂	k' ₂	α	Rs
3	1,2	6,84	2,76	8,65	3,75	1,36	0,44
	1	8,95	3,12	11,26	4,19	1,34	0,58
	0,8	10,13	2,75	12,82	3,75	1,36	0,47
	0,6	13,47	2,74	16,99	3,72	1,36	0,50
	0,4	20,88	2,83	26,29	3,82	1,35	0,47
	0,2	40,91	2,78	51,25	3,74	1,34	0,45
Benzoïne	1,2	5,18	1,86	5,58	2,08	1,12	0,57
	1	6,06	1,81	6,54	2,03	1,12	0,83
	0,8	7,48	1,79	8,06	2,01	1,12	0,64
	0,6	9,87	1,76	10,64	1,98	1,12	0,59
	0,4	14,80	1,78	15,95	1,99	1,12	0,58
	0,2	33,49	2,10	35,98	2,33	1,11	0,49
Lorazepam	1,2	3,87	1,14	5,98	2,30	2,02	2,11
	1	4,58	1,12	7,02	2,25	2,01	1,88
	0,8	5,67	1,12	8,66	2,23	2,00	1,66
	0,6	7,54	1,11	11,42	2,20	1,98	1,62
	0,4	11,52	1,16	16,94	2,18	1,88	0,53
	0,2	33,81	2,12	33,81	2,12	1,00	0,00
Oxazepam	1,2	4,10	1,27	4,63	1,56	1,23	0,53
	1	4,82	1,23	5,43	1,51	1,23	0,44
	0,8	5,98	1,23	6,69	1,50	1,22	0,47
	0,6	7,97	1,23	8,82	1,47	1,19	0,21
	0,4	13,14	1,47	13,14	1,47	1,00	0,00
	0,2	28,34	1,62	28,34	1,62	1,00	0,00
Temazepam	1,2	4,59	1,54	5,10	1,82	1,18	0,57
	1	5,40	1,50	5,98	1,77	1,18	0,45
	0,8	6,64	1,48	7,34	1,74	1,18	0,37
	0,6	8,81	1,47	9,70	1,72	1,17	0,33
	0,4	13,58	1,55	14,51	1,72	1,11	0,14
	0,2	31,28	1,89	31,28	1,89	1,00	0,00

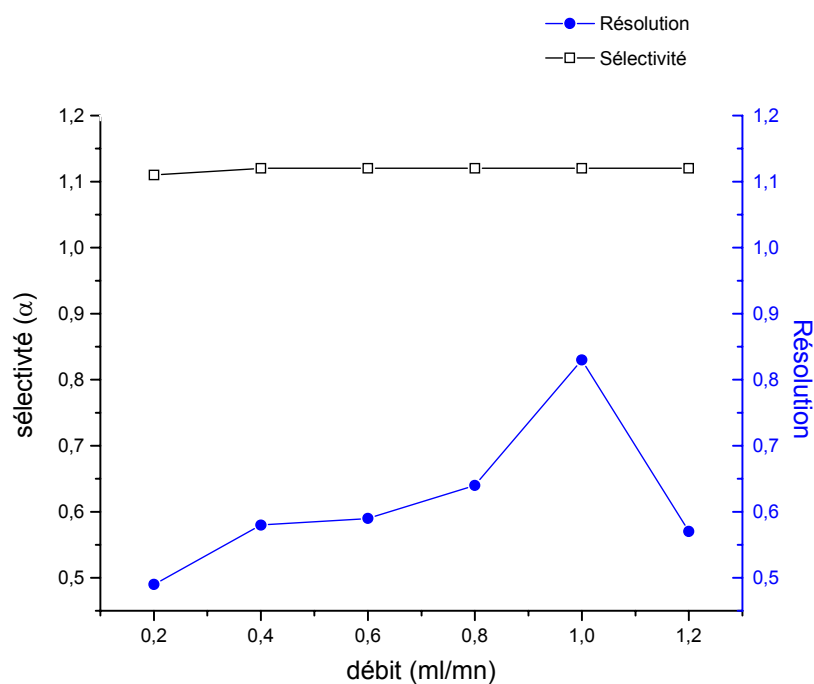


Figure 15 : Influence du débit sur la sélectivité et la résolution dans le cas de la benzoiné sur la colonne B. (Phase mobile : tampon/ CH_3CN : 98/2, $\lambda_{254\text{nm}}$).

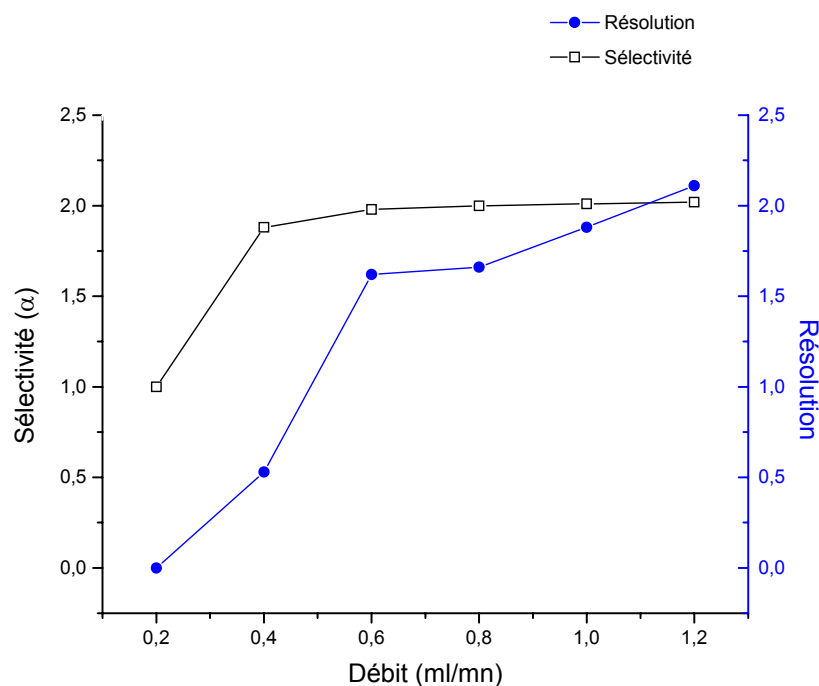


Figure 16 : Influence du débit sur la sélectivité et la résolution dans le cas du lorazépam sur la colonne B. (Phase mobile : tampon/ CH_3CN : 98/2, $\lambda_{254\text{nm}}$).

II-3 Test de la phase stationnaire à base de phényl-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (colonne C):

Les phases stationnaires à base de cyclodextrine dérivées avec des groupements aromatiques polaires ont démontré leur efficacité dans les deux modes : normal et organique polaire.²⁹

La dérivation des cyclodextrines permet de varier et d'améliorer leur énantiosélectivité, elle implique également la modification de la taille et la forme de leur cavité, comme elle peut modifier les propriétés physiques des cyclodextrines macrocycliques, tout en introduisant de nouveaux groupements fonctionnels.²⁹

Il est largement admis que le complexe d'inclusion peut être stabilisé en fonction de la nature des groupements fixés sur le bord de la cavité de la cyclodextrine.¹⁹ Cette dérivation va permettre à la phase stationnaire d'avoir un spectre de reconnaissance chirale plus large, comparé à la β -cyclodextrine non dérivée.⁹

Le groupement phényl-hydroxypropyle va permettre d'élargir la cavité de la cyclodextrine, de manière à ce qu'elle puisse contenir des molécules plus grandes, et les groupements hydroxyles formeront des liaisons hydrogène dans le but de stabiliser le complexe d'inclusion ainsi formé.⁴ D'un autre côté, ces groupements pourraient provoquer une gêne stérique vis-à-vis de l'inclusion et empêcher ainsi la résolution chirale.

Les résultats obtenus sur cette colonne avec le mode inverse sont résumés dans le tableau VI. La phase mobile utilisée est un mélange d'eau et d'acétonitrile et cela en vue des différents résultats obtenus avec les deux colonnes précédentes.

Cette colonne a pu ainsi séparer : le ketoprofène, nicardipine, benzoïne ainsi que les produits 4, 6 et 8. Un exemple de chromatogramme est présenté sur la figure 17.

[29] Y. Gong, H. K. Lee, *J. Sep. Sci.*, 2003, **26**, 515

Tableau VI: Séparation des produits optiquement actifs sur la phényl-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (colonne C)							
Produits	Eau/CH ₃ CN [*]	tr ₁	k' ₁	tr ₂	k' ₂	α	Rs
1 ^a	65/35	8,94	6,27	8,94	6,27	1,00	0,00
	75/25	28,86	20,22	28,86	20,22	1,00	0,00
2 ^a	65/35	4,70	2,51	4,70	2,51	1,00	0,00
	75/25	9,27	5,82	9,27	5,82	1,00	0,00
3 ^a	65/35	11,23	7,38	11,23	7,38	1,00	0,00
4 ^a	75/25	10,60	6,79	10,96	7,06	1,04	0,41
	85/15	16,98	11,67	17,87	12,34	1,06	0,77
5 ^a	0/100	2,06	0,10	2,06	0,10	1,00	0,00
	75/25	47,41	33,86	47,41	33,86	1,00	0,00
6 ^a	75/25	17,91	12,17	18,50	12,60	1,04	0,42
	85/15	33,76	24,19	35,50	25,49	1,05	0,74
7 ^a	75/25	1,59	0,17	1,59	0,17	1,00	0,00
	85/15	1,96	0,46	1,96	0,46	1,00	0,00
8 ^a	65/35	13,01	9,58	13,72	10,15	1,06	1,03
	75/25	37,33	26,45	40,88	29,06	1,10	1,78
9 ^a	0/100	2,10	0,12	2,10	0,12	1,00	0,00
	65/35	24,46	17,25	24,46	17,25	1,00	0,00
10 ^a	0/100	2,06	0,10	2,06	0,10	1,00	0,00
	55/45	21,49	15,04	21,49	15,04	1,00	0,00
11 ^a	65/35	11,89	8,67	11,89	8,67	1,00	0,00
	75/25	38,22	27,10	38,22	27,10	1,00	0,00
12 ^a	65/35	17,26	11,88	17,26	11,88	1,00	0,00
13 ^a	0/100	5,22	1,78	5,85	2,11	1,19	0,79
	75/25	22,90	15,84	22,90	15,84	1,00	0,00
14 ^a	65/35	10,23	6,63	10,23	6,63	1,00	0,00
	75/25	40,30	28,63	40,30	28,63	1,00	0,00
15 ^a	65/35	12,37	8,23	12,37	8,23	1,00	0,00
16 ^b	65/35	1,34	0,00	1,34	0,00	-	-
	85/15	1,34	0,00	1,34	0,00	-	-

Tableau VI: Suite							
Produits	Eau/CH ₃ CN*	tr ₁	k' ₁	tr ₂	k' ₂	α	Rs
17 ^b	65/35	1,29	-0,04	1,29	-0,04	1,00	0,00
	85/15	1,34	0,00	1,34	0,00	-	-
18 ^b	65/35	1,28	-0,04	1,28	-0,04	1,00	0,00
	85/15	1,36	0,01	1,36	0,01	1,00	0,00
19 ^b	65/35	1,34	0,00	1,34	0,00	-	-
	85/15	1,39	0,04	1,39	0,04	1,00	0,00
20 ^c	65/35	1,34	0,00	1,34	0,00	-	-
	85/15	1,50	0,12	1,50	0,12	1,00	0,00
21 ^d	65/35	1,33	-0,01	1,33	-0,01	1,00	0,00
	85/15	1,68	0,25	1,68	0,25	1,00	0,00
22 ^c	65/35	1,42	0,06	1,42	0,06	1,00	0,00
	85/15	1,61	0,20	1,61	0,20	1,00	0,00
23 ^a	75/25	12,09	7,95	12,09	7,95	1,00	0,00
Fluazifop-butyl ^a	65/35	23,57	16,59	23,57	16,59	1,00	0,00
Haloxifop-éthoxyéthyl ^a	65/35	19,17	13,31	19,17	13,31	1,00	0,00
Benzoine^a	65/35	4,92	3,00	4,92	3,00	1,00	0,00
	85/15	14,93	10,14	15,22	10,36	1,02	< 0,05
Lorazepam ^a	65/35	5,12	3,16	5,12	3,16	1,00	0,00
	85/15	23,76	16,73	23,76	16,73	1,00	0,00
Lormetazepam ^a	65/35	6,47	4,26	6,47	4,26	1,00	0,00
	75/25	15,93	10,71	15,93	10,71	1,00	0,00
Oxazepam ^a	65/35	5,04	2,76	5,04	2,76	1,00	0,00
	75/25	10,81	6,95	10,81	6,95	1,00	0,00
Temazepam ^a	65/35	6,06	3,52	6,06	3,52	1,00	0,00
	75/25	14,30	9,51	14,30	9,51	1,00	0,00
Warfarine ^a	65/35	2,44	0,82	2,44	0,82	1,00	0,00
	85/15	4,09	2,05	4,09	2,05	1,00	0,00
Propranolol ^c	65/35	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e

Produits	Eau/CH ₃ CN [*]	tr ₁	k' ₁	tr ₂	k' ₂	α	Rs
Tertatolol ^a	65/35	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e
Verapamil ^c	65/35	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e
Indapamide ^a	65/35	5,30	2,96	5,30	2,96	1,00	0,00
	85/15	18,86	13,07	18,86	13,07	1,00	0,00
Naproxène ^a	65/35	1,78	0,33	1,78	0,33	1,00	0,00
	85/15	2,22	0,66	2,22	0,66	1,00	0,00
Kétoprofène^a	25/75	1,58	0,17	1,61	0,19	1,13	0,06
	85/15	1,99	0,49	1,99	0,49	1,00	0,00
Ibuprofène ^c	65/35	2,35	0,75	2,35	0,75	1,00	0,00
	85/15	3,48	1,60	3,48	1,60	1,00	0,00
Nicardipine^a	25/75	11,71	7,67	12,12	7,98	1,04	< 0,05
	35/65	17,92	12,68	17,92	12,68	1,00	0,00

*: Eau/Acétonitrile; 1 ml/mn
^a: λ_{254nm}. ^b: λ_{220 nm}. ^c: λ_{230 nm}. ^d: λ_{206 nm}. ^e: λ_{200 nm}.
n.e: non élué.

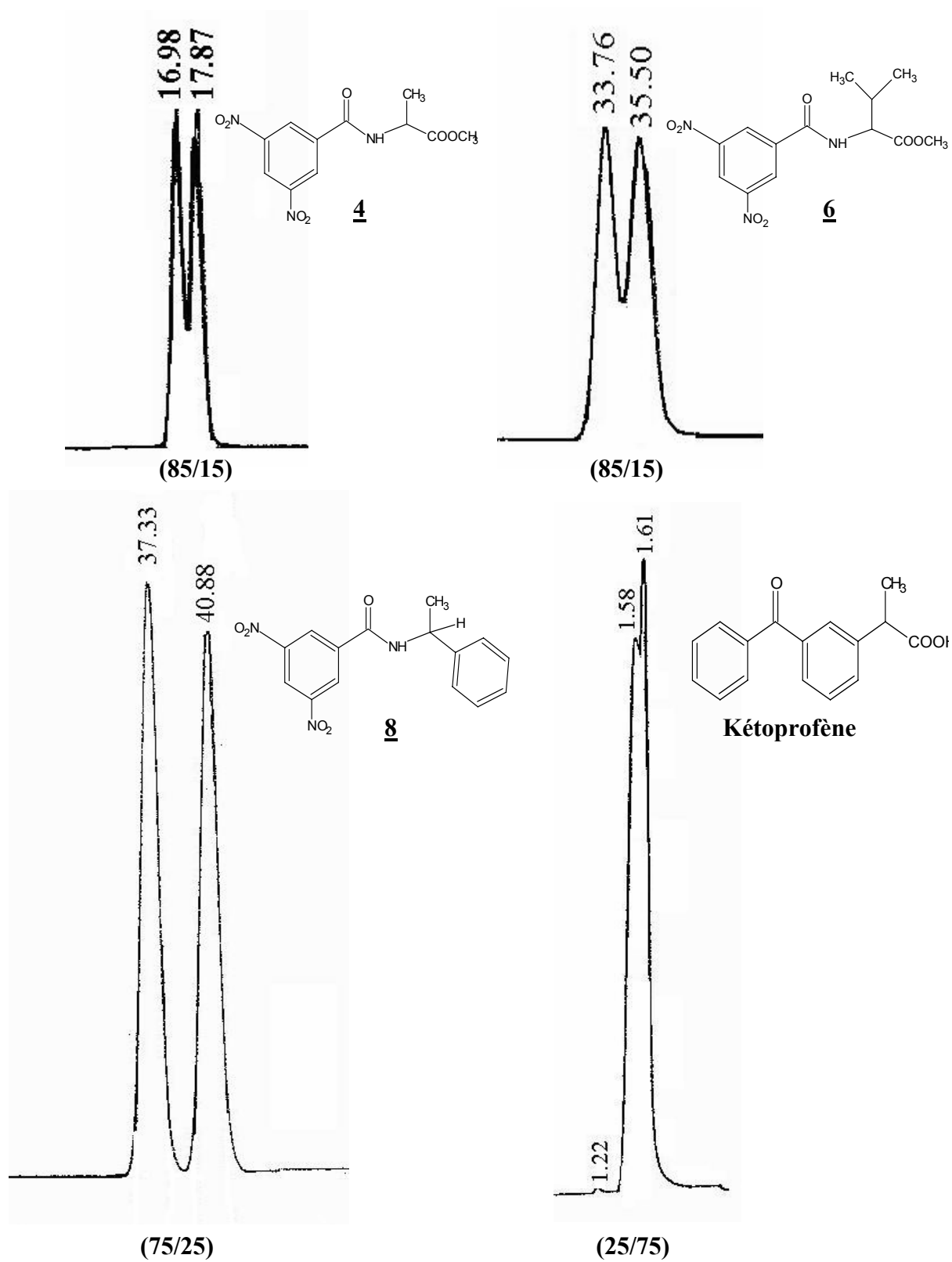


Figure 17 : Chromatogrammes de quelques solutés séparés sur la colonne C.
(Phase mobile : Eau/CH₃CN, 1 ml/mn, λ_{254} nm).

II-3-a Effet de la composition de la phase mobile sur la séparation chirale :

Comme cela a été observé sur les précédentes colonnes, les temps de rétention diminuent avec l'augmentation de la quantité de l'acétonitrile dans la phase mobile, ce qui traduit le comportement typique d'une colonne en mode inverse.²⁷ (Fig.18)

Mis à part les six (6) produits optiquement actifs séparés précédemment, aucun autre composé n'a pu être résolu, malgré la forte rétention de certains (indapamide, lorazepam etc...).

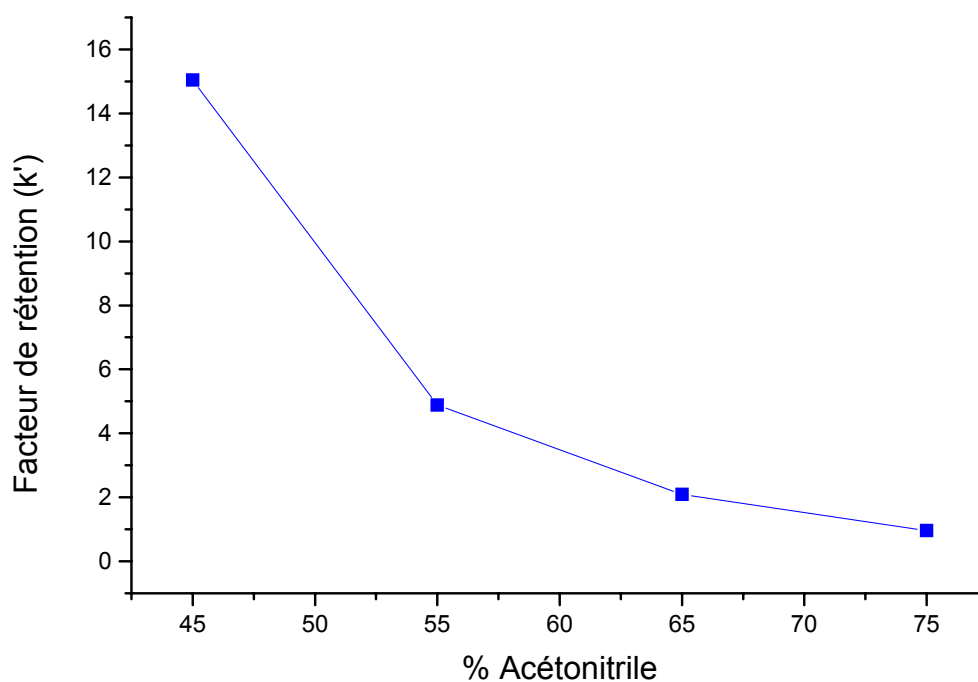


Figure 18 : Effet de l'augmentation de la quantité d'acétonitrile dans la phase mobile sur la rétention du produit 10 (Colonne C. Phase mobile : Eau/ CH₃CN, 1 ml/mn, λ_{254} nm).

Nous pouvons expliquer cela par le fait que la rétention ne soit pas due à la formation de complexe d'inclusion, mais à des interactions non stéréosélectives, pouvant se former entre le soluté et les groupements silanols de la phase stationnaire.¹⁹

Nous pouvons également noter que les composés acides tels que les herbicides et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (profènes) ne sont quasiment pas retenus, ce qui explique la coélution de leurs deux énantiomères. Ce type de produit nécessite l'utilisation de tampons aqueux dans la phase mobile²⁸ comme cela a été expliqué pour la colonne B.

II-3-b Effet du modifiant organique sur la résolution chirale :

Comme nous pouvons le constater sur les figures 19 et 20, la résolution est altérée par le modifiant organique, à cause de la compétition de ce dernier avec le soluté à l'intérieur de la cavité de la cyclodextrine,²² et cela à cause de l'hydrophobicité de l'acétonitrile.

Il a été reporté dans la littérature que la résolution de ce genre de colonne est améliorée avec l'augmentation de la composition de l'eau dans la phase mobile,²⁹ car elle intensifie les interactions hydrophobes.²⁷ De plus, le solvant organique modère la formation des complexes d'inclusion et des liaisons hydrogène,³⁰ ce qui explique la diminution des temps de rétention lors de l'ajout de l'acétonitrile.

La sélectivité ne varie pas en fonction de la composition de la phase mobile, cette dernière ne dépend que de la polarité de la phase mobile, ainsi que de la stabilité du complexe d'inclusion formé entre le soluté et la cyclodextrine.

Un autre résultat intéressant est le comportement du ketoprofène, qui est séparé avec 25% en eau, alors que l'augmentation du pourcentage en eau dans la phase mobile, empêche la résolution chirale de ce soluté, le même cas a été observé avec la nicardipine.

[30] T. E. Beestley, J. T. Lee, *Recent Developments in LC Column Technology*, June 2003

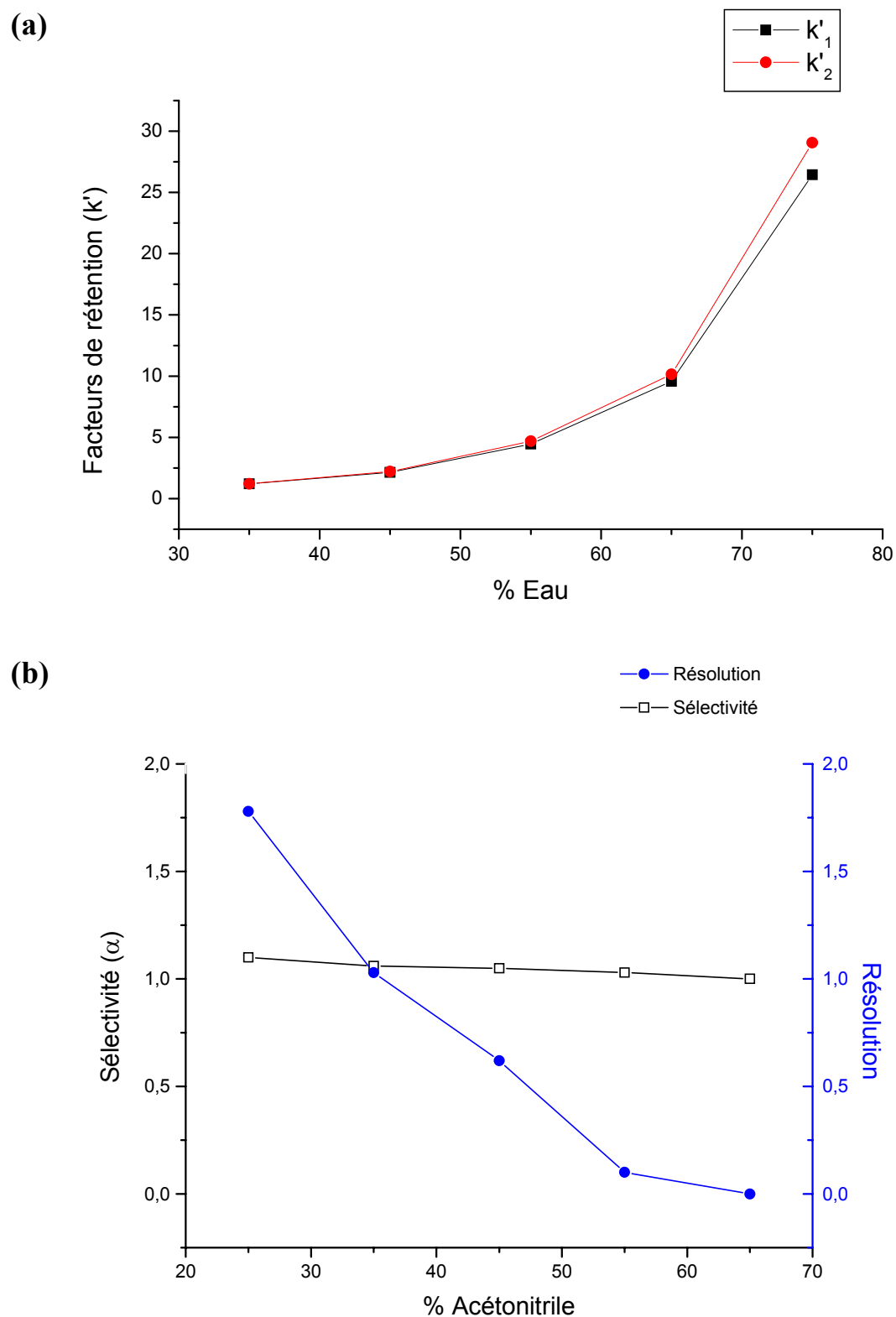


Figure 19 : Effet de la composition de la phase mobile sur les facteurs de rétention (a) ainsi que sur la résolution et la sélectivité (b) du produit 8.

(Colonne C, phase mobile : eau/ CH_3CN , 1 ml/mn, $\lambda_{254 \text{ nm}}$).

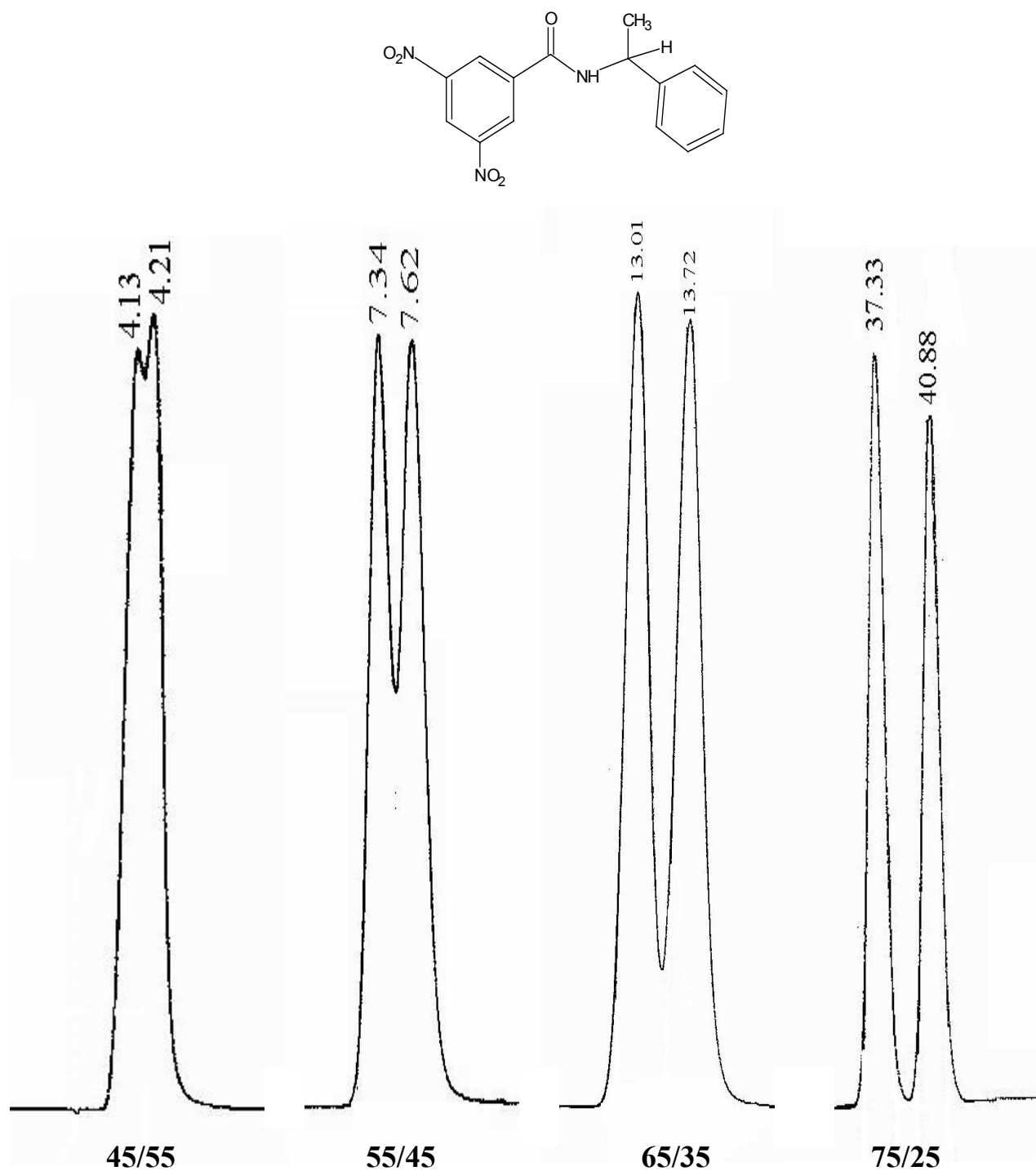


Figure 20 : Effet de la composition de la phase mobile sur la séparation des énantiomères du produit 8 sur la colonne C. (Phase mobile : eau/ CH₃CN, 1 ml/mn, $\lambda_{254\text{ nm}}$).

II-3-c Influence de la structure du soluté sur la résolution chirale:

Avec des phases mobiles constituées d'eau, la cavité hydrophobe de la cyclodextrine permettra l'inclusion complète de molécule ou de la partie lipophile de cette dernière.⁸

Nous pouvons remarquer la séparation des produits 4 et 6 (annexe A) sur cette colonne ce qui n'est pas le cas du produit 5, ceci peut être expliqué par la présence du groupement éthyle benzène qui semble créer un encombrement stérique susceptible de gêner la formation du complexe d'inclusion.

Quand au produit 7, la présence d'un groupement hydroxyle acide diminue la rétention empêchant ainsi la séparation chirale. Concernant le produit 8, la coélution de ses deux énantiomères est probablement due à sa taille volumineuse comparée à celles des produits 9 et 10.

Il est à noter que les produits 4, 5, 6, 8 et 9 ont été mieux séparés en mode normal qu'en mode inverse, alors que le lorazepam n'a été séparé qu'en mode organique polaire. Ceci confirme l'hypothèse stipulant que les cyclodextrines dérivées avec des groupements carbamates et aromatiques sont moins efficaces en mode inverse par rapport aux autres modes.²⁶

II-3-d Influence du débit sur la séparation chirale :

Les résultats obtenus lors de la variation du débit pour le produit 8 sont présentés sur le tableau VII.

Les temps de rétention augmentent avec la diminution du débit,²² ce qui donne un effet positif sur la résolution chirale car le soluté passe plus de temps dans la phase stationnaire pour former un complexe d'inclusion. Par ailleurs, nous avons pu noter l'indépendance de la sélectivité vis-à-vis du débit.³¹

[31] A. Péter, G. Torok, D. W. Armstrong, G. Toth, D. Tourwé, *J. Chromatogr. A*, 2000, **904**, 1

Débit (ml/mn)	tr ₁	k' ₁	tr ₂	k' ₂	α	Rs
1,2	6,27	4,70	6,52	4,93	1,05	0,57
1	7,51	4,69	7,82	4,92	1,05	0,67
0,8	9,42	4,71	9,81	4,95	1,05	0,73
0,6	12,59	4,78	13,10	5,01	1,05	0,73
0,4	19,08	4,73	19,85	4,96	1,05	0,70
0,2	38,22	4,70	39,78	4,94	1,05	0,71

*: Eau/Acétonitrile: 55/45, $\lambda_{254 \text{ nm}}$

III- Conclusion:

Dans cette partie, nous avons testé les trois colonnes chirales à base de β -cyclodextrine (A, B et C) en mode inverse, pour la séparation des produits chiraux testés auparavant en mode normal et organique polaire. 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 chirale utilisée.

Ainsi, le test de la phase stationnaire à base de β -cyclodextrine non dérivée (colonne A), a permis la séparation de quatre couples d'énantiomères, parmi eux deux herbicides (fluazifop-butyl et haloxyfop-éthoxyéthyl) et un produit pharmaceutique (la warfarine). L'étude de l'effet du pH a démontré la sensibilité extrême de ce type de phases stationnaires vis-à-vis de ce paramètre qui doit être manié avec une grande précaution.

La colonne B à base d'hydroxypropyl- β -cyclodextrine a permis la séparation de huit solutés optiquement actifs, notamment des produits pharmaceutiques tels que les benzodiazépines et les anti-inflammatoires non stéroïdiens. Nous avons souligné l'importance de la nature du modifiant organique et de la solution aqueuse utilisés dans la phase mobile ainsi que celle du débit sur la résolution chirale.

Sur la colonne C à base de phényl-hydroxypropyl- β -cyclodextrine, six produits optiquement actifs ont été séparés en utilisant une phase mobile à base d'eau, au lieu du tampon phosphate. Ainsi, il a été constaté que plus la phase mobile est enrichie en eau plus la résolution est meilleure.

CONCLUSION GENERALE

Nous nous sommes intéressés dans ce travail à la séparation chirale de plusieurs produits optiquement actifs sur des colonnes à base de β -cyclodextrine préparées au laboratoire, en chromatographie liquide à haute performance en utilisant trois modes de phase mobile.

Les séparations chirales en mode normal n'ont été obtenues que sur la colonne à base de phényl-hydroxypropyl- β -cyclodextrine. Ainsi, neuf produits optiquement actifs ont été séparés sur cette colonne, notamment des produits pharmaceutiques. Nous avons démontré dans cette étude l'effet déterminant de la composition de la phase mobile ainsi que celui de la nature de l'alcool utilisé sur la sélectivité de la phase stationnaire.

Lorsque nous avons comparé le comportement des trois colonnes en mode normal, nous avons pu souligner la nécessité de la présence des groupements aromatiques et carbamates sur la β -CD pour que la résolution chirale puisse être obtenue, vu que la β -cyclodextrine non dérivée n'a séparé aucun produit en mode normal.

Quant au mode organique polaire, il s'est avéré inefficace avec la β -cyclodextrine non dérivée et l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine, contrairement à ce qui a été reporté en bibliographie. Seuls le lorazepam et l'oxazepam ont pu être séparés sur la colonne C, ce qui démontre encore une fois l'importance des groupements polaires et leur rôle capital dans le mécanisme de la reconnaissance chirale. Nous avons démontré également l'importance du rapport acide/base dans l'optimisation de la séparation chirale.

En mode inverse, les trois colonnes se sont montrées très efficaces et cela est sûrement dû à l'implication du phénomène d'inclusion (principale caractéristique de la β -cyclodextrine) dans le mécanisme de résolution chirale. Ainsi, dix-sept produits racémiques ont été résolus avec ce mode de phase inverse. Il s'agit des herbicides sur la colonne A, des benzodiazépines sur la colonne B et des anti-inflammatoires non stéroïdiens sur les colonnes B et C.

La majorité des solutés séparés ont été résolus sur la colonne B qui s'est montrée particulièrement efficace. Alors que la colonne C, elle a été plus efficace en mode normal. Dans ce cas, nous pouvons admettre que les groupements polaires et aromatiques ont dû gêner l'inclusion des solutés à l'intérieur de la cavité de la cyclodextrine.

A la lumière de ces résultats, nous avons pu constater qu'il est préférable de commencer le test d'une colonne à base de β -cyclodextrine avec le mode normal avant de passer au mode inverse car celui-ci permet la préservation des performances de la phase stationnaire.

Quant au mode inverse il est vrai qu'il offre un large choix de phases mobiles, de manière à avoir plus de paramètres sur lesquels nous pouvons jouer dans le but d'optimiser la séparation chirale. Parmi ces paramètres nous pouvons citer : la concentration et la nature du tampon, la valeur du pH, la nature du solvant organique, la valeur du débit...etc.

L'autre point essentiel concernant les modes inverse et organique polaire, est la possibilité d'analyser des échantillons biologiques qui ont tendance à être trop retenus en mode normal.

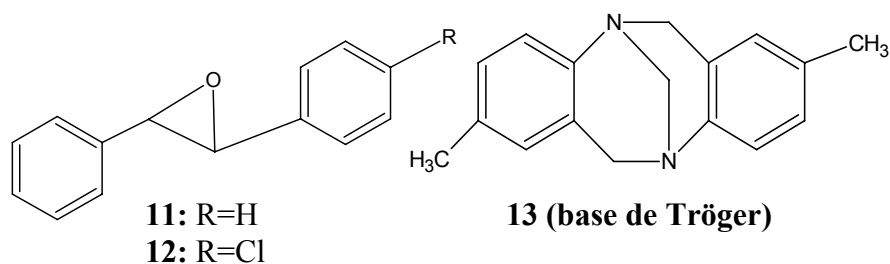
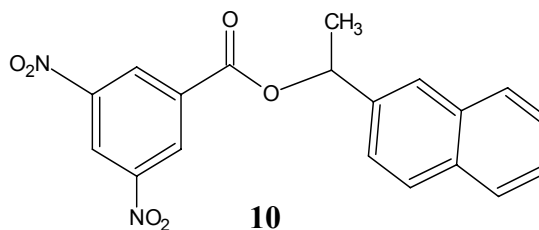
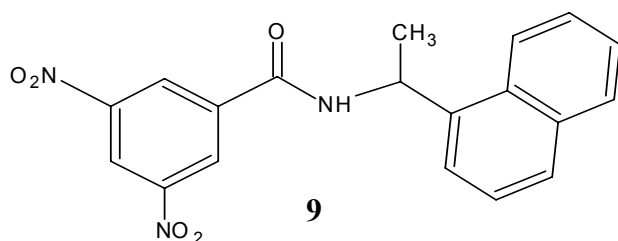
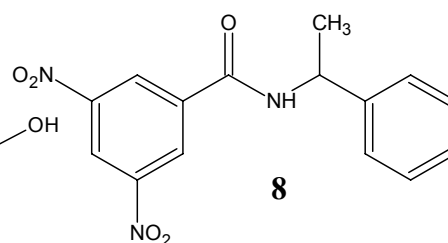
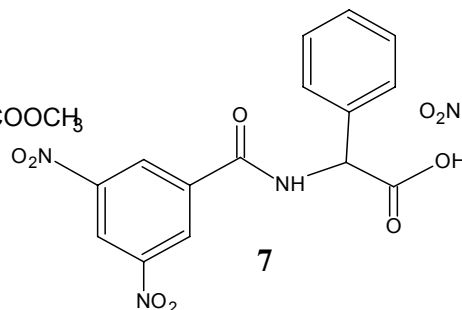
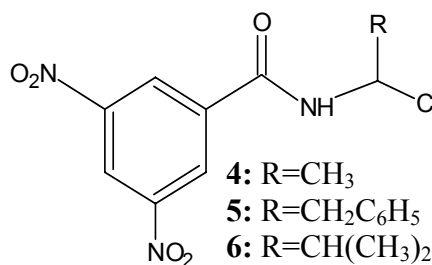
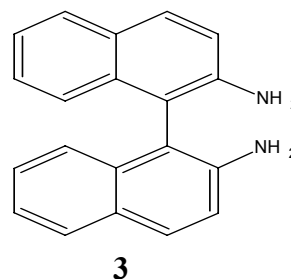
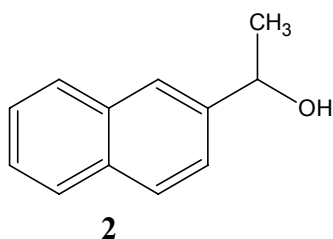
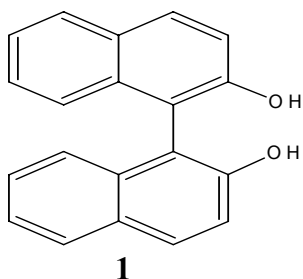
Ainsi, nous pouvons noter une certaine complémentarité entre les trois colonnes chirales ainsi que les trois modes de phases mobiles utilisés.

Une suite logique de ce travail serait d'effectuer des applications biologiques que ce soit avec des herbicides ou avec des produits pharmaceutiques afin d'étudier le métabolisme de chaque énantiomère ainsi que leurs effets sur les organismes vivants.

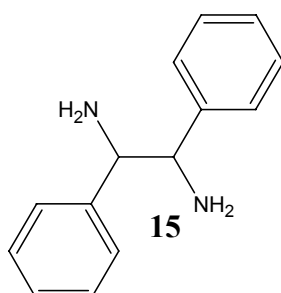
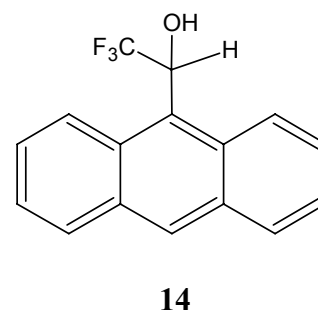
ANNEXE A

Structures des produits testés

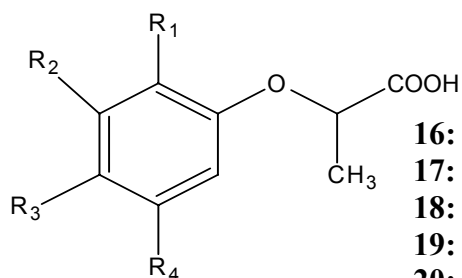
I- Les produits optiquement actifs



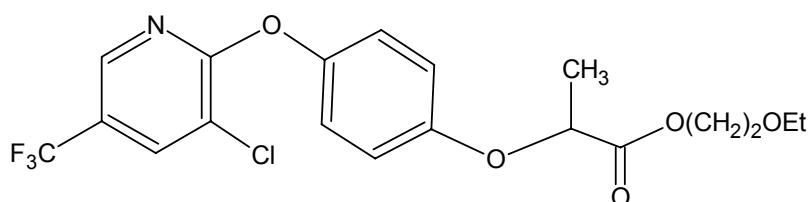
13 (base de Tröger)



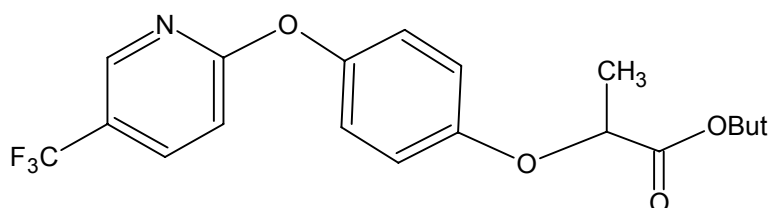
II- Les herbicides



- 16:** $R_1=R_2=R_3=R_4=H$; **acide phenoxypropionique**
17: $R_1=Cl, R_2=R_3=R_4=H$; **acide 2-chloro-phenoxypropionique**
18: $R_2=Cl, R_1=R_3=R_4=H$; **acide 3-chloro-phenoxypropionique**
19: $R_3=Cl, R_1=R_2=R_4=H$; **acide 4-chloro-phenoxypropionique**
20: $R_1=R_3=Cl, R_2=R_4=H$; **dichlorprop**
21: $R_1=R_3=R_4=Cl, R_2=H$; **silvex**
22: $R_1=CH_3, R_2=R_4=H, R_3=Cl$; **mecoprop**



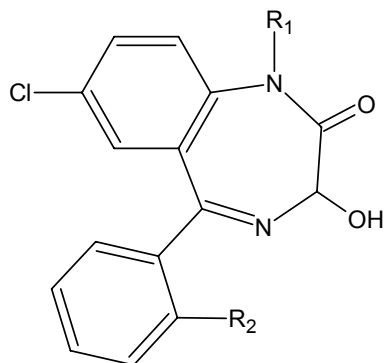
Fluazifop-butyl



Haloxyfop-éthoxyéthyl

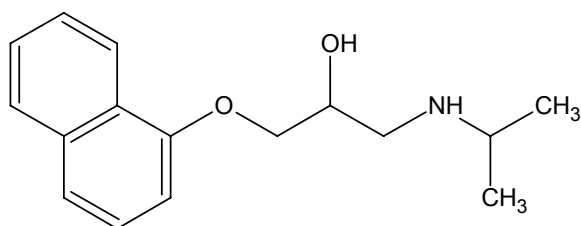
III- Les produits pharmaceutiques

1- Les benzodiazépines

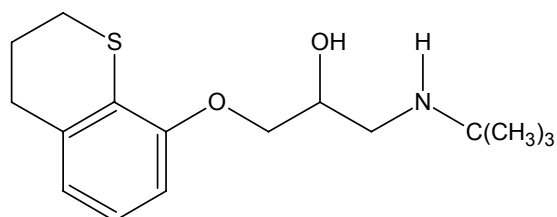


Lorazepam: $R_1=H$, $R_2=Cl$
Lormetazepam: $R_1=CH_3$, $R_2=Cl$
Oxazepam: $R_1=R_2=H$
Temazepam: $R_1=CH_3$, $R_2=H$

2- Les β -bloquants

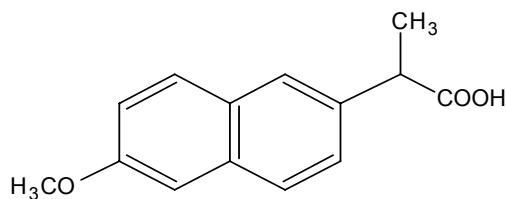


Propranolol

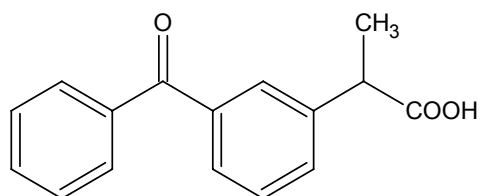


Tertatolol

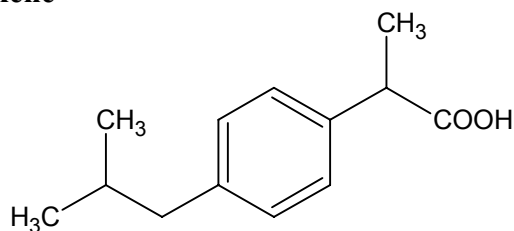
3- Les anti-inflammatoires non stéroïdiens :



Naproxène

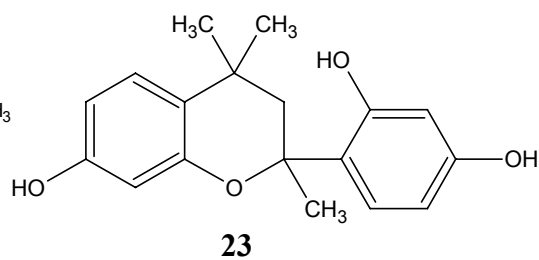
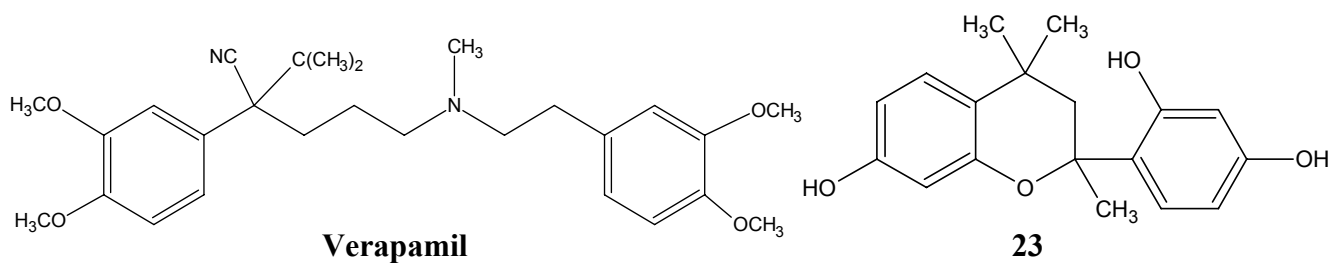
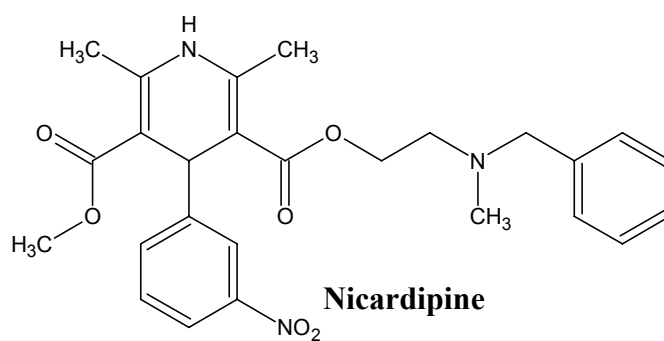
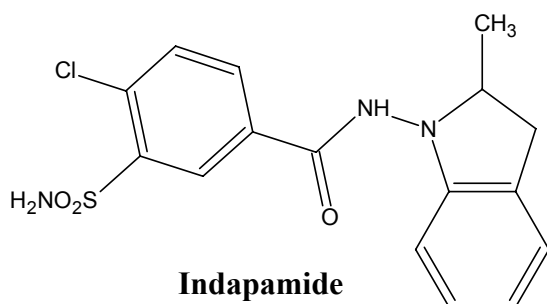
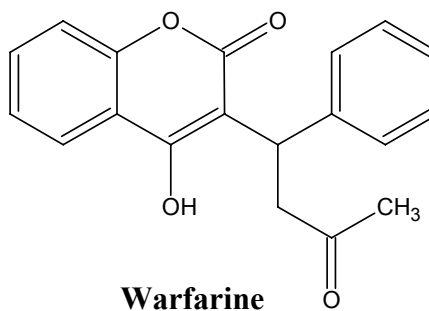
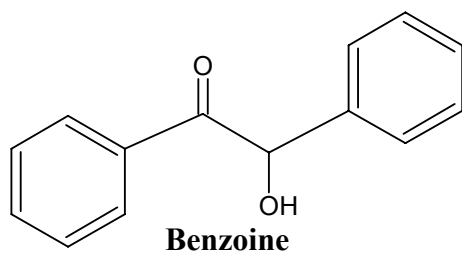


Ketoprofène



Ibuprofène

4- Divers :



ANNEXE B

Références bibliographiques utilisées dans ce travail :

Introduction

- [1] L. Pasteur, *Ann. Chim. Phys.*, 1848, **24**, 442
- [2] D. K. Kondepudi, D. J. Durand, *Chirality*, 2001, **13**, 351
- [3] T. Kubota, C. Yamamoto, Y. Okamoto, *Chirality*, 2002, **14**, 372
- [4] K. Mihlbachler, K. Kaczmariski, A. Seidel-Morgenstern, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, 2002, **955**, 35
- [5] T. J. Ward, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 2863
- [6] D. W. Armstrong, *Direct Enantiomeric Separations in Liquid Chromatography and Gas Chromatography*, edited by H. J. Issaq, *Century of Separation Science*, Marcel Dekker, New York, 2002, Chapitre 33

Chapitre I : Généralités

- [1] U. Selditz, *Separability of Racemates in Chiral Chromatography. Attempts to explain Chiral Recognition through Structure-Retention Relationships*, Thèse de Doctorat, 1998, Groningen Utrecht Institute for Drug Exploration, Netherlands.
- [2] K. Mislow, *Chirality*, 2002, **14**, 126
- [3] Référence citée dans : T. E. Beesley, R. P. Scott, *Chiral Chromatography*. New York: John Wiley & Sons; 1998. 506 p
- [4] S. Amllénmark, *Chromatographic Enantioseparation, methods and application, second edition*, Ellis Horwood Series in analytical chemistry; 1991. 282 p
- [5] F. Tazerouti, *Synthèse, caractérisation et application des phases stationnaires chirales en chromatographie liquide*, Thèse de Doctorat, 2001, ALGER, U.S.T.H.B.
- [6] G. Götmár, N. Robinat Albareda, T. Fornstedt, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 2950
- [7] D. R. Bobbitt, S. W. Linder, *Trends Anal. Chem.*, 2001, **20(3)**, 111
- [8] Y. Kubo, N. Hirota, S. Maeda, S. Tokita, *Anal. Sci.*, 1998, **14**, 183
- [9] T. E. Beestley, J. T. Lee, *Recent Developments in LC Column Technology*, June 2003
- [10] B. Chankvetadze, *J. Sep. Sci.*, 2001, **24**, 691
- [11] K. Mihlbachler, K. Kaczmariski, A. Seidel-Morgenstern, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, 2002, **955**, 35
- [12] H. Y. Aboul-Enein, I. Ali, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2001, **370**, 951
- [13] H. Y. Aboul-Enein, I. Ali, *J. Sep. Sci.*, 2001, **24**, 831
- [14] N. M. Mair, P. Franco, W. Lindner, *J. Chromatogr. A*, 2001, **906**, 3
- [15] M. Xu, E. Brahmachary, M. Janco, F. H. Ling, *J. Chromatogr. A*, 2001, **928**, 25
- [16] M. Wedig, S. Laug, T. Christians, M. Thunhorst, U. Holzgrabe, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, **27**, 531
- [17] H. J. Federsel, *Chirality*, 2003, **15**, S128
- [18] E. Brenna, C. Fuganti, S. Serra, *Tetrahedron : Asymmetry*, 2003, **14**, 1
- [19] H. Y. Aboul-Enein, M. D. Efstatiade, G. E. Baiulescu, *Electrophoresis*, 1999, **20**, 2686
- [20] A. Jaus, M. Oehme, *J. Chromatogr. A*, 2001, **905**, 59
- [21] J. J. Ellington, J. J. Evans, K. B. Prickett, W. L. Champion Jr, *J. Chromatogr. A*, 2001, **928**, 145
- [22] Y. Makino, Y. Urano, T. Nagano, *J. Chromatogr. A*, 2002, **947**, 151
- [23] S.C. Ng, T. T. Ong, P. Fu, C. B. Ching, *J. Chromatogr. A*, 2002, **968**, 31
- [24] B. Glaser, W. Amelung, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2002, **16**, 891
- [25] C. Rodier, C. Laurent, C. Szopa, R. Sternberg, F. Raulin, *Chirality*, 2002, **14**, 527

- [26] P. Y. Hayes, M. T. Fletcher, S. Chow, M. J. McGrath, *Chirality*, 2003, **15**, S116
- [27] A. Khrimian, A. Kh. Margaryan, W. F. Schmidt, *Tetrahedron*, 2003, **59**, 5475
- [28] B. Feibush, N. Grinberg, in: M. Zief, L. J. Crane (Eds.), *Chromatographic Chiral Separations, Chromatographic Science Series*, Vol.40, Marcel Dekker, New York, 1988, p. 1, Chapitre 1
- [29] E. Schneiderman, A. M. Stalcup, *J. Chromatogr. B*, 2000, **745**, 99
- [30] T. J. Ward, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 2863
- [31] Q. Debg, S. Kang, Q. Zhu, Z. Xu, *American Laboratory*, 1999, July, 43
- [32] D. W. Armstrong, *Direct Enantiomeric Separations in Liquid Chromatography and Gas Chromatography*, edited by H. J. Issaq, *Century of Separation Science*, Marcel Dekker, New York, 2002, Chapitre 33
- [33] D. W. Armstrong, K. L. Rundlett, U. B. Nair, *Current Separations*, 1996, **15(2)**, 57
- [34] R. Schmidt, H. G. Wahl, H. Häberle, H.-J. Dieterich, V. Schurig, *Chirality*, 1999, **11**, 206
- [35] F. Sánchez-Rasero, M. B. Matallo, G. Dios, E. Romero, A. Peña, *J. Chromatogr. A*, 1998, **799**, 355
- [36] Z. Juvancz, *Trends Anal.Chem.*, 2002, **21(5)**, 379
- [37] H. Wang, J. L. Gu, H. F. Hu, R. J. Dai, T. H. Ding, R. N. Fu, *Anal. Chim. Acta.*, 1998, **359**, 39
- [38] S. C. Ng, L. Chen, L. F. Zhang, C. B. Ching, *Tetrahedron Letters*, 2002, **43**, 677
- [39] H. Y. Aboul-Enein, *J. Chromatogr. A*, 2001, **906**, 185
- [40] Y.-J. Wu, M.-M. Ma, S. Zeng, *Journal of Zhejiang University SCIENCE*, 2004, **5(2)**, 226
- [41] J. Szymura-Oleksiak, M. Walczak, J. Bojarski, H.Y. Aboul-Enein, *Chirality*, 1999, **11**, 267
- [42] P. De Tullio, A. Ceccato, J. F. Liégeois, B. Pirotte, A. Felikidis, M. Stachow, *Chirality*, 1999, **11**, 261
- [43] M. H. Iha, A. S. Martinez, P. S. Bonato, *J. Chromatogr. B*, 2002, **767**, 1
- [44] J. Oxelbark, S. Claeson, *Tetrahedron : Asymmetry*, 2002, **13**, 2235
- [45] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, G. Dewynter, J. L. Montero, *Algerian Journal of Advanced Materials*, 1998, **2**, 69
- [46] J. Haginaka, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, **27**, 357
- [47] M. A. Schwarz, P. C. Hauser, *J. Chromatogr. A*, 2001, **928**, 225
- [48] F. Pellati, S. Benvenuti, M. Melegari, F. Firenzuoli, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, **29**, 1113
- [49] K. M. Fried, A. E. Young, S. U. Yasuda, I. W. Wainer, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, **27**, 479
- [50] C. J. Welch, M. H. Kress, M. Beconi, *Chirality*, 2003, **15**, 143
- [51] J. Zukowski, M. Brightwell, V. De Biasi, *Chirality*, 2003, **15**, 600
- [52] U. Heinemann, G. Blaschke, N. Knebel, *J. Chromatogr. B*, 2003, **793**, 389
- [53] A. Motoyama, A. Suzuki, O. Shiota, R. Namba, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, **28**, 97
- [54] R. Lukae, A. J. Clark, S. Khalid, A. Rodger, A. Snedden, P. M. Rodger, *Journal of Molecular liquids*, 2002, **98-99**, 411
- [55] M. G. Quaglia, A. Mai, G. Sbardella, M. Artico, R. Ragno, *Chirality*, 2001, **13**, 75
- [56] M. G. Finn, *Chirality*, 2002, **14**, 534
- [57] M. Kato, T. Toyo'oka, *Chromatography*, 2001, **22(3)**, 159
- [58] C. Hellriegel, H. Händel, M. Wedig, S. Steinhauer, F. Sörgel, K. Albert, U. Holzgrabe, *J. Chromatogr. A*, 2001, **914**, 315
- [59] M. Zhou, J. T. Stewart, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, **30**, 443
- [60] C. E. Lin, K. H. Chen, *J. Chromatogr. A*, 2001, **930**, 155

- [61] C. Simo, A. Gallardo, J. San Roman, C. Barbas, A. Cifuentes, *J. Chromatogr. B*, 2002, **767**, 35
- [62] A. Salvador, B. Herbreteau, M. Dreux, A. Karlsson, O. Gyllenhaal, *J. Chromatogr. A*, 2001, **929**, 101
- [63] M. Girod, B. Chankvetadze, Y. Okamoto, G. Blaschke, *J. Sep. Sci.*, 2001, **24**, 27
- [64] E. Frankotte, T. Leutert, L. La Vacchia, F. Ossola, P. Richert, A. Schmidt, *Chirality*, 2002, **14**, 313
- [65] A. Laverde Jr, G. J. A. Da Conceição, S. C. N. Queiroz, *Magn. Reson. Chem.*, 2002, **40**, 433
- [66] C. Yamamoto, E. Yashima, Y. Okamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1999, **72**, 1815
- [67] A. Torrens, J. A. Castrillo, J. Frigola, L. Salgado, J. Redondo, *Chirality*, 1999, **11**, 63
- [68] N. Fadnavis, V. Bhaskar, A. Deshpande, U. Bhalerao, *Anal. Chim. Acta.*, 2001, **441**, 297
- [69] E. Yashima, Y. Okamoto, *Chiral recognition mechanism of polysaccharides chiral stationary phases*, in: H. Y. Aboul-Enein and I. W. Wainer (Ed.), *The Impact of Stereochemistry on Drug Development and Use*, Chemical Analysis Series, Vol. 142, Jons Wiley & Sons, 1997, chapitre 12
- [70] E. Yashima, *J. Chromatogr. A*, 2001, **906**, 105
- [71] T. Kubota, C. Yamamoto, Y. Okamoto, *Chirality*, 2002, **14**, 372
- [72] M. M. Hefnawy, J. T. Stewart, *Anal. Lett.*, 1999, **32(1)**, 159
- [73] B. Polak, W. Golkiewicz, *Chromatographia*, 2002, **56**, 323
- [74] L. Skalova, R. Kral, B. Szotakova, Y. N. Babu, L. Pichard Garcia, V. Wsol, *Chirality*, 2003, **15**, 433
- [75] Z. Chilmonezyk, H. Ksycinka, H. Y. Aboul-Enein, W. J. Lee, *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, 2001, **24(16)**, 2505
- [76] H. Y. Aboul-Enein, I. A. Al-Duraibi, *Enantiomer*, 1999, **4**, 451
- [77] H. Y. Aboul-Enein, I. Ali, M. G. Schmid, V. Jetcheva, O. Gecse, G. Gubitz, *Analytical Letters*, 2001, **34(7)**, 1107
- [78] H. Y. Aboul-Enein, I. Ali, G. Gubitz, C. Simons, P. J. Nicholls, *Chirality*, 2000, **12**, 727
- [79] M. L. De La Puente, C. T. White, A. Rivera-Sagredo, J. Reilly, *J. Chromatogr. A*, 2003, **983**, 101
- [80] C. Roussel, B. Bonnet, A. Piederriere, C. Suteu, *Chirality*, 2001, **13**, 56
- [81] C. L. Narayana, T. Suresh, S. Mahender Rao, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, **32**, 21
- [82] C. Perrin, V. A. Vu, N. Matthijs, M. Maftouh, *J. Chromatogr. A*, 2002, **947**, 69
- [83] Z. Chilmoneczyk, H. Ksycinska, M. Mazgajska, H. Y. Aboul-Enein, *Chirality*, 1999, **11**, 790
- [84] J. Garcés, P. Franco, L. Oliveros, C. Minguillon, *Tetrahedron : Asymmetry*, 2003, **14**, 1179
- [85] M. G. Schmid, O. Gecse, Z. Szabo, F. Kilar, G. Gubitz, I. Ali, H. Y. Aboul-Enein, *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, 2001, **24(16)**, 2493
- [86] B. H. Kim, S. U. Lee, K. T. Kim, *Chirality*, 2003, **15**, 276
- [87] T. Spitzer, E. Yashima, Y. Okamoto, *Chirality*, 1999, **11**, 195
- [88] S. Sforza, G. Galaverna, R. Corradini, A. Dossena, R. Marchelli, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2003, **14**, 124
- [89] Y. C. Guillaume, J. F. Robert, C. Guinchard, *Talanta*, 2001, **55**, 263
- [90] B. Perly, F. Pilard, *Les cyclodextrines et leur Applications*, CLEFS CEA, **35**, 1997
- [91] L. Liu, Q. X. Guo, *J. Incl. Phenom.*, 2002, **42**, 1
- [92] S. Chen, *J. Chin. Chem. Soc.*, 2001, **48**, 751
- [93] K. P. Lee, S. H. Choi, E. N. Ryu, J. J. Ryoo, J. H. Park, Y. Kim, M. H. Hyun, *Anal. Chem.*, 2002, **18**, 31

- [94] R. Herraiez-Hernandez, P. Campins-Falco, *Anal. Chim. Acta.*, 2001, **434**, 315
- [95] S. Rudaz, J. C. Veuthey, *Chirality*, 1999, **11**, 319
- [96] H. Kim, E. Radwanski, R. Lovey, C. C. Lin, A. A. Nomeir, *Chirality*, 2002, **14**, 436
- [97] Y. C. Guillaume, J. F. Robert, C. Guinchard, *Talanta*, 2001, **55**, 263
- [98] Z. Shen, S. Wang, R. Bakhtiar, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2002, **16**, 332
- [99] G. Torok, A. Péter, D. W. Armstrong, D. Tourwé, G. Toth, J. Sapi, *Chirality*, 2001, **13**, 648
- [100] A. Péter, G. Torok, D. W. Armstrong, G. Toth, D. Tourwé, *J. Chromatogr. A*, 2000, **904**, 1
- [101] C. Rustichelli, V. Ferioli, G. Gamberini, R. Stancanelli, *Chromatographia*, 2001, **54**, 731
- [102] M. Brunnenberg, K. A. Kovar, *J. Chromatogr. B*, 2001, **751**, 9
- [103] B. K. Patel, J. Valentova, A. J. Hutt, *Chromatographia*, 2002, **55**, 135
- [104] G. Blaschke, in: M. Zief, L. J. Crane (Eds.), *Chromatographic Chiral Separations, Chromatographic Science Series*, Vol.40, Marcel Dekker, New York, 1988, p. 179, Chapitre 7

Chapitre II: La séparation chirale en mode normal

- [1] B. Chankvetadze, *J. Sep. Sci.*, 2001, **24**, 691
- [2] U. Holzgrabe, T. Christians, *J. Cap. Elec. And Microchip Tech.* 007, 2002, **1/2**, 23
- [3] D. W. Armstrong, *Direct Enantiomeric Separations in Liquid Chromatography and Gas Chromatography*, H. J. Issaq (Ed.), *Century of Separation Science*, Marcel Dekker, New York, 2002, Chapitre 33
- [4] N. M. Mair, P. Franco, W. Lindner, *J. Chromatogr. A*, 2001, **906**, 3
- [5] K. L. Park, K. H. Kim, S. H. Jung, H. M. Lim, C. H. Hong, J. S. Kang, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, **27**, 569
- [6] S.C. Ng, T. T. Ong, P. Fu, C. B. Ching, *J. Chromatogr. A*, 2002, **968**, 31
- [7] S. C. Ng, L. Chen, L. F. Zhang, C. B. Ching, *Tetrahedron Letters*, 2002, **43**, 677
- [8] T. J. Ward, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 2863
- [9] S. Sforza, G. Galaverna, R. Corradini, A. Dossena, R. Marchelli, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2003, **14**, 124
- [10] T. Hargitai, Y. Kaida, Y. Okamoto, *J. Chromatogr.*, 1993, **628**, 11
- [11] T. E. Beestley, J. T. Lee, *Recent Developments in LC Column Technology*, June 2003
- [12] D. W. Armstrong, M. Hilton, L. Coffin, *LC-GC*, 1992, **9**, 647
- [13] A. Schuster, C. Götte, G. Bernhardt, A. Buschauer, *Chirality*, 2001, **13**, 285
- [14] C. H. Lin, C. E. Lin, C. C. Chen, L. F. Liao, *J. Chin. Chem. Soc.*, 2001, **48**, 1069
- [15] M. M. Hefnawy, J. T. Stewart, *Anal. Lett.*, 1999, **32(1)**, 159
- [16] M. G. Schmid, O. Gecse, Z. Szabo, F. Kilar, G. Gubitz, I. Ali, H. Y. Aboul-Enein, *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, 2001, **24(16)**, 2493
- [17] F. Tazerouti, *Synthèse, caractérisation et application des phases stationnaires chirales en chromatographie liquide*, Thèse de Doctorat, 2001, ALGER, U.S.T.H.B.
- [18] J. M. Finn, in: M. Zief, L. J. Crane (Eds.), *Chromatographic Chiral Separations, Chromatographic Science Series*, Vol.40, Marcel Dekker, New York, 1988, p. 53, Chapitre 3
- [19] Chiral Separation. *A Guide to using cyclodextrin bonded phases for liquid chromatography*, ASTEC, Advanced Separation Technologies Inc., USA, 1997
- [20] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, G. Dewynter, J. L. Montero, *Algerian Journal of Advanced Materials*, 1998, **2**, 69

- [21] C. Yamamoto, E. Yashima, Y. Okamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1999, **72**, 1815
- [22] Z. Chilmonczyk, H. Ksycinska, M. Mazgajska, H. Y. Aboul-Enein, *Chirality*, 1999, **11**, 790
- [23] G. Félix, C. Cachau, A. Thienpont, M.-H. Souldard, *Chromatographia*, 1996, **42 (9/10)**, 583
- [24] Y. Nakamura, S. Takeuchi, K. Okumura, Y. Ohgo, *Tetrahedron Letters*, 2003, **44**, 6221
- [25] I. A. Anan'eva, E. N. Shapovalova, S. A. Lopatin, O. A. Shpigun, V. P. Varlamov, V. A. Davankov, D. W. Armstrong, *J. Anal. Chem.*, 2002, **57(4)**, 393
- [26] S. Rudaz, J. C. Veuthey, *Chirality*, 1999, **11**, 319
- [27] C. Perrin, V. A. Vu, N. Matthijs, M. Maftouh, *J. Chromatogr. A*, 2002, **947**, 69
- [28] P. S. Bonato, R. Bortocan, C. M. Gaitani, F. O. Paías, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2002, **13(2)**, 190
- [29] U. Skogsberg, S. Allenmark, *J. Chromatogr. A*, 2001, **921**, 161
- [30] Y. Gong, H. K. Lee, *J. Sep. Sci.*, 2003, **26**, 515
- [31] B. K. Patel, J. Valentova, A. J. Hutt, *Chromatographia*, 2002, **55**, 135
- [32] R. Herraez-Hernandez, P. Campins-Falco, *Anal. Chim. Acta.*, 2001, **434**, 315
- [33] H.Y. Aboul-Enein, I. A. Al-Duraibi, *Enantiomer*, 1999, **4**, 451
- [34] J. Zukowski, *Chirality*, 1998, **10**, 362
- [35] H.Y. Aboul-Enein, *J. Sep. Sci.*, 2003, **26**, 521
- [36] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, P. Franco, C. Minguillon, *Chirality*, 2002, **14**, 59
- [37] M. Péter, A. Péter, J. Van Der Eycken, P. Cosmos, G. Bernath, F. Fulop, *J. Chromatogr. A*, 1998, **816**, 123
- [38] T. Wang, Y. W. Chen, *J. Chromatogr. A*, 1999, **855**, 411
- [39] B. Chankvetadze, C. Yamamoto, Y. Okamoto, *J. Chromatogr. A*, 2001, **922**, 127
- [40] C. L. Narayana, T. Suresh, S. Mahender Rao, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, **32**, 21
- [41] F. Leonelli, B. Garofalo, L. M. Migneco, R. M. Bettolo, *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, 2003, **26(3)**, 401

Chapitre III: La séparation chirale en mode organique polaire

- [1] E. Schneiderman, A. M. Stalcup, *J. Chromatogr. B*, 2000, **745**, 99
- [2] Z. Juvancz, *Trends Anal. Chem.*, 2002, **21(5)**, 379
- [3] D. W. Armstrong, M. Hilton, L. Coffin, *LC-GC*, 1992, **9**, 647
- [4] T. E. Beestley, J. T. Lee, *Recent Developments in LC Column Technology*, June 2003
- [5] D. W. Armstrong, *Direct Enantiomeric Separations in Liquid Chromatography and Gas Chromatography*, edited by H. J. Issaq, *Century of Separation Science*, Marcel Dekker, New York, 2002, Chapitre 33
- [6] A. Péter, G. Torok, D. W. Armstrong, G. Toth, D. Tourwé, *J. Chromatogr. A*, 2000, **904**, 1
- [7] C. Rustichelli, V. Ferioli, G. Gamberini, R. Stancanelli, *Chromatographia*, 2001, **54**, 731
- [8] M. H. Iha, A. S. Martinez, P. S. Bonato, *J. Chromatogr. B*, 2002, **767**, 1
- [9] G. Félix, C. Cachau, A. Thienpont, M.-H. Souldard, *Chromatographia*, 1996, **42(9/10)**, 583
- [10] Chiral Separation. *A Guide to using cyclodextrin bonded phases for liquid chromatography*, ASTEC, Advanced Separation Technologies Inc., USA, 1997
- [11] A. Peter, J. Kaman, F. Fülöp, J. Van Der Eycken, *J. Chromatogr. A*, 2001, **919**, 79

- [12] G. Torok, A. Péter, D. W. Armstrong, D. Tourwé, G. Toth, J. Sapi, *Chirality*, 2001, **13**, 648
- [13] F. Tazerouti, *Synthèse, caractérisation et application des phases stationnaires chirales en chromatographie liquide*, Thèse de Doctorat, 2001, ALGER, Ug.S.T.H.B.
- [14] Y. Gong, H. K. Lee, *J. Sep. Sci.*, 2003, **26**, 515
- [15] N. Grobuschek, L. SripHong, M. G. Schmid, T. Lorand, H. Y. Aboul-Enein, G. Gubitz, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2002, **53**, 25
- [16] M. A. Schwarz, P. C. Hauser, *J. Chromatogr. A*, 2001, **928**, 225
- [17] S. Rudaz, J. C. Veuthey, *Chirality*, 1999, **11**, 319
- [18] A. Anan'eva, E. N. Shapovalova, S. A. Lopatin, O. A. Shpigun, V. P. Varlamov, V. A. Davankov, D. W. Armstrong, *J. Anal. Chem.*, 2002, **57(4)**, 393
- [19] C. L. Narayana, T. Suresh, S. Mahender Rao, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, **32**, 21
- [20] M. Péter, A. Péter, J. Van Der Eycken, P. Cosmos, G. Bernath, F. Fulop, *J. Chromatogr. A*, 1998, **816**, 123

Chapitre IV: La séparation chirale en mode inverse

- [1] I. A. Anan'eva, E. N. Shapovalova, S. A. Lopatin, O. A. Shpigun, V. P. Varlamov, V. A. Davankov, D. W. Armstrong, *J. Anal. Chem.*, 2002, **57(4)**, 393
- [2] B. Perly, F. Pilard, *Les cyclodextrines et leur Applications*, CLEFS CEA, **35**, 1997
- [3] E. Schneiderman, A. M. Stalcup, *J. Chromatogr. B*, 2000, **745**, 99
- [4] D. W. Armstrong, *Direct Enantiomeric Separations in Liquid Chromatography and Gas Chromatography*, edited by H. J. Issaq, *Century of Separation Science*, Marcel Dekker, New York, 2002, Chapitre 33
- [5] S.C. Ng, T. T. Ong, P. Fu, C. B. Ching, *J. Chromatogr. A*, 2002, **968**, 31
- [6] M. Kato, T. Toyo'oka, *Chromatography*, 2001, **22(3)**, 159
- [7] O. Lecnik, M. G. Schmid, C. O. Kappe, G. Gübitz, *Electrophoresis*, 2001, **22**, 3198
- [8] F. Leonelli, B. Garofalo, L. M. Migneco, R. M. Bettolo, *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, 2003, **26(3)**, 401
- [9] Z. Juvancz, *Trends Anal. Chem.*, 2002, **21(5)**, 379
- [10] Y. C. Guillaume, J. F. Robert, C. Guinchard, *Talanta*, 2001, **55**, 263
- [11] M. D. Beeson, G. Vigh, *J. Chromatogr.*, 1993, **634**, 197
- [12] T. Y. Kim, H. J. Kim, *J. Chromatogr. A*, 2001, **933**, 83
- [13] M. M. Hefnawy, J. T. Stewart, *Anal. Lett.*, 1999, **32(1)**, 159
- [14] Chiral Separation. *A Guide to using cyclodextrin bonded phases for liquid chromatography*, ASTEC, Advanced Separation Technologies Inc., USA, 1997
- [15] A. Ceccato, P. Hubert, P. De Tullio, J.-F. Liégeois, A. Felikidis, J. Géczy, J. Crommen, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1998, **18**, 605
- [16] K. Lemr, J. Seveik, D. Friedecky, A. Jonakova, D. Jirovsky, *Acta Univ. Palacki. Olomouc.*, 1999, *Chemica* **38**, 41
- [17] A. Bielejewska, K. Duszezyk, D. Sybilska, *J. Chromatogr. A*, 2001, **931**, 81
- [18] C. Perrin, N. Matthijs, D. Mangelings, C. Granier-Loyaux, M. Maftouh, *J. Chromatogr. A*, 2002, **966**, 119
- [19] S. Rudaz, J. C. Veuthey, *Chirality*, 1999, **11**, 319
- [20] S. Chen, *J. Chin. Chem. Soc.*, 2001, **48**, 751
- [21] C. E. Lin, K. H. Chen, *J. Chromatogr. A*, 2001, **930**, 155
- [22] X. Wang, C. B. Ching, *Chirality*, 2002, **14**, 798
- [23] L. Liu, Q. X. Guo, *j. Incl. Phenom*, 2002, **42**, 1

- [24] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, F. Pilar, C. Minguillon, *Chirality*, 2002, **14**, 59
- [25] K. M. Fried, A. E. Young, S. U. Yasuda, I. W. Wainer, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, **27**, 479
- [26] A. Peter, J. Kaman, F. Fülöp, J. Van Der Eycken, *J. Chromatogr. A*, 2001, **919**, 79
- [27] H. Y. Aboul-Enein, I. Ali, M. G. Schmid, V. Jetcheva, O. Gecse, G. Gubitz, *Analytical Letters*, 2001, **34(7)**, 1107
- [28] P. S. Bonato, R. Bortocan, C. M. Gaitani, F. O. Paias, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2002, **13(2)**, 190
- [29] Y. Gong, H. K. Lee, *J. Sep. Sci.*, 2003, **26**, 515
- [30] T. E. Beestley, J. T. Lee, *Recent Developments in LC Column Technology*, June 2003
- [31] A. Péter, G. Torok, D. W. Armstrong, G. Toth, D. Tourwé, *J. Chromatogr. A*, 2000, **904**, 1

ANNEXE C

Conditions d'analyse

Type d'appareillage utilisé :

- a) Appareil TSP : Système de dégazeur de phase mobile;
Pompe : SpectraSERIES P200;
Autosampler : SpectraSERIES AS 300;
Déecteur UV à longueur d'onde variable : SpectraSERIES UV 150;
Intégrateur : ChromJet.

- b) Appareil Waters : Pompe quaternaire 600 E;
Injecteur réodine 7725 i (boucle 20 µl);
Déecteur à barrettes de photodiodes (PDA) 996 (Waters, Milford, MA, USA).

L'éluant doit être filtré puis dégazé aux ultrasons.

Le temps mort est obtenu par injection d'un soluté non retenu (Tri-tertio-butyl-benzene).