

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE
HOUARI BOUMEDIENNE

FACULTE DE CHIMIE



THESE

Présentée pour l'obtention du diplôme de **DOCTORAT**

En : CHIMIE

Spécialité : Chimie Organique Appliquée

Par :

M^{me} Kahina SI-AHMED épouse LADJI

Sujet :

**PREPARATION DE MATERIAUX CHROMATOGRAPHIQUES
DESTINÉS À LA SÉPARATION DE PRODUITS
OPTIQUEMENT ACTIFS**

Soutenue publiquement le 1^{er} Décembre 2009, devant le jury composé de :

| | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| M^{me} O. CHERIFI | Professeur (U.S.T.H.B.) | Présidente |
| M^{lle} F. TAZEROUTI | Professeur (U.S.T.H.B.) | Directeur de Thèse |
| M. A.Y. BADJAH-HADJ-AHMED | Professeur (U. Riyad, A. Saoudite) | Examineur |
| M^{me} B. DJERDJOURI | Professeur (U.S.T.H.B.) | Examineur |
| M. M. HADJ-MAHAMMED | Professeur (U. Ouargla) | Examineur |
| M^{me} Z. KABOUCHE | Professeur (U. Constantine) | 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 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 ne saurais trouver les mots qui exprimeront toute ma gratitude à Mlle F. TAZEROUTI, Professeur 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. BADJAH-HADJ-AHMED, Professeur à l'université de Riyad (A. Saoudite). Je tiens à le remercier très chaleureusement pour avoir cru en moi, pour son aide précieuse, ses conseils éclairés et les encouragements qu'il m'a prodigués et également d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier très chaleureusement et témoigner ma profonde gratitude à Monsieur S. FANALI, Directeur de l'unité des méthodes Chromatographiques et électrophorétiques au Centre National de la Recherche (C.N.R.) de Rome (Italie), pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour son aide précieuse et les encouragements qu'il m'a sans cesse prodigués ainsi de m'avoir permis de profiter de ses compétences et d'avoir mis à ma disposition tous les instruments d'analyse lors de mon séjour à Rome. Sans lui ce travail n'aurait pas abouti. Mes remerciements vont également à tous les membres du laboratoire pour l'aide et l'ambiance amicale qu'ils ont su créer et entretenir au sein de l'équipe.

Je prie Mme O. CHERIFI, Professeur à l'U.S.T.H.B., qui me fait l'honneur de présider le jury de thèse, d'accepter mes plus vifs remerciements.

J'exprime mes profonds remerciements à Mesdames les Professeurs B. DJERDJOURI (U.S.T.H.B.) et Z. KABOUCHE (U. Constantine) et Monsieur le Professeur M. HADJ-MAHAMMED (U. Ouargla), d'avoir bien voulu accepter de participer au jury.

Je remercie également tous mes collègues du laboratoire et 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 toute ma famille qui m'a toujours soutenue et encouragée ainsi qu'à tous mes amis.

SOMMAIRE

| | |
|----------------------------------------------------------------|----|
| Liste des abréviations et symboles | i |
| Introduction générale | 1 |
| <hr/> | |
| Chapitre I : Généralités | 4 |
| <hr/> | |
| I. Notions de chiralité et de stéréochimie..... | 4 |
| II. Impact et importance de la chiralité..... | 6 |
| III. Techniques de séparation chirale..... | 8 |
| III.1. Techniques chromatographiques classiques..... | 9 |
| III.2. Nano-Chromatographie Liquide..... | 11 |
| III.2.1. Principe..... | 11 |
| III.2.2. Appareillage Nano-CL..... | 14 |
| III.2.3. Préparation des colonnes capillaires..... | 14 |
| III.3. Electrophorèse capillaire..... | 15 |
| III.3.1. Principe..... | 16 |
| III.3.2. Flux électroosmotique (FEO)..... | 18 |
| III.3.3. Mobilité électrophorétique..... | 20 |
| III.3.4. Séparation chirale par électrophorèse capillaire..... | 21 |
| IV. Sélecteurs chiraux..... | 22 |
| IV.1. Complexes labiles..... | 24 |
| IV.1.1. Sélecteurs de type Pirkle..... | 24 |
| IV.1.2. Echangeurs de ligands..... | 24 |
| IV.2. Complexes d'inclusion..... | 24 |
| IV.2.1. Cyclodextrines..... | 24 |
| IV.2.2. Ethers couronnes..... | 27 |
| IV.3. Polymères..... | 27 |
| IV.3.1. Polysaccharides..... | 27 |
| IV.3.2. Polymères synthétiques..... | 28 |
| IV.4. Protéines..... | 29 |
| IV.5. Antibiotiques macrocycliques..... | 29 |

| | |
|-----------------------------------------------------|----|
| V. Validation d'une méthode analytique..... | 30 |
| V.1. Spécificité (sélectivité)..... | 30 |
| V.2. Linéarité..... | 30 |
| V.3. Répétabilité..... | 31 |
| V.4. Précision et la justesse..... | 31 |
| V.5. Limites de détection et de quantification..... | 31 |
| V.6. Recouvrement..... | 32 |
| VI. Références bibliographiques..... | 33 |

Chapitre II : Etude et comparaison des propriétés énantiométriques de plusieurs phases stationnaires chirales à base de β -cyclodextrine et de cellulose par CLHP 39

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I. Introduction..... | 39 |
| II. Partie expérimentale..... | 40 |
| II.1. Réactifs chimiques..... | 40 |
| II.2. Appareillage..... | 41 |
| II.3. Calculs chromatographiques..... | 41 |
| III. Résultats et discussion..... | 42 |
| III.1. Effet de la nature du spacer..... | 44 |
| III.2. Impact de la nature du substituant du cycle aromatique du dérivé de la β -CD sur la reconnaissance chirale..... | 50 |
| III.3. Effet de la structure chimique du soluté sur le mécanisme de résolution chirale..... | 51 |
| III.4. Effet de la nature et de la quantité du modifiant organique..... | 51 |
| III.5. Séparation chirale des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et de quelques herbicides acides..... | 54 |
| III.6. Séparation chirale des flavanones..... | 56 |
| IV. Conclusion..... | 61 |
| V. Références bibliographiques..... | 62 |

Chapitre III : Séparation chirale de quelques produits pharmaceutiques, substances illicites et flavanones par électrophorèse capillaire 64

| | |
|-------------------------------|----|
| I. Introduction..... | 64 |
| II. Partie expérimentale..... | 67 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| II.1. Réactifs chimiques..... | 67 |
| II.2. Appareillage..... | 70 |
| II.3. Préparation des colonnes capillaires modifiées..... | 71 |
| II.4. Préparation des échantillons et des tampons de migration..... | 72 |
| II.5. Procédure électrophorétique..... | 73 |
| II.6. Calculs électrophorétiques..... | 73 |
| III. Résultats et discussion..... | 74 |
| III.1. Séparation chirale de quelques produits pharmaceutiques et illicites..... | 74 |
| III.1.1. Effet de l'électrolyte sur la mobilité électrophorétique des solutés..... | 75 |
| III.1.2. Effet de la concentration du sélecteur chiral sur la mobilité et la résolution des solutés..... | 75 |
| III.1.3. Effet de la structure chimique du soluté sur la discrimination chirale..... | 81 |
| III.2. Séparation des flavanones et flavanones glycosides par électrophorèse capillaire..... | 84 |
| III.2.1. Résolution des flavanones sur une colonne capillaire non modifiée..... | 86 |
| III.2.2. Résolution des flavanones sur une colonne capillaire modifiée..... | 91 |
| III.2.3. Mécanisme de la discrimination énantiomérique et diastéréomérique des flavanones par EC..... | 96 |
| III.3. Quantification diastéréomérique de l'hespéridine présente dans un jus d'orange commercial..... | 99 |
| IV. Conclusion..... | 104 |
| V. Références bibliographiques..... | 105 |

Chapitre IV : Séparation énantiomérique et diastéréomérique de flavanones et flavanones glycosides sur une phase stationnaire chirale à base phénylcarbamate-propyl- β -cyclodextrine par Nano-Chromatographie Liquide et CLHP 109

| | |
|-------------------------------------------------|-----|
| I. Introduction..... | 109 |
| II. Partie expérimentale..... | 111 |
| II.1. Réactifs chimiques..... | 111 |
| II.2. Appareillage..... | 111 |
| II.3. Préparation de la colonne capillaire..... | 113 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| III. Résultats et discussion..... | 114 |
| III.1. Evaluation de la phase stationnaire chirale par Nano-Chromatographie Liquide..... | 114 |
| III.1.1. Evaluation de la phase stationnaire chirale en mode inverse par Nano-CL | 116 |
| III.1.1.1. Influence de la composition de la phase mobile et du débit sur l'énantiorésolution..... | 116 |
| III.1.1.2. Influence de la composition de la phase mobile | 121 |
| III.1.1.3. Influence du tampon aqueux sur la séparation chirale en Nano-CL..... | 123 |
| III.1.2. Evaluation de la phase stationnaire chirale en mode organique polaire et normal par Nano-CL..... | 126 |
| III.2. Evaluation de la PSC pour la résolution des flavanones par CLHP..... | 130 |
| III.2.1. Etude de la séparation chirale en CLHP des flavanones en mode inverse..... | 132 |
| III.2.2. Etude de la séparation chirale en CLHP des flavanones en mode normal..... | 136 |
| IV. Conclusion..... | 138 |
| V. Références bibliographiques..... | 139 |

Chapitre V : Analyse qualitative et quantitative par Nano-Chromatographie Liquide des énantiomères de l'hespérétine dans l'urine humaine après ingestion d'un jus d'orange sanguine 142

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|-----|
| I. Introduction..... | 142 |
| II. Partie expérimentale..... | 144 |
| II.1. Réactifs chimiques..... | 144 |
| II.2. Appareillage Nano-CL et préparation de la colonne capillaire..... | 144 |
| II.3. Préparation des échantillons..... | 144 |
| II.4. Extraction liquide-liquide..... | 144 |
| II.5. Répétabilité, précision et justesse..... | 145 |
| II.6. Recouvrement..... | 145 |
| II.7. Excrétion urinaire de l'hespérétine chez l'être humain..... | 146 |
| III. Résultats et discussion..... | 147 |
| III.1. Traitement des échantillons biologiques..... | 147 |
| III.2. Conditions chromatographiques..... | 148 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| III.3. Validation de la méthode..... | 150 |
| III.3.1. Sensibilité et linéarité..... | 150 |
| III.3.2. Précision, justesse et recouvrement..... | 150 |
| III.3.3. Etude pharmacocinétique stéréospécifique de l'hespé- rétine chez l'homme..... | 153 |
| IV. Conclusion..... | 156 |
| V. Références bibliographiques..... | 157 |

| | |
|----------------------------|------------|
| Conclusion générale | 159 |
|----------------------------|------------|

Liste des abbreviations et symboles

| | |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| α | Sélectivité |
| ACN | Acétonitrile |
| AM | Amphétamine |
| ATEA | Acétate de triéthylammonium |
| β-CD | β -Cyclodextrine |
| CCM | Chromatographie sur Couche Mince |
| CH₃Cl | Chloroforme |
| CL | Chromatographie Liquide |
| CLC | Chromatographie Liquide Capillaire |
| CLHP | Chromatographie Liquide à Haute Performance |
| CPG | Chromatographie en Phase Gazeuse |
| CPS | Chromatographie en Phase Supercritique |
| DAD | Détecteur à barrettes de diodes |
| D.E. | Diamètre Externe |
| D.I. | Diamètre Interne |
| D.S. | Déviat ion Standard |
| D.S.R. | Déviat ion Standard Relative |
| E | Champ électrique |
| ECC | Electrochromatographie Capillaire |
| EC | Electrophorèse Capillaire |
| EtOH | Ethanol |
| FDA | US Food and Drug Administration |
| FEO | Flux Electroosmotique |
| η | Viscosité |
| H | Hauteur des plateaux théoriques |
| HD | Hespéridine |
| HP-β-CD | Hydroxypropyl- β -Cyclodextrine |
| HT | Hespérétine |
| ICH | International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use |

| | |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------|
| IR | Infra-Rouge |
| <i>k</i> | Facteur de rétention |
| l | Longueur efficace |
| L | Longueur totale |
| LD | Limite de Détection |
| LQ | Limite de Quantification |
| MA | Méthamphétamine |
| MDA | 3,4-méthylènedioxyamphétamine |
| MDMA | 3,4-méthylènedioxyméthamphétamine ou ecstasy |
| MDEA | 3,4-méthylènedioxyéthylamphétamine |
| MeOH | Méthanol |
| μ_{app} | Mobilité électrophorétique apparente |
| μ_{eff} | Mobilité électrophorétique effective |
| μ_{FEO} | Mobilité électrophorétique du flux électroosmotique |
| N | Efficacité |
| Nano-CL | Nano-Chromatographie Liquide |
| n-Hept | n-Heptane |
| n-PrOH | n-Propanol |
| 2-PrOH | 2-Propanol ou isopropanol |
| PSC | Phase Stationnaire Chirale |
| PSC-CD | Phase Stationnaire Chirale à base de Cyclodextrine |
| r^2 | Coefficient de corrélation |
| R | Rectus |
| Rs | Résolution |
| S | Sinister |
| SBE-β-CD | Sulfobutyléther- β -Cyclodextrine |
| S.I. | Standard Interne |
| TFA | Acide trifluoroacétique |
| t_m | Temps de migration |
| t_r | Temps de rétention |
| UV | Ultra-Violet |
| V | Voltage |
| ζ | Potentiel zêta |

INTRODUCTION GENERALE

Depuis plus de deux siècles, les secrets de la chiralité ont suscité la curiosité de nombreux scientifiques. Biot, Pasteur, le Bel, Van't Hoff puis Lord Kelvin ont défini les caractéristiques d'une molécule chirale et découvert les propriétés qui lui sont associées. A ce jour, la définition de la chiralité est toujours la même que celle décrite par Kelvin en 1884 : «un objet dépourvu d'éléments de symétrie qui existe sous deux formes non superposables et images l'une de l'autre dans un miroir, ces deux entités sont nommées des énantiomères».

La détermination univoque des compositions énantiomériques se révèle être une tâche d'importance primordiale pour les chimistes et les biochimistes lors de la synthèse, la caractérisation et l'utilisation de produits optiquement actifs. Des études biopharmaceutiques démontrent qu'il peut y avoir des différences significatives dans les actions, les vitesses d'adsorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion entre les énantiomères d'une même substance. La tendance consistant à synthétiser les principes actifs de médicaments, pesticides, fongicides, herbicides, phéromones, parfums, aromes...etc sous forme optiquement pure, est actuellement accentuée par la pression des autorités chargées du contrôle et des autorisations de commercialisation. D'où la nécessité de développer continuellement de nouvelles méthodes analytiques de plus en plus efficaces et sensibles afin de contrôler la présence éventuelle de traces de l'autre énantiomère inactif ou toxique dans le lot de fabrication.

A l'heure actuelle, parmi les nombreuses méthodes de discrimination chirale, la Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) représente une technique de choix pour la purification et la quantification d'énantiomères. En effet, outre le fait qu'elle allie à la fois rapidité, efficacité et sensibilité, elle permet également la séparation de composés chiraux sur des phases stationnaires chirales. Néanmoins, d'autres techniques émergentes telles que la Nano-Chromatographie Liquide et l'électrophorèse capillaire connaissent un succès grandissant que ce soit à l'échelle analytique ou industrielle et cela grâce aux nombreux avantages analytiques (haute sensibilité et efficacité) et environnementaux (faible quantité de solvants et d'échantillons) qu'elles présentent.

A ce jour, il n'existe pas de sélecteur chirale universel permettant l'analyse de tous les isomères connus. Néanmoins, depuis la découverte des cyclodextrines en 1891 par Villiers, ces molécules ont reçu, à juste titre, une grande attention de la communauté scientifique ; et cela à cause de leur capacité de distinguer les composés structurellement proches tels que

les isomères, les homologues et surtout, les énantiomères. Cette distinction se fait généralement par formation préférentielle d'un complexe d'inclusion de type hôte-invité avec l'un des deux énantiomères. Cette particularité a fait des CDs un outil de choix par excellence lors des séparations analytiques par chromatographie ou électrophorèse capillaire.

Le principal but de ce travail consiste à développer de nouvelles méthodologies pour l'analyse énantiosélective de produits pharmaceutiques, naturels et racémiques par CLHP, nano-chromatographie liquide et électrophorèse capillaire, et cela en utilisant la β -cyclodextrine comme sélecteur chiral.

Le premier chapitre bibliographique rappelle les notions de chiralité et son implication dans le monde du vivant. Nous donnons ensuite les principes fondamentaux des techniques chromatographiques et électrophorétiques utilisées ainsi que les caractéristiques des différents sélecteurs chiraux. A la fin de cette partie, nous décrivons les différentes étapes liées à la validation d'une méthode analytique.

Le second chapitre est dédié, dans un premier temps, à l'étude des propriétés énantiosélectives de trois phases stationnaires chirales (PSCs) à base de β -cyclodextrine, et cela en faisant varier les différents facteurs pouvant influencer le pouvoir énantio-discriminatoire de ces PSCs. Par la suite, nous comparons ces sélecteurs chiraux à d'autres à base de cellulose et de cyclodextrine, ce qui nous a permis d'étudier l'effet de la nature du sélecteur chiral, du spacer et des groupements fonctionnels de la β -CD. Le mécanisme de caractérisation chirale est également discuté.

Le troisième chapitre est consacré, dans sa première partie, à l'analyse de produits pharmaceutiques et illicites par électrophorèse capillaire en utilisant l'hydroxypropyl- β -CD comme additif chiral au tampon de migration. L'effet de la concentration du sélecteur chiral sur la mobilité et la résolution des solutés est également discuté. Dans la seconde partie de ce chapitre, nous décrivons la préparation d'une colonne capillaire dont les parois internes ont été chimiquement modifiées. Cette colonne sera testée lors de la séparation des flavanones et flavanones glycosides en utilisant la sulfobutyléther- β -CD (SBE- β -CD) comme sélecteur chiral. Les résultats obtenus seront ensuite comparés à ceux réalisés sous les mêmes conditions opératoires mais avec une colonne capillaire non-modifiée. Les effets du pH, de la

concentration de la SBE- β -CD et des différences structurales des flavanones injectées sont étudiés. La dernière partie de ce chapitre sera consacrée à la détermination de la composition diastéréomérique en hespéridine d'un jus d'orange commercial.

Le quatrième chapitre décrit d'abord la préparation d'une colonne capillaire remplie avec une phase stationnaire chirale originale à base de phényle-carbamate-propyl- β -cyclodextrine. Ce matériau sera par la suite utilisé dans un système Nano-CL et cela dans le but de séparer énantiomériquement et diastéréomériquement des flavanones et flavanones glycosides, respectivement. Les trois modes de phase mobiles (normal, organique polaire et inverse) seront testés durant cette étude. A la fin de ce chapitre une comparaison des résultats chromatographiques obtenus par la Nano-CL et la CLHP sera effectuée.

Le dernier chapitre de cette thèse est consacré à la validation d'une méthode analytique destinée à la détermination et la quantification par Nano-CL de l'hespéretine dans l'urine humaine après ingestion d'un jus d'orange sanguine. Les étapes de traitement et d'extraction des échantillons seront décrites. L'excrétion stéréospécifique sera également discutée lors de l'étude pharmacocinétique.

CHAPITRE I

GENERALITES

I. Notions de chiralité et de stéréochimie

La chiralité est un mot dérivé du grec kheir « κείρ », qui veut dire main. Un objet est dit « chiral » lorsqu'il est identique en tout point à son image miroir, sans lui être superposable. L'exemple le plus parlant est incontestablement les mains droite et gauche. D'une manière analogue, une molécule chirale, forme avec son image miroir un couple d'énantiomères dont les propriétés physico-chimiques sont parfaitement identiques, mais qui diffèrent dans leur arrangement tridimensionnel. Un mélange équimolaire de ces deux formes énantiomériques est appelé mélange racémique [1].

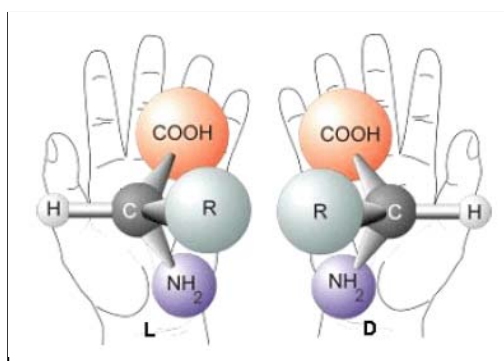


Figure 1 : les énantiomères D et L d'un acide aminé.

La forme la plus connue et la plus simple d'une molécule chirale est obtenue lorsqu'un atome de carbone possède quatre substituants différents, tel qu'un acide aminé (Figure 1). Ce carbone est désigné comme le centre chiral ou stéréogénique. La nature de ce centre chiral ne se limite pas au carbone, en effet d'autres atomes tels que le soufre, l'azote, le silicium ou le phosphore peuvent générer des molécules chirales lorsqu'ils sont entourés de substituants différents (Figure 2 A) [2].

Outre la chiralité bâtie autour d'atomes asymétriques, des molécules dépourvues de centres chiraux peuvent également présenter le phénomène de chiralité. Il en est ainsi pour les dérivés allènes, dans lesquels les atomes se répartissent autour d'un axe (Figure 2 B). Par ailleurs, d'autres molécules peuvent présenter une chiralité planaire tel que l'atropoisomérisation (Figure 2 C). La chiralité liée à l'hélicité est un phénomène qu'on retrouve dans certaines macromolécules telles que les protéines (Figure 2 D). Dans ce dernier cas, les deux énantiomères correspondent aux deux sens d'enroulement de l'hélice [3].

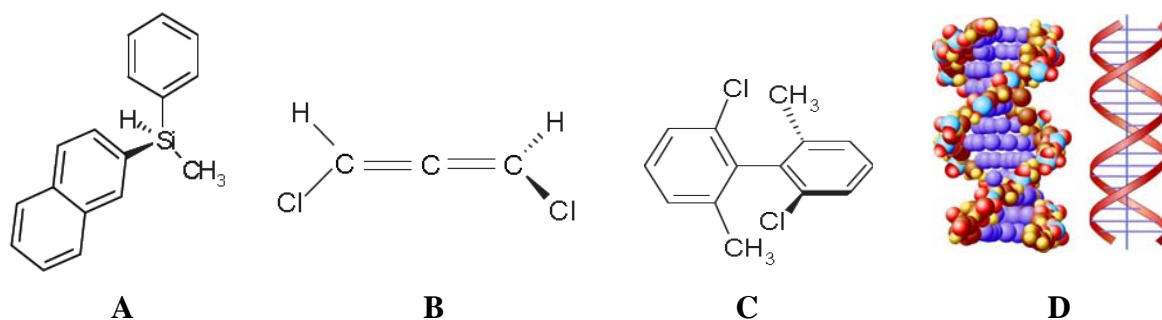


Figure 2 : Quelques exemples de molécules chirales. (A) : chiralité induite par un atome de silicium. (B) : énantiomérisme introduite par un axe de chiralité. (C) : atropoisomérisme. (D) : protéine.

Les molécules chirales sont également désignées comme optiquement actives, cette appellation est due à leur pouvoir rotatoire sur la lumière polarisée. Autrement dit, si une substance chirale est traversée par un faisceau de lumière polarisée plane, elle provoque une rotation du plan de polarisation de cette lumière (Figure 3). Néanmoins lorsque nous avons affaire à un mélange racémique, aucune activité optique n'est observée. Ainsi, les énantiomères agissent sur le sens de la lumière polarisée avec un même angle mais dans des directions opposées. Un énantiomère est dit « dextrogyre » (d) s'il fait tourner la lumière polarisée dans le sens positif (+), c'est-à-dire dans le sens horaire, et « lévogyre » (l) s'il le fait tourner dans le sens négatif (-) ; toutefois, cette nomenclature ne présume en rien du nombre de centres d'asymétrie ni de l'arrangement spatial de leurs substituants [4].

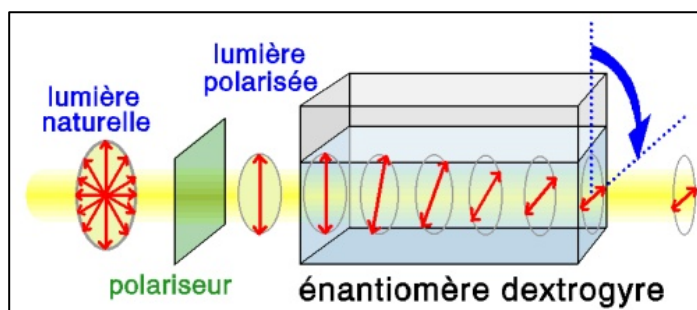


Figure 3 : Schématisation de la polarisation de la lumière par un énantiomère dextrogyre.

La première séparation chirale, qui constitue le fondement même de l'énantio-séparation, fut reportée en 1848 par Louis Pasteur (1822-1895). Grâce aux faces hemihédrales des cristaux racémiques du tartrate d'ammonium de sodium, il put séparer en s'aidant d'une loupe et d'une pince les cristaux des deux isomères [5-7]. La caractérisation des propriétés physiques des énantiomères (pour lesquels la seule différence constitue la rotation opposée du plan de la lumière), a conduit Pasteur à postuler que les énantiomères ont des arrangements tridimensionnels différents et sont des images non superposables au niveau macroscopique et microscopique. Il développa le domaine de la séparation chirale en étudiant l'influence d'un énantiomère par rapport à l'autre et introduisit la technique de la résolution via la formation de diastéréoisomères. La séparation des énantiomères par formation de diastéréoisomères est la base de la majorité des séparations chromatographiques modernes [4,8].

Dés lors les fondements de la chimie chirale ont été établis, et depuis elle ne cesse d'évoluer notamment dans le développement de nouvelles techniques de séparation énantiomérique de plus en plus performantes et efficaces.

II. Impact et importance de la chiralité

De nos jours, l'importance biologique de la chiralité n'est plus à démontrer, le corps humain étant lui-même "chiral" (le cœur à gauche alors que le foie se situe à droite). La chimie du vivant est elle aussi étroitement liée à la chiralité. Dans le monde végétal nous pouvons citer le cas de plusieurs plantes qui s'enroulent autour des objets d'une façon chirale : le chèvrefeuille '*Lonicera Sempervirens*' dans le sens antihoraire alors que le liseron '*convolvulus Arvensis*' dans le sens horaire. Dans le domaine alimentaire par exemple, les saveurs et les odeurs des énantiomères peuvent être différentes. Certains récepteurs gustatifs et olfactifs sont capables de distinguer les énantiomères d'une structure moléculaire donnée. Ainsi, les papilles gustatives reconnaissent les goûts différents des diastéréoisomères de l'aspartame. L'isomère L-L présente un goût sucré, alors que les trois autres isomères, D-D, L-D et D-L, ont un goût amer-aigre. La stéréospécificité des récepteurs olfactifs peut être illustrée par l'exemple du limonène, le (+)-limonène a une odeur de citron alors que le (-)-limonène, d'orange. La (+)-carvone a une odeur de cumin alors que son énantiomère la (-)-carvone sent la menthe verte [9,10].

En ce qui concerne le monde des insectes, un certain nombre de phéromones sont chirales et leur activité biologique est généralement reliée à une stéréochimie bien définie. Le

Disparlure par exemple, est une phéromone du Bombyx disparate. Seul l'énantiomère (+) est actif. L'énantiomère (-) n'a aucune action biochimique [11]. Vu les ravages des cultures et les risques de transmission de maladies, les programmes de lutte contre les espèces nuisibles d'insectes ont intégré l'utilisation des propriétés chirales des phéromones. La technique consiste à attirer les insectes mâles avec une phéromone synthétique et à les détourner ainsi des femelles. Cette méthode entraîne beaucoup moins d'effets secondaires que l'utilisation des insecticides classiques.

L'indéniable impact de la chiralité se reflète également dans l'industrie agrochimique et de facto sur notre environnement. Ainsi plus de 30% des pesticides commercialisés à travers le monde sont de nature chirale [12]. Parmi les grandes familles de pesticides chiraux, nous pouvons citer : les insecticides pyréthroïdes, les pesticides organochlorés et organophosphorés, les fongicides triazoles ainsi que les herbicides aryloxypropanoate. Ces pesticides chiraux sont, dans leur grande majorité, utilisés sous la forme de mélanges racémiques bien que les effets souhaités ne soient dus qu'à un seul énantiomère. A titre d'exemple nous pouvons citer le Deltaméthrine, l'un des insecticides les plus utilisés au monde depuis sa commercialisation datant de plus d'une vingtaine d'année ; ainsi, cet insecticide possédant trois carbones asymétriques, existe sous la forme d'un mélange constitué de huit isomères ; toutefois, l'activité insecticide souhaitée n'est due qu'à un seul isomère ; les autres formes sont inactives certes, mais contribue malheureusement à la dégradation de notre environnement [13].

Du fait que l'activité thérapeutique d'une molécule puisse varier avec sa configuration absolue, les autorités sanitaires et réglementaires, telle que la Food and Drug Administration (FDA), exigent une documentation complète d'essais pharmacologiques, pharmacocinétiques et toxicologiques lors du dépôt des droits d'exploitation d'un brevet, tant sur le mélange racémique que sur les énantiomères purs [14-17]. La figure 4 présente la répartition des molécules mises sur le marché américain en fonction de leur composition stéréo-isomérique. Cette étude, réalisée en 2006, montre que 67 % de molécules commercialisées à usage pharmaceutique sont chirales. 83 % d'entre elles ne sont disponibles que sous leur forme énantiopure. Cette proportion devrait encore augmenter dans les années à venir. En effet, l'échéance de protection par des brevets de nombreux médicaments racémiques incite la plupart des laboratoires pharmaceutiques à breveter le même principe actif sous sa forme énantiopure [18].

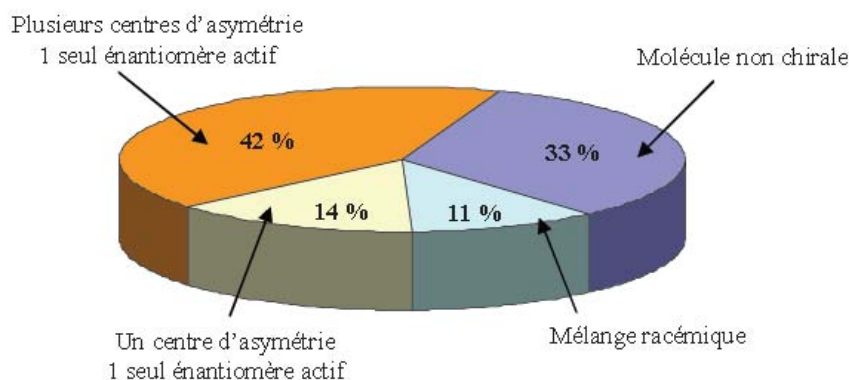


Figure 4: Répartition des molécules pharmaceutiques mises sur le marché américain en 2006.

En résumé, dans le domaine pharmaceutique, tout au moins, la chiralité revêt donc une importance considérable tant au point de vue thérapeutique que réglementaire ou économique. L'augmentation de la demande de composés énantiopurs dans l'industrie pharmaceutique a stimulé ainsi le développement de nouvelles sociétés qui sont spécialisées dans la synthèse asymétrique et elle a aussi favorisé le développement de nouvelles méthodes de séparation des énantiomères. Des avancées remarquables dans les techniques de séparation ont été réalisées au cours des vingt dernières années [19].

III. Techniques de séparation chirale

Depuis Louis Pasteur jusqu'à nos jours, le progrès qu'a connu la séparation chirale est plus qu'impressionnant. Le nombre de techniques de séparation est si important que nous n'avons présenté sur la figure 5 que les techniques les plus communes. Néanmoins, les techniques chromatographiques et électrophorétiques sont de loin les méthodes les plus utilisées et les plus efficaces, tant sur le plan analytique qu'industriel [20], c'est pour cela que nous nous sommes focalisé sur ces deux types de techniques séparatrices.

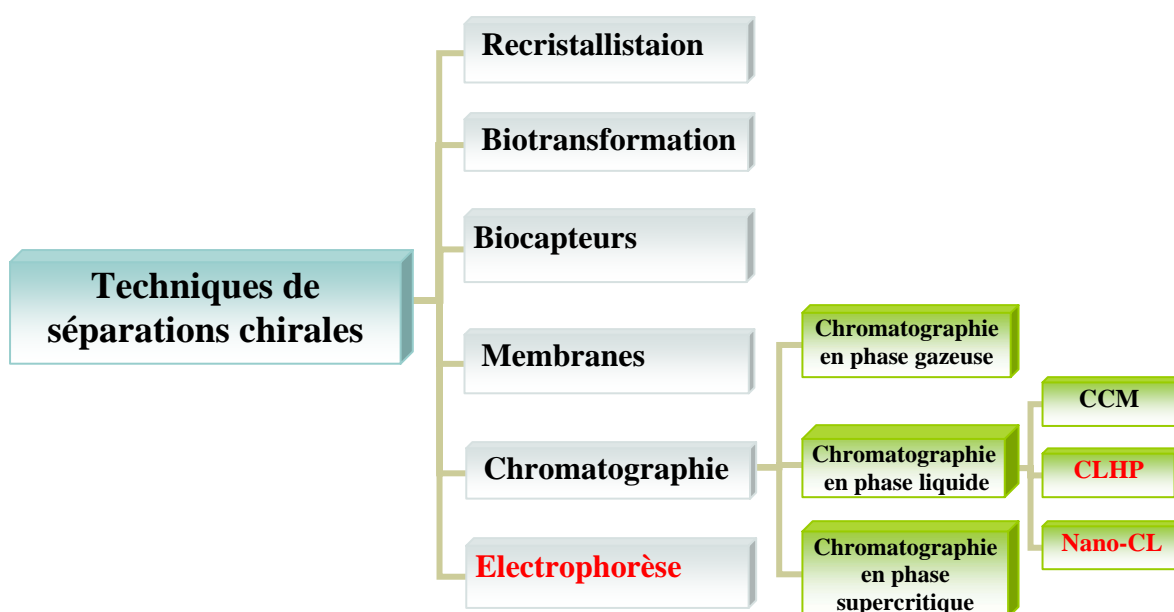


Figure 5 : Les différentes techniques utilisées pour résoudre des énantiomères.

III.1. Techniques chromatographiques classiques

Les séparations chirales par chromatographie jouissent d'une popularité bien méritée. En effet elles allient formidablement efficacité, simplicité et robustesse. Elles permettent un large éventail d'énantioséparation de molécules d'intérêt biologique, agroalimentaire ou pharmaceutique [4].

Parmi les techniques chromatographiques, la chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie en phase gazeuse (CPG) ont notamment montré leurs potentialités pour l'analyse d'acides aminés [21,22], de pesticides [23,24] ou de composés volatils [25,26], mais leur utilisation reste très restreinte. En effet, de nombreux composés chiraux sont thermosensibles ce qui ne permet pas leur analyse en CPG. Cependant, depuis ces dernières années, la chromatographie en phase supercritique (CPS) recueille un regain d'intérêt en raison de la rapidité des analyses et des sélectivités remarquables [27]. Cette technique a permis la résolution de plusieurs familles de composés chiraux tels que les produits pharmaceutiques [28,29], les pesticides [30] et les acides aminés [31].

A l'heure actuelle, la chromatographie en phase liquide (CL) est la technique qui recueille le plus de succès dans le domaine de la séparation énantiomérique [1,2,4,8]. Cette méthode nous offre un choix de phases stationnaires chirales innombrables ; en effet, les constructeurs lui dédient un large panel de colonnes chromatographiques chirales adaptées à la séparation de structures chimiques variées. Nous avons également la possibilité d'utiliser une phase mobile chirale, un large choix de détecteurs (UV, DAD, IR, réfractomètre, spectroscope de masse) autant de paramètres possibles afin d'optimiser la séparation en CL, ce qui explique son succès dans le domaine de l'énantioséparation [1].

Deux approches distinctes de séparation stéréosélective peuvent être utilisées en chromatographie liquide : une approche indirecte et une approche directe. L'approche indirecte est fondée sur la séparation après dérivation en diastéréoisomères. Le principe de cette technique consiste à modifier la molécule chirale à analyser en la faisant réagir avec un réactif optiquement pur de façon à former deux diastéréoisomères. L'analyse chromatographique s'effectue sur une colonne achirale classique (généralement C18) [32]. Cette méthode est toutefois limitée aux molécules ayant des groupements réactionnels (amine, hydroxyle, carboxylique, etc.) et exige soit une grande pureté énantiomérique du réactif chiral, soit la connaissance de l'excès énantiomérique. D'ailleurs, la réaction de dérivation doit être rapide et quantitative [33]. Il est à noter que pour certaines applications, telles que les séparations des acides aminés ou des peptides, elles restent une approche intéressante [34,35].

La séparation d'énantiomères par approche directe, c.-à-d. sans dérivation au préalable, est devenue de plus en plus fréquente au cours de ces dernières années [36]. Cette approche permet la séparation directe des composés chiraux selon deux voies distinctes : La première voie consiste en la séparation chirale après addition de sélecteurs chiraux à la phase mobile (phase mobile chirale) [8] ; toutefois, la nécessité d'ajouter de grandes quantités de sélecteurs chiraux dans la phase mobile peut constituer l'élément restrictif de cette technique qui est de ce fait très peu utilisée par rapport à la deuxième voie. Cette dernière repose sur la séparation au moyen de sélecteurs chiraux immobilisés (phases stationnaires chirales (PSCs)) [32]. En effet, les PSCs ont prouvé leur efficacité dans le domaine de la séparation des énantiomères par les méthodes chromatographiques et représentent la meilleure alternative pour la majorité des applications biochimiques, pharmaceutiques ou pharmacologiques [1,2,4,8,29,32] ; ainsi, le nombre de PSCs disponibles actuellement est assez impressionnant [37]. Néanmoins, il n'existe pas de phase stationnaire universelle.

La CLHP couplée à une phase stationnaire chirale, est ainsi devenue la technique incontournable dans le domaine de la séparation chirale [38]. Bien qu'elle nous offre de nombreux avantages, nous ne pouvons pas ignorer ses inconvénients liés à la consommation excessive de solvant organique ainsi que le coût élevé des phases stationnaires. C'est pour cela que des techniques dites miniatures sont apparues, afin de profiter des avantages de la CLHP tout en faisant abstraction de ses inconvénients [39-41].

III.2. Nano-Chromatographie Liquide

III.2.1. Principe

L'intérêt grandissant que connaissent les techniques miniatures, en général, et la Nano-Chromatographie Liquide (Nano-CL) en particulier, est palpable dans le nombre croissant de publications et de travaux scientifiques qui leur sont dédiés [39-45]. Toutefois, les prémices de ce type de technique remontent à 1967, et sont attribués aux travaux menés par Horváth et *al*, qui utilisèrent des colonnes en acier inoxydable de diamètre interne (D.I.) variant entre 0.5 et 1.0 mm pour la séparation de ribonucleotides [45]. Malgré l'essor prodigieux qu'ont connu les colonnes chromatographiques classiques avec un D.I. de 4.6 mm, quelques auteurs, à l'instar de Scott, Yang et Ishii, ont continué leurs investigations dans le domaine des micro-colonnes en utilisant des colonnes de D.I. inférieurs à 1 mm [43,45]. Ce n'est qu'en 1988 que la Nano-CL proprement dite fut introduite et cela grâce aux travaux de Karlsson et Novotny [46]. Dès lors, cette technique n'a cessé de progresser et de s'améliorer grâce à l'intérêt qui lui a été conféré par un très grand nombre d'équipes de recherche.

Ainsi sont apparus, par ordre chronologique : la micro chromatographie liquide, la chromatographie liquide capillaire et plus récemment la Nano-Chromatographie Liquide. Tel que cela est présenté sur le tableau 1 et la figure 6, nous pouvons voir que les principales différences entre ces techniques et la CLHP classique résident dans le diamètre interne des colonnes utilisées ainsi que dans le débit de la phase mobile. D'une manière générale, les analyses en CLHP sont effectuées sur des colonnes ayant un D.I. de 4.6 mm avec un débit typique de 1 mL min^{-1} [47]. Les colonnes de D.I. variant entre 1 et 3 mm sont des micro-colonnes (narrow bore) et celles dont le D.I. est compris entre 150 et 800 μm sont appelées micro-colonnes capillaires. Concernant les capillaires à diamètre interne plus faible (100 μm , 75 μm et 50 μm) elles sont nommées les colonnes « nanoflow » et cela afin de souligner leur utilisation avec des débits de l'ordre de quelques nanolitres par minute [48]. C'est notamment

grâce à ces deux paramètres que les quantités de phase mobile et stationnaire utilisées sont largement en deçà de celles utilisées en CLHP [39,45].

Tableau 1 : Exemples de techniques miniatures avec le diamètre interne de la colonne ainsi que le débit utilisé [39].

| Diamètre interne de la colonne | Débit | Type de Chromatographie liquide |
|--------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------|
| 8-20 mm | $> 2 \text{ mL min}^{-1}$ | CLHP semi-préparatoire |
| 4.6 mm | $0.5-1.0 \text{ mL min}^{-1}$ | CLHP analytique |
| 1.1-2.1 mm | $0.1-0.5 \text{ mL min}^{-1}$ | Micro-CL |
| 0.5-1.0 mm | $0.5-100 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$ | |
| 150-320 μm | $0.3-0.5 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$ | CL Capillaire |
| 10-100 μm | $100-400 \text{ nL min}^{-1}$ | Nano-CL |

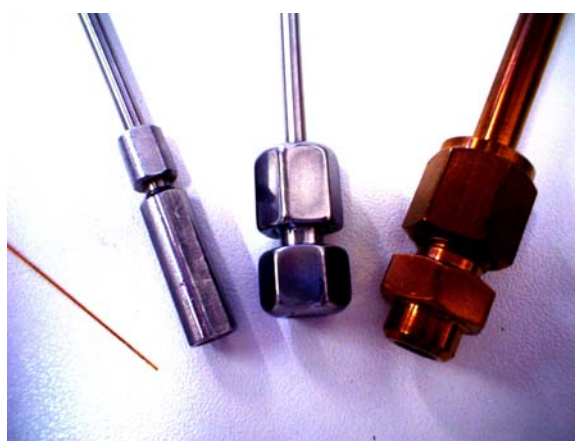


Figure 6 : Les différentes dimensions de colonnes chromatographiques.

La miniaturisation de la chromatographie liquide en chimie analytique a permis l'amélioration de l'efficacité de la séparation, la rapidité de l'analyse, la réduction de la consommation de solvant et la sensibilité de détection [46]. Néanmoins, la réduction du diamètre de la colonne nécessite de facto la réduction du débit de la phase mobile et par conséquent, la miniaturisation de tous les composants du système chromatographique tels que les tubes de connections, la pompe, l'injecteur et le détecteur. Dans le cas contraire, en plus du risque de destruction de la colonne capillaire (dû à la trop forte pression), de grandes pertes de résolution et d'efficacité de la séparation chromatographique seront enregistrés [43]. En effet, d'après Charvet et al., une réduction du diamètre de la colonne de d_1 à d_2 nécessitera la réduction de tout les paramètres (débit, volumes des tubes de connections, injecteur et détecteur) avec un facteur $f = \frac{d_1^2}{d_2^2}$, et cela afin d'obtenir un appareillage efficace [49].

Sachant que les principes de séparations chromatographiques utilisés en CLHP (résolution, sélectivité, hauteur et nombre des plateaux théoriques ...) ont tous été transférés aux techniques miniatures avec succès [39], il serait important de noter qu'aucun de ces paramètres n'est directement lié au D.I. de la colonne utilisée. A titre d'exemple nous pouvons citer l'efficacité de la colonne : en effet, ce paramètre qui est très souvent mesuré en terme de nombre de plateaux théoriques (N) ne dépend que de la largeur des pics chromatographiques, et donne une idée sur la qualité de la résolution [47]. Cependant, si nous supposons qu'un soluté injecté en CLHP avec un débit d'1 mL min⁻¹ possède une largeur de pic de 0.5 min, cela voudra dire que notre pic a un volume approximatif de 500 µL ; si la même séparation est réalisée avec une colonne de D.I. de 75 µm avec un débit nécessairement de l'ordre de 200 nL min⁻¹, le volume du pic sera de 100 nL. Ceci signifie que le soluté a été concentré 5000 fois par rapport à la CLHP classique (D.I. 4.6 mm).

La concentration du soluté est un paramètre très important lors de sa détection par absorbance UV, et cela du fait que la loi de Beer-Lambert démontre la proportionnalité de l'absorbance UV avec la concentration du soluté. De ce fait, la sensibilité de détection se trouve elle aussi améliorée de 5000 fois lors du passage de la CLHP classique à la Nano-CL [39].

III.2.2. Appareillage Nano-CL

D'une manière générale, les appareils Nano-CL recensés dans la littérature ont tous été développés par les auteurs au sein même de leurs laboratoires de recherche [39-41,43-46,48], et cela en apportant les modifications nécessaires à un système CLHP classique ou alors en assemblant plusieurs instruments de fournisseurs différents (pompe, injecteur et détecteur) avec des connections et des T de très faibles volumes tout en assurant un système de split afin de récupérer la phase mobile excédante (Voir chapitre IV) [39,43,45].

Le premier instrument Nano-Chromatographe Liquide commercial a été introduit sur le marché dans les milieux des années 90 par la firme LC Packings (Dionex corp., Californie, USA) [48]. Récemment, plusieurs autres compagnies lui ont emboité le pas telles que Waters, Amersham, Eksigent, Agilent, Shimadzu...etc. Néanmoins les instruments Nano-CL « fait-maison » sont toujours très utilisés et préférés aux appareils commerciaux et cela pour deux raisons majeurs : la première concerne le prix très élevé des instruments commercialisés et la seconde se résume dans la liberté d'accès aux différents composants du système afin de les optimiser et d'étudier leur influence sur la qualité des séparations chromatographiques.

III.2.3. Préparation des colonnes capillaires

De la même manière, les colonnes capillaires utilisées en Nano-CL, sont soit acquises auprès des différents fournisseurs de matériaux chromatographiques ou alors préparées au niveau même du laboratoire et cela en remplissant des colonnes capillaires en silice fondue avec la phase stationnaire souhaitée. Cette seconde approche permet la préparation de colonnes qu'on ne trouve pas nécessairement sur le marché que ce soit en termes de dimensions ou alors à cause de l'utilisation de phases stationnaires originales et donc non-commercialisées. Le remplissage est réalisé grâce à une pompe CLHP qui propulse la phase stationnaire, cette dernière est ensuite maintenue à l'intérieur de la colonne capillaire au moyen de frittés (Voir chapitre IV) [40,41].

La préparation des frittés est une étape cruciale qui conditionne la qualité de la séparation et l'efficacité de la colonne capillaire [50]. Plusieurs procédés de préparation ont été décrits [50,51]. Ainsi, ces frittés peuvent être de nature mécanique (en acier inoxydable) [52] ou alors par polymérisation in-situ d'un monomère afin de former un frittés macroporeux [53] ; néanmoins, l'utilisation de ces deux méthodes est limitée par plusieurs inconvénients tels que la formation de bulles d'air et l'étalement des pics chromatographiques [51]. D'après

plusieurs auteurs, la méthode la moins contraignante et la plus efficace est la préparation des frittés par agglomération du support par chauffage au moyen d'un filament [40,41,54-57].

Tous les avantages précédemment cités font de la Nano-CL un outil de choix pour les séparations cliniques et prés-cliniques ainsi que dans le domaine de la séparation chirale. En effet, cette technique s'est avérée très efficace pour l'énantio-séparation des produits pharmaceutiques tels que les β -bloquants [58], les acides aminés [59], les acides barbituriques [60], la thalidomide [61], les anti-inflammatoires non-stéroïdiens [62] et les herbicides [63]. Et cela en utilisant des phases stationnaires chirales ou des phases mobiles chirales (méthode directe) ou alors après dérivatisation du soluté par un agent chiral (méthode indirect). Nous pouvons également noter l'utilisation des mêmes modes de phases mobiles que la CLHP classique à savoir : normal (éluant principalement constitué d'un solvant apolaire (heptane ou hexane)), inverse (éluant aqueux) et organique polaire (solvants polaires) [40].

III.3. Electrophorèse capillaire

L'électrophorèse est une technique analytique développée par le suédois chimiste Arne Tiselius durant les années 30 du siècle passé [64]. Cependant ce n'est qu'en 1967 que les premières tentatives de séparations électrophorétiques ont été réalisées par Hjerten [65]. Le principe de l'électrophorèse repose sur la migration des espèces en solution, porteuses d'une charge électrique globale, soumises à l'effet d'un champ électrique, et au contact d'un support approprié. La séparation des molécules se fera donc sur la base de leur différences de rapport charge/taille, plus grand est ce rapport, plus vite sera la migration de l'ion. Ce concept de base explique le fait que pendant très longtemps et encore à ce jour, l'électrophorèse ait été une technique largement utilisée par les biochimistes essentiellement pour leurs analyses de nature protéomique (ADN, ARN, protéines...) [66].

Il existe six différents modes séparatifs utilisant le principe des séparations sous un champ électrique (Tableau 2). En ce qui nous concerne nous nous sommes intéressés à l'électrophorèse capillaire de zone, appelée plus couramment électrophorèse capillaire, qui se trouve être la technique la plus efficace et la plus utilisée [67,68].

| Tableau 2 : Brève description des 6 modes électrophorétiques | |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Mode | Mécanisme de séparation |
| L'électrophorèse capillaire de zone. | Opère avec un électrolyte tamponné. Les solutés migrent suivant leurs rapports charge/masse. |
| L'électrophorèse sur gel. | Réalisée dans un réseau polymérique qui agit comme un tamis moléculaire. |
| La chromatographie électrocinétique micellaire. | Similaire à l'EC avec ajout de surfactants à l'électrolyte tamponné. |
| L'électrochromatographie capillaire. | Technique hybride entre la CLHP et l'EC, la séparation est achevée sur une phase stationnaire. |
| L'isotachophorèse. | utilise un flux électroosmotique nul et un système tampon hétérogène. Les ions se répartissent selon leur mobilité respective entre les deux régions tampon et ils se déplacent à travers le capillaire à une vitesse fixe. |
| La focalisation isoélectrique capillaire. | Permet la séparation des peptides et protéines dans un tampon aqueux sur la base de leurs points isoélectrique (pI). |

III.3.1. Principe

Le principal attrait de l'électrophorèse capillaire est son automatisation et donc sa facilité d'emploi. Ainsi, sa mise en œuvre consiste à utiliser un tube capillaire ouvert à ses extrémités, en verre de silice de très faible diamètre (15 à 150 μm). Ce capillaire, d'une longueur L (20-80 cm), est rempli de la même solution aqueuse d'électrolyte tamponné que les deux réservoirs situés de part et d'autre [67]. On applique aux électrodes une différence de potentiel importante (plusieurs dizaines de kV). Un système de détection est placé avant l'extrémité aval du capillaire. En mode UV par exemple, le capillaire coupe le trajet optique entre la source et le photomultiplicateur, ce qui permet de mesurer l'absorbance de la solution en évitant tout volume mort [68]. Un schéma simplifié du principe de l'EC est proposé sur la figure 7.

En raison de la taille très réduite du capillaire, les volumes d'échantillons injectés (de l'ordre de quelques nanolitres) doivent être parfaitement contrôlés. En général, deux modes d'injection peuvent être utilisés : l'injection hydrodynamique et l'injection électrocinétique [67]. L'introduction de quelques nanolitres dans un capillaire peut se faire très simplement par

gravité : c'est l'injection hydrodynamique. Elle est réalisée par application d'une pression pendant un temps défini sur le flacon porte-échantillon dans lequel le capillaire est plongé, ou par création d'une dépression à l'extrémité opposée du capillaire [68]. Ce mode d'injection est le plus couramment utilisé. En mode d'injection électrocinétique, l'échantillon est introduit dans le capillaire en appliquant une tension électrique pendant un temps donné. Les résultats obtenus sont moins reproductibles pour ce mode d'injection qui présente un caractère très sélectif variant en fonction de facteurs souvent difficiles à contrôler (température à l'injection, composition des solvants injectés, volume total dans le flacon échantillon) [69].

La séparation en EC repose essentiellement sur la mobilité électrophorétique, le coefficient de partage entre les phases, les constantes d'ionisations et la taille des molécules. Cette diversité de paramètres est une des raisons de la richesse d'applications de cette technique. Comparée aux techniques chromatographiques, l'EC devient une technologie très attrayante par son efficacité, sa sélectivité, sa facilité d'emploi, sa souplesse et sa rapidité d'exécution. D'autre part, l'utilisation de très faibles volumes d'échantillon, la faible consommation de réactifs, le faible coût des consommables et en particulier des capillaires, peuvent faire préférer cette technique aux techniques chromatographiques classiques [67-71].

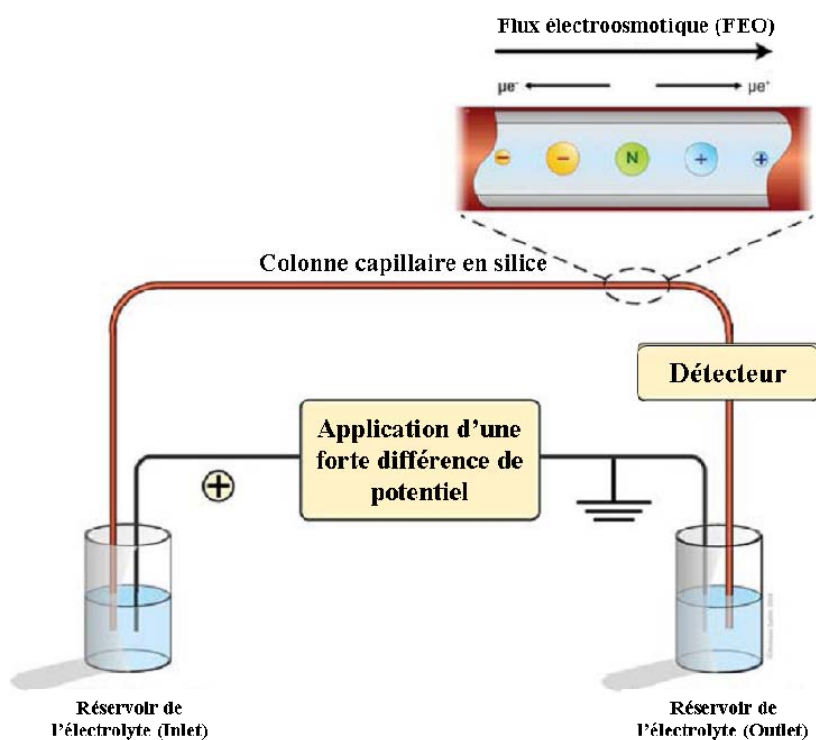


Figure 7 : Schéma d'une électrophorèse capillaire.

III.3.2. Flux électroosmotique (FEO)

L'application d'un champ électrique entre les deux extrémités d'une colonne capillaire en silice, remplie d'un tampon électrolyte, conduit à la génération d'un flux électroosmotique (FEO). Le contact du capillaire avec la solution tamponnée causera la dissociation des groupements silanols (Si-OH), ce qui explique pourquoi les parois internes de la colonne capillaire soient négativement chargées [67]. Par conséquent, les charges positives présentes dans l'électrolyte seront attirées vers les parois négatives du capillaire ce qui créera une double couche électrique adjacente à la surface de la colonne capillaire. Les cations les plus proches de la paroi négative formeront donc une couche stationnaire, quelque soit le potentiel appliqué, et cela en raison des fortes interactions électrostatiques. Lors de l'application d'une différence de potentiel, la partie mobile de cette double couche, c'est-à-dire les cations qui sont plus éloignés des parois négatives, migreront vers l'électrode négative (la cathode) en entraînant la solution tamponnée ce qui induira le FEO (Figure 8) [69].

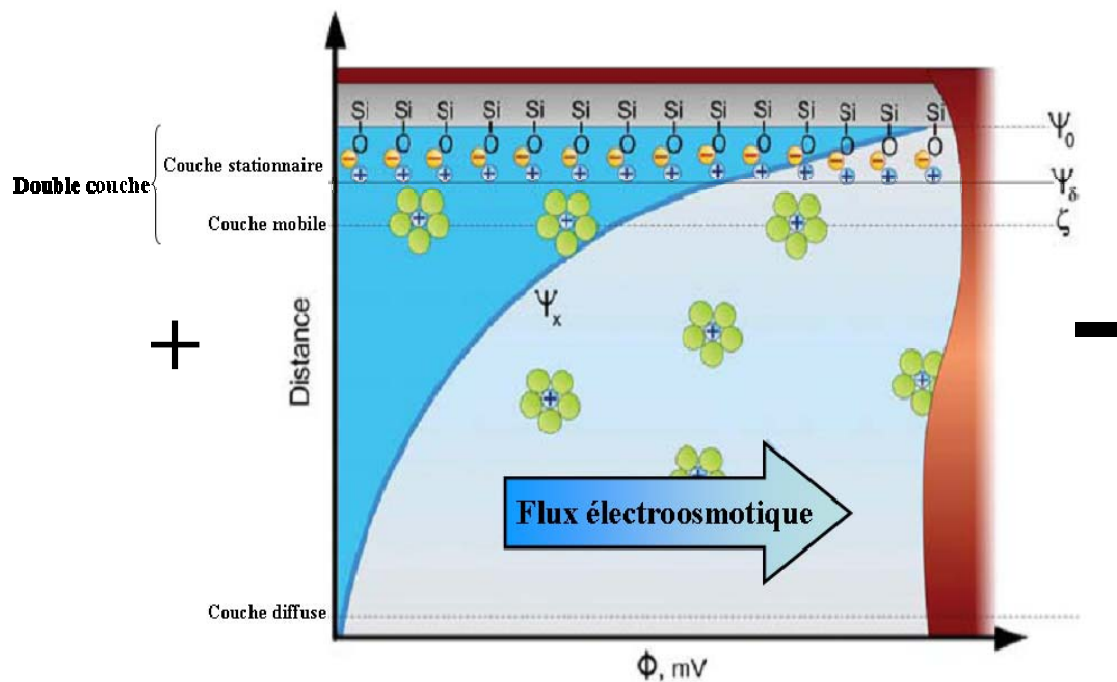


Figure 8 : Schéma de la double couche, Ψ_x est le potentiel créé entre une certaine distance x et la surface interne et ζ est le potentiel zêta.

La vitesse v_{eof} de ce FEO peut être exprimée en fonction de la constante diélectrique ϵ de la solution ($C^2 J^{-1} m^{-1}$), du potentiel zêta ζ (V) (généré par la présence de la double couche d'ions, à l'intérieur de la colonne capillaire), de la viscosité de la solution η et du champ électrique E ($V m^{-1}$) par l'équation [68]:

$$v_{eof} = \frac{\epsilon \zeta E}{4\pi \eta}$$

Sur la figure 9, nous pouvons distinguer l'avantage majeur de l'utilisation de techniques électrophorétiques (EC) par rapport à la chromatographie classique (CLHP). Ainsi, en EC, le liquide est mis en mouvement sous l'action d'un champ électrique, de ce fait le flux électroosmotique générera un profil plat de vitesse le long du diamètre du capillaire (à l'exception de quelques nano-litres adjacent aux parois internes) et cela contrairement au profil parabolique classique engendré dans une colonne dont le mouvement de la phase mobile est dû à l'action de la pression. Ce second profil résulte des forces frictionnelles de type solide-liquide qui conduisent à de larges pics et à une faible efficacité. Par contre le FEO ne contribue nullement à l'étalement des pics, ce qui explique les très hautes efficacités obtenues avec les techniques électrophorétiques [68,69,72].

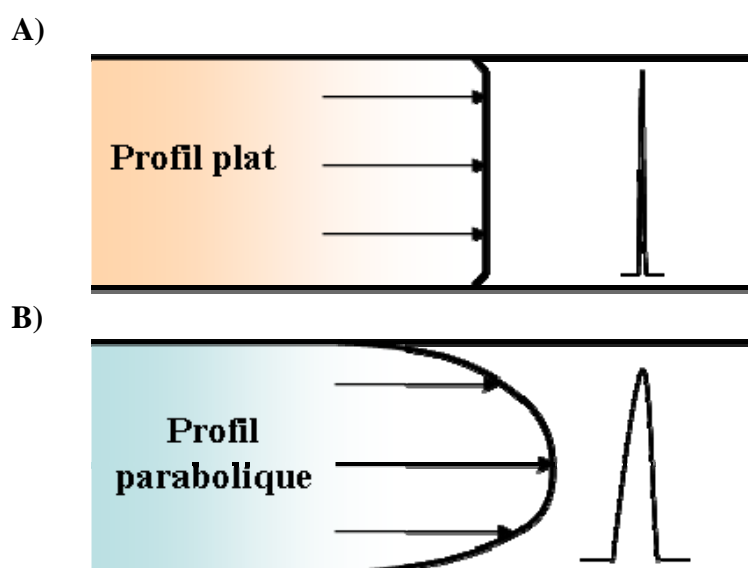


Figure 9 : Profils de vitesse des solutions lors A) des séparations électrophorétiques et B) des séparations chromatographiques

III.3.3. Mobilité électrophorétique

La séparation par électrophorèse capillaire résulte de la migration électrophorétique (mouvement des molécules chargées vers l'électrode de polarité inverse) et du flux électroosmotique (FEO) (mouvement d'électrolytes lié à la charge interne du capillaire et du potentiel appliqué). La vitesse de migration électrophorétique v_e (m s^{-1}) s'exprime en fonction du champ électrique appliqué E (V m^{-1}) et de la mobilité électrophorétique de l'ion μ_e ($\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) [69] :

$$v_e = E \times \mu_e$$

En ce qui concerne le champ électrique, il est fonction de la tension appliquée ainsi que des caractéristiques du capillaire ($E = \frac{V}{L}$, V : potentiel appliqué et L : longueur de la colonne capillaire). La mobilité électrophorétique est constante pour une espèce ionique donnée. Elle s'exprime en fonction de la charge ionique q (C), de la viscosité de la solution η et du rayon ionique r (m) [67] :

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

En conséquence de ce qui a été expliqué précédemment, nous avons pu noter que le FEO influe sur la mobilité totale des molécules du soluté, ainsi, la mobilité apparente (μ_{app}) des molécules au sein du capillaire correspondra à la somme de la mobilité électrophorétique effective (μ_e ou μ_{eff}) et de la mobilité électroosmotique [73].

$$\mu_{app} = \mu_{eff} + \mu_{FEO}$$

Le calcul de la mobilité apparente se fait généralement grâce à l'équation suivante :

$$\mu_{app} = \frac{l \times L}{t_m \times V}$$

Sachant que l est la longueur efficace, L : la longueur totale, t : le temps de migration et V correspond au voltage appliqué.

Etant donné que la mobilité du FEO est très souvent supérieure à celle des ions, toutes les espèces et indépendamment de leur charge, seront entraînées vers la cathode [74]. Ainsi, le FEO entraînera vers la cathode d'abord les molécules chargées positivement, puis les molécules neutres dont la mobilité effective est nulle ($\mu_{app} = \mu_{FEO}$) et qui migreront donc avec la même vitesse que le FEO, et enfin les molécules chargées négativement (Figure 10). De plus, les cations qui possèdent le rapport charge/masse le plus élevé migreront avant les cations dont le rapport est plus faible. Ce rapport peut être modifié en ajustant le pH du tampon de migration, affectant ainsi l'état d'ionisation et donc la mobilité électrophorétique [75].

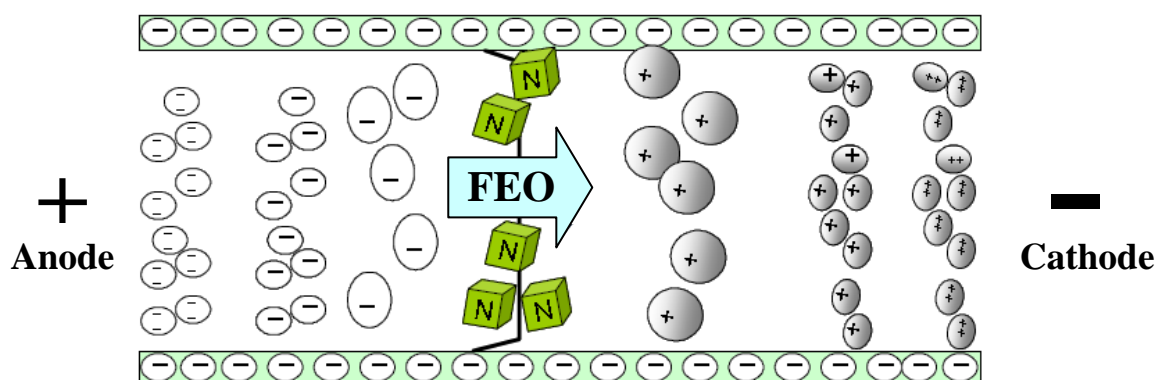


Figure 10 : Ordre de migration des molécules en fonction de leur rapport charge/masse

III.3.4. Séparation chirale par électrophorèse capillaire

Les nombreux avantages de l'électrophorèse capillaire ont encouragé la communauté scientifique à appliquer cette technique à la séparation énantiomérique. La caractérisation chirale par EC est obtenue par ajout d'un sélecteur chiral à l'électrolyte tamponné. Ce dernier va réagir sélectivement avec l'un des deux énantiomères et modifier sa mobilité électrophorétique, ce qui nous permettra de le distinguer de son isomère optique [76]. Il est intéressant de noter que la séparation chirale par EC fait intervenir quelques principes chromatographiques, du fait que la mobilité ne soit pas résultante uniquement du champ électrique mais également des différentes interactions qui peuvent s'établir entre le soluté et le sélecteur chiral [2].

Il existe un nombre impressionnant de sélecteurs chiraux pouvant être appliqué à la séparation énantiomérique par EC. Ces sélecteurs ont été initialement appliqués en chromatographie conventionnelle que ce soit comme additifs à la phase mobile ou comme phase stationnaire.

IV. Sélecteurs chiraux

De nombreux composés optiquement actifs (naturels, semi-synthétiques ou synthétiques) ont été développés en tant que sélecteurs chiraux pour la séparation stéréosélective d'énantiomères [77]. Toutefois, un bon sélecteur chiral doit répondre à certains critères [78,79] :

- ✓ Sa structure moléculaire et conformationnelle doit posséder suffisamment de centres d'asymétrie, de cavités chirales afin de pouvoir interagir de façon stéréosélective avec des énantiomères à séparer.
- ✓ Il doit être stable chimiquement dans les conditions d'analyse (température, pH, solvant...).
- ✓ Son prix est un critère important qui conditionnera le choix de la technique analytique.
- ✓ Il ne doit pas interférer avec le système de détection.

La stéréo-sélectivité provient de la différence de stabilité des complexes formés entre le sélecteur chiral et chaque énantiomère. La règle des trois points d'interaction (dite règle de Dalgliesh) mentionne que deux énantiomères seront séparés s'ils se forment trois interactions simultanées (AA', BB', CC') entre le sélecteur chiral et l'énantiomère et dont l'une d'entre elles est stéréosélective (Figure 11). Ces interactions peuvent être attractives ou répulsives et sont généralement de type π - π , dipôle-dipôle, Van der Waals, ions-dipôle ainsi que les liaisons d'hydrogènes [80].

Les sélecteurs chiraux peuvent être classés en cinq grandes familles selon leur structure chimique et le mécanisme de reconnaissance chirale mis en jeu (Figure 12).

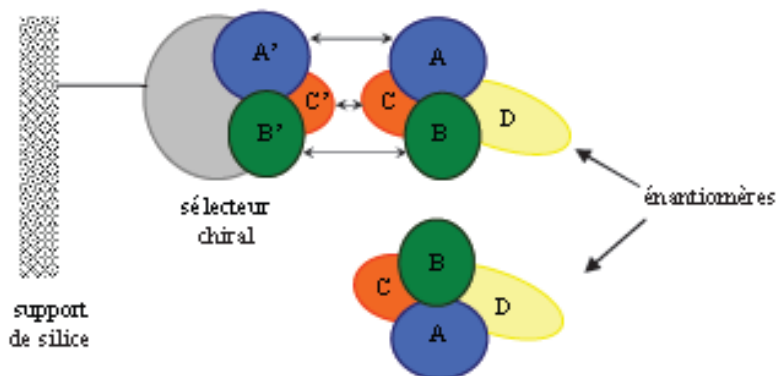


Figure 11 : Modèle des trois points d'interaction de Dalgliesh.

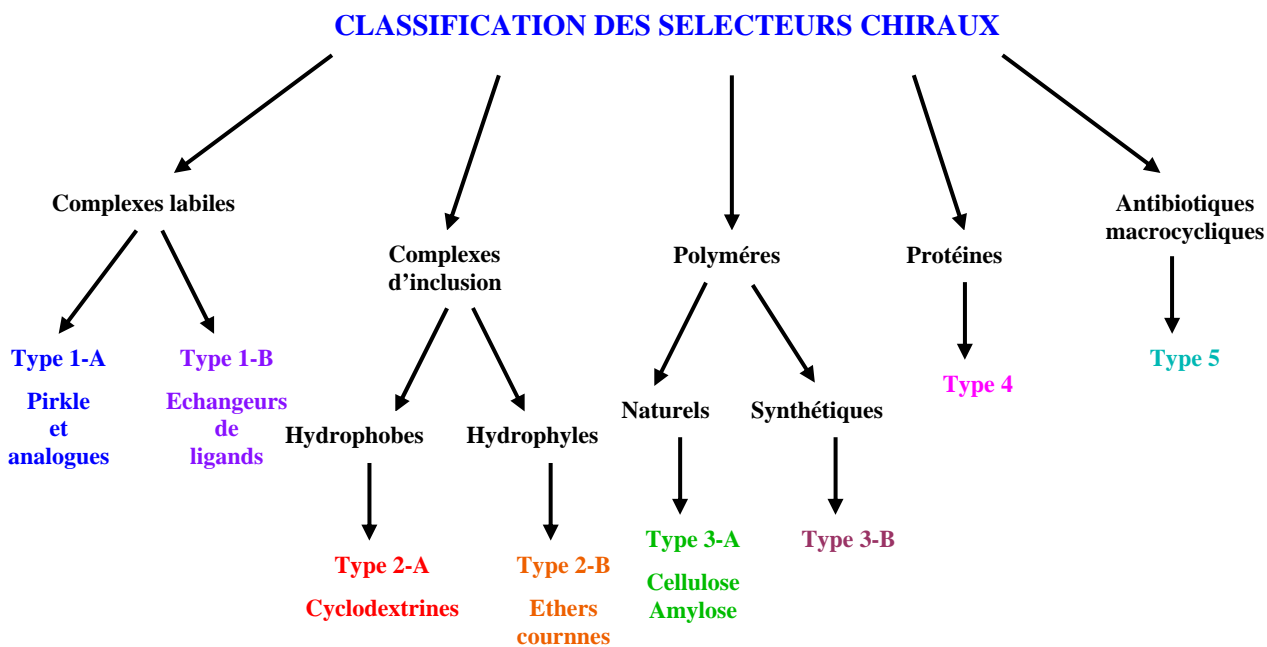


Figure 12 : Classification des sélecteurs chiraux.

IV.1. Complexes labiles

IV.1.1. Sélecteurs de type Pirkle

Ces sélecteurs ont été développés par Pirkle et al. [81]. Ils sont constitués de dérivés de type (R) ou (S) N-3,5-dinitrobenzoyl-phénylglycine, N-3,5-dinitrobenzoyl-leucine, N-naphtyl-alanine ou N-naphtyl-valine. Tous ces sélecteurs possèdent un noyau aromatique. Le mécanisme de reconnaissance chirale proposé par Pirkle est basé sur la formation de diastéréoisomères de stabilité différente entre soluté et sélecteur chiral, mettant en jeu des interactions de type π - π , dipôle-dipôle et /ou formation de liaison hydrogène [82].

Bien que récemment utilisés comme additifs chiraux en électrophorèse capillaire [83], les sélecteurs chiraux de type Pirkle sont généralement utilisés comme phases stationnaires en chromatographie liquide. Le nombre de composés chiraux pouvant être séparés avec ce sélecteur est très important. Citons par exemple les alcools aminés [84, 85], les acides aminés [85] ainsi qu'un grand nombre de β -bloquants [86, 87].

IV.1.2. Echangeurs de ligands

Leur mécanisme de séparation est fondé sur la formation d'un complexe diastéréoisomérique ternaire entre un soluté (donneur d'électrons), un métal de transition présentant des orbitales vacantes et un agent chélateur chiral. Ce ligand est généralement un acide aminé capable, lui aussi, de former un complexe avec un ion métallique tel que Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} [32]. Afin de former un complexe de coordination avec le métal de transition, le soluté doit posséder au moins deux groupements polaires de type -COOH, -NH₂, -OH. Cette technique s'applique en électrophorèse capillaire de zone [88] ou micellaire, en électrochromatographie et en CLHP [89]. Dans le dernier cas, le ligand peut être immobilisé sur un support de silice ou additionné comme sélecteur chiral dans la phase mobile aqueuse.

IV.2. Complexes d'inclusion

IV.2.1. Cyclodextrines

Les cyclodextrines (CDs) sont des oligosaccharides cycliques constitués d'unités répétitives de glucopyranose, reliées entre elles par des liaisons glycosidiques α -1,4. Elles résultent de la dégradation enzymatique de l'amidon. L'enzyme impliquée, la cyclodextrine glycosyl transférase est produite à partir de bactéries telles que *Bacillus macerans* et *Alcaliphilic bacilli* [90]. Les principales CDs obtenues sont l' α -CD, la β -CD et la γ -CD, constituées respectivement de 6, 7 et 8 unités glucose. Chaque unité glucopyranose adopte

une conformation chaise. Cet arrangement est à l'origine de la forme de la CD, celle d'un cône tronqué, possédant une cavité centrale hydrophobe dont l'ouverture est bordée de fonctions hydroxyles (Figure 13). Ces nombreux groupements hydroxyles, situés sur les atomes de carbone C2, C3 et C6, procurent à l'extérieur de la CD un caractère hydrophile [1,8,91].

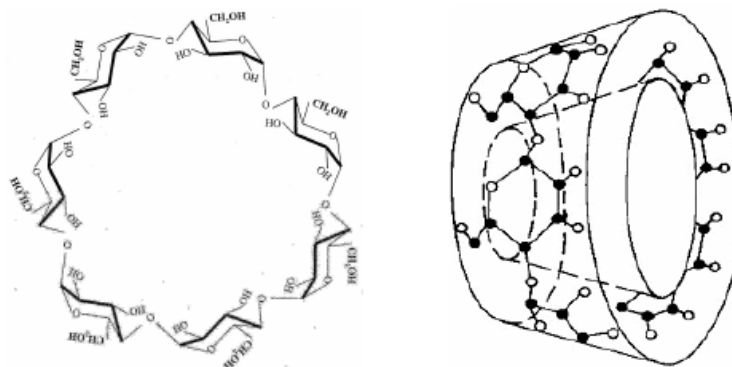


Figure 13 : Structure de la β -cyclodextrine

Une des propriétés remarquables des cyclodextrines est leur aptitude à former des complexes d'inclusion (Figure 14) avec une grande variété de molécules [73, 74]. La stabilité de ces complexes d'inclusion est déterminée par les caractéristiques moléculaires de la molécule invitée et est contrôlée par plusieurs phénomènes notamment l'effet hydrophobe, les liaisons hydrogène et les interactions de Van Der Waals [92].

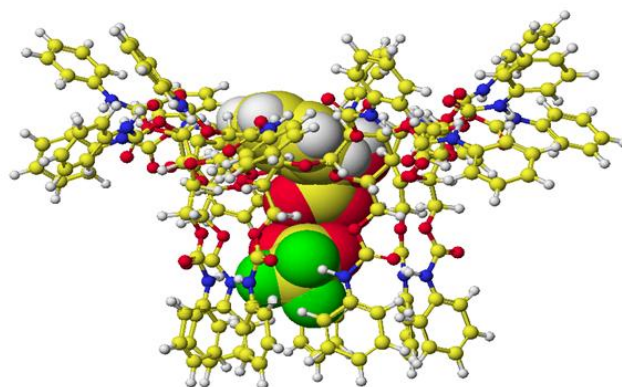


Figure 14 : Représentation schématisique du complexe d'inclusion formé par la β -CD et l'acide mandélique

Les CDs sont capables de différencier des molécules de structure chimique proche, telles que les isomères et plus particulièrement les énantiomères. En effet, les CDs possèdent 5 centres chiraux par groupements glucose, soit 35 centres stéréogènes pour la β -CD. Selon Wainer et Drayer [93], quelques critères doivent être respectés afin de faciliter la reconnaissance chirale :

- le soluté doit être constitué au moins d'un noyau aromatique situé en position α ou β du centre chiral.
- le soluté doit posséder des groupements hydrophiles proches du centre d'asymétrie susceptibles de former des liaisons hydrogènes avec les groupements hydroxyles de la CD.
- la taille de la cavité hydrophobe doit être en adéquation avec la géométrie du groupement aromatique du soluté.

Par ailleurs, les CDs ont des propriétés physico-chimiques compatibles avec de nombreuses techniques analytiques [94]. En effet, les CDs présentent les avantages suivants:

- Elles n'absorbent pas en UV dans la gamme utilisée pour la détection des solutés.
- Elles sont stables sur une large gamme de pH.
- Elles peuvent intensifier la fluorescence d'un composé et faciliter sa détection.
- Elles sont ininflammables, non toxiques et non volatiles.

Les cyclodextrines ont été utilisées dans le domaine de la séparation chirale à partir de 1980 [95]. A présent, leur utilisation en chromatographie (CLHP, CPG, CPS et CCM) et en électrophorèse capillaire (EC et ECC) est devenue très courante [96 - 100]. Elles sont utilisées comme phases stationnaires [101,102] ou comme additifs de la phase mobile et du tampon de migration [96,97,102,76]. En EC, elles sont de loin les sélecteurs chiraux les plus utilisés et les plus efficaces [71]

Les cyclodextrines natives ont été modifiées par substitution de l'atome d'hydrogène du groupe hydroxyle par divers groupements neutres, aromatiques, anioniques ou cationiques (alkyle, hydroxyalkyle, diméthylphenylcarbamate, amino, thio, sulfate, sulfoalkyle, glucosyle, maltosyle, méthyle, hydroxyethyle, hydroxypropyle, acétyle, etc.) [76,93,103]. Ces cyclodextrines modifiées sont employées en tant qu'additifs de phase mobile et de tampon de migration ou comme phases stationnaires chirales. Les phases stationnaires cyclodextrines

natives et modifiées sont utilisées en CLHP en mode de phase normale, phase inversée, ou encore en mode organique polaire [1].

Parmi les nombreuses molécules qui ont été résolues avec les cyclodextrines, citons le cas des benzodiazépines [104], les dérivés d'imidazole [105], les β -bloquants [106], les anti-inflammatoires non stéroïdiens [107], la warfarine [108], les alcaloïdes [109], les barbituriques [110], les dérivés d'acides aminés [111], etc.

Dans le cadre de notre travail, nous avons porté notre choix sur ce sélecteur chiral en raison de sa très haute efficacité que ce soit en chromatographie liquide ou en électrophorèse capillaire.

IV.2.2. Ethers couronnes

Les éthers couronnes sont des macrocycles répétant l'unité (-O-C₂H₄-). Ces éthers cycliques ont été synthétisés pour la première fois par Pedersen [112]. L'utilisation d'un éther couronne comme sélecteur chiral en chromatographie et en électrophorèse capillaire a été rapportée dans la littérature [71,113].

Le mécanisme de reconnaissance chirale repose sur la formation de liaisons hydrogène et d'interactions électrostatiques entre une fonction aminée du composé chiral et les hétéroatomes de l'éther couronne. Les interactions secondaires entre les groupes carboxyliques de l'éther couronne et des groupes situés à proximité du centre chiral du soluté sont essentielles pour la reconnaissance chirale [114].

Les éthers couronnes ont été utilisés avec succès pour la reconnaissance chirale des amines aromatiques (1-naphthyl-ethyl-amine, 1-phényl-ethyl-amine, etc.) et des amino-alcools (norephedrine, noradrenaline, 2-amino-1,2-diphényl-éthanol) [115]. Cependant, la séparation des acides aminés et dérivés constitue la cible majeure de ce sélecteur [116].

IV.3. Polymères

IV.3.1. Polysaccharides

La cellulose et l'amylose sont les biopolymères optiquement actifs les plus abondants qui possèdent un fort potentiel d'applications en séparation chirale [117,118]. Ces polysaccharides ont une structure hélicoïdale asymétrique composée d'unités répétitives de

(D)-(+)-glucose reliées par des ponts éthers en position β (1-4) pour la cellulose et α (1-4) pour l'amylose [1]. Afin d'améliorer l'énantiosélectivité de ces polymères naturels, la cellulose et l'amylose ont été dérivées par divers substituants. Développés par Okamoto et al., plus d'une dizaine de dérivés de l'amylose (Chiralpak®) et de cellulose (Chiralcel®) sont commercialisés par la Société Daicel (Tokyo, Japon) [119]. Les mécanismes de reconnaissance des phases polysaccharidiques sont multiples et complexes en raison des différentes conformations qu'adoptent les polysaccharides en fonction de la nature et de la teneur en modificateur organique dans la phase mobile. On admet que le processus de caractérisation chiral est dû à la formation de complexes diastéréoisomériques par liaisons hydrogène ou interactions π - π entre le soluté et le motif polysaccharidique [120].

Les phases stationnaires à base de polysaccharides sont très intéressantes en chromatographie liquide à l'échelle préparative en raison de leur nombre élevé de cavités chirales qui induit une forte capacité de charge. En plus de leur faible coût, ces PSCs possèdent un haut pouvoir énantiosélectif envers une multitude de composés ce qui leur permet de résoudre 90 % des racémates [121]. En EC, des polysaccharides linéaires ont été utilisés tels que les dextrans, les dextrans et l'héparine. Malgré un fort pouvoir résolutif vis-à-vis de certaines classes chimiques (par exemple, les sucres pour les maltodextrines), leur utilisation reste très limitée [71,116].

IV.3.2. Polymères synthétiques

Ce type de sélecteur chiral a été introduit par Blaschke et al. [122, 123]. Il est préparé par polymérisation de monomères chiraux. Il représente une classe intéressante de part ses propriétés stéréosélectives dues à la structure hélicoïdale particulière du polymère et aux cavités asymétriques. L'inclusion des énantiomères dans ces cavités constituerait le mécanisme principal de la reconnaissance chirale [124, 125]. Les chaînes polymériques elles-mêmes possèdent de multiples centres chiraux, provenant des monomères, qui interviennent également dans la discrimination chirale [126]. De nombreux polymères d'origine synthétique ont été utilisés en tant que sélecteurs chiraux. Citons les molécules de polyméthacrylate, polyacrylamide, polyméthacrylamide et les dérivés du polystyrène [127].

Ces sélecteurs chiraux ont été principalement utilisés comme phases stationnaires en chromatographie. Leur utilisation à l'échelle préparative connaît un grand succès [123]. Plus de 200 composés chiraux ont été résolus sur ce type de sélecteur chiral [128, 129]. Ils ont

également été utilisés en électrophorèse et ont permis la séparation de β -bloquants, de benzodiazépines et des dérivés binaphtols [130].

IV.4. Protéines

Ceux sont des polymères de poids moléculaire élevé composés de sous-unités chirales (les acides aminés naturels en série L en général). Diverses protéines telles que l'avidine [131], α 1-glycoprotéine acide (AGP) [132,133], ovomucoïde (OVM) [134], cellulase nommée cellobiohydrolase (CBH) [135], sérum albumine humain (SAH) [136] ou de boeuf (SAB) [137,138]...ont la capacité de fixer certaines molécules de façon stéréosélective. Les mécanismes de reconnaissance chirale semblent être dus à la structure particulière de la protéine et/ou à la formation de cavités hydrophobes capables de reconnaître des molécules chirales. D'autres interactions (effet hydrophobe, électrostatiques, transfert de charges, liaisons hydrogène, échange d'ions, etc) sont probablement impliquées également dans la reconnaissance énantiosélective du ligand [139]. Ces sélecteurs chiraux permettent la résolution d'une large gamme de composés chiraux. Ainsi, des molécules médicamenteuses chirales (acides, neutres ou basiques) ont été séparées par CLHP ou par électrophorèse capillaire en utilisant différents sélecteurs chiraux protéiques [71,140].

IV.5. Antibiotiques macrocycliques

Les antibiotiques macrocycliques les plus utilisés et donnant de meilleurs résultats en tant que sélecteurs chiraux sont les glycopeptides (ristocétine, vancomycine, teicoplanine et avopracine) [141,142]. Bien que le mécanisme de reconnaissance de ces sélecteurs chiraux ne soit pas clairement élucidé, il semblerait que des mécanismes d'inclusion dans la cavité hydrophobe, des interactions dipôles-dipôles, des liaisons hydrogène, des interactions de type π - π (transfert de charge), électrostatiques, ou des répulsions stériques, jouent un rôle dans la reconnaissance chirale [141-143]. Donc, les propriétés énantiosélectives des antibiotiques macrocycliques semblent se rapprocher de celles des protéines, des cyclodextrines et des sélecteurs chiraux polymériques. Cependant, les antibiotiques macrocycliques présentent des avantages majeurs par rapport aux autres sélecteurs chiraux à savoir leur grande stabilité et leur capacité plus importante [144]. Ils ont été utilisés pour la résolution énantiomérique d'une grande variété de composés que ce soit en chromatographie liquide (PSC) ou en électrophorèse capillaire (additif). Parmi les composés résolus, nous citerons les acides aminés et leurs dérivés, les peptides, les alcools, les esters, les sulfamides... [71,113].

V. Validation d'une méthode analytique

Le développement d'une nouvelle méthode analytique nécessite sa validation afin de démontrer que la procédure développée correspond à l'usage pour lequel elle est prévue [145, 146]. Pour l'analyse pharmaceutique, la référence internationale de base en matière de validation analytique est actuellement constituée par des textes publiés par la FDA (US Food and Drug Administration) et ceux dans le cadre d'ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) [147-149]. Ces textes ont été établis pour combler les différences qui existent souvent entre différents recueils et textes réglementaires de l'Union Européenne, des États-Unis et du Japon [150]. D'une manière générale, les critères de validation couramment utilisés dans les procédures analytiques de séparation et repris dans le document Q2A de la Conférence Internationale sur l'Harmonisation [151] sont : sélectivité, justesse, précision, répétabilité, linéarité, limites de détection et de quantification ainsi que le recouvrement.

V.1. Spécificité (sélectivité)

La spécificité est la propriété qui fait qu'une méthode d'analyse rend compte sans ambiguïté de la substance analysée en présence d'autres composantes normalement présentes. Ces dernières peuvent inclure des impuretés, des produits de dégradation, la matrice, etc. [151]. Notons que le terme sélectivité paraît un terme plus approprié que le terme spécificité adopté par ICH [150]. La spécificité de la méthode est testée en chromatographie, en préparant des solutions de l'échantillon surchargées à un niveau de concentration approprié avec les composés susceptibles d'interférer [147].

V.2. Linéarité

La linéarité d'une procédure analytique est sa capacité à obtenir, à l'intérieure d'un certain intervalle de dosage, des résultats (et non des signaux) directement proportionnels à la concentration (quantité) de la substance à examiner dans l'échantillon [145]. La linéarité de la gamme d'étalonnage est en général établie avec au moins 5 concentrations différentes. Dans le cas de l'analyse d'un produit principal, la gamme de linéarité étudiée se situe entre 80 – 120 % ou 50 – 150 % ou 40 – 160 % de la concentration cible où se situe le dosage [150]. Pour toutes les séries de validation, une droite de régression (ou courbe de calibration) est ajustée sur les concentrations calculées par rapport aux concentrations introduites en appliquant le modèle de régression linéaire pour lequel le coefficient de détermination (r^2), la pente et l'ordonnée à l'origine sont calculés [151].

V.3. Répétabilité

La répétabilité du système est évaluée par injections successives (souvent plus de six injections) d'une même solution étalon. La répétabilité intra-jour de la procédure doit être aussi évaluée en répétant la procédure dans sa totalité (préparation de l'étalon et de l'échantillon) avec $n \geq 6$ déterminations indépendantes, ou en testant séparément la répétabilité de préparation de l'échantillon et de l'étalon respectivement ($n \geq 6$). D'après Araujo, l'expression répétabilité inter-jour est totalement erronée et doit être remplacée par l'expression précisions inter-jours [151], elle est estimée en préparant chaque jour ($n=3$) une nouvelle solution d'électrolyte, de solution étalon et d'échantillon [145,150].

V.4. Précision et la justesse

La précision d'une méthode correspond au degré d'accord (degré de dispersion) entre les résultats des mesures obtenues par l'analyse individuelle de plusieurs prélèvements d'un même échantillon homogène, prélevés dans des conditions prescrites [147]. L'évaluation de la précision doit se faire au moyen d'échantillons homogènes et authentiques. S'il est impossible d'obtenir des échantillons homogènes, on peut utiliser des échantillons préparés artificiellement ou une solution d'échantillon. Elle est généralement exprimée par l'écart-type relatif ou le coefficient de variation (D.S.R.%) d'un ensemble de mesures [145].

La justesse (ou biais %) se réfère à l'étroitesse d'agrément entre le résultat obtenu et la valeur de référence acceptée notamment par convention ou « la vraie valeur ». C'est donc l'écart entre la valeur théorique d'un standard et les valeurs expérimentales mesurées de ce standard [151].

Le seuil de tolérance suggéré par la FDA pour les valeurs des déviations standards relatives d'une méthode bioanalytique est de 15%. Néanmoins pour l'analyse de médicaments la D.S.R.% ne doit pas excéder les 2% et cela à cause de la simplicité de la matrice (comprimés, sirop...etc) ainsi que la possibilité de choisir librement les concentrations étudiées [149].

V.5. Limites de détection (LD) et de quantification (LQ)

La LD correspond à la quantité de soluté minimale détectée dans l'échantillon, mais pas nécessairement quantifiée comme une valeur exacte. Elle est souvent définie comme la quantité de soluté qui donne un rapport signal/bruit de fond égal à 3 [145]. La LQ correspond

à la quantité de soluté minimale quantifiée avec une justesse et une précision convenables. Un coefficient de variation voisin de 10 % et une justesse voisine de ± 10 % sont en général tolérés au niveau de la LQ [150]. Les limites de détection et de quantification peuvent être évaluées en se basant sur une évaluation visuelle, sur le rapport signal/bruit de fond ou sur l'écart-type de la réponse et la pente de la droite d'étalonnage [147].

V.6. Recouvrement

Le recouvrement (ou taux de rendement d'extraction) du soluté dans la matrice correspond au rapport entre la réponse mesurée d'un échantillon biologique enrichie avec le soluté ciblé et soumise à la procédure d'extraction et celle d'une solution (aqueuse) préparée avec la même concentration en soluté. Ce paramètre est calculé afin de vérifier les pertes du soluté durant la procédure d'extraction [145].

VI. Références bibliographiques

- [1] K. Si-Ahmed « Séparation de produits optiquement actifs sur phases stationnaires chirales en chromatographie liquide » Thèse de Magister, 2004, USTHB.
- [2] T. E. Beesley, R. P. Scott. Chiral Chromatography. John Wiley & Sons; New York, 1998.
- [3] A. Collet, J. Crassous, J.-P. Dutasta, L. Guy. Molécules chirales: stéréochimie et propriétés. EDP Sciences, CNRS éditions, Paris, 2006.
- [4] S. Amllénmark, Chromatographic Enantioseparation, methods and application, second edition, Ellis Horwood Series in analytical chemistry, Chichester, 1991.
- [5] C. Gros, J. Boni, l'actualité chimique, Société Française de Chimie, Mars 1995, 9.
- [6] H.P. Husson, Ann. Pharm. Fr. 55 (1997) 14.
- [7] D. R. Bobbitt, S. W. Linder, Trends Anal. Chem., 2001, 20(3), 111
- [8] F. Tazerouti « Synthèse, caractérisation et application des phases stationnaires chirales en chromatographie liquide » Thèse de Doctorat d'état, 2001, USTHB.
- [9] B. Waldeck, J. Allergy Clin. Immunol., 103 (1999) 742.
- [10] M.F. Grenier-Loustalot, H. Casabianca, l'actualité chimique, Société Française de Chimie, 1999, 40.
- [11] E. Alexandros, K. Demetrios, D. Chronopoulos, Tetrahedron Lett., 46 (2005) 4353.
- [12] B.S. Sekhon, J. Pestic. Sci., 34 (2009) 1.
- [13] A. Williams, Phytoparasitica, 28 (2000) 243.
- [14] J.-P. Tillement, B. Testa, F. Brée, Biochem. Pharm., 66 (2003) 1123.
- [15] FDA, Development of New Stereoisomeric Drugs (5 janvier 1992),
<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm122883.htm>
- [16] S.F. Murphy-Poulton, F. Boyle, X.Q. Gu, L.E. Mather, J. Chromatogr. B, 831 (2006) 48.
- [17] M. Espinosa Bosch, A.J. Ruiz Sánchez, F. Sánchez Rojas, C. Bosch Ojeda, J. Pharm. Biomed. Anal. 46, (2008) 9.
- [18] Y.S. Wang, K.-T. Tai, J.-H. Yen, Ecotoxicol. Environ. Safety 57 (2004) 346.
- [19] I. Ilisz, R. Berkecz, A. Péter, J. Pharm. Biomed. Anal., 47 (2008) 1.
- [20] P. Wang, S. Jiang, D. Liu, H. Zhang, Z. Zhou, J. Agric. Food Chem. 54 (2006) 1577.
- [21] P. Schmitt, A.W. Garrison, D. Freitag, A. Kettrup, J. Chromatogr. A 792 (1997) 419.
- [22] J.L. Jarman, W.J. Jones, L.A. Howell, A.W. Garrison, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 6175.

- [23] V.C. Anigbogu, H. Woldeab, A.W. Garrison, J.K. Avants, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 83 (2003) 89.
- [24] V. Schurig, *TrAC Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 647.
- [25] K. Lin, S. Zhou, C. Xu, W. Liu, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 8134.
- [26] N. Kurihara, J. Miyamoto, G.D. Paulson, B. Zeeh, M.W. Skidmore, R.M. Hollingworth, H.A. Kuiper, *Pure Appl. Chem.* 69 (1997) 2007.
- [27] J.J. Ellington, J.J. Evans, K.B. Prickett, W.L. Champion, *J. Chromatogr. A* 928 (2001) 145.
- [28] J. L. Bernal, L. Toribio, M. J. del Nozal, E. M. Nieto, M. I. Montequi, *J. Pharm. Biomed., Anal.* 54 (2002) 245.
- [29] M. Maftouh, C. Granier-Loyaux, E. Chavana, J. Marini, A. Pradines, Y. Vander Heyden, C. Picard, *J. Chromatogr. A* 1088 (2005) 67.
- [30] L. Toribio, M.J. del Nozal, J.L. Bernal, J.J. Jiménez, C. Alonso, *J. Chromatogr. A* 1046 (2004) 249.
- [31] G.-S. Ding, Y. Liu, R.-Z. Cong, J.-D. Wang, *Talanta* 62 (2004) 997.
- [32] G. Gübitz, *Chiral separation: methods and protocols*, Humana Press, New Jersey, 2004.
- [33] D.T. Witte, *Pharm. World Sci.* 15 (1993) 283.
- [34] I. Istvan, B. Robert, P. Antal, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008) 1.
- [35] C. Czerwenka, M. Lämmerhofer, W. Lindner, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003) 1789.
- [36] E. Yashima, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 105.
- [37] T. Kubota, C. Yamamoto, Y. Okamoto, *Chirality* 14 (2002) 372.
- [38] T.J. Ward, B.A. Baker, *Anal. Chem.*, 80 (2008) 4363.
- [39] J. Hernandez-Borges, Z. Aturki, A. Rocco, S. Fanali, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1589.
- [40] K. Si-Ahmed, F. Tazerouti, A.Y. Badjah-Hadj-Ahmed, Z. Aturki, G. D'Orazio, A. Rocco, S. Fanali, *J. Chromatogr. A* (2009) DOI: doi:10.1016/j.chroma.2009.07.053.
- [41] G D'Orazio, S Fanali, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 2567.
- [42] F. Hu, C. Deng, Y. Liu, X. Zhang, *Talanta* 77 (2009) 1299.
- [43] J.P. C. Vissers, H.A. Claessens, C.A. Cramers, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 1.
- [44] J. Embrechts, F. Lemièrre, W. Van Dongen, E. L. Esmans, P. Buytaert, E. Van Marck, M. Kockx, A. Makar, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14 (2003) 482.
- [45] J.P.C. Vissers, *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 117.
- [46] K.E. Karlsson, M. Novotny, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1662.
- [47] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *Practical HPLC method development*, 2nd. Ed.; John Wiley and Sons, New York, 1997.

- [48] P.R. Cutillas, *Current Nanoscience* 1 (2005) 65.
- [49] J.P. Chervet, M. Ursem, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1507.
- [50] A.M. Siouffi, V. Tomao, J. Pesek, *Analisis* 27 (1999) 151.
- [51] H. Wang, J. Cao, Y. Bi, L. Chen, Q.-H. Wan, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5882.
- [52] E. Rapp, E. Bayer, *J. Chromatogr. A* 887 (2000) 367.
- [53] J.H. Knox, I.H. Grand, *Chromatographia* 32 (1991) 317.
- [54] Y. Chen, G. Gerhardt, R. Cassidy, *Anal. Chem.* 72 (2000) 610.
- [55] S.M. Piraino, J.G. Dorsey, *Anal. Chem.* 75 (2003) 4292.
- [56] J.-R. Chen, M.T. Dulay, R.N. Zare, F. Svec, E. Peters, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1224.
- [57] G. Wang, M. Lowry, Z. Zhong, L. Geng, *J. Chromatogr. A* 1062 (2005) 275.
- [58] E. Francotte, M. Jung, *Chromatographia* 42 (1996) 521.
- [59] H. Hofstetter, O. Hofstetter, V. Schurig, *J. Microcol. Sep.* 10 (1998) 287.
- [60] D. Wistuba, V. Schurig, *Electrophoresis* 21 (2000) 3152.
- [61] M. Meyring, B. Chankvetadze, G. Blaschke, *J. Chromatogr. A* 876 (2000) 157.
- [62] Z. Liu, K. Otsuka, S. Terabe, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 17.
- [63] N. Rosales-Conrado, M.E. Leon-Gonzalez, G. D'Orazio, S. Fanali, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 1303.
- [64] A. Tiselius, *Transactions of the Faraday Society*, 33 (1937) 524.
- [65] S. Hjerten, *Chromatographic Reviews*, 9 (1967) 122.
- [66] D.C. Simpson, R.D. Smith, *Electrophoresis* 26 (2005) 1291.
- [67] J.P. Landers, *Handbook of capillary electrophoresis*, (2ème édition), CRC Press, Boca Raton, Finland, 1997.
- [68] P.G. Righetti, *Capillary electrophoresis in analytical biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, Finland, 1996.
- [69] L. Labat, M. Deveaux, J.-P. Dubqst, *Ann. Toxicol. Anal.* XII(3) (2000) 179.
- [70] N. Anastos, N.W. Barnett, S.W. Lewis, *Talanta* 67 (2005) 269.
- [71] G. Gübitz, M.G. Schmid, *J. Chromatogr. A* 1204 (2008) 140.
- [72] M. Wiklund, P. Spéjel, S. Nilsson, H.M. Hertz, *Ultrasonics* (2003) 329.
- [73] K. Altria, *Capillary electrophoresis guidebook: Principles, operation and applications*, Humana Press, Totowa, NJ, 1995.
- [74] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1298.
- [75] C. Blessum, J. Jeppsson, R. Aguzzi, H. Bernon, J. Bienvenu, *Ann. Biol. Clin.* 57 (1999) 643.

- [76] B. Chankvetadze, *Capillary electrophoresis in chiral analysis*, J. Wiley and Sons, New York, 1997.
- [77] S. Fanali, *Electrophoresis* 30 (2009) S203.
- [78] N.M. Maier, P. Franco, W. Lindner, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 3.
- [79] G. Gübitz, M.G. Schmid, *Biopharm. Drug Dispos.* 22 (2001) 291.
- [80] C.E. Dalgliesh, *J. Chem. Soc.* 47 (1952) 3940.
- [81] W.H. Pirkle, M.H. Hyun, B. Bank, *J. Chromatogr. A* 316 (1984) 585.
- [82] M.M. Hefnawy, J.T. Stewart, *Anal. Lett.* 32 (1999) 159.
- [83] W. Thomann, F. Prost, A. Prochazhova, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 555.
- [84] Y. Wu, M. Krocka, T. Li, *J. Chromatogr. A* 822 (1988) 11.
- [85] A.J. Bourgue, I.S. Krull, *J. Chromatogr. A* 537 (1991) 123.
- [86] P.V. Petersen, J. Ekelund, L. Olsen, S.V. Ovesen, *J. Chromatogr. A* 757 (1997) 65.
- [87] A.M. Dyas, M.L. Robinson, A.F. Fell, *J. Chromatogr. A* 586 (1991) 351.
- [88] B.K. Singh, A. Walker, D.J. Wright, *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (2002) 2600.
- [89] M. Lorin, R. Delépée, P. Morin, J.-P. Ribet, *Anal. Chim. Acta* 592 (2007) 139.
- [90] J. Szejtli, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1743.
- [91] S. Li, W. Purdy, *J. Chromatogr. A* 625 (1992) 109.
- [92] L. Liu, Q.-X. Guo, *J. Incl. Phenom.* 42 (2002) 1.
- [93] F. Bressolle, M. Audran, T.-N. Pham, J.-J. Vallon, *J. Chromatogr. B* 687 (1996) 303.
- [94] B. Perly, F. Pilard, *Les cyclodextrines et leur Applications*, CLEFS CEA, 35, 1997
- [95] H. Nishi, K. Nakamura, H. Nakai, T. Sato, *J. Chromatogr. A* 757 (1997) 225.
- [96] X.Y. Gong, P.C. Hauser, *Electrophoresis* 27 (2006) 4375.
- [97] X.Y. Gong, P.C. Hauser, *J. Chromatogr. A* 1094 (2005) 196.
- [98] M.H. Hyun, G. Tan, J.Y. Xue, *J. Chromatogr. A* 1097 (2005) 188.
- [99] V. Farkas, T. Tóth, G. Orosz, P. Huszthy, M. Hollósi, *Tetrahedron: Asymmetry* 17 (2006) 1883.
- [100] D.W. Armstrong, Y. Tang, S. Chen, C. Bagwill, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1473.
- [101] K. Si-Ahmed, F. Tazerouti, A.Y. Badjah-Hadj-Ahmed, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 507.
- [102] D.W. Armstrong, U.B. Nair, *Electrophoresis* 18 (1997) 2331.
- [103] J. Szejtli, *Med. Res. Rev.* 14 (1994) 353.
- [104] C. Bertucci, E. Domenici, G. Uccello-Barretta, P. Salvadori, *J. Chromatogr. A* 506 (1990) 617.

- [105] C. Foulon, C. Danel, M.P. Vaccher, J.P. Bonte, C. Vaccher, J.F. Goossens, *Electrophoresis* 25 (2004) 2735.
- [106] M.G. Vargas, Y. Vander Heyden, M. Maftouh, D.L. Massart, *J. Chromatogr. A* 855 (1999) 681.
- [107] D.W. Armstrong, C.D. Chang, S.H. Lee, *J. Chromatogr. A* 539 (1991) 83.
- [108] W.P. Yau, E. Chan, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 107.
- [109] A.M. Stalcup, J.R. Faulkner, Y. Tang, D.W. Armstrong, L.W. Levy, E. Regalado, *Biomed. Chromatogr.* 5 (1991) 3.
- [110] H. Riering, M. Sieber, *J. Chromatogr. A* 728 (1996) 171.
- [111] P. Zakaria, M. Macka, P.R. Haddad, *J. Chromatogr. A* 1031 (2004) 179.
- [112] C.J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.* 89 (1967) 2495.
- [113] D. W. Armstrong, *Direct Enantiomeric Separations in Liquid Chromatography and Gas Chromatography*, H. J. Issaq (éd.), *Century of Separation Science*, Marcel Dekker, New York, 2002.
- [114] E. Kim, Y. Koo, D.S. Chung, *J. Chromatogr. A* 1045 (2004) 119.
- [115] Y. Mori, K. Ueno, T. Umeda, *J. Chromatogr. A* 757 (1997) 328.
- [116] M. Blanco, I. Valverde, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 428.
- [117] H. Y. Aboul-Enein, I. Ali, G. Gubitz, C. Simons, P. J. Nicholls, *Chirality* 12 (2000) 727.
- [118] H. Y. Aboul-Enein, I. Ali, M. G. Schmid, V. Jetcheva, O. Gecse, G. Gubitz, *Anal. Lett.* 34 (2001) 1107.
- [119] Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Hatada, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 5357.
- [120] C. Roussel, B. Bonnet, A. Piederriere, C. Suteu, *Chirality* 13 (2001) 56.
- [121] Y. Zhang, D.-R. Wu, D.B. Wang-Iverson, A.A. Tymiak, *Drug Discovery Today* 10 (2005) 571.
- [122] G. Blaschke, J. Maibaum, *J. Chromatogr. A* 366 (1986) 329.
- [123] G. Blaschke, *J. Liq. Chromatogr. A* 9 (1986) 341.
- [124] Y. Okamoto, E. Yashima, *Angew. Chem. Int. Ed.* 37 (1998) 1020.
- [125] Y. Okamoto, Y. Kaida, *J. Chromatogr. A* 666 (1994) 403.
- [126] E. Yashima, K. Maeda, Y. Okamoto, *Nature* 399 (1999) 449.
- [127] T. Nakano, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 205.
- [128] J. Irurre, J. Santamari, M.C. Gonzalez-Rego, *Chirality* 7 (1995) 154.
- [129] Y. Okamoto, E. Yashima, *Macromolecular Design of polymeric materials*, Dekker, New York, 1997.

- [130] F. Haddadian, E.J. Billiot, S.A. Shamsi, I.M. Warner, *J. Chromatogr. A* 858 (1999) 219.
- [131] J. Haginaka, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 253.
- [132] J. Hermansson, *J. Chromatogr. A* 269 (1983) 71.
- [133] J. Hermansson, *Trends Anal. Chem.* 8 (1989) 251.
- [134] T. Miwa, T. Miyakawa, M. Kayano, Y. Miyake, *J. Chromatogr. A* 408 (1987) 316.
- [135] I. Marle, P. Erlandsson, L. Hansson, R. Isaksson, C. Pettersson, G. Pettersson, *J. Chromatogr. A* 586 (1991) 233.
- [136] A. Ahmed, D.K. Lloyd, *J. Chromatogr. A* 766 (1997) 237.
- [137] X. Zhang, E.W. Davidian, T.H. Nguyen, R.W. Evans, J. Im Sung, G. E. Barker, *J. Chromatogr. A* 745 (1996) 1.
- [138] D. Eberle, R.P. Hummel, R. Kuhn, *J. Chromatogr. A* 759 (1997) 185.
- [139] E. Francotte, W. Lindner, *Methods and Principles in Medicinal Chemistry, Chirality in Drug Research*, Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
- [140] A. Ceccato, P. Hubert, J. Crommen, *STP Pharma Pratiques* 9 (1999) 295.
- [141] D.W. Armstrong, U.B. Nair, *Electrophoresis* 18 (1997) 2331.
- [142] T. Ward, *LC-GC*, 14 (1996) 886.
- [143] T. Ward, C. Dann III, A. Blaylock, *J. Chromatogr. A* 715 (1995) 337.
- [144] D.W. Armstrong, Y. Tang, S. Chen, Y. Zhou, C. Bagwill, J.-R. Chen, *Anal.Chem.* 66 (1994) 1473.
- [145] I. Taverniers, M. De Loose, E. Van Bockstaele, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 535.
- [146] L. Fotsing, M. Fillet, I. Bechet, P. Hubert, J. Crommen, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 1113.
- [147] G.A. Shabir, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 57.
- [148] N. Tavakoli, J. Varshosaz, F. Dorkoosh, M.R. Zargarzadeh, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 325.
- [149] E. Rozet, W. Dewé, E. Ziemons, A. Bouklouze, B. Boulanger, P. Hubert, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 2214.
- [150] H. Fabre, *Analisis* 27 (1999) 155.
- [151] P. Araujo, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 2224.

CHAPITRE II

**ETUDE ET COMPARAISON DES PROPRIETES
ENANTIOSELECTIVES DE PLUSIEURS PHASES
STATIONNAIRES CHIRALES A BASE DE β -
CYCLODEXTRINE ET DE CELLULOSE PAR
CLHP**

I. Introduction

Durant les deux dernières décennies, la chromatographie chirale a évolué de telle manière, qu'elle devint la méthode la plus efficace et la plus puissante non seulement pour l'analyse des produits optiquement actifs, mais également pour leur obtention sous forme énantiomérique pure. Cet essor prodigieux est principalement dû au développement de nouvelles phases stationnaires chirales (PSCs) dotées d'un grand pouvoir énantio-discriminatoire ; ainsi, un très grand nombre de PSCs ont été synthétisées, dont plus d'une centaine sont actuellement commercialisées [1,2].

Les cyclodextrines (CDs) sont l'un des matériaux les plus utilisés dans la résolution de composés racémiques par chromatographie liquide, chromatographie en phase gazeuse et par électrophorèse capillaire [3-5]. Malgré la découverte de toute une série de cyclodextrines allant de la α - (6 unités glucoses) à la θ -CD (13 unités), il n'y a que les trois premières cyclodextrines de la série (α -, β - et γ -CDs) qui aient connue une large utilisation dans les domaines pharmaceutiques, agroalimentaires, analytiques...etc. [4,6].

En chromatographie liquide, la formation d'un complexe d'inclusion joue un rôle clé dans le mécanisme de reconnaissance chirale des CDs en mode inverse [3-8] ; par contre, en mode normal et organique polaire, le solvant organique de la phase mobile occupe la cavité hydrophobe de la cyclodextrine, la rendant inaccessible au soluté [8]. Afin de palier à cet inconvénient, plusieurs cyclodextrines dérivées avec des groupements aromatiques ont été préparées et utilisées efficacement en mode normal [9,10].

Les phases stationnaires chirales à base de β -CDs modifiées sont susceptibles d'introduire de nouvelles interactions de type π - π et polaire-polaire, conduisant à la forte rétention des solutés et subséquemment à l'achèvement de leur caractérisation chirale. Ainsi, nous avons recensé plusieurs travaux de recherches traitant de la fonctionnalisation de la CD avec des groupements phényl-carbamates [11-13], acétyl-carbamates [14], amino-méthyl-phényl-carbamates [15], 2,6-dinitro-4-trifluoro-méthyl-phényl éther [4] et dinitro-phényl-carbamates [16].

Hormis la nature du sélecteur chirale, le spacer qui relie le sélecteur au gel de silice, peut à son tour affecter d'une manière significative la reconnaissance chirale [17-18].

Liu et *al.* ont énuméré plusieurs problèmes rencontrés lors de l'utilisation des PSCs à base de β -CD préparées avec des spacers contenant des azotes. En effet, leur synthèse est ardue, elles sont instables et démontrent un faible pouvoir énantiosélectif [19]. Malgré l'importance des spacers ne contenant pas d'atome d'azote [20], rares sont les méthodes rapportées dans la littérature décrivant ce genre de PSCs [21–24].

Dans le présent travail, nous avons testé trois (3) phases stationnaires chirales à bases de β -cyclodextrine greffée à la silice via un spacer à base de chlorure d'undécénoyle (ne contenant pas d'atome d'azote) préparées par Tazerouti et al. [25]. Par la suite, nous avons comparé l'énantiosélectivité de ces 3 PSCs à d'autres phases stationnaires à base de cellulose citées dans la littérature et à une colonne commerciale Chiralcel OD-H [26]. Ainsi, l'étude de l'effet de la nature et de la longueur du spacer, la nature du sélecteur chiral, ainsi que l'effet de la nature du substituant du groupement aromatique a été menée afin de séparer une variété de produits optiquement actifs (produits pharmaceutiques, flavanone, herbicides ...). Nous avons également étudié l'influence de la nature et de la composition de la phase mobile sur le pouvoir énantiodiscriminatoire de ces phases stationnaires.

II. Partie expérimentale

II.1. Réactifs chimiques

Les solvants : n-heptane (n-Hept), 2-propanol (2-PrOH), chloroforme (CHCl_3), diéthylamine (DEA) et acide trifluoroacétique (TFA) sont tous de grade CLHP et ont été fournis par Fluka (Buchs, Suisse). Le soluté 11 a été fourni par Aldrich (Buchs, Switzerland), le soluté 10 ainsi que le silvex (solute 13) par Acros (Geel, Belgique) et le dichloroprop par Lancaster (Lancashire, Grande-Bretagne). L'haloxyfop-ethoxyethyl et le mecoprop (solutés 9 et 14) ont été offerts par Rhône-Poulenc (Sta Catalina La Victoria, Espagne) et Dow Elanco (Madrid, Espagne), respectivement.

Les flavonoïdes (la flavanone, la 4'-hydroxyflavanone, la 6-hydroxyflavanone, la 7-hydroxyflavanone, la 6-méthoxyflavanone, l'hespérétine, et la naringénine) ont été acquises auprès de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Tous les autres produits optiquement actifs ont été gracieusement offerts par le laboratoire de Chimie Pharmaceutique (Barcelone, Espagne), parmi ces composés certains se trouvent sous forme de mélanges racémiques pendant que d'autres sont énantio-enrichis.

II.2. Appareillage

Les trois phases stationnaires chirales à base de dérivés d'undécénoate/phénylcarbamate- β -CD ont été remplies dans des tubes en acier inoxydable (150×4.6 mm D.I.) par la méthode conventionnelle « suspension diluée » en utilisant un Chromatem/Haskel (Touzart & Matignon, France) [25,26]. La Chiralcel OD-H à base de tris(3,5-diméthylphénylcarbamate)cellulose (150×4.6 mm D.I.) a été fournie par Daicel Chemical Industries Ltd (Tokyo, Japan).

Les séparations chromatographiques ont été effectuées sur deux systèmes CLHP distincts. Le premier comprend une pompe SpectraSeries P200, un injecteur automatique AS 300, un détecteur spectrophotomètre UV 150 et un intégrateur Chromjet. Le second appareil est un système Perkin-Elmer Series 200 HPLC muni d'un détecteur à barrette de diodes (Perkin-Elmer, CT, USA), d'un injecteur Rhéodyne 7725i (20 μ L). Le traitement des données chromatographiques se faisait grâce au logiciel TurboScan 200 data.

II.3. Calculs chromatographiques

Le temps mort (t_0) a été mesuré pour chaque composition de phase mobile à l'aide du 1,3,5-tri-tert-butylbenzène (TTBB). Les facteurs de rétention (k) ont été obtenus en utilisant l'équation :

$$k = \frac{(tr - t_0)}{t_0}$$

Sachant que tr est le temps de rétention du soluté.

Le facteur de séparation ou de sélectivité (α) a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

Sachant que k_1 et k_2 correspondent aux facteurs de rétention du premier et du second énantiomère élué, respectivement.

Le facteur de résolution (R_s) a été calculé en appliquant la relation suivante :

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

Avec : tr_1 et tr_2 : Temps de rétention des deux énantiomères.

w_1 et w_2 : Largeurs à la base des pics des deux énantiomères.

III. Résultats et discussion

Trois sélecteurs chiraux ont été liés chimiquement à la silice à l'aide d'un spacer (le chlorure d'undécénoyle) [25,26] pour l'obtention des trois PSCs présentement testées ; il s'agit de : l'undécénoate/phényle-carbamate- β -CD (PSC A), l'undécénoate/méthyl-phényl-carbamate- β -CD (PSC B) et l'undécénoate/chloro-phényl-carbamate- β -CD (PSC C), le schéma de synthèse de ces PSCs est représenté sur la figure 1.

Nous nous sommes intéressés, en premier lieu, à l'étude de l'effet de la nature et de la longueur du spacer, pour cela nous avons comparé la PSC D (Figure 1), précédemment préparée et testée par Tazerouti et al. [12,25], à la PSC A. Ces deux sélecteurs ne diffèrent que par la nature du spacer utilisé (le 3-isocyanatopropyltriéthoxysiliane et le chlorure du 10-undécénoyle, respectivement) ; alors que les groupements hydroxyles restants de la β -CD sont modifiés par le même dérivé phénylcarbamate.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet de la nature du substituant du groupement phényle modifiant la CD. Ainsi, nous avons comparé les PSC A, B et C dont les phényles carbamates sont respectivement : non-substitués, substitués par un groupement méthyle ou alors par un atome de chlore.

Nous avons également comparé les PSCs A, B et C à leurs homologues à base de cellulose préparées par Oliveros et al. (Substituants des groupements phénylcarbamates : H : CSP 1; CH₃ : CSP 2; et Cl : CSP 3) [27]. Le procédé de synthèse est similaire à celui de nos trois PSCs A, B et C, avec les mêmes dérivés de phényle carbamate et le même spacer. Nous avons également testé la Chiralcel OD-H et évalué ses aptitudes énantio-séparatrices par rapport à nos phases stationnaires.

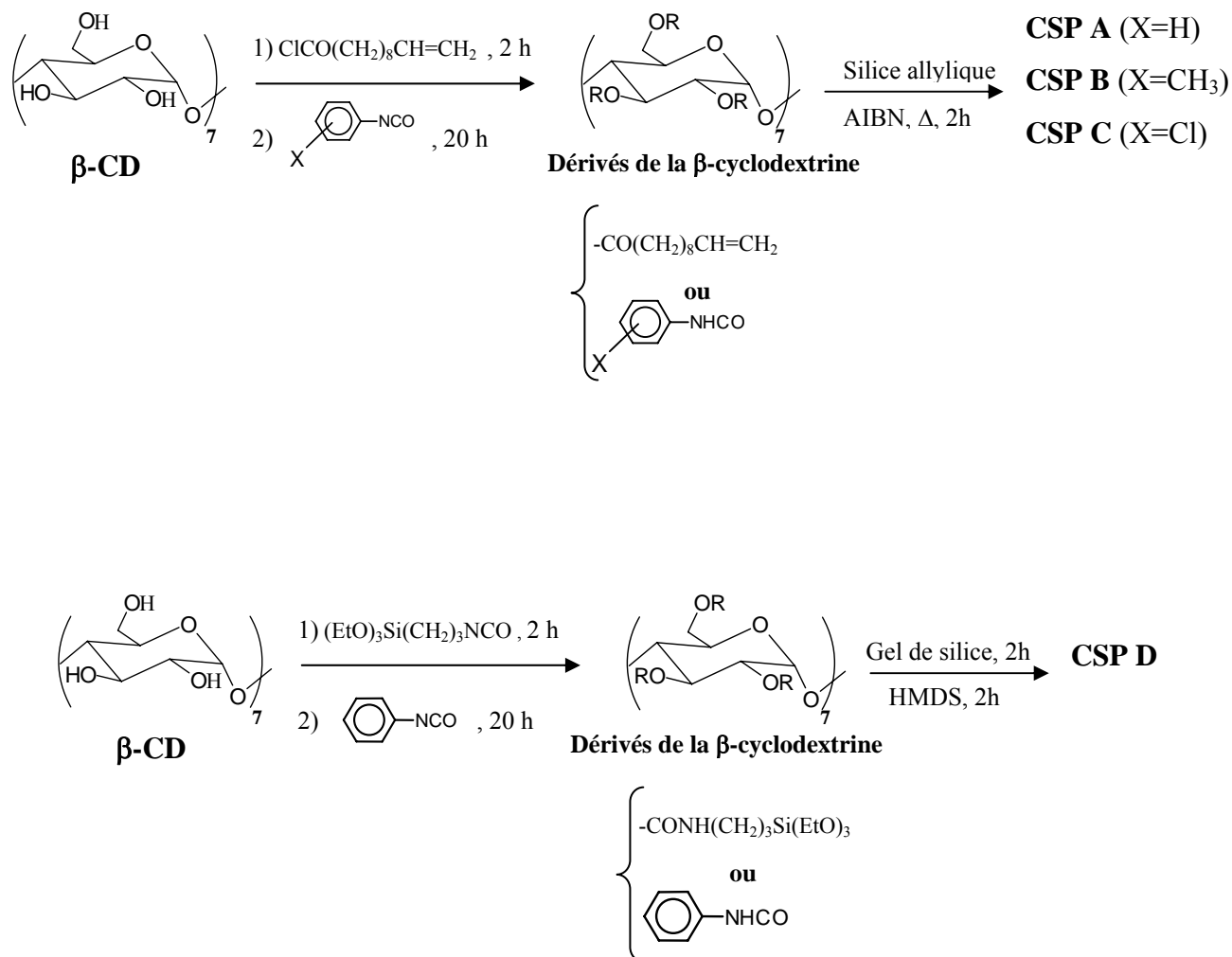


Figure 1 : Schéma de synthèse des PSCs à base de β -cyclodextrine testées [25,26]

Il est largement admis, que la cyclodextrine native est très efficace en mode inverse, dans ces conditions opératoires. Le mécanisme d'énantio-séparation implique la formation d'un complexe d'inclusion ; toutefois, ce type de PSC ne démontre aucune sélectivité chirale en mode normal [3,8]. D'un autre côté, les CDs dont les hydroxyles sont substitués par des groupements aromatiques et carbamates démontrent une grande capacité énantio-discriminatrice aussi bien en mode inverse qu'en mode normal, c'est ce qu'on appelle des PSCs multimodales [7,9].

En mode inverse, le test des PSCs A, B, C et D n'a démontré aucune sélectivité chirale vis-à-vis d'une large gamme de produits optiquement actifs, ceci peut être expliqué par la gêne stérique générée par les groupements aromatiques et carbamates sur le bord de la cavité de la CD ce qui semble inhiber la formation d'un complexe d'inclusion.

Par ailleurs, le test des 3 colonnes en mode normal a permis la résolution d'un grand nombre de produits optiquement actifs. La phase mobile utilisée est le mélange heptane/2-propanol (Tableau 1) et heptane/chloroforme (Tableau 2). Quelques chromatogrammes des séparations obtenues sont présentés sur la figure 2. Tous les résultats présentés ont été obtenus après optimisation des conditions chromatographiques pour chaque PSC.

III.1. Effet de la nature du spacer

Le spacer est une molécule qui lie le sélecteur chiral au gel de silice ; malgré sa nature achirale, il peut grandement influencer l'aptitude énantiosélective de la phase stationnaire chirale [28-30]. Suivant le type et la nature du sélecteur chiral, quelques PSCs favoriseront les spacers à courtes chaînes carbonées [31], pendant que d'autres favoriseront des spacers plus longs [32].

Toutefois, il a été clairement démontré que pour des sélecteurs chiraux à base de β -CD, les longs spacer ne contenant pas de groupements amines secondaires, seront bénéfiques en termes d'énantio-sélectivité. La raison invoquée est que les longs spacers affaiblissent l'effet des groupements silanols résiduels [20]. En effet, en plus des interactions chirales qui peuvent exister entre le soluté et le sélecteur chiral, il peut y avoir des réactions non stéréo-sélectives secondaires entre ce même soluté et les silanols résiduels, ce qui réduit les capacités énantio-discriminatrices de la PSC [8,9].

Tableau 1: Comparaison des résultats chromatographiques obtenus sur les PSCs à base de cyclodextrine et de cellulose.

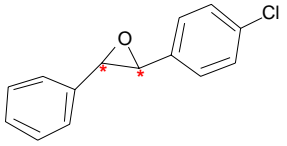
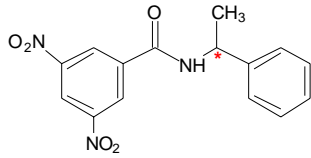
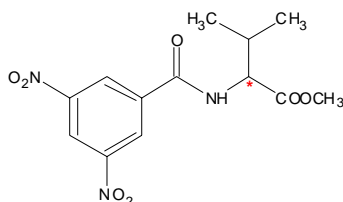
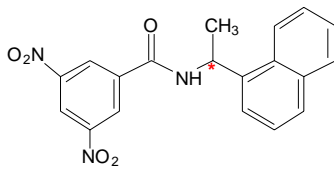
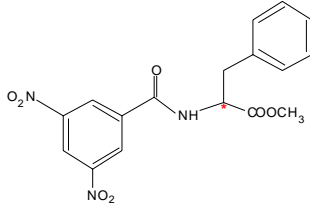
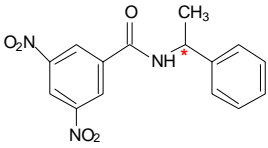
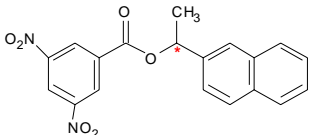
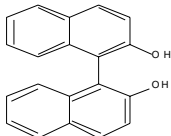
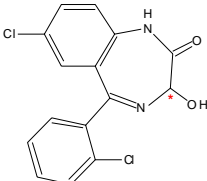
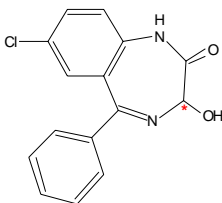
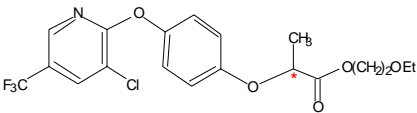
| Solutés | Colonne | k_1 | k_2 | α | Rs | Phase mobile ^a |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-------|-------|----------|-------|---------------------------|
|  <p>Soluté 1 : trans-2-phényl-3-(4-chlorophényl)-oxirane</p> | PSC A | 0.17 | 0.17 | 1.00 | 0.00 | 98/2 |
| | PSC B | 0.15 | 0.18 | 1.23 | 0.35 | 98/2 |
| | PSC C | 0.19 | 0.19 | 1.00 | 0.00 | 98/2 |
| | PSC D ^b | 0.19 | 0.31 | 1.62 | 1.49 | 80/20 |
| | PSC 1 ^c | 0.26 | 0.32 | 1.22 | - | 98/2 |
| | PSC 2 ^c | 0.29 | 0.44 | 1.52 | 0.96 | 98/2 |
| | PSC 3 ^c | 0.21 | 0.30 | 1.45 | 0.45 | 98/2 |
| Chiralcel OD-H | 2.27 | 2.79 | 1.23 | 2.34 | 98/2 | |
|  <p>Soluté 2 : N-(3,5-dinitrobenzoyl)-2-amino-méthyl-propanoate</p> | PSC A | 9.80 | 12.40 | 1.26 | 1.76 | 98/2 |
| | PSC B | 2.66 | 4.69 | 1.76 | 3.69 | 90/10 |
| | PSC C | 8.76 | 10.00 | 1.14 | 1.18 | 98/2 |
| | PSC D ^b | 1.89 | 2.06 | 1.09 | 0.99 | 80/20 |
| | PSC 1 ^c | 6.21 | 6.21 | 1.00 | 0.00 | 98/2 |
| | PSC 2 ^c | 6.60 | 6.60 | 1.11 | - | 98/2 |
| | PSC 3 ^c | 9.34 | 11.21 | 1.20 | 1.17 | 98/2 |
| Chiralcel OD-H | 11.20 | 11.20 | 1.00 | 0.00 | 80/20 | |
|  <p>Soluté 3 : N-(3,5-dinitrobenzoyl)-2-amino-3-méthyl-méthyl-butanoate</p> | PSC A | 3.54 | 4.75 | 1.34 | 1.56 | 98/2 |
| | PSC B | 4.81 | 6.97 | 1.45 | 3.05 | 98/2 |
| | PSC C | 2.14 | 2.36 | 1.10 | 0.80 | 98/2 |
| | PSC D ^b | 1.40 | 1.55 | 1.11 | 1.04 | 80/20 |
| | PSC 1 ^c | 6.79 | 7.54 | 1.11 | - | 90/10 |
| | PSC 2 ^c | 5.78 | 7.05 | 1.22 | 1.12 | 90/10 |
| | PSC 3 ^c | 6.38 | 6.38 | 1.00 | 0.00 | 90/10 |
| Chiralcel OD-H | 8.12 | 10.62 | 1.31 | 2.45 | 80/20 | |
|  <p>Soluté 4 : N-(3,5-dinitrobenzoyl)-1-(1-naphthyl)-éthanamine</p> | PSC A | 6.14 | 7.17 | 1.17 | 0.89 | 98/2 |
| | PSC B | 8.19 | 9.83 | 1.20 | 1.55 | 98/2 |
| | PSC C | 3.82 | 5.04 | 1.32 | 1.96 | 98/2 |
| | PSC D ^b | 1.24 | 1.50 | 1.21 | 1.72 | 80/20 |
| | PSC 1 ^c | 3.19 | 4.43 | 1.39 | - | 80/20 |
| | PSC 2 ^c | 4.64 | 5.66 | 1.22 | 0.80 | 80/20 |
| | PSC 3 ^c | 3.93 | 4.40 | 1.12 | - | 80/20 |
| Chiralcel OD-H | 10.10 | 10.10 | 1.00 | 0.00 | 80/20 | |
|  <p>Soluté 5 : N-(3,5-dinitrobenzoyl)-3-phényl-méthyl-propanoate</p> | PSC A | 9.37 | 12.3 | 1.31 | 1.33 | 98/2 |
| | PSC B | 12.94 | 22.2 | 1.71 | 2.79 | 98/2 |
| | PSC C | 4.59 | 4.59 | 1.00 | 0.00 | 98/2 |
| | PSC D ^b | 4.02 | 6.51 | 1.62 | 5.65 | 90/10 |
| | Chiralcel-OD H | 19.09 | 19.09 | 1.00 | 0.00 | 80/20 |

Tableau 1 : suite

| Solutés | Colonne | k_1 | k_2 | α | R_s | Phase mobile ^a |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-------|-------|----------|-------|---------------------------|
|  <p>Soluté 6 : N-(3,5-dinitrobenzoyl)-1-phényl-éthanamine</p> | PSC A | 8.48 | 11.3 | 1.33 | 1.60 | 98/2 |
| | PSC B | 12.15 | 19.9 | 1.63 | 3.00 | 98/2 |
| | PSC C | 4.10 | 5.45 | 1.33 | 2.19 | 98/2 |
| | PSC D ^b | 19.74 | 24.87 | 1.26 | 2.63 | 98/2 |
| | Chiralcel-OD H | 4.03 | 4.03 | 1.00 | 0.00 | 80/20 |
|  <p>Soluté 7 : O-(3,5-dinitrobenzoyl)-1-(2-naphthyl)-éthanol</p> | PSC A | 0.49 | 0.49 | 1.00 | 0.00 | 98/2 |
| | PSC B | 0.74 | 0.78 | 1.06 | 0.20 | 98/2 |
| | PSC C | 0.33 | 0.33 | 1.00 | 0.00 | 98/2 |
| | PSC D ^b | 1.43 | 1.56 | 1.09 | 0.73 | 98/2 |
| | Chiralcel-OD H | - | - | - | - | - |
|  <p>Soluté 8 : 1,1'-bi-2-naphtol</p> | PSC A | 1.62 | 1.77 | 1.09 | 0.56 | 98/2 |
| | PSC B | 1.33 | 1.49 | 1.12 | 0.84 | 98/2 |
| | PSC C | 1.30 | 1.38 | 1.06 | 0.22 | 98/2 |
| | PSC D ^b | 3.38 | 4.01 | 1.19 | 1.57 | 98/2 |
| | Chiralcel-OD H | 3.93 | 4.50 | 1.14 | 1.27 | 90/10 |
|  <p>Lorazepam</p> | PSC A | 24.85 | 24.85 | 1.00 | 0.00 | 98/2 |
| | PSC B | 4.47 | 6.24 | 1.39 | 1.36 | 90/10 |
| | PSC C | 4.26 | 4.26 | 1.00 | 0.00 | 90/10 |
| | PSC D ^b | 4.45 | 5.21 | 1.17 | 1.71 | 90/10 |
| | PSC 1 ^c | 3.35 | 9.04 | 2.70 | 1.48 | 80/20 |
| | PSC 2 ^c | 3.34 | 8.01 | 2.40 | 2.16 | 80/20 |
| | PSC 3 ^c | 8.45 | 12.00 | 1.42 | 1.11 | 80/20 |
| | Chiralcel-OD H | 9.30 | 14.28 | 1.53 | 3.75 | 90/10 |
|  <p>Oxazepam</p> | PSC A | 2.14 | 2.14 | 1.00 | 0.00 | 90/10 |
| | PSC B | 4.15 | 4.88 | 1.17 | 1.00 | 90/10 |
| | PSC C | 4.00 | 4.00 | 1.00 | 0.00 | 90/10 |
| | PSC D ^b | 4.13 | 4.96 | 1.20 | 1.94 | 90/10 |
| | PSC 1 ^c | 3.00 | 3.72 | 1.24 | - | 80/20 |
| | PSC 2 ^c | 3.08 | 3.80 | 1.23 | 0.81 | 80/20 |
| | PSC 3 ^c | 6.85 | 8.90 | 1.30 | 1.12 | 80/20 |
| | Chiralcel-OD H | 9.33 | 12.63 | 1.35 | 2.65 | 90/10 |
|  <p>Soluté 9 : Fluazifop-butyl</p> | PSC A | 0.69 | 0.69 | 1.00 | 0.00 | 98/2 |
| | PSC B | 0.77 | 0.88 | 1.14 | 0.81 | 98/2 |
| | PSC C | 0.61 | 0.61 | 1.00 | 0.00 | 98/2 |
| | PSC D ^b | 1.18 | 1.38 | 1.17 | 1.24 | 98/2 |
| | Chiralcel-OD H | 2.29 | 2.81 | 1.23 | 2.34 | 98/2 |

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

^b: 3-isocyanatopropyltriéthoxysilane/phénylcarbamate- β -CD [12]

^c: Dérivés de 10-undécénoate/phénylcarbamates cellulose [27]

Tableau 2: Résultats chromatographiques obtenus sur les 3 PSCs lors de l'utilisation du chloroforme comme modifiant organique

| Solutés | Colonne | k_1 | k_2 | α | Rs | Phase mobile ^a |
|------------------|---------|-------|-------|----------|------|---------------------------|
| 1 | PSC A | 2.86 | 3.17 | 1.11 | 0.90 | 95/05 |
| | PSC B | 1.26 | 1.75 | 1.38 | 2.93 | 95/05 |
| | PSC C | 1.87 | 2.16 | 1.16 | 1.40 | 95/05 |
| 2 | PSC A | 13.63 | 14.35 | 1.05 | 0.30 | 75/25 |
| | PSC B | 14.68 | 16.6 | 1.13 | 1.71 | 75/25 |
| | PSC C | 12.43 | 12.43 | 1.00 | 0.00 | 75/25 |
| 3 | PSC A | 7.28 | 7.28 | 1.00 | 0.00 | 75/25 |
| | PSC B | 4.78 | 5.15 | 1.10 | 0.91 | 75/25 |
| | PSC C | 3.18 | 3.5 | 1.10 | - | 75/25 |
| 4 | PSC A | 6.41 | 6.85 | 1.07 | 0.41 | 75/25 |
| | PSC B | 6.95 | 7.70 | 1.11 | 1.31 | 75/25 |
| | PSC C | 4.76 | 5.30 | 1.11 | 1.20 | 75/25 |
| 5 | PSC A | 5.59 | 5.59 | 1.00 | 0.00 | 75/25 |
| | PSC B | 7.76 | 8.68 | 1.12 | 2.00 | 75/25 |
| | PSC C | 4.85 | 4.85 | 1.00 | 0.00 | 75/25 |
| 6 | PSC A | 7.72 | 8.84 | 1.14 | 1.34 | 75/25 |
| | PSC B | 9.45 | 12.4 | 1.31 | 2.88 | 75/25 |
| | PSC C | 6.05 | 6.94 | 1.15 | 2.00 | 75/25 |
| 7 | PSC A | 1.19 | 1.19 | 1.00 | 0.00 | 90/10 |
| | PSC B | 1.69 | 1.75 | 1.04 | 0.20 | 90/10 |
| | PSC C | 0.81 | 0.81 | 1.00 | 0.00 | 90/10 |
| 8 | PSC A | 7.58 | 8.36 | 1.10 | 0.35 | 90/10 |
| | PSC B | 2.06 | 2.21 | 1.07 | 0.58 | 75/25 |
| | PSC C | 1.85 | 1.94 | 1.05 | - | 75/25 |
| 9 | PSC A | 1.13 | 1.13 | 1.00 | 0.00 | 90/10 |
| | PSC B | 7.35 | 7.35 | 1.00 | 0.00 | 90/10 |
| | PSC C | 3.35 | 3.35 | 1.00 | 0.00 | 90/10 |
| Lorazepam | PSC A | 3.80 | 3.80 | 1.00 | 0.00 | 25/75 |
| | PSC B | 12.14 | 13.70 | 1.13 | 1.33 | 50/50 |
| | PSC C | 8.59 | 8.59 | 1.00 | 0.00 | 50/50 |
| Oxazepam | PSC A | 3.28 | 3.28 | 1.00 | 0.00 | 25/75 |
| | PSC B | 11.09 | 12 | 1.07 | 1.25 | 50/50 |
| | PSC C | 7.95 | 8.42 | 1.06 | 0.28 | 50/50 |

^a: n-heptane/chloroforme, 1 mL min⁻¹, $\lambda_{254\text{ nm}}$.

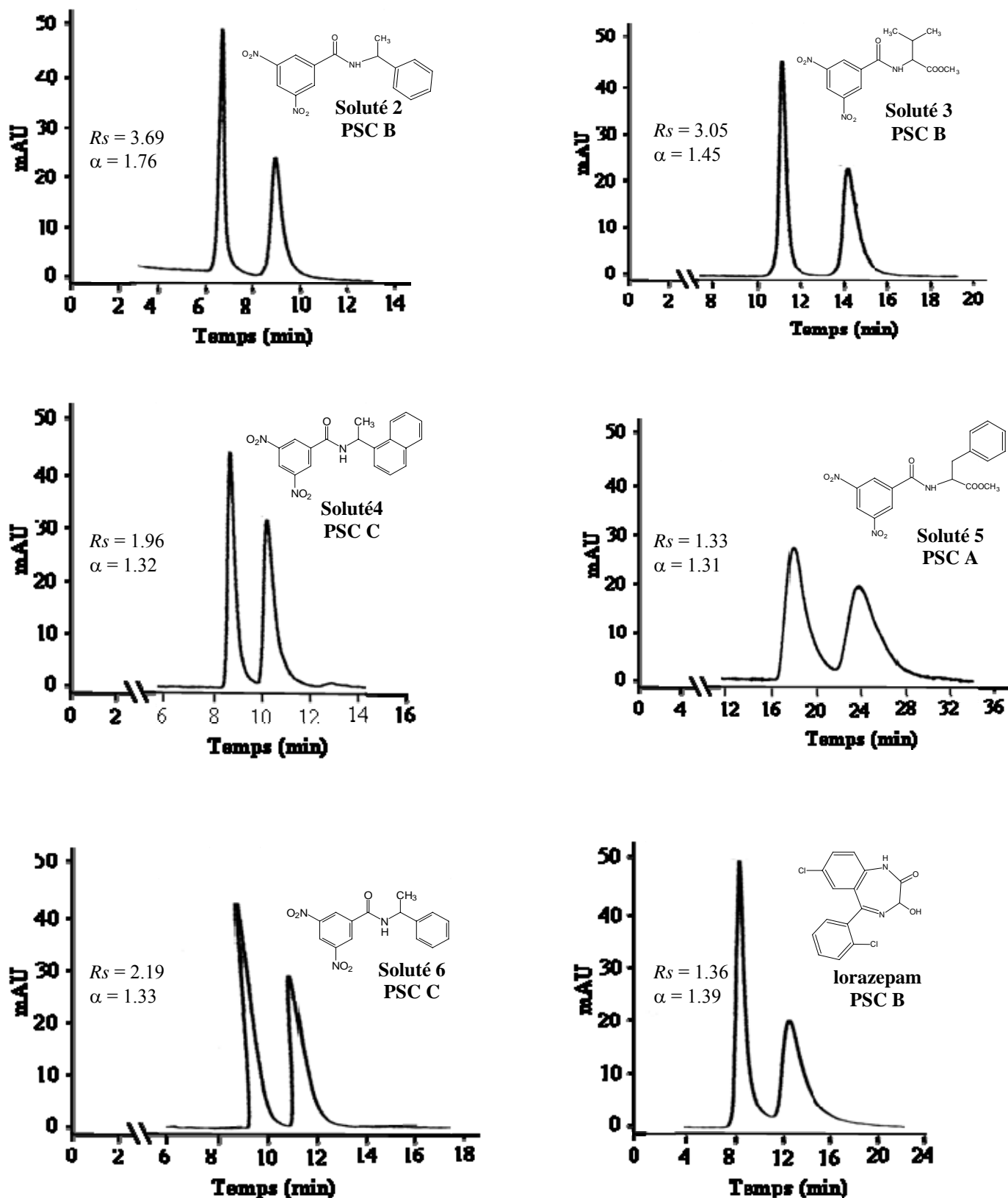


Figure 2 : Quelques chromatogrammes des séparations chirales obtenues sur les PSC A, B et C. (voir conditions expérimentales sur le tableau 1)

Afin d'outrepasser ces inconvénients, Chen et *al.* ont suggéré quelques approches très intéressantes qui consistent à utiliser un long spacer, recourir au end-capping durant l'étape finale de la synthèse et l'ajout d'un modifiant organique à la phase mobile afin de masquer l'influence de ces groupements silanols [33]. Dans la présente étude, nous avons utilisé ces trois approches afin d'améliorer les capacités énantio-sélectives des PSCs A, B et C.

Tel que nous l'avons expliqué au début de cette partie, l'étude de l'effet du spacer se fera par la comparaison de la PSC A dont le spacer contient 12 groupements méthylène avec la PSC D dont le spacer contient 3 groupements méthylène. Sur le tableau 1, nous pouvons voir que les temps de rétention obtenus lors de l'utilisation de la colonne D sont, à quelques exceptions près, largement supérieurs à ceux obtenus lors de l'utilisation des undécénoyles/phénylcarbamate- β -CD.

Les résultats chromatographiques obtenus indiquent également une certaine complémentarité entre les deux phases, en effet les solutés faiblement résolus sur la PSC D, sont bien séparés sur la PSC A et vice-versa. A titre d'exemple, nous pouvons citer les composés portant le groupement 3,5-dinitrobenzoyl (solutés 2 et 3) qui sont beaucoup mieux séparés sur l'undécénoate/phénylcarbamate- β -CD PSC (colonne A) que sur le même dérivé aromatique de la cyclodextrine lié à la silice par un spacer relativement court spacer (3-isocyanatopropyltriéthoxysilane) (colonne D). Néanmoins, tous les autres solutés sont mieux séparés sur la PSC D. Ce qui implique la performance de cette phase par rapport à la PSC A.

Nous pouvons expliquer ce cas de figure par le fait que les longs spacers sont susceptibles d'offrir au sélecteur chiral une plus grande flexibilité et distorsion ce qui pourrait gêner stériquement l'éntiodiscrimination. Nous pouvons ainsi stipuler que l'éntio-sélectivité dépend aussi bien des interactions chirales que des interactions achirales ; toutefois, une trop large contribution des interactions non-stéréo-sélectives diminue le pouvoir énantio-discriminatoire du sélecteur chiral [34].

III.2. Impact de la nature du substituant du cycle aromatique du dérivé de la β -CD sur la reconnaissance chirale

La seule différence existant entre les 3 PSCs A, B et C réside dans le substituant en position para du cycle aromatique du dérivé phénylcarbamate modifiant la CD (H pour la PSC A, CH₃ pour la PSC B et Cl pour la PSC C); toutefois, les résultats chromatographiques présentés sur les tableaux 1 et 2 illustrent parfaitement le grand impact de ce substituant sur la résolution chirale [35].

Ainsi, nous pouvons observer que la PSC A et C ont le domaine d'application le plus restreint; en effet, ces deux colonnes n'ont séparé que la moitié des produits neutres injectés; par contre, la colonne B a permis la séparation de tous les solutés neutres testés avec d'excellentes résolutions, notamment pour les solutés 2, 3, 5 et 6. Ceci démontre l'efficacité et le grand pouvoir énantio-discriminatoire de ce sélecteur chirale.

Il est très intéressant de noter qu'un ordre similaire d'efficacité a été observé par Oliveros et *al.* lors du test des trois colonnes cellulosiques substituées par le même type de groupement aromatique (H : PSC 1, CH₃ : PSC 2 et Cl : PSC 3) [27]. Ainsi, nous pouvons affirmer que le groupement méthyle et l'atome de chlore (avec un effet moindre), semblent jouer un rôle déterminant dans le mécanisme de caractérisation chirale et cela en contribuant à la formation d'un des trois points d'interaction entre le soluté et le sélecteur, en effet, ces trois points d'attache sont nécessaires pour l'achèvement de la reconnaissance chirale en mode normal [7].

Le mécanisme exact des interactions mises en jeu durant la reconnaissance chirale en mode normal est toujours obscur. Néanmoins, nous pouvons supposer que le solvant apolaire (heptane) occupe la cavité hydrophobe de la CD [7,16,36]. Subséquemment, le mécanisme de séparation chirale dans ce mode est probablement dû à la formation d'un complexe diastéréomérique entre le soluté et la phase stationnaire, et cela grâce aux liaisons hydrogènes, interactions de type π - π et dipôle-dipôle. Ces types d'interactions sont effectivement plus probables et plus fortes lorsque la β -CD est modifiée avec des groupements phénylcarbammates [9,16].

III.3. Effet de la structure chimique du soluté sur le mécanisme de résolution chirale

Il apparaît clairement à partir du tableau 1, que les meilleures séparations ont été obtenues pour les solutés 2-6, avec des résolutions autour de 3.00 lors de l'utilisation de la colonne B. Tous ces composés contiennent le groupement 3,5-dinitrobenzoylé qui semble être prédisposé à former de très fortes interactions π - π avec les groupements phénylcarbamates de la PSC ; pendant que les groupements carbamates de ces mêmes solutés interagissent tout aussi fortement avec ceux du sélecteur chirale grâce à des liaisons hydrogènes et à des interactions de type dipôle-dipôle.

Concernant le soluté 7, malgré la présence du groupement 3,5-dinitrobenzoylé, une faible résolution a été obtenue lors de sa séparation sur les PSCs B et D alors qu'aucune séparation n'a pu être achevée sur les colonnes A et C, ceci peut être expliqué par la présence d'une fonction ester à la place de la fonction carbamate des solutés 2-6 ; en effet, les carbamates peuvent générer de fortes liaisons hydrogènes, par conséquent, nous pouvons présumer que l'atome d'azote des solutés 2-6 contribue à la formation d'un des trois points d'attache nécessaire pour l'accomplissement de la caractérisation chirale [36].

Nous pouvons également noter que lorsque le groupement méthyle du centre stéréogénique du soluté 2 est substitué par un groupement plus volumineux, tel que l'isopropyle (soluté 3) ou benzyle (soluté 5), la résolution est fortement diminuée. La même observation peut être faite pour le soluté 2 dont le groupement COOCH_3 est remplacé par un autre plus encombrant tel qu'un naphthyle (soluté 4) ou un phényle (soluté 6). Ce phénomène peut être aisément expliqué par le fait qu'une gêne stérique au voisinage du centre stéréogénique inhibe les interactions stéréo-sélectives, ce qui défavorise la résolution chirale.

III.4. Effet de la nature et de la quantité du modifiant organique

La littérature a démontré intelligiblement l'effet négatif de l'augmentation du ratio du modifiant organique dans la phase mobile sur la résolution chirale [8,9,36,37]. En effet, sur la figure 3, nous pouvons voir que la résolution est fortement diminuée lorsqu'on augmente le pourcentage d'alcool dans la phase mobile ; néanmoins, la sélectivité est faiblement affectée par ce paramètre [38,39]. Ce comportement peut être dû au fait que l'alcool entre en compétition avec le soluté pour la formation de liaisons hydrogène avec

les sites actifs de la PSC, ce qui minimise les opportunités de formation d'un complexe diastéréomérique entre le soluté et le sélecteur chiral.

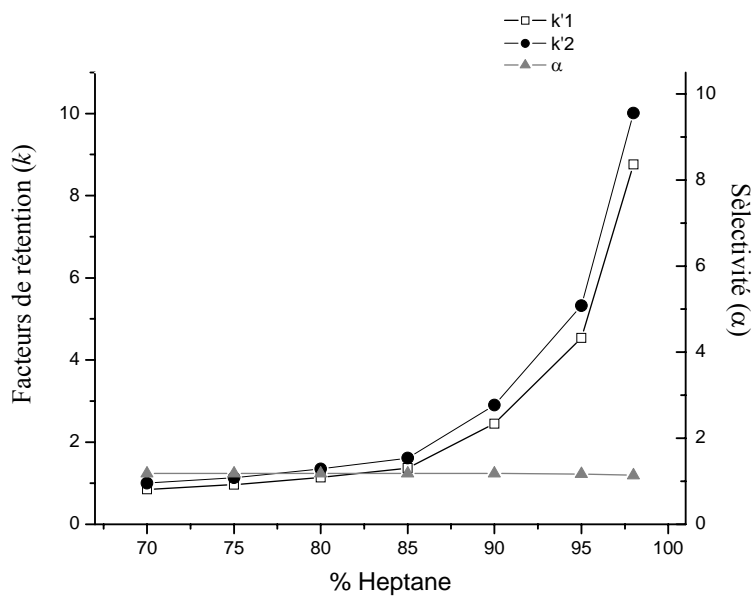
Sur le tableau 2, nous pouvons apprécier les résultats obtenus lors de l'utilisation du chloroforme comme modifiant organique. Nous avons en effet obtenu quelques intéressantes variations de la sélectivité de nos PSCs lors du changement du modifiant organique. Ainsi, d'une manière générale, le mélange heptane/chloroforme agit de manière défavorable sur l'énantio-sélectivité de nos colonnes, et cela malgré la forte rétention des solutés sous ces conditions opératoires.

Ce dernier phénomène peut être expliqué par les fortes interactions mises en jeu entre le 2-PrOH et les groupements polaires du sélecteur chiral, contrairement au chloroforme, ce qui induit une faible rétention de la majorité des solutés sans toutefois affecter leur énantio-séparation [12].

En comparant les résultats présentés sur les tableaux 1 et 2, nous pouvons voir que, d'une manière générale, les solutés qui sont bien résolus lors de l'utilisation de l'isopropanol le sont également avec le mélange heptane/chloroforme ; cependant, le nombre de produits optiquement actifs séparés diminue avec cette dernière phase mobile. Ce comportement a également été observé avec les PSCs à base de cellulose [27]. La figure 4 nous donne l'opportunité d'apprécier une exception à cette dernière constatation; en effet, le soluté 1 est mieux résolu sur la PSC B lors de l'utilisation du chloroforme comme modifiant organique.

Durant cette étude, la PSC C (10-undécénoate/4-chlorophénylcarbamate β -CD) s'est totalement singularisée en séparant les énantiomères du soluté 1 et de l'oxazepam uniquement lors de l'utilisation du chloroforme comme solvant organique. Ce qui implique un élargissement du domaine d'application de cette colonne. La PSC 3 qui est l'homologue cellulosique de la PSC C a eu un comportement similaire sous les mêmes conditions de phases mobile [27]. Nous pouvons ainsi noter la complémentarité de ces deux types de phases mobile.

A)



B)

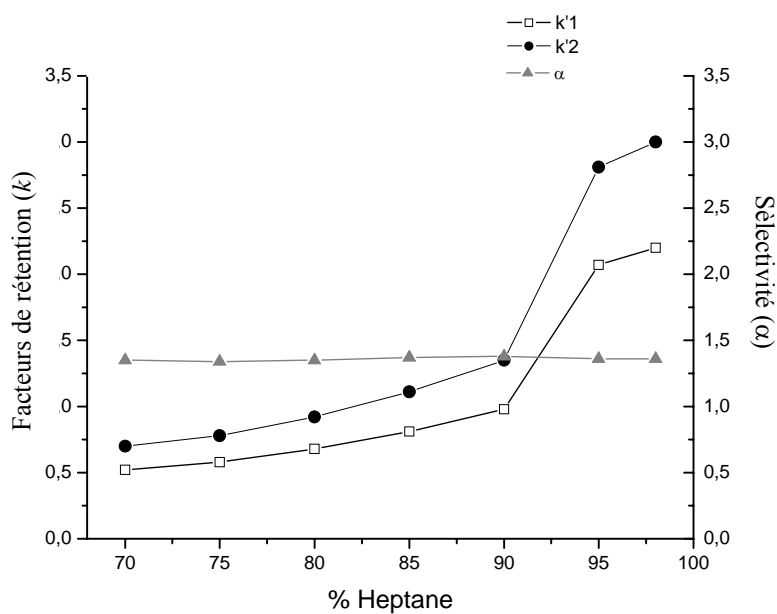


Figure 3: Effet de la composition de la phase mobile sur la rétention et résolution chirale du soluté 2 (A) et du soluté 4 (B). (PSC C, phase mobile: heptane/2-PrOH, débit: 1 mL min⁻¹, λ_{254} nm).

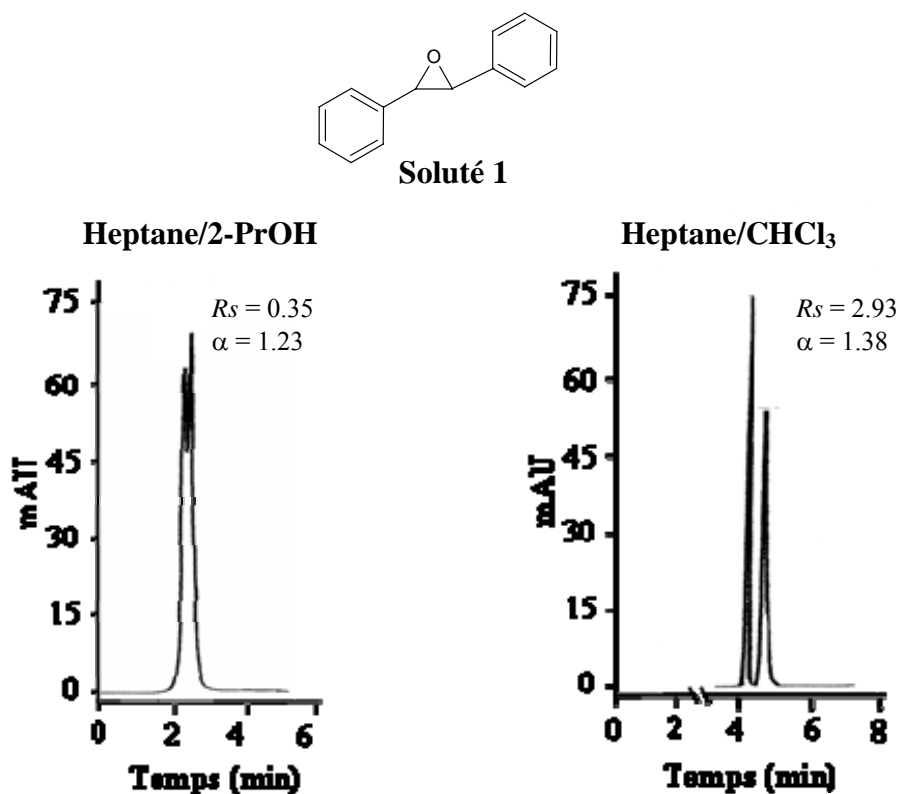


Figure 4: Effet de la nature du modifiant organique sur la résolution chirale du soluté 1 (PSC B, heptane/2-PrOH: 98/2, heptane/chloroforme: 95/5, 1 mL min⁻¹, $\lambda_{254 \text{ nm}}$)

Un autre phénomène qui nous paraît tout aussi intéressant, consiste en la perte de résolution du soluté 8 sur les PSC B et C lors de la diminution du pourcentage de chloroforme dans la phase mobile ; cette observation va à l'encontre de ce qui a été observé lors de l'enrichissement de la phase mobile en 2-PrOH pour ce même soluté et avec ces mêmes sélecteurs chiraux.

III.5. Séparation chirale des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et de quelques herbicides acides

L'élution et éventuellement la résolution chirale d'une certaine classe de composés chiraux en mode normal, nécessite l'ajout de modifiant à la phase mobile. Ces modifiants dépendent de la nature du composé analysé, ils peuvent être cationiques (le diéthylamine pour les composés basiques tels que les produits pharmaceutiques contenant des groupements amines) ou alors anioniques (l'acide trifluoroacétique pour les composés acides

tels que les anti-inflammatoires non stéroïdiens et les herbicides acides) [40]. De plus, le TFA est bien connu pour supprimer l'étalement des pics et diminuer la rétention des composés acide [41].

Les résultats optimaux obtenus avec une phase mobile constituée du mélange d'heptane/2-PrOH/TFA sont présentés sur la figure 5. Ainsi, nous pouvons voir que la PSC A n'a permis la résolution d'aucun composé acides à l'exception du naproxène, pendant que la colonne C a permis la séparation, mais pas toujours avec les meilleures facteurs de sélectivité, de tous les composés acide hormis un herbicide : le silvex (soluté 13).

La PSC B quant à elle, nous a permis d'atteindre d'excellentes sélectivités pour tous les composés acides, à l'exception du kétoprofène qui n'a pu être séparé que sur la colonne C. Parmi tout les AINS testés, le naproxène a toujours été le mieux séparé, et cela quelque soit le sélecteur chiral utilisé. Ceci est probablement dû à la présence du groupement naphthyle qui favorise les interactions de type π - π entre ce soluté et la PSC.

Concernant les colonnes B et C, la meilleure sélectivité pour les herbicides a été obtenue pour le silvex (soluté 13). Ce dernier est l'herbicide qui porte le plus grand nombre de chlore, ce qui favoriserait la formation de liaison hydrogène (importante interaction pour la formation du complexe diastéréomérique entre le soluté et la PSC) [26].

A partir de la figure 5, nous pouvons également noter que nos colonnes à base de CD, en particulier la B et la C, semblent avoir un plus grand pouvoir énantio-sélectif vis-à-vis des produits acides testés par rapport à la colonne commercial à base de cellulose (Chiralcel-OD H).

Un important phénomène a été également noté, il s'agit de la grande stabilité des PSCs à base de 10-undécénoate- β -CD par rapport à la PSC D dont le spacer est le 3-isocyanatopropyltriéthoxysilane. En effet, cette dernière a complètement perdu son énantio-sélectivité lors de l'utilisation de l'éluant constitué d'un mélange heptane, chloroforme et TFA.

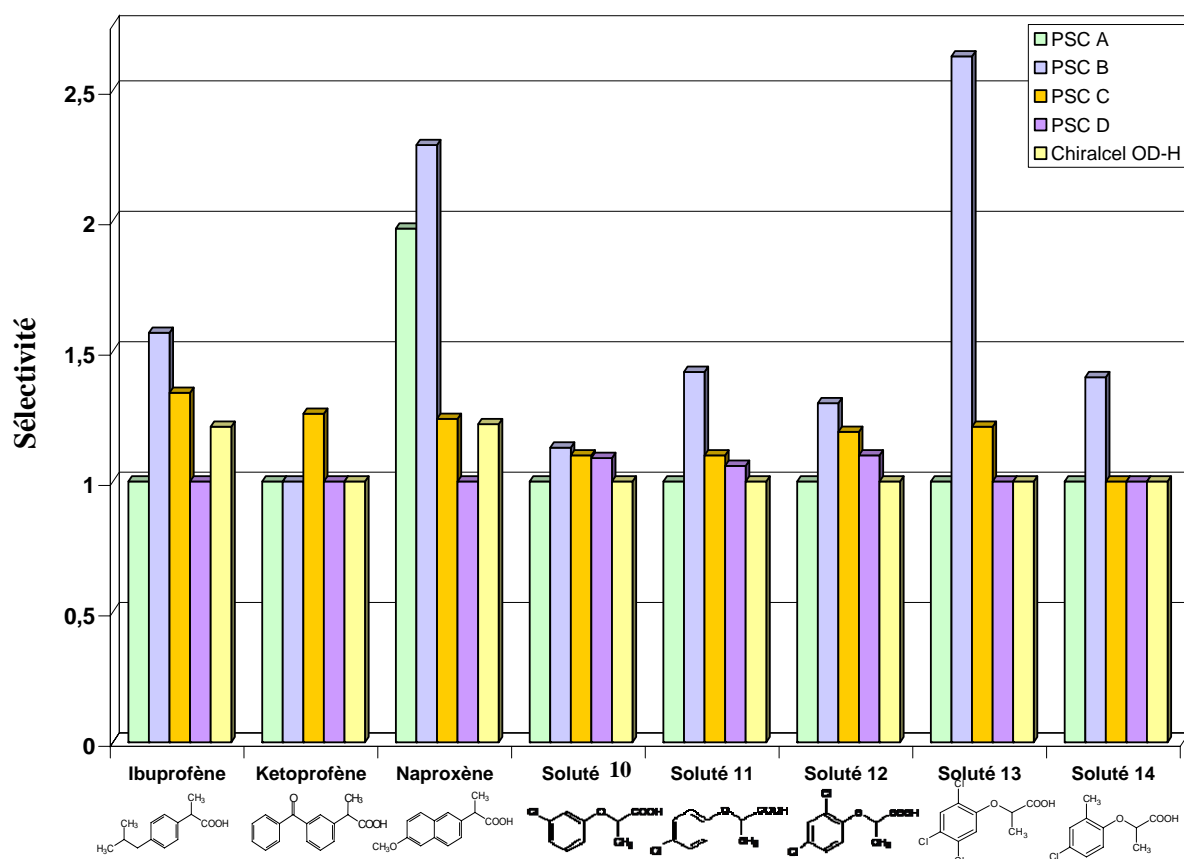


Figure 5: Comparaison des sélectivités (α) observées pour différentes PSCs vis-à-vis de la séparation chirale des composés acides.

(PSC A, B, C et D : heptane/2-propanol/TFA, 98/2/0.5%; débit, 0.5 mL min⁻¹.)

Chiralcel OD-H: heptane/2-propanol/TFA, 90/10/0.1%; débit, 1 mL min⁻¹)

III.6. Séparation chirale des flavanones

Les flavanones sont des polyphénols chiraux répandus dans le règne végétal. Leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives [42].

Les résultats chromatographiques optimaux obtenus lors de la séparation de quelques flavanones sur les colonnes A, B et C ainsi que sur la chiralcel OD-H sont présentés sur le tableau 3. La figure 6 illustre quelques exemples de chromatogrammes obtenus.

Hormis l'excellente résolution obtenue pour l'hespérétine ($R_s = 2.65$), la PSC A s'est avérée être la moins efficace pour la séparation chirale de cette famille de produits naturels. Par contre la colonne C a permis la séparation de la grande majorité des flavanones, et s'est même montrée plus efficace que la cellulose pour la séparation de plusieurs flavonoïdes tels que la 7-hydroxyflavanone, 4'-hydroxyflavanone ainsi que l'hespérétine.

Nous pouvons également noter que les flavanones substituées sont plus retenues que la flavanone, cependant, l'influence des groupements hydroxyles et méthoxy dépend de leur position sur les cycles aromatiques. En effet, indépendamment de la PSC étudiée mais pour une même composition de phase mobile, nous pouvons voir que les 7- et 4'-hydroxyflavanones sont plus retenues que la 6-hydroxyflavanone.

D'un autre côté, si nous comparons les séparations chirales obtenues pour la 6-hydroxyflavanone et la 6-méthoxyflavanone, nous pouvons voir que la substitution du groupement hydroxyle par un groupement méthoxy en position 6 est très bénéfique pour la sélectivité chirale bien que la rétention ait diminué. Le même constat peut être fait lorsqu'on compare la résolution de l'hespérétine à celle de la naringénine, en effet la présence d'un groupement méthoxy en position 6 dans l'hespérétine explique sa meilleure résolution par rapport à la naringénine. Ainsi, nous pouvons constater que les groupements en position (6-) de la structure chimique des flavanones semblent participer à la réalisation des trois points d'interactions nécessaires pour que la discrimination chirale puisse s'effectuer [8,9]. Nous pouvons expliquer ce phénomène par le fait que les liaisons hydrogènes formées entre les groupements hydroxyls des flavanones et les fonctions carbamates des PSCs sont d'une part trop fortes (ce qui explique la forte rétention de la 6-hydroxyflavanone par rapport à la 6-méthoxyflavanone), et d'autre part elles semblent gêner le mécanisme de caractérisation chirale (interactions non stéréo-sélectives).

Nous pouvons également noter que la 4'-hydroxyflavanone, l'hespérétine et la naringénine sont les seuls produits séparés sur toute les phases stationnaires testées, ce qui souligne l'importance de la substitution du cycle phényle du squelette de base des flavanones en position 4' vu que ce dernier est directement lié au centre stéréogénique.

A partir du tableau 3, nous pouvons constater que la Chiralcel OD-H donne de meilleures résolutions pour toutes les flavanones testées hormis la 4'-hydroxyflavanone et l'hespéretine et cela malgré leur forte rétention. Ceci pourrait démontrer la différence du mécanisme de la reconnaissance chirale entre la forme hélicoïdale de la cellulose et la cavité de la cyclodextrine.

Tableau 3 : Résultats chromatographiques obtenus pour la séparation chirale des flavanones

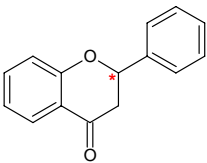
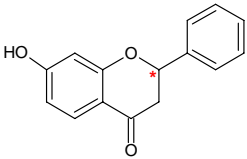
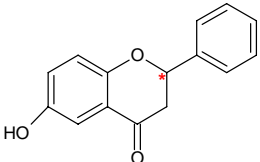
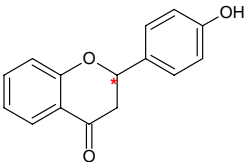
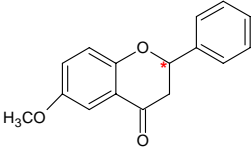
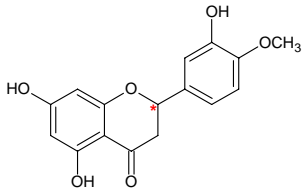
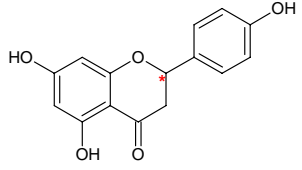
| Composés | PSC | k_1 | k_2 | α | R_s | Phase mobile ^a |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-------|-------|----------|-------|---------------------------|
|  Flavanone | PSC A | 0.23 | 0.23 | 1.00 | 0.00 | 98/02 |
| | PSC B | 0.52 | 0.52 | 1.00 | 0.00 | 98/02 |
| | PSC C | 0.45 | 0.62 | 1.37 | 0.85 | 98/02 |
| | Chiralcel-OD H | 3.02 | 4.11 | 1.36 | 4.21 | 98/02 |
|  7-hydroxyflavanone | PSC A | 2.56 | 2.56 | 1.00 | 0.00 | 98/02 |
| | PSC B | 4.14 | 4.14 | 1.00 | 0.00 | 98/02 |
| | PSC C | 3.12 | 3.63 | 1.16 | 0.45 | 98/02 |
| | Chiralcel-OD H | 27.41 | 29.17 | 1.07 | 0.25 | 98/02 |
|  6-hydroxyflavanone | PSC A | 0.75 | 0.75 | 1.00 | 0.00 | 98/02 |
| | PSC B | 1.37 | 1.37 | 1.00 | 0.00 | 98/02 |
| | PSC C | 1.05 | 1.05 | 1.00 | 0.00 | 98/02 |
| | Chiralcel-OD H | 11.65 | 13.38 | 1.15 | 1.54 | 98/02 |
|  4'-hydroxyflavanone | PSC A | 2.69 | 3.22 | 1.19 | 0.40 | 98/02 |
| | PSC B | 3.51 | 4.36 | 1.24 | 1.08 | 98/02 |
| | PSC C | 5.32 | 8.57 | 1.61 | 2.02 | 98/02 |
| | Chiralcel-OD H | 37.8 | 41.12 | 1.09 | 1.19 | 98/02 |
|  6-méthoxyflavanone | PSC A | 0.27 | 0.27 | 1.00 | 0.00 | 98/02 |
| | PSC B | 0.36 | 0.36 | 1.00 | 0.00 | 98/02 |
| | PSC C | 0.67 | 0.91 | 1.36 | 1.07 | 98/02 |
| | Chiralcel-OD H | 3.82 | 4.79 | 1.25 | 2.84 | 98/02 |

Tableau 3 : (suite)

| Composés | PSC | k_1 | k_2 | α | Rs | Phase mobile ^a |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-------|-------|----------|------|---------------------------|
|  Hespérétine | PSC A | 10.55 | 17.38 | 1.65 | 2.65 | 98/02 |
| | PSC B | 6.46 | 8.76 | 1.36 | 1.88 | 95/05 |
| | PSC C | 3.91 | 6.80 | 1.74 | 2.67 | 95/05 |
| | Chiralcel-OD H | 22.07 | 25.19 | 1.14 | 1.25 | 90/10 |
|  Naringénine | PSC A | 9.48 | 11.49 | 1.21 | 0.37 | 98/02 |
| | PSC B | 3.58 | 4.43 | 1.24 | 1.04 | 95/05 |
| | PSC C | 10.31 | 14.59 | 1.41 | 1.33 | 98/02 |
| | Chiralcel-OD H | 10.62 | 13.83 | 1.30 | 1.95 | 90/10 |

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

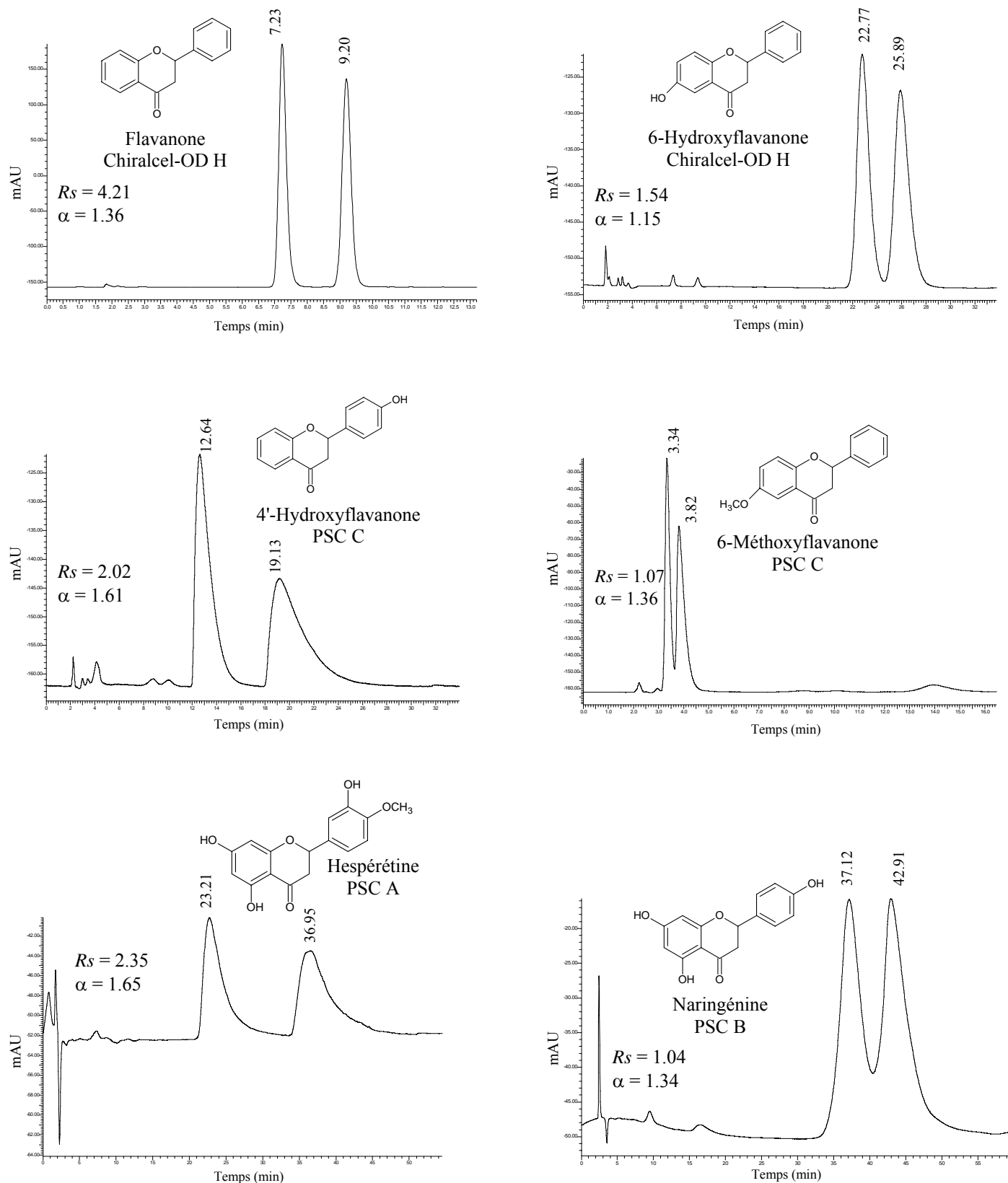


Figure 6 : Quelques chromatogrammes des flavanones énantio-séparées sur les PSCs A, B et C ainsi que sur la Chiralcel-OD H. (voir conditions expérimentales sur le tableau 3).

IV. Conclusion

Le test de trois phases stationnaires à base de 10-undécénoate/phénylcarbamate- β -CD a permis la séparation chirale de plusieurs produits racémiques, de produits pharmaceutiques, d'herbicides et de flavanones. Ces colonnes se sont montrées très efficaces en mode normal dont le mécanisme de caractérisation chirale semble être dû à la formation d'un complexe diastéréomérique entre le soluté et le sélecteur chirale.

La comparaison des trois colonnes 10-undécénoates/phénylcarabamates- β -CD avec une autre phénylcarabamates- β -CD PSC a démontré l'effet indéniable du spacer sur la sélectivité chirale de nos phases ; par ailleurs, nous avons aussi noter une certaine complémentarité entre elles.

L'importance de la nature du substituant en position para du groupement aromatique de la β -CD a été établie, en effet les trois colonnes ont démontré des sélectivités totalement différentes mais complémentaires. Ainsi, la colonne B (10-undécénoate/CH₃-phénylcarbamate- β -CD) s'est montrée plus efficace pour les produits racémiques neutres, les produits pharmaceutiques acides ainsi que les herbicides acides, pendant que la colonne C a permis l'obtention de résultats satisfaisants lors de la séparation chirale des flavanones.

Nous avons également démontré que la nature et la composition de la phase mobile ont un rôle prédominant lors du processus de discrimination chirale. D'un autre coté, nous avons discuté l'effet de la structure chimique des solutés injectés. Ainsi n'importe quel changement structural mineur que ce soit au niveau de l'éluent ou du soluté, peut affecter de manière radicale la résolution chirale.

Il serait intéressant de noter la complémentarité observée entre les trois PSCs 10-undécénoates/phénylcarabamates- β -CD et la colonne commercial à base de cellulose Chiralcel OD-H, notamment lors de la séparation des flavanones.

V. Références bibliographiques

- [1] G. Gübitz, M.G. Schmid. Dans: G. Gübitz, M.G. Schmid (eds). Chiral separations: methods and protocols. Humana Press Totowa, NJ, 2004.
- [2] N.M. Maier, W. Lindner. Dans: E. Francotte, W. Lindner (eds). Chirality in Drug Research, Wiley-VCH, Weinheim, 2006.
- [3] D.W. Armstrong. Dans: H.J. Issaq (ed). A century of separation science. Marcel Dekker, New York, 2002.
- [4] Q. Zhong, L. He, T.E. Beesley, W.S. Trahanovsky, P. Sun, C. Wang, D.W. Armstrong, Chromatographia 64 (2006)147.
- [5] Y. Cheng, L. Fan, H. Chen, X. Chen, Z. Hu, J. Chromatogr. A 1072 (2005) 259.
- [6] D.W. Armstrong, W. DeMond, J. Chromatogr. Sci. 22 (1984) 411.
- [7] C.R. Mitchell, D.W. Armstrong. Dans: G. Gübitz, M.G. Schmid (eds). Chiral separations: methods and protocols. Humana Press Totowa, NJ, 2004.
- [8] K. Si-Ahmed, F. Tazerouti, A.Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B.Y. Meklati, Chromatographia 62 (2005) 571.
- [9] K. Si-Ahmed, F. Tazerouti, A.Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B.Y. Meklati, J. Sep. Sci. 30 (2007) 2025.
- [10] C. Cachau, A. Thienpont, M.-H. Soulard, G. Félix, Chromatographia 44 (1997) 411.
- [11] K. Nakamura, H. Fujima, H. Kitagawa, H. Wada, K. Makino, J. Chromatogr. 694 (1995) 111.
- [12] F. Tazerouti, A.Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B.Y. Meklati, P. Franco, C. Minguillon, Chirality 14 (2002) 59.
- [13] A. Zhou, X. Lv, Y. Xie, C. Yan, R. Gao, Anal. Chim. Acta 547 (2005) 158.
- [14] D.W. Armstrong, C.D. Chang, S.H. Lee, J. Chromatogr. 539 (1991) 83.
- [15] B. Chankvetadze, E. Yashima, Y. Okamoto, Chirality 8 (1996) 402.
- [16] Q. Zhong, L. He, T.E. Beesley, W.S. Trahanovsky, P. Sun, C. Wang, D.W. Armstrong, J. Chromatogr. A 1115 (2006) 19.
- [17] A. Berthod, C.D. Chang, D.W. Armstrong, Talanta 40 (1993) 1367.
- [18] Z.M. Zhou, M. Fang, C.X. Yu, Anal. Chim. Acta 539 (2005) 23.
- [19] M. Liu, S.L. Da, Y.Q. Feng, L.S. Li, Anal. Chim. Acta 533 (2005) 89.
- [20] D.W. Armstrong. Bonded phase material for chromatographic separations. U.S.patent 4539399, 1985.
- [21] C.D. Chang, D.W. Armstrong, Talanta 40 (1993) 1367.

- [22] M. Kim, J.D. Way, R.M. Baldwin, *Korean J. Chem. Eng.* 21 (2004) 465.
- [23] Y. Kuravchi, H. Ono, B. Wang, N. Egashira, K. Ohga, *Anal. Sci.* 13 (1997) 47.
- [24] Y.Q. Feng, M.J. Xie, S.L. Da, *Anal. Chim. Acta* 403 (2000) 187.
- [25] F. Tazerouti « Synthèse, caractérisation et application des phases stationnaires chirales en chromatographie liquide » Thèse de Doctorat d'état, 2001, USTHB.
- [26] K. Si-Ahmed, F. Tazerouti, A.Y. Bajah-Hadj-Ahmed, *Anal. Bioanal. Chem.*, 395 (2009) 507.
- [27] L. Oliveros, A. Senso, P. Franco, C. Minguillon, *Chirality* 10 (1998) 283.
- [28] Y.F. Poon, I.W. Muderawan, S.C. Ng, *J. Chromatogr. A* 1101 (2006) 185.
- [29] L. Thunberg, S. Allenmark, A. Fribreg, F. Ek, T. Frejd, *Chirality* 16 (2004) 614.
- [30] I. Ali, H.Y. Aboul-Enein, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 762.
- [31] I. D'Acquarica, *J. Pharm. Biomed Anal.* 23 (2000) 3.
- [32] M.H. Hyun, D.H. Kim, *Chirality* 16 (2004) 294.
- [33] Z. Chen, T. Fuyumuro, K. Watabe, T. Hobo, *Anal. Chim. Acta* 518 (2004) 181.
- [34] G. Félix, C. Cachau, A. Thienpont, M.-H. Soulard, *Chromatographia* 42 (1996) 583.
- [35] J. Garcés, P. Franco, L. Oliveros, C. Minguillon, *Tetrahedron: Asymmetry* 14 (2003) 1179.
- [36] T.J. Ward, D.W. Armstrong. Dans: M. Zief, L.J. Crane (Eds.), *Chromatographic chiral separations*, Marcel Dekker, New York, 1988.
- [37] H.Y. Aboul-Enein, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 521.
- [38] H.Y. Aboul-Enein, I.A. Al-Duraibi. *Enantiomer* 4 (1999) 451.
- [39] M. Péter, A. Péter, J. Van Der Eycken, P. Cosmos, G. Bernath, F. Fulop, J. *Chromatogr. A* 816 (1998) 123.
- [40] C. Perrin, V.A. Vu, N. Matthijs, M. Maftouh, *J. Chromatogr. A* 947 (2002) 69.
- [41] B.K. Patel, J. Valentova, A.J. Hutt, *Chromatographia* 55 (2002) 135.
- [42] J.A. Yáñez, P.K. Andrews, N.M. Davies, *J. Chromatogr. B* 848 (2007) 159.

CHAPITRE III

SEPARATION CHIRALE DE QUELQUES PRODUITS PHARMACEUTIQUES, SUBSTANCES ILLICITES ET FLAVANONES PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE

I. Introduction:

De nos jours, plus de la moitié des produits pharmaceutiques commercialisés sont optiquement actifs dont 37% seulement sont sous forme énantiomériquement pure [1]. Toutefois, il est clairement établi, que l'activité pharmacologique est restreinte à un seul énantiomère (l'eutomère), pendant que l'autre énantiomère (le distomère) peut être inactif, toxique ou avoir des effets secondaires [2]. La prise de conscience générale vis-à-vis des dangers liés à l'administration de produits pharmaceutiques racémiques, se reflète dans les nouvelles réglementations en vigueur, qui astreignent les firmes pharmaceutiques à remettre un rapport détaillé sur les effets pharmacologiques, métaboliques et toxicologiques de chaque énantiomère, lors du développement d'un nouvel principe actif chiral [3].

La chiralité se reflète également dans les produits d'origine naturelle ; parmi eux, nous pouvons citer les flavanones qui forment l'une des douze classes des flavonoïdes, et sont présents en quantités importantes dans une grande variété de fruits et de légumes consommés quotidiennement par l'homme. Leur forme énantiomérique (S) est largement prédominante dans la nature ; cette spécificité fait en sorte que cette classe de produits soit un excellent moyen de vérifier l'origine naturelle ou synthétique des produits agroalimentaires [4]. Tout comme les produits pharmaceutiques chiraux, les effets thérapeutiques des flavanones peuvent être également dus à l'un des deux énantiomères [5], d'où la nécessité de développer de nouveaux outils analytiques destinés à la caractérisation chirale de ces flavonoïdes optiquement actifs.

Bien que la chromatographie soit toujours la méthode la plus utilisée pour le contrôle de qualité à l'échelle industrielle, l'électrophorèse capillaire commence à attirer de plus en plus l'attention des industries, vu ses nombreux avantages. Parmi les principales raisons qui pourrait expliquer son vif succès nous pouvons citer : sa très haute efficacité de séparation, atteignant plus d'un million de plateaux théoriques, ses faibles durées d'analyse, sa facilité d'emploi due à son automatisation, sa faible consommation en échantillons et solvants, et surtout le fait qu'elle soit exempté de phase stationnaire [6]. Aussi, plusieurs principes de séparation utilisés efficacement en CLHP ont été transférés en EC. Notamment la séparation chirale, qui trouva en cette technique une alternative de choix à la chromatographie.

La résolution énantiomérique par EC peut être achevée par simple ajout d'un sélecteur chiral approprié à l'électrolyte tamponné tel que : les dérivés de cyclodextrines [7-9], les antibiotiques macrocycliques [10], les protéines [11], les polysaccharides [12], les éthers couronnes [13]. Parmi ces sélecteurs, les CDs sont de loin les plus efficaces et les plus utilisées, et cela du fait de leur haute résolution vis-à-vis d'une large gamme de produits optiquement actifs, de leur faible absorbance UV ainsi que de leur bonne solubilité en solution aqueuse [14]. Les cyclodextrines furent utilisées pour la première fois en électrophorèse capillaire par S. Fanali en 1989 pour la séparation chirale de produits pharmaceutiques [15].

Le mécanisme de caractérisation chirale des cyclodextrine en EC, est basé sur l'aptitude des CDs à former des complexes d'inclusions avec le soluté. Ainsi, la totalité ou une partie du soluté est incluse dans la cavité hydrophobe pendant que les groupements fonctionnelles du soluté interagissent avec ceux de la cyclodextrine. De ce fait, la dimension et la forme de la cavité de la CD ainsi que la structure chimique du soluté jouent un rôle déterminant durant le processus de caractérisation chirale [16]. Parmi les différents types de cyclodextrines, la β -CD (7 unités glucopyranoses) possède une cavité de dimension adéquate vis-à-vis d'une large gamme de molécules, ce qui explique le fait qu'elle soit considérée comme le sélecteur chiral le plus approprié et le plus efficace en électrophorèse capillaire [17].

L'amélioration des propriétés énantio-sélectives des cyclodextrines peut être obtenue par modification et dérivatisation de leurs groupements hydroxyles. C'est ainsi qu'une multitude de dérivés de CD sont apparus en EC. Ces dérivés sont plus efficaces et plus solubles que la CD native [18]. Parmi les CDs modifiées neutres utilisées en électrophorèse capillaire, nous pouvons citer l'HP- β -CD qui s'est avérée être un excellent sélecteur chiral pour bon nombre de produits optiquement actifs [19,20], la diméthyl- β -CD [21], la glucosyl- β -CD [22] et la β -CD acétylée [23]. Une autre gamme de cyclodextrine incluant les CDs ioniques est apparue et a démontré son indéniable performance vis-à-vis de ses homologues non chargées. Nous citerons à titre d'exemple : la carboxyméthyl- β -CD [24], la cyanoéthyl- β -CD [25], la β -CD sulfatée [5], la β -CD phosphatée [26] et particulièrement la sulfobutylether- β -CD pour sa grande efficacité [27,28]. Concernant les CDs dites cationiques, nous avons la β -CD aminée [29] et l'ammonium- β -CD [30] ; néanmoins, il est à noter que cette dernière classe est nettement moins efficace que les CDs anioniques [16].

Plusieurs raisons peuvent nous amener à modifier chimiquement la surface intérieure des colonnes capillaires en EC ; en effet, la réduction ou carrément la suppression des interactions soluté-capillaire, l'élimination du flux électro-osmotique afin d'avoir des temps d'analyse plus courts et l'amélioration de la résolution sont les principaux bienfaits de l'utilisation de capillaires modifiés [31]. Il existe deux approches de traitement des parois internes des colonnes capillaires. La première consiste à greffer de manière covalente les groupements silanols de la paroi interne avec des polymères tels que le ((3-aminopropyl)-triméthoxysilane (APS) [32], l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) [33], l'alcool polyvinylique (PVA) [34] ou le polyacrylamide [35-37]. La seconde approche consiste en la modification dynamique de la paroi par une mono ou une multi-couche, ce qui signifie que la modification se fera par ajout d'un polymère à l'électrolyte tel que le polybrène (bromure d'héxadimétrine) [38]. Par ailleurs, il est largement admis que les colonnes capillaires, dont les parois internes ont été chimiquement modifiées par le polyacrylamide sont plus efficaces d'où leur fréquente utilisation par différents auteurs [39,40].

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés en premier lieu à la séparation chirale par électrophorèse capillaire, de plusieurs familles de produits pharmaceutiques (β -bloquants, les bronchodilatateurs, stimulants nerveux, hormones et antidépresseurs) ainsi que quelques substances illicites tels que les amphétamines et l'ecstasy. Nous citerons également le cas de l'éphédrine (un puissant décongestionnant [41]); qui est un précurseur très utilisé dans la fabrication des méthamphétamines par réduction chimique de la fonction alcool. Elle est parfois consommée comme coupe-faim et améliore l'efficacité physique ou mentale, elle augmente même le taux d'agressivité, d'où le caractère dopant de cette substance [42]. Tous ces faits ont amené la FDA (Food and Drug Administration) en 2004 ainsi que la cour suprême des Etats Unies d'Amérique en 2007 à classer l'éphédrine comme produit illicite et interdire sa commercialisation [43].

La seconde partie du travail, a été consacrée, à la résolution chirale et diastéréoisomérique de quelques flavanones et flavanones glycosides sur un capillaire non modifié ainsi que sur un capillaire dont les parois sont greffées par le polyacrylamide et cela en utilisant un électrolyte tamponné contenant de la sulfobutyléther- β -CD (SBE- β -CD). L'effet du pH et de la concentration de la SBE- β -CD ont été étudiés. La dernière partie a été

consacrée à la détermination de la composition diastéréomérique de l'héspéridine dans un jus d'orange commercial.

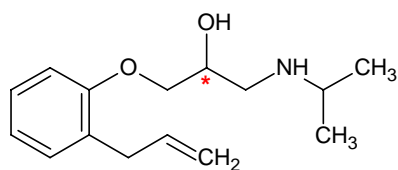
II. Partie expérimentale

II.1. Réactifs chimiques

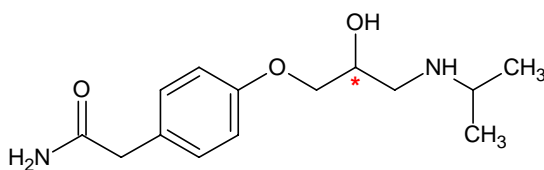
Tous les produits chimiques utilisés sont de grade analytique, l'hydroxyde de sodium, l'acide phosphorique (85%), l'acide acétique, l'acide nitrique, le dihydrogénophosphate de sodium, le monohydrogénophosphate de sodium, le méthanol et l'éthanol ont été fournis par Carlo Erba (Milan, Italie). L'eau ultra pure a été obtenue grâce au système de purification Milli-Q (Millipore, Bedford, MA). L'hydroxypropyl- β -CD et la sulfobutyléther- β -CD ont été fournies respectivement par Cyclolab (Budapest, Hongrie) et Advasep (CyDex Inc., Overland Park). La N, N, N', N'-tetraméthylethylenediamine (TEMED), le 3-(triméthoxysilyl)propyl-méthacrylate et l'acétate d'ammonium ont été fournis par Fluka (Buchs, Suisse), l'acrylamide 99.9% et le persulfate d'ammonium par Bio-Rad (Hercules, CA).

Tous les produits pharmaceutiques, l'alcool benzylique ainsi que les flavanones et flavanones glycosides ont été acquis auprès de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). L'amphétamine (AM), la méthamphétamine (MA), la 3,4-méthylènedioxyamphétamine (MDA), la 3,4-méthylènedioxyméthamphétamine (MDMA) et la 3,4-méthylènedioxyéthylamphétamine (MDEA) ont été fournies par Cerilliant Corporation (Round Rock, Texas, USA). Leurs structures chimiques sont présentées sur la figure 1. Le jus d'orange sanguine Oranfrizer analysé durant le présent travail a été acheté dans un supermarché à Rome (Italie), ce jus pasteurisé a été obtenu des mandarines et oranges sanguines siciliennes.

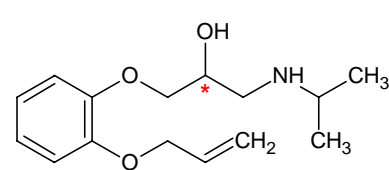
Les β -bloquants



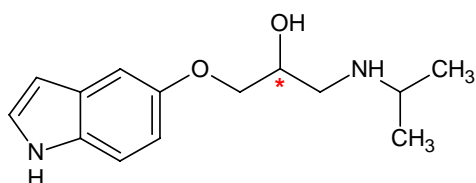
Alprénolol



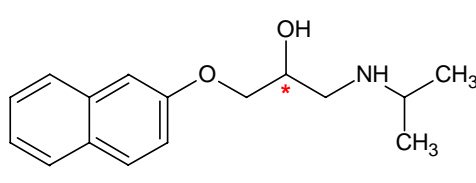
Aténolol



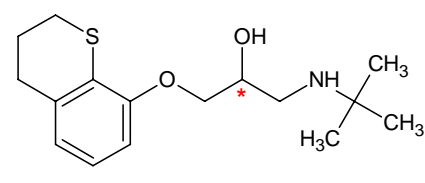
Oxprénolol



Pindolol

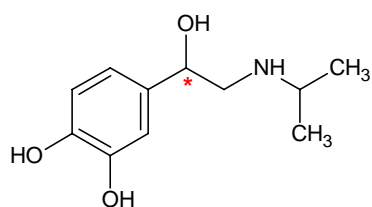


Propranolol

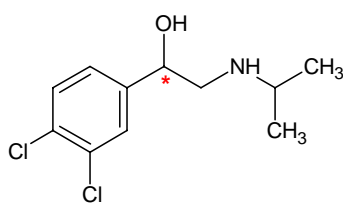


Tertatolol

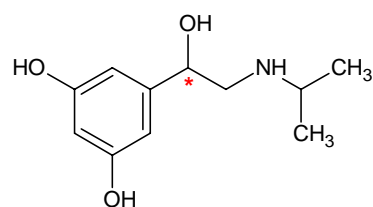
Les bronchodilatateurs (les agonistes β -adrénergiques)



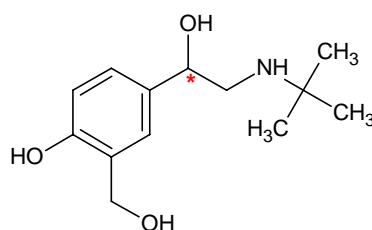
Isoprotérénol



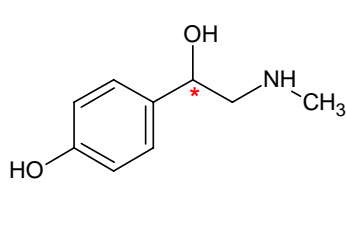
Dichloroisoprotérénol



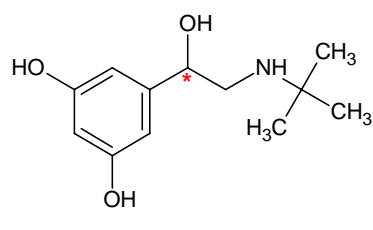
Métaprotérénol



Salbutamol

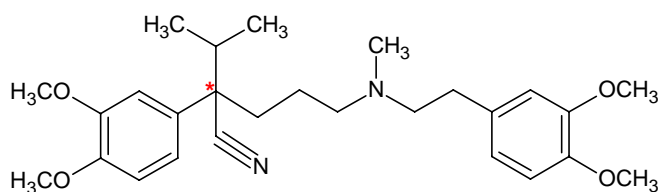


Synéphrine



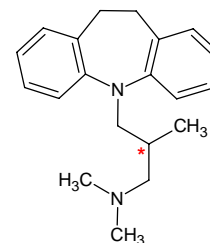
Terbutaline

Inhibiteur calcique



Vérapamil

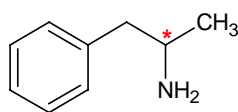
Antidépresseur



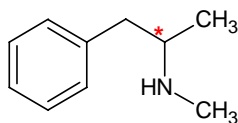
Trimipramine

Figure 1 : Structure chimique et classe thérapeutique des produits pharmaceutiques, illicites et naturels analysés

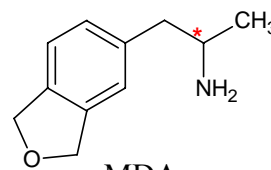
Les produits illicites



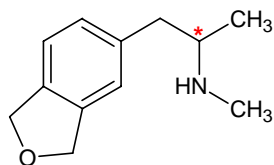
Amphétamine



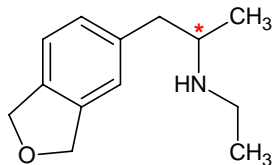
Métamphétamine



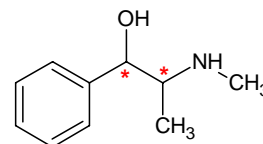
MDA



MDMA (ecstasy)

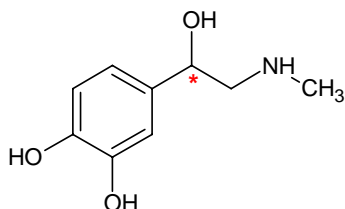


MDEA

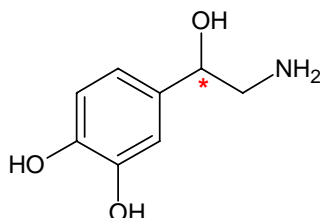


Ephédrine

Les hormones

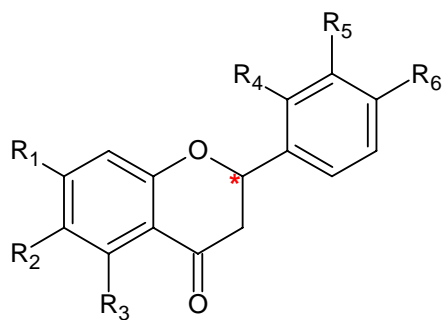


Adrénaline (épinéphrine)



Noradrénaline

Les Flavanones



$R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=R_6=H$

$R_1=OH, R_2=R_3=R_4=R_5=R_6=H$

$R_2=OH, R_1=R_3=R_4=R_5=R_6=H$

$R_6=OH, R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=H$

$R_4=OH, R_1=R_2=R_3=R_5=R_6=H$

$R_1=OCH_3, R_2=R_3=R_4=R_5=R_6=H$

$R_2=OCH_3, R_1=R_3=R_4=R_5=R_6=H$

$R_6=OCH_3, R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=H$

$R_6=OCH_3, R_1=R_3=R_5=OH, R_2=R_4=H$

$R_1=R_3=R_6=OH, R_2=R_4=R_5=H$

Flavanone

7-Hydroxyflavanone

6-Hydroxyflavanone

4'-Hydroxyflavanone

2'-Hydroxyflavanone

7-Méthoxyflavanone

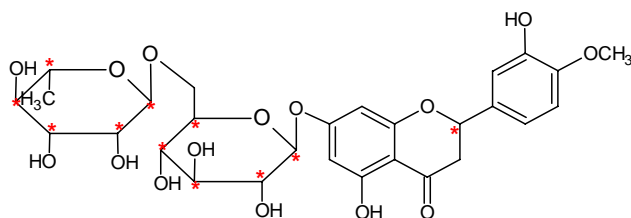
6-Méthoxyflavanone

4'-Méthoxyflavanone

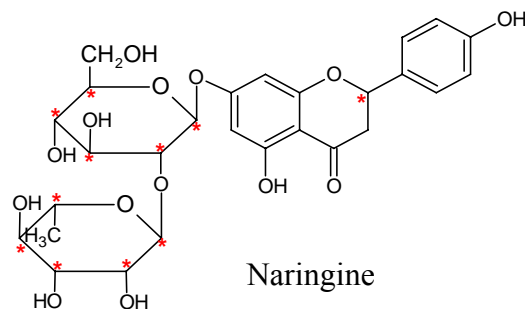
Hespérétine

Naringénine

Les Flavanones glycosides



Hespéridine



Naringine

Figure 1 : (suite).

II.2. Appareillage :

L'électrophorèse capillaire utilisée est un model automatisé HP^{3D} (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) équipé d'un échantillonneur automatique et d'un détecteur à barrettes de diode (190-600 nm). La détection à été achevée à 200 et 205 nm afin d'assurer le maximum de sensibilité pour les composés injectés [44]. L'acquisition et le traitement des données électrophorétiques ont été réalisés sur le logiciel HP ChemStation V6.03. Toutes les analyses ont été effectuées à température ambiante (25°C). Les colonnes capillaires en silice fondue non modifiées ont été fournies par Composite Metal Service (Worcester, Grande Bretagne). Les caractéristiques des colonnes capillaires utilisées dans cette étude ainsi que les paramètres d'injection (mode hydrodynamique) et de voltage sont résumés sur le tableau 1.

Tableau 1 : Conditions opératoires utilisées lors de l'analyse des produits optiquement actifs par EC.

| Produits analysés | Type de colonne | diamètre interne | diamètre externe | longueur totale | longueur efficace (jusqu'au détecteur) | Pression et durée d'injection | Voltage |
|---------------------------------------|------------------------|------------------|------------------|-----------------|----------------------------------------|-------------------------------|---------|
| Produits pharmaceutiques et illicites | Non modifiée | 50 µm | 375 µm | 48.5 cm | 40 cm | 50 mbar x 10 s | 20 kV |
| Flavanones et flavanones glycosides | Non modifiée | 75 µm | 375 µm | 48.5 cm | 40 cm | 50 mbar x 08 s | -15 kV |
| | Modifiée chimiquement* | | | | | | |
| Jus d'orange et hespéridine | Modifiée chimiquement* | 75 µm | 375 µm | 48.5 cm | 40 cm | 50 mbar x 08 s | -15 kV |

* : Modification des parois intérieures du capillaire par greffage covalent avec le polyacrylamide

II.3. Préparation des colonnes capillaires modifiées

Les capillaires modifiés ont été préparés au niveau du laboratoire suivant la méthode initialement décrite par Hjertén [35] ; cette méthode est basée sur l'utilisation d'un composé bifonctionnel (3-(triméthoxysilyl)propyl-méthacrylate) dont un groupement va réagir spécifiquement avec les parois de la colonne, pendant que l'autre groupement prendra part au processus de polymérisation avec un monomère (l'acrylamide). Néanmoins, nous avons apporté plusieurs modifications à cette méthode.

Dans une première étape, et afin d'activer les groupements silanols des parois intérieures, les capillaires ont été lavés par passages successifs d'une solution d'hydroxyde de sodium (1M) pendant 2 h, d'eau ultra pure pendant 10 min puis d'une solution d'acide nitrique (1M) pendant 2 h. Par la suite, le processus de silanisation (voir figure 2) est réalisé par lavage du capillaire avec une solution constituée de 10 μ L de 3-(triméthoxysilyl)propyl-méthacrylate diluée dans 1 mL d'éthanol pendant 12 h. Cette première étape a été finalisée par passage d'eau pendant 30 min.

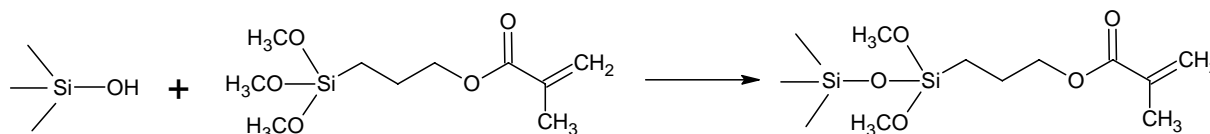


Figure 2 : Réaction de silanisation [45]

L'étape suivante constitue le processus de polymérisation. Nous avons d'abord préparé la solution polymérique et cela en ajoutant à 20 mL d'eau portée à ébullition, 0.8 g d'acrylamide, puis 20 mg de persulfate d'ammonium, cette solution est ensuite dégazée sous vide pendant 10 min. A cette solution nous avons ajouté 200 μ L d'une autre solution constituée d'un mélange de 100 μ L de N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) et de 900 μ L d'eau. Le capillaire est ensuite lavé par passage de cette solution pendant 7 heures (voir figure 3).

A la fin, nous avons fait passer de l'eau pendant 30 min afin d'éliminer l'acrylamide en excès puis un faible jet d'air durant 30 min et cela afin de sécher le capillaire.

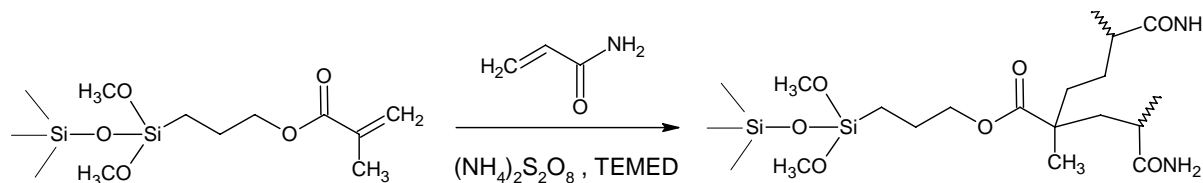


Figure 3 : Réaction de polymérisation [45].

II.4. Préparation des échantillons et des tampons de migration

Les solutions standards de chaque soluté (1 mg mL^{-1}) ont été préparées dans du MeOH et stockées au réfrigérateur à $+4^\circ\text{C}$. Les dilutions ont été quotidiennement effectuées dans de l'eau afin d'obtenir une concentration finale de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Les électrolytes utilisés durant cette étude sont à base de tampon phosphate et de tampon acétate. Le tampon phosphate (50mM, pH 2.5) a été préparé en dissolvant 0.34 mL d'acide phosphorique (85%) dans environ 80 mL d'eau ultra pure. Nous avons par la suite ajusté le pH à 2.5 par titrage avec de l'hydroxyde de sodium (1M), puis nous avons complété la solution obtenue jusqu'à 100 mL.

Concernant les tampons phosphate (45 mM, pH 3 ou 7) et le tampon acétate (45 mM, pH), nous avons suivi les mêmes étapes décrites pour le premier tampon, sauf qu'on a dissout respectivement 0.62 g de NaH_2PO_4 , 0.80 g de Na_2HPO_4 ou 0.35 g d'acétate d'ammonium dans de l'eau ultra pure. Afin d'atteindre les pH désirés, nous avons titré les solutions obtenues avec de l'acide phosphorique (pH 3 ou 7) ou avec de l'acide acétique (pH 5).

Les quantités appropriées des sélecteurs chiraux (HP- β -CD ou SBE- β -CD) ont été ajoutées aux tampons de migration afin d'atteindre les concentrations souhaitées. Ces solutions sont également préparées quotidiennement et sont filtrées au travers de filtres $0.45 \mu\text{m}$ (Millipore, Milford, MA, USA) et dégazées dans un bain à ultrason pendant 10 min.

II.5. Procédure électrophorétique

Les fenêtres UV des capillaires ont été préparées en retirant, à l'aide d'une lame, la couche polyimide qui recouvre les capillaires (environ 5 mm) à la distance choisie (40 ou 31,5 cm). Après cette étape les capillaires ont été insérées dans un support « la cartouche » qui est elle même introduite manuellement dans l'appareil.

Le tableau 2 présente les différentes étapes de rinçages successifs (sous une pression de 5 bar) effectués afin de conditionner et régénérer les colonnes capillaires durant les différentes étapes d'analyse. Après chaque série de 10 injections, l'électrolyte contenant le sélecteur chirale est renouvelé.

Tableau 2 : Etapes de conditionnement des colonnes capillaires.

| Type de colonne | Premier usage | | Avant chaque injection | | Fin de l'analyse | |
|--------------------------------------------|------------------|--------|------------------------|-------|------------------|--------|
| | Solution | Durée | Solution | Durée | Solution | Durée |
| Capillaire non modifié | H ₂ O | 5 min | H ₂ O | 1 min | H ₂ O | 2 min |
| | NaOH (1M) | 15 min | NaOH 0.1 M | 1 min | NaOH 0.1 M | 5 min |
| | H ₂ O | 20 min | H ₂ O | 2 min | H ₂ O | 20 min |
| | Electrolyte | 20 min | Electrolyte + CD | 3 min | | |
| Capillaire modifié (polyacrylamide) | H ₂ O | 10 min | H ₂ O | 2 min | H ₂ O | 20 min |
| | Electrolyte | 20 min | Electrolyte + CD | 3 min | | |

II.6. Calculs électrophorétiques

La mobilité effective (μ_{eff}) et apparente (μ_{app}), le facteur de séparation (α) ainsi que la résolution énantiomérique (R_s) ont été calculés en appliquant les équations suivantes [46]:

$$\mu_{eff} = \mu_{app} - \mu_{FEO} \quad ; \quad \mu_{app} = \frac{l \times L}{t \times V} \quad ; \quad \alpha = \frac{\mu_{app,1}}{\mu_{app,2}} \quad ; \quad R_s = 2 \times \frac{(t_2 - t_1)}{(w_1 + w_2)}$$

Avec :

μ_{FEO} : mobilité apparente du flux électroosmotique (mesurée par injection de l'alcool benzylique).

l : longueur efficace.

L : longueur totale.

t : temps de migration.

V : voltage appliqué.

$\mu_{app,1}$ et $\mu_{app,2}$: mobilités électrophorétiques apparentes des deux énantiomères.

w_1 et w_2 : largeurs à la base des pics des deux énantiomères.

III. Résultats et discussion

III.1. Séparation chirale de quelques produits pharmaceutiques et illicites

Plusieurs produits d'intérêt pharmaceutique (Figure 1), incluant six β -bloquants (aténolol, alprénolol, oxprénolol, pindolol, propranolol et tertatolol), six agonistes β -adrénergiques (dichloroisoprotérénol, isoprotérénol, métoprotérénol, salbutamol, synéphrine et terbutaline), deux hormones (adrénaline ou épinéphrine, noradrénaline), un antidépresseur (trimipramine), un inhibiteur calcique (vérapamil) et six produits illicites (amphétamine, méthamphétamine, MDA, MDEA, MDMA et l'éphédrine), ont été analysés par électrophorèse capillaire.

L'électrolyte utilisé lors de cette étude est un tampon phosphate de concentration 50 mM et de pH 2.5. Le choix de ces conditions opératoires est basé sur les données de la littérature, qui préconise cette concentration et cette valeur de pH pour l'analyse des produits basiques [47-50]. En effet, tous les produits analysés dans la présente étude ont un pKa qui varie entre 9 et 11, de ce fait, à pH 2.5 tous ces composés seront totalement ionisés sous leur forme cationique ce qu'il leur conférera une grande mobilité en direction de la cathode.

Par ailleurs, il est largement admis que l'acidité du tampon de migration peut sérieusement affecter la mobilité ainsi que le flux électroosmotique, et cela en changeant les constantes de dissociation du soluté ainsi que celles des groupements Si-OH du capillaire. Lors de l'utilisation de faibles valeurs de pH, les solutés auront une plus faible mobilité ce qui se traduira par un temps de séjour dans la colonne plus long, et permettre ainsi à la résolution chirale de s'effectuer. Par contre avec des pH plus élevés, les temps de migration sont extrêmement rapides à cause de l'augmentation du FEO ce qui conduit à de faibles résolutions [19, 20, 51].

Aussi, nous avons effectué quelques expériences préliminaires afin de fixer la valeur du voltage ainsi que la durée de l'injection, afin d'avoir des temps d'analyses et des absorptions raisonnables tout en assurant un rapport signal/bruit de fond satisfaisant [19].

III.1.1. Effet de l'électrolyte sur la mobilité électrophorétique des solutés

Dans un premier temps, nous avons étudié la mobilité de nos solutés sans ajouter le sélecteur chirale à l'électrolyte tamponné. Les résultats obtenus sont présentés sur le tableau 3.

Tel que cela était prévisible, aucune séparation chirale n'a pu être obtenue sous ces conditions opératoires. Aussi, nous pouvons voir que les temps de migration de nos solutés sont assez courts et varient entre 5.31 et 8.72 min. Ce qui confirme la complète protonation de nos composés [25].

De plus, à pH 2.5, le flux électroosmotique (FEO) est très faible par rapport à la mobilité des solutés ($\mu_{\text{FEO}} = 0.84 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). En effet, les solutés migrent vers la cathode grâce à leur simple mobilité sans être accéléré par la présence du FEO ou alors retardé par le sélecteur chirale à cause des interactions qui pourraient s'établir entre les solutés et la cyclodextrine [16].

III.1.2. Effet de la concentration du sélecteur chirale sur la mobilité et la résolution des solutés

Afin de permettre l'énantio-séparation de nos produits pharmaceutiques et illicites, nous avons ajouté au tampon de migration différentes quantités d'hydroxypropyl- β -CD (de 5 à 30 mM). Le choix du sélecteur chirale est dû à sa haute énantiosélectivité aussi bien, en chromatographie liquide qu'en électrophorèse capillaire, et cela vis-à-vis d'une large gamme de produits optiquement actifs [19, 20, 50]. En effet il est considéré en électrophorèse capillaire comme un sélecteur chirale de choix pour la résolution des produits à caractère basique [52].

Tableau 3 : Effet de la concentration du sélecteur chiral sur les temps de migration et les résolutions des produits pharmaceutiques et illicites analysés. ^{a,b}

| Composés | Concentration de l'HP-β-CD (mM) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------|---------------------------------|----------------|---|----|----------------|----------------|------|------|----------------|----------------|------|------|----------------|----------------|------|------|----------------|----------------|------|------|
| | 0 | | | | 5 | | | | 10 | | | | 15 | | | | 30 | | | |
| | t ₁ | μ ₁ | α | Rs | t ₁ | μ ₁ | α | Rs | t ₁ | μ ₁ | α | Rs | t ₁ | μ ₁ | α | Rs | t ₁ | μ ₁ | α | Rs |
| Alprénolol | 7.52 | 1.31 | - | - | 9.42 | 1.72 | 1.01 | 0.51 | 10.72 | 1.51 | 1.01 | 0.53 | 14.14 | 1.14 | 1.01 | 0.61 | 15.32 | 1.06 | 1.01 | 0.51 |
| Aténolol | 7.82 | 1.23 | - | - | 9.29 | 1.74 | - | - | 10.08 | 1.60 | - | - | 11.06 | 1.46 | - | - | 13.33 | 1.21 | 1.01 | 0.42 |
| Oxprénolol | 7.57 | 1.30 | - | - | 8.10 | 2.00 | - | - | 8.82 | 1.83 | - | - | 10.32 | 1.57 | 1.01 | 0.41 | 11.94 | 1.35 | 1.01 | 0.51 |
| Pindolol | 7.61 | 1.28 | - | - | 7.93 | 2.04 | - | - | 8.95 | 1.81 | 1.01 | 0.51 | 12.01 | 1.35 | 1.01 | 0.68 | 12.12 | 1.33 | 1.01 | 0.72 |
| Propranolol | 7.03 | 1.46 | - | - | 11.12 | 1.45 | 1.02 | 0.92 | 12.37 | 1.31 | 1.02 | 1.04 | 13.87 | 1.17 | 1.02 | 0.95 | 16.62 | 0.97 | 1.02 | 0.82 |
| Tertatolol | 8.38 | 1.09 | - | - | 11.08 | 1.46 | 1.01 | 0.64 | 12.55 | 1.29 | 1.01 | 0.58 | 14.19 | 1.14 | 1.01 | 0.55 | 17.17 | 0.94 | 1.01 | 0.47 |
| Dichloro-isoprotérénol | 7.18 | 1.41 | - | - | 10.23 | 1.58 | 1.02 | 1.02 | 11.68 | 1.38 | 1.02 | 0.87 | 12.68 | 1.27 | 1.01 | 0.81 | 16.42 | 0.98 | 1.01 | 0.55 |
| Isoprotérénol | 7.50 | 1.32 | - | - | 7.75 | 2.09 | 1.01 | 0.84 | 8.50 | 1.90 | 1.02 | 1.33 | 11.15 | 1.45 | 1.03 | 1.80 | 11.24 | 1.44 | 1.03 | 2.28 |
| Métaprotérénol | 7.56 | 1.30 | - | - | 8.39 | 1.93 | 1.03 | 2.00 | 9.48 | 1.71 | 1.04 | 2.49 | 13.28 | 1.22 | 1.06 | 2.89 | 13.36 | 1.21 | 1.05 | 2.91 |
| Salbutamol | 7.27 | 1.38 | - | - | 8.28 | 1.95 | - | - | 8.62 | 1.88 | - | - | 9.26 | 1.75 | 1.01 | 0.38 | 10.44 | 1.55 | 1.01 | 0.78 |
| Synéphrine | 7.04 | 1.46 | - | - | 7.00 | 2.31 | 1.01 | 0.47 | 7.62 | 2.12 | 1.01 | 0.70 | 8.53 | 1.90 | 1.01 | 1.00 | 10.60 | 1.53 | 1.02 | 1.28 |
| Terbutaline | 7.64 | 1.28 | - | - | 8.82 | 1.83 | 1.08 | 2.93 | 9.79 | 1.65 | 1.05 | 3.46 | 11.75 | 1.38 | 1.06 | 4.00 | 13.85 | 1.17 | 1.06 | 3.82 |
| Adrénaline | 6.30 | 1.73 | - | - | 7.21 | 2.24 | 1.01 | 0.72 | 7.74 | 2.09 | 1.01 | 1.47 | 9.34 | 1.73 | 1.02 | 1.70 | 10.47 | 1.54 | 1.02 | 2.45 |
| Noradrénaline | 6.45 | 1.67 | - | - | 6.66 | 2.43 | - | - | 7.11 | 2.27 | 1.01 | 0.59 | 8.28 | 1.95 | 1.01 | 0.81 | 9.43 | 1.71 | 1.02 | 1.02 |

Tableau 3 : (Suite)

| Composés | Concentration de l'HP-β-CD (mM) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|---------------------------------|----------------|---|----|----------------|----------------|------|------|----------------|----------------|------|------|----------------|----------------|------|------|----------------|----------------|------|------|
| | 0 | | | | 5 | | | | 10 | | | | 15 | | | | 30 | | | |
| | t ₁ | μ ₁ | α | Rs | t ₁ | μ ₁ | α | Rs | t ₁ | μ ₁ | α | Rs | t ₁ | μ ₁ | α | Rs | t ₁ | μ ₁ | α | Rs |
| Amphétamine | 5.31 | 2.20 | - | - | 6.10 | 2.65 | 1.01 | 0.31 | 6.86 | 2.36 | 1.01 | 0.39 | 8.14 | 1.99 | 1.02 | 0.48 | 10.11 | 1.60 | 1.02 | 0.52 |
| Méthamphétamine | 5.51 | 2.09 | - | - | 6.71 | 2.41 | - | - | 7.51 | 2.15 | - | - | 8.98 | 1.80 | - | - | 11.19 | 1.44 | - | - |
| MDA | 5.62 | 2.04 | - | - | 7.84 | 2.06 | 1.02 | 0.53 | 9.00 | 1.80 | 1.02 | 0.58 | 11.06 | 1.46 | 1.03 | 0.68 | 13.55 | 1.19 | - | - |
| MDMA | 5.96 | 1.87 | - | - | 8.20 | 1.97 | 1.03 | 1.31 | 9.39 | 1.72 | 1.03 | 1.37 | 11.09 | 1.46 | 1.03 | 1.46 | 14.42 | 1.12 | 1.02 | 1.26 |
| MDEA | 6.36 | 1.70 | - | - | 9.32 | 1.73 | 1.03 | 1.36 | 10.59 | 1.53 | 1.02 | 1.29 | 13.08 | 1.24 | 1.02 | 1.39 | 15.43 | 1.05 | 1.02 | 1.03 |
| Ephédrine | 5.83 | 1.93 | - | - | 6.87 | 2.35 | - | - | 7.51 | 2.15 | 1.01 | 0.50 | 8.47 | 1.91 | 1.01 | 0.69 | 10.64 | 1.52 | 1.02 | 1.00 |
| Trimipramine | 6.98 | 1.48 | - | - | 13.54 | 1.19 | 1.01 | 0.39 | 14.24 | 1.14 | - | - | 22.53 | 0.72 | 1.01 | 0.09 | 19.27 | 0.84 | - | - |
| Vérapamil | 8.72 | 1.01 | - | - | 12.86 | 1.26 | 1.01 | 0.58 | 14.28 | 1.13 | 1.01 | 0.54 | 16.24 | 1.00 | 1.01 | 0.49 | 19.23 | 0.84 | - | - |

^a: Capillaire non modifié 48.5 (40 longueur effective) cm x 50 μm D.I., électrolyte: 50 mM tampon phosphate, pH 2.5, contenant différentes concentrations de HP-β-CD; voltage 20 kV; injection par pression 50 mbar x 10 s.

^b: μ₁: 10⁻⁴cm⁻²V⁻¹s⁻¹, t₁ (min)

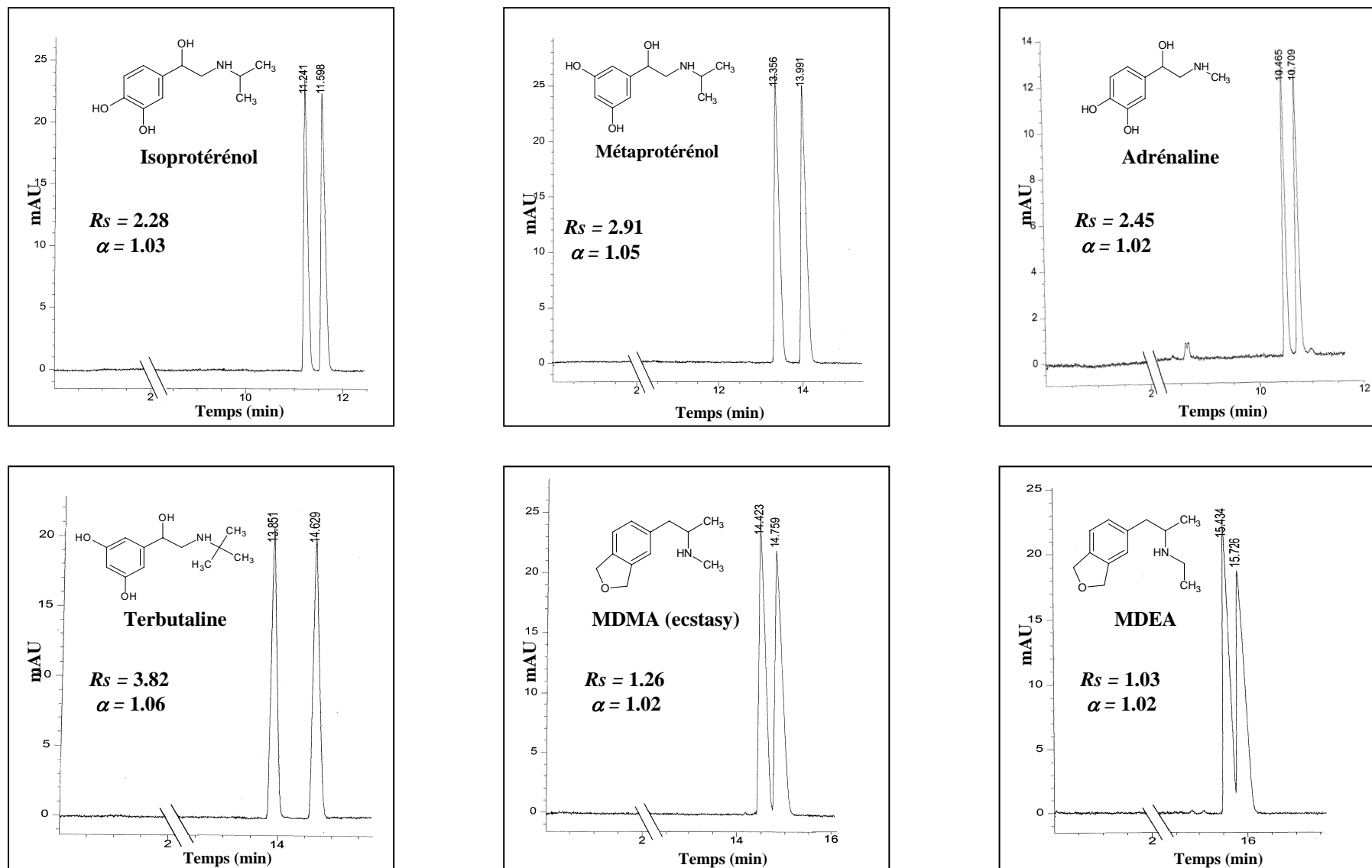


Figure 4 : Quelques électrophérogrammes de séparations chirales obtenues avec 30 mM de HP- β -CD (Voir les autres conditions expérimentales sur le tableau 3).

Le premier effet observé après l'ajout de la cyclodextrine, concerne la quasi suppression du FEO. En effet, la mobilité de l'alcool benzylique (marqueur utilisé pour déterminer le FEO) était inférieure à $0.2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Cette observation peut s'expliquer par l'augmentation de la viscosité de l'électrolyte ainsi que par la probable adsorption de la cyclodextrine sur la surface du capillaire [25]. Ainsi hormis la méthamphétamine, tous les produits injectés ont été énanti-séparés, ce qui démontre le haut pouvoir énanti-sélectif de la HP- β -CD. Notamment pour la tertbutaline, l'adrénaline, le métoprotérénol et l'isoprotérénol qui ont été séparés avec d'excellentes résolutions ($2 < R_s < 4$). Quelques électrophérogrammes des meilleures séparations chirales obtenues sont présentés sur la figure 4.

La figure 5 illustre l'effet de la concentration du sélecteur chiral ajouté au tampon de migration sur la mobilité effective de quelques produits pharmaceutiques. Ainsi, nous pouvons voir qu'une augmentation de la quantité de HP- β -CD présente dans l'électrolyte diminue la mobilité électrophorétiques des solutés. Cette diminution dépend essentiellement de la concentration du sélecteur chiral et de la constante de stabilité du complexe CD-soluté formé [25]. Si nous comparons les résultats obtenus pour les six β -bloquants, nous discernons la diminution de la constante de stabilité des complexes dans l'ordre suivant: tertatolol>propranolol>alprénolol>aténolol>pindolol>oxprénolol. Wren et Rowe ont proposé de relier les interactions entre les β -bloquants et la cyclodextrine à l'hydrophobicité des ces solutés [53]. Ce qui signifie, que le composé le plus hydrophobe interagira plus avec la cavité hydrophobe de la CD, ce qui se traduira par une plus faible mobilité effective.

L'influence de l'hydrophobicité des solutés sur la formation du complexe d'inclusion est mieux illustrée par les résultats obtenus pour les MDA, MDMA et MDEA. Ainsi, le groupement amine de ces trois composés est soit non substitué, soit porteur d'un groupement méthyle ou d'un éthyle, respectivement. La plus petite mobilité a été observée pour la MDEA qui se trouve être également la plus hydrophobe des trois, ce qui confirme l'hypothèse de Wren et Rowe [53].

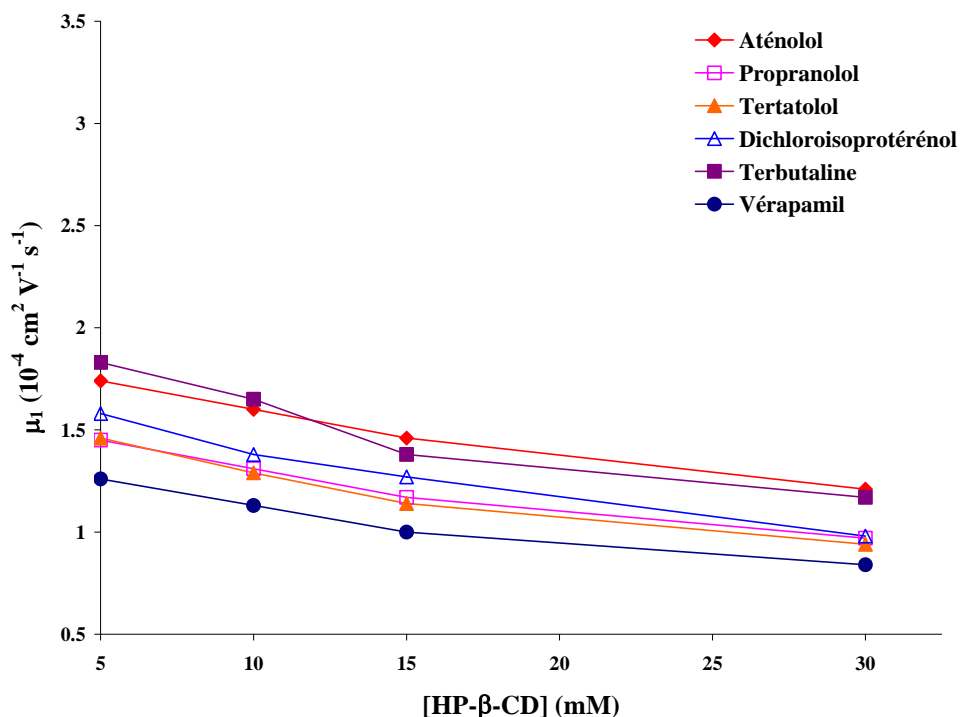


Figure 5 : Effet de la concentration du sélecteur chiral sur la mobilité de quelques solutés (voir conditions expérimentales sur le tableau 3).

Si nous examinons avec attention les différentes résolutions obtenues pour les produits injectés en fonction de la quantité de CD présente dans l'électrolyte (de 5 à 30 mM), nous distinguons aisément deux profils majeurs : le premier décrit une augmentation continue de la résolution avec la concentration de HP-β-CD. En effet, plus le tampon de migration est enrichie en sélecteur chiral, meilleure est la séparation chirale (Figure 6 A). Parmi les solutés pour lesquels une forte concentration en CD est bénéfique à leur séparation, nous pouvons citer l'oxprénolol, l'isoprotérénol, le salbutamol, l'adrénaline ainsi que l'éphédrine.

Le second profil, concerne les solutés qui observent un maximum de résolution vis-à-vis d'une certaine concentration de cyclodextrine (Figure 6 B), tels que l'alprénolol (15 mM), le propranolol (10 mM) et le dichloroisoprotérénol (5 mM).

Ces phénomènes sont en totale accordance avec ce qui a été observé dans la littérature [19, 25, 54-56] ainsi qu'avec le modèle théorique proposé par Wren et Rowe qui suggère l'existence d'une concentration optimale de sélecteur chirale pour chaque soluté [53].

III.1.3. Effet de la structure chimique du soluté sur la discrimination chirale

La discrimination chirale est réalisée via les interactions mises en jeu entre le soluté et la cyclodextrine. Les différentes affinités des deux énantiomères vis-à-vis de la cavité de la cyclodextrine, sont principalement dues aux propriétés structurales du soluté ainsi qu'à son aptitude à former un complexe d'inclusion ainsi que des liaisons hydrogènes avec les groupements fonctionnels de la cyclodextrine [20]. Ainsi, les résolutions obtenues pour les six β -bloquants injectés indiquent l'effet radical de la substitution du cycle phényle sur la caractérisation chirale ; en effet, la meilleure résolution pour ces produits a été obtenue pour le propranolol ($R_s=1.02$), qui contrairement aux autres, possède un groupement naphthyle connu pour sa forte affinité vis-à-vis de la cavité de la cyclodextrine [57], ce qui explique sa bonne résolution par rapport aux autres β -bloquants.

Nous pouvons également remarquer que la substitution du groupement phényle en position para (aténolol) semble gêner son inclusion à l'intérieur de la CD, ce qui explique sa faible résolution ($R_s=0.42$). Néanmoins, tel que cela a été précédemment mis en lumière, la forte rétention du tertatolol (due à son hydrophobicité), par rapport au propranolol, semble être dû aux fortes interactions non stéréo-sélectives entre ce soluté et la cyclodextrine.

Concernant la famille des bronchodilatateurs, communément utilisés pour le traitement de l'asthme [58], nous pouvons également apprécier l'effet de la position ainsi que la nature des substituants du groupement phényle adjacent au centre stéréogénique. Ainsi, la substitution des groupements hydroxyles de l'isoprotérénol par des chlores (dichloroisoprotérénol) semble affecter négativement la résolution chirale qui passe de 2.28 à 1.02. Ceci peut être expliqué par le fait que, contrairement aux chlores, les groupements hydroxyles génèrent aisément des liaisons hydrogènes avec le sélecteur chirale, ces liaisons sont très importantes lors de la formation des trois points d'interaction nécessaire pour la caractérisation chirale, tel que cela a été stipulé par Dalglish [59].

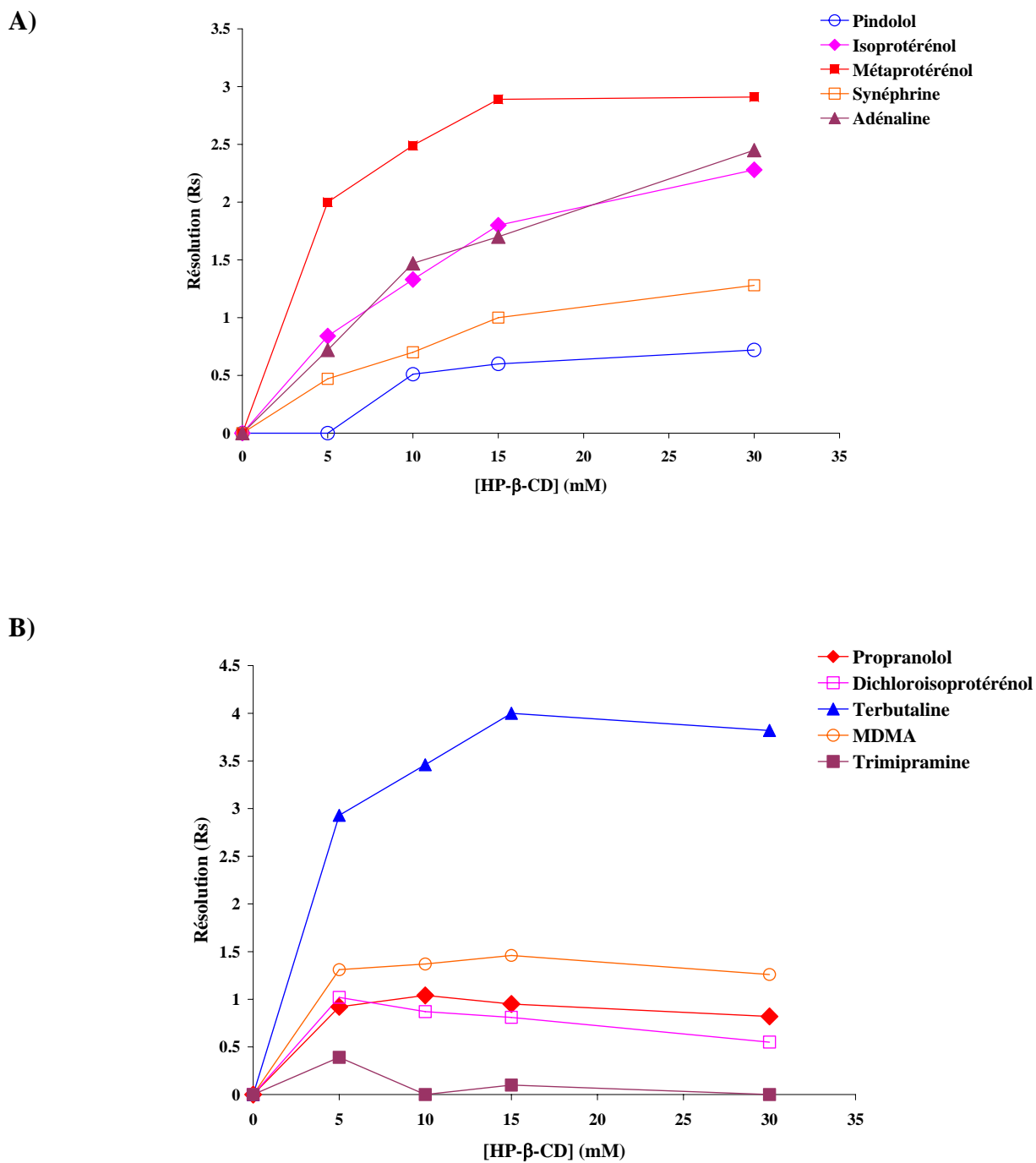


Figure 6 : Effet de la concentration de la HP-β-CD sur la résolution chirale de quelques solutés par EC (voir conditions expérimentales sur le tableau 3).

Nous pouvons également observer que le OH en position para de l'isoprotérénol influe négativement sur la résolution chirale. En effet la métaprotérénol dont le phényle est substitué en position méta est mieux séparé ($R_s=2.91$). La meilleure résolution pour cette famille de médicament a été obtenue pour la terbutaline ($R_s=4.00$), en effet ce soluté porte les hydroxyles en position méta, et contrairement au métaprotérénol, possède un groupement tertbutyle sur l'amine ce qui lui confère une plus grande hydrophobicité.

L'ordre croissant des résolutions chirales obtenues pour les amphétamines peut être directement corrélé à leur hydrophobicité. En effet, plus la chaîne alkyle substituant le groupement amine est longue, meilleure est la séparation, ce même comportement a été également observé pour l'adrénaline et la noradrénaline. Néanmoins, aucune résolution chirale n'a pu être obtenue pour la méthamphétamine. Notons également que l'ecstasy ou MDMA est la mieux résolue avec un $R_s = 1.46$. Concernant la séparation de l'éphédrine, nous pouvons voir que les caractéristiques structurales de ce soluté sont plus proches des agonistes β -adrénergiques. En effet, l'éphédrine ne contient pas de groupement hydroxyle contrairement à la synéphrine ($R_s=1.28$) ce qui explique sa moins bonne résolution ($R_s=1.00$). Nous pouvons également noter que la trimipramine est le soluté le moins résolu, cela doit être dû à sa structure encombrante, constituée de trois cycles aromatiques, ce qui semble affaiblir la constante de stabilité du complexe formé entre ce soluté et la CD.

Afin de conclure cette partie nous avons comparé les résultats obtenus lors de l'utilisation de la HP- β -CD à ceux obtenus par Quang et Khaledi qui ont testé la β -CD native, la diméthyle- β -CD et la triméthyle- β -CD pour la résolution chirale de quelques produits pharmaceutiques par électrophorèse capillaire dans les mêmes conditions opératoires (Tampon phosphate (50 mM, pH 2.5)) (Figure 7) [52]. Ainsi, la diméthyle- β -CD a donné des résolutions comparables aux nôtres pour quelques solutés, alors que la triméthyle- β -CD s'est montrée totalement inefficace. Il est à noter que le sélecteur chiral utilisé dans ce travail a permis la résolution de tous les composés testés.

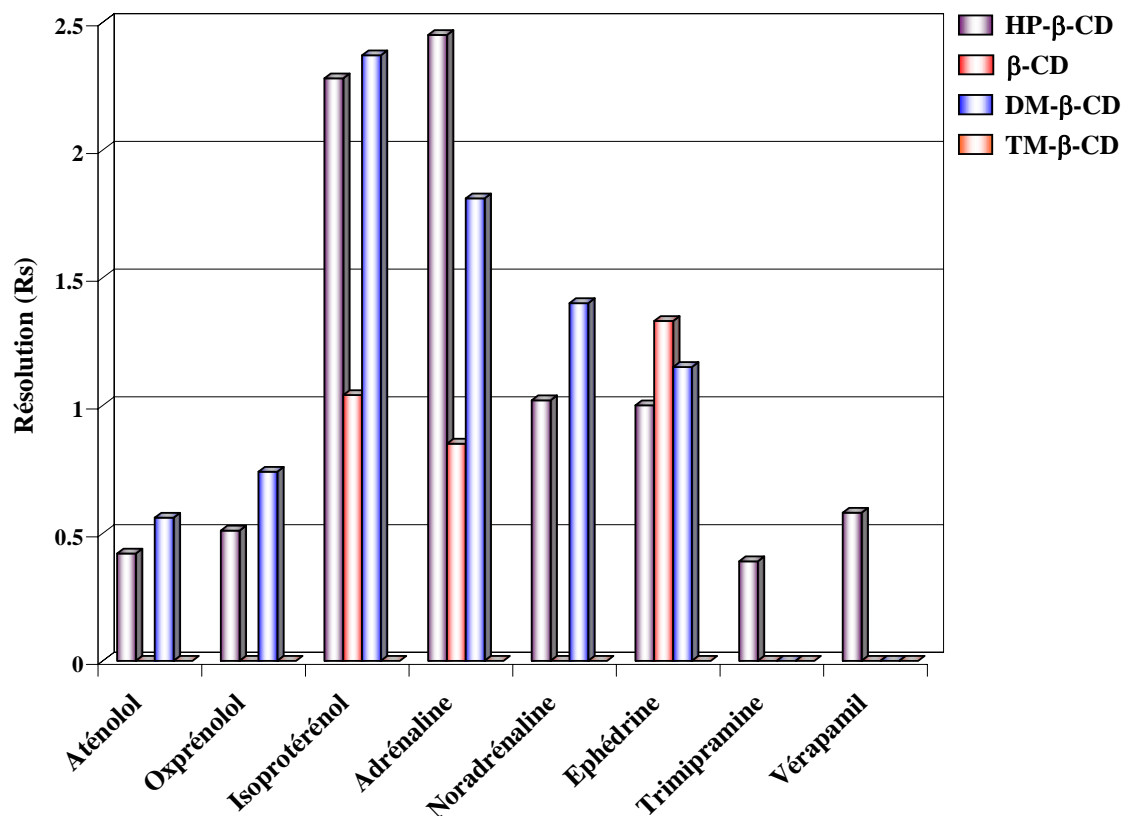


Figure 7 : Comparaison des résultats optimaux obtenus pour la HP-β-CD (voir le tableau 3) avec d'autres sélecteurs chiraux tirés de la littérature [52] (50 mM tampon phosphate, pH 2.5, [β-CD]=[DM-β-CD]=[TM-β-CD]=20 mM, voltage appliqué 20 kV).

III.2. Séparation des flavanones et flavanones glycosides par électrophorèse capillaire

Les flavanones sont des produits naturels neutres avec des pKa qui sont généralement supérieur à 10, à l'exception de celles qui portent un groupement hydroxyle à la position 7 (la 7-hydroxyflavanone, l'hespérétine et la naringénine). Ces dernières possèdent donc un caractère faiblement acide avec des pKa de l'ordre de 8 [60]. Par conséquent, ces composés ne seront pas ionisés pour des valeurs de pH comprises entre 3 et 8 [60,61], leur séparation nécessitera donc l'utilisation d'un sélecteur chiral ionique. La grande majorité des travaux recensés dans la littérature ont étudié la résolution des flavanones à des pH fortement basique et cela afin d'ioniser ces composés [61-65], cela leur a permis d'utiliser des sélecteurs chiraux non chargés. Cependant, il est largement admis que ce type de pH induit un flux électroosmotique trop important ce qui réduit la durée des interactions soluté-sélecteur chiral [19].

Les CDs anioniques ont prouvées à maintes reprises leur efficacité et leur performance par rapport à leurs homologues neutres et surtout cationiques (en effet ces dernières sont peu utilisées à cause de leur adsorption sur les parois du capillaire, faible solubilité et surtout leur faible pouvoir énantio-sélectif) [17, 66]. Les CDs chargées négativement ont permis ainsi la résolution d'une large gamme de produits optiquement actifs notamment ceux à caractère basique ou neutre. Leur pouvoir énantio-sélectif particulièrement élevé semble être dû à leur mobilité intrinsèque [56]. De nos jours, le dérivé anionique de la β -CD le plus utilisé et le plus efficace est très probablement la sulfobutyl- β -cyclodextrine (SBE- β -CD) [17, 67]. Cette cyclodextrine a été utilisée pour la première fois en électrophorèse capillaire par Chankvetadze et al. en 1994, et cela dans le but de séparer les énantiomères de la thalidomide [27]. Cette CD est substituée aléatoirement aux positions 2, 3 et 6 par des groupements sulfobutyles avec un degré de substitution est égale à 4. Elle est également constituée d'un mélange d'isomères ce qui explique le fait que les concentrations seront présentées en mg mL⁻¹ au lieu du mM conventionnel. La SBE- β -CD se comporte comme un tétra anion à n'importe quelle valeur de pH, ce qui lui confère un large domaine d'application [68, 69].

Fillet et al. ont proposé un protocole analytique pour la séparation des énantiomères par électrophorèse capillaire. Ce protocole est subdivisé en deux approches suivant la nature basique ou acide (et neutre) du composé. Dans les deux cas, il préconise l'utilisation d'un tampon phosphate à pH 3, car les meilleures séparations chirales sont obtenues lorsque les composés à caractère acide sont sous leur forme neutre [55], il seront ainsi détectés à l'anode, d'où la nécessité d'inverser la polarité de l'appareil [70].

Le but de cette seconde partie du travail est donc d'étudier la séparation des énantiomères de flavanones et des diastéréoisomères des flavanones glycosides par électrophorèse capillaire. Pour cela, nous avons utilisé un sélecteur chiral anionique, la sulfobutyle éther- β -cyclodextrine, l'électrolyte de départ est constitué d'un tampon phosphate de concentration de 45 mM et de pH égale à 3. Nous avons travaillé en mode de polarité inversée avec un voltage fixé à -15 kV. Cette étude a été effectuée sur deux types de colonnes capillaires, la première est non modifiée, la seconde est une colonne dont les parois internes ont été modifiées chimiquement par greffage covalent du polyacrylamide.

III.2.1. Résolution des flavanones sur une colonne capillaire non modifiée

Les résultats électrophorétiques obtenus lors de la séparation chirale des flavanones et flavanones glycosides sur une colonne capillaire non modifiée sont résumés sur le tableau 4. Quelques électrophérogrammes sont présentés sur la figure 8. Ainsi, nous pouvons voir, parmi les 12 flavanones injectées, seules les flavanones glycosides (hespéridine et naringine) ont été complètement résolues, Quand aux 6 autres flavanones, elles ont pu être partiellement séparées.

Tel que cela a été décrit précédemment, l'utilisation d'un sélecteur chiral chargée négativement en polarité inversée et de surcroît à un pH fortement acide, a un effet radical sur le flux électroosmotique. En effet, ce dernier devient totalement négligeable, par conséquent les solutés neutres deviennent mobiles uniquement lorsqu'ils sont complexés avec la CD chargée [53], à cela s'ajoute l'augmentation de leur temps de migration ce qui leur permettra de mieux interagir avec la cyclodextrine [5]. C'est dans ce cas de figure, que Chiari et al. ont affirmé que nous pouvons confondre les mobilités effectives et apparentes du soluté [31].

En ce qui nous concerne, nous avons vérifié ce postulat en injectant l'alcool benzylique (marqueur neutre pour déterminer la mobilité du FEO [71]), ainsi, aucun pic n'a été observé même après 90 minutes de son injection ce qui démontre le très faible effet du FEO sur la mobilité des solutés injectés. C'est pour cette raison que sur le tableau 4, nous avons directement mis les mobilités apparentes.

Afin d'étudier l'effet de la concentration du sélecteur chiral sur la mobilité électrophorétique ainsi que la résolution énantiomérique des flavanones, nous avons fait varier ce paramètre de 0.5 mg mL^{-1} à 10 mg mL^{-1} . Nous pouvons voir à partir du tableau 4 que l'augmentation de la concentration du sélecteur chiral accroît la mobilité des solutés, ce qui était totalement prévisible ; en effet, vu que l'effet du FEO est négligeable, la migration des flavanones (complexées avec la SBE- β -CD) dépendra uniquement de la mobilité ainsi que de la quantité du sélecteur chiral anionique [72].

Tableau 4 : Résultats électrophorétiques obtenus lors de la résolution des flavanones et flavanones glycosides sur une colonne capillaire non modifiée.^{a,b}

| Composés | Concentration SBE-β-CD (mg mL ⁻¹) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|-----------------------------------------------|----------------|------|------|----------------|----------------|------|------|----------------|----------------|------|------|----------------|----------------|------|------|----------------|----------------|------|------|
| | 0.5 | | | | 1 | | | | 2 | | | | 5 | | | | 10 | | | |
| | t ₁ | μ ₁ | α | Rs | t ₁ | μ ₁ | α | Rs | t ₁ | μ ₁ | α | Rs | t ₁ | μ ₁ | α | Rs | t ₁ | μ ₁ | α | Rs |
| Flavanone | 28.70 | -0.75 | 1.08 | 0.77 | 17.82 | -1.21 | 1.04 | 0.50 | 11.63 | -1.85 | 1.00 | 0.00 | 10.20 | -2.11 | 1.00 | 0.00 | 7.76 | -2.78 | 1.00 | 0.00 |
| 7-Hydroxyflavanone | 17.08 | -1.26 | 1.07 | 0.53 | 10.77 | -2.00 | 1.03 | 0.53 | 9.61 | -2.24 | 1.01 | 0.31 | 8.57 | -2.51 | 1.00 | 0.00 | 7.24 | -2.98 | 1.00 | 0.00 |
| 6-Hydroxyflavanone | 24.10 | -0.89 | 1.00 | 0.00 | 12.42 | -1.74 | 1.00 | 0.00 | 9.77 | -2.21 | 1.00 | 0.00 | 8.88 | -2.43 | 1.00 | 0.00 | 7.41 | -2.91 | 1.00 | 0.00 |
| 4'-Hydroxyflavanone | 22.26 | -0.97 | 1.00 | 0.00 | 12.31 | -1.75 | 1.00 | 0.00 | 9.72 | -2.22 | 1.00 | 0.00 | 9.02 | -2.39 | 1.00 | 0.00 | 7.43 | -2.90 | 1.00 | 0.00 |
| 2'-Hydroxyflavanone | 16.12 | -1.34 | 1.00 | 0.00 | 10.44 | -2.06 | 1.03 | 0.34 | 9.04 | -2.39 | 1.03 | 0.36 | 8.46 | -2.55 | 1.02 | 0.54 | 7.10 | -3.04 | 1.02 | 1.00 |
| 7-Méthoxyflavanone | 17.06 | -1.26 | 1.05 | 0.58 | 10.93 | -1.97 | 1.02 | 0.52 | 8.92 | -2.42 | 1.00 | 0.00 | 8.70 | -2.48 | 1.00 | 0.00 | 7.29 | -2.96 | 1.00 | 0.00 |
| 6-Méthoxyflavanone | 23.00 | -0.94 | 1.00 | 0.00 | 12.36 | -1.74 | 1.00 | 0.00 | 9.42 | -2.29 | 1.00 | 0.00 | 9.11 | -2.37 | 1.00 | 0.00 | 7.42 | -2.90 | 1.00 | 0.00 |
| 4'-Méthoxyflavanone | 22.19 | -0.97 | 1.00 | 0.00 | 12.32 | -1.75 | 1.01 | 0.36 | 9.40 | -2.29 | 1.00 | 0.00 | 9.12 | -2.36 | 1.00 | 0.00 | 7.53 | -2.86 | 1.00 | 0.00 |
| Hespérétine | 11.71 | -1.84 | 1.02 | 0.19 | 9.12 | -2.36 | 1.01 | 0.11 | 7.84 | -2.75 | 1.00 | 0.00 | 8.08 | -2.67 | 1.00 | 0.00 | 6.97 | -3.09 | 1.00 | 0.00 |
| Naringénine | 14.55 | -1.48 | 1.00 | 0.00 | 9.91 | -2.18 | 1.00 | 0.00 | 8.07 | -2.67 | 1.00 | 0.00 | 8.22 | -2.62 | 1.00 | 0.00 | 6.98 | -3.09 | 1.00 | 0.00 |
| Hespéridine | 26.31 | -0.82 | 1.25 | 3.89 | 12.90 | -1.67 | 1.09 | 2.89 | 9.81 | -2.20 | 1.06 | 2.27 | 9.39 | -2.30 | 1.03 | 2.23 | 7.95 | -2.71 | 1.02 | 1.20 |
| Naringine | 90.57 | -0.24 | 1.38 | 5.61 | 27.50 | -0.78 | 1.25 | 4.34 | 15.91 | -1.36 | 1.15 | 2.77 | 13.02 | -1.66 | 1.11 | 3.13 | 9.55 | -2.26 | 1.05 | 1.36 |

^a: Capillaire non modifié 48.5 (40 longueur effective) cm x 75 μm D.I., électrolyte: 45 mM tampon phosphate, pH 3, contenant différentes concentrations de SBE-β-CD; voltage -15 kV; injection par pression 50 mbar x 08 s.

^b: μ₁: 10⁻⁴cm⁻²V⁻¹s⁻¹, t₁ (min)

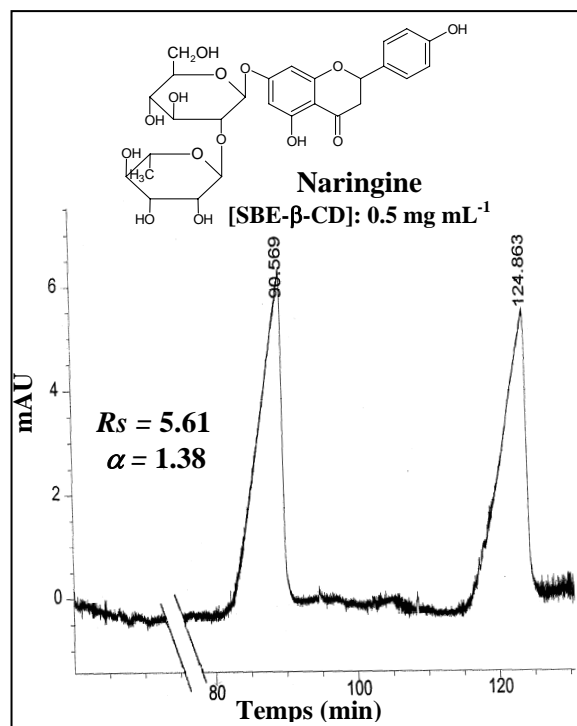
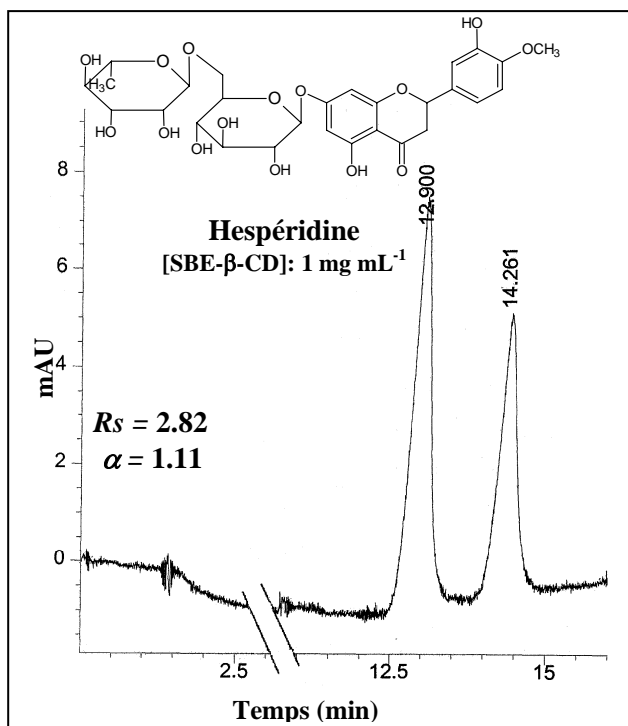
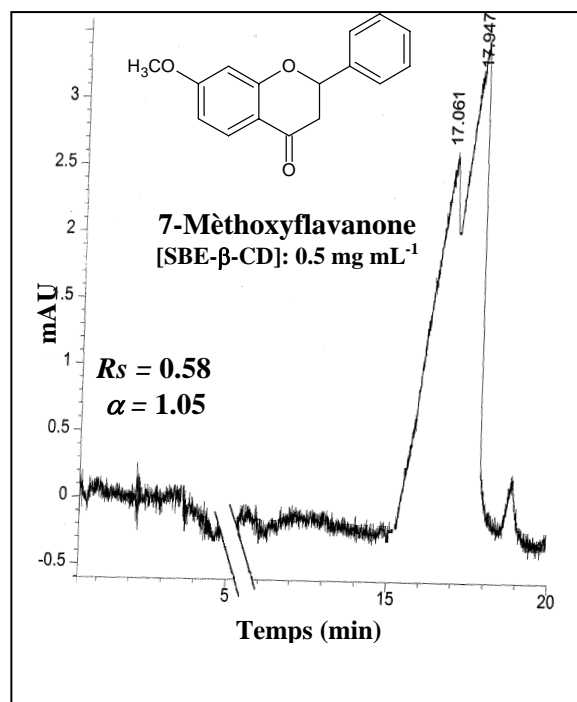
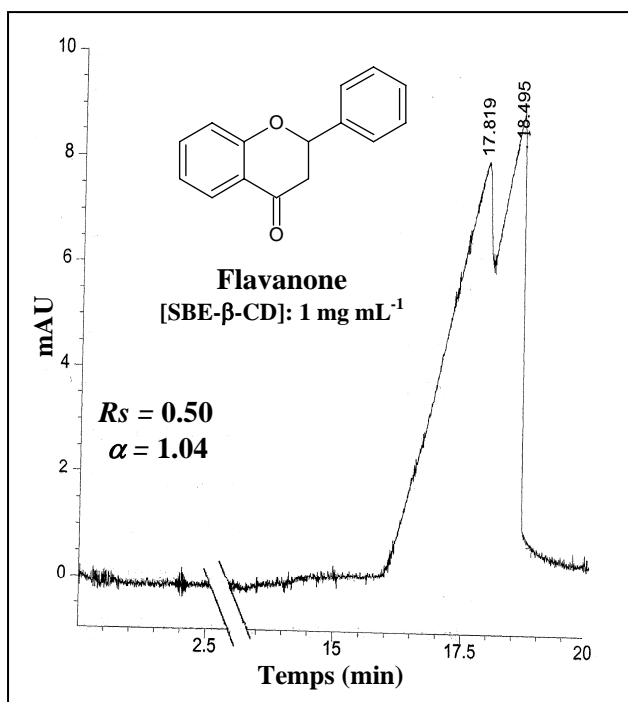


Figure 8 : Quelques électrophérogrammes des flavanones et flavanones glycosides séparés sur une colonne capillaire non modifiée.
(Voir conditions opératoires sur le tableau 4)

L'augmentation de la mobilité due à l'utilisation de grandes concentrations en SBE- β -CD se traduit par une diminution des temps de migration, ce qui signifie que les flavanones auront moins de temps pour établir des interactions stéréo-sélectives avec la cyclodextrine ce qui explique les faibles résolutions obtenues ; néanmoins, la 2'-hydroxyflavanone constitue une exception à cette règle, en effet la meilleure séparation chirale de ce composé a été obtenue avec la concentration en sélecteur chiral la plus élevée (10 mg mL⁻¹). Ce phénomène semble être dû à la forte complexation du soluté avec la CD, donc l'augmentation de la concentration du sélecteur augmente les chances d'interactions stéréo-sélectives entre la cyclodextrine et le soluté [68].

Il a été précédemment démontré que la séparation chirale des flavonoïdes par électrophorèse capillaire était fortement influencée par la valeur du pH de l'électrolyte [73]. C'est pour cela que nous avons entrepris l'étude de ce paramètre. Ainsi, en plus de l'étude menée à pH 3 (tableau 4) nous avons sélectionné deux autres valeurs, à savoir pH 5 et 7. Pour cela deux tampons de migration ont été utilisés : le premier électrolyte était à base d'un tampon acétate de concentration 45 mM et de pH 5, le second à base d'un tampon phosphate pH 7. Afin de mieux apprécier les résultats obtenus nous les avons comparé à ceux obtenus à pH 3. La concentration de SBE- β -CD ajoutée à l'électrolyte était de 1 mg mL⁻¹, le choix de cette valeur est basé sur les résultats obtenus à pH 3 ; en effet, de bonnes résolutions ont pu être achevées avec des temps de migration acceptables.

Contrairement à ce qui a été observé à pH 3, le flux électroosmotique n'est plus négligeable sur une colonne capillaire non modifiée à pH 5 ; en effet, plus le pH augmente, plus les groupements silanols seront dissociés ce qui a pour résultat l'augmentation du FEO [73]. C'est pour cela que la première étape (avant de commencer l'étude) a été la mesure de la mobilité du FEO. Ainsi, le temps de migration et la mobilité de l'alcool benzylique ont été respectivement estimés à 6.13 min et $-3.52 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$. Par ailleurs, nous pouvons remarquer à partir de la figure 9A que l'augmentation du pH entraîne une augmentation de la mobilité des flavanones. Ces dernières sont, en effet, éluées plus rapidement grâce au FEO, ce qui laisse moins de temps aux flavanones d'établir des interactions stéréo-sélectives avec le sélecteur chiral. Ceci explique l'altération de la résolution pour tous les solutés injectés (Figure 9 B) [28].

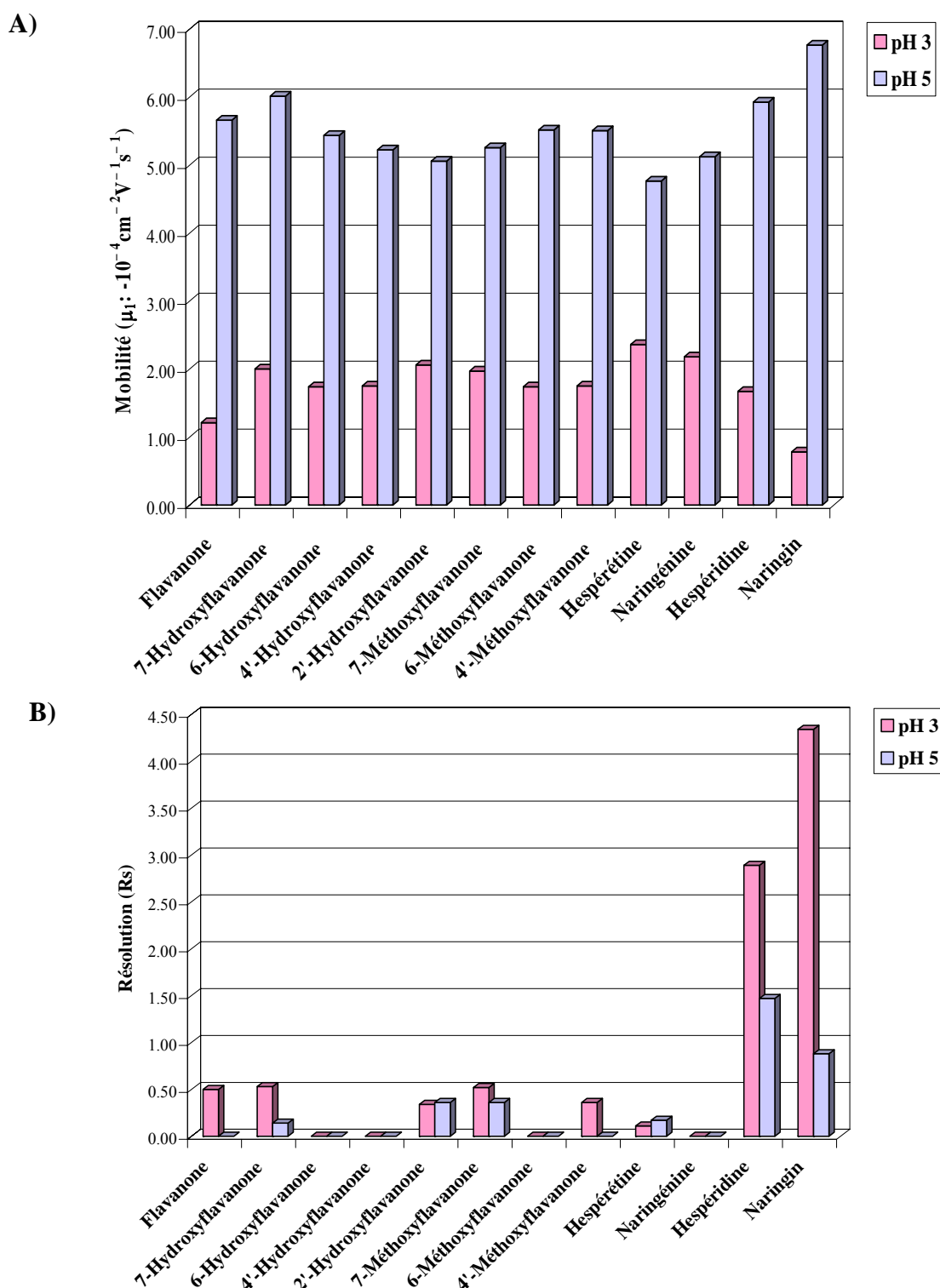


Figure 9 : Effet de la valeur du pH sur la mobilité (A) et la résolution (B) des flavanones et flavanones glycosides (Capillaire non modifié 48.5 (40 longueur effective) cm x 75 μm D.I., électrolyte: 45 mM tampon phosphate pH 3 ou 45 mM tampon acétate pH 5, contenant 1 mg mL⁻¹ de SBE-β-CD; voltage -15 kV; injection par pression 50 mbar x 08 s).

Malencontreusement, nous n'avons pas pu poursuivre la suite de l'étude de l'effet du pH et cela à cause de fortes fluctuations qui ont été observées sur la ligne de base lors de l'analyse des flavanones à pH 7. Ce fait notifie la détérioration de la colonne capillaire. Nous pouvons expliquer ce phénomène par la forte dissociation des groupements silanols de la colonne capillaire lorsqu'on augmente le pH (d'où l'augmentation du FEO). Cette dissociation a pour effet direct l'augmentation de l'absorptivité de la surface intérieure de la colonne vis à vis des solutés, des sélecteurs chiraux ainsi que leurs impuretés [36]. Belder et al. ont également observé cette détérioration lors de l'utilisation des colonnes capillaires non modifiées aux pH neutres [74]. Un autre inconvénient, relatif à l'utilisation de ce type de colonnes a été observé, il concerne la faible reproductibilité des résultats obtenus à pH 3 et 5, ce qui est d'après Janini et al. caractéristique de ce type de colonnes [36]. Dans le but de palier à tous ces désagréments, nous nous sommes donc intéressés aux colonnes capillaires chimiquement modifiées.

III.2.2. Résolution des flavanones sur une colonne capillaire modifiée

La non reproductibilité des résultats, l'adsorption des solutés sur la surface du capillaire et l'instabilité du flux électroosmotique le long du tube capillaire sont les principales raisons qui ont amenés les chercheurs à s'intéresser aux capillaires dit « modifiés » [40,75]. En effet, en recouvrant les parois internes de la colonne capillaire avec un polymère, il serait possible de supprimer les sites actifs responsables de la création du FEO et de l'absorption des solutés. Ces sites concerneraient entre autres les ponts siloxanes inertes et les groupements silanols [76].

C'est dans cette optique que plusieurs travaux de recherche ont été menés afin de trouver la meilleure méthode de modification des parois internes des colonnes capillaires [32-37]. Ainsi, les colonnes capillaires modifiées par greffage covalent du polyacrylamide introduites par le suédois Hjertén en 1985 [35] ont largement démontré leur performance vis-à-vis des autres méthodes de greffage ultérieurement développées, ce qui explique leur utilisation intensive [25,37,40]. Ainsi, du fait de la neutralité et de la haute hydrophobicité du polymère obtenu, les interactions soluté/parois du capillaire sont totalement inhibées, de plus grâce à l'homogénéité du greffage, le FEO est totalement supprimé en tout point du tube capillaire [31,40].

La caractérisation du capillaire modifié est extrêmement difficile et cela à cause de sa petite dimension ainsi que l'inaccessibilité relative de la fine surface polymérisée. Ainsi, le test de ce type de capillaire se fait par injection d'un marqueur neutre (généralement l'alcool benzylique) et de mesurer son temps de migration [40]. Pour notre part, nous avons injecté ce marqueur sur une colonne capillaire non modifiée avec un électrolyte constitué de 50 mM tampon phosphate pH 2.5. Le temps de migration obtenu était de 19 min. Nous avons ensuite effectué ce test sous les mêmes conditions opératoires (électrolyte, pH, concentration, voltage) sur la colonne capillaire modifiée. 80 min après l'injection du marqueur, aucun pic n'a été observé sur l'électrophérogramme ce qui indique la réussite du greffage [77].

Nous avons analysé les flavanones sur cette colonne sous les mêmes conditions opératoires utilisées pour le capillaire non modifié. Nous avons utilisé un électrolyte à base de 45 mM de tampon phosphate pH 3 ; les résultats obtenus sont présentés sur le tableau 5, quelques électrophérogrammes sont présentés sur la figure 10.

Ainsi, 10 flavanones ont pu être séparées, notamment la 6-hydroxyflavanone et la naringénine qui n'ont pas pu être séparées sur la colonne capillaire non modifiée ; nous avons également observé une parfaite reproductibilité des résultats, une meilleure allure des pics, une ligne de base stable ainsi que des mobilités électrophorétiques supérieures à celles obtenues avec le capillaire non modifié.

Tableau 5 : Résultats électrophorétiques obtenus lors de la séparation chirale des flavanone et flavanones glycosides sur une colonne capillaire modifiée.^{a,b}

| Composés | Concentration SBE-β-CD (mg mL ⁻¹) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|-----------------------------------------------|----------------|------|------|----------------|----------------|------|------|----------------|----------------|------|------|----------------|----------------|------|------|----------------|----------------|------|------|
| | 0.5 | | | | 1 | | | | 2 | | | | 5 | | | | 10 | | | |
| | t ₁ | μ ₁ | α | Rs | t ₁ | μ ₁ | α | Rs | t ₁ | μ ₁ | α | Rs | t ₁ | μ ₁ | α | Rs | t ₁ | μ ₁ | α | Rs |
| Flavanone | 18.97 | -1.14 | 1.04 | 0.56 | 13.49 | -1.60 | 1.03 | 0.56 | 10.10 | -2.13 | 1.01 | 0.38 | 9.42 | -2.29 | 1.01 | 0.25 | 8.25 | -2.61 | 1.00 | 0.00 |
| 7-Hydroxyflavanone | 12.92 | -1.67 | 1.05 | 0.48 | 9.78 | -2.20 | 1.03 | 0.30 | 8.39 | -2.57 | 1.01 | 0.28 | 8.18 | -2.64 | 1.00 | 0.00 | 7.62 | -2.83 | 1.00 | 0.00 |
| 6-Hydroxyflavanone | 14.01 | -1.54 | 1.01 | 0.21 | 11.05 | -1.95 | 1.02 | 0.47 | 8.94 | -2.41 | 1.00 | 0.00 | 8.49 | -2.54 | 1.00 | 0.00 | 7.75 | -2.78 | 1.00 | 0.00 |
| 4'-Hydroxyflavanone | 14.80 | -1.46 | 1.00 | 0.00 | 10.88 | -1.98 | 1.00 | 0.00 | 9.04 | -2.38 | 1.00 | 0.00 | 8.57 | -2.51 | 1.00 | 0.00 | 7.80 | -2.76 | 1.00 | 0.00 |
| 2'-Hydroxyflavanone | 10.35 | -2.08 | 1.07 | 0.78 | 8.72 | -2.47 | 1.04 | 0.78 | 7.76 | -2.78 | 1.03 | 0.84 | 7.32 | -2.95 | 1.02 | 0.81 | 7.24 | -2.98 | 1.02 | 0.97 |
| 7-Méthoxyflavanone | 13.12 | -1.64 | 1.04 | 0.58 | 10.51 | -2.05 | 1.02 | 0.40 | 8.73 | -2.47 | 1.00 | 0.00 | 8.24 | -2.62 | 1.00 | 0.00 | 7.49 | -2.88 | 1.00 | 0.00 |
| 6-Méthoxyflavanone | 15.85 | -1.36 | 1.00 | 0.00 | 11.84 | -1.82 | 1.00 | 0.00 | 9.30 | -2.32 | 1.00 | 0.00 | 8.35 | -2.58 | 1.00 | 0.00 | 7.79 | -2.77 | 1.00 | 0.00 |
| 4'-Méthoxyflavanone | 15.57 | -1.38 | 1.00 | 0.00 | 11.58 | -1.86 | 1.01 | 0.31 | 9.14 | -2.36 | 1.00 | 0.00 | 8.50 | -2.54 | 1.00 | 0.00 | 7.77 | -2.77 | 1.00 | 0.00 |
| Hespérétine | 9.50 | -2.27 | 1.02 | 0.17 | 8.22 | -2.62 | 1.00 | 0.00 | 7.57 | -2.85 | 1.00 | 0.00 | 7.22 | -2.99 | 1.00 | 0.00 | 7.21 | -2.99 | 1.00 | 0.00 |
| Naringénine | 10.94 | -1.97 | 1.01 | 0.09 | 8.92 | -2.42 | 1.00 | 0.00 | 7.89 | -2.73 | 1.00 | 0.00 | 7.69 | -2.80 | 1.00 | 0.00 | 7.26 | -2.97 | 1.00 | 0.00 |
| Hespéridine | 13.89 | -1.55 | 1.15 | 2.72 | 11.99 | -1.80 | 1.10 | 2.49 | 9.58 | -2.25 | 1.06 | 1.89 | 8.90 | -2.42 | 1.03 | 1.50 | 8.35 | -2.58 | 1.02 | 1.11 |
| Naringine | 42.41 | -0.51 | 1.28 | 4.06 | 25.57 | -0.84 | 1.21 | 3.19 | 15.45 | -1.40 | 1.14 | 2.91 | 11.34 | -1.90 | 1.08 | 2.07 | 9.93 | -2.17 | 1.05 | 1.79 |

^a: Capillaire modifiée 48.5 (40 longueur effective) cm x 75 μm D.I., électrolyte: 45 mM tampon phosphate, pH 3, contenant différentes concentrations de SBE-β-CD; voltage -15 kV; injection par pression 50 mbar x 08 s.

^b: μ₁: 10⁻⁴ cm⁻² V⁻¹ s⁻¹, t₁ (min)

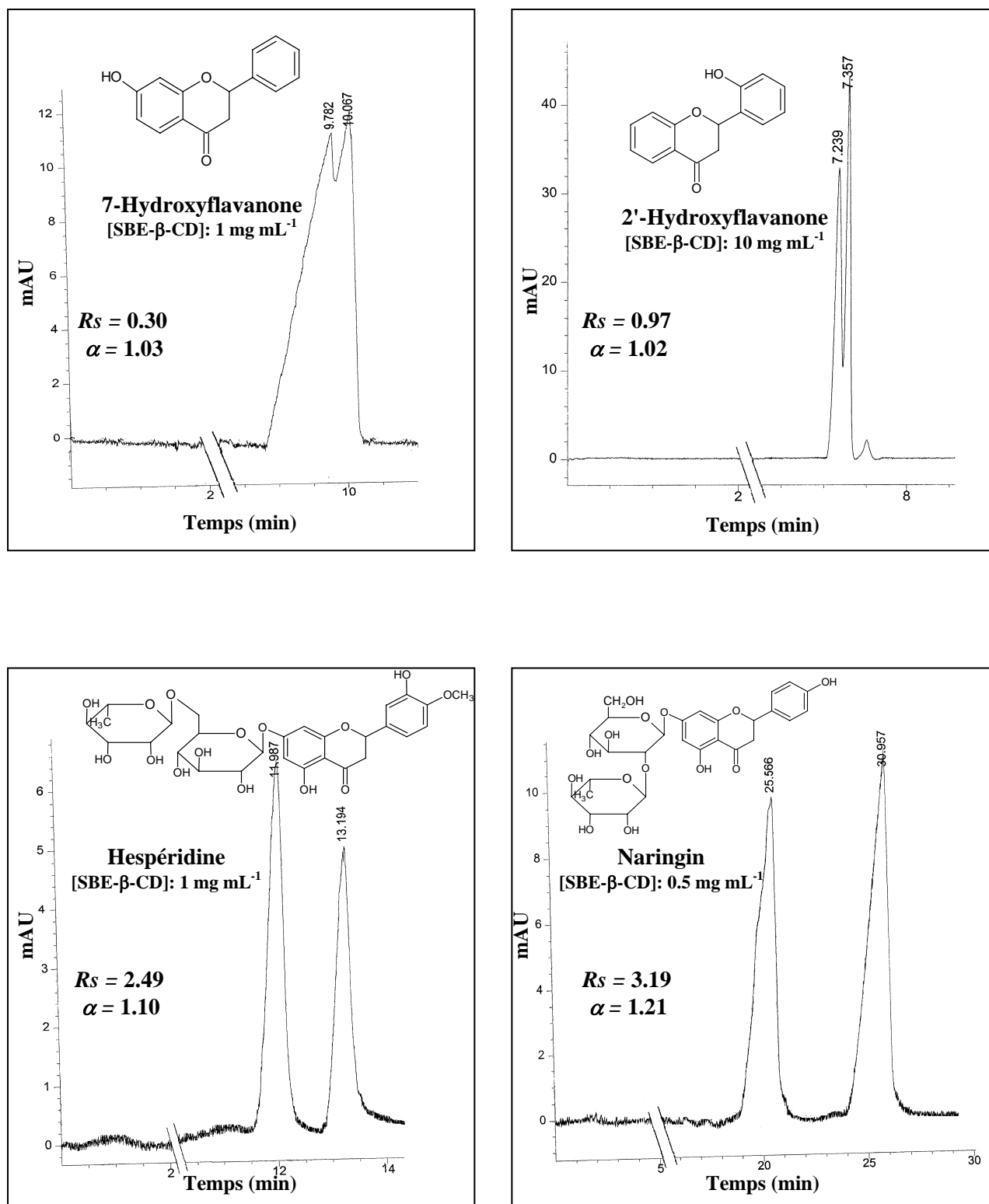


Figure 10 : Quelques électrophérogrammes des flavanones et flavanones glycosides séparés sur une colonne capillaire modifiée. (Voir conditions opératoires sur le tableau 5).

Tel que cela fut observé pour le capillaire non modifié, une augmentation de la concentration de la SBE- β -CD, augmente la mobilité des flavanones et diminue ainsi la résolution, exception faite pour la 2'-hydroxyflavanone qui est mieux résolue avec de faibles temps de migration. Il est intéressant de noter que même avec de faibles concentrations en sélecteur chiral (0.5 mg mL⁻¹), nous avons pu obtenir de très bonnes résolutions. Ce comportement est caractéristique des cyclodextrines négativement chargées [65]. L'étude de l'effet du pH de manière rigoureuse nécessite impérativement l'utilisation d'un capillaire modifié (sans FEO) ; en effet, avec un capillaire ordinaire l'effet du pH sur la résolution peut être dû à une variation du FEO et non pas à la variation du réarrangement sélecteur/soluté [66]. La stabilité de la colonne modifiée nous a permis de tester la séparation chirale des flavanones aux pH 5 et 7 ce qui n'était pas possible avec le capillaire à base de silice non greffée. Les résultats électrophorétiques obtenus sont présentés sur le tableau 6.

Si nous comparons les résultats obtenus pour une même concentration en SBE- β -CD, nous allons remarquer qu'une augmentation du pH conduit à une augmentation des temps de migration tout en altérant la résolution chirale, ce qui indique que la migration des solutés n'a pas été modifiée par des réactions stéréo-sélectives. A titre d'exemple nous pouvons citer le cas de la naringine dont le premier diastéréoisomère est détecté à 11.34 min avec une résolution de 2.07 à pH 3, alors qu'à pH 7 il est détecté à 14.87 min avec une Rs de 1.18. Nous pouvons expliquer ce comportement par l'augmentation de la mobilité du sélecteur chiral lorsque le pH augmente, ce qui laissera peu de temps à l'achèvement des interactions chirales induisant ainsi de faibles résolutions [28].

Il serait intéressant de noter le cas particulier de la 4'-hydroxyflavanone qui n'a été séparée qu'avec un tampon acétate à pH 5 auquel nous avons ajouté une concentration en SBE- β -CD de 2 mg mL⁻¹, ce qui démontre la complexité et l'imprévisibilité du mécanisme de résolution chirale en électrophorèse capillaire. Nous pouvons ainsi conclure d'une manière générale que le pH 3 a permis d'achever les meilleures séparations chirales.

Tableau 6 : Effet du pH sur la séparation chirale des flavanones et des flavanones glycosides sur une colonne capillaire modifiée.^{a,b}

| Composés | Tampon phosphate pH 3 | | | | Tampon acétate pH 5 | | | | Tampon phosphate pH 7 | | | |
|---------------------|-----------------------|----------------|------|------|---------------------|----------------|------|------|-----------------------|----------------|------|------|
| | t ₁ | μ ₁ | α | Rs | t ₁ | μ ₁ | α | Rs | t ₁ | μ ₁ | α | Rs |
| Flavanone | 9.42 | -2.29 | 1.01 | 0.25 | 8.77 | -2.46 | 1.00 | 0.00 | 9.80 | -2.20 | 1.00 | 0.00 |
| 7-Hydroxyflavanone | 8.18 | -2.64 | 1.00 | 0.00 | 8.15 | -2.64 | 1.00 | 0.00 | 8.51 | -2.53 | 1.00 | 0.00 |
| 6-Hydroxyflavanone | 8.49 | -2.54 | 1.00 | 0.00 | 8.44 | -2.55 | 1.00 | 0.00 | 8.85 | -2.44 | 1.00 | 0.00 |
| 4'-Hydroxyflavanone | 8.57 | -2.51 | 1.00 | 0.00 | 8.47 | -2.54 | 1.00 | 0.00 | 9.22 | -2.34 | 1.00 | 0.00 |
| 2'-Hydroxyflavanone | 7.32 | -2.95 | 1.02 | 0.81 | 7.98 | -2.70 | 1.02 | 0.86 | 8.62 | -2.50 | 1.02 | 0.35 |
| 7-Méthoxyflavanone | 8.24 | -2.62 | 1.00 | 0.00 | 8.16 | -2.64 | 1.00 | 0.00 | 9.04 | -2.39 | 1.00 | 0.00 |
| 6-Méthoxyflavanone | 8.35 | -2.58 | 1.00 | 0.00 | 8.20 | -2.63 | 1.00 | 0.00 | 9.70 | -2.22 | 1.00 | 0.00 |
| 4'-Méthoxyflavanone | 8.50 | -2.54 | 1.00 | 0.00 | 8.62 | -2.50 | 1.00 | 0.00 | 9.17 | -2.35 | 1.00 | 0.00 |
| Hespérétine | 7.22 | -2.99 | 1.00 | 0.00 | 7.90 | -2.73 | 1.00 | 0.00 | 8.44 | -2.55 | 1.01 | 0.12 |
| Naringénine | 7.69 | -2.80 | 1.00 | 0.00 | 8.12 | -2.65 | 1.00 | 0.00 | 8.88 | -2.43 | 1.00 | 0.00 |
| Hespéridine | 8.90 | -2.42 | 1.03 | 1.50 | 10.10 | -2.13 | 1.04 | 0.83 | 10.92 | -1.97 | 1.04 | 0.71 |
| Naringine | 11.34 | -1.90 | 1.08 | 2.07 | 14.28 | -1.51 | 1.11 | 1.37 | 14.87 | -1.45 | 1.12 | 1.18 |

^a : Capillaire modifiée 48.5 (40 longueur effective) cm x 75 μm D.I., électrolyte: 45 mM tampon de migration contenant 5 mg mL⁻¹ de SBE-β-CD; voltage : -15 kV; injection par pression : 50 mbar x 08 s.

^b : μ₁: 10⁻⁴ cm⁻² V⁻¹ s⁻¹, t₁ (min).

III.2.3. Mécanisme de la discrimination énantiomérique et diastéréomérique des flavanones par EC

Les flavanones adoptent une configuration en forme d'enveloppe [78]. L'atome de carbone en position C₂ (centre stéréogénique) se trouve hors du plan formé par le cycle pyranone (Figure 11). En ce qui concerne notre étude, la reconnaissance chirale des flavanones est réalisée grâce à la formation d'un complexe d'inclusion entre ces solutés et la SBE-β-CD [65]. Il a été précédemment démontré que le rutin (Figure 12), une flavanol naturel, forme un complexe d'inclusion de type 1:1 avec la β-CD, et cela grâce au groupement phényle du rutin qui pénètre à l'intérieur de la cavité hydrophobe de la CD [79,80]. Par conséquent, nous pouvons assumer que les flavanones analysées et la SBE-β-CD peuvent présenter une configuration spatiale similaire à celle du complexe rutine/β-CD.

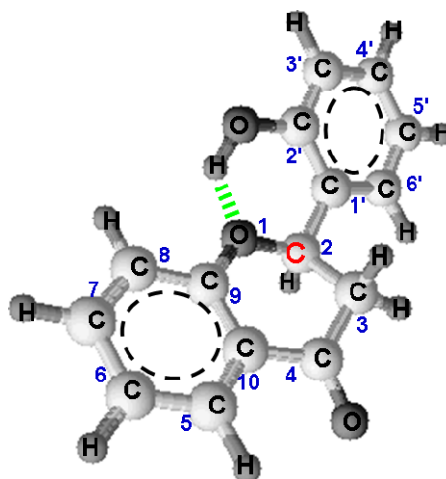


Figure 11 : Structure tridimensionnelle de la 2'-hydroxyflavanone en indiquant la présence d'une liaison hydrogène intramoléculaire

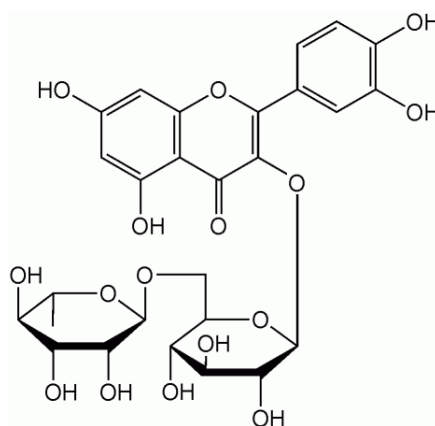


Figure 12 : Structure chimique de la rutine.

Les interactions hydrophobes entre le cycle aromatique des flavanones et la cavité de la cyclodextrine sont considérées comme les principales forces responsables de la caractérisation chirale. Cependant, bien que le groupement phényle inclus dans la CD soit commun à tous les flavanones étudiées, la reconnaissance chirale peut également être grandement affectée par la nature et le nombre de substituants du phényle. En effet, ces derniers influent sur la profondeur d'inclusion ainsi que la configuration tridimensionnelle du complexe formé [5]. En plus de la formation d'un complexe d'inclusion, les liaisons hydrogènes qui se forment entre les substituants polaires du soluté et la CD, jouent un rôle très important dans le mécanisme de séparation chirale [57].

L'hésperidine et la naringine sont les deux flavanones glycosides qui ont été le mieux séparées durant cette étude et cela indépendamment de la nature du capillaire ou du pH, par contre, leurs homologues aglycones l'hésperétine et la naringénine ont été faiblement résolus. Ceci pourrait s'expliquer par la présence du groupement diglycosyle ; en effet, ce groupement semble jouer un rôle clé dans la résolution chirale, notamment lors de la formation de liaisons hydrogènes avec les substituants de la CD, ce type de liaison stabilise le complexe hôte-soluté formé, tel que cela a été clairement démontré par Fronza et al. [81].

La 2'-hydroxyflavanone a été également assez bien séparée en comparaison aux autres flavanones aglycones notamment par rapport aux 4'-, 6- et 7-hydroxyflavanones. Nous pouvons expliquer ce résultat par les différentes spécificités structurales propres à la 2'-hydroxyflavanone qui pourrait favoriser la formation d'un complexe d'inclusion stable. Ainsi, à partir de la configuration de cette dernière, nous pouvons noter l'existence de liaisons hydrogènes intramoléculaires entre le H lié au centre stéréogénique et l'oxygène du groupement hydroxyle en position 2' (Figure 11), sans oublier l'existence d'interactions répulsives stériques entre le groupement 2'-hydroxyle et la cavité hydrophobe de la cyclodextrine [78,79].

Il semblerait également que la substitution de la flavanone en position 7, par un groupement hydroxyle ou méthoxy, favoriserait la caractérisation chirale. Nous pouvons donc conclure que cette position semble être privilégiée dans le mécanisme de caractérisation chirale notamment pour la formation de liaisons hydrogènes stéréo-sélectives avec les substituant de la SBE- β -CD.

Il serait important de signaler, qu'à notre connaissance, aucune séparation chirale par électrophorèse capillaire, même partielle, de la flavanone et des méthoxyflavanones, n'a été citée dans la littérature. La même remarque peut être notée concernant les valeurs des résolutions des flavanones glycosides, obtenues sur les colonnes capillaires modifiée non et modifiée. Une comparaison des différentes séparations chirales obtenues pour ces deux composés, durant la présente étude avec d'autres travaux citées dans la littérature, est illustrée sur la figure 13.

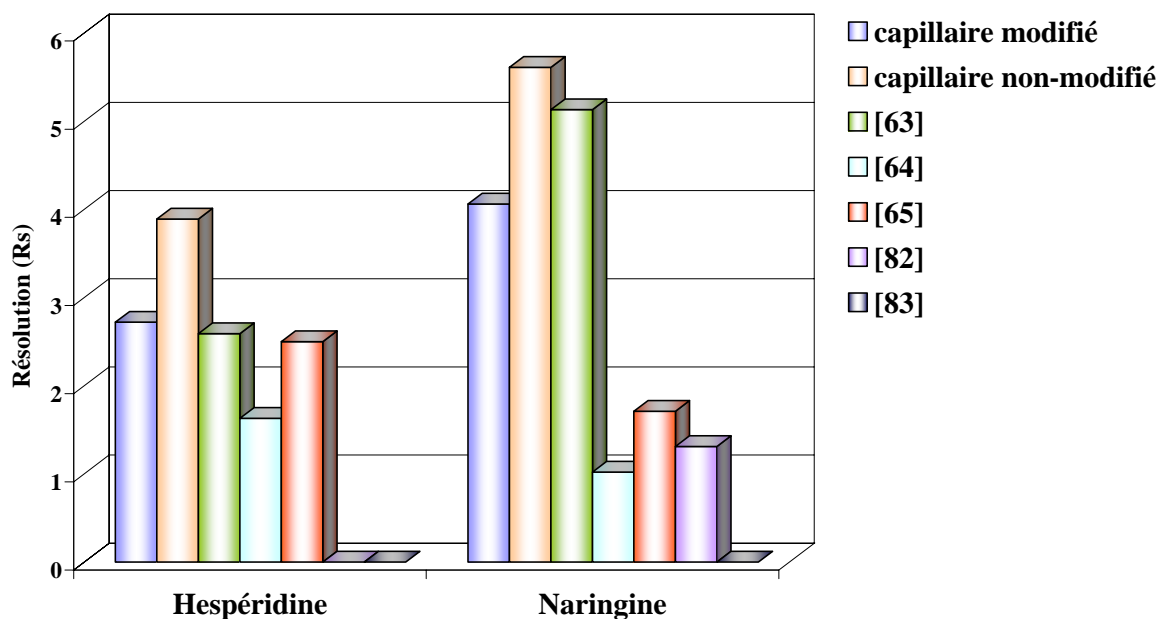


Figure 13 : Comparaison des séparations diastéréoisomériques obtenues lors du présent travail avec d'autres résultats cités dans la littérature.

III.3. Quantification diastéréomérique de l'hespéridine présente dans un jus d'orange commercial

L'hespéridine (HD) est un des principaux bioflavonoïdes présents chez les espèces du genre citrus (telles que l'oranger doux, le citronnier, le limettier ...) [84]. Ces derniers sont cultivés abondamment dans les régions tempérées chaudes (Bassin méditerranéen, Floride, Californie, Australie...) [85]. L'hespéridine est prédominante dans les écorces d'agrumes : orange, citron ou pamplemousse. En effet, la couche externe des écorces d'orange, appelée le flavédo, doit sa couleur jaune orangée aux flavanones [86,87]. Par contre c'est dans la peau et les parties membraneuses de ces fruits que se trouvent les concentrations les plus élevées en hespéridine. Par conséquent, le jus d'orange contenant la pulpe est plus riche en flavonoïdes que celui sans pulpe [88].

L'hésperidine a été découverte pour la première fois en 1827 par Lebreton, et dès lors plusieurs travaux de recherches intensifs lui ont été consacrés [89]. Notamment depuis la mise en lumière de ses nombreux bienfaits sur la santé humaine. Ainsi, grâce à ses propriétés anti-inflammatoires, elle diminue efficacement les œdèmes dus à l'accumulation des fluides extracellulaires.

Une carence en hésperidine peut causer des saignements, des douleurs aux extrémités des membres et des crampes musculaires au niveau des jambes, surtout pendant la nuit. Ces symptômes sont reliés à une insuffisance veineuse. De plus aucun signe de toxicité n'a été observé lors de l'ingestion de l'hésperidine [84].

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à la quantification diastéréomérique de l'hésperidine présente dans un jus d'orange sanguine pulpeux Oranfrizer®. Il a été obtenu des mandarines et oranges sanguines siciliennes. La quantification de n'importe quelle substance nécessite une méthode analytique parfaitement reproductible avec un temps d'analyse relativement court ; ainsi, à partir du travail d'optimisation effectué dans la partie III.2. (Page 84), nous avons sélectionné les conditions expérimentales suivantes : 5 mg mL⁻¹ de SBE-β-CD dissoute dans un tampon phosphate de concentration 45 mM et de pH 3. L'analyse a été effectuée sur une colonne capillaire modifiée par greffage covalent avec du polyacrylamide. En effet, avec ces conditions expérimentales l'hésperidine est totalement résolue ($R_s = 1.5$) avec un temps d'analyse inférieur à 10 min. La modification des parois intérieures du capillaire supprimeront les interactions qui pourraient s'établir entre les produits secondaires du jus d'orange et les groupements silanols du capillaire.

La quantification diastéréomérique de la HD a été effectuée suivant la méthode des ajouts dosés. Cette méthode consiste à faire des répliques de l'échantillon à analyser, en ajoutant à chacun d'eux des volumes croissants de l'élément à doser. On obtient ainsi une gamme de calibration croissante de même matrice et à volume final constant. L'analyse des échantillons : celui pour qui aucun ajout n'a été effectué et ceux avec les ajouts croissants, permet d'établir une droite d'étalonnage et de déduire la concentration inconnue [90].

La première étape de la quantification consiste d'abord, à l'extraction de la HD à partir du jus d'orange. Pour cela, nous nous sommes inspirés de la méthode d'extraction liquide-liquide proposée par Bronner et Beecher [91], mais en apportant quelques modifications. Ainsi, 5 mL de jus d'orange ont été mélangés à 15 mL de méthanol, ce mélange a été soumis à un agitateur vibrant type vortex pendant 2 min puis centrifugé à 3000 tour/min pendant 7 min. Nous avons récolté la solution obtenue et dilué le résidu solide avec un mélange constitué de 10 mL de MeOH et de 5 mL d'eau. Les mêmes étapes de mélange et de centrifugation ont été répétées pour cette seconde partie de l'extraction. La solution obtenue a été ajoutée à la première, et le résidu solide est redissout une dernière fois dans 15 mL d'eau, mélangée et centrifugé, la solution obtenue est ajoutée aux précédentes. Nous avons ensuite filtré l'extrait obtenu à travers un filtre 0.45 μm (Millipore, Milford, MA, USA) avant de l'injecter.

Nous avons préparé 6 solutions constituées de 0.5 mL d'extrait de jus auquel nous avons ajouté 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 et 0.5 mL d'hespéridine de concentration 0.5 mg/mL préparée dans un mélange eau/MeOH (1:1, v/v), puis nous avons complété les solutions obtenues avec de l'eau afin d'atteindre un volume final de 1 mL. La figure 14 illustre l'électrophérogramme représentant le jus analysé. Nous avons réalisé une courbe d'étalonnage des aires des pics en fonction du volume ajouté pour chaque diastéréoisomère. Ainsi, tel que nous pouvons voir sur la figure 15, les courbes d'étalonnage obtenues sont parfaitement linéaires avec un coefficient de corrélation linéaire r^2 égale à 0.997 et 0.996 pour les 2R- et 2S-hespéridine respectivement.

En prenant en compte les dilutions effectuées, ainsi que l'excès énantiomérique de chaque forme diastéréoisomérique dans l'hespéridine commerciale, nous avons trouvé que le jus analysé contenait 112.81 et 599.55 mg/L de (2R)- and (2S)-hespéridine, respectivement. L'identification des énantiomères (R) et (S) a été effectuée grâce à la bibliographie, qui stipule clairement que les flavonoïdes chiraux d'origine naturelle existent majoritairement sous la forme S [4].

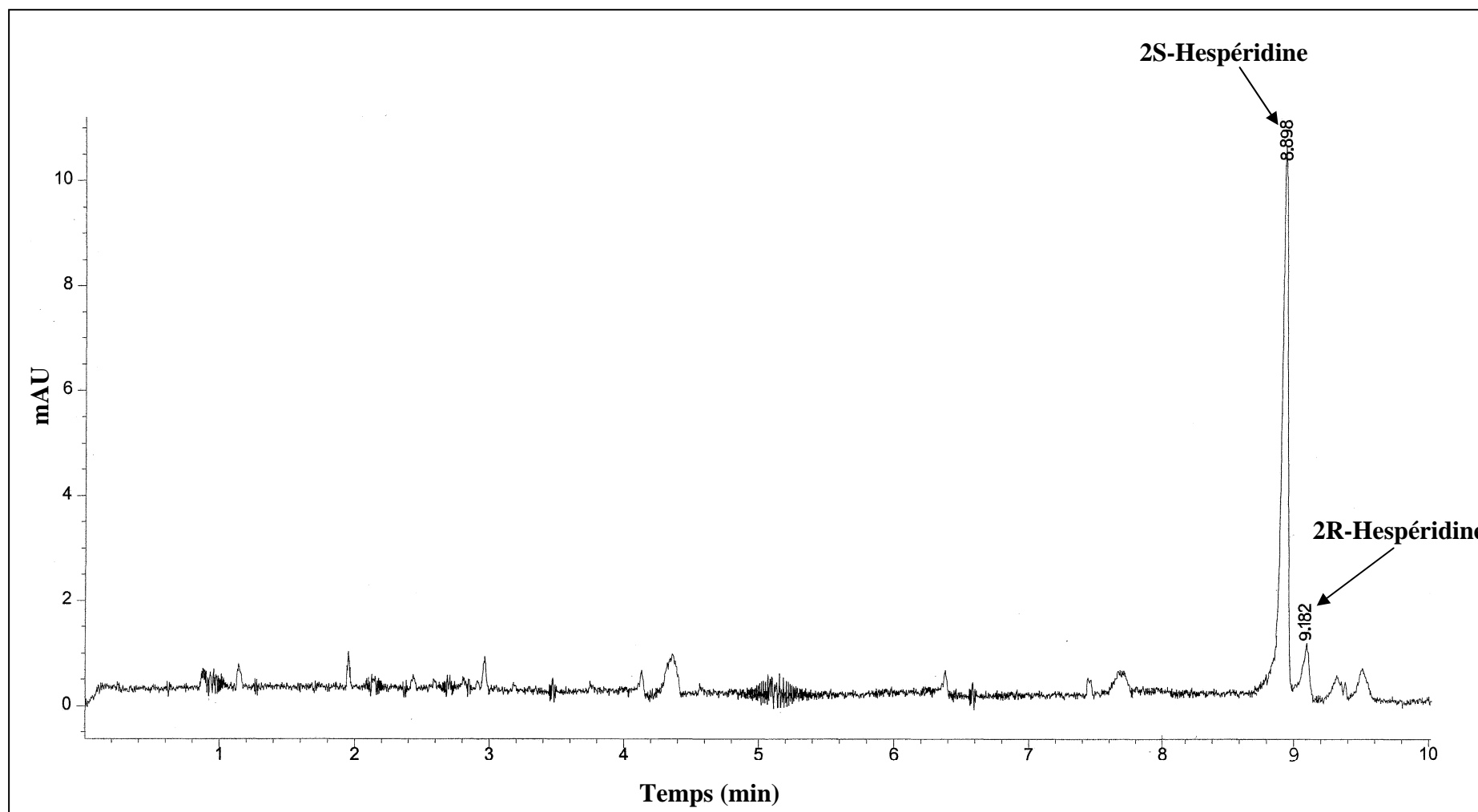


Figure 14 : Electrophérogramme du jus d'orange sanguine analysé (colonne capillaire modifiée, 45 mM tampon phosphate pH 3 contenant 5 mg mL^{-1} de SBE- β -CD, voltage : -15 kV; injection par pression : 50 mbar x 08 s).

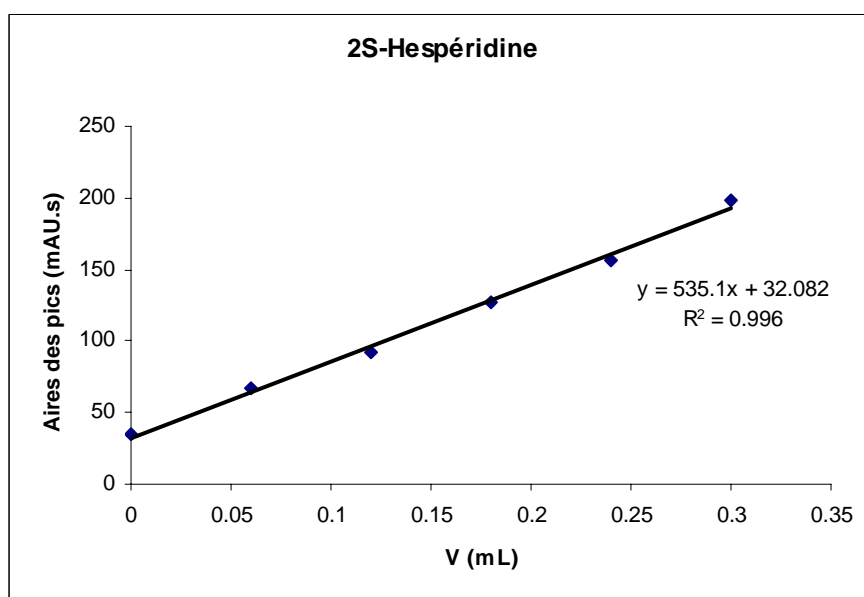
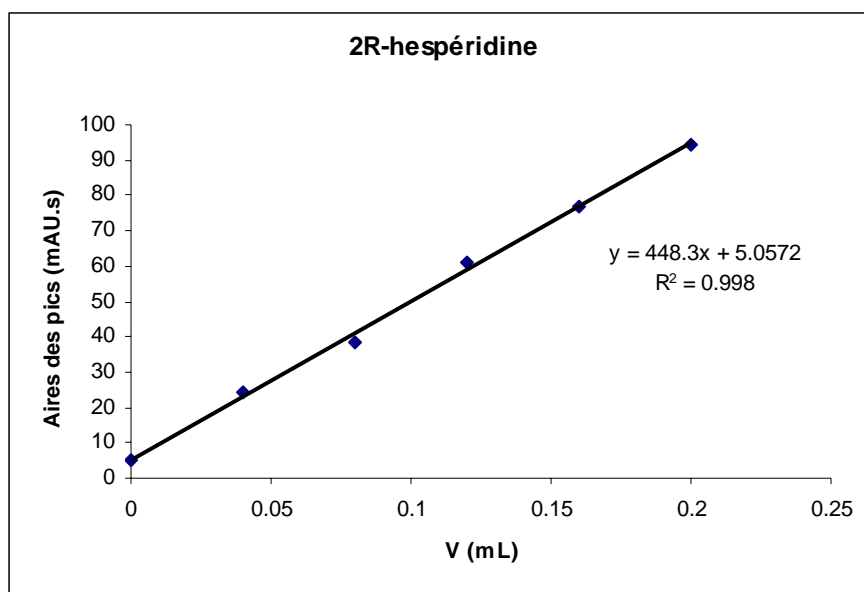


Figure 15 : Courbes d'étalonnage obtenues par la méthode des ajouts dosés pour les deux diastéréoisomères de l'héséridine (Voir conditions opératoires sur la figure 14).

IV. Conclusion

Dans la première partie de cette étude, nous nous sommes intéressés à la séparation chirale de quelques produits pharmaceutiques et de quelques drogues par électrophorèse capillaire, en utilisant l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine comme sélecteur chiral. Ainsi, hormis la méthamphétamine tous les solutés injectés ont pu être séparés. L'étude de l'effet de la concentration du sélecteur chiral a démontré l'impact fondamental de ce paramètre sur la mobilité des solutés ainsi que la qualité des séparations chirales. Les effets structuraux liés à la configuration tridimensionnelle des solutés ont été également discutés. Ainsi une variation minime dans la structure chimique du soluté peut affecter radicalement le mécanisme de caractérisation chirale.

La seconde partie a été consacrée à la séparation chirale des flavanones sur deux types de colonnes capillaires. La première est non-modifiée et la seconde est modifiée par greffage covalent. Le sélecteur chiral utilisé est une cyclodextrine chargée négativement : la SBE- β -CD. Ainsi nous avons démontré la performance de la colonne modifiée d'un point de vue stabilité vis-à-vis d'une large gamme de pH ainsi qu'une bonne reproductibilité des résultats. La grande majorité des flavanones injectées a été séparée, notamment l'héspéridine et la naringine qui ont été totalement résolues ($R_s > 2.5$). Il serait intéressant de noter que ces résolutions n'ont jamais été atteintes dans la littérature et qu'aucune séparation chirale de la flavanone ainsi que des méthoxyflavanones n'ont été recensées dans la bibliographie, ce qui souligne l'originalité de ce travail. L'effet de la concentration du sélecteur chirale ainsi que celui du pH ont été discutés pour les 2 types de capillaires, ces deux paramètres se sont montrés décisifs durant le processus de caractérisation chirale. Une tentative d'élucidation du mécanisme de reconnaissance chirale mis en jeu a été effectuée sur la base de la configuration spatiale des flavanones.

La dernière partie de ce chapitre a été consacrée à la quantification diastéréomérique de l'héspéridine présente dans un jus d'orange sanguine commercial. La quantification a été effectuée par la méthode des ajouts dosés. La parfaite linéarité des courbes d'étalonnage obtenues pour chacun des deux diastéréoisomères démontre la fiabilité de la méthode. Par ailleurs, la large prédominance de la forme diastéréomérique S certifie l'origine naturelle du jus d'orange analysé.

V. Références bibliographiques

- [1] A. Rajendran, G. Paredes, M. Mazzotti, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 709.
- [2] G. Gübitz, M.G. Schmid, *J. Chromatogr. A* 1204 (2008) 140.
- [3] FDA, Development of New Stereoisomeric Drugs (5 janvier 1992),
<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm122883.htm>
- [4] J.A. Yáñez, C.M. Remsberg, N.D. Miranda, K.R. Vega-Villa, P.K. Andrews, N.M. Davies, *Biopharm. Drug Dispos.* 29 (2007) 63.
- [5] C.-H. Lin, W.-R. Fang, C.-M. Kuo, W.-Y. Chang, Y.-C. Liu, W.-Y. Lin, J.-C. Wu, C.-E. Lin, *J. Chromatogr. A* 1188 (2008) 301.
- [6] J.-L. Veuthey, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 93.
- [7] S.L. Li, G. Vigh, *J. Chromatogr. A* 1051 (2004) 95.
- [8] W.H. Tang, I.W. Muderawan, T.T. Ong, S.C. Ng, *Anal. Chim. Acta* 546 (2005) 119.
- [9] A.C. Servais, M. Fillet, P. Chiap, W. Dewé, P. Hubert, J. Crommen, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 143.
- [10] D.W. Armstrong, U.B. Nair, *Electrophoresis* 18 (1997) 2331.
- [11] J. Haginaka, *J. Chromatogr. A* 875 (2000) 235.
- [12] H. Nishi, Y. Kuwahara, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 577.
- [13] C.Y. Wang, D.H. Wang, T.H. Leng, Q.S. Yu, *J. Heterocycl. Chem.* 42 (2005) 1043.
- [14] S. Fanali, *Electrophoresis* 30 (2009) S203.
- [15] S. Fanali, *J. Chromatogr. A* 474 (1989) 441.
- [16] B. Chankvetadze, *Capillary electrophoresis in chiral analysis*, J. Wiley and Sons, New York, 1997.
- [17] P.T.T. Ha, J. Hoogmartens, A. Van Schepdael, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1.
- [18] G. Li, X. Lin, C. Zhu, A. Hao, Y. Guan, *Anal. Chim. Acta* 421 (2000) 27.
- [19] S. Zhou, J. Ouyang, W.R.G. Baeyens, H. Zhao, Y. Yang, *J. Chromatogr. A* 1130 (2006) 296.
- [20] C. Pak, P.J. Marriott, P.D. Carpenter, R.G. Amiet, *J. Chromatogr. A* 793 (1998) 357.
- [21] M. Yoshinaga, M. Tanaka, *J. Chromatogr. A* 679 (1994) 359.
- [22] S. Kodama, A. Yamamoto, A. Matsunaga, H. Yanai, *Electrophoresis* 25 (2004) 2892.
- [23] U. Schmitt, M. Ertan, U. Holzgrabe, *Electrophoresis* 25 (2004) 2801.
- [24] M. Fillet, I. Bechet, P. Hubert, J. Crommen, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 1107.
- [25] Z. Aturki, C. Desiderio, L. Mannina, S. Fanali, *J. Chromatogr. A* 817 (1998) 91.

- [26] Y. Tanaka, M. Yanagawa, S. Terabe, J. High Resolut. Chromatogr. 19 (1996) 421.
- [27] B. Chankvetadze, G. Endresz, G. Blaschke, Electrophoresis 15 (1994) 804.
- [28] C. Desiderio, S. Fanali, J. Chromatogr. A 716 (1995) 183.
- [29] U.B. Nair, D.W. Armstrong, Microchem. J. 57 (1997) 199.
- [30] W. Tang, I.W. Muderawan, S.C. Ng, H.S.O. Chan, J. Chromatogr. A 1094 (2005) 187.
- [31] M. Chiari, F. Damin, J.C. Reijenga, J. Chromatogr. A 817 (1998) 15.
- [32] M. Moini, S.M. Demars, H. Huang, Anal. Chem. 74 (2002) 3772.
- [33] C. Aguilar, A.J.P. Hofte, U.R. Tjaden, J. Van der Greef, J. Chromatogr. A 926 (2001) 57.
- [34] F. Foret, H. Zhou, E. Gangl, B. Karger, Electrophoresis 21 (2000) 1363.
- [35] S. Hjertén, J. Chromatogr. A 347 (1985) 191.
- [36] G.M. Janini, G.M. Muschik, H.J. Issaq, Electrophoresis 17 (1996) 1575.
- [37] S. Fanali, C. Cartoni, C. Desiderio, Chromatographia 54 (2001) 87.
- [38] A.J. Tomlinson, S. Naylor, J. Liq. Chromatogr. 18 (1995) 3591.
- [39] L. Gao, S. Liu, Anal. Chem. 76 (2004) 7179.
- [40] J. Horvath, V. Dolník, Electrophoresis 22 (2001) 644.
- [41] N. Erk, J. Pharm. Biomed. Anal. 23 (2000) 255.
- [42] R.A. Glennon, R. Young, Pharm. Biochem. Behav. 65 (2000) 655.
- [43] Food and Drug Administration, Fed. Regist. 69 (2004), p. 6787.
- [44] K.D. Altria. Dans J.P. Landers (éd), Handbook of capillary electrophoresis, (2^{ème} édition), CRC Press, Boca Raton, FL, 1997, p. 189.
- [45] M. Chiari, M. Nesi, P.G. Righetti. Dans P.G. Righetti (éd),. Capillary electrophoresis in analytical biotechnology, CRC Press, Boca Raton, FL, 1996, p. 1.
- [46] K. Altria, Capillary electrophoresis guidebook: Principles, operation and applications, Humana Press, Totowa, NJ, USA, 1995.
- [47] R. Wang, Z.-p. Jia, J.-J. Fan, L.-R. Chen, H. Xie, J. Ma, X. Ge, Q. Zhang, Y. Ao, J. Wang, Chromatographia 65 (2007) 575.
- [48] S. Wei, H. Guob, J.-M. Lin, J. Chromatogr. B 832 (2006) 90.
- [49] L. Gagyí, Á. Gyéresi, F. Kilar, J. Biochem. Biophys. Methods 70 (2008) 1268.
- [50] S. Fanali, J. Chromatogr A. 735 (1996) 77.
- [51] Y. Wei, X. Lin, C. Zhu, Can. J. Anal. Sci. Spectr. 50 (2005) 135.
- [52] C. Quang, M.G. Khaledi, J. Chromatogr. A 692 (1995) 253.
- [53] S.A.C. Wren, R.C. Rowe, J. Chromatogr. 603 (1992) 235.

- [54] M. Fantacuzzi, G. Bettoni, G. D'Orazio, S. Fanali, *Electrophoresis* 27 (2006) 1227.
- [55] M. Fillet, P. Hubert, J. Crommen, *Electrophoresis* 19 (1998) 2834.
- [56] G. Gübitz, M.G. Schmid, *Electrophoresis* 21 (2000) 4112.
- [57] T.J. Ward, D.W. Armstrong. Dans: M. Zief, L.J. Crane (éds), *Chromatographic chiral separations*, Marcel Dekker, New York, 1988, p. 131.
- [58] B. Waldeck, *Eur. J. Pharm.* 445 (2002) 1.
- [59] C.E. Dalgliesh, *J. Chem. Soc.* 47 (1952) 3940.
- [60] S.-P. Wang, M.-D. Fu, M.-H. Wang, *J. Chromatogr. A* 1164 (2007) 306.
- [61] H. Park, S. Jung, *Electrophoresis* 26 (2005) 3833.
- [62] C. Kwon, H. Park, S. Jung, *Carbohydr. Res.* 342 (2007) 762.
- [63] D. Wistuba, A. Bogdanski, K.L. Larsen, V. Schurig, *Electrophoresis* 27 (2006) 4359.
- [64] N. Gel-Moreto, R. Streich, R. Galensa, *J. Chromatogr. A* 925 (2001) 279.
- [65] Z. Aturki, M. Sinibaldi, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 844.
- [66] C. Perrin, Y. Vander Heyden, M. Maftouh, D.L. Massart, *Electrophoresis* 22 (2001) 3203.
- [67] G. Galaverna, S. Sforza, T. Tedeschi, R. Corradini, A. Dossena, R. Marchelli, *Electrophoresis* 24 (2003) 2698.
- [68] M. Dolezalova, S. Fanali, *Electrophoresis* 21 (2000) 3264.
- [69] T. De Boer, R.A. De Zeeuw, G.J. De Jong, K. Ensing, *Electrophoresis* 21(2000) 3220.
- [70] M. Wind, P. Hoffmann, H. Wagner, W. Thormann, *J. Chromatogr. A*, 895 (2000) 51.
- [71] X. Lin, M. Zhao, X. Qi, C. Zhu, A. Hao, *Electrophoresis* 27 (2006) 872.
- [72] M. Meyring, B. Chankvetadze, G. Blaschke, *Electrophoresis* 20 (1999) 2425.
- [73] H. Kim, Y. Choi, J. Lim, S.-R. Paik, S. Jung, *Chirality*, publication acceptée (2009)
DOI: 10.1002/chir.20696.
- [74] D. Belder, G. Schomburg, *J. Chromatogr. A*, 666 (1994) 351.
- [75] C.M. Boone, E.Z. Jonkers, J.P. Franke, K. Ensing, *J. Chromatogr. A* 927 (2001) 203.
- [76] A. Cifuentes, H. Poppe, J.C. Kraak, F.B. Erim, *J. Chromatogr. B* 681 (1996) 21.
- [77] H. Engelhardt, M.A. Cufiat-Walter, *J. Chromatogr. A*, 716 (1995) 27.
- [78] M. Krishnaiah, R.Kumar, N.Kumar, D. Gunasekar, B. Jayaprakasam, *Acta Cryst.* E61 (2005) o2862.
- [79] M.L. Calabro, S. Tommasini, P. Dnato, R. Stancanelli, D. Raneri, S. Catania, C. Costa, V. Villari, P. Ficarra, R. Ficarra, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2005) 1019.

- [80] D. Haiyun, H. Ding, J. Chao, G. Zhang, S. Shung, J. Pan, *Spectrochim. Acta A* 59 (2003) 3421.
- [81] G. Fronza, C. Fuganti, E. Genesio, A. Mele, *J. Incl. Phen. Macro. Chem.* 44 (2002) 225.
- [82] M. Asztemborska, M. Miskiewicz, D. Sybilska, *Electrophoresis* 24 (2003) 2527.
- [83] H. Park, S. Jung, *Electrophoresis* 26 (2005) 3833.
- [84] A. Garg, S. Garg, L.J.D. Zaneveld, A.K. Singla, *Phytother. Res.* 15 (2001) 655.
- [85] G.K. Jayaprakasha, B. Girenavar, B.S. Patil, *LWT - Food Sci. Tech.* 41 (2008) 376.
- [86] B. Mira, M. Blasco, S. Subirats, A. Berna, *J Sup-critical Fluids* 9 (1996) 238.
- [87] R. Ikan, *Natural Products: A Laboratory Guide* (2^{ème} édition), Academic Press, Londres, GB, 1991.
- [88] A. Ortuno, A. Baidez, P. Gomez, M.C. Arcas, I. Porras, A. Garcia-Lidon, J.A. Del Rio, *Food Chem.* 98 (2006) 351.
- [89] R.M. Horowitz, B. Gentili, *Tetrahedron* 19 (1963) 773.
- [90] J. Tranchant, *Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse* (4^{ème} édition), Masson et Cie., Paris, France, 1995.
- [91] W.E. Bronner, G.R. Beecher, *J. Chromatogr. A*, 705 (1995) 247.

CHAPITRE IV

**SEPARATION ENANTIOMERIQUE
ET DIASTEREOMERIQUE DE FLAVANONES
ET FLAVANONES GLYCOSIDES SUR UNE
PHASE STATIONNAIRE CHIRALE A BASE DE
PHENYLCARBAMATE-PROPYL- β -
CYCLODEXTRINE PAR NANO-
CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE ET CLHP**

I. Introduction

Les techniques chromatographiques telles que la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la chromatographie en phase supercritique (CPS) et la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) ont été largement utilisées pour la séparation et purification des composés chiraux [1-3]. Comme cela a été reporté dans la littérature, la grande majorité des séparations chirales a été réalisée avec des phases stationnaires chirales [4,5]. Malgré la robustesse des systèmes chromatographiques, ils présentent des inconvénients de taille tels que : la consommation de grande quantité de solvant, le coût élevé des colonnes chirales... C'est pour cette raison, que les techniques de séparation à micro-échelle telles que l'électrophorèse (EC) et l'électrochromatographie capillaire (ECC) ont connu un essor prodigieux [6-8].

Récemment, la miniaturisation a également été introduite en chromatographie liquide (CL), et cela en diminuant le diamètre interne des colonnes ($100 \mu\text{m} < \text{D.I.} < 500 \mu\text{m}$) ainsi que le débit ($200\text{-}1000 \text{ nL min}^{-1}$). Néanmoins, la chromatographie liquide capillaire et la nano chromatographie liquide ont été utilisées essentiellement à des fins analytiques.

La Nano-CL, initialement introduite par Karlsson et Novotny [9], a été intensivement étudiée, durant la décennie passée, afin de la développer sur le plan théorique, instrumental, technologique et applicabilité [10,11]. En effet, la littérature est riche en travaux qui ont démontré que les techniques dites « miniatures » ont un avenir des plus prometteurs dans différents domaines d'application telles que la protéomique, la métabolomique, la pharmacie, l'agroalimentaire et la séparation chirale [12-17].

Ces nouvelles techniques analytiques offrent plusieurs avantages par rapport à la CLHP conventionnelle, parmi eux nous pouvons citer : une plus grande efficacité, des temps d'analyse, volumes d'échantillons et de solvants organiques réduits, ce qui a pour conséquence directe un faible impact environnemental et un moindre coût [9,18,19]. A tout cela s'ajoute, la faible quantité de phases stationnaires requises, ce qui est particulièrement important au vue des prix exorbitants de ces matériaux. Par conséquent, la Nano-CL peut être complémentaire ou alors carrément compétitive vis-à-vis de la CLHP classique, et cela dans différents domaines d'applications analytiques ce qui inclus la séparation chirale.

Les PSCs-CDs sont soit chimiquement liées à la silice via des spacers [20-23] ou alors adsorbées sur le gel de silice tel que les polymères à base de cyclodextrine [24]. Très récemment, les colonnes monolithiques fonctionnalisées avec des cyclodextrines ont été également développées pour les séparations chirales [25].

Grace aux PSCs à base de cyclodextrine, l'élution multimodal (inverse, normal et polaire organique) peut être appliquée pour la résolution de plusieurs classes de composés optiquement actifs [26,28]. Bien qu'une multitude de PSCs-CDs soit commercialisée, la nécessité et le besoin de développer de nouveaux matériaux hautement énatio-sélectifs avec de faibles temps de rétentions est toujours d'actualité. Plusieurs PSCs à base de β -CD native et d'hydroxypropyl- β -CD ont été préparées au niveau de notre laboratoire, et cela en immobilisant chimiquement la CD sur le gel de silice à l'aide d'un spacer difonctionnel [29-33]. Parmi elles, la phénylcarbamate-propyl- β -CD s'est montrée particulièrement efficace pour l'énatio-séparation d'une large gamme de produits racémiques tels que les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les benzodiazépines, la base de tröger... et cela en employant les trois modes de phases mobiles [32]. Au vu du caractère hautement énatio-sélectif de cette PSC, nous avons étendu son applicabilité aux dimensions de la micro-échelle. A notre connaissance, très rares sont les travaux rapportés dans la littérature qui traitent de l'utilisation des cyclodextrines comme phases stationnaires en Nano-CL ou en CL capillaire [34-37].

Concernant le présent travail, l'énatio-sélectivité de la phénylcarbamate-propyl- β -CD a été étudiée par Nano-CL pour la séparation énantiomérique et diastéréomérique de quelques flavanones appartenant à la classe des polyphénols [38]. Ces composés sont généralement présents dans les fruits et légumes et sont connus pour leur bienfaits pharmacologiques (anti-cancérigène, anti-inflammatoire, antivirales ...). Malgré le potentiel thérapeutique des flavonoïdes chiraux, rares sont les études traitant de l'activité d'un seul énantiomère [39]. Ainsi les séparations chirales des flavanones ont été réalisées par Nano-CL et par CLHP en mode inverse, normal et polaire organique. Plusieurs paramètres chromatographiques, notamment la composition de la phase mobile, la nature du solvant organique et le débit, ont été optimisés afin d'obtenir la résolution complète de nos composés, nous avons pu ainsi comparer l'efficacité de la Nano-CL v.s. la CLHP.

II. Partie expérimentale

II.1. Réactifs chimiques

Tous les réactifs chimiques sont de grade analytique, l'acetonitrile (ACN), le Méthanol (MeOH), l'éthanol (EtOH), le propanol (PrOH), le 2-propanol (2-PrOH), le n-hexane (n-Hex) et le n-heptane (n-Hept) ont été fournis par Carlo Erba (Milan, Italie), le triéthylamine (TEA) ainsi que l'acide acétique glacial par Fluka (Buchs SG, Suisse). L'eau ultra pure a été obtenue grâce au système de purification Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). La LiChrospher 100 RP-18 silica phase (5 µm) a été fournie par Merck (Darmstadt, Germany). La PSC-CD a été préparée suivant la méthode précédemment décrite [30].

Les flavonoïdes (flavanone, 2'-hydroxyflavanone, 4'-hydroxyflavanone, 6-hydroxyflavanone, 7-hydroxyflavanone, 4'-méthoxyflavanone, 6-méthoxyflavanone, 7-méthoxyflavanone, l'hespérétine, l'hespéridine, la naringénine et le naringin) ont été acquis auprès de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Les solutions standards de chaque flavonoïde (1 mg mL⁻¹) ont été préparées dans le MeOH ou EtOH, pour les analyses en mode inverse ou normal, respectivement. Ils ont été stockés au réfrigérateur à +4°C. Les dilutions ont été quotidiennement effectuées dans de l'eau ou de l'EtOH afin d'obtenir une concentration finale de 100 µg mL⁻¹.

II.2. Appareillage

Les analyses par Nano-CL ont été effectuées à l'aide d'une instrumentation assemblée au niveau du laboratoire (Figure 1). Le système est constitué d'une pompe micro-LC Accela TM, Thermo Electron Corporation (San Jose, California, USA) contrôlée par un système software (Xcalibur 2.0 data system). Le débit a été réduit du µL/min au nL/min grâce à un dispositif de splitting statique. Ce dernier a été réalisé en connectant un T en acier inoxydable (Vici Valco (Houston, Texas, USA)) par l'une de ses extrémités à la pompe grâce à un tube en PEEK 50 cm x 130 µm D.I., les deux autres extrémités du T ont été connectées à la valve de l'injecteur grâce à un tube de 7 cm x 500 µm D.I. et à un flacon de rejet grâce à un capillaire en silice de 50 cm x 50 µm D.I. Cet arrangement a permis d'obtenir un débit de l'ordre de 120-400 nL min⁻¹.

La valeur exacte du débit final a été mesurée en connectant à l'extrémité de la colonne capillaire une micro-seringue grâce à un tube en téflon. La mesure du volume de phase mobile se fait 5 min plus tard. L'injection de l'échantillon a été effectuée grâce à une micro valve d'injection à 4 ports (100 nL) (Vici Valco (Houston, Texas, USA)).

La détection on-colonne a été réalisée à 205 nm à l'aide d'un détecteur photomètre UV-VIS Spectra 100, Thermo Separation Products (San Jose, Californie, USA). Les données ont été collectées sur un intégreur Shimadzu CR5A Chromatopac (kyoto, Japan). L'analyse des composés racémiques a été effectuée sur un capillaire (34 cm x 100 μ m D.I.) dont 22 cm sont remplis avec une PSC à base de phénylcarbamate-propyl- β -cyclodextrin, la longueur effective du capillaire est de 24 cm.

Concernant les analyses en CLHP, elles ont été effectuées sur un système Perkin-Elmer Series 200 HPLC muni d'un détecteur à barrettes de diode (Perkin-Elmer, CT, USA), d'un injecteur Rhéodyne 7725i (20 μ L). Le traitement des données chromatographiques a été fait grâce au logiciel TurboScan 200 data. Le temps mort a été mesuré en injectant le 1,3,5-tri-tert-butylbenzène (TTBB) en mode normal et le nitrate de sodium (NaNO_3) en mode inverse et organique polaire.

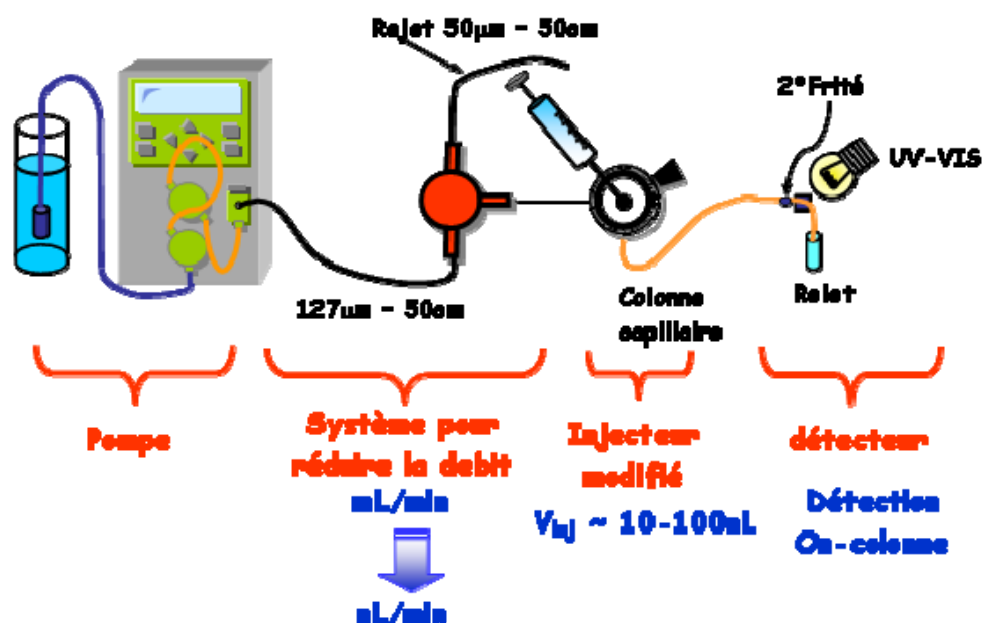


Figure 1 : Schéma simplifié de la Nano-CL utilisée dans ce travail.

II.3. Préparation de la colonne capillaire

Les capillaires en silice fondue (100 μm D.I. x 375 D.E.) ont été fournis par Composite Metal Services (Hallow, Worcestershire, Grande Bretagne). Leur remplissage avec la PSC-CD a été effectué au niveau du laboratoire suivant une procédure précédemment décrite [40]. Une extrémité du capillaire est connectée à un fritté mécanique temporaire (Valco (Houston, Texas, USA)) afin de retenir la phase stationnaire lors du remplissage. L'autre extrémité est connectée à une pré-colonne CLHP en acier inoxydable (10 cm x 4.1 μm D.I.) qui joue le rôle du réservoir dans lequel se trouve la PSC en suspension. La pré-colonne est à son tour connectée à une pompe LC Series 10 Perkin-Elmer (Palo Alto, CA).

Le capillaire est d'abord rempli par une phase stationnaire LiChrospher 100 RP18 5 μm (quelques mg suspendus dans 1 mL d'acétone) pendant 10 min sous 30 MPa. Le réservoir est ensuite nettoyé et le solvant organique à l'intérieur du capillaire est éliminé en faisant passer de l'eau pendant 30 min. Une fois cette étape initiale effectuée, le premier fritté est réalisé et cela en chauffant le capillaire à l'endroit même où se trouve la phase stationnaire C18 pendant 6 s à 700 °C sur un appareil conçu au laboratoire. Ce dernier comprend un fil métallique relié par ses deux extrémités à une résistance. Cette délicate étape doit impérativement se dérouler sous passage continu d'eau dans le capillaire. Le fritté temporaire peut être maintenant retiré, le capillaire relié à la pré-colonne est alors inversé afin d'éliminer toute la phase C18 restante en faisant passer de l'eau. Le but de l'utilisation de la C18, matériau très stable à haute température, est de réaliser le premier fritté thermique.

Par la suite, nous avons reconnecté le capillaire au réservoir contenant la phase chirale à base de phénylcarbamate-propyl-β-cyclodextrine suspendue dans un mélange MeOH:2-PrOH (1:1). Le remplissage est effectué sous les mêmes conditions que précédemment, il est arrêté lorsque la longueur du capillaire rempli atteint 22 cm. Par la suite, le capillaire est rempli une seconde fois avec la phase C18 (5 cm) afin de réaliser le second fritté thermique en suivant exactement les mêmes étapes décrites précédemment. La fenêtre de détection a été réalisée en grattant la fine couche de polyimide du capillaire avec une lame à une distance de 2 cm du second fritté. Finalement, le capillaire est coupé afin d'avoir une colonne de 34 cm de longueur totale. Cette dernière est équilibrée en faisant passer la phase mobile sous 35 MPa.

III. Résultats et discussion

III.1. Evaluation de la phase stationnaire chirale par Nano-Chromatographie Liquide

Dans le présent travail, les aptitudes énantio-sélectives de la phénylcarbamate-propyl- β -CD (Figure 2) ont été évaluées en Nano-Chromatographie Liquide pour la séparation chirale de plusieurs flavanones (Figure 3). La PSC s'est également montrée très efficace pour la résolution diastéréomérique de l'hespéridine et le naringin, deux flavanones glycosides. Tous les composés analysés, à l'exception des deux flavanones-7-O-glycosides, possèdent un centre chiral à la position 2 de leur structure chimique, et existent donc sous forme de couples d'énantiomères. A cause de la présence d'un groupement disaccaride à la position 7 du cycle les flavanones-7-O-glycosides se présentent sous forme d'un couple de diastéréoisomères pour chaque composé (Figure 3).

En ce qui concerne la PSC étudiée, elle contient dans sa structure des groupements aromatiques polaires tels que les phénylcarbamate-propyles qui contribuent à l'achèvement de la discrimination chirale grâce aux liaisons hydrogènes qu'ils peuvent former avec un soluté donné [41]. Ainsi, l'évaluation de l'énantio-sélectivité de cette phase stationnaire a été réalisée sous différents modes d'élution : inverse, normal et organique polaire.

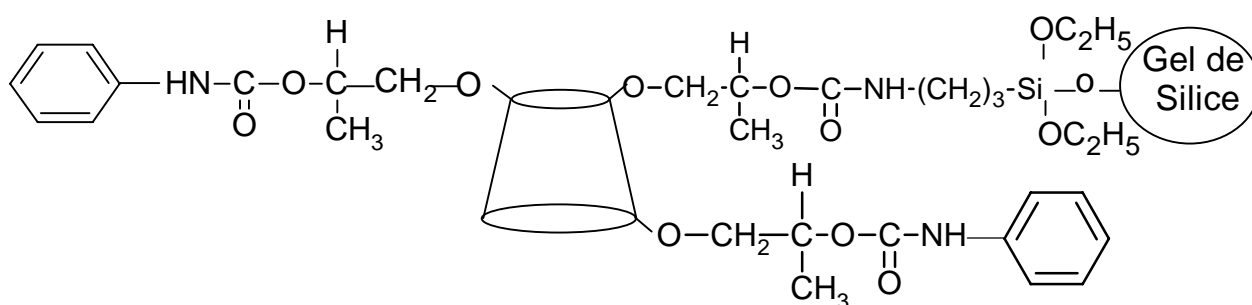


Figure 2 : Structure chimique de la phénylcarbamate-propyl- β -CD.

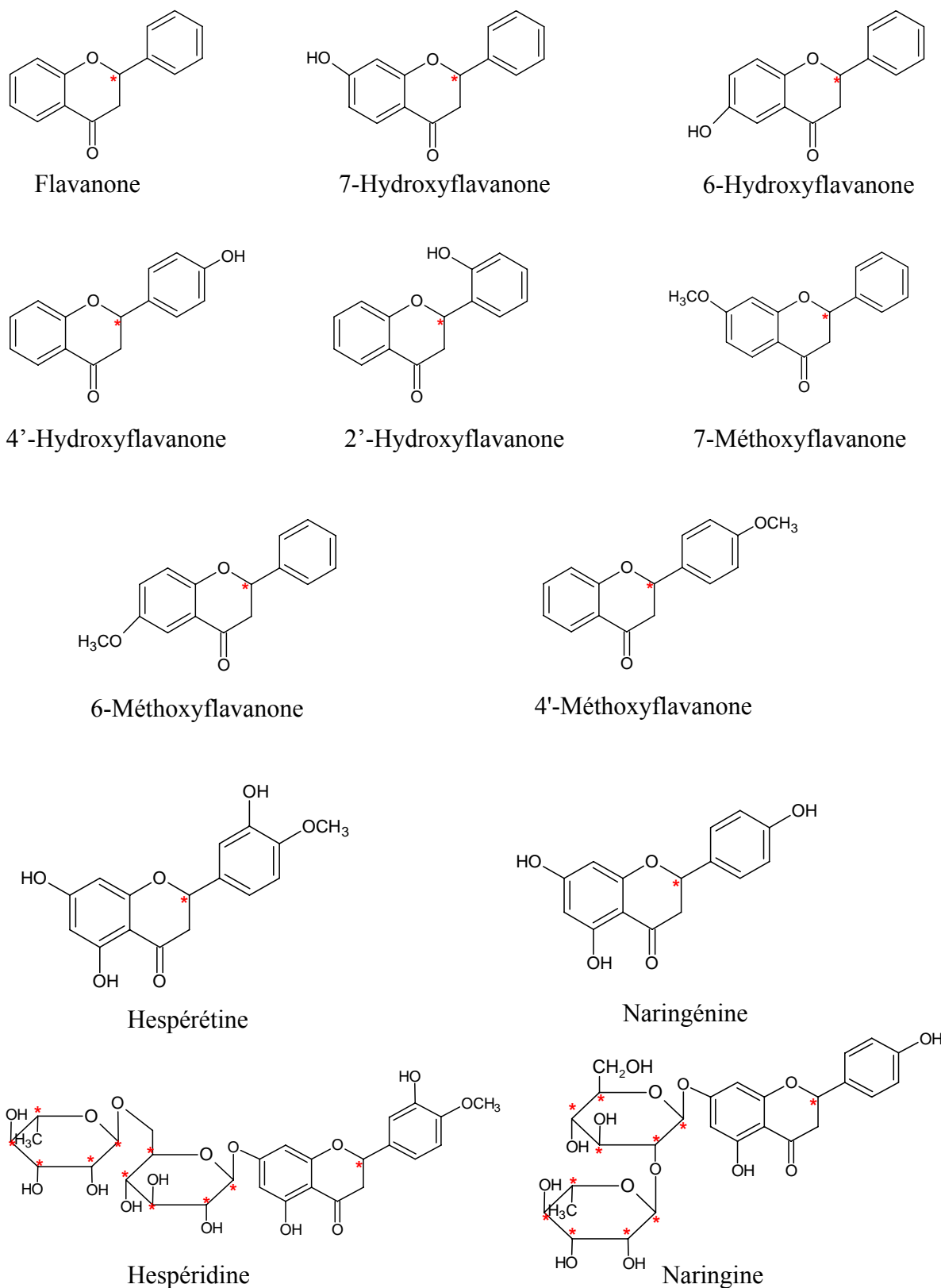


Figure 3 : Structure chimique des flavanones et flavanones glycosides.

III.1.1. Evaluation de la phase stationnaire chirale en mode inverse par Nano-CL

III.1.1.1. Influence de la composition de la phase mobile et du débit sur l'énantiorésolution

En chromatographie liquide, le mécanisme de reconnaissance moléculaire des cyclodextrines est géré par une multitude d'interactions entre la PSC et les énantiomères analysés, et cela même si la complexation par inclusion joue un rôle prédominant durant ce processus [31,32]. Néanmoins, le choix d'une phase mobile appropriée doit être effectué soigneusement, afin de favoriser les interactions secondaires améliorant l'énantiorésolution.

En considérant les données de la littérature concernant l'utilisation des PSCs-CD en chromatographie liquide inverse [27,32], un mélange constitué d'eau et d'un solvant organique polaire tel que l'ACN a été utilisé lors des analyses préliminaires. La flavanone a été choisi comme composé-test afin d'évaluer le débit optimal. Ainsi, ces expériences ont été menées avec une phase mobile constituée de H₂O/ACN, 60/40 (v/v) sous différents débits allant de 120 jusqu'à 400 nL min⁻¹. La flavanone racémique a été énantiorésolue quelque soit le débit utilisé. La figure 4 montre les courbes de Van Deemter (Hauteur des plateaux théorique (H) en fonction de la vitesse linéaire de la phase mobile) pour les deux énantiomères de la flavanone. En comparant les deux courbes, nous pouvons noter une légère différence dans leur allure. Etant donné, que les énantiomères ont des propriétés physico-chimiques identiques, cette différence peut être attribuée à divers effets cinétiques entre ces énantiomères et la cyclodextrine ainsi qu'aux différentes interactions de type Van der Waals, liaisons hydrogènes, complexation par inclusion...etc.

Nous pouvons également noter qu'une diminution de H pour les deux énantiomères a été observée lorsque le débit augmente de 15,5 à 32.5 mm min⁻¹. L'exploitation des deux courbes de Van Deemter pour les deux énantiomères nous amène à sélectionner un débit de 240 nL min⁻¹ (38.8 mm min⁻¹) pour les futures analyses effectuées sur cette colonne capillaire. En effet, cette valeur de débit offre le meilleur compromis en termes d'efficacité et de temps d'analyse acceptable. Ainsi, nous avons pu entamer l'étude de l'énantiosélectivité de notre colonne capillaire en analysant les flavanones avec une phase mobile à base d'eau et d'acétonitrile.

L'étude de l'effet de la composition de la phase mobile sur la rétention, la sélectivité et la résolution des flavanones, a été réalisée en faisant varier la concentration de l'acétonitrile de 20 à 80 %. Nous avons pu constater qu'une augmentation de la concentration de ce solvant organique diminue simultanément la rétention et la résolution chirale des composés injectés. En effet, la nature aprotique de l'ACN augmente son affinité pour la cavité hydrophobe de la CD, il entre ainsi en compétition avec le soluté pour former un complexe d'inclusion avec le sélecteur chirale [20]. De plus, la relation linéaire observée entre $\ln k$ et la concentration de la phase mobile en ACN (r^2 variant entre 0.95 et 0.99 pour tous les solutés) (Figure 5), illustre le mécanisme typique des phases stationnaires utilisées en mode inverse.

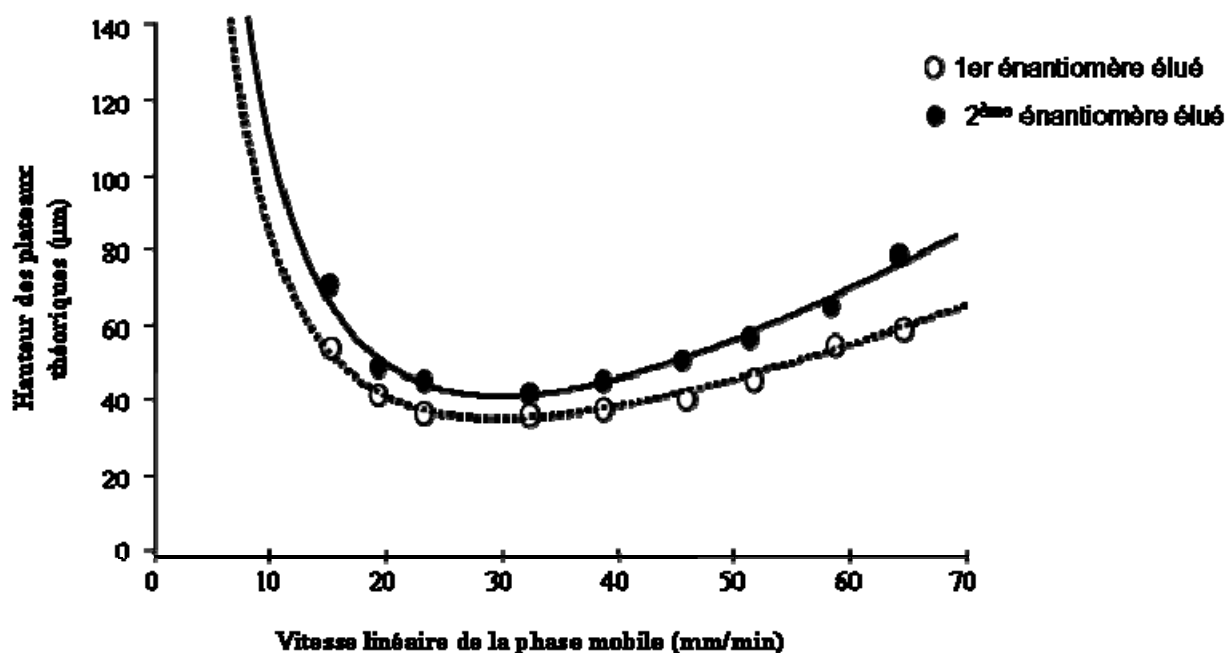


Figure 4 : Courbe de Van Deemter des 2 énantiomères de la flavanone (phase mobile : H₂O/ACN, 60/40 (v/v), λ_{205} nm)

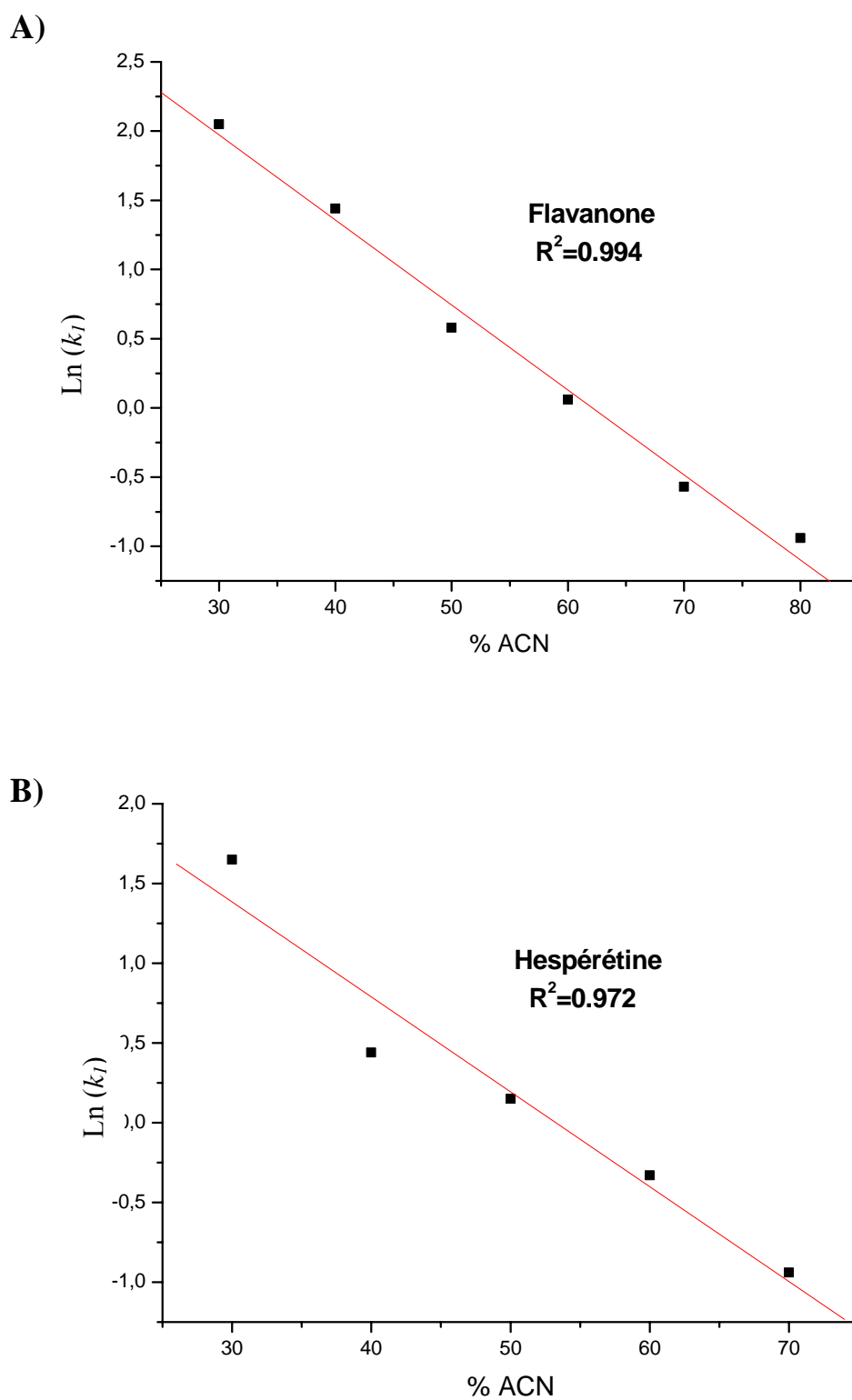


Figure 5 : Courbes décrivant la relation entre $\ln(k_1)$ et la composition de la phase mobile en acétonitrile pour la flavanone (A) et l'hespérétine (B) (phase mobile : Eau/ACN, débit : 240 nL min^{-1} , $\lambda_{205 \text{ nm}}$).

Le tableau 1 résume les résultats chromatographiques obtenus sous des conditions expérimentales optimales par Nano-CL. Ainsi, tous les solutés injectés ont pu être complètement résolus à l'exception de la 2'-hydroxyflavanone et le naringin qui n'ont été que partiellement séparés ($R_s = 0.50$). Ceci peut être expliqué par la position des substituants de ces deux flavanones qui semble défavoriser les interactions stéréo-sélectives avec la PSC-CD. Sur la figure 6, nous présentons quelques chromatogrammes des énantiomères des flavanones et des diastéréoisomères de l'hésperidine résolus en mode inverse avec le mélange eau/ACN.

Tableau 1: Séparation énantiomérique et diastéréomérique des flavanones en Nano-CL en mode inverse avec une phase mobile à base d'eau et d'ACN*

| Composés | tr_1 | k_1 | tr_2 | k_2 | α | R_s |
|-----------------------------------|--------|-------|--------|-------|----------|-------|
| Flavanone ^{a)} | 45.73 | 7.79 | 51.82 | 8.96 | 1.15 | 2.09 |
| 7-Hydroxyflavanone ^{b)} | 41.22 | 5.45 | 44.78 | 6.01 | 1.10 | 1.23 |
| 6-Hydroxyflavanone ^{a)} | 29.69 | 4.71 | 32.82 | 5.31 | 1.13 | 1.36 |
| 4'-Hydroxyflavanone ^{a)} | 27.16 | 4.22 | 29.89 | 4.75 | 1.12 | 1.56 |
| 2'-Hydroxyflavanone ^{a)} | 28.84 | 4.54 | 30.19 | 4.54 | 1.06 | 0.50 |
| 7- Méthoxyflavanone ^{c)} | 43.57 | 6.21 | 48.90 | 7.08 | 1.14 | 2.05 |
| 6- Méthoxyflavanone ^{c)} | 40.38 | 5.68 | 44.15 | 6.31 | 1.11 | 1.51 |
| 4'-Méthoxyflavanone ^{c)} | 37.67 | 5.23 | 43.37 | 6.17 | 1.18 | 2.07 |
| Hespérétine ^{a)} | 32.21 | 5.19 | 40.77 | 6.84 | 1.32 | 1.78 |
| Naringénine ^{a)} | 27.33 | 4.25 | 30.96 | 4.95 | 1.16 | 1.17 |
| Hésperidine ^{b)} | 21.32 | 2.34 | 27.01 | 3.23 | 1.38 | 2.06 |
| Naringin ^{b)} | 25.46 | 2.98 | 26.73 | 3.18 | 1.07 | 0.51 |

a) Phase mobile: H₂O/ACN (70/30 v/v)

b) Phase mobile: H₂O/ACN (80/20 v/v)

c) Phase mobile: H₂O/ACN (60/40 v/v)

* Débit 240 nL min⁻¹, $\lambda_{205 \text{ nm}}$

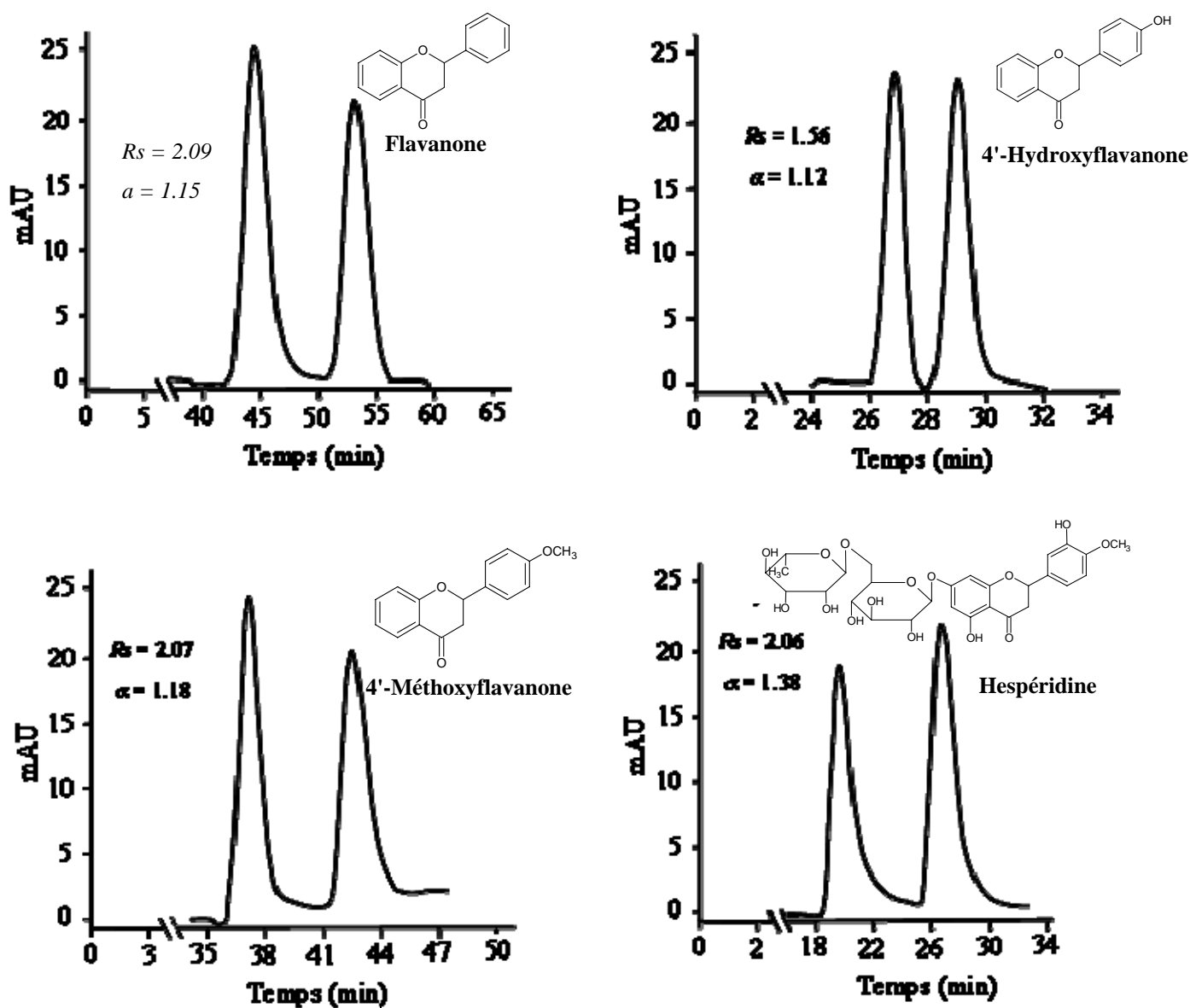


Figure 6: Exemples de séparations chirales obtenues en Nano-CL en mode inverse (voir conditions expérimentales sur le tableau 1).

III.1.1.2. Influence de la composition de la phase mobile

Dans cette étape de notre étude, nous avons utilisé le méthanol comme modifiant organique au lieu de l'acétonitrile ; l'effet de la concentration du MeOH sur la rétention, la sélectivité et la résolution a été étudié en faisant varier sa concentration entre 50 et 100%. Le tableau 2 résume les résultats chromatographiques optimaux obtenus dans ces conditions. Avec juste 30% d'eau dans la phase mobile, tous les solutés ont pu être séparés hormis la 2'-hydroxyflavanone et le naringin.

Tel que cela est présenté sur le tableau 2, les meilleures résolutions ont été obtenues pour les méthoxyflavanones, spécialement celles dont le groupement méthoxy se trouve à la position 4' ou 7. L'héspéridine et l'héspérétine ont été bien résolues, il est intéressant de noter qu'elles portent également un groupement méthoxy à la position 4' ; par contre, la naringénine et le naringin, qui portent un groupement hydroxyl à la même position, leur résolutions a diminué. En effet, de faibles résolutions ont été observées pour les quatre hydroxyflavanones injectées, ce qui prouve que les groupements méthoxy sont plus aptes à établir des liaisons hydrogènes stéréo-sélectives avec les substituants de la PSC. Notons que parmi, ces hydroxyflavanones, la 4' est la mieux résolue ($R_s = 3.28$), ce qui démontre que cette position semble être importante dans le mécanisme de caractérisation chirale.

D'un autre coté, l'héspérétine et la naringénine sont mieux résolues que leurs correspondant glycosidiques respectifs, à savoir l'héspéridine et le naringin. Nous pouvons expliquer ce résultat par le fait que les flavanones aglycones démontrent une plus grande affinité vis-à-vis de la cavité de la CD. En effet, leurs forte hydrophobicité ainsi que leurs petites tailles par rapport à leurs dérivés glycosidiques favoriseraient les interactions stéréo-sélectives.

Concernant la 2'-hydroxyflavanone, qui se trouve être le composé le moins résolu, si nous observons attentivement sa structure chimique, nous pouvons aisément suspecter la formation de liaisons hydrogènes intramoléculaires entre le OH de la position 2' et l'oxygène adjacent, ce qui pourrait gêner la formation d'interactions stéréo-sélectives entre le centre stéréo-génique de la molécule et les groupements fonctionnels du sélecteur chirale.

Les résolutions obtenues avec 60% de MeOH sont supérieures à celles observées pour la même composition en ACN, En effet pour cette composition de phase mobile, seules les solutés : flavanone, 6-méthoxyflavanone et l'hespérétine ont pu être partiellement séparés ($R_s < 1$) lors de l'utilisation de l'ACN comme modifiant organique. Nous avons également remarqué que pour des résolutions similaires mais à différentes concentrations de MeOH et d'ACN, des temps d'analyses beaucoup plus courts ont été observés lors de l'utilisation du méthanol. A titre d'exemple, nous pouvons citer le cas de la flavanone qui a pu être séparée avec un $R_s > 2$ en 23 min (avec 60% de MeOH) et 45 min (avec 30% d'ACN).

Tableau 2: Séparations chirales des flavanones en Nano-CL avec une phase mobile constituée du mélange eau/ méthanol*

| Composés | tr_1 | k_1 | tr_2 | k_2 | α | R_s |
|-----------------------------------|--------|-------|--------|-------|----------|-------|
| Flavanone ^{a)} | 23.13 | 3.18 | 29.33 | 4.31 | 1.35 | 2.34 |
| 7-Hydroxyflavanone ^{a)} | 14.52 | 1.62 | 16.05 | 1.90 | 1.17 | 1.40 |
| 6-Hydroxyflavanone ^{a)} | 14.80 | 1.67 | 17.91 | 2.23 | 1.34 | 1.45 |
| 4'-Hydroxyflavanone ^{a)} | 13.61 | 1.46 | 15.92 | 1.88 | 1.29 | 1.49 |
| 2'-Hydroxyflavanone ^{c)} | 24.35 | 3.44 | 25.07 | 3.57 | 1.03 | 0.31 |
| 7- Méthoxyflavanone ^{b)} | 15.55 | 1.59 | 18.29 | 2.05 | 1.28 | 2.61 |
| 6- Méthoxyflavanone ^{b)} | 16.87 | 1.81 | 19.67 | 2.28 | 1.26 | 1.93 |
| 4'-Méthoxyflavanone ^{b)} | 15.42 | 1.57 | 18.64 | 2.11 | 1.34 | 3.28 |
| Hespérétine ^{a)} | 16.55 | 1.99 | 25.07 | 3.53 | 1.77 | 2.51 |
| Naringénine ^{c)} | 17.42 | 2.17 | 19.94 | 2.64 | 1.21 | 1.26 |
| Hespéridine ^{c)} | 15.68 | 1.86 | 20.29 | 2.70 | 1.45 | 1.92 |
| Naringin ^{c)} | 12.81 | 1.34 | 13.77 | 1.51 | 1.13 | 0.91 |

a) Phase mobile: H₂O/MeOH(40/60 v/v)

b) Phase mobile: H₂O/MeOH (30/70 v/v)

c) Phase mobile: H₂O/MeOH (50/50 v/v)

* Débit 240 nL min⁻¹, $\lambda_{205\text{ nm}}$

Ainsi, il apparaît clairement que des temps de rétention plus longs ne sont pas toujours synonymes de meilleures résolutions. En effet, le MeOH démontre un pouvoir déplaçant plus faible et cela contrairement à l'acétonitrile [42], ce qui laisse plus de temps au soluté pour former un complexe d'inclusion avec la cavité de la cyclodextrine. Ceci expliquerait l'augmentation de la rétention, l'énantiosélectivité et la résolution lorsque le MeOH est utilisé comme solvant organique. A tout cela s'ajoute la nature amphiprotique du MeOH qui favoriserait les interactions polaires (les liaisons hydrogènes, les interactions ioniques, dipôles-dipôles etc) qui contribuent positivement à la reconnaissance chirale [43].

III.1.1.3. Influence du tampon aqueux sur la séparation chirale en Nano-CL

Hormis la modification du pH et de la force ionique de l'éluant, l'ajout d'un tampon à la phase mobile peut aussi changer substantiellement les propriétés physico-chimiques de la phase stationnaire. D'une manière générale, le pH de la phase mobile agit plutôt sur la séparation des solutés ionisables. A l'exception de l'hésperétine et de la naringénine qui démontrent une faible acidité due aux nombreux groupements hydroxyles présents dans leurs structures [44], les autres flavanones sont neutres ; par conséquent, le pH n'aurait pas d'influence significative sur leur énanti-sélectivité.

Les résultats chromatographiques optimaux obtenus avec une phase mobile constituée de 1% ATEA, pH 4.5/MeOH sont résumés sur le tableau 3. Ainsi si nous comparons ces résultats avec ceux obtenus avec un éluant composé d'un mélange H₂O/MeOH, nous pouvons constater : une diminution des temps de rétention, une meilleure forme des pics et une amélioration de l'énantio-séparation de la majorité des composés injectés. En effet, le tampon acétate de triéthylammonium (ATEA) masque les groupements silanols résiduels et réduit les interactions entre les solutés et les sites acides de la silice en améliorant ainsi l'efficacité des pics ainsi que l'énantiorésolution [43]. Concernant la 6-hydroxyflavanone, la 2'-hydroxyflavanone et le naringin, l'ajout du tampon semble être néfaste pour la séparation de ces produits. En effet, un étalement des pics et une perte de résolution ont été observés pour ces 3 solutés. La figure 7 montre quelques séparations chirales obtenues avant et après ajout du tampon à la phase mobile.

Tableau 3: Séparation énantiomérique et diastéréomérique des flavanones en Nano-CL en mode inverse avec une phase mobile à base de tampon et de méthanol*

| Composés | tr_1 | k_1 | tr_2 | k_2 | α | R_s |
|-----------------------------------|--------|-------|--------|-------|----------|-------|
| Flavanone ^{a)} | 18,39 | 1.66 | 22,09 | 2.19 | 1.32 | 2.64 |
| 7-Hydroxyflavanone ^{a)} | 14,25 | 1.06 | 15,55 | 1.25 | 1.18 | 1.53 |
| 6-Hydroxyflavanone ^{a)} | 14,17 | 1.04 | 16,18 | 1.34 | 1.28 | 0.77 |
| 4'-Hydroxyflavanone ^{a)} | 13,27 | 0.92 | 15,03 | 1.17 | 1.28 | 1.76 |
| 2'-Hydroxyflavanone ^{b)} | 16,25 | 1.48 | 16,25 | 1.48 | 1.00 | 0.00 |
| 7- Méthoxyflavanone ^{a)} | 25,60 | 2.70 | 32,18 | 3.65 | 1.35 | 2.86 |
| 6- Méthoxyflavanone ^{a)} | 31,70 | 3.58 | 40,37 | 4.83 | 1.35 | 2.89 |
| 4'-Méthoxyflavanone ^{a)} | 24,69 | 2.57 | 32,95 | 3.76 | 1.46 | 3.30 |
| Hespérétine ^{a)} | 18,69 | 1.70 | 28,09 | 3.06 | 1.80 | 3.13 |
| Naringénine ^{b)} | 15,33 | 1.34 | 17,53 | 1.68 | 1.25 | 1.36 |
| Hespéridine ^{b)} | 10,43 | 0.59 | 13,05 | 0.99 | 1,61 | 2,26 |
| Naringin ^{b)} | 9,10 | 0.39 | 9,49 | 0.45 | 1.15 | 0.44 |

a) Phase mobile: Tampon/MeOH(40/60 v/v)

b) Phase mobile: Tampon/MeOH (50/50 v/v)

* Tampon: 1% d'acétate de triéthylammonium, pH 4.5. Débit 240 nL min⁻¹, λ_{205} nm

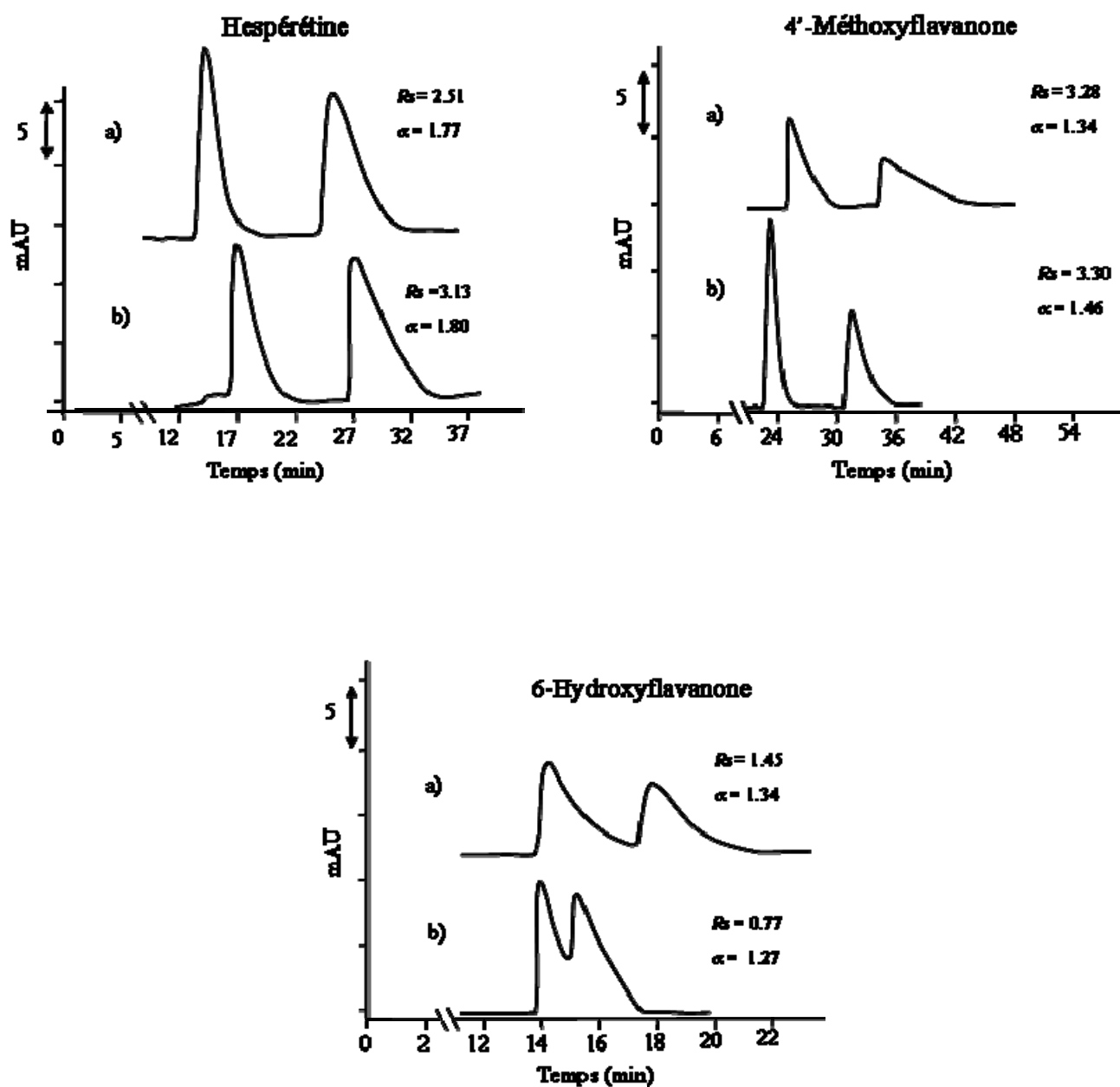


Figure 7 : Comparaison des chromatogrammes des séparations chirales obtenues avec deux phases mobiles différentes : a) H₂O/MeOH 40/60 (v/v), b) Tampon/MeOH/, 40/60 (v/v).
Débit: 240 nL min⁻¹, $\lambda_{205\text{ nm}}$

III.1.2. Evaluation de la phase stationnaire chirale en mode organique polaire et normal par Nano-CL

La forme particulière des cyclodextrines ainsi que leur aptitude à former des complexes d'inclusion, ont fait que ce sélecteur chiral soit plus efficace et par conséquent plus utilisé en mode inverse [1]. Toutefois, la dérivation des groupements hydroxyles de la CD par des substituants tels que les phénylcarbammates, profère un caractère multimodal au sélecteur chiral, ce qui nous permet d'envisager des séparations énantiomériques en mode organique polaire et normal [32].

Une phase mobile à base de MeOH a été utilisée pour les séparations énantiomériques et diastéréomériques des flavanones. Aussi, nous avons pu séparer la flavanone ($\alpha=1.19$, $R_s=1.34$), 7-méthoxyflavanone ($\alpha=1.26$, $R_s=1.77$), 6-méthoxyflavanone ($\alpha=1.20$, $R_s=1.48$), 4'-méthoxyflavanone ($\alpha=1.25$, $R_s=2.02$) et l'hésperétine ($\alpha=1.39$, $R_s=1.23$). Les 4'- et 6-hydroxyflavanones n'ont été que partiellement résolues, $R_s = 0.74$ et 0.60 , respectivement. Quelques uns des chromatogrammes obtenus sous ces conditions sont présentés sur la figure 8.

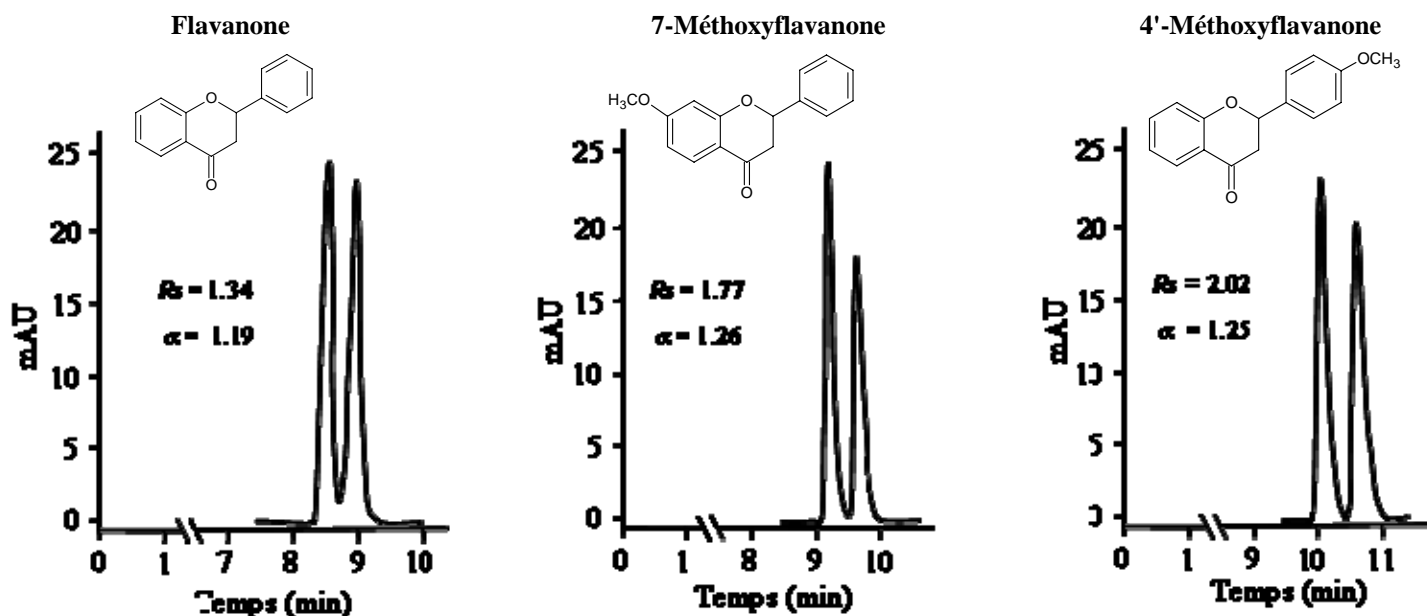


Figure 8: Chromatogrammes des séparations chirales obtenues en mode organique polaire (Phase mobile : 100 % MeOH, débit : 240 nL min⁻¹, λ_{205} nm)

Contrairement au mode inverse, il est plus que probable, que le mécanisme de discrimination chirale ne soit pas dû à la formation d'un complexe d'inclusion et cela à cause de la présence exclusive du méthanol dans la phase mobile qui semble occuper la cavité de la cyclodextrine [45]. Le mécanisme de la séparation chirale en MOP est principalement dû à la formation d'interactions de type : π - π -complexe, liaisons hydrogènes, dipôles-dipôles ainsi qu'électrostatiques, sans oublier les effets répulsifs stériques entre les solutés et les substituants de la CD [46,48]. La structure chimique des flavanones comporte des cycles aromatiques et des groupements carbonyles, les cycles sont susceptibles de former des interactions de type π - π avec les groupements phényles de la PSC, pendant que les carbonyles du soluté vont interagir avec ceux du sélecteur grâce à des liaisons hydrogènes et des interactions dipôles-dipôles. Ces effets facilitent vraisemblablement la formation du complexe diastéréomérique en MOP, ce qui explique les résolutions chirales obtenues avec ce mode de phase mobile.

Il est intéressant de noter que nous avons pu réaliser d'excellentes séparations chirales avec juste un solvant organique comme éluant sans aucun additif. Ainsi, dans le but d'étudier ce phénomène, nous avons testé 4 autres phases mobiles exquisément constituées de solvants organiques. Notre choix s'est porté sur l'acétonitrile (solvant aprotique) et 3 autres alcools (solvants protiques) : l'éthanol, n-propanol et 2-propanol.

Tel que cela est présenté sur la figure 9, le méthanol semble être le meilleur solvant organique pour ce mode de phase mobile. Afin d'expliquer ces résultats sur la base des propriétés intrinsèques des solvants testés, nous allons d'abord comparer les quatre alcools étudiés afin d'expliquer l'ordre d'efficacité et de rétention observés pour la résolution chirale des flavanones (MeOH>EtOH>2-PrOH>n-PrOH).

D'une manière générale, les alcools sont connus pour leurs très fortes interactions avec la cyclodextrine et cela dans l'ordre suivant n-PrOH>2-PrOH>EtOH>MeOH [49]. Cet ordre est en concordance avec la viscosité de solvants. En effet, le n-propanol est l'alcool le plus visqueux ce qui implique une très forte pression et donc des temps de rétention plus courts dus au très fort pouvoir déplaçant du n-PrOH, ce qui laisse peu de temps aux interactions stéréo-sélectives de s'établir entre le soluté et le sélecteur chirale [35, 50]. Ce qui explique les bons résultats obtenus avec le MeOH comme éluant.

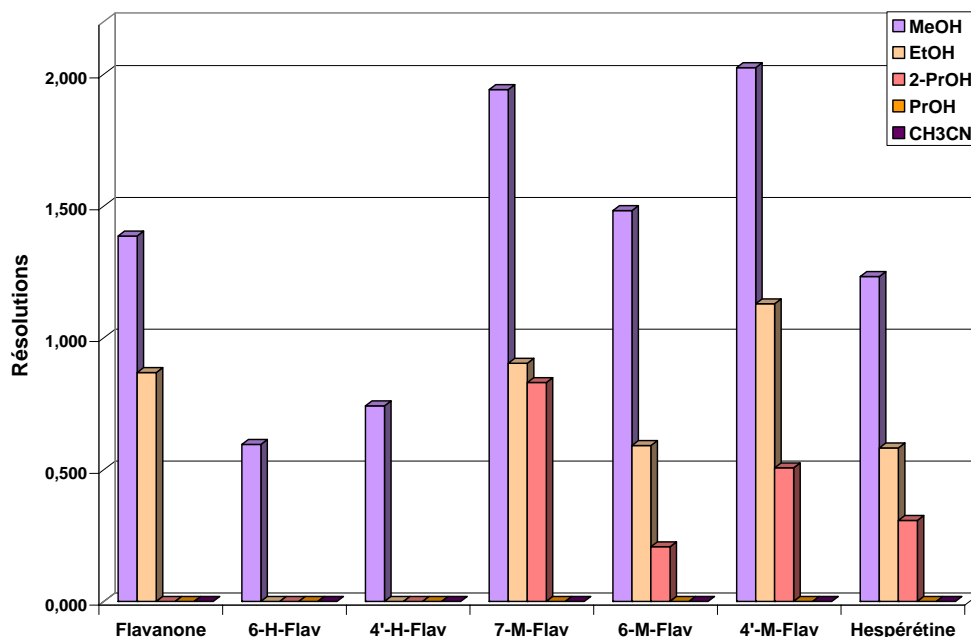


Figure 9 : Effet de la nature du solvant organique sur la résolution chirale de quelques flavanones (Phase mobile : 100% solvant organique, débit : 240 nL min⁻¹, λ_{205} nm)

Concernant la phase mobile à base d'acétonitrile, aucune séparation énantiomérique ou diastéréomérique n'a pu être achevée pour les composés étudiés. Ceci peut être expliqué par le caractère aprotique de l'acétonitrile dû à son pKa très élevé (25) [51], c'est pour cette raison qu'il tendra plus à former des agrégats de solvant, plutôt qu'un réseau de liaisons hydrogènes (tel que le MeOH) qui favoriserait la discrimination chirale [52].

La PSC a été également testée en mode normal. La phase mobile utilisée est le mélange hexane/éthanol. Comme cela fut le cas en MOP, la cavité de la cyclodextrine sera occupée par le solvant apolaire, ce qui inhibe la formation d'un complexe d'inclusion. La caractérisation chirale sera donc due à la formation d'un complexe diastéréomérique favorisé par la nature des substituants de la CD [53]. De plus il apparaît clairement que la nature aromatique du soluté soit cruciale pour sa résolution chirale [3].

L'optimisation de la composition de la phase mobile a été effectuée en faisant varier le ratio de l'éthanol et en ajoutant un aditif anionique : l'acide trifluoroacétique (TFA). Cet additif est largement utilisé pour supprimer l'étalement des pics et réduire le temps de rétention des composés acides [54]. Malgré la nature neutre de nos flavanones les bienfaits du TFA précédemment cités ont pu être observés. En effet, le milieu acide de la phase mobile a minimisé la formation des liaisons hydrogènes non stéréo-sélectives que pouvait former le soluté avec les groupements silanols de la PSC.

Sous ces conditions opératoires, seules les 4'-, 6- et 7- méthoxyflavanones, l'hespérétine et l'hespéridines ont pu être séparées avec des résolutions de l'ordre de 0.50-1.91, ce qui est bien en deçà des résultats obtenus en mode inverse. La figure 10 montre un exemple de chromatogrammes obtenus en mode normal.

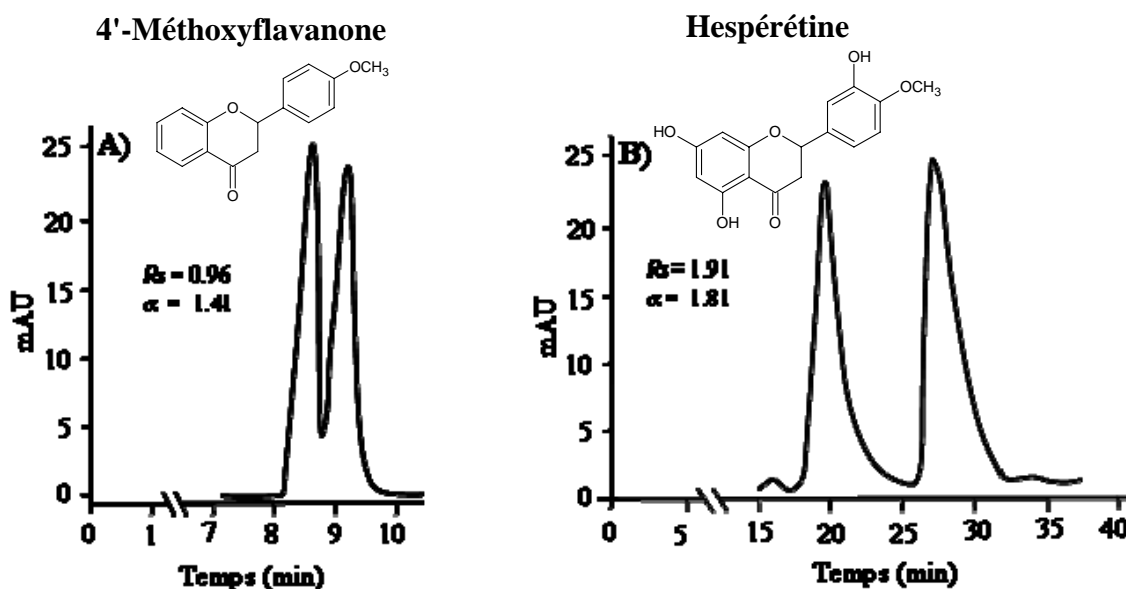


Figure 10 : Quelques chromatogrammes obtenus en mode normal par Nano-CL.

(A : Hexane/EtOH/TFA : 40/60/0.5 (v/v/v), 240 nL min⁻¹, λ_{205} nm)

(B : Hexane/EtOH/TFA : 70/30/0.5 (v/v/v), 240 nL min⁻¹, λ_{205} nm)

III.2. Evaluation de la PSC pour la résolution des flavanones par CLHP

Afin de comparer et évaluer l'efficacité de la Nano-CL par rapport à la CLHP, nous avons étudié la séparation chirale des flavanones sur une colonne CLHP classique (150 x 4.6 mm) remplie par la même PSC (phénylcarbamate-propyl- β -CD) [32].

Pour cela nous avons testé notre colonne dans les deux modes de phases mobiles faisant intervenir deux mécanismes de caractérisation chirales différents, à savoir les modes inverse et normal. Après plusieurs expériences préliminaires, nous avons sélectionné deux types de phases mobiles : la première destinée au mode inverse, constituée d'un mélange Eau/ACN. En effet, tel que cela a été démontré dans un travail ultérieur, le méthanol s'est avéré être inefficace pour la résolution chirale sur ce type de colonnes chromatographiques, de plus l'emploi d'un tampon aqueux a été évitée aux vues des risques liés à son utilisation [31,32, 55].

La seconde phase mobile, testée en mode normal, est composé d'un mélange heptane/2-PrOH. En effet, l'isopropanol a donné de meilleurs résultats que l'éthanol lors des précédentes études traitant de l'énantiosélectivité des PSCs-CD [32,55,56]. L'ajout du TFA à la phase mobile en mode normal n'a absolument pas affecté les énatio-séparations obtenues, et cela même pour l'hespérétine et la naringénine qui possèdent un léger caractère acide. Les résultats chromatographiques obtenues pour les modes inverse et normal, sous des conditions expérimentales optimales, sont résumés sur le tableau 4. Quelques chromatogrammes sont présentés sur la figure 11.

Tableau 4 : Séparation chirale des flavanones en mode inverse et normal par CLHP sur la phénylcarbamate-propyl- β -CD (1 mL min⁻¹).

| Composés | Mode inverse | | | | | Mode normal | | | | |
|---------------------|----------------------|-------|-------|----------|-------|-------------|-------|-------|----------|-------|
| | H ₂ O/ACN | k_1 | k_2 | α | R_s | Hept/2-PrOH | k_1 | k_2 | α | R_s |
| Flavanone | 70/30 | 20.77 | 23.76 | 1.14 | 2.13 | 98/02 | 1.88 | 2.52 | 1.34 | 1.36 |
| 7-Hydroxyflavanone | 80/20 | 40.87 | 44.42 | 1.09 | 1.23 | 90/10 | 5.44 | 5.92 | 1.09 | 0.35 |
| 6-Hydroxyflavanone | 80/20 | 32.92 | 38.47 | 1.17 | 2.33 | 98/02 | 6.95 | 8.17 | 1.17 | 1.04 |
| 4'-Hydroxyflavanone | 80/20 | 30.71 | 34.81 | 1.13 | 1.34 | 90/10 | 4.26 | 5.98 | 1.40 | 1.80 |
| 6-Méthoxyflavanone | 70/30 | 29.10 | 33.20 | 1.14 | 2.07 | 98/02 | 12.29 | 4.30 | 1.23 | 0.51 |
| Hespérétine | - | n.e. | n.e. | n.e. | n.e. | 80/20 | 8.66 | 18.21 | 2.10 | 1.62 |
| Naringénine | - | n.e. | n.e. | n.e. | n.e. | 90/10 | 7.74 | 10.56 | 1.36 | 0.45 |

n.e. : non-élué

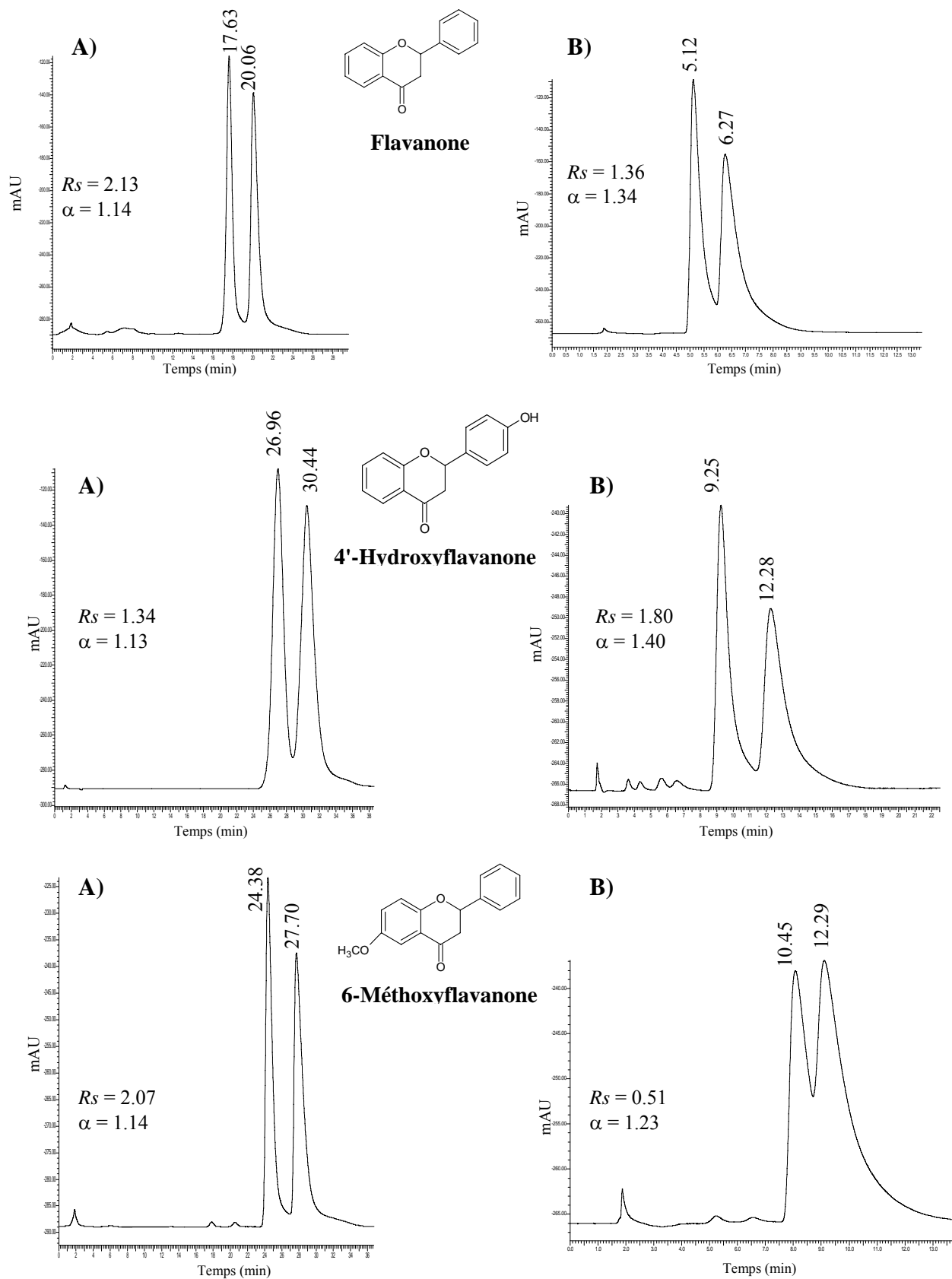


Figure 11 : Quelques chromatogrammes des séparations chirales des flavanones obtenues en mode inverse (A) et normal (B) par CLHP (Voir conditions opératoires sur le tableau 4)

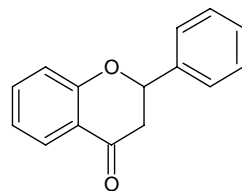
III.2.1. Etude de la séparation chirale en CLHP des flavanones en mode inverse

Tel que cela est présenté sur le tableau 4, hormis l'hespérétine et la naringénine qui n'ont pas pu être éluées quelque soit la composition de la phase mobile, toutes les autres flavanones injectées ont pu être résolues, notamment la flavanone, la 6-hydroxyflavanone ainsi que la 6-méthoxyflavanone qui ont été séparées avec des résolutions supérieures à 2.

L'étude de l'effet de la composition de la phase mobile sur la résolution chirale en mode inverse a été réalisée (Figure 13), tel que cela a été également observé en Nano-CL lors de l'utilisation de l'acétonitrile comme modifiant organique, l'enrichissement de la phase mobile en solvant organique altère la résolution chirale. Ce comportement peut être expliqué par la compétition de l'ACN (molécule hydrophobe) avec le soluté pour la formation de complexe d'inclusion avec la PSC. La très forte rétention de l'hespérétine et de la naringénine en mode inverse lors de l'utilisation de la CLHP serait peut être due aux interactions mises en jeu entre ces composés à caractère acide et les groupements silanols résiduels de la phase stationnaire ; néanmoins, ce comportement n'a pas été observé lors de l'utilisation de cette même phase stationnaire en Nano-CL.

Sur le tableau 5, nous pouvons apprécier la comparaison de différentes PSCs à base de β -CD, recensée dans la littérature, vis-à-vis de la résolution des flavanones par CLHP. Ainsi nous pouvons voir que le sélecteur chirale utilisé dans le présent travail démontre l'efficacité et la haute applicabilité de notre méthode analytique. A titre d'exemple, nous pouvons citer le cas de la flavanone qui a été séparée en moins de 30 min avec une résolution de 2.13 alors que Ng et *al.* ont obtenu pour ce même composé une résolution plus faible avec un temps d'analyse supérieur (75 min) [42].

La figure 14 illustre la comparaison des deux techniques analytiques, Nano-CL et CLHP, pour la séparation chirale de quelques flavanones en termes de rétention et de résolution, et cela pour un même type de phase mobile (H_2O/ACN). Ainsi nous pouvons voir que les facteurs de rétentions obtenus en Nano-CL sont largement inférieurs à ceux observés en CLHP et cela pour toutes les flavanones testées.



Flavanone

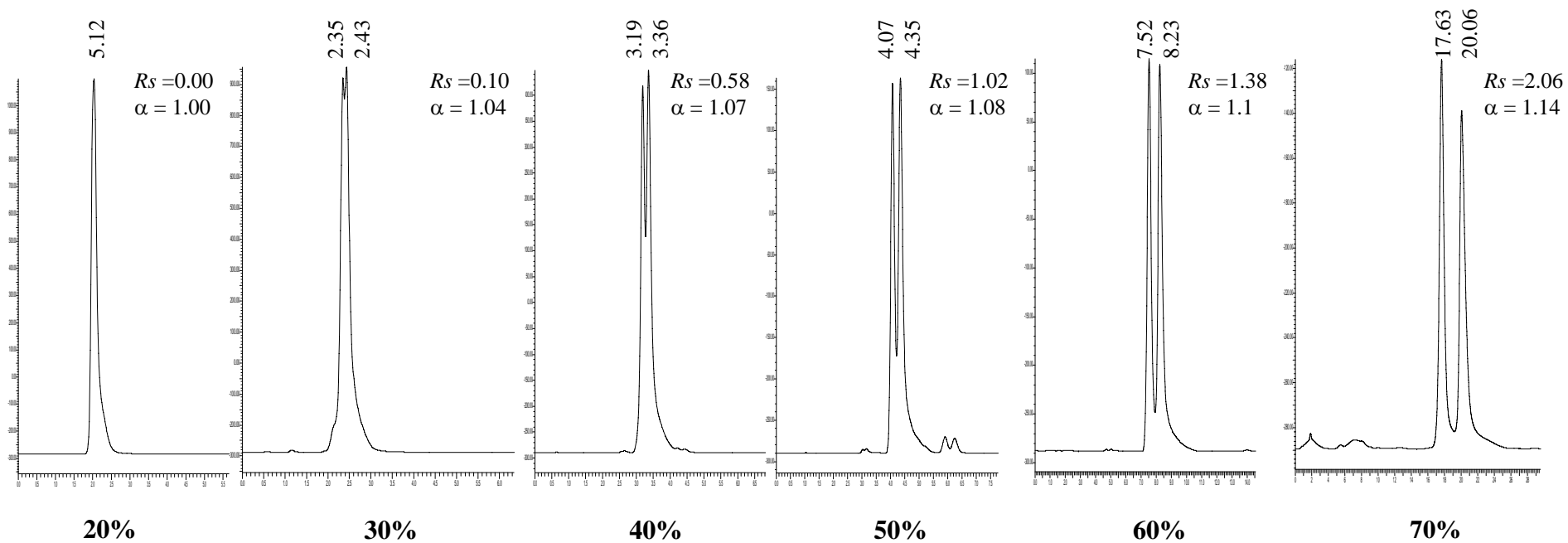


Figure 13: Effet de la composition de la phase mobile en eau sur la résolution chirale de la flavanone par CLHP en mode inverse (Phase mobile : Eau/ACN, 1 mL min⁻¹).

Hormis les 2 flavanones substituées en position 6, les résolutions obtenues avec les 2 techniques sont comparables ; néanmoins, il serait important de noter que contrairement à la CLHP, l'acétonitrile n'est pas le modifiant organique optimal pour la Nano-CL, et qu'avec un éluant composé d'eau et de méthanol on obtient de bien meilleures résolutions qu'on CLHP.

Tableau 5 : Comparaison des résolutions de quelques flavanones obtenues sur différentes PSCs à base de β-CD citées dans la littérature par CLHP en mode inverse.

| Composés | PSC 1 | PSC 2 | PSC 3 | PSC 4 | PSC 5 | PSC 6 |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Flavanone | 2.13 | 1.00 | 1.31 | 1.76 | 1.30 | 0.70 |
| 6-hydroxyflavanone | 2.33 | - | 1.45 | - | 1.20 | 0.80 |
| 4'-hydroxyflavanone | 1.34 | - | 0.81 | - | 0.00 | 0.00 |
| 6-méthoxyflavanone | 2.07 | 1.03 | 1.31 | - | 1.10 | 0.70 |

PSC 1 : PSC testée dans ce travail (voir conditions opératoires sur le tableau 4).

PSC 2 : heptakis(6 -azido-6-déoxy-2,3 -di-o-méthyl)-β-CD, Eau/MeOH : 60/40, 0.5 mL min⁻¹ [42]

PSC 3 : (6A-N-allylamino-6A-déoxy)perméthyl-β-CD, Tampon 1% ATEA, pH 5.5/MeOH : 75/25, 0.5 mL min⁻¹ [44]

PSC 4 : 2,4-dinitrophényl-β-CD, Tampon 1% ATEA, pH 4.1/ACN : 60/40, 1 mL min⁻¹ [47]

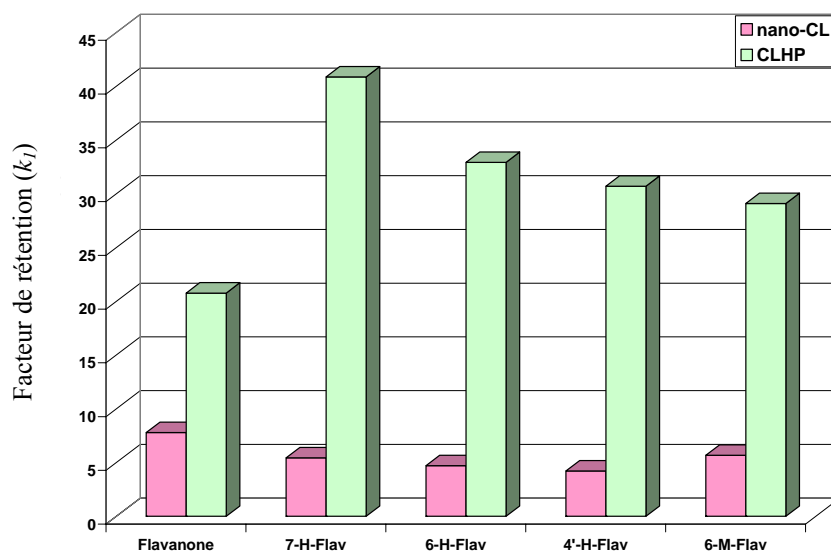
PSC 5 : Cyclobond I, Eau/MeOH : 50/50, 1 mL min⁻¹ [57]

PSC 6 : Acetylated Cyclobond I, Eau/MeOH : 50/50, 1 mL min⁻¹ [57]

Les comportements assez particuliers de la 6-hydroxyflavanone et de la 6-méthoxyflavanone ont attiré notre attention. En effet, l'étude menée par la Nano-CL a clairement démontré qu'en mode inverse la position (4'-) de la structure chimique des flavanones est un site privilégié lors de l'achèvement du mécanisme de caractérisation chirale en mode inverse. C'est ainsi que la 4'-hydroxyflavanone est nettement mieux résolue que les 6- et 7-hydroxyflavanones. En CLHP, la tendance s'inverse, ainsi, c'est la position (6-) qui semble être un site propice aux interactions stéréo-sélectives avec la PSC, ce qui explique les bonnes résolutions obtenues en CLHP.

Ce phénomène ainsi que la très forte rétention de l'hespérétine et de la naringénine observés en CLHP, illustrent l'influence de l'échelle chromatographique utilisée (nano ou conventionnelle) sur les propriétés énanti-sélectives du sélecteur chirale.

A)



B)

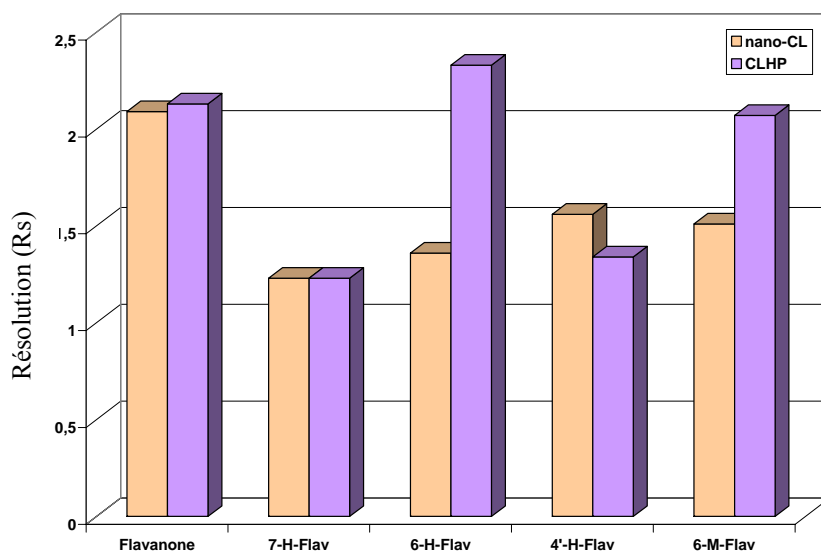


Figure 14 : Nano-CL v.s. CLHP. Comparaison des facteurs de rétention (A) et des résolutions (B) obtenues lors de la séparation de quelques flavanones en mode inverse (conditions expérimentales : voir tableaux 1 et 4).

III.2.2. Etude de la séparation chirale en CLHP des flavanones en mode normal

Contrairement au mode inverse, le test de la colonne en mode normal a permis l'élution de toutes les flavanones injectées. Néanmoins les résolutions obtenues en mode normal sont moins bonnes que celles observées en mode inverse. Nous avons également constaté que les solutés sont beaucoup moins retenus en mode normal, et cela quelque soit l'outil analytique utilisé : CLHP ou Nano-CL. Zhou et *al.* ont tenté de donner une explication à ce phénomène, en mettant en avant la meilleure allure des pics due à la grande stabilité des solvants utilisés en mode inverse [35].

Seules l'hésperétine et la 4'-hydroxyflavanone ont pu être totalement résolues (tableau 4), cette dernière est d'ailleurs mieux résolue qu'en mode inverse. L'effet de la composition de la phase mobile a été étudié, ainsi tel que cela est présenté sur la figure 15, l'enrichissement de la phase mobile en isopropanol diminue la rétention ainsi que la sélectivité des solutés, et cela est dû à la compétition de l'alcool avec le soluté pour la formation des liaisons hydrogènes avec le sélecteur chirale [55].

Similairement à ce qui a été observée en Nano-CL et contrairement à la CLHP en mode inverse, la position (4'-) de la structure chimique des flavanones, semble être importante dans l'établissement des trois points d'interactions nécessaires pour que la caractérisation chirale puisse s'effectuer, en effet, parmi les hydroxyflavanones injectées la (4'-) est la mieux séparée.

Nous pouvons également noter que les temps de rétentions obtenus par Nano-CL en mode normal sont inférieurs à ceux obtenus par CLHP ; néanmoins, les flavanones injectées ont été mieux séparées par CLHP, à l'exception de la 6-méthoxyflavanones et l'hésperétine qui ont démontré de meilleures séparations en Nano-CL.

Un autre fait intéressant concerne la nature des substituants des flavanones. Si nous comparons les 6-hydroxy et 6-méthoxyflavanones, nous pouvons conclure aisément que les groupements hydroxyles semblent former de plus fortes liaisons hydrogènes avec les groupements polaires de la cyclodextrine, ce qui explique la faible résolution de la 6-méthoxyflavanone.

L'opposé de ce phénomène a été observé en Nano-CL, en effet, les méthoxyflavanones ont été bien séparées en mode normal alors que les énantiomères de leurs homologues hydroxyflavanones ont tous été élués en même temps.

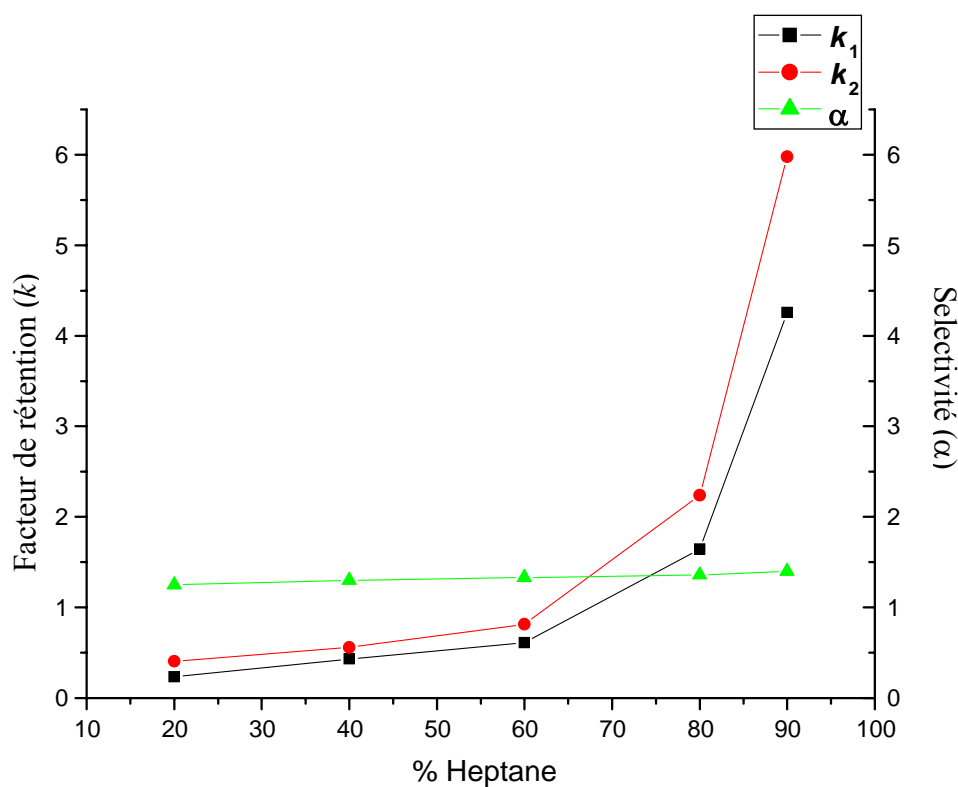


Figure 15 : Effet de la composition de la phase mobile sur la résolution chirale de la 4'-hydroxyflavanone en mode normal par CLHP (phase mobile : heptane/2-PrOH, 1 mL min⁻¹)

IV. Conclusion

La nano chromatographie liquide couplée à la PSC phénylcarbamate-propyl-β-CD s'est avérée être une technique de choix pour la résolution énantiomérique et diastéréomérique de plusieurs flavanones. Les analyses ont été effectuées sur une colonne capillaire de diamètre interne de 100 μm remplie d'une PSC-CD.

Les énatio-séparations de l'intégralité des composés injectés ont été obtenues en mode inverse avec d'excellentes résolutions. Nous avons démontré l'importance de la nature du solvant organique, puisque le MeOH s'est avéré être un bien meilleur modifiant organique que l'acétonitrile. Malgré la nature neutre de la majorité des flavanones injectées, l'ajout du tampon nous a permis d'améliorer l'efficacité des pics chromatographiques et de facto leurs résolutions pour la grande majorité des solutés injectés. Nous avons aussi démontré l'importance de la nature et la position des groupements substituant la flavanone. Malgré les bonnes résolutions obtenues en mode normal et organique polaire, ces deux modes ne se sont pas montrés aussi efficaces que le mode inverse pour la séparation des flavanones en Nano-CL.

Le mécanisme de caractérisation chirale semble plus complexe puisqu'il dépend de l'échelle analytique utilisée. En effet, dans les mêmes conditions expérimentales, les flavanones qui sont bien séparées avec une technique ne le sont pas nécessairement avec l'autre.

Par ailleurs, nous avons pu démontrer l'efficacité et la haute sélectivité du sélecteur chirale utilisé dans le présent travail en comparant les résultats obtenus en Nano-CL et CLHP à ceux cités dans la littérature.

Ainsi, les faibles quantités de solvants et de phases stationnaires utilisés font de la Nano-CL un outil analytique de choix pour la résolution des isomères optiques, vu son faible coût et son impact environnemental négligeable. Ceci confirme l'avantage de l'utilisation de cette technique miniature par rapport à la CLHP classique

V. Références bibliographiques

- [1] T.J. Ward, D.W. Armstrong. Dans: M. Zief, L.J. Crane (Eds.), *Chromatographic chiral separations*, Marcel Dekker, New York, 1988.
- [2] S. Ahuja, *Chiral separations : Applications and Technology*, American Chemical Society, Washington, 1997
- [3] D.W. Armstrong, H.J. Issaq (Ed.), *Century of Separation Science*, Marcel Dekker, New York (2002), p. 555.
- [4] S.Li, W. Purdy, *Chem. Rev.* 92 (1992) 1457.
- [5] C.J. Easton, S.F. Lincoln, *Chem. Soc. Rev.* 25 (1996) 163.
- [6] S. Fanali, *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 227.
- [7] B. Chankvetadze, *Capillary electrophoresis in chiral analysis*, John Wiley and Sons, New York 1997.
- [8] S. Fanali, P. Catarcini, G. Blaschke, B. Chankvetadze, *Electrophoresis* 22 (2001) 3131.
- [9] K.E. Karlsson, M. Novotny, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1662.
- [10] J.P.C. Vissers, H.A. Claessens, C.A. Cramers, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 1.
- [11] J.P.C. Vissers, *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 117.
- [12] Y. Ishihama, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 73.
- [13] J. Hernández-Borges, Z. Aturki, A. Rocco, S. Fanali, *J. Sep. Sci* 30 (2007) 1589.
- [14] S. Fanali, Z. Aturki, V. Kašicka, M.A. Raggi, G. D’Orazio, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1719.
- [15] G. D’Orazio, Z. Aturki, M. Cristalli, M.G. Quaglia, S. Fanali, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 105.
- [16] B. Chankvetadze, I. Kartoziya, J. Breitkreutz, Y. Okamoto, G. Blaschke, *Electrophoresis* 22 (2001) 3327.
- [17] B. Chankvetadze, C. Yamamoto, M. Kamigaito, N. Tanaka, K. Nakanishi, Y. Okamoto, *J. Chromatogr. A* 1110 (2006) 46.
- [18] R. T. Kennedy, J.W. Jorgenson, *Anal. Chem.* 61 (1989) 1128.
- [19] M. Krejčí, in J. Wiley (Editor), *Trace analysis with microcolumn liquid chromatography*, in *Chromatographic Science* vol. 59, New York, 1992.
- [20] F. Bressolle, M. Audran, T-N. Pham, J.J. Vallon, *J. Chromatogr. B* 687 (1996) 303.
- [21] E. Schneiderman, A.M. Stalcup, *J. Chromatogr. B* 745 (2000) 83.
- [22] K. Fujimura, K. Suzuki, K. Hagashi, S. Masuda, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2198.
- [23] T. Hargitai, Y. Kaida, Y. Okamoto, *J. Chromatogr.* 628 (1993), 11.
- [24] N. Thuaud, B. Seville, A. Deratani, G. Lelievre, *J. Chromatogr.* 555 (1991) 53.

- [25] D. Wistuba, V. Schurig, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1344.
- [26] S.M. Han, *Biomed. Chromatogr.* 11 (1997) 259.
- [27] S.C. Chang, G.L. Reid, S. Chen, C.D. Chang, D.W. Armstrong, *Trends Anal. Chem.* 12 (1993) 144.
- [28] D.W. Armstrong, S. Chen, C. Chang, S. Chang, *J. Liq. Chromatogr.* 15 (1992) 545
- [29] F. Tazerouti « Synthèse, caractérisation et application des phases stationnaires chirales en chromatographie liquide » Thèse de Doctorat d'état, 2001, USTHB.
- [30] F. Tazerouti, A.Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B.Y. Meklati, P. Franco, C. Minguillon, *Chirality*, 14 (2002) 59.
- [31] K. Si-Ahmed, F. Tazerouti, A.Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B.Y. Meklati, *Chromatographia* 62 (2005) 571.
- [32] K. Si-Ahmed, F. Tazerouti, A.Y. Bajah-Hadj-Ahmed, B.Y. Meklati, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 2025.
- [33] K. Si-Ahmed, F. Tazerouti, A.Y. Bajah-Hadj-Ahmed, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 507.
- [34] D. Wistuba, H. Czesla, M. Roeder, V. Schurig, *J. Chromatogr. A* 815 (1998) 183.
- [35] A. Zhou, X. Lv, Y. Xie, C. Yan, R. Gao, *Anal. Chim. Acta* 547 (2005) 158.
- [36] L. Bo, N. Siu-Choon, F. Yu-Qi, *Electrophoresis* 29 (2008) 4045.
- [37] M. Pumera, I. Jelinek, J. Jindrich, O. Benada, *J. Liq. Chromatogr.* 25 (2002) 2473.
- [38] K. Si-Ahmed, F. Tazerouti, A.Y. Badjah-Hadj-Ahmed, Z. Aturki, G. D'Orazio, A. Rocco, S. Fanali, *J. Chromatogr. A* (2009) DOI : 10.1016/j.chroma.2009.07.053.
- [39] J. A. Yáñez, P. K. Adrews, N. M. Davies, *J. Chromatogr. B* 848 (2007) 159.
- [40] G. D'Orazio, Z. Aturki, M. Cristalli, M.G. Quaglia, S. Fanali, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 105.
- [41] R.J. Soukup, R.V. Rozhkov, R.C. Larock, D.W. Armstrong, *Chromatographia* 61 (2005) 219.
- [42] S.C. Ng, T.T. Ong, P. Fu, C.B. Ching, *J. Chromatogr. A* 968 (2002) 31.
- [43] C.R. Mitchell, D.W. Armstrong, in: G. Gübitz, M.G. Schmid (Eds.), *Chiral Separations: Methods and Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, 2005, p. 61.
- [44] X.H. Lai, S.C. Ng, *J. Chromatogr. A* 1059 (2004) 53.
- [45] S. Das, K.G. Thomas, M.V. George, P.V. Kamat, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 88 (1992) 3419.
- [46] D.W. Armstrong, S. Chen, C. Chang, S. Chang, *J. Liq. Chromatogr.* 15 (1992) 545.

- [47] M.L. Hilton, S.C. Chang, M.P. Gasper, M. Pawlowska, D.W. Armstrong, A.M. Stalcup, J. Liq. Chromatogr. 16 (1993) 127.
- [48] Q. Zhong, L. He, T.E. Beesley, W.S. Trahanovsky, P. Sun, C. Wang, D.W. Armstrong, J. Chromatogr. A 1115 (2006) 19.
- [49] M.W. Matchett, S.K. Branch, T.M. Jefferies, Chirality 8 (1996) 126.
- [50] M. Maftouh, C. Granier-Loyaux, E. Chavana, J. Marini, A. Pradines, Y. Vander Heyden, C. Picard. J. Chromatogr. A 1088 (2005) 67.
- [51] W. L. Jorgensen, J. M. Briggs, J. Gao, J. Am. Chem. Soc. 109 (1987) 6857.
- [52] Y. Yang, R.I. Boysen, M.T.W. Hearn, J. Chromatogr. A 1043 (2004) 81.
- [53] D.W. Armstrong, A.M. Stalcup, M.L. Hilton, J.D. Duncan, J.R. Faulkner, S.C. Chang, Anal. Chem. 62 (1990) 1610.
- [54] C. Perrin, V.A. Vu, N. Matthijs, M. Maftouh, J. Chromatogr. A 947 (2002) 69.
- [55] K. Si-Ahmed « Séparation de produits optiquement actifs sur des phases stationnaires chirales à base de β -cycodextrines » Thèse de Magister, 2004, USTHB.
- [56] B.H. Shao, X.Z. Xu, J.D. Lu, L. Zou, X.Y. Fu, Chinese Chem. Let. 14 (2003) 401.
- [57] M. Krause, R. Galensa, J. Chromatogr, 514 (1990) 147.

CHAPITRE V

**ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE
PAR NANO-CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE
DES ENANTIOMERES DE L'HESPERETINE
DANS L'URINE HUMAINE APRES INGESTION
D'UN JUS D'ORANGE SANGUINE**

I. Introduction

La consommation des agrumes ainsi que leur jus a fortement augmenté ces dernières décennies ; ceci peut être expliqué par les nombreuses campagnes de sensibilisation menées par plusieurs organismes internationaux tel que l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) [1]. Cette prise de conscience est principalement due aux innombrables bienfaits des produits à base de citrus sur la santé humaine, justifiés par la présence de l'une des plus importantes familles de métabolite secondaires végétaux, dénommés les flavonoïdes [2].

Les flavonoïdes sont des substances naturelles polyphénoliques très répandues dans le règne végétal. Parmi cette famille de composés, nous pouvons citer l'hespéridine (HD) un citroflavonoïde très présent dans les agrumes en général et les oranges en particulier. La HD est une flavanone glycosilée (3',5,7-trihydroxy-4'-méthoxyflavanone-7-rhamnoglucoside), ce qui signifie qu'elle est constituée d'un noyau flavanone d'hespérétine (3',5,7-trihydroxy-4'-méthoxyflavanone) auquel est liée de manière covalente une partie glucosidique de rutinose L-rhamnosyl-(α 1 \rightarrow 6)-glucose) fixée sur le groupe hydroxyle présent sur le carbone en position 7 de l'hespérétine (Figure 1) [3]. L'hespérétine est un flavonoïde chiral, il existe donc sous deux forme énantiomériques grâce à la présence d'un centre stéréogénique en position 2 du cycle pyranone ; néanmoins, dans la nature, c'est la forme 2S qui prédomine. Après ingestion d'un jus d'orange, la partie glucosidique de la HD est rapidement éliminée durant le transit dans le tractus gastro-intestinal ainsi que dans le foie. Les produits du métabolisme de l'hespéridine dans le corps humain seront donc la molécule aglycone à savoir l'hespérétine ainsi que ses conjugués sulfate et glucuronide [4].

L'Hespéridine (vitamine P) ainsi que l'hespérétine (HT) démontrent de nombreuses propriétés pharmacologiques. Elles démontrent des activités antifongiques, antioxydantes, antibactériennes, antivirales, anti-cancérigènes, antiallergiques, anti-inflammatoires et analgésiques [5-8]. Tous les bienfaits de la HD et la HT expliquent l'intérêt grandissant qui leur est porté par la communauté scientifique, notamment, concernant l'étude de leur comportement dans les fluides biologiques [9-13].

Toutefois, la grande majorité des travaux recensés dans la littérature, traitant du métabolisme de l'hespéridine ne tiennent pas en compte le caractère chiral de cette molécule ;

alors qu'il est connu que l'adsorption, la distribution, le métabolisme ainsi que l'élimination de toute substance dans le corps humain est très probablement stéréosélectifs [14].

En effet, malgré le développement de plusieurs méthodes analytiques telles que la chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC) [15], l'électrophorèse capillaire (EC) [16] et la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) [17,18] utilisées pour la résolution chirale des énantiomères de l'hespérétine, nous n'avons trouvé que deux études qui traitent de l'identification et de la quantification stéréospécifique de l'hespérétine dans les fluides biologiques. Ces travaux ont été menés par Yáñez et *al.* qui ont développé une méthode stéréo-sélective CLHP couplée à une colonne commerciale à base de cellulose [3,19].

En se basant sur les résultats obtenus dans le chapitre III, nous décrivons dans cette partie de travail la quantification par Nano-CL des énantiomères de l'hespérétine dans l'urine d'un volontaire sain. Les échantillons ont été collectés entre 0 et 24 h après ingestion d'un jus d'orange sanguine commercial. Une hydrolyse enzymatique a été effectuée afin d'isoler l'hespérétine de ses homologues issus du tract gastro-intestinal. Par la suite, une extraction liquide-liquide suivie de l'analyse stéréospécifique par Nano-CL ont été menées [20].

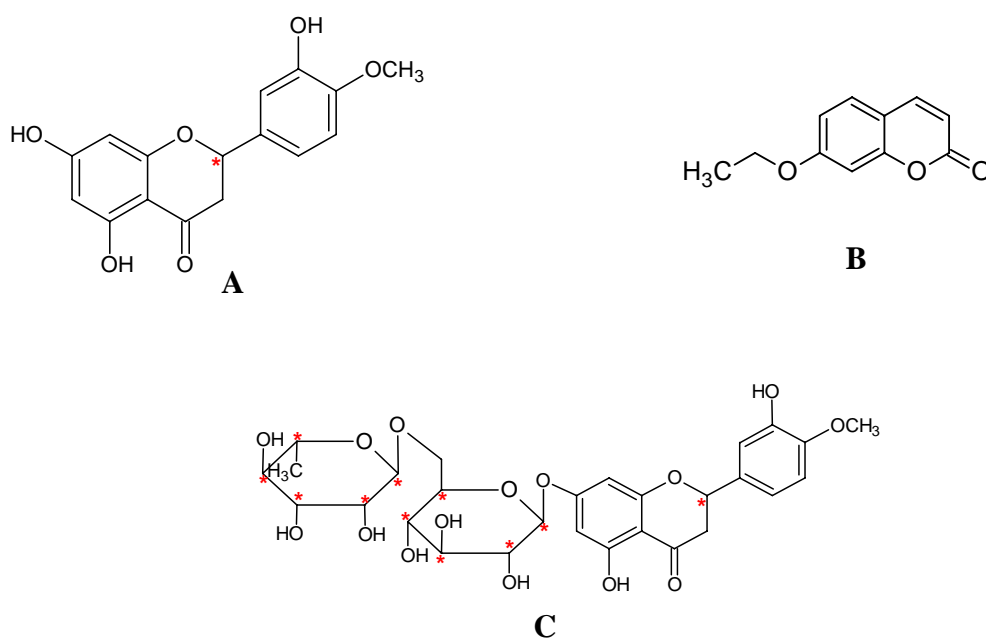


Figure 1 : Structures chimiques de l'hespérétine (A), la 7-éthoxycoumarine (B) et de l'hespéridine (C).

II. Partie expérimentale

II.1. Réactifs chimiques

L'hespérétine racémique, l'hespéridine, la 7-éthoxycoumarine et la β -glucuronidase H. pomatia Type-HP-2 ont été fournis par Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA). Le méthanol, l'acide acétique, la triéthylamine (TEA), l'acide chlorhydrique, l'acide ascorbique, l'hydroxyde de sodium ainsi que l'acétate d'éthyle sont tous de grade analytique et ont été acquis auprès de Carlo Erba (Milan, Italie). L'eau ultra pure a été obtenue grâce au système de purification Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Le jus d'orange sanguine Oranfrizer® utilisé durant le présent travail a été acheté dans un supermarché à Rome (Italie), ce jus pasteurisé a été obtenu des mandarines et oranges sanguines siciliennes.

II.2. Appareillage Nano-CL et préparation de la colonne capillaire

(Voir chapitre IV)

II.3. Préparation des échantillons

Les solutions mères d'hespérétine ainsi que du standard interne (S.I.) (7-éthoxycoumarine) ont été préparées par dissolution de la quantité appropriée du composé dans du méthanol de manière à obtenir des concentrations finales de 1 mg mL^{-1} et $100 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivement. Ces solutions ont été stockées à l'abri de la lumière à -20°C et utilisées pour une durée n'excédant pas un mois.

La linéarité de la méthode a été évaluée à 6 niveaux de concentrations pour chaque énantiomère (0.25, 0.50, 1.00, 2.50, 5.00, 10.00 et $25.00 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$). Ces solutions ont été préparées quotidiennement par dilutions séquentielles de la solution mère d'hespérétine dans un blanc urine (le blanc urine est obtenu par le volontaire avant l'ingestion du jus d'orange). Le volume final pour chaque échantillon a été fixé à $500 \text{ }\mu\text{L}$. Chaque mélange standard a subi une extraction liquide-liquide avant d'être analysé.

II.4. Extraction liquide-liquide

Nous avons ajouté à $500 \text{ }\mu\text{L}$ d'urine (enrichie en hespérétine ou obtenue du volontaire) $50 \text{ }\mu\text{L}$ du standard interne de concentration $100 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, $100 \text{ }\mu\text{L}$ de HCl 0.1 N ainsi qu' 1 mL d'acétate d'éthyle, successivement.

Ce mélange a été soumis à un agitateur vibrant type vortex pendant 1 min puis mis dans un bain à ultra-sons pendant 1 min et centrifugé à 3000 tour par minute pendant 8 min. La couche organique du surnageant obtenu a été soigneusement prélevée, cette opération a été répétée trois fois. Les trois surnageants obtenus ont été combinés et évaporés sous azote. Le résidu obtenu a été reconstitué dans 500 μL de phase mobile. Afin de s'assurer de l'élimination complète de tout composant solide de l'urine, la solution finale a été soumise une nouvelle fois au vortex (1 min) et centrifugée à 3000 tpm (5 min). Le surnageant obtenu a été injecté dans le système chromatographique afin d'être quantifié.

II.5. Répétabilité, précision et justesse

L'étude de la répétabilité a été réalisée en répétant les analyses six (6) fois durant la même journée (intra-jour), sur trois journées consécutives (inter-jour), et cela pour trois niveaux de concentrations différentes de 2R- ou 2S-hespérétine préparées dans un blanc urine (0.50, 5.00 et 25.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

La précision a été évaluée en calculant la déviation standard relative (D.S.R.%) des concentrations énantiomériques. Concernant la justesse (Biais%), elle a été estimée sur la base du pourcentage d'erreur moyenne entre les concentrations réelles et mesurées.

II.6. Recouvrement

Le recouvrement ou les rendements d'extraction des deux énantiomères d'hespérétine ont été établis pour trois concentrations 0.50, 5.00 et 25.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Concernant le standard interne, le rendement a été évalué pour une concentration de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ces solutions ont été obtenues en enrichissant 0.5 mL d'un blanc urine avec des quantités appropriées d'hespérétine et de 7-éthoxycoumarine. Ces échantillons ont été extraits suivant la procédure décrite en II.4. puis analysés par Nano-CL. L'extraction et l'analyse ont été répétées trois fois pour chaque concentration (n=3).

Le recouvrement de la méthode a été déterminé en comparant la surface du pic des énantiomères de HT ainsi que celle du SI dans le blanc urine surchargé avec celles obtenues en analysant les mêmes concentrations de HT et SI mais préparées directement dans la phase mobile (sans extraction).

II.7. Excrétion urinaire de l'hespérétine chez l'être humain

Après 5 jours de diète vis-à-vis de tout aliment susceptible de contenir de l'hespérétine ou de l'hespéridine (notamment les fruits de type citrus) ainsi qu'une nuit de jeun, le volontaire sain a ingéré tôt le matin 1 L d'un jus d'orange sanguine commercial et cela en moins de 10 min. Le volontaire est un sujet male, non fumeur et sans maladies gastro-intestinales. Il n'est pas végétarien et ses habitudes alimentaires sont stables et saines.

Le jus utilisé durant la présente étude est de haute qualité, il a été pasteurisé avec un emballage aseptique, il a donc une courte durée de péremption (1 mois) et doit être obligatoirement conservé sous réfrigération (4 °C). De plus, il doit être impérativement consommé dans les trois jours qui suivent son ouverture. La quantification énantiomérique de l'hespéridine dans ce jus d'orange a été précédemment réalisée par électrophorèse capillaire (Voir chapitre III, partie III.3. Page 99). Ainsi l'analyse a révélé la présence des deux diastéréoisomères de l'hespéridine (HD) avec des concentrations de 112.81 and 599.55 mg L⁻¹ pour les (2R)- et (2S)-HD, respectivement.

L'urine a été collectée à plusieurs intervalles de temps entre 0 et 24 h après l'ingestion du jus d'orange, elle a été stockée dans des récipients préalablement lavés avec une solution acide. Le volume a été mesuré, puis un échantillon d'urine de 10 mL est prélevé et conservé à -20 °C jusqu'à son analyse. Une quantité appropriée de sodium azide (agent stabilisateur) a été ajouté de manière à atteindre une concentration de 1 mg mL⁻¹.

Les conjugués d'hespérétine (sulfates et glucuronides) issus du processus du métabolisme de l'hespéridine ont été soumis à une hydrolyse enzymatique. Ainsi, 0.5 mL d'urine collectée a été incubée sous agitation constante avec 50 µL d'un tampon d'acétate de sodium (1M, pH 4.8), 50 µL d'acide ascorbique et 25 µL de β-glucuronidase H. pomatia Type-HP-2 pendant 18 h et à 37 °C. Les échantillons d'urine obtenus ont été traités suivant la méthode d'extraction détaillée dans la partie II.4 puis analysés par Nano-CL.

III. Résultats et discussion

III.1. Traitement des échantillons biologiques

Une séparation efficace des composés présents dans les matrices biologiques (plasma, urine ...) nécessite un prétraitement de l'échantillon avant d'effectuer l'analyse chromatographique. En effet, il est largement admis que l'urine contient plusieurs substances endogènes susceptibles d'interférer avec les pics des composés ciblés lors de l'analyse chromatographique, ce qui pourrait rendre la procédure de quantification laborieuse [11].

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à la quantification de l'hespérétine dans l'urine humaine après ingestion d'un jus d'orange sanguine. Néanmoins, la HT présente dans l'urine est majoritairement sous forme de conjugués glucuronides ou sulfates issus du processus de métabolisme [3,4]. Donc afin de libérer l'hespérétine sans la décomposer, nous avons traité l'urine avec la H. promatia type-HP-2 qui se trouve être un mélange d'enzymes dérivées d'escargot romains. Ces enzymes présentent des activités β -glucuronidase et sulfatase.

Les résultats présentés dans ce travail représentent la concertation totale en hespérétine présente dans l'urine, ce qui inclus la HT non conjuguée ou alors liée aux groupements glucuroniques, sulfates ou glycosidiques ainsi que la HT liée ou non aux protéines [11,12]. Le protocole d'hydrolyse enzymatique décrit ainsi que le standard interne (7-éthoxycoumarine) ont été utilisés par plusieurs auteurs afin d'isoler et quantifier les flavonoïdes ciblés dans la matrice biologique [3,11,14,19].

Nous avons recensé dans la littérature plusieurs protocoles décrivant l'extraction de l'hespérétine à partir de l'urine, ces méthodes sont principalement des extractions de type liquide-liquide suivie d'une évaporation sous azote. Parmi les solvants d'extraction utilisés nous pouvons citer l'acétonitrile [3,19] et le méthanol [10]. Quelques méthodes solide-liquides ont également été décrites [9,11], néanmoins les taux de recouvrement rapportés étaient insatisfaisants. En ce qui nous concerne nous avons utilisé une méthode d'extraction liquide-liquide, après l'essais de plusieurs solvants d'extraction, notre choix s'est porté sur l'acétate d'éthyle qui nous a permis d'atteindre de très bon rendement d'extraction ainsi qu'une évaporation sous azote plus rapide que lors de l'utilisation d'acétonitrile ou de méthanol.

III.2. Conditions chromatographiques

L'optimisation de la séparation chirale de l'hespérétine en termes de résolution et de sélectivité a été précédemment effectuée en faisant varier les différentes conditions chromatographiques (voir chapitre IV) [21]. La meilleure séparation des énantiomères de HT ainsi que le SI a été obtenue avec une phase mobile constituée d'un mélange de tampon d'acétate de triéthylammonium (1% (v/v), pH 4.5) et de méthanol dans les proportions suivante : 30/70 (v/v), le débit de la phase mobile était de 400 nL min⁻¹.

La sélectivité de la méthode a été clairement démontrée. En effet, tel que cela peut être observé sur les figures 2 (A-C) aucune interférence ou co-élution des pics ciblés n'a été observée. La confirmation de l'ordre d'élution énantiomérique a été effectuée lors de l'analyse de l'hespéridine dans le jus d'orange ainsi que l'urine obtenue après ingestion du jus d'orange. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux cités dans la littérature, pour lesquels les échantillons d'urine ou de jus sont toujours énanti-enrichis en 2S-hespérétine ou 2S-hespéridine, respectivement [3,19].

Les temps de rétentions de 2R- et 2S-HT dans l'urine sont approximativement de 9 et 12 min, respectivement. Le standard interne a été élué à 7 min environ (Figure 2 B). Si nous comparons ces résultats avec ceux obtenus par Yáñez *et al.* [19], nous pouvons remarquer que des résolutions similaires ont pu être atteintes. Par ailleurs, la méthode Nano-CL présentement proposée a permis d'effectuer l'analyse en moins de 15 min ce qui est nettement inférieur au temps d'analyse obtenu en CLHP conventionnelle sur une phase stationnaire commerciale à base de cellulose (30 min) [19].

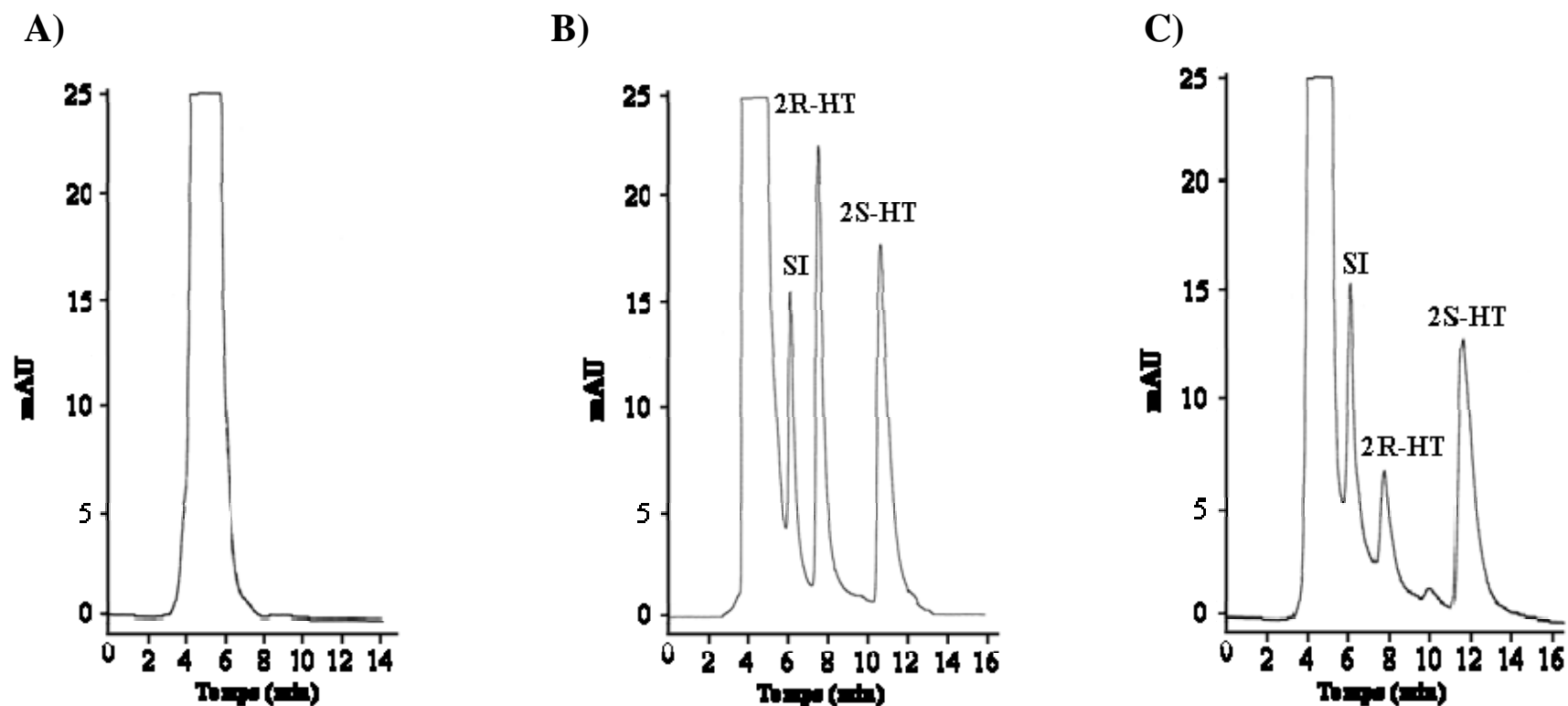


Figure 2: Chromatogrammes obtenus par Nano-CL de (A) Blanc urine, (B) urine contenant le standard interne ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) ainsi que 2R- et 2S-hespérétine ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$ pour chaque énantiomère) et (C) échantillon d'urine humaine collectée 7h après l'ingestion du jus. Conditions expérimentales: colonne capillaire remplie de phénylcarbamate-2-propyl- β -CD, $100 \mu\text{m}$ D.I., avec 22.5 cm et 34.0 cm de longueur effective et totale, respectivement; phase mobile : 1% TEAA pH 4.5/méthanol 30/70 (v,v), débit : 400 nL min^{-1} .

III.3. Validation de la méthode

III.3.1. Sensibilité et linéarité

Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) ont été estimées à 3 et 10 fois le rapport signal/bruit de fond, respectivement. La valeur de LD pour chaque énantiomère a été évaluée à $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$. La valeur du LQ était de $0.50 \mu\text{g mL}^{-1}$ avec une précision (DSR%) inter-jour de 0.39 et 1.24 % ainsi qu'une justesse (Biais%) de -1.82 et -2.01% pour les 2R- et 2S- hésperétine, respectivement (Tableau 1).

L'excellente linéarité de la méthode ($r^2 = 0.9990$ et 0.9996 pour 2R- et 2S- hésperétine, respectivement) a été démontrée grâce aux courbes de calibration construites à partir de la variation des ratios des hauteurs de pics (2R- ou 2S-HT/SI) en fonction de la concentration énantiomérique correspondante en hésperétine, et cela pour un intervalle de concentrations allant de 0.25 à $25 \mu\text{g mL}^{-1}$. Les droites de régressions obtenues pour 2R- et 2S-HT sont $y = 0.0557x + 0.0077$ et $y = 0.0487x - 0.0031$, respectivement (Figure 3).

III.3.2. Précision, justesse et recouvrement

Les précisions inter- et intra-jours (D.S.R.%) calculées durant l'étude de la répétabilité de l'analyse (n=6) pour les énantiomères de l'hésperétine étaient en-dessous de 4.5% et cela pour tout l'intervalle de concentrations étudiées ; en ce qui concerne les justesses inter- et intra-jours (Biais%), elles variaient entre -2.01 et -0.25% (Tableau 1). Ces données indiquent la bonne reproductibilité et l'exactitude de la méthode Nano-CL développée.

Le recouvrement de la méthode (ou les rendements d'extractions) des deux énantiomères de l'hésperétine et du standard interne a été directement évalué par comparaison de la surface du pic de chaque composé dans le blanc urine enrichi et soumis à la procédure d'extraction liquide-liquide avec la surface du pic du même composé dans des standards préparés dans la phase mobile aux mêmes concentrations. Trois (3) concentrations énantiomériques ont été choisies pour effectuer cette étude 0.50 , 5.00 et $25.00 \mu\text{g mL}^{-1}$. Concernant le SI sa concentration reste invariable ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Pour chaque concentration l'extraction est répétée trois fois (n=3). Ainsi, le rendement d'extraction moyen du SI est de $96.53 \% \pm 1.86$ (moyenne \pm D.S.). Concernant les énantiomères de HT dans l'urine le recouvrement variait entre 82.48% et 99.67% (Tableau 2).

Tableau 1: Précision et justesse Inter- (n=3) et intra-jour (n=6) de l'analyse des énantiomères de l'hespérétine dans l'urine humaine.

| Concentration ajoutée de chaque énantiomère (2R- ou 2S-HT) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Concentrations observées | | | | D.S.R. (%) | | | | Biais (%) | | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-------|------------|-------|------------|-------|------------|-------|------------|-------|------------|-------|
| | Intra-jour | | Inter jour | | Intra-jour | | Inter jour | | Intra-jour | | Inter jour | |
| | 2R-HT | 2S-HT | 2R-HT | 2S-HT | 2R-HT | 2S-HT | 2R-HT | 2S-HT | 2R-HT | 2S-HT | 2R-HT | 2S-HT |
| 0.50 | 0.49 | 0.49 | 0.49 | 0.49 | 2.57 | 2.73 | 0.39 | 1.24 | -1.98 | -0.71 | -1.82 | -2.01 |
| 5.00 | 4.98 | 4.94 | 4.95 | 4.90 | 1.39 | 4.45 | 1.05 | 1.12 | -0.32 | -1.68 | -0.94 | -2.00 |
| 25.00 | 24.94 | 24.88 | 24.75 | 24.56 | 1.59 | 1.88 | 1.29 | 1.32 | -0.25 | -0.47 | -0.99 | -1.78 |

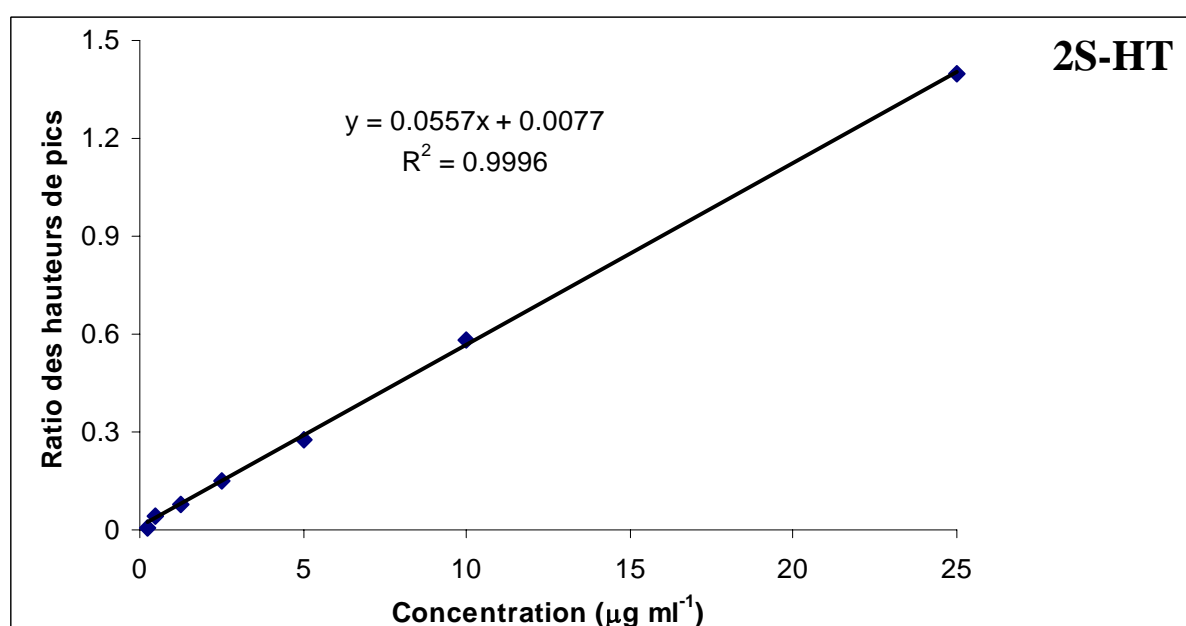
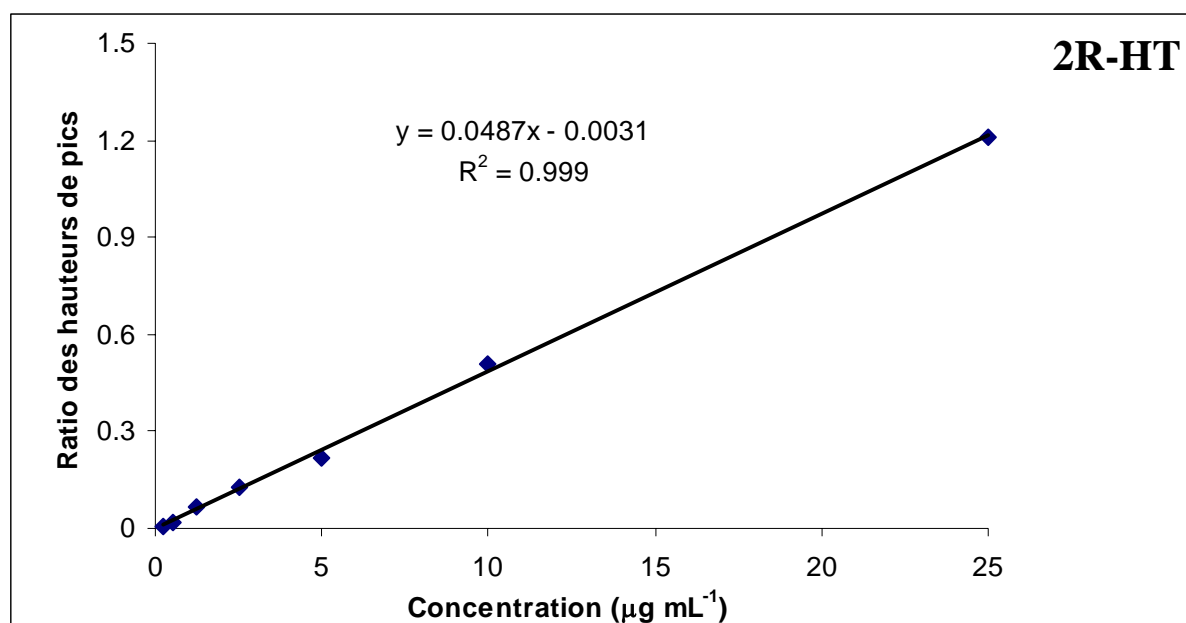


Figure 3 : Courbes de calibrations obtenues pour les énantiomères de l'hespérétine lors de leur analyse dans l'urine humaine.

Tableau 2 : Recouvrement des énantiomères de l'hespérétine à partir de l'urine humaine (n=3)

| Concentration de chaque énantiomère ajouté (2R- ou 2S-HT) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Recouvrement (%) \pm D.S. | | D.S.R. (%) | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|------------------|------------|-------|
| | 2R-HT | 2S-HT | 2R-HT | 2S-HT |
| 0.50 | 85.65 \pm 1.35 | 82.48 \pm 0.90 | 1.57 | 1.10 |
| 5.00 | 94.92 \pm 5.42 | 87.99 \pm 5.03 | 5.71 | 5.69 |
| 25.00 | 99.67 \pm 0.87 | 97.34 \pm 0.69 | 0.87 | 0.71 |

III.3.3. Etude pharmacocinétique stéréospécifique de l'hespérétine chez l'homme

La méthode Nano-CL développée a été appliquée pour la détermination qualitative et quantitative des énantiomères de l'hespérétine dans l'urine humaine après administration orale de 112.81 mg de 2R-hespéridine et 599.55 mg de 2S-hespéridine et cela après ingestion d'1 L de jus d'orange sanguine. Bien que de telles concentrations en HT puissent paraître relativement élevées, il a été précédemment démontré que des quantités similaires peuvent être aisément ingérées avec la consommation du fruit frais (orange) [10]. En effet, Tomás-Barberán et Clifford ont clairement établi que la consommation du fruit entier permet un apport en hespéridine 5 fois supérieur à celui lié à l'ingestion de son jus [22]. Par ailleurs, dans une étude menée en Finlande, il a été reporté que l'hespérétine est le flavonoïde le plus consommé avec un taux moyen de 28.3 mg/jour l'équivalent de 30% de la totalité des flavonoïdes consommés [23].

Sur la figure 4, nous présentons les profils de variation des concentrations des 2S- et 2-R hespérétine dans l'urine en fonction du temps. Nous pouvons constater à partir de ces courbes que les énantiomères de l'hespérétine sont détectés dans les deux heures qui suivent l'ingestion du jus. En ce qui concerne les concentrations maximales de l'hespérétine dans l'urine, elles sont observées après 7 heures et sont de l'ordre de 6.14 et 19.26 mg L⁻¹ pour les 2R- et 2S-HT, respectivement.

Aucun énantiomère de l'hespérétine n'a été détecté 24 heures après l'administration du jus. Il serait également intéressant de noter que la 2S-HT est excrète en plus grande quantité que son énantiomère correspondant, ce qui était prévisible vu la concentration élevée du jus d'orange en 2S-hespéridine.

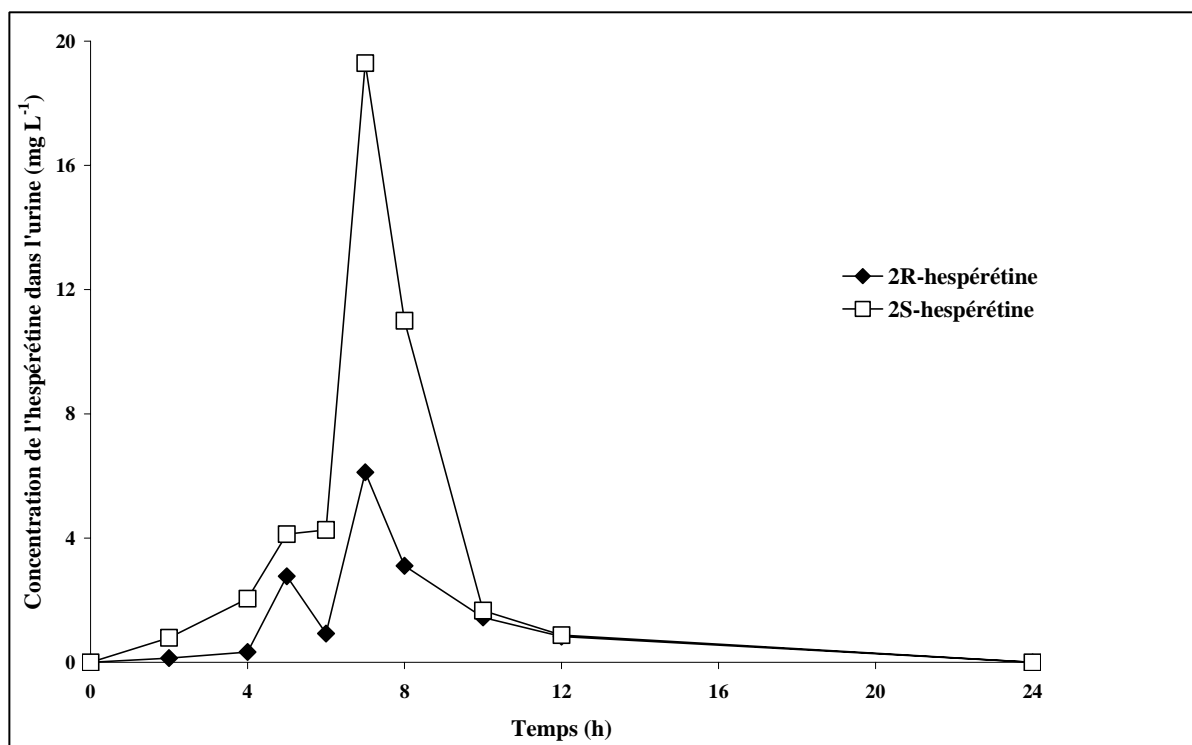


Figure 4 : Evolution temporelle de la concentration des énantiomères de l'hespérétine dans l'urine après ingestion du jus d'orange sanguine.

Les courbes cumulatives urinaires pour les deux énantiomères sont illustrées sur la figure 5. Ainsi, nous pouvons voir que l'hespérétine est majoritairement excrète entre 4 et 8 h après l'ingestion du jus. Le pourcentage excrète durant cette période (4-8 h) par rapport à la quantité totale éliminée est de 87.13 % et 91.42% pour les 2R- et 2S- hespérétine, respectivement.

L'excrétion urinaire relative des 2R- et 2S-hespérétine est de 6.44% et 3.55%, respectivement. Ces valeurs ont été obtenues en calculant le ratio entre la concentration cumulative de la 2R- ou 2S-HT après 24h et la concentration en 2R- ou 2S-hespéridine ingéré avec le jus, respectivement. La valeur correspondante pour l'hespérétine racémique était de 4.00% et cela en considérant la concentration de HT racémique après 24 h et la concentration totale de l'hespéridine ingérée.

Il est important de noter que les résultats obtenus durant le présent travail sont en parfaite concordance avec ceux précédemment obtenus lors des études pharmacologiques relatives à l'analyse de l'hespérétine dans l'urine humaine [3,9,10,22,24].

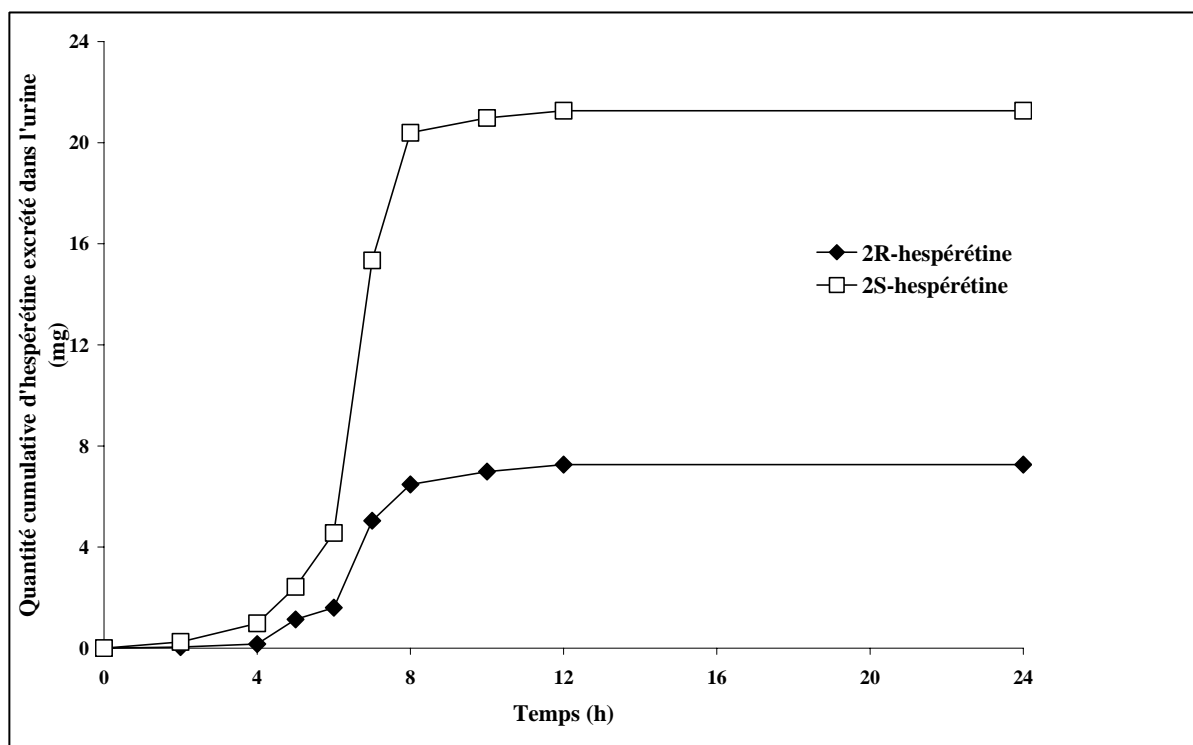


Figure 5: Profil de l'excrétion urinaire cumulative des énantiomères de l'hespérétine après ingestion du jus d'orange sanguine.

IV. Conclusion

Lors du présent travail, nous avons développé pour la première fois une méthode Nano-CL stéréospécifique pour l'analyse qualitative et quantitative de l'hespérétine dans l'urine humaine. Cette technique a permis d'obtenir une excellente séparation énantiomérique en moins de 15 min et cela en utilisant de faibles quantités d'échantillons, de phases mobiles et de phases stationnaires chirales, sans oublier son faible impact sur l'environnement.

La sensibilité, la linéarité, la reproductibilité ainsi que l'exactitude de la méthode ont été démontrées avec des résultats extrêmement satisfaisants. L'excrétion des 2R- et 2S-HT dans l'urine a été contrôlée pendant 24h et nous a permis de constater que ce flavonoïde est essentiellement éliminé dans les douze heures qui suivent l'ingestion du jus d'orange sanguine. Ceci démontre l'importance de l'apport quotidien en hespérétine afin de pouvoir bénéficier de ces innombrables bienfaits. Nous pouvons également constater que l'hespérétine peut être efficacement utilisée comme biomarqueur vis-à-vis de l'ingestion de jus ou de fruits de type citrus.

Ainsi, l'approche analytique décrite lors de cette étude est simple, rapide, efficace et très économique par rapport aux méthodes CLHP classiques. Toutes ces caractéristiques démontrent l'utilité et l'intérêt de cette méthode lors des applications cliniques et précliniques qui nécessitent des quantités minimales d'échantillons biologiques sans oublier les temps d'analyse relativement courts.

V. Références bibliographiques

- [1] M.S. Ladaniya, *Citrus Fruit: Biology, Technology and Evaluation*, Academic Press, San Diego, CA, 2007.
- [2] J.L. Perez, G.K. Jayaprakashaa, K.S. Yooa, B.S. Patil, *J. Chromatogr. A* 1190 (2008) 394.
- [3] J.A. Yáñez, C.M. Remsberg, N.D. Miranda, K.R. Vega-Villa, P.K. Andrews, N.M. Davies. *Biopharm. Drug Dispos.* 29 (2007) 63.
- [4] H. Serra, T. Mendes, M.R. Bronze, A.L. Simplicio, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 4009.
- [5] A. Garg, S. Garg, L.J.D. Zaneveld, A.K. Singla. *Phytother. Res.* 15 (2001) 655.
- [6] G. Kaur, N. Tirkey, K. Chopra, *Toxicology* 226 (2006) 152.
- [7] I. Erlund, *Nutr. Res.* 24 (2004) 851.
- [8] P. Knekt, J. Kumpulainen, R. Järvinen, H. Rissanen, M. Heliövaara, A. Reunanen, T. Hakulinen, A. Aromaa, *Am. J. Clin. Nutr.* 76 (2002) 560.
- [9] I. Erlund, E. Meririnne, G. Alftan, A. Aro. *J. Nutr.* 131 (2001) 235.
- [10] C. Manach, C. Morand, A. Gil-Izquierdo, C. Bouteloup-Demange. C. Rémésy, *Eur. J. Clin. Nutr.* 57 (2003) 235.
- [11] F. I. Kanaze, E. Kokkalou, M. Georgarakis, I. Niopas, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 175.
- [12] C. Gardana, S. Guarnieri, P. Riso, P. Simonetti, M. Porrini, *Brit. J. Nutr.* 98 (2007) 165.
- [13] E. de Rijke, P. Out, W.M.A. Niessen, F. Ariese, C. Gooijer, U.A.T. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 1112 (2006) 31.
- [14] K.R. Vega-Villa, C.M. Remsberg, K.L. Podelnyk, N.M. Davies, *J. Chromatog. B.* 875 (2008) 142.
- [15] M. Asztemborska, M. Miskiewicz, D. Sybilska, *Electrophoresis.* 24 (2003) 2527.
- [16] C. Kwon, S.R. Paik, S. Jung, *Electrophoresis.* 29 (2008) 4284.
- [17] S.C. Ng, T.T. Ong, P. Fu, C.B. Ching, *J. Chromatogr. A.* 968 (2002) 31.
- [18] S. Caccamese, C. Caruso, N. Parrinello, A. Savarino, *J. Chromatogr. A.* 1076 (2005) 155.
- [19] J.A. Yáñez, X.W. Teng, K.A. Roupe, N.M. Davies, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 591.
- [20] K. Si-Ahmed, F. Tazerouti, A.Y. Badjah-Hadj-Ahmed, Z. Aturki, G. D'Orazio, A. Rocco, S. Fanali, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (2010) 225.
- [21] K. Si-Ahmed, F. Tazerouti, A.Y. Badjah-Hadj-Ahmed, Z. Aturki, G. D'Orazio, A. Rocco, S. Fanali, *J. Chromatogr. A* (2009) doi:10.1016/j.chroma.2009.07.053.

- [22] F.A. Tomàs-Barberà, M.N. Clifford, J. Sci. Food Agric. 80 (2000) 1073.
- [23] S. Kobayashi, S. Tanabe, M. Sugiyama, Y. Konishi, Biochim. Biophys. Acta 1778 (2008) 33.
- [24] F.I. Kanaze, M.I. Bounartzi, M. Georgarakis, I. Niopas, Eur. J. Clin. Nutr. 57 (2003), 235.

CONCLUSION GENERALE

Nous nous sommes intéressés dans ce travail au développement et à l'optimisation de nouvelles techniques chromatographiques et électrophorétiques destinées à la séparation chirale de produits d'intérêt pharmaceutique et agroalimentaire.

Dans la première partie de ce manuscrit, l'efficacité de trois phases stationnaires chirales à base de 10-undécénoate/phénylcarbamate- β -CD, a été démontrée en séparant plusieurs produits racémiques, pharmaceutiques, herbicides et flavanones. Le test de ces trois colonnes en mode normal, nous a permis d'apprécier leurs potentialités lors de l'utilisation de phases mobiles apolaires, ce qui constitue une nette avancée pour ce type de sélecteurs chiraux dont l'utilisation a été généralement restreinte aux phases mobiles aqueuses. Les effets de la nature et la composition de la phase mobile ainsi que l'impact des propriétés structurales des solutés tests sur la résolution ont également été investigués.

La comparaison des trois PSCs à leurs homologues à base de cyclodextrine et de cellulose (préparées ou commerciale), a démontré l'importance de la nature et de la longueur du spacer reliant le sélecteur chiral à la silice ; en effet, l'utilisation d'un long spacer (12 atomes méthylène) a permis d'améliorer l'efficacité et la stabilité des phases stationnaires étudiées.

L'effet de la nature du substituant du cycle aromatique modifiant la cyclodextrine a été également étudié. Il s'est avéré que les PSCs dont les groupements phénylcarbammates portant un méthyle en position para sont particulièrement efficaces vis-à-vis de la résolution des solutés injectés ; ce qui montre la contribution de ce groupement durant le mécanisme de caractérisation chirale qui semble être dû à la formation d'un complexe diastéréomérique entre le soluté et le sélecteur chirale. Par ailleurs, une certaine complémentarité a pu être observée entre les trois phases stationnaires étudiées.

L'électrophorèse capillaire a été utilisée, dans la deuxième partie de ce travail, afin d'étudier la résolution énantiomérique d'une large gamme de produits pharmaceutiques, illicites et flavanones. Ainsi, l'universalité de la HP- β -CD en tant que sélecteur chiral a été clairement démontrée. En effet, ce sélecteur a permis la résolution de tous les produits pharmaceutiques ainsi que la grande majorité des substances illicites injectées.

Par ailleurs, la préparation d'une colonne capillaire chimiquement modifiée a été réalisée pour la caractérisation chirale des flavanones en utilisant la sulfobutyléther- β -CD comme additif chiral au tampon de migration. Ceci nous a permis de constater l'apport de ce matériau par rapport aux capillaires non-modifiés et cela en termes d'efficacité, de reproductibilité et de stabilité. Nous avons également démontré les effets indéniables de la concentration du sélecteur, du pH ainsi que la nature et la position des substituants portés par les cycles aromatiques des flavanones sur la mobilité et la résolution de ces dernières.

La méthode électrophorétique ainsi développée a permis la quantification diastéréomérique de l'hespéridine présente dans un jus d'orange commercial. Une excellente linéarité a été obtenue lors du traçage des courbes d'étalonnage ce qui démontre la fiabilité et l'efficacité de la méthode. De plus, la prédominance de la forme énantiomérique (S) confirme l'origine naturelle du jus d'orange analysé.

L'utilisation d'une technique dite « miniature » à savoir la Nano-CL a été d'un grand apport pour la séparation énantiosélective des flavanones et flavanones glycosides. En effet, cette technique a permis l'obtention de très bonnes séparations chirales avec des temps d'analyses relativement courts comparés à ceux obtenus en CLHP par d'autres auteurs. Ainsi, pour la première fois dans la littérature, nous avons préparé une colonne capillaire (100 μ m) remplie d'une PSC-CD. L'importance de l'effet de la nature et de la composition de la phase mobile sur l'énantiorésolution (R_s), facteur de rétention (k') et énantiosélectivité (α) a été démontré. En mode inverse, le mélange constitué de méthanol et d'un tampon aqueux a permis l'énantio-séparation de l'intégralité des composés injectés avec d'excellentes résolutions. L'impact des effets structuraux des flavanones sur la résolution chirale a été clairement établi. La séparation de ces mêmes solutés en modes organique polaire et normal a pu être également effectuée.

Par ailleurs, les faibles quantités de solvants, d'échantillons et de phase stationnaire, utilisés lors de cette étude, font de cette technique un outil analytique de choix du point de vue économique vu son faible coût et son impact sur l'environnement qui est pratiquement négligeable. Ceci confirme les avantages de l'utilisation de cette technique miniaturisée par rapport à la CLHP classique pour la discrimination chirale des isomères optiques.

La dernière partie de la thèse a été consacrée à l'étude pharmacocinétique stéréospécifique de l'hespérétine dans l'urine humaine après ingestion par un volontaire d'un litre de jus d'orange sanguine commercial. En plus du caractère inédit de la méthode Nano-CL développée, nous avons pu valider cette la méthode utilisée suivant les différents critères établis par les organisations internationales de contrôle de qualité.

Ainsi, une excellente linéarité, répétabilité et recouvrement ont pu être achevés. Les limites de quantification, de précision et de justesses obtenues sont au-delà des limites imposées par les directives réglementaires. L'étude du profil d'excrétion de l'hespérétine, chez l'être humain, sur une durée de 24 h, nous a permis de constater le métabolisme stéréosélectif des deux énantiomères, ainsi que l'importance de consommer quotidiennement des produits à base de fruits de type citrus.

L'approche analytique décrite dans cette étude, démontre l'utilité et l'intérêt de la Nano-CL pour les applications cliniques et précliniques qui nécessitent des quantités minimales d'échantillons biologiques ainsi que des temps d'analyses relativement courts.