

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE
HOUARI BOUMEDIENNE

Pour l'obtention du grade de :
DOCTEUR D'ETAT EN CHIMIE

Option : CHIMIE ORGANIQUE APPLIQUEE

Par

Mlle Fairouz TAZEROUTI

SYNTHESE, CARACTERISATION ET APPLICATION DES PHASES STATIONNAIRES CHIRALES EN CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

Soutenue publiquement le 14 Novembre 2001 devant le jury composé de :

M. F. AMRANI	Professeur (U.S.T.H.B.)	Président
Mme L. ARIBI-ZOUIOUECHE	Professeur (U. Annaba)	Examineur
M. S. BENAYACHE	Professeur (U. Constantine)	Examineur
M. M. H. GUERMOUCHE	Professeur (U.S.T.H.B.)	Examineur
M. B. Y. MEKLATI	Professeur (U.S.T.H.B.)	Examineur
M. M. FERKIOUI	Docteur en pharmacie (Saidal)	Membre invité
Mr. A.Y. BADJAH HADJ AHMED	Professeur (U.S.T.H.B.)	Directeur de Thèse

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. B. Y. MEKLATI, Professeur de chimie à l'U.S.T.H.B. Qu'il me soit permis de lui exprimer mes remerciements pour m'avoir accueillie dans son laboratoire sans oublier son aide précieuse et d'avoir accepté de juger ce travail.

Je ne saurais trouver les mots qui exprimeront toute ma gratitude à M. A. Y. BAJAH-HADJ-AHMED, 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'il n'a cessé de me prodiguer, pour avoir cru en moi et pour m'avoir toujours encouragée à aller de l'avant, qu'il trouve ici l'expression de ma plus profonde reconnaissance.

Par la même occasion, je tiens à remercier M. le Professeur J. L. MONTERO, Directeur du laboratoire de Synthèse Macromoléculaire, à l'Université de Montpellier (France) de m'avoir accueillie dans son laboratoire. J'exprime mes sincères remerciements à M. G. DEWYNTER, Maître de Conférences à l'Université de Montpellier, pour son aide précieuse et ses encouragements pendant mon séjour au sein de son laboratoire.

Je suis très heureuse de témoigner ma gratitude à Mme C. MINGUILLON, Professeur et Directrice du laboratoire de Chimie Pharmaceutique à l'Université de Barcelonne (Espagne). Je tiens à la remercier vivement pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour son aide précieuse et ses encouragements. Sans elle 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 ne pourrai oublier l'aide précieuse de Monsieur J. P. Cansellier, Maître de Conférences à l'ENSIASET de Toulouse. Qu'il trouve ici mes sincères remerciements.

J'adresse également mes sincères remerciements à M. le professeur M. H. GUERMOUCHE du laboratoire de Chromatographie (U.S.T.H.B.) pour son aide matérielle et d'avoir bien voulu juger ce travail.

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

J'exprime mes profonds remerciements à Mme le Professeur L. ARIBI-ZOUIOUECHE (U. Annaba) et Messieurs les Professeurs S. BENAYACHE (U. Constantine) et M. FERKIOUI (SAIDAL), pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de participer à ce jury.

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

Je dédie enfin ce travail à mon regretté père, à ma mère, à toute ma famille qui m'a soutenue et encouragée, particulièrement à ma sœur Ammal, à mon neveu et mes nièces, à mon regretté ami Mohamed , ainsi qu'à tous mes amis.

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	1
Chapitre I: GENERALITES	3
♦ Perspective historique	3
♦ Pourquoi la séparation chirale?.....	3
I-1 Les phases stationnaires chirales à base de protéines	11
I-2 Les phases stationnaires chirales type Pirkle	11
I-3 Les phases stationnaires chirales à base de cellulose	11
I-4 Les phases stationnaires chirales à base d'antibiotiques macrocycliques	12
I-5 Les phases stationnaires chirales à base de cyclodextrines	13
Chapitre II: UTILISATION DE LA β-CYCLODEXTRINE COMME ADDITIF CHIRAL A LA PHASE MOBILE	17
II-1 Introduction	17
II-1-1 Influence du type et de la concentration de la cyclodextrine	23
II-1-2 Influence des phases stationnaires	23
II-1-3 Influence de la composition de la phase mobile	24
II-1-4 Influence de la température	24
II-1-5 Influence du pH et de la force ionique	24
II-1-6 Influence des modifiants organiques	25
II-2 Résultats et Discussion	26
II-3 Conclusion	32
Chapitre III: SYNTHÈSE ET CARACTERISATION DES PHASES STATIONNAIRES CHIRALES A BASE DE β-CYCLODEXTRINE	34
III-1 Méthodes de synthèse des PSCs à base de cyclodextrine	34
III-2 Synthèse des PSCs A, B, C, D, E et F	40
III-3 Caractérisation des PSCs par analyse élémentaire	42
III-4 Caractérisation des PSCs par la RMN	42
III-4-1 Caractérisation des dérivés de la cyclodextrine par la RMN du ^1H	42
III-4-2 Caractérisation des PSCs par RMN à l'état solide du ^{29}Si et ^{13}C	46
III-5 Partie expérimentale	50
III-5-1 Synthèse des PSCs A et B	50

	Pages
III-5-2 Synthèse de la phase C	50
III-5-3 Synthèse des PSCs D, E et F	51
III-5-3-a Préparation de la silice allylique	51
III-5-3-b Préparation des dérivés de la cyclodextrine	51
III-5-3-c Préparation des PSCs D, E et F	52
Chapitre IV: REMPLISSAGE DES COLONNES POUR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE	53
IV-I Introduction	53
IV-I-1 Stabilisation chimique	53
IV-I-2 Stabilisation physique	53
IV-I-2-a Technique d'isodensité	54
IV-I-2-b Technique de viscosité	54
IV-I-2-c Technique de la bouillie diluée	55
IV-I-3 Stabilisation mécanique	55
IV-I-4 Dispositif de remplissage	55
IV-II Méthodes de remplissage	58
IV-II-1 Remplissage par stabilisation mécanique.....	58
IV-II-2 Remplissage par suspension diluée	59
IV-III Partie expérimentale	60
IV-III-1 Méthode 1	60
IV-III-2 Méthode 2	60
Chapitre V: APPLICATION DES PSCs SYNTHETISEES EN C.L.H.P.	61
V-I Introduction	61
V-II Résultats et discussion	64
V-II-1 Séparation d'isomères benzénique disubstitués sur la PSC A en mode inverse ...	64
V-II-2 Séparation des terpènes et de quelques produits aromatiques optiquement actifs en mode inverse sur les deux PSCs A et B	69
V-II-3 Séparation des produits optiquement actifs ainsi que des produits Pharmaceutiques chiraux sur les PSCs C, D, E et F en mode normal	74
V-II-4 Séparation de quelques herbicides chiraux sur les PSCs C, D, E et F	88
V-II-5 L'effet du solvant et de la composition de la phase mobile sur la sélectivité	94
V-II-6 L'effet de la dimension de la colonne sur la sélectivité	98
V-II-7 Comparaison des résultats obtenus à ceux donnés par la littérature	102
V-III Conclusion	103
CONCLUSION GENERALE	104

ANNEXE A: Références bibliographiques	106
ANNEXE B : Conditions d'analyse	113

Depuis toujours, l'homme a essayé de comprendre d'abord et de copier ensuite la nature avec plus ou moins de succès. Pour les chimistes, cet effort se traduit de nos jours par un effort considérable en vue de l'élucidation des mécanismes naturels les plus complexes et la synthèse de molécules les reproduisant.

L'industrie des parfums, par exemple, a toujours été très liée aux substances naturelles et attache une grande importance à la qualité de ses produits. Les relations structure/odeur sont d'une importance capitale et c'est l'une des raisons pour lesquelles la notion de **chiralité** a particulièrement été étudiée ces dernières années.

Dans le domaine des médicaments, il a été reporté récemment que plus de 88% des produits pharmaceutiques chiraux synthétisés sont commercialisés sous forme de mélanges racémiques. Ces statistiques sont alarmantes si l'on sait que dans la plupart des cas, le principe actif des médicaments est dû essentiellement à une seule forme énantiomérique (**R** ou **S**), alors que l'autre forme peut être inactive voire même toxique. Un exemple tragique est celui de la Thalidomide considérée comme responsable de l'un des plus grands drames thérapeutiques. En effet la forme **R** est un analgésique alors que la forme **S** est un tératogène puissant. Ainsi, l'administration du racémique (**R,S**)-thalidomide aux femmes enceintes entraîne des monstruosité fœtales se traduisant par l'absence, plus ou moins complète de membres à la naissance. En Angleterre et en Allemagne, plusieurs milliers de malformations natales ont été enregistrées dans les années 60 et attribuées à la thalidomide, ce qui a conduit ultérieurement au retrait immédiat de ce médicament du marché. Parmi de nombreux autres exemples, celui de la Pénicillamine mérite d'être signalé. En effet, l'énantiomère **D** est utilisé pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde alors que l'énantiomère **L** est hautement toxique.

Après le cas tragique cité ci-dessus, des normes de plus en plus draconiennes ont été établies pour la commercialisation et le marketing des produits pharmaceutiques ; parmi ces règles nous citons: tout produit racémique doit être considéré à priori comme un médicament contenant 50 % d'impureté. Ceci explique la nécessité de recourir à des méthodes d'analyses performantes et en particulier le développement rapide de la chromatographie liquide utilisant des phases stationnaires chirales.

Bien que plus d'une centaine de phases stationnaires chirales soient disponibles actuellement, de nombreux produits racémiques demeurent sans résolution. Par conséquent, le

développement de nouvelles phases stationnaires chirales performantes constitue un domaine de recherche d'actualité et un défi permanent.

Aussi, et dans le cadre de notre travail, nous nous sommes fixés comme objectif la préparation de nouvelles phases stationnaires chirales à base de β -cyclodextrine (β -CD) en vue de leur utilisation en chromatographie liquide à haute performance.

Dans la première partie de ce travail, la β -cyclodextrine, un oligomère cyclique naturel obtenu par la dégradation enzymatique de l'amidon, a été utilisée comme additif chiral à la phase mobile pour la séparation des isomères de position de quelques dérivés du benzène disubstitué.

Dans la 2^{ème} partie, nous avons synthétisé 6 phases stationnaires chirales à base de β -cyclodextrine. Après leur caractérisation par différentes techniques, plusieurs colonnes ont été remplies avec les phases préparées en utilisant les méthodes de garnissage appropriées.

L'application de ces phases stationnaires chirales a été réalisée en chromatographie liquide par l'analyse de plusieurs familles de produits optiquement actifs tels que les produits naturels, pharmaceutiques et pesticides. Le mécanisme de la séparation énantiosélective des racémiques testés sur ces nouvelles phases stationnaires chirales a été discuté en détail.

◆ PERSPECTIVE HISTORIQUE :

L'intérêt de la chiralité a été, jusqu'à ces dernières années, principalement académique et par conséquent, cette notion a occupé une position relativement minoritaire en chimie analytique.

Le développement de la chimie chirale a connu, depuis une vingtaine d'années, un grand essor bien que la notion des isomères optiques a été découverte depuis plus d'un siècle.

Identifiés initialement par Biot¹ au début du XIX^e siècle, la découverte des isomères optiques a été établie par le travail de Louis Pasteur² en 1848 qui démontra que l'acide tartrique naturel était dextrogyre ; il put isoler ensuite le mélange racémique des grains de raisin. Ces découvertes, suivies par d'autres, amenèrent van't Hoff³ et Le Bel,⁴ indépendamment, en 1874 à formuler la première proposition d'une structure tétraédrique pour le carbone saturé. Cependant, ce fut Emil Fischer qui présenta la première tentative d'établir la stéréochimie absolue des isomères optiques et détermina la configuration du (+)-glucose, travaux pour lesquels il reçut le prix Nobel en 1902⁵. Plus tard, l'hypothèse de Fisher fût confirmée par Bijovet⁶ qui utilisa la cristallographie par les rayons X.

C'est ainsi que les bases de la chimie chirale furent établies et depuis, l'étude de la stéréochimie ne fait que progresser.

◆ POURQUOI LA SEPARATION CHIRALE ?

A de rares exceptions près, la nature vivante ne produit que des substances énantiomériquement pures de configuration absolue bien définie: ainsi, les α -aminoacides naturels sont dans la majorité des cas de configuration (L). Les règnes végétal et animal constituent la source primaire de composés énantiomériquement purs. En synthèse organique, il est fréquemment nécessaire de pouvoir disposer de substances de synthèse énantiopures. C'est un problème qui se pose, en particulier, dans l'industrie pharmaceutique. En effet, étant donnée une substance chirale de synthèse utilisable comme médicament, sur les 2 énantiomères possibles un seul présente en général les propriétés pharmacologiques requises (Tableau I). Dans les meilleurs des cas, l'autre énantiomère n'est qu'une charge inutile quand il

[1] D. Biot, *Ann. Chim. Phys.*, 1820, **15**, 222

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

[3] J. H. van't Hoff, *Arch. Neerl. Sci. Exactes Natur.*, 1874, **9**, 445

[4] J. A. Le Bel, *Bull. Soc. Chim.*, Paris, 1874, **22**, 337

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

[6] E. Bijovet, *Endeavour*, 1955, **14**, 71

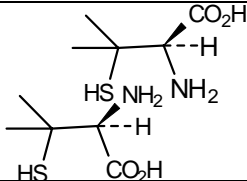
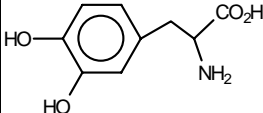
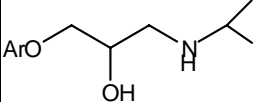
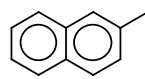
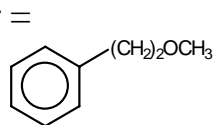
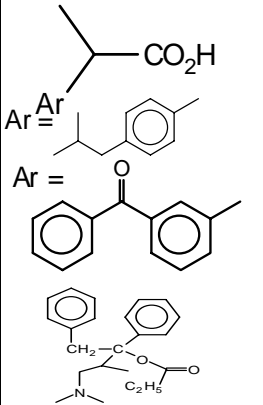
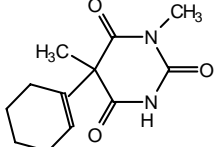
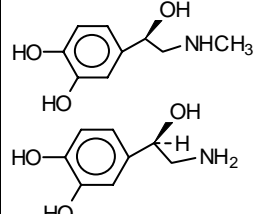
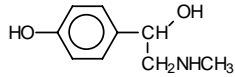
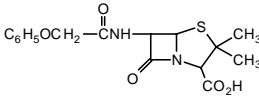
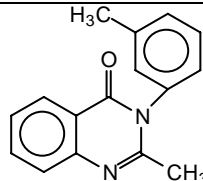
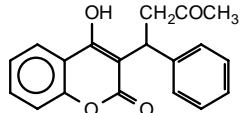
Tableau I: Activité pharmacologique des formes énantiomériques de quelques produits pharmaceutiques		
Produits	Activité pharmacologique des formes énantiomériques	Structure
Chelateurs : Penicillamine	D → arthrite rhumatoïde et maladie de Wilson L → toxique	
Dopa et ses dérivés : Traitement de la Maladie de Parkinson	L → précurseur de la dopamine D → toxique	
β-bloquants adrénergiques Propranolol Métoprolol Néбиволол Labétolol	(S) → 50-500 fois plus efficace que la forme (R) (R) → souvent inactif, peut être même toxique (+) → actif (-) → dilatateur de vaisseaux (R,R) → actif (S,R) → α-antagonistes (S,S) et (R,S) → inactifs	 Ar =  Ar = 
Anti-inflammatoires (analgésiques) : Ibuprofène Ketoprofène Propoxyfène	(S) → anti-inflammatoire (R) → inactif (S) → anti-inflammatoire (R) → isomère actif contre l'ostéoporose (S) → anti-tussif (R) → inactif	
Barbituriques (hypnotiques) : Hexobarbital	S(+) → plus actif que la forme R(-)	
Catécholamine : Epinephrine Norepinephrine	(R) → (dilatateur de vaisseaux) 20 fois plus actif que la forme (S) (R) → (dilatateur des bronches) 800 fois plus actif que la forme (S)	

Tableau 1: (suite)		
Synephrine	Une forme est 60 fois plus active	
Antibiotiques : Pénicilline V	L → très faible activité antibiotique	
Amphétamine	(S) → stimulant (CNS) (R) → faible activité	
Méthamphétamine	(S) → substance de contrôle (R) → décongestant nasal	
Produits micellaires (hypnotique et anticonvulsif) : Méthaqualone	Forme (-) plus active que la forme (+)	
Anticoagulants : Warfarine	(S) → 5 fois plus efficace que la forme (R)	

n'est pas toxique ou même tératogène. Le patient n'a donc aucun avantage à consommer un médicament sous forme racémique. Durant les années 50, la thalidomide était prescrite pour soulager la femme enceinte des vomissements matinaux, mais elle a été retirée du marché en 1962 à cause de son effet mutagénique sur le fœtus.⁷ Plus tard, il a été prouvé que l'énantiomère (S) était le premier responsable tératogène ; cependant, les deux formes énantiomériques pures se racémisent *in vitro* et *in vivo*. Récemment, la thalidomide connaît un regain d'intérêt en tant qu'agent thérapeutique contre l'irritation de la bouche chez les patients porteurs du HIV et également pour les problèmes dermatologiques liés aux désordres auto-immunes.⁸

L'industrie des parfums est confrontée à une situation analogue: telle substance chirale peut présenter une odeur agréable alors que son énantiomère exhale un remugle déplaisant. Il en est de même dans le domaine gustatif : ainsi, le **R**-limonène rappelle la fraîcheur citronnée, alors que l'odeur du **S**-limonène semble beaucoup plus amère. La carvone est un autre cas frappant dans la mesure où l'isomère (-) possède une odeur de menthe verte alors que

[7] R. Bishop, I. Hermansson, B. Jaderlund, G. Lindgren, C. Pernow, *Am. Lab.*, 1986, **18**, 138

[8] H. J. Schmidt, D. Neubert, *Arch. Toxicol.*, 1998, **62**, 2

l'isomère (+) évoque l'odeur des graines de carvi.⁹

Dans le domaine de l'archéologie, les mesures du degré de racémisation d'acides aminés spécifiques sont utilisées pour déterminer l'âge des restes humains tels que les dents et les os.¹⁰ Une autre application curieuse de l'énantioséparation concerne la détermination de l'excès énantiomérique dans les météorites, en vue de leur caractérisation.¹¹

Le domaine de l'agro-chimie et la protection des cultures, est également concerné par l'énantioséparation car la présence d'un stéréoisomère inactif ou moins actif contribue uniquement à augmenter le degré de pollution du milieu naturel sans bénéficier de l'action désirée.¹²

Ainsi, il est d'une importance extrême pour les industries chimique, agro-alimentaire et pharmaceutique de maîtriser la séparation des isomères actifs de leur partie opposée indésirable. Pour cela des techniques d'analyse sont indispensables pour séparer les énantiomères dans un but qualitatif, quantitatif ou préparatif.

Les techniques de séparation chromatographiques telles que la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la chromatographie en phase supercritique (SFC), la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP)^{13,14} de même que l'électrophorèse capillaire (EC)¹⁵ ont été fréquemment utilisées pour la séparation chirale. Le développement de ces méthodes est illustré sur la figure 1.¹⁶

Dans le début des années 80, peu de phases stationnaires chirales aussi bien pour la CPG que pour la CLHP étaient disponibles. Ainsi, en 1966, Gil-Av et al.¹⁷ ont décrit la première phase stationnaire chirale pour la CPG et en 1976 Sogah et Cram¹⁸ introduisirent les PSCs à base d'éthers couronnes. En 1978, Harada et al.¹⁹ utilisèrent pour la première fois les cyclodextrines (CDs) comme agents de séparation chiraux et en 1980, Armstrong²⁰

[9] M. F. Grenier-Loustalot, H. Casabianca, *l'Actualité Chimique*, Société Française de Chimie, 1999, **11**, 40

[10] V. R. Meyer, *ACS Symp. Ser.*, 1991, **471**, 217

[11] J. R. Cronin, S. Pizzarello, *Science*, 1997, **275**, 951

[12] N.M. Maier, P. Franco, W. Lindner., *J. Chromatogr. A*, 2001, **906**, 3

[13] A. M. Krstulovic, *Chiral Separation by HPLC*, Ellis Horwood, Chichester, 1989

[14] S. Hara, J. Cazes, Special Issue on Optical Resolution by Liquid Chromatography, *J. Liq. Chromatogr.*, 1986, **9(241)**, 694

[15] B. Françoise, A. Michel, P. Tuyel-Nga, J. Vallon, *J. Chromatogr. B*, 1996, **687**, 303

[16] T. Arai, *J. Chromatogr. B*, 1998, **717**, 295

[17] D. Gil-Av, B. Feibush, R. Charles-Sigies, *Tetrahedron Lett.*, 1988, 1009

[18] G. D. Y. Sogah, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, **98**, 3038

[19] A Harada, M. Furue, S. L. Nozakura, *J. Polymer Sci*, 1978, **16**, 189

[20] D. W. Armstrong, *J. Liq. Chromatogr.*, 1980, **6**, 895

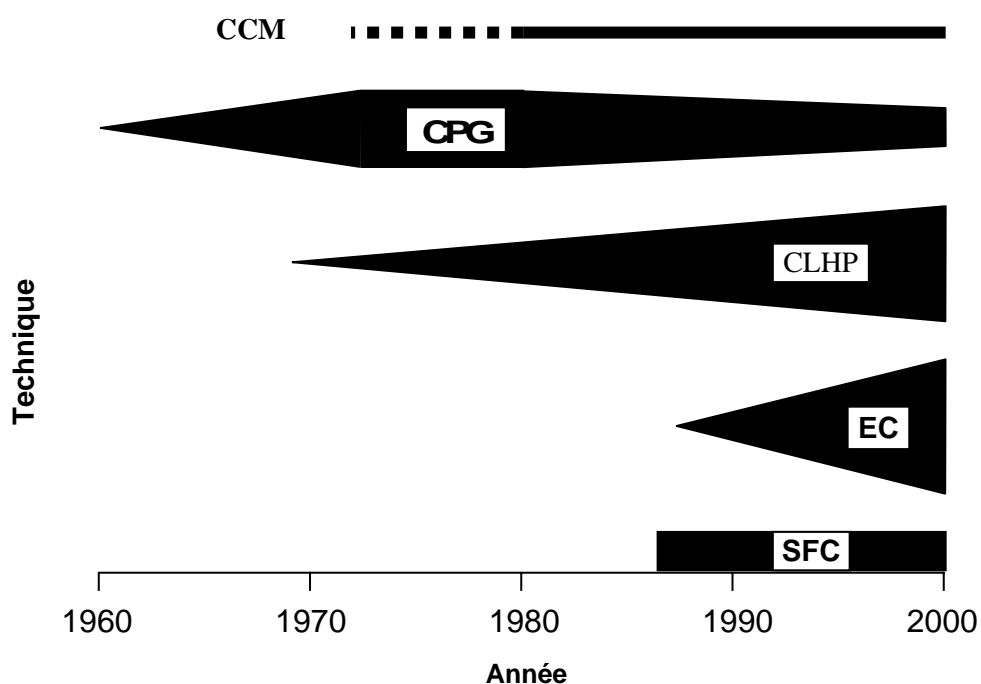


Figure 1 : Développement des méthodes de séparation chromatographique et électrophorétique

proposa l'utilisation des cyclodextrines comme additifs à la phase mobile pour la séparation chirale en chromatographie sur couche mince. Aujourd'hui, les CDs sont l'un des agents chiraux les plus largement utilisés en chromatographie et en électrophorèse pour la séparation des énantiomères, bien que d'autres réactifs tels que ceux à base de cellulose, ont trouvé de nombreux domaines d'application.

En chromatographie liquide, à l'opposé de la chromatographie gazeuse, il y a de fortes interactions entre la phase mobile et le soluté, ce qui fournit une variable supplémentaire pour contrôler la séparation. Ces interactions peuvent être augmentées durant l'analyse par la programmation du solvant, ce qui élargit le domaine de polarité du soluté racémique à séparer.²¹

Il existe un très grand nombre de matériaux utilisés comme phases stationnaires chirales. Le tableau II regroupe les sélecteurs chiraux les plus importants ainsi que leur application par différentes techniques de séparation.¹²

[21] T. E. Beesley, R. P. Scott, *Chiral Chromatography*. New York : John Wiley & Sons, 1998.

Tableau II : Principaux groupes de sélecteurs chiraux classés selon leur origine et les techniques de séparation appropriées

Source	Type	Sélecteur chiral	Techniques	Echelle ^a	Refs.
Naturelle	Protéines	Sérum d'albumine	CL, EC, CEC Membranes, extraction	A	22, 23
		Orosomucoide		A	
		(α_1 -acide glycoprotéine)		A	
		Ovomucoide		A	
		Cellobiohydrolase I		A	
		Avidine		A	
		Chymotrypsine		A	
	Ovotransferrine	A			
	Oligosaccharides	α, β et γ - Cyclodextrines	CL, EC, CEC, CCM, cryst.	A/P	24-27
		Disaccharides	EC	A	28
		Maltodextrines	EC	A	
	Polysaccharides	Cellulose	EC	A	29
		Amylose		A	
		Amidon		A	
		Dextrane		A	
Heparine		A		30	
Pectines	EC	A	31		
Antibiotiques	Vancomycine	CL, EC, CG, SFC	A/P	32-35	
	Teicoplanine				
	Ristocetine				
	Avoparcine				
	Acides aminés	CL, EC, SFC Cryst.		36, 37	
	Acides choliques/sels biliaires				
	Alcaloïdes				
	Acide tartrique				

^a A : Echelle analytique ; P : échelle préparative

- [22] S. G. Allenmark, in: G. Subramanian (Ed.), *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*, VCH, Weinheim, 1994, p. 183, Chapitre 7
- [23] A. Strandberg, A. Nyström, S. Behr, A. Karlsson, *Chromatographia*, 1999, **50**, 215
- [24] A.M. Stalcup, in: G. Subramanian (Ed.), *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*, VCH, Weinheim, 1994, p. 95, Chapitre 5
- [25] T. J. Ward, D. W. Armstrong, in: M. Zief, L. J. Crane (Eds.), *Chromatographic Chiral Separations*, Chromatographic Science Series, Vol. 40, Marcel Dekker, New York, 1988, p. 131, Chapitre 5
- [26] R. A. Menges, D. W. Armstrong, in: S. Ahuja (Ed.), *Chiral Separations by Liquid Chromatography*, American Chemical Society, Washington, DC, 1991, pp. 67-100
- [27] S. M. Han, *Biomed. Chromatogr.*, 1997, **11**, 259
- [28] B. Chankvetadze, M. Saito, E. Yashima, Y. Okamoto, *Chirality*, 1998, **10**, 134
- [29] H. Nishi, *J. Chromatogr. A*, 1997, **792**, 327
- [30] R. Gotti, V. Cavrini, V. Andrisano, G. Mascellani, *J. Chromatogr. A*, 1999, **845**, 247
- [31] K. W. Phinney, L. A. Jinadu, L. C. Sander, *J. Chromatogr. A*, 1999, **857**, 285
- [32] A. Berthod, U. B. Nair, C. Bagwill, D. W. Armstrong, *Talanta*, 1996, **43**, 1767
- [33] D. W. Armstrong, Y. Tang, S. Chen, Y. Zhou, C. Bagwill, J. R. Chen, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 1473
- [34] D. W. Armstrong, Y. Liu, K. H. Ekborg-Ott, *Chirality*, 1995, **7**, 474
- [35] S. Fanali, Z. Aturki, C. Desiderio, P. G. Righetti, *J. Chromatogr. A*, 1999, **838**, 223
- [36] C. Rosini, P. Altamura, D. Pini, C. Bertucci, G. Zullino, P. Salvadori, *J. Chromatogr.*, 1985, **348**, 79
- [37] C. Rosini, C. Bertucci, D. Pini, P. Altamura, P. Salvadori, *Tetrahedron Lett.*, 1985, **26**, 3361

Tableau II : (suite)

Source	Type	Sélecteur chiral	Techniques	Echelle ^a	Refs.
Semi-synthétique	Oligosaccharides modifiés	Cyclodextrines dérivées Polymères de CDs	CL,EC,CEC,CG,CCM EC	A/P A	24, 27 29
	Polysaccharides modifiés	Polysaccharide carbamates	CL,EC,SFC,CCM, membranes, extraction	A/P	38-40
		Polysaccharide esters	CL,EC,SFC,CCM, membranes, extraction	A/P	38-41
	Sulfates de polysaccharides	Sulfate dextrane	EC		
Chondroitines dérivés		EC			29
Synthétique	Molécules à faible M modifiées	Sélecteurs échangeurs d'ions	CL, EC, CEC, SFC, extraction	A/P	42, 43
	Molécules à faible M synthétique	Sélecteurs type Pirkle	CL,EC,CG,CCM, membranes	A/P	44, 45
		Molécules réceptrices	CL,EC, extraction, cryst.	A	
	Sélecteurs LEC	Ethers couronnes	CL,EC, extraction	A/P	46
		Dérivés proline	CL,EC,CCM, extraction, membranes	A/P	47
Polymères synthétiques hélicoïdaux	Polyacrylamides	CL, EC, SFC	A/P	48	
	Polyacrylates		A/P	49, 50	
	Tartramides réticulés MIPs	CL CL,EC, FC, membranes	A/P A	51 52	

^a A : Echelle analytique ; P : échelle préparative

- [38] J. Dingenen, in: G. Subramanian (Ed.), *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*, VCH, Weinheim, 1994, p. 115, Chapitre 6
- [39] E. Yashima, Y. Okamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1995, **68**, 3289
- [40] C. Minguillon, P. Franco, L. Oliveros, P. Lopez, *J. Chromatogr. A*, 1996, **728**, 407
- [41] C. Minguillon, A. Senso, L. Oliveros, *Chirality*, 1997, **9**, 145
- [42] C. Pettersson, E. Heldin, in: G. Subramanian (Ed.), *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*, VCH, Weinheim, 1994, p. 279, Chapitre 9
- [43] N. M. Maier, L. Nicoletti, M. Lämmerhofer, W. Lindner, *Chirality*, 1999, **11**, 522
- [44] W. Pirkle, T. Pochapsky, *Chem. Rev.*, 1989, **89**, 347
- [45] W. Lindner, G. Uray, U. Steiner, *J. Chromatogr.*, 1991, **553**, 373
- [46] L. Sousa, G. Sogah, D. Hoffman, D. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, **100**, 4569
- [47] V. A. Davankov, in: V. A. Davankov, J. D. Navratil, H. F. Walton (Eds), *Ligand Exchange Chromatography*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1988
- [48] G. Blaschke, in: M. Zief, L. G. Crane (Eds), *Chromatographic Chiral Separations*, Marcel Dekker, New York, 1988, p. 179, Chapitre 7
- [49] Y. Okamoto, K. Hatada, in: A.M. Krstulovic (Ed.), *Chiral Separations by HPLC-Applications to Pharmaceutical Compounds*, Wiley, New York, 1989, p. 316, Chapitre 12
- [50] Y. Okamoto, S. Honda, I. Okamoto, H. Huki, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 6971
- [51] S. G. Allenmark, S. Andersson, P. Moller, D. Sanchez, *Chirality*, 1995, **7**, 248
- [52] B. Sellergren, in: G. Subramanian (Ed.), *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*, VCH, Weinheim, 1994, p. 69, Chapitre 4

Cependant, il est admis l'existence de 5 principaux types de phases utilisées fréquemment en chromatographie liquide. Ces dernières ont été classées initialement par Irving Wainer.⁵³ Le premier type, bien connu actuellement, concerne les phases stationnaires à base de protéines. Ces phases stationnaires ont été les premières développées, ce sont généralement des protéines naturelles liées à la silice. Comme les protéines possèdent un grand nombre de centres chiraux de configuration connue, elles peuvent donc interagir fortement avec des solutés de faible taille moléculaire montrant ainsi une forte sélectivité chirale.

Le second type de PSCs concerne des substances chirales à poids moléculaire relativement faible liées à la silice ; ces phases stationnaires ont été développées par Pirkle.⁵⁴ On les appelle également les phases en brosse. Chaque groupement lié dispose d'un nombre limité de centres chiraux mais, vu leur taille faible, il peut y avoir un grand nombre de groupements liés à la silice et ainsi, la probabilité pour que le soluté interagisse avec un centre chiral est relativement importante. L'avantage particulier des phases de type Pirkle est que l'ensemble des molécules réagissant est faible, les contributions extra-chirales sont faibles, et donc la sélectivité chirale devient le facteur prédominant contrôlant la rétention.

Le troisième type de PSCs est basé sur les polymères à base de cellulose et d'amylose développés par Okamoto.⁵⁵ Elles sont dérivées en fixant des groupements polaires appropriés sur le polymère de cellulose qui est ensuite déposé à la surface de la silice. Le quatrième type de phases est basé sur les glycopeptides macrocycliques introduits par Armstrong.³³ Ces matériaux contiennent un grand nombre de centres chiraux avec une cavité moléculaire dans laquelle les molécules du soluté peuvent pénétrer et former des interactions avec des groupements voisins.

Enfin, le cinquième groupe concerne les matériaux à base de cyclodextrines liées à un support tel que la silice ; ces matériaux sont généralement préparés de la même manière que ceux utilisés pour la préparation des phases inverses.

[53] I. W. Wainer, *Trends in Analytical Chemistry*, 1987, **6**, 5

[54] W. H. Pirkle, D. W. House, *J. Org. Chem.*, 1979, **44**(12), 1957

[55] Y. Okamoto, *Chem. Lett.*, 1986, 1237

I-1 Les PSCs à base de protéines:

Il existe plusieurs phases préparées à partir de protéines : l' α_1 -acide glycoprotéine (AGP), le cellobiohydrolase, le sérum d'albumine humain (HSA) et le sérum d'albumine bovin (BSA) en sont des exemples.⁵⁶ Ces phases stationnaires sont utilisées avec des phases mobiles contenant des quantités d'eau élevées (généralement > 90%) ce qui implique que les séparations sont dues à la combinaison entre les interactions hydrophobiques et polaires. Les colonnes à base de protéines offrent peut être le domaine d'application le plus large mais ne conduisent pas toujours à la séparation la plus efficace.⁵⁷

I-2 Les PSCs type Pirkle:

Il existe de nombreuses molécules chirales de taille faible utilisées en tant que phases Pirkle, les plus connues sont les carbamates d'urée substitués. Ce type de phases est capable de différencier les énantiomères par la formation de complexes à base d'interactions attractives. Ces interactions peuvent être de type π - π , dipole-dipole ou liaisons hydrogène.⁵⁸ L'avantage de ces phases est qu'elles sont préparées d'une manière simple et facile et sont commercialisées à des prix raisonnables. Cependant, elles ne séparent que les solutés aromatiques et une dérivation peut être nécessaire pour améliorer la séparation. Ce type de phases peut opérer aussi bien en mode inverse qu'en mode normal.²¹

I-3 Les PSCs à base de cellulose:

Les colonnes à base de cellulose exigent la combinaison des interactions attractives et de complexe d'inclusion pour obtenir une séparation chirale. Les colonnes disponibles contiennent de la cellulose microcristalline dérivée sous forme de: triacétate-(MCTA), tribenzoate, trisphénylcarbamate- et tris (3,5-diméthylphénylcarbamate)-.^{21,59} Une grande variété de solutés peut être séparée par ce type de phases tels que les alcaloïdes et les produits pharmaceutiques. Un grand nombre de ce type de colonnes est commercialisé entre autres par la firme japonaise Daicel.

[56] H. T. Karnes, M. A. Sarkar, *Pharmaceutical Research*, 1987, **4**, 287

[57] Y. Okamoto, E. Yashima, *Chromatographic Enantiomer Separation on Chiral Polymers*. In: *Chromatographic separations based on molecular recognition*, Ed. K. Jirino, Wiley- VCH, 1997.

[58] W. H. Pirkle, D. W. House, J. M. Finn, *J. Chromatogr.*, 1980, **192**, 143

[59] P. Franco, A. Senso, L. Oliveros, C. Minguillon, *J. Chromatogr. A*, 2001, **906**, 155

D'autre part, des colonnes chromatographiques ont été fabriquées à base d'amylose (amidon) (Fig.2). Ces colonnes montrent une sélectivité différente de celles des colonnes de cellulose mais sont moins robustes. Ceci peut être lié à la différence de structure adoptée par chaque polymère. En effet, la cellulose forme une structure linéaire alors que l'amylose adopte une structure hélicoïdale.^{33,57} Du fait que ces phases stationnaires soient déposées sur la surface de la silice et non pas liées chimiquement, certains solvants sont recommandés pour la phase mobile tels que les mélanges hexane-éthanol, hexane-2-propanol. En pratique, certains dérivés de cellulose et d'amylose peuvent être utilisés en mode inverse mais en respectant des précautions pour empêcher la dissolution de la phase stationnaire.



Figure 2: Phases stationnaires à base de cellulose (A) et d'amylose (B)

De plus, comme l'amidon est soluble dans l'eau, la phase mobile utilisée ne doit contenir aucune quantité d'eau si on veut prolonger la durée de vie de la colonne. Enfin, il est à signaler que le changement du mode de développement n'est pas toujours réversible. Par exemple, il est souvent possible de passer du mode polaire au mode inverse, mais il est généralement impossible de revenir au mode polaire après le changement. Ceci semble être dû au changement morphologique qui se produit dans la phase stationnaire et qui détruit sa sélectivité chirale.²¹

I-4 Les PSCs à base d'antibiotiques macrocycliques:

Les antibiotiques macrocycliques ont été immobilisés sur le gel de silice initialement par Armstrong.³⁴ Trois antibiotiques ont été utilisés: Rifamycine, Vancomycine et Teicoplanine. Le premier sélecteur a eu plus de succès dans le domaine de l'électrophorèse capillaire alors que les 2 autres sont suffisamment robustes pour être utilisés dans des colonnes multimode en chromatographie liquide. La phase à base de Teicoplanine est utilisée particulièrement dans la

séparation des aminoacides bloqués et non dérivés. Récemment, une nouvelle phase à base de l'Avoparcine a été introduite sous le nom de CHIROBIOTIC A.²¹

La rétention et la sélectivité de ces phases stationnaires sont contrôlées par la composition du solvant, le pH de la phase mobile et le type du tampon. Ces antibiotiques possèdent un grand nombre de centres chiraux qui augmentent la probabilité de la sélectivité chirale, ils possèdent également des centres d'inclusion superficiels améliorant ainsi la sélectivité spatiale. Aussi, le processus de séparation de ce type de phases est essentiellement dû aux d'interactions de types: π - π , ioniques, liaisons hydrogène et peptidiques ainsi qu'à la complexation par inclusion.

I-5 Les PSCs à base de Cyclodextrines:

Les cyclodextrines (CDs) sont des oligosaccharides cycliques non réducteurs contenant 6 à 12 unités de D(+)-glucopyranose liés entre eux par des liaisons α -(1,4).^{60,61} Leur nature cyclique les fait ressembler à un collier dont chaque perle serait une molécule de glucose. Les CDs ne sont pas présentes dans les organismes supérieurs mais sont obtenues par dégradation de l'amidon, polymère naturel du glucose présent en très grande quantité dans la biomasse végétale et servant de réserve nutritive pour la plante. Cette dégradation du polymère linéaire de très grande longueur, en fragments plus petits et cycliques est réalisée par une enzyme, la cyclo-glycosyl transférase (CGTase) présente dans des micro-organismes et en particulier dans *Bacillus macerans*.⁶² Les composés obtenus sont appelés cyclodextrines naturelles car elles ne comportent que des unités D-glucose non modifiées. Les trois cyclodextrines α , β et γ , les plus courantes, ont des structures de base caractéristiques comportant respectivement six, sept et huit unités α -D-glucopyranose (Fig.3). Les propriétés particulières des CDs sont liées non pas à leur nature chimique mais plutôt à leur structure spatiale. Le Tableau III représente les propriétés physiques et chimiques des CDs les plus courantes.³⁴ Leur caractère cyclique délimite une cavité de dimensions bien déterminées et leur confère une forme générale torique, ressemblant à un abat-jour (Fig.4). Les deux faces ont en effet des diamètres différents, la plus étroite étant nommée face primaire, car elle est constituée principalement par les groupements hydroxyles primaires sur l'atome de carbone C₆. La plus large, face

[60] W. L. Hinze, D. W. Armstrong, *Anal. Lett.*, 1980, **13**, 103

[61] D. W. Armstrong, *Patents pending*, USA; Japan, Europe, 1984

[62] F. Bressole, M. Audran, T-N Pham, J. J. Vallon, *J. Chromatogr. B*, 1996, **687**, 303

secondaire, est constituée par les groupements hydroxyles secondaires sur les atomes de carbones C₂ et C₃. Cette structure délimitant une cavité est à l'origine des applications potentielles des CDs qui vont être susceptibles d'héberger une molécule, dite invitée, avec laquelle elles constituent alors un couple hôte-invité, formant ainsi un complexe d'inclusion soluble dans l'eau alors que la molécule invitée seule ne l'est pas.⁶³

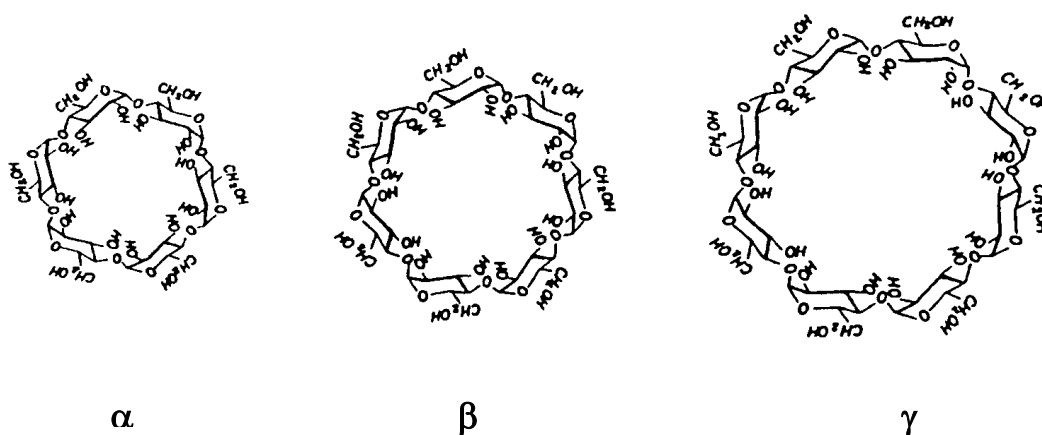


Figure3: Les formes α , β et γ -Cyclodextrines

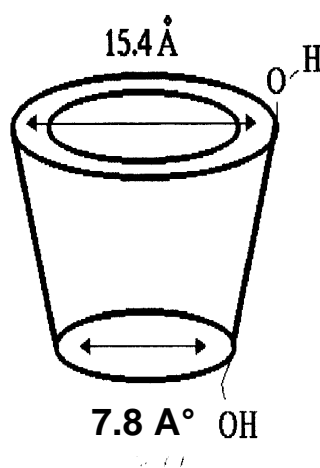


Figure 4: Structure de la β -Cyclodextrine

[63] B. Perly, F. Pilard, "Les Cyclodextrines et leurs Applications", *CLEFS CEA*, **35**, 1997

Tableau III: Caractéristiques physiques et chimiques des CDs dérivées et non dérivées

	α -CD	β -CD	γ -CD	β -CD méthylée méthylée* DM		2-hydroxypropyl- β -CD HP β CD-2-7 HP β CD-2-6	
Masse moléculaire	973	1135	1297	1317	1331	1292	1384
Nombre d'unité de glucose	6	7	8	7	7	7	7
Volume de cavité (nm ³)	1.74	2.62	4.27	-	-	-	-
Diamètre externe (nm)	1.37	1.53	1.69	-	-	-	1.53
Diamètre de cavité (nm)	0.57	0.78	0.95	-	-	-	0.78
Longueur (nm)	0.79	0.79	0.79		1.0-1.1		
Solubilité dans l'eau, %g (p/v à 25°C)	14.5	1.85	23.2	>100	>50	>33	>33
Nbre de substituants/unité de CD	-	-	-	~13	~14	~2.7	~4.6
Centres chiraux	30	35	40				
*: méthylée d'une façon aléatoire DM: heptakis (2,6)-di-O-méthyl β -CD							

Cette propriété est d'une importance majeure pour les applications pharmaceutiques car elle permet de solubiliser des principes actifs efficaces mais peu ou pas solubles dans l'eau et les fluides physiologiques en général. Quelques exemples des très nombreuses autres applications du concept de chimie supramoléculaire envisagées ou en cours de réalisation peuvent être donnés. Le piégeage moléculaire de composés indésirables tels que les polluants en est un, de même que la libération lente et contrôlée de molécules instables ou volatiles pour des applications agro-alimentaires comme la conservation d'aliments ou la libération de phéromones sexuelles utilisées comme leurres destinées à piéger certains insectes nuisibles.⁶³

De même, les cyclodextrines sont capables de reconnaître deux isomères optiques différents, ouvrant ainsi la possibilité de les séparer. Cette application potentielle des CDs en tant qu'agents de résolution chirale est de la plus haute importance dans le domaine pharmaceutique où les composés actifs doivent impérativement être optiquement purs. Pour différentes raisons (coût, disponibilité, dimensions de la cavité, etc.), la β -cyclodextrine représente 95 % de toutes les cyclodextrines produites et consommées.

Dans la β -CD, 21 groupements OH peuvent être modifiés par une large variété de substituants (alkyl-, hydroxyalkyl-, amino-, thio-, glucosyl-, maltosyl-, methyl-, hydroxyethyl-, hydroxypropyl-, acetyl-, etc.). Un ou deux groupements OH primaires (C₆) sont utilisés pour lier la CD à la surface de la silice. Les groupements OH secondaires (position 2 et 3) peuvent être dérivés dans le but soit d'augmenter la solubilité du dérivé de la cyclodextrine soit d'améliorer la pénétration et/ou l'association entre la CD et son invité. Ainsi, un grand nombre de CDs dérivées ont été synthétisées pour fournir des types d'interactions spécifiques afin d'augmenter leur sélectivité chirale. Les β -CDs diversement dérivées par des groupements acétyl, naphthylethyl- carbamoyl, 3,5-diméthylphénylcarbamoyl et paratoluyl sont commercialisées par ASTEC (Advanced Separation Technologies Inc.).⁶⁴ Le taux de greffage des diverses cyclodextrines a été optimisé par Ward et Armstrong.⁶⁵

L'avantage principal des PSCs à base de cyclodextrines est la possibilité de leur utilisation dans les trois modes : normal, inverse et polaire, ce qui leur doit d'être les premières phases stationnaires chirales multimode.⁶⁴

Dans le cadre de notre travail, nous nous sommes intéressés à préparer des phases stationnaires chirales à base de β -cyclodextrines. Leur application en CLHP nous a permis de constater leur efficacité à séparer un grand nombre de solutés optiquement actifs tels que les produits pharmaceutiques et les pesticides.

[64] Chiral Separations. *A Guide to using Cyclodextrin bonded phases for liquid chromatography*, ASTEC, BAS Technicol, UK, 1997

[65] T. J. Ward, D. W. Armstrong, *J. Liq. Chromatogr.*, 1986, **9**, 407

II-1 INTRODUCTION:

En chromatographie liquide à haute performance, trois approches peuvent être utilisées pour réaliser la séparation chirale: la séparation indirecte utilisant un agent chiral pour former des diastéréoisomères permanents, la séparation directe en utilisant une phase stationnaire chirale et la séparation directe utilisant un additif chiral à la phase mobile.

Dans ce chapitre nous allons présenter l'utilisation d'un sélecteur chiral tel que la β -CD dans la phase mobile ainsi que ses avantages et inconvénients. L'utilisation des phases stationnaires chirales va être discutée dans un chapitre ultérieur.

La chimie est parfois décrite en terme de collision, où la rencontre de deux entités peut se traduire par la formation de liaison chimique. La découverte des composés formant stéréospécifiquement des "complexes" sans liaisons chimiques avec un certain nombre de substances organiques et inorganiques est relativement récente, bien que ces "complexes" soient connus depuis plus d'une centaine d'années.¹

La formation d'un complexe d'inclusion est le résultat de l'abilité d'un composé, grâce à ses propriétés stériques convenables et également à sa polarité partielle, à envelopper spatialement un autre soluté. Les termes "hôte" (host) et "invité" (guest) sont généralement utilisés pour clarifier ces fonctions. Une propriété caractéristique importante du soluté "hôte" est son aptitude à former une structure avec une cavité libre dont les dimensions lui permettent d'envelopper la molécule invitée.

Les cyclodextrines font partie des composés qui peuvent former des complexes d'inclusion avec d'autres solutés. Ce sont des oligosaccharides cycliques non réducteurs constitués de 6, 7 ou 8 unités de D-glucose liés entre eux par des liaisons α -1,4 formant ainsi l' α , β ou γ cyclodextrine, respectivement. La cyclodextrine la plus utilisée est la β -CD. La surface extérieure de la molécule de la cyclodextrine est hydrophile à cause de la présence des groupements hydroxyles primaires et secondaires alors que la cavité intérieure est hydrophobe.²

[1] E. S. Keulemansova, S. Krysl, *J. Chromatogr.*, 1980, **184**, 347

[2] E. Ameyibor, J.T. Stewart, *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, 1997, **20(6)**, 855

Lorsque les cyclodextrines sont utilisées comme additif chiral à la phase mobile en chromatographie liquide en phase inverse, le mécanisme de séparation est essentiellement dû à la formation d'un complexe d'inclusion dans lequel le soluté (invité) est inclus dans la cavité de la CD (hôte). La figure 1 représente un schéma de la complexation par inclusion d'un soluté dans la cavité de la cyclodextrine.

Pour les énantiomères, la reconnaissance chirale se manifeste grâce à la complexation sélective des énantiomères avec la CD.³ Parmi les facteurs contrôlant le processus d'énantioséparation, nous citons :

- 1) les différences de constante de stabilité des complexes formés ;
- 2) les différences d'adsorption des complexes à la surface de la phase stationnaire ;
- 3) les différences d'adsorption des molécules de soluté libre sur la couche de cyclodextrine adsorbée à la surface.

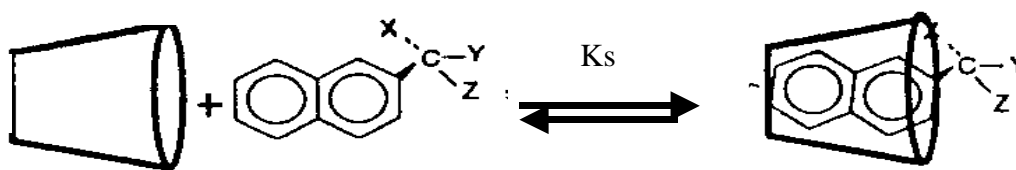


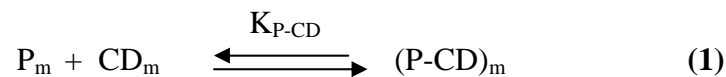
Figure1 : Schéma de formation de complexe par inclusion d'un soluté dans la cavité de la β -cyclodextrine

Ainsi, un système chromatographique contenant la β -CD dans la phase mobile met en jeu plusieurs équilibres. Si une seule espèce de soluté est présente (généralement les conditions opératoires sont choisies de telle manière à avoir une seule espèce) et les complexes formés dans la phase mobile de stœchiométrie 1:1, les équilibres existants pour chaque énantiomère sont les suivants^{4,5}:

[3] F. Bressolle, M. Audran, T.N. Pham, J.J. Vallon, *J. Chromatogr. B*, 687 (1996) 303-336

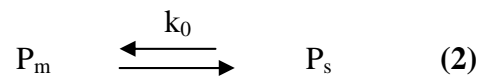
[4] A. Bielejewska, R. Nowakowski, K. Duszczuk, D. Sybilska, *J. Chromatogr. A*, 840 (1999) 159-70

[5] J. Debowski, D. Sybilska, J. Jurczak, *J. Chromatogr.*, 237 (1982) 303-306



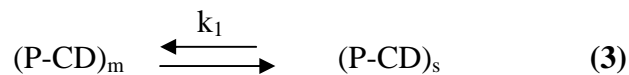
où P est le soluté, CD est la β -CD, (P-CD) est le complexe soluté- β -CD, K_{P-CD} est la constante de formation apparente du complexe et l'indice m indique la phase mobile.

Cependant, pour obtenir la rétention du soluté non complexé, P doit être distribué entre les phases mobile et stationnaire selon l'équilibre (2):



où l'indice s indique la phase stationnaire.

Il n'est pas totalement exclu, d'autre part, que le complexe-soluté P-CD et la β -CD elle-même soient distribués avec la phase stationnaire. Dans ce cas, les équilibres suivants sont également envisagés:



Comme la β -CD est très faiblement retenue dans la colonne dans la plupart des systèmes étudiés, la distribution de la β -CD/phase stationnaire peut être négligeable (**équilibre 4**).

De plus, l'hydrophobicité du soluté peut être partiellement masquée par l'inclusion dans la cavité de la β -CD. Il peut être admis alors que le complexe soluté- β -CD se comporte de la même manière que la β -CD seule et par conséquent, l'équilibre correspondant (3) peut être négligé. Dans ce cas, le facteur de capacité peut être basé uniquement sur les deux premiers équilibres.

Selon Walhagen et al.⁶, le facteur de rétention d'un tel système contenant la β -CD comme additif chiral à la phase mobile peut être décrit comme suit :

$$1/k = 1/k_0 + \frac{K_{P-CD} \cdot [CD]}{k_0} \quad (5)$$

où k_0 est le facteur de rétention en absence de cyclodextrine ; k est le facteur de rétention du soluté échantillon avec une concentration $[CD]$ de la cyclodextrine dans la phase mobile.

La variation de $1/k$ en fonction de $[CD]$ doit être une droite qui ne passe pas par l'origine et dont la tangente est égale au rapport: K_{P-CD}/k_0 .

Lorsque la stœchiométrie des complexes est connue (à partir de plusieurs injections chromatographiques avec différentes concentrations de CD), deux analyses chromatographiques sont suffisantes: une pour déterminer k_0 et l'autre pour déterminer k à une concentration de CD donnée.

Parce que la complexation énantiosélective est accentuée avec la stabilité de l'inclusion de la partie hydrophobe du soluté dans la cavité de la CD, la taille de la cavité de la CD est d'une importance majeure dans la formation du complexe d'inclusion. Seuls les molécules invitées qui pénètrent dans la cavité chirale de la CD, donnant lieu à un contact intime avec la surface interne, peuvent former un complexe d'inclusion stable. Si la taille de la molécule est trop petite ou trop grande, aucune interaction n'est possible empêchant ainsi la séparation.

En outre, pour obtenir une séparation chirale avec la CD, il est nécessaire que différentes interactions aient lieu entre les énantiomères et la CD. Ces interactions peuvent être de type dipole-dipole, inductives, de Van Der Waals ou celles dues aux liaisons hydrogène. Si l'une de ces interactions, au moins, dépend de la stéréochimie, alors la séparation chirale d'un soluté optiquement actif est possible.³

[6] A. Walhagen, L. E. Edholm, *Chromatographia*, 1991, **32(5/6)**, 215

La première application de cette technique a été effectuée par Uekama et al.⁷ avec la séparation des prostaglandines A, B et E par chromatographie échangeuse d'ions. Quant à la première séparation énantiomérique, elle a été rapportée par Debowski et al.⁵ qui ont pu séparer l'acide mandélique. Depuis, les cyclodextrines ont été utilisées comme additifs modifiant la phase mobile pour améliorer les séparations en CCM,⁸⁻¹⁰ en CLHP en phase inverse,¹¹⁻¹⁴ CLHP microbore^{15,16} et en électrophorèse capillaire.^{3,17-19}

Cette méthode présente plusieurs avantages:

- a) les solutions aqueuses de CD ne sont ni inflammables ni volatiles comparées aux autres modifiants organiques;
- b) la CD n'est pas toxique, donc les phases mobiles contenant la CD sont moins nocives pour la santé que les solvants organiques en CLHP en mode inverse;
- c) le processus d'inclusion de la CD en solution est réversible;
- d) la CD n'absorbe pas dans le domaine UV très souvent utilisé pour la détection chromatographique;
- e) la CD est stable dans un large domaine de pH;
- f) la CD peut rehausser le signal de fluorescence en détection chromatographique lorsqu'elle est utilisée dans la phase mobile;
- g) la CD peut solubiliser et stabiliser des solutés qui sont peu solubles dans l'eau;
- h) les colonnes conventionnelles peu coûteuses sont utilisées.²⁰

[7] K. Uekama, F. Hirayama, K. Ikada, *J. Pharm. Sci.*, 1977, **66** (5), 706

[8] D. W. Armstrong, J. R. Faulkner, S. M. Han, *J. Chromatogr.*, 1988, **448**, 345

[9] D. W. Armstrong, J. R. Faulkner, S. M. Han, *J. Chromatogr.*, 1988, **452**, 323

[10] J. D. Duncan, D. W. Armstrong, *J. Planar. Chromatogr.*, 1990, **3**, 65

[11] J. Debowski, D. Sybilska, J. Jurczak, *Chromatographia*, 1982, **16**, 198

[12] D. Sybilska, T. Zukowski, J. Borjaski, *J. Liq. Chromatogr.*, 1986, **9**(2&3), 591

[13] M. Gazdag, G. Szepesi, L. HUSZAR, *J. Chromatogr.*, 1986, **371**, 227

[14] R.A. Menges, D. W. Armstrong, Chiral Separations Using Native and Functionalized Cyclodextrin-bonded Stationary phases. In : *Chiral Separations by Liquid Chromatography*. Editeur : S. Ahuja, Washington, 1991

[15] J. P. C. Vissers, *J. Chromatogr. A*, 1999, **856**, 117

[16] T. Takeuchi, H. Asai, D. Ishi, *J. Chromatogr.*, 1986, **357**, 409

[17] L. A. St. Pierre, K. B. Sentell, *J. Chromatogr. B*, 1994, **657**, 291

[18] X. Xu, J. T. Stewart, *J. Pharm & Biom. Anal.*, 2000, **23**, 735

[19] P. Jandera, S. Bunveková, J. Planeta, *J. Chromatogr. A*, 2000, **871**, 139

[20] S. M. Han, *Biomed. Chromatogr.*, 1997, **11**, 259

Cependant, ces nombreux avantages sont accompagnés de plusieurs limitations. En effet, cette application est limitée aux solutés qui peuvent former des complexes d'inclusion. De plus, les CDs sont très peu solubles dans les phases mobiles aqueuses ou aqueuses/organiques. Ceci peut être un inconvénient car la concentration peut ne pas être suffisante pour séparer certains énantiomères.

Cependant, la solubilité limitée peut être améliorée en ajoutant de l'urée à la phase mobile mais parfois ceci entraîne une instabilité de la ligne de base et une viscosité élevée de la phase mobile.³

Une autre alternative pour palier au problème de solubilité est de modifier chimiquement les OH secondaires de la CD en les substituant par un groupement méthyle, hydroxyéthyle, hydroxypropyle, sulfate ou groupement acétyle. Cette modification chimique permet de modifier aussi bien la sélectivité chirale que les propriétés physiques de la CD telle que la force et la nature des interactions intermoléculaires polaires entre l'invité et le hôte, de même que la solubilité du matériau, permettant ainsi une meilleure sélectivité.^{3,20}

Roussel et al.²¹ ont proposé l'utilisation de la β -CD-carboxyméthylée et une nouvelle β -CD cationique dérivée comme additif chiral. La β -CD cationique est de loin plus soluble dans l'eau que la β -CD non dérivée et ne demande pas un recouvrement dynamique. Elle présente des avantages certains par rapport à l'utilisation d'autres CDs fréquemment utilisées. La rétention et la résolution peuvent être contrôlées grâce au large domaine de solubilité de la β -CD cationique. En général, l'énantiosélectivité observée est au moins aussi bonne que celle pour la β -CD non dérivée utilisée dans les mêmes conditions et est nettement améliorée en utilisant des concentrations élevées. La β -CD cationique, a été utilisée par exemple dans l'énantioséparation de huit dérivés d'aminoacides (phenylthiohydantoïnes et méthylthiohydantoïnes) et de plusieurs médicaments chiraux (hexobarbital, mephobarbital, terbutaline et chlorthalidone).³

Bien que les cyclodextrines soient devenues disponibles commercialement en grande quantité et à faible coût, plusieurs cyclodextrines dérivées utilisables comme additif chiral à la phase mobile existent sur le marché mais à des prix généralement élevés.

[21] C. Roussel, A. Favrou, *J.Chromatogr. A*, 1995, **704**, 67

Plusieurs auteurs ont étudié les CDs comme additif chiral à la phase mobile en mode inverse.^{3,22,23} Certains facteurs semblent être responsables de la séparation tel que le type de CD utilisée,^{24,25} sa concentration dans la phase mobile,²⁴⁻²⁶ le type de la phase mobile^{6,24-27} et la température du processus de séparation.^{4,25,27}

II-1-1 Influence du type et de la concentration de la cyclodextrine:

Ces facteurs ont été largement étudiés dans de nombreux travaux.^{23,28-30} Il a été démontré que l' α -CD peut être appliquée à la séparation de petites molécules (système à un noyau aromatique), alors que les β et γ -CD sont adaptées pour la résolution des composés ayant des tailles supérieures (2-4 noyaux). Lamparczyk et al.²⁵ ont étudié la séparation des énantiomères du norgestel en mode de phase inverse. Ils ont observé que le facteur de rétention diminuait lorsque la concentration de β -CD dans la phase mobile augmentait mais qu'aucune résolution chirale n'a été obtenue au delà du domaine de concentration de la β -cyclodextrine (0-16 mM).

II-1-2 Influence des phases stationnaires :

Plusieurs auteurs ont postulé que les CDs ne s'adsorbaient pas à la surface des phases stationnaires aussi bien polaires qu'apolaires. La polarité et le type de phase stationnaire jouent un rôle important dans la rétention, la sélectivité de séparation et l'efficacité. Le même pouvoir de résolution a été trouvé sur une variété de colonnes octadécylsilice à une composition d'éluant constante et avec des temps de rétention entièrement différents.^{23,28}

[22] T. Higashi, A. Ogasawara, K. Shimada, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 23 (16) (2000) 2475-86

[23] S. Gorög, M. Gazdag, *J. Chromatogr. B*, 1994, **659**, 51

[24] D. Sybilska, M. Asztemborska, A. Bielejewska, *Chromatographia*, 1993, **35**, 637

[25] H. Lamparczyk, P. K. Zarzycki, J. Nowakowska, *J. Chromatogr. A*, 1994, **668**, 413

[26] H. Lamparczyk, P. K. Zarzycki, R. J. Ochocka, D. Sybilska, *Chromatographia*, 1991, **31**, 157

[27] R. H. Pullen, J. J. Brennan, G. Potanay, *J. Chromatogr. A*, 1995, **691**, 187

[28] M. Gazdag, G. Szepesi, L. Huszär, *J. Chromatogr.*, 1986, **351**, 128

[29] K. Fujimura, T. Ueda, M. Kitagawa, H. Takayanagi, T. Ando, *Anal. Chem.*, 1986, **58**, 2668

[30] M. Gazdag, G. Szepesi, L. Huszär, *J. Chromatogr.*, 1988, **436**, 31

II-1-3 Influence de la composition de la phase mobile :

La concentration adéquate du modifiant organique dépend de la polarité de la phase stationnaire ; en augmentant sa concentration, le facteur de capacité k' du soluté complexé diminue de la même manière qu'avec les systèmes de phase inverse ordinaires. L'ordre d'élution des composés n'est pas altéré et la sélectivité n'est pas modifiée par la nature du solvant organique.^[23,31] Les solutés et les solvants organiques sont en compétition pour se localiser préférentiellement dans la cavité hydrophobe, ce qui mène à une variété de degrés d'interactions des composés testés avec les CDs.

II-1-4 Influence de la température :

L'effet de l'élévation de la température de la colonne sur les caractéristiques de séparation (facteur de capacité, la sélectivité et la résolution) n'est pas toujours prévisible.^{23,31} Lamparczyk et al.²⁵ ont étudié l'effet de la température sur la résolution des énantiomères du norgestel et ont montré qu'un comportement linéaire selon Van't Hoff commun aux 2 énantiomères est observé dans le domaine entre 70-40°C. Dans ce domaine le degré de complexation avec la β -CD pour les 2 énantiomères est très faible et la stéréosélectivité n'est pas observée.

La température à laquelle commence la déviation par rapport à la loi de Van't Hoff est 40°C; en dessous de cette température le mécanisme d'inclusion commence à être important. Lorsque la température diminue au dessous de la température ambiante la rétention diminue également. La meilleure séparation chirale est obtenue dans le domaine de -5 à 0° C. L'énantiosélectivité dans ce domaine de température peut être interprétée comme étant due à la faible mobilité des molécules invitées et hôtes d'une part et l'effet de l'encombrement stérique d'autre part.

II-1-5 Influence du pH et de la force ionique:

Si le soluté invité contient des groupements fonctionnels ionisables, la formation du complexe d'inclusion est affectée par le pH et par la force ionique du milieu. En absence de groupements ionisables ces effets ne sont pas observés.^{23,30}

[31] M. Gazdag, G. Szepesi, K. Mihalyfi, J. Chromatogr., 1988, **450**, 145

La rétention des produits basiques sur la silice dans les conditions de phase inverse est une fonction complexe du pH, du solvant organique et de la concentration du tampon.^{27,32} Les mécanismes de rétention sont une combinaison des interactions d'échange d'ions avec les groupements silanols ionisés, et les interactions hydrophobes avec les groupements siloxanes sur la surface de la silice.^{27,33}

Sueyasu et al.³⁴ ont développé une méthode simple et efficace pour déterminer les énantiomères du thiamylal dans le sérum en mode de phase inverse et avec une phase mobile contenant la β -CD. L'énantioséparation n'était pas influencée par le changement du pH au dessus du domaine 3-4,6. Il est à noter que la cavité hydrophobe de la β -CD ne peut inclure sélectivement que des espèces non-ioniques. Ainsi, le thiamylal ($pK_a=7.5$) est pratiquement non ionisé en milieu acide, permettant la formation du complexe d'inclusion.

II-1-6 Influence des modifiants organiques :

En mode inverse, l'utilisation d'un modifiant alcool est nécessaire pour la formation du complexe d'inclusion.^{3,20,29} Sa présence réduit l'énantiosélectivité induite par la β -CD dans la phase mobile.³⁵ De faibles quantités sont cependant utilisées. Il est nécessaire alors d'utiliser une colonne de faible hydrophobicité, dans le but d'obtenir des valeurs de rétention acceptables

Les modifiants organiques amines sont souvent utilisés en mode de phase inverse pour améliorer la symétrie des pics mais ils ont peu d'effet sur la sélectivité.

L'utilisation de la CD comme additif dans la phase mobile ou fixée à la phase stationnaire n'est pas limitée à la séparation chirale uniquement. Elle peut être utilisée également pour des analyses de routine.¹⁴ En effet, certains solutés sont élués à des temps de rétention élevés (>50 mn), et leur injection sur des colonnes à base de β -CD permet d'obtenir des pics plus fins à des temps de rétention réduits. De même, les isomères géométrique ne sont généralement pas (ou faiblement) séparés sur les colonnes usuelles telles que la C_{18} . L'ajout d'un sélecteur chiral tel que la β -CD dans la phase mobile permet une meilleure séparation de ces isomères.

[32] G. B. Cox, R. W. Stout, *J. Chromatogr.*, 1987, **384**, 315

[33] B. A. Bidlingmeyer, J. K. DelRios, J. Korpl, *Anal. Chem.*, 1982, **54**, 442

[34] M. Sueyasu, T. Ikeda, K. Otsubo, *J. Chromatogr. B*, 1995, **665**, 133

[35] A. D. Cooper, T. M. Jefferies, *J. Chromatogr.*, 1993, **637**, 137

II-2 RESULTATS ET DISCUSSION:

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la séparation des isomères de position *ortho*, *mé*ta, *para* de trois solutés aromatiques disubstitués : nitrophénol, fluorophénol et crésol en mode de phase inverse. La colonne chromatographique commerciale utilisée est de type silice greffée C₁₈ alors que la phase mobile est un mélange binaire méthanol/eau contenant une faible concentration de β -CD.

Le tableau I regroupe les valeurs de k' en fonction de la concentration de la cyclodextrine dans la phase mobile pour les trois séries étudiées. Nous avons calculé également le facteur de sélectivité correspondant au rapport *o/p* et *m/p* pour chaque série. Nous constatons que les meilleures valeurs de α sont obtenues pour les nitrophénol suivis des fluorophénol et enfin du crésol.³⁶ Ceci signifie que les complexes formés par les isomères du nitrophénol et fluorophénol sont les plus stables. D'autre part, nous constatons que plus la concentration de la CD augmente plus la rétention diminue pour les trois séries. Ceci signifie clairement qu'il y a compétition entre l'interaction soluté/phase stationnaire d'une part et la complexation soluté/ β -CD d'autre part. Ainsi, la formation du complexe hydrophile ne facilite pas sa fixation à la surface de la phase stationnaire hydrophobe, ce qui se traduit par une rétention plus faible.

Lorsque la concentration de la CD augmente l'équilibre de complexation (1) dans la phase mobile est favorisé. Par conséquent, les complexes formés seront plus rapidement élués avec une meilleure séparation.

Généralement, ce n'est pas le degré ou la nature de la pénétration dans la cavité de la cyclodextrine qui est le premier responsable de la résolution mais l'existence d'interaction entre les groupements OH secondaires et la molécule invitée.

[36] F. Tazerouti, A. Y. Badjah, B. Y. Meklati. Communication au 3^{ème} Congrès de la Société Algérienne de Chimie (S.A.C.), 2-4/5/1995, Annaba.

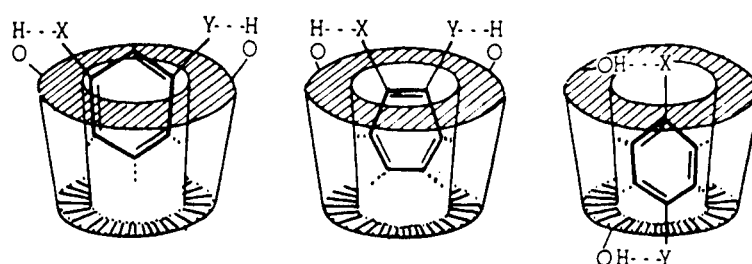
Tableau I: Effet de la concentration de la cyclodextrine sur le facteur de rétention des isomères de position des 3 séries

[CD]x 10 ³ (mM)	Nitrophénol ^a					Fluorophénol ^b					Crésol ^a				
	k'			α		k'			α		k'			α	
	o	m	p	$\alpha=o/m$	$\alpha=m/p$	o	m	p	$\alpha=m/p$	$\alpha=p/o$	o	m	p	$\alpha=o/m$	$\alpha=m/p$
0,0	4,08	2,61	2,35	1,56	1,36	1,61	2,16	1,79	1,21	1,11	2,83	2,71	2,67	1,04	1,01
0,5	4,44	2,88	2,59	1,54	1,11	1,64	2,32	1,85	1,25	1,13	2,86	2,74	2,74	1,04	1
1,0	3,95	2,49	2,21	1,58	1,12	1,61	2,24	1,82	1,23	1,13	2,86	2,71	2,67	1,05	1,01
1,5	3,93	2,43	2,16	1,62	1,12	1,63	2,14	1,82	1,17	1,11	2,76	2,56	2,55	1,08	1
2,0	3,94	2,42	2,09	1,63	1,16	1,59	2,17	1,8	1,2	1,13	-	-	-	-	-
2,5	3,93	2,39	2,08	1,64	1,15	-	-	-	-	-	2,73	2,53	2,5	1,08	1,01
3,0	3,88	2,35	2,02	1,65	1,16	1,6	2,17	1,8	1,2	1,12	-	-	-	-	-
4,0	3,72	2,26	1,91	1,64	1,18	1,45	1,95	1,63	1,19	1,12	2,75	2,45	2,3	1,12	1,06
5,0	3,48	2,08	1,72	1,67	1,21	1,32	1,86	1,5	1,24	1,13	2,59	2,33	2,16	1,11	1,08

Phase mobile : MeOH / eau (40:60) contenant de la β -cyclodextrine; ^a: 0.6 ml/mn; ^b: 0.4 ml/mn

Ainsi, la formation du complexe d'inclusion permet une meilleure différenciation des trois isomères de position grâce aux diverses interactions qui se développent entre le soluté aromatique avec ses deux substituants d'une part et la cavité de la β -CD avec ses groupements hydroxyles d'autre part.

La figure 2 représente un schéma de complexation de la β -CD avec les trois isomères de position d'un soluté donné.



..... Liaison hydrogène

..... interaction électrostatique

X : groupement hydrophobe qui peut pénétrer dans la cavité

Y : groupement polaire qui peut former des liaisons H

Figure 2 : Schéma d'inclusion dans la β -CD d'un groupement phényl disubstitué en *ortho*, *méta* et *para*

Parmi les trois séries, les nitrophénols sont les plus retenus. La figure 3 représente la variation de k' en fonction de la concentration pour cette série. Nous constatons que l'ordre d'élution des trois isomères en fonction de la concentration de la CD est dans l'ordre croissant: *para*, *méta* et *ortho*. Cet ordre d'élution est probablement dû à la forte chélation en *ortho* entre l'hydrogène du groupement hydroxyl et l'oxygène du groupement nitro, ce qui rend le soluté moins polaire. Les interactions avec la phase stationnaire de type C_{18} seront plus importantes d'où la forte rétention de l'isomère *ortho*. Cette observation reste valable pour les complexes d'inclusion. Il est à remarquer que les résultats publiés dans un travail antérieur³⁷ montrent que l'ordre d'élution de ces trois isomères obtenu sur phases stationnaires à base de

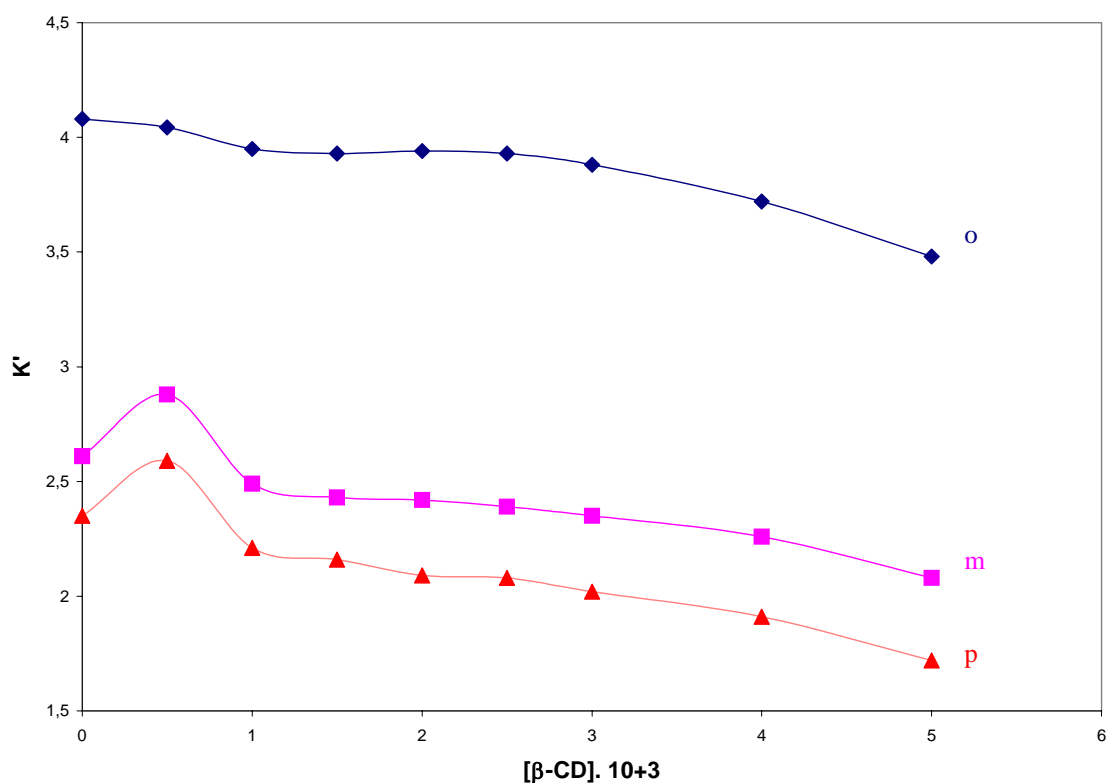


Figure 3 : Effet de la concentration de la cyclodextrine dans la phase mobile sur la rétention des isomères de position *o*, *m* et *p* nitrophénol

cyclodextrine est totalement différent: (*m*, *o* et *p*). En effet, dans ce cas une meilleure complexation signifie une fixation sélectivement plus forte sur la phase stationnaire, ce qui explique la rétention plus importante de l'isomère *para*.

En ce qui concerne les isomères du crésol, les isomères *mé*ta et *para* ne sont pas séparés sur une colonne classique en mode isocratique. L'ajout de la β -CD dans la phase mobile conduit à la séparation complète de ces deux isomères. Nous constatons d'après la figure 4 que la meilleure séparation est obtenue à des concentrations élevées de la cyclodextrine. L'ordre d'élu

tion obtenu est : *p*, *m* et *o*; il est comparable à celui obtenu en littérature (*m*, *p* et *o*) en utilisant l'éthanol comme modifiant organique. La même remarque faite précédemment reste valable: sur une colonne chromatographique à base de cyclodextrine, l'ordre d'élu

tion observé est pratiquement inversé : *m*, *o*, *p*.³⁷

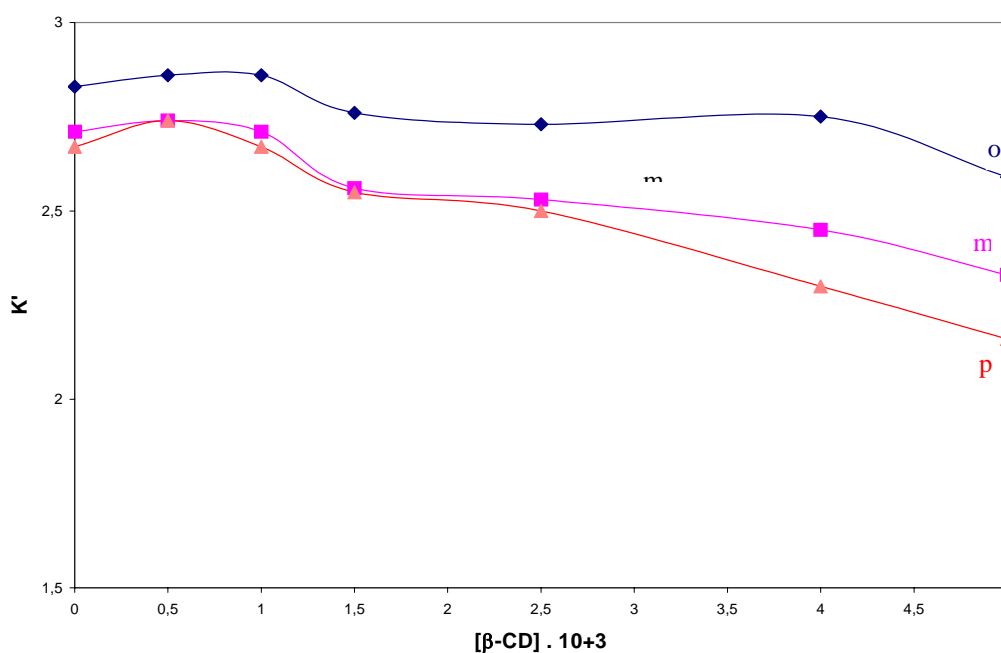


Figure 4 : Effet de la concentration de la cyclodextrine dans la phase mobile sur la rétention des isomères de position *o*, *m* et *p* crésol

Quant à la série des fluorophénols, la courbe correspondante montre que la séparation est obtenue à des valeurs de k' plus faibles comparés aux deux autres séries (Fig. 5). Cependant, l'ordre d'élution obtenu (o, p, m) est différent de celui obtenu pour le crésol et le nitrophénol (p, m, o). Pour cette série, l'ordre d'élution reste le même quelle que soit la concentration de la β -CD présente dans la phase mobile. Bien que les trois isomères soient élués plus rapidement, la séparation obtenue reste pratiquement la même; les constantes de stabilité des trois complexes sont similaires.

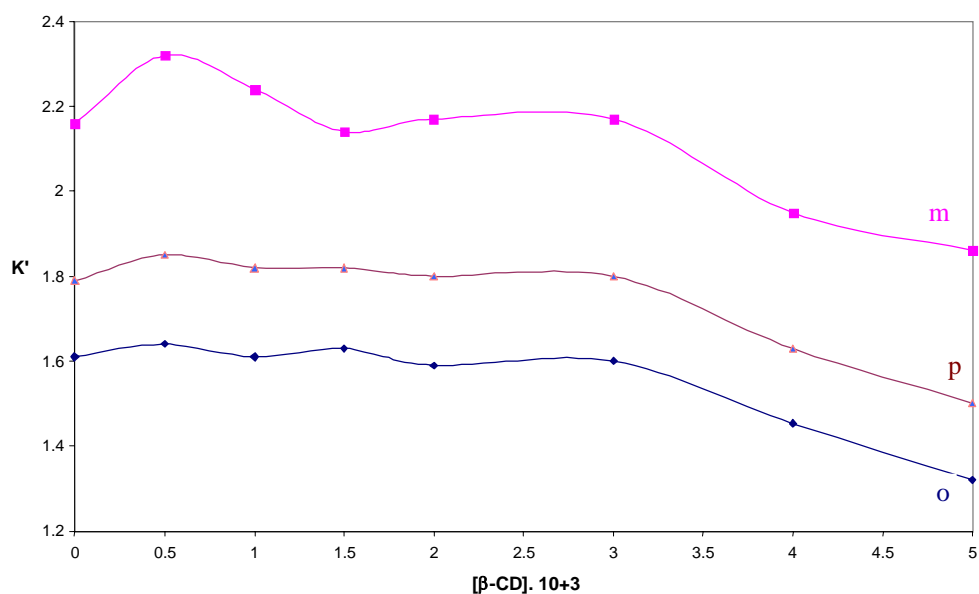


Figure 5 : Effet de la concentration de la cyclodextrine dans la phase mobile sur la rétention des isomères de position o, m et p fluorophénol

Les figures 6 et 7 représentent un exemple de chromatogrammes obtenus avant et après l'ajout de la β -CD dans la phase mobile pour la série du nitrophénol et crésol. Il apparaît clairement que la présence de β -CD à 2 mM améliore la séparation des trois isomères.

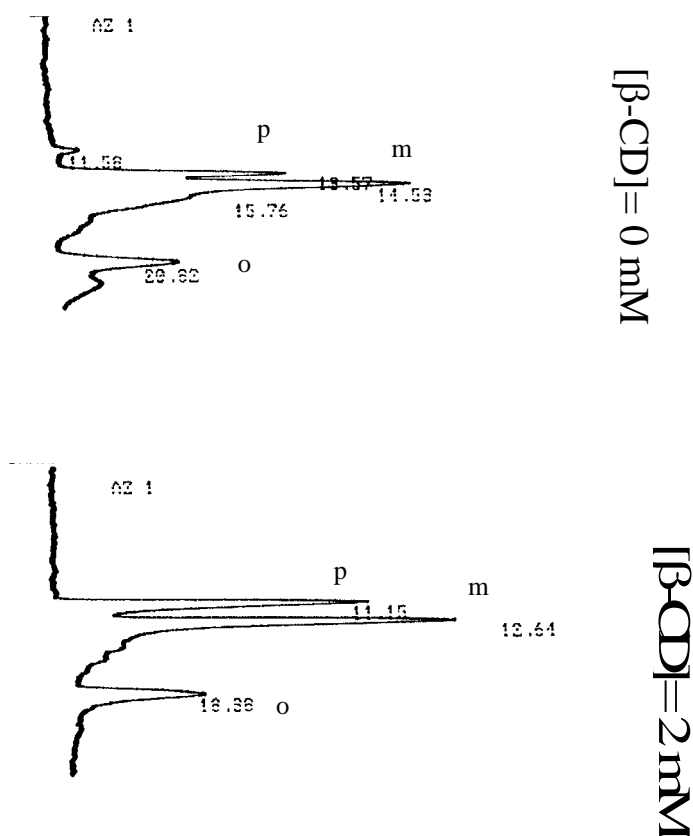


Figure 6: Séparation des 3 isomères *ortho*, *méta* et *para* nitrophénol

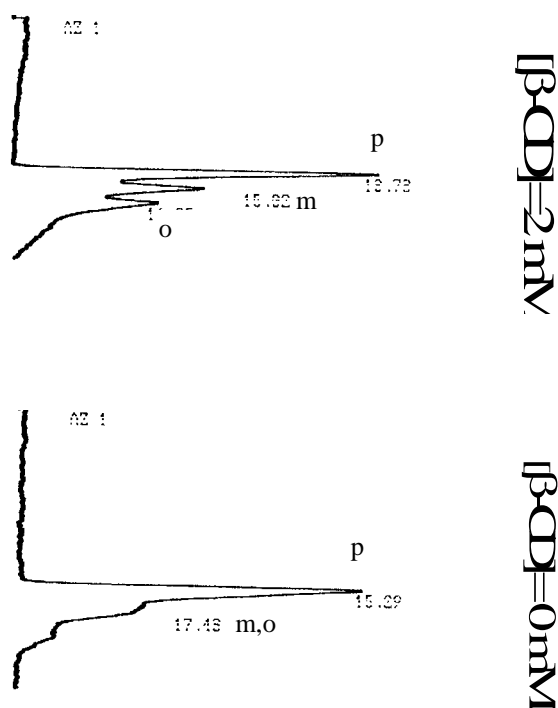


Figure 7: Séparation des 3 isomères *ortho*, *mé*ta et *para* crésol

II-3 CONCLUSION:

La séparation des isomères de position de trois dérivés du benzène disubstitué sur une colonne classique de type C_{18} a été réalisée grâce à l'ajout de la β -CD dans la phase mobile méthanol/eau. Les résultats obtenus montrent que pour tous les solutés étudiés, le facteur de capacité diminue à peu près régulièrement en fonction de la concentration de β -CD. Pour certaines compositions de la phase mobile, cette élution plus rapide s'accompagne d'une meilleure séparation des trois isomères de position, particulièrement dans le cas du crésol.

Il est à noter que les ordres d'élution observés, diffèrent complètement de ceux obtenus en utilisant la cyclodextrine comme phase stationnaire, ce qui traduit l'importance du phénomène d'inclusion dans les interactions à la base de la rétention.

Néanmoins, cette technique d'analyse est limitée à cause de la faible solubilité de la cyclodextrine dans la phase mobile qui pose de nombreux problèmes d'ordre pratique comme cela a été rapporté dans la littérature³. Dans notre cas, bien que nous ayons travaillé avec une concentration maximale de β -CD égale à 5 mM, en deçà de sa limite de solubilité dans l'eau, nous avons été confrontés à des difficultés telles que :

- précipitation dans certaines parties du circuit chromatographique,
- colmatage des circuits et frittés,
- instabilité de la pression et du débit.

Malgré les précautions prises tel que le rinçage fréquent de tout le circuit, cette technique reste difficile à mettre en œuvre et n'a pu être appliquée pour d'autres types de solutés. Pour ces raisons nous nous sommes intéressés à la préparation de phases stationnaires utilisant comme sélecteur chiral la β -CD afin de tester leurs performances dans la séparation des isomères de position et des isomères optiques. Les résultats obtenus sont décrits dans les chapitres ultérieurs.

III-1 Méthodes de synthèse des phases stationnaires chirales à base de cyclodextrine :

Les isomères optiques purs peuvent être obtenus par la résolution des énantiomères en utilisant des méthodes chromatographiques, telle que la chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Cette technique a été développée efficacement dans un but aussi bien analytique que préparatif. La clé de cette efficacité réside en l'utilisation des phases stationnaires chirales. Durant ces dix dernières années, de nombreuses phases stationnaires ont été développées pour la CLHP et environ une centaine est actuellement commercialisée.¹

Les phases stationnaires chirales à base de β -cyclodextrine (β -CD) représentent actuellement l'un des matériaux les plus utilisés (environ 50 sont commercialisées). Parmi leurs nombreux avantages, nous citerons leur compatibilité avec une large gamme de solvants. Elles peuvent être utilisées efficacement aussi bien en mode de phase inverse (ce qui n'est pas possible avec d'autres phases stationnaires chirales) qu'en mode de phase normal. Elles peuvent être également utilisées en mode dénommé " mode organique polaire" (phase mobile "magique") où la phase mobile comprend entre autre un solvant organique polaire (généralement la triéthylamine ou l'acide acétique glacial) en absence complète d'eau. Ce développement leur a permis d'être les premières phases stationnaires chirales dites "multimodes".^{2,3}

Initialement, les CDs ont été polymérisées et réticulées en gels.⁴⁻⁶ Cependant, peu de séparations énantiomériques ont été reportées avec ce type de matériau⁴ car ce gel de polymère avait une faible résistance mécanique et une faible efficacité ce qui le rendait inadapté aux applications en CLHP.

Mizobuchi et al.^{7,8} ont préparé des résines de CD/polyuréthane, utilisées aussi bien en chromatographie en phase gazeuse qu'en CLHP. Ces résines peuvent développer des

- [1] Y.Okamoto, E. Yashima, *Chromatographic Separations Based on Molecular Recognition*, edited by K. Jino, Wiley-VCH, New York, 1997
- [2] D.W. Armstrong, *LC-GC*, 1992, **9**, 647
- [3] *Chiral Separations, A Guide to Using Cyclodextrins Bonded Phases for HPLC*, Astec, Advanced Separation Technologies Inc., 1997, UK.
- [4] A. Harada, M. Furue, S. Nozakura, *J. Polym. Sci.*, 1978, **16**, 187.
- [5] B. Zsardon, F. Szilasi, F. Tudos, J. Szejtli, *J. Chromatogr.*, 1981, **208**, 109.
- [6] B. Zsardon, L. Decsei, M. Szilasi, F. Tudos, *J. Chromatogr.*, 1983, **270**, 127.
- [7] Y. Mizobuchi, M. Tanaka, T. Shono, *J. Chromatogr.*, 1980, **194**, 153.
- [8] Y. Mizobuchi, M. Tanaka, T. Shono, *J. Chromatogr.*, 1981, **208**, 35.

interactions fortes et sélectives basées sur la formation de complexes d'inclusion avec des solutés possédant un noyau aromatique ou des hétéroatomes. Par la suite, les CDs ont été immobilisées sur gel de polyacrylamide. Ces phases stationnaires ont montré une meilleure efficacité que celle des résines de CDs/polyuréthane dans la séparation des isomères de position de benzènes disubstitués.⁹ Cependant, les temps d'élution de ces isomères étaient excessivement longs et le débit de la phase mobile ne pouvait être augmenté à cause du manque de rigidité du gel polyacrylamide, ce qui a limité l'utilisation pratique de ces gels.

Ultérieurement, d'autres travaux ont été menés en vue de lier la CD à une matrice plus solide et présentant une plus grande résistance mécanique. La silice s'est révélée un matériau de choix, par ailleurs très largement utilisée dans les différentes techniques chromatographiques.

Deux approches ont alors été utilisées: la première consiste à lier chimiquement la β -CD à la silice au moyen d'une chaîne difonctionnelle adéquate (dite « spacer »). La deuxième consiste à déposer une cyclodextrine polymérisée à la surface de la silice. La première approche peut être séparée en 3 variantes :

- 1- Le spacer est d'abord greffé sur le gel de silice puis la CD réagit avec le groupement terminal du spacer.
- 2- Le groupement réactif du spacer préalablement couplé à la CD réagit avec les groupements silanols libres situés à la surface de silice.
- 3- Une partie du spacer est couplée à la silice, et l'autre partie à la CD et l'immobilisation consiste à faire réagir les deux parties. Ces supports chromatographiques présentent d'excellentes propriétés.

Fujimura et al.¹⁰ ont été les premiers à lier chimiquement les molécules de CDs sur la surface de la silice à l'aide de chaînes amines. Le gel de silice réagit avec le (3-(2-aminoethyl) aminopropyl) triméthoxysilane pour former un gel de silice modifié diaminé. Pour faire réagir la CD avec ce dernier, il est nécessaire de transformer les groupements hydroxyles primaires de la β -CD en tosylates. Des gels de silice modifiés par un groupement aminé ont été également employés en utilisant le (3-aminopropyl) triméthoxysilane comme réactif. Ces mêmes auteurs trouvèrent que les phases liées diaminées étaient plus efficaces pour la séparation de divers isomères de structure que les monoamines (fig.1a).

[9] M. Tanaka, Y. Kawaguchi, M. Nakae, Y. Mizobuchi, *J. Chromatogr.*, 1982, **246**, 207

[10] K. Fujimura, T. Ueda, T. Ando, *Anal. Chem.*, 1983, **55**, 446

Kawaguchi et al.¹¹ fixèrent la CD sur gel de silice à travers des liaisons de type amide, le gel de silice étant converti en dérivé carboxylique (succinyl) par la procédure générale via le dérivé aminopropyl. La CD réagit d'abord avec l'éthylènediamine pour former une CD monosubstituée (en position OH primaire). La CD ainsi modifiée est greffée sur la silice dérivée au moyen d'un spacer contenant une chaîne amide (Fig.1b).

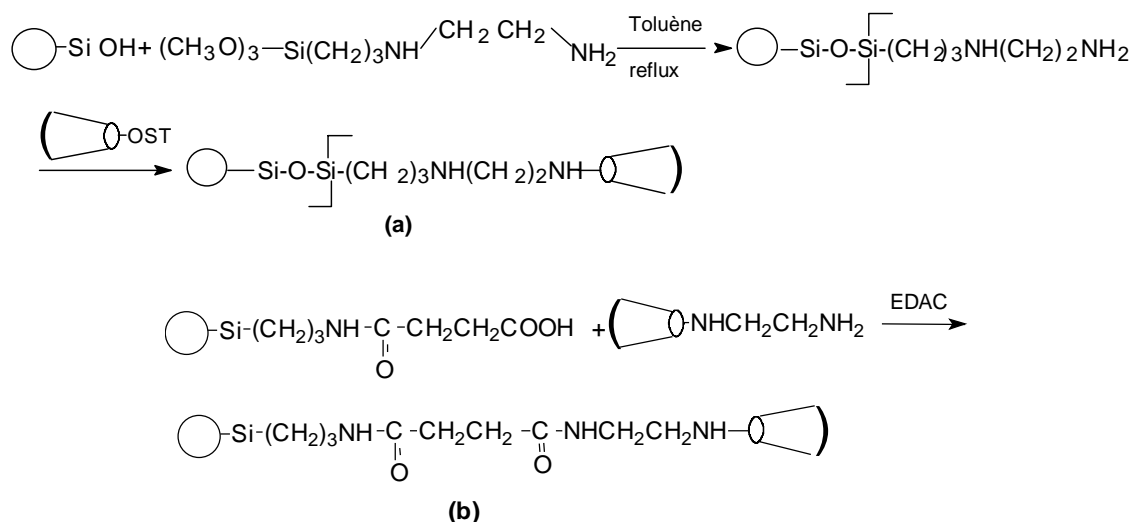


Figure 1: Fixation de la β -CD sur la silice au moyen (a) d'une chaîne amine ou (b) d'une chaîne amide.

La figure 1 montre que les phases stationnaires de type amine et amide présentent une certaine similitude puisque dans les deux cas le spacer est lié à la CD par un OH primaire. Cependant, elles diffèrent par la longueur et la composition chimique de leur spacer. Par la suite, des problèmes incontournables avec ce type de phases ont été relevés, à savoir :

- le temps de rétention varie avec la concentration de l'échantillon, ce qui affecte un travail quantitatif.
- elles sont instables en présence d'eau, limitant ainsi l'utilisation des phases mobiles aqueuses.

[11] Y. Kawaguchi, M. Tanaka, M. Nakae, K. Funazo, T. Shono, *Anal. Chem.*, 1983, **55**, 1852

- c) la quantité de cyclodextrine effectivement greffée sur la surface de la silice est très faible.
- d) la sélectivité est affectée par la présence d'amines.
- e) la formation de nitroxyde est généralement inévitable durant la synthèse, donnant au matériau une couleur marron et le rendant ainsi inapproprié pour les applications en CCM.
- f) la synthèse est plutôt ardue et nécessite un temps excessivement long.¹²

L'avantage de ce type de phases stationnaires chirales est la séparation des énantiomères d'acides aromatiques à faible poids moléculaire tel que l'acide mandélique ainsi que d'autres produits du même genre. Ceci peut être le résultat de l'interaction additionnelle entre le groupe acide carboxylique de l'énantiomère et l'azote basique du spacer. Par la suite, ces matériaux ont été abandonnés et d'autres liens non-azotés ont été développés. En 1983, Armstrong et *al.*¹², développèrent des greffages stables en milieu aqueux. Le spacer est ainsi attaché au gel de silice grâce à un groupement silane, epoxy silane, organo-halosilane ou alkyl-vinyl-silane. Cette réaction doit être impérativement menée en milieu anhydre. La cyclodextrine est alors liée par l'un de ses groupements OH à la fonction époxyde ou halogénure. La réaction est réalisée en présence d'une base forte (NaH), le solvant étant le DMSO ou la pyridine. L'utilisation du vinyl-alkyl-silane nécessite la conversion du ligand vinyl alkyl en dérivé époxyde ou halogénure.

Plusieurs études ont été menées pour mesurer la réactivité respective et les pKa relatifs des groupements hydroxyles de la CD. Bien que le greffage de la cyclodextrine puisse être effectué à travers aussi bien les OH primaires que secondaires, les OH en C₆ et C₂ sont connus pour être les plus réactifs. Les phases stationnaires à base de CD ne contenant pas d'azote sont largement utilisées car elles sont relativement stables sous les conditions standards de chromatographie liquide.¹² Sur la figure 2 nous avons représenté, à titre d'exemple, une phase stationnaire commerciale de ce type développée par ASTEC sous le nom de Cyclobond.

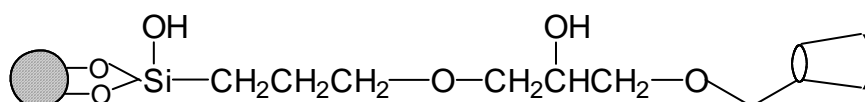


Figure 2: Phases stationnaires type Cyclobond¹²

[12] D. W. Armstrong, W. De Mond, *J. Chromatogr. Sci.*, 1984, **22**, 411

Ainsi, les matériaux Cyclobond I, II et III correspondent à la β , γ et α -cyclodextrine respectivement.¹³⁻¹⁵ Ils ont connu un succès prononcé dans le domaine de la séparation chirale dû au fait qu'ils montrent une stabilité et une sélectivité satisfaisantes. Quand ces phases stationnaires sont utilisées en mode inverse, la formation d'un complexe d'inclusion (dans lequel la partie hydrophobe du soluté pénètre dans la cavité de la CD) est largement responsable de la rétention et de la sélectivité. Par contre, en mode normal, c'est la phase mobile hydrophobe qui occupe la cavité de la cyclodextrine, les interactions du soluté se faisant principalement avec les OH de la β -CD. Ainsi, en mode normal, la sélectivité de ces phases stationnaires est similaire à celles des colonnes de type diol.²

Thuaud et al.¹⁶ ont introduit un nouveau type de greffage, il consiste en l'adsorption d'un polymère de β -CD sur la silice. Ce polymère est obtenu soit par condensation de β -CD avec un réactif bifonctionnel (epichlorhydrine) (EP- β -CD- N^+ polymer) ou par greffage d'un dérivé de la β -CD monosubstituée sur un polymère linéaire (polyvinyl imidazol) (PV1- β -CD) (Fig.3).

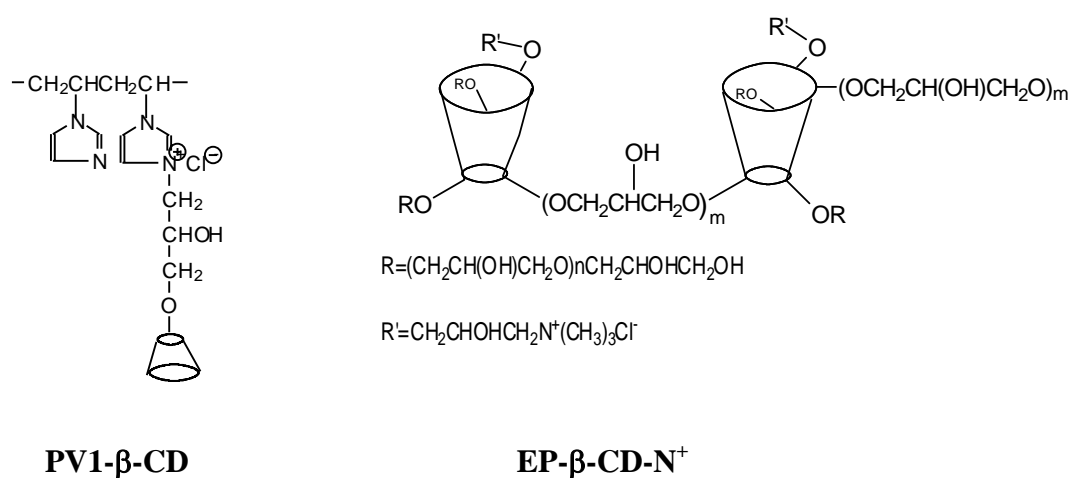


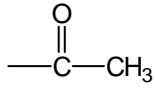
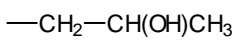
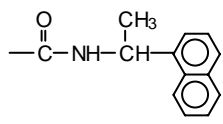
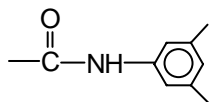
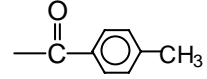
Figure 3: Exemple de phases stationnaires à base de polymères de β -cyclodextrine

- [13] R. A. Menges, D. W. Armstrong. *Chiral Separations Using Native and Functionalized Cyclodextrin-Bonded Stationary Phases in HPLC: Chiral Separation by Liquid-Chromatography*, edited by S. Ahuja, Ciba-Geigy Corporation, American Chemical Society, Washington, DC 1991, 67
- [14] F. Bressolle, M. Audran, T.N. Pham, J.J. Vallon, *J. Chromatogr.B*, 1996, **687**, 303.
- [15] S.M. Han, *Biomed. Chromatogr.*, 1997, **11**, 259
- [16] N. Thuaud, B. Sebillé, A. Deratani, B. Popping, C. Pellet, *Chromatographia*, 1993, **36**, 373.

Malgré le fait que ces phases soient plutôt déposées que liées à la surface de la silice, elles ont montré d'intéressantes séparations chirales notamment dans le domaine des produits pharmaceutiques tels que les anti-coagulants et les barbituriques.^{17,18}

Ces dernières années, plusieurs progrès technologiques ont augmenté les performances de la série Cyclobond et élargi leur domaine d'application. L'un des premiers progrès est l'introduction des dérivés de la cyclodextrine dans les Cyclobond. Parmi les phases représentées dans le tableau I, les plus intéressantes sont la Cyclobond I RSP (R,S-hydroxypropylether) et Cyclobond I SN (S-naphthylethylcarbamate) ainsi que la RN (R-naphthylethylcarbamate). Ces phases sont commercialisées actuellement sous le nom Cyclobond 2000. Ces Cyclobond dérivées peuvent être utilisées avec succès en mode inverse, mode normal et également en mode polaire organique.^{3,19}

Tableau I: Les phases stationnaires de type Cyclobond I

Groupement ^a R	Substituant	Nom
	Acétyl	Cyclobond I Ac
	S ou (R,S) 2-hydroxypropyl	Cyclobond I SP ou RSP
	(R), (S) ou (R,S) Naphthylethyl Carbamate	Cyclobond I RN, SN ou RSN
	Dimethylphenyl Carbamate	Cyclobond I DMP
	p-toluy ester	Cyclobond I PT

a: Groupement R lié aux atomes C-2, C-3 et / ou C-6 de la β -cyclodextrine

[17] B. Sebillé, M. Guillaume, C. Vidal-Madjar, N. Thuaud, *Chromatographia*, 1997, **45**, 383

[18] N. Thuaud, B. Sebillé, *J. Chromatogr. A*, 1994, **685**, 15

[19] A.M. Stalcup, *Cyclodextrin Bonded Chiral Stationary Phases in Enantiomer Separation: A Practical Approach to Chiral Separation by Liquid Chromatography*, edited by Subramanian, New York, 1994

Bien que plus d'une centaine de phases stationnaires chirales soient disponibles actuellement de nombreux produits racémiques demeurent sans résolution. Par conséquent, le développement de nouvelles phases stationnaires chirales performantes constitue un domaine de recherche d'actualité.

III-2 Synthèse des phases stationnaires chirales A, B, C, D, E et F :

En ce qui concerne notre travail, nous nous sommes intéressés à un autre type de phases stationnaires chirales à base de β -cyclodextrine, en tenant compte des propriétés des phases stationnaires décrites dans les travaux antérieurs.

Ainsi, la première étape de notre travail, a consisté à préparer une phase stationnaire chirale en utilisant une méthode décrite préalablement par la littérature,²⁰ ce qui nous a permis de nous familiariser avec la synthèse des phases chirales ainsi que leurs applications. Cette synthèse (Fig.4) consiste à substituer les groupements hydroxyles primaires de la CD par un spacer difonctionnel (isocyanatopropyltriéthoxysilane), à dériver les OH libres restants en groupements phényle carbamate et enfin à greffer la CD dérivée à la surface de la silice par une réaction de silanisation. La phase stationnaire obtenue est notée PSC A.

Dans la deuxième étape, nous avons suivi le même schéma de synthèse en utilisant l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (2-HP- β -CD) au lieu de la β -cyclodextrine (PSC B, Fig. 4). Les deux phases stationnaires chirales obtenues ont été caractérisées par analyse élémentaire ainsi que par spectroscopie RMN à l'état solide du ^{13}C et du ^{29}Si .²¹

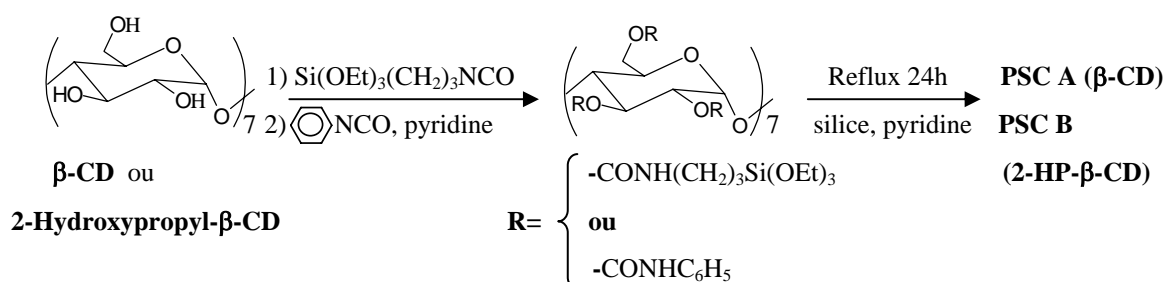


Figure 4: Schéma de synthèse des phases stationnaires chirales A et B

[20] K. Nakamura, H. Fujimura, H. Kitagawa, H. Wada, K. Makino, *J. Chromatogr. A*, 1995, **694**, 111.

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

Dans la troisième étape, nous avons réalisé la même synthèse mais en améliorant la technique de préparation (PSC C).²² Cette méthode consiste à suivre une procédure dite « one-pot » plus appropriée qui simplifie aussi bien la préparation de la phase stationnaire que la caractérisation du sélecteur chiral intermédiaire.

Enfin, dans la quatrième étape de ce chapitre nous décrivons la synthèse de trois nouvelles phases stationnaire chirales (D, E et F). Les sélecteurs chiraux ainsi que les phases stationnaires sont préparées comme indiqué sur la figure 5.

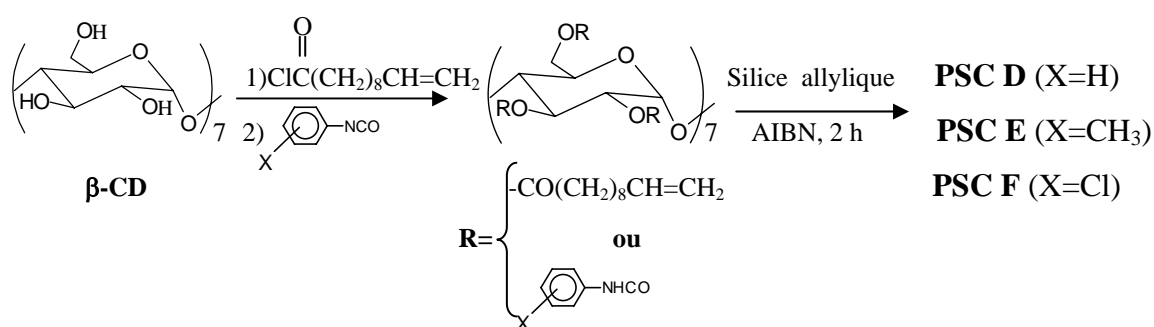


Figure 5: Préparation des phases stationnaires D, E et F

Les dérivés de la cyclodextrine sont obtenus par la réaction successive de la cyclodextrine avec un chlorure d'acide (chlorure d'undecenoyl) et un dérivé de phényle isocyanate (phényle isocyanate, p-méthyle ou p-chloro-phényle isocyanate). Ces dérivés ainsi préparés sont fixés à la silice allylique préalablement préparée et ceci par une réaction de greffage radicalaire, en présence de l' α, α' -azobisisobutyronitrile (AIBN), mettant en jeu la double liaison C=C du groupement 10-undecenoyl préalablement lié à la cyclodextrine. Les phases stationnaires chirales obtenues sont caractérisées par analyse élémentaire.

III-3 Caractérisation des phases stationnaires chirales par analyse élémentaire :

Le tableau II regroupe les résultats obtenus par l'analyse du C, N et H des six phases stationnaires synthétisées. La quantité de la cyclodextrine greffée par gramme de support est basée sur la quantité d'azote calculée si une dérivation complète de la β -CD est obtenue. L'ordre de grandeur obtenu est en accord avec les résultats de la littérature pour ce type de phases. Cette quantité est considérée suffisante pour adsorber une quantité d'échantillon de l'ordre de la picomole.¹⁰

Quant aux résultats de l'analyse élémentaire du sélecteur chiral de la phase C (β -CD^c), ils donnent: %C: 60.41; %H: 4.90; %N: 8.06, les valeurs calculées étant: C:60.16; H: 5.35; N: 7.55. Ces résultats correspondent à un degré de substitution de 1.17 unité de spacer (3-carbamatopropyltriéthoxysilane) et 19 groupements phénylcarbamate par molécule de β -cyclodextrine.

Tableau II: Résultats de l'analyse élémentaire des phases stationnaires chirales synthétisées				
Phases	%C	%H	%N	Quantité de cyclodextrine/ 100g de phase (μ mol/g)
A	14.6	1.7	8.9	65
B	9.3	1.2	2.5	49
C	6.73	1.15	0.65	23
D	6.65	1.38	0.49	17
E	5.09	1.09	0.45	16
F	4.05	1.09	0.22	8

III-4 Caractérisation des phases stationnaires par la RMN :

III-4-1 Caractérisation des dérivés de la cyclodextrine par RMN du ¹H:

La RMN du ¹H nous a permis de confirmer la dérivation des groupements hydroxyles de la β -CD sous forme de phényle carbamate ainsi que la structure des différents spacers utilisés.

Les figures 6 et 7 représentent les quatre spectres correspondants aux quatre cyclodextrines dérivées en solution dans le deutérochloroforme: β -CD^c: sélecteur chiral de la PSC C; β -CD^d (PSC D); β -CD^e (PSC E); β -CD^f (PSC F).

Ainsi, l'utilisation des spectres de référence de la β -CD cités dans la littérature^{23,24} nous a aidé à indexer les différents signaux de chaque spectre. Les résultats obtenus sont donnés ci-dessous:

β -CD^c : δ = 3.8 -5.6 ppm : (les différents H de la β -CD); 6.4-7.6: (H-Ar); 1.2: (CH₃-); 0.8: (CH₂-Si); 2.2: (CH₂-O, -CH₂- et CH₂-NH)

β -CD^d : δ =3.8-5.7 ppm (les H de la β -CD); 6.4-7.6 (H-Ar); 4.9 (C¹¹H₂=); 5.6 (-C¹⁰H=); 1.0-1.8 (-C³H₂-C⁸H₂-); 2.24 (C⁹H₂-); 2.40 (C²H₂-)

β -CD^e : δ = 3.8-5.6 (les H de la β -CD); 4.9 (C¹¹H₂=); 5.5 (-C¹⁰H=); 2.04 (C²H₂-); 2.3 (C⁹H₂-); 2.2 (CH₃-Ar); 1.17-1.60 (C³H₂-C⁸H₂); 6.5-7.26 (H-Ar)

β -CD^f : δ = 4.0-5.8 (les H de la β -CD); 4.95 (C¹¹H₂=); 5.80 (-C¹⁰H=); 2.35 (C²H₂-); 2.01 (C⁹H₂-); 0.88-1.60 (-C³H₂-C⁸H₂-); 6.65-7.26 (H-Ar);

[23] H.J. Schneider, F. Hacket, V. Rudiger, H. Ikeda, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 1755.

[24] R.M. Silverstein, G.C. Bassler, T.C. Morill, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5^{ème} édition, John Wiley & Sons, 1991.

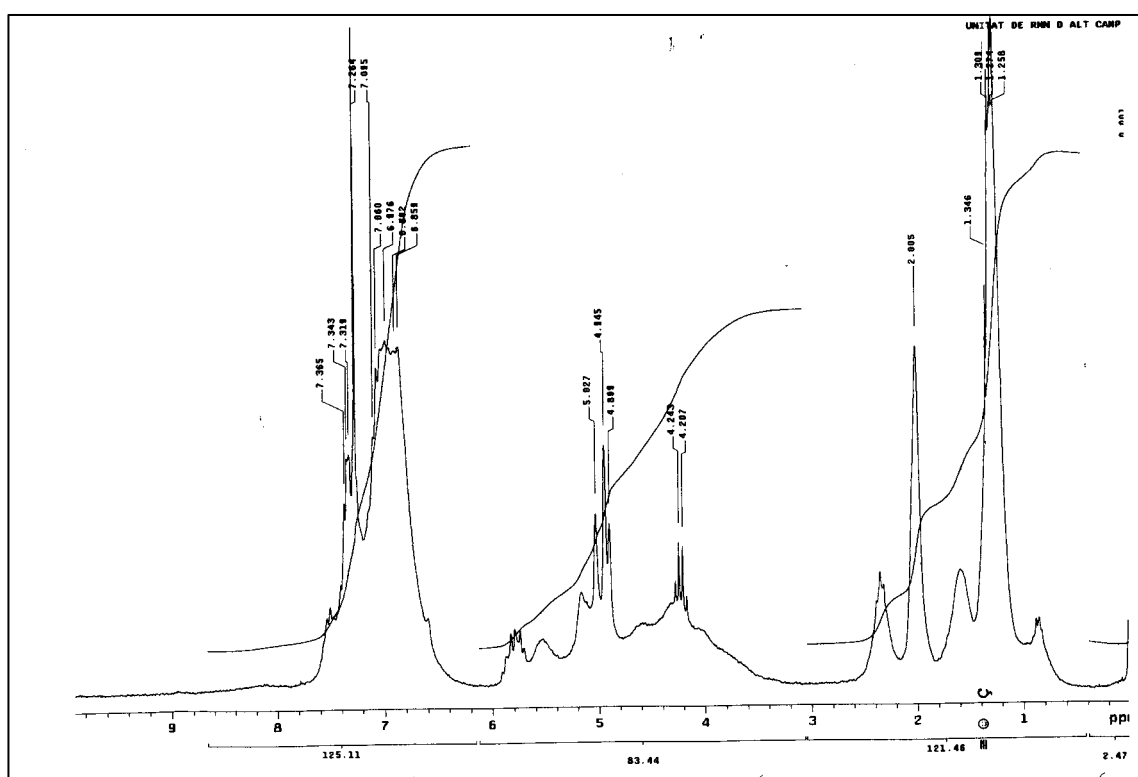
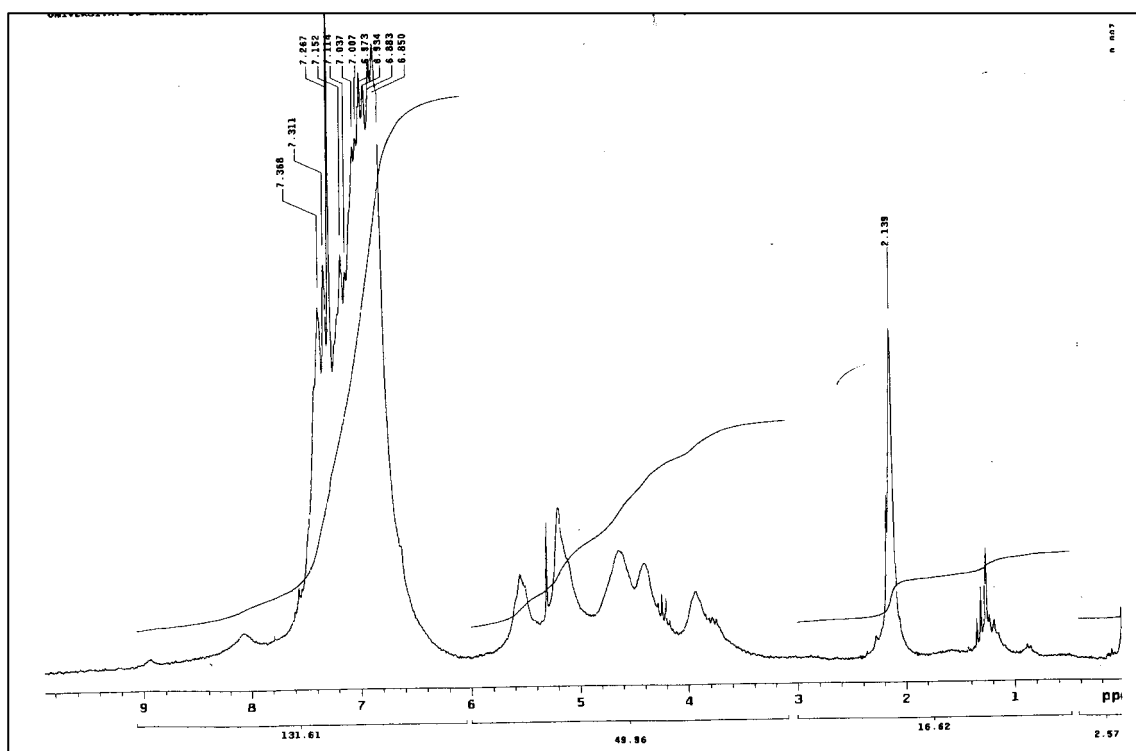


Figure 6 : Spectres RMN du ^1H des dérivés de la cyclodextrine C et D dans CDCl_3

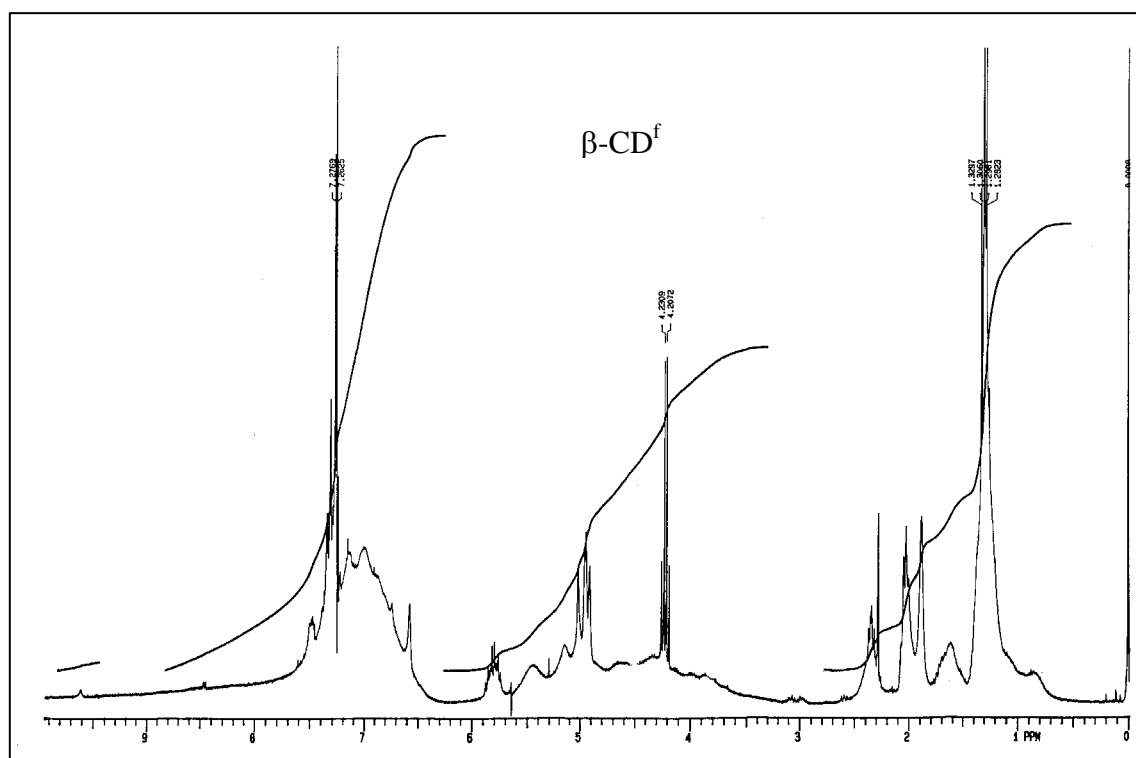
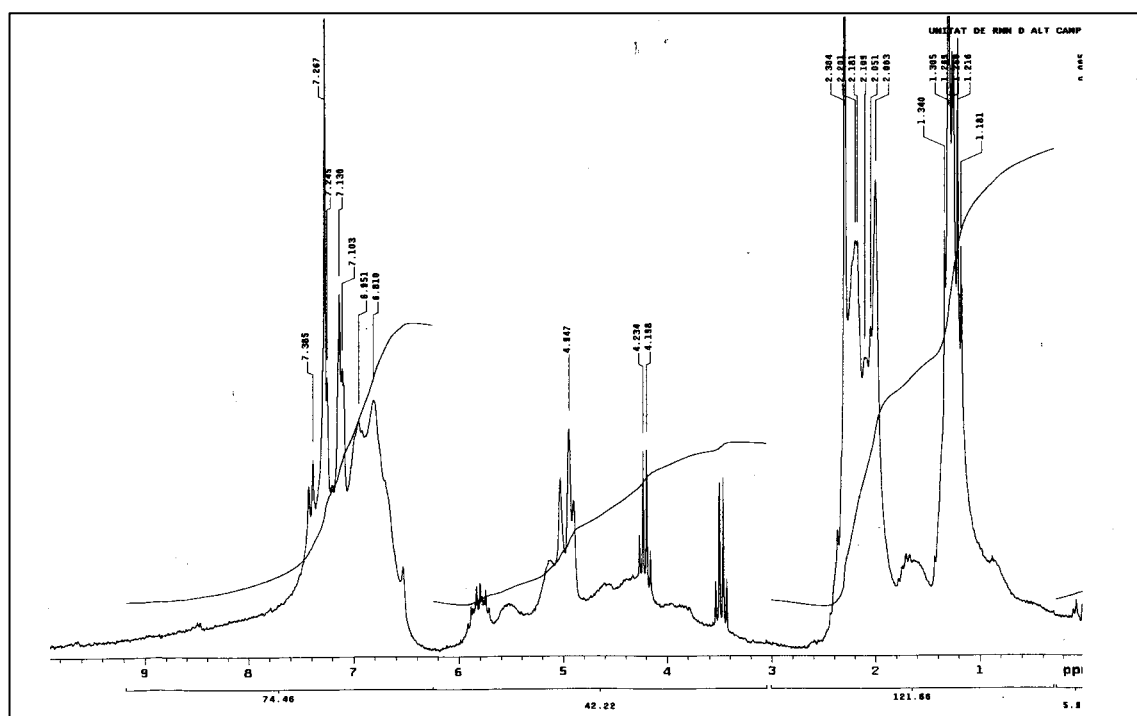


Figure 7 : Spectres RMN du ^1H des dérivés de la cyclodextrine et F dans CDCl_3

III-4-2 Caractérisation des phases stationnaires par RMN à l'état solide du ^{29}Si et du ^{13}C :

La spectroscopie RMN à l'état solide est un outil inestimable pour l'étude de la surface des matériaux solides. Plusieurs auteurs ont utilisé la RMN du solide à polarisation croisée (CP) en mode de rotation à l'angle magique de spin (MAS) du noyau du ^{13}C et du ^{29}Si dans le but de caractériser les surfaces de silice diversement greffées.²⁵⁻³⁰

En effet, plusieurs informations peuvent être obtenues à partir de ces techniques: elles permettent la différenciation entre les groupements silanols libres et les groupements silanols geminaux. Ceci n'est pas possible avec d'autres techniques telle que la spectroscopie infra-rouge par exemple.^{25,28} La RMN du ^{13}C peut être aussi utilisée pour l'étude de la conformation ainsi que la mobilité des chaînes alkyles sur la silice modifiée chimiquement.³¹

La figure 8 représente les 2 spectres RMN du ^{29}Si des deux phases stationnaires chirales synthétisées A et B correspondant à la β -CD perphénylée greffée sur gel de silice et l'hydroxypropyl- β -CD perphénylée / gel de silice, respectivement.^{21,32,33} Les deux spectres obtenus ne diffèrent pas d'une manière significative l'un de l'autre. On y retrouve principalement les deux signaux caractéristiques de la silice à savoir Q^4 ($\delta=-110$ ppm) et Q^3 ($\delta=-101$ ppm) correspondant aux groupements siloxane $\text{Si}(\text{O})_4$ et aux groupements silanols $\text{Si}(\text{O})_3(\text{OH})$ respectivement. Quant au signal Q^2 correspondant aux groupements silanols geminaux $\text{Si}(\text{O})_2(\text{OH})_2$ ($\delta=-90$ ppm), il est pratiquement inexistant dans les deux spectres. Ceci confirme que les silanols de la surface de la silice participent fortement au processus de greffage effectué entre la silice et le groupement terminal du spacer fixé sur la cyclodextrine et ceci par la réaction de silanisation. Maciel et al.³⁴ ont déjà montré que ce sont les groupements silanols de la surface qui participent à toute modification chimique du gel de silice.

[25] G. Crini, M. Morcellet, *J. Chromatog. Sci.*, 1996, **34**, 477.

[26] Y. Berezmitski, M. Jaroniec, M. E. Gangoda, *J. Chromatogr. A*, 1998, **828**, 59.

[27] M. Pursch, L.C. Sarrder, K. Albert, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 4107

[28] E. Bayer, K. Albert, T. Reiners, M. Nieder, D. Muller, *J. Chromatogr.*, 1983, **264**, 197.

[29] K. Albert, E. Bayer, *J. Chromatogr.*, 1991, **544**, 345

[30] B. Buszewski, R.M. Gadzata-Kopciuch, M. Markuszewski, R. Kaliszan, *Anal. Chem.*, 1997, **69**, 3277.

[31] J. Nawrocki, *J. Chromatogr. A*, 1997, **779**, 29.

[32] A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, F. Tazerouti, B. Y. Meklati, Communication au 2nd *Mediterranean Basin Conference on Analytical Chemistry*, 23-28 / 11 / 1997, Rabat, Maroc.

[33] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, Communication au 2^{ème} *Colloque National sur l'Elaboration et la Caractérisation des Matériaux*, 2-3/06/1998, U.S.T.H.B., Alger.

[34] G.E. Maciel, D.N. Sindrof, V.J. Bartuska, *J. Chromatogr.*, 1981, **205**, 438.

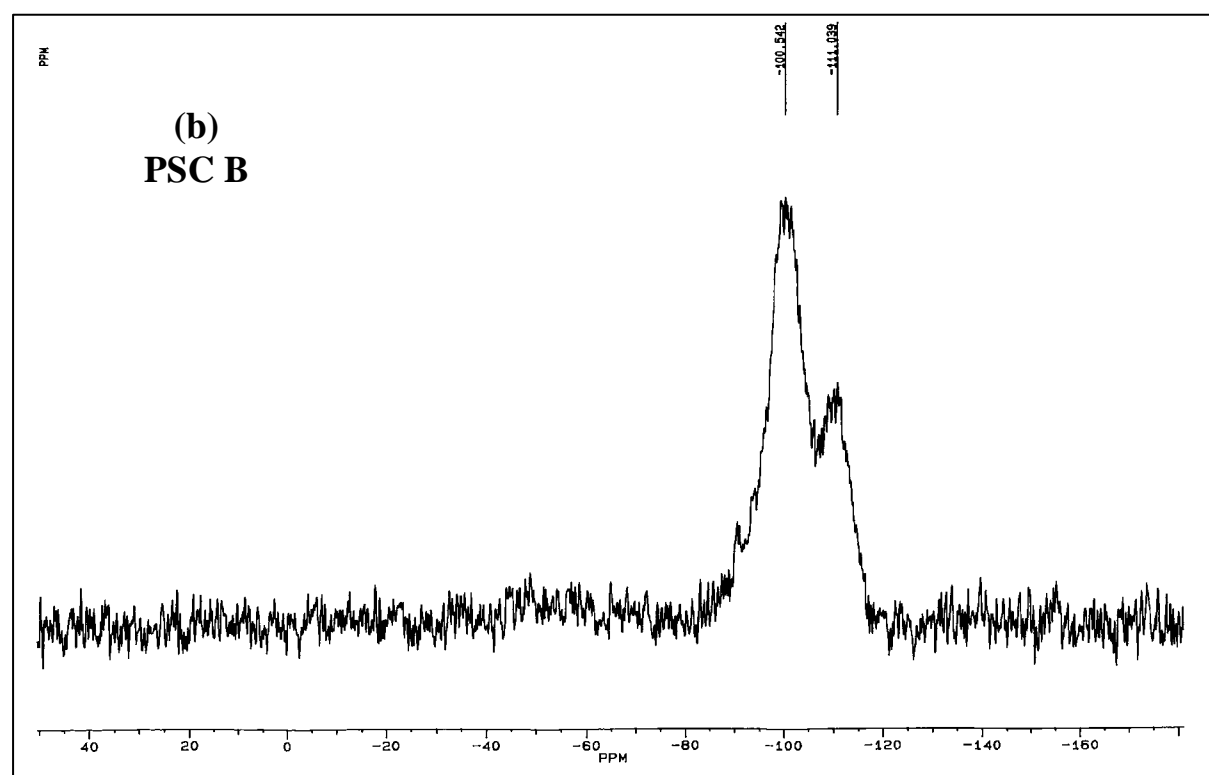
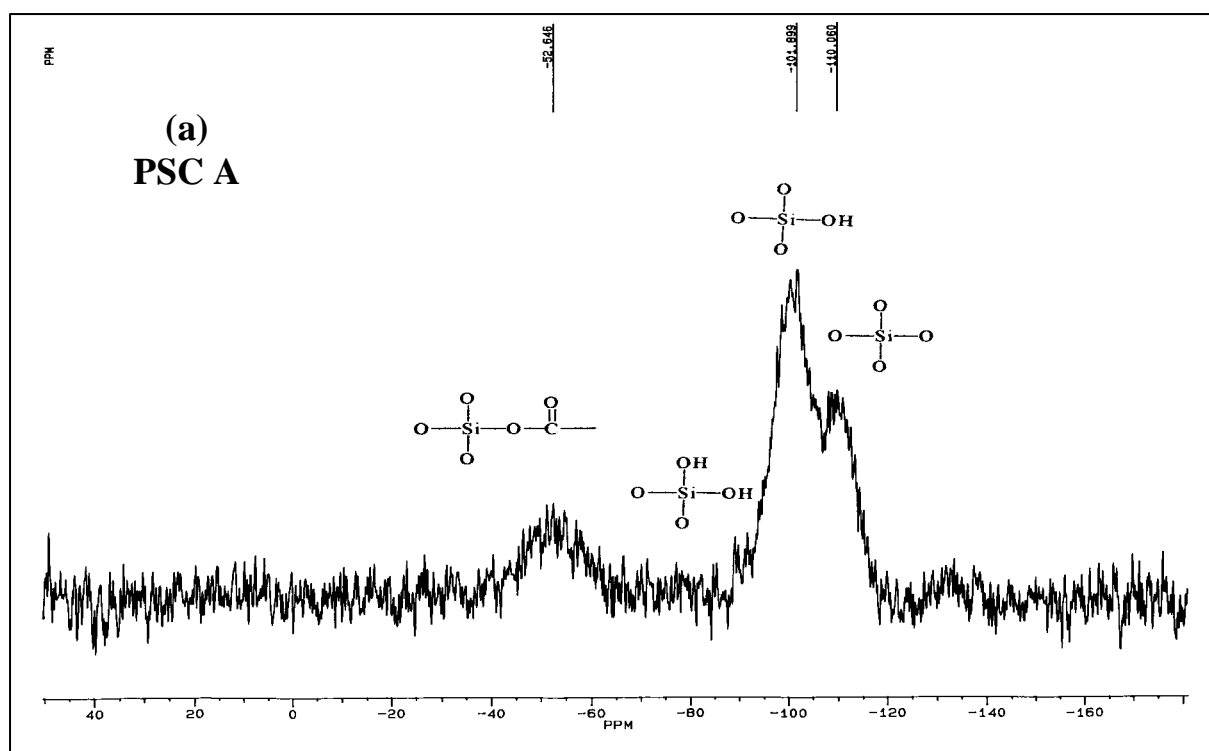


Figure 8 : Spectres RMN du ^{29}Si à l'état solide des 2 PSCs A et B

D'autre part, nous remarquons l'apparition d'une bande à -52.6 ppm sur le spectre (a) qui pourrait être attribuée au groupement $\begin{matrix} \text{Si-O} \\ | \\ \text{Si-O-Si-C} \\ | \\ \text{O-Et} \end{matrix}$. Par ailleurs, il a été reporté que les liaisons Si-O-Si-C obtenues par une réaction de silanisation sont plus stables que les liaisons Si-O-C vis à vis des phases mobiles agressives.³⁵

La figure 9 représente les spectres RMN du ^{13}C obtenus pour les trois phases stationnaires chirales A, B et C. En comparant les spectres obtenus à celui de la β -CD non substituée et à ceux donnés par la littérature^{23,28,36} nous avons pu indexer chaque signal comme suit:

PSC A : δ = 97.46 ppm (C_1 de la β -CD); 71.84 (C_2 , C_3 et C_5 de la β -CD); 81.66 (C_4 de la β -CD); 58.62 (C_6 de la β -CD); 16.37 (CH_2 -Si); 119.54-136.8 (Ar); 154.16 (HN-COO).

PSC B : δ = 101.71 ppm (C_1 de la β -CD); 72.84 (C_2 , C_3 et C_5 de la β -CD); 82.2 (C_4 de la β -CD); 59.51 (C_6 de la β -CD); 15.67 (CH_2 -Si); 118.41-138.20 (Ar); 153.95 (HN-COO).

PSC C : δ = 98.55 (C_1 de la β -CD); 71.42 ppm (C_2 , C_3 et C_5 de la β -CD); 82.2 (C_4 de la β -CD); 65.47 (C_6 de la β -CD); 112.93-138.03 (Ar); 153.95 (HN-COO) ; -0.89 (CH_3 -Si)

Ainsi, les spectres obtenus par RMN du ^{13}C nous ont permis de confirmer le greffage de la cyclodextrine dérivée sur la surface de la silice. En plus de la première étape de modification de la surface de la silice, un second traitement est souvent indiqué pour minimiser la polarité de la surface de la silice grâce à ses groupements OH. Ce traitement à l'hexamethyldisilazane (HMDS) appelé souvent "end-capping" introduit un nouveau signal sur le spectre RMN de la phase stationnaire qui a subi cette dérivation. En effet ce signal très intense à -0.89 ppm est dû au groupement $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, ce qui rend l'interprétation du spectre très ardue (Fig.8c). Ce signal n'apparaît pas sur les deux spectres a et b puisque les deux phases correspondantes n'ont pas subi cette modification.

[35] G. Schomburg, A. Deege, J. Köhler, U.B. Vogelsang, *J. Chromatogr.*, 1983, **282**, 27

[36] D. Rong, V. T. D' Souza, *Tetrahedron Lett.*, 1990, **31 (30)**, 4275.

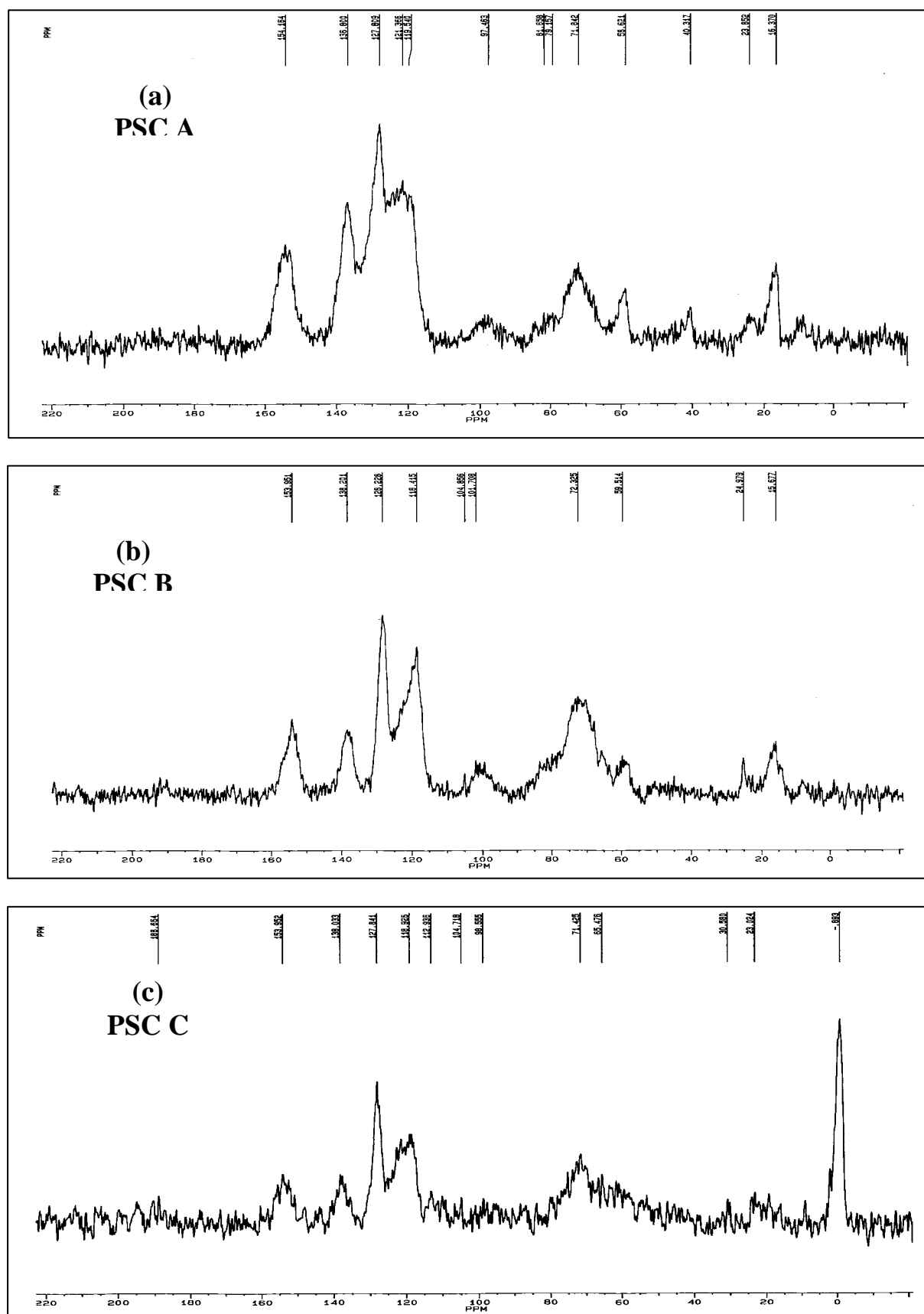


Figure 9 : Spectres RMN du ^{13}C à l'état solide des 3 PSCs A, B et C

III-5 Partie expérimentale :

III-5-1 Synthèse des phases stationnaires chirales A et B :

0.75 ml (2.5 mmole) du spacer (3-isocyanatopropyltriéthoxysilane) sont ajoutés à une solution de β -cyclodextrine (2.85 g, 2.5 mmole) dans la pyridine anhydre (35 ml). Le mélange est laissé à 80° C pendant 6 heures sous un courant d'azote. Un excès de phénylisocyanate (3.75 ml, 35.6 mmole) est ajouté au mélange à la même température, la réaction se poursuit pendant 5 heures afin de transformer les OH secondaires libres en groupements phenyl carbamate. Dans la troisième étape, le mélange obtenu est ajouté au gel de silice préalablement séché (3 g, 180° C, 4 h), l'ensemble est laissé à reflux pendant 24 heures. La silice modifiée ainsi obtenue est finalement filtrée et lavée abondamment avec un excès de pyridine, acétone, méthanol, eau, THF et le dichlorométhane puis finalement séchée sous vide.

Nous avons préparé par cette méthode les deux phases stationnaires chirales A et B en liant respectivement la β -CD et la 2-hydroxypropyl- β -CD à la surface de la silice (Fig.4).

III-5-2 Synthèse de la phase stationnaire C:

1.65 g de β -CD (1.45 mmol) sont mis en suspension dans du toluène dans un ballon équipé d'une colonne Dean-Stark afin d'éliminer azéotropiquement l'eau absorbée. Après l'élimination complète de l'eau, le toluène est également éliminé sous pression réduite. Le résidu sec est dissous dans 75 ml de pyridine et 1.5 mmol du 3-isocyanatopropyltriéthoxysilane sont ajoutés à la solution. Le mélange est laissé sous reflux pendant 2 heures. Par la suite, 47.1 mmol de phényl isocyanate sont ajoutés et la solution est laissée toute la nuit à la température du reflux. A ce moment, un prélèvement du mélange réactionnel (25 ml) est traité dans le but de caractériser le sélecteur chiral. Enfin, 3 g de gel de silice (Nucléosil, 100-5) préalablement séchés sont ajoutés et la suspension est chauffée à reflux pendant 2 heures.

Par la suite, 0.3 ml d'hexaméthylsilazane (HMDS) est additionné et la réaction est maintenue sous la température du reflux pendant 2 autres heures. Le solide obtenu est lavé avec la pyridine, l'éthanol, l'eau, acétone et le diéther et finalement séché sous vide à

température ambiante. La phase stationnaire ainsi obtenue est caractérisée par analyse élémentaire.

L'échantillon contenant le sélecteur chiral est versé dans un mélange méthanol / eau et le solide obtenu est filtré et lavé à l'éthanol chaud. La caractérisation de la β -CD dérivée a été effectuée par analyse élémentaire et par RMN du proton.

III-5-3 Synthèse des phases stationnaires chirales D, E et F :*

III-5-3-a Préparation de la silice allylique:

Une bouillie de 5 g de gel de silice sphérique (Kromasil, 100-5) dans 125 ml de toluène est placée dans un ballon tricol, équipé d'un thermomètre, une entrée de gaz et d'une colonne Dean-Stark. Le mélange est porté à reflux pendant 2 heures. Après élimination complète de l'eau, la colonne est remplacée par une tête de distillation et 25 ml de toluène sont distillés. Une solution de 7 ml de l'allyltriéthoxysilane dans 25 ml de toluène distillé précédemment est ajoutée à la bouillie sous atmosphère d'argon. La solution est laissée pendant 5 heures sous reflux. La suspension est laissée revenir à température ambiante et 4 ml d'hexaméthylsilazane sont ajoutés. Le mélange réactionnel est mis sous reflux pendant deux autres heures. La bouillie est ensuite filtrée et le solide obtenu est lavé successivement avec: toluène, acétone, éthanol, eau, éthanol absolu et finalement l'acétone. Le produit obtenu est séché sous vide et caractérisé par analyse élémentaire. Les résultats obtenus sont : %C: 3.055; % H: 1.107.

III-5-3-b Préparation des dérivés de la cyclodextrine:

Les sélecteurs chiraux et les phases stationnaires chirales sont préparés comme indiqué sur la figure 5. Les dérivés de la β -CD sont préparés de la manière suivante: 0.5 g (0.44 mmole) de la β -CD en suspension dans la pyridine sont traités avec 0.38 ml (1.77 mmole) de chlorure d'undecenoyl et de phenylisocyanate approprié (3.6 mole/mole d'unité de glucose) . Le mélange est laissé réagir à 100°C pendant 20 h. Les produits résultants précipitent dans l'eau. Ils sont filtrés et à nouveau dissous dans le chloroforme. Après évaporation du solvant, le produit est récupéré et lavé au méthanol et à l'éthanol. Les dérivés sont caractérisés par RMN du ^1H .

*Publication en phase de soumission

III-5-3-c Préparation des phases stationnaires chirales D, E et F

Les cyclodextrines dérivées sont fixées sur la silice allylique par une réaction de greffage radicalaire par le biais de la double liaison C=C sur le groupe 10-undecenoyl. La cyclodextrine dérivée est d'abord déposée sur le gel de silice allylique (30 % en poids). Après évaporation du solvant, le matériau solide est laissé pendant 2 heures à 100° C en présence de 10 % en poids d'AIBN (α, α' -azobisisobutyronitrile) afin de poursuivre la réaction. Les phases stationnaires ainsi obtenues sont mises en suspension dans du chloroforme et laissées à reflux pendant 2 heures. Après cela la suspension obtenue est filtrée et le solide est lavé avec du chloroforme et de l'acétone.

IV-I INTRODUCTION:

La chromatographie en phase liquide a connu ces dernières années un essor considérable par suite de l'apparition de supports de très fine granulométrie (diamètre des particules inférieur à 10 μm). Leurs utilisations conduisant à des hauteurs équivalentes à un plateau théorique (HEPT) très faible (N élevé), permettent dès lors la réussite de séparation chromatographique sur des colonnes relativement courtes alliant ainsi efficacité et vitesse d'analyse. Cependant, l'élaboration de ces colonnes est très délicate et nécessite des remplissages par voie humide sous haute pression. Cette méthode, plus délicate à mettre en œuvre que la méthode par voie sèche (la même technique utilisée en CPG), consiste à préparer une suspension de phase stationnaire aussi stable que possible, de manière à éviter toute sédimentation ou ségrégation, dans un liquide ou un mélange de liquides convenable, puis à injecter sous pression cette suspension dans la colonne chromatographique. Cependant chaque laboratoire a sa propre « recette » de mise en suspension du support. Les trois méthodes de remplissage les plus connues¹ ainsi que leurs avantages et / ou leurs inconvénients sont citées ci-dessous.

IV-I-1 Stabilisation chimique :

J.J. Kirkland² a montré que la silice demeurait en suspension dans une solution aqueuse d'ammoniaque 10^{-3} M. Les particules de silice semblent, dans ce milieu, se charger électriquement ce qui a pour effet d'éviter leur agglomération et une décantation trop rapide. La silice est ensuite déshydratée par lavage de la colonne avec du méthanol puis équilibrée par passage de différents solvants de force éluante décroissante.

Cette technique est principalement utilisée avec les supports poreux sphériques de répartition granulométrique serrée.

IV-I-2 Stabilisation physique :

Pour éviter la sédimentation et la floculation trop rapide des particules pendant le remplissage, des solvants ont été utilisés à travers les techniques d'isodensité,^{1,3,4} de viscosité⁵

[1] R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, *Manuel Pratique de Chromatographie en Phase Liquide*, Masson, 2^{ème} édition, 1982.

[2] J.J. Kirkland, *J. Chromatogr. Sci.*, 1972, **10**, 593

[3] J.J. Kirkland, *J. Chromatogr. Sci.*, 1971, **9**, 206

[4] R. E. Majors, *Anal. Chem.*, 1972, **44**, 1722

[5] J. Asshauer, I. Halasz, *J. Chromatogr. Sci.*, 1974, **12**, 139

et la technique de la bouillie diluée.⁶⁻¹⁰

IV-I-2-a Technique d'isodensité :

Elle consiste à utiliser un mélange de solvants de densité égale à celle des particules. Dans le cas de la silice, qui a été le support le plus étudié, de très nombreux mélanges de solvants ont été utilisés parmi lesquels on peut citer :

- 1) Tétrabromoéthane (d=2,96) 60.6 % en poids ;
Tétrachloroéthylène (d= 1.63) 39.4 % en poids.
- 2) Tétrabromoéthane (d=2,96) ;
Dioxane (d= 1.03) ;
Tétrachlorure de carbone (d=1.59).
- 3) Iodure de méthyle (d= 2.28) ;
Tétrachlorure de carbone (d=1.59).

La densité de ces mélanges est ajustée de façon à éviter la décantation du support. Cette technique donne de très bons résultats aussi bien avec la silice vierge qu'avec la silice greffée. Toutefois il est nécessaire, d'une part de purifier certains de ces solvants, avant leur utilisation et, d'autre part, d'activer la silice contenue dans la colonne une fois le remplissage effectué. Cette opération est longue et demande des quantités importantes de solvants variés.^{4,11,12}

IV-I-2-b Technique de viscosité :

Asshauer et al.⁵ ont montré que des liquides dont la viscosité est comprise entre 40 et 60 cP à température ordinaire (huile de paraffine, cyclohexanol, etc.) permettent de maintenir en suspension des particules de silice de 10 µm. Cette technique qui permet d'utiliser des solvants de polarité très variée, présente l'inconvénient d'entraîner des durées de remplissage plus longues que celles des autres techniques (une à plusieurs heures) dues à la lenteur du débit et à la pression élevée qui est due à la viscosité des solvants.

[6] B. Coq, C. Gonnet, J. L. Rocca, *J. Chromatogr.*, 1975, **106**, 249

[7] J. M. Bather, R. A. C. Gray, *J. Chromatogr.*, 1976, **122**, 159

[8] H. R. Linder, H. P. Keller, R. W. Frei, *J. Chromatogr. Sci.*, 1976, **14**, 234

[9] J. J. Kirkland, P. E. Antle, *J. Chromatogr. Sci.*, 1977, **15**, 137

[10] M. Broquaire, *J. Chromatogr.*, 1979, **170**, 43

[11] W. Strubert, *Chromatographia*, 1973, **6**, 50

[12] J. H. Knox, A. Pryde, *J. Chromatogr.*, 1975, **112**, 171

IV-I-2-c Technique de la bouillie diluée :

Elle consiste à utiliser un solvant identique à celui qui sera utilisé pour la séparation chromatographique ultérieure, ou solvants très peu polaires.^{6,13,14} Ce type de solvants peut paraître surprenant dans la mesure où il ne paraît pas tenir compte de la stabilité de la suspension, mais il répond à un souci majeur de l'analyste. En effet, une fois la colonne remplie, il faut équilibrer cette dernière avec la phase mobile qui sera utilisée et cette opération peut présenter des difficultés considérables et exiger le passage sur la colonne d'un volume très important de phase mobile si les polarités respectives du solvant de remplissage et de ses impuretés et de la phase mobile ont été mal choisies, c'est à dire si la phase mobile est moins polaire que le liquide de remplissage et ses impuretés éventuelles. Il suffit alors d'opérer suffisamment rapidement pour que la sédimentation des particules soit réduite au minimum.

Ce procédé donne de très bons résultats à la condition que la suspension de remplissage ait une consistance optimale qui dépend à la fois des caractéristiques de la silice et de celles du solvant.^{10,14,15}

IV-I-3 Stabilisation mécanique :

Cette technique consiste à agiter mécaniquement les particules dans un mélange de solvants pour les maintenir en suspension durant l'opération de remplissage. Elle a l'avantage de permettre le remplissage rapide et aisé de trois colonnes simultanément.⁸

IV-I-4 Dispositif de remplissage:

Lorsque la taille des particules est inférieure à 10 µm, la plupart des auteurs s'accordent à reconnaître que la méthode de remplissage par voie humide donne les meilleurs résultats. Même s'il existe comme nous venons de le voir de nombreuses façons de mettre en suspension le support, la technique de remplissage est toujours la même. La suspension de remplissage est introduite sous haute pression dans la colonne chromatographique. Plusieurs auteurs.^{1,6,14,16} ont discuté du design de l'appareil de remplissage et des conditions optimales sous lesquelles il doit être utilisé pour donner des colonnes efficaces.

[13] M. Caude, L. Phan, B. Terlain, J. P. Thomas, *J. Chromatogr. Sci.*, 1975, **13**, 390

[14] D. Bar, M. Caude, R. Rosset, *Analisis*, 1976, **4(3)**, 108

[15] P. A. Bristow, P. N. Brittain, C. M. Riley, B. F. Williamson, *J. Chromatogr.*, 1977, **131**, 57

[16] E. J. Kikta, Jr., *J. Liq. Chromatogr.*, 1979, **2(1)**, 129

La figure 1 représente un schéma général du montage utilisé pour remplir des colonnes chromatographiques :

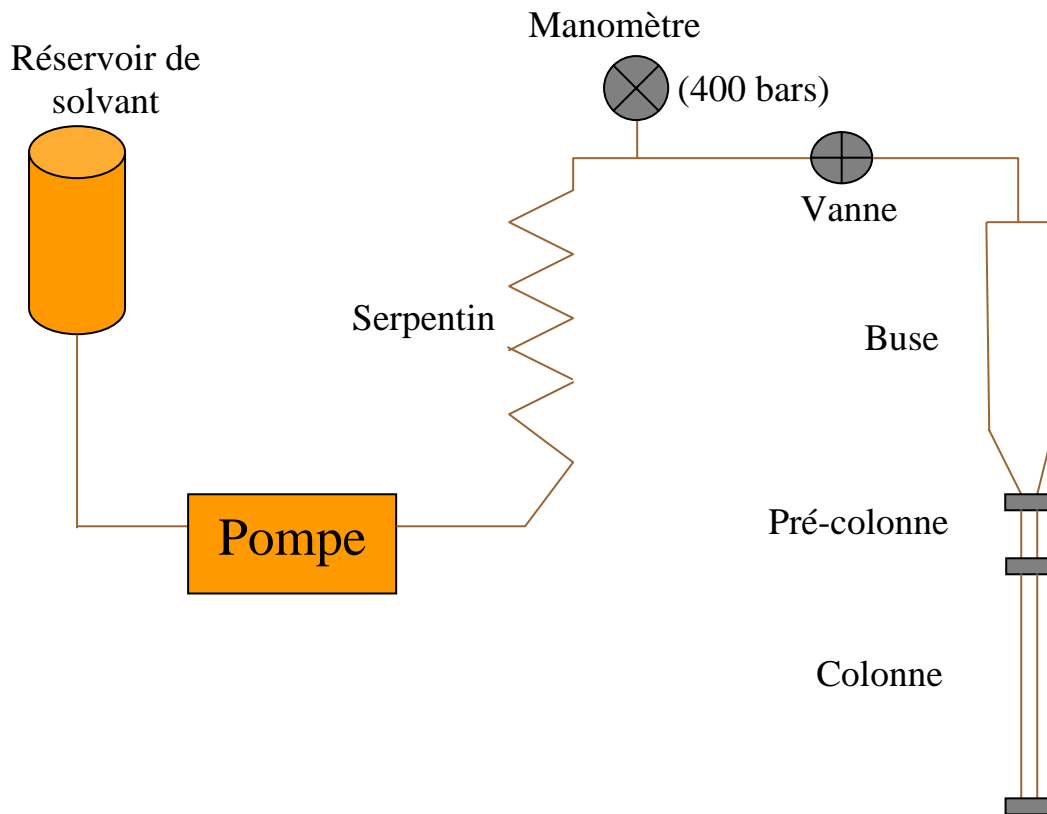


Figure 1: Montage de remplissage de colonnes HPLC par voie humide

Cette méthode consiste à mettre les particules en suspension dans un liquide adéquat, à verser cette suspension dans le réservoir de remplissage (buse) intercalée entre la pompe et la colonne analytique, et à appliquer brusquement, au moyen de la vanne une pression importante pour pousser la suspension dans la colonne, le bas de la colonne doit être bouché par un fritté pour retenir les particules. Quant à la pompe, elle doit être capable de fournir de grands débits (plus d'un litre/heure) sous une pression élevée (200-600 bars) suivant les supports. Les pompes pneumatiques sont les plus utilisées.

Le serpentín (un tube en acier) placé entre la pompe et la vanne d'arrêt haute pression doit être plein du liquide de déplacement, agit comme un réservoir de pression lors de l'ouverture du circuit, et permet ainsi un meilleur tassement du lit chromatographique.

Quant au réservoir de remplissage, il peut être cylindrique ou cylindroconique, et son volume doit représenter au moins 3 fois celui de la colonne à remplir.

L'utilisation de ce type d'appareil a permis d'atteindre une haute efficacité de façon reproductible avec des supports de fine granulométrie. Un nombre de plateaux théoriques de l'ordre de 60 000 /m a été obtenu pour les supports de silice de 5 μm de type LiChrosorb Si 60 et Partisil et de 30 000 plateaux pour les supports en alumine type LiChrosorb Alox T et Spherisorb A5Y.⁶

D'autre part, l'utilisation d'un volume de liquide compressé entre la pompe et la colonne à remplir apporte une plus grande sécurité dans la réussite et la reproductibilité du remplissage, d'autant plus que la réserve de liquide est plus importante. L'étude des paramètres géométriques de la colonne (longueur et diamètre interne) a été abordée également. Une décroissance de l'efficacité est apparue à partir de longueurs inférieures à 15 cm et le diamètre interne de 4.6 mm a donné le meilleur résultat. La validité de cette méthode a été éprouvée par comparaison avec celle classique d'isodensité.⁶

Ainsi, en raison de la finesse de ces phases stationnaires (5 μm), la préparation des colonnes chromatographiques est délicate et nombreux d'utilisateurs de la chromatographie liquide, en l'absence d'un mode opératoire précis et rebutés par le pourcentage d'échec important qu'ils observent lorsqu'ils essayent de remplir leurs colonnes eux même, se résignent à acheter des colonnes prêtes à l'emploi. Or ces colonnes sont très onéreuses et cela limite le développement de la chromatographie liquide. Si l'on veut disposer de phases stationnaires variées il est pratiquement indispensable de remplir ses propres colonnes.

Dans le cadre de notre travail, nous avons effectué le remplissage des colonnes au laboratoire. En effet, afin de tester les phases stationnaires chirales synthétisées dans le chapitre précédent, nous les avons remplies dans des tubes en acier inoxydable de différentes dimensions et ceci en utilisant 2 méthodes de remplissage :

IV-II METHODES DE REMPLISSAGE*

IV-II-1 Remplissage par stabilisation mécanique

L'appareil utilisé pour cette technique de remplissage est représenté sur la figure 2.

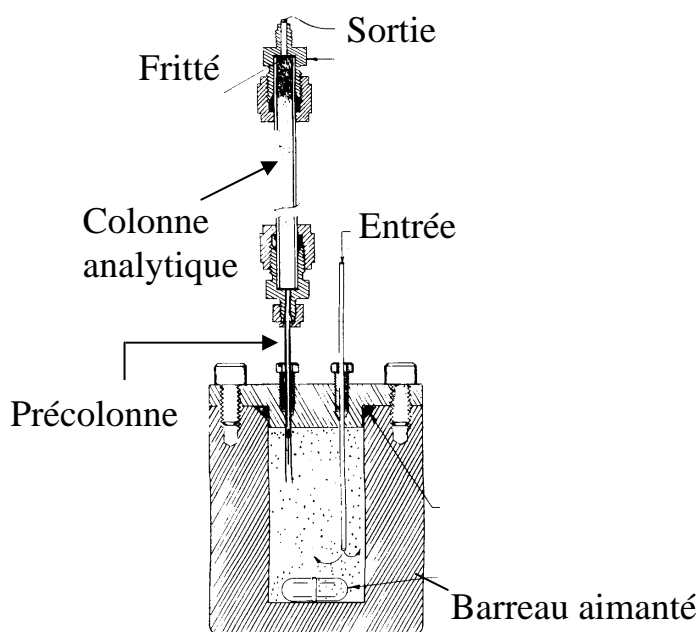


Figure 2 : Appareil de remplissage par stabilisation mécanique

Cette technique consiste à mettre la phase stationnaire dans un solvant adéquat (dépend de la phase mobile utilisée ultérieurement en CLHP), de verser la suspension dans le réservoir de remplissage. Ce dernier doit être déposé sur un agitateur magnétique afin que le remplissage s'effectue d'une manière homogène. La suspension est alors introduite dans la colonne par palier, en envoyant le solvant dans le réservoir grâce à la pompe du chromatographe. Lorsqu'il n'y a plus de solvant à la sortie de la colonne, ce qui veut dire que l'ensemble « pré-colonne-colonne » est remplie, on stoppe le débit du solvant et on ouvre avec précaution le cylindre. On débranche la colonne et on la place directement sur le chromatographe. Par la suite, on équilibre la colonne remplie en faisant passer les solvants adéquats en tenant bien compte de la miscibilité de ces derniers. Pour évaluer l'efficacité de la colonne, nous avons effectué trois injections du même soluté dans les mêmes conditions et le nombre de plateaux

* Cf. Annexe B pour le type d'appareillage utilisé

théoriques (N) calculé par la relation (1) est égal à la moyenne des 3 valeurs correspondantes aux 3 injections (Tableau I).

$$N = 5.54 (t_R/\delta)^2 \quad (1)$$

où t_R = temps de rétention du soluté
 δ = largeur du pic à mi-hauteur

IV-II-2 Remplissage par suspension diluée

Le montage utilisé pour cette technique est le même représenté sur la figure 1. Le principe de remplissage ne diffère pas de celui de la méthode précédente sauf que la phase stationnaire est poussée dans la colonne analytique sans être soumise à une agitation et ceci au moyen d'une pompe pneumatique qui assure la propulsion du solvant à un fort débit. La durée du remplissage dépend surtout de la dimension de la colonne et bien sûr de la nature du matériau : 10-15 mn de remplissage pour une colonne de 150, 4.6 mm D.I et de 1 à 3 heures pour une colonne de 250, 2.1 mm D.I.

L'efficacité des six colonnes remplies a été évaluée (Tableau I) après les avoir équilibrées avec de le 2-propanol et de l'heptane.

Tableau I : Caractéristiques des colonnes remplies

Colonne	N	dimensions	soluté	conditions
A	66 993	(150, 4.6 mm) ^a	pulégone	Méthanol/ H ₂ O : 40/60
B	1687	(250, 2.1 mm) ^b	carvone	CH ₃ CN/ H ₂ O : 15/85
C	3744	(150, 4.6 mm) ^b	TTB ^c	100 % heptane
C'	1400	(250, 2.1 mm) ^b	TTB ^c	100 % heptane
D	4124	(150, 4.6 mm) ^b	TTB ^c	100 % heptane
E	5825	(150, 4.6 mm) ^b	TTB ^c	100 % heptane
F	4648	(150, 4.6 mm) ^b	TTB ^c	100 % heptane

^a : remplissage par stabilisation mécanique

^b : remplissage par suspension diluée

^c : Tri-tertiobutyl-benzène

IV-III PARTIE EXPERIMENTALE:

IV-III-1 Méthode 1 :

3 g de phase stationnaire sont mises en suspension dans un bécher contenant 25 ml de solvant (50 % méthanol-50 % 2-propanol). Le bécher est soumis aux ultrasons pendant quelques secondes, et la suspension est ensuite directement versée dans l'appareil de remplissage muni d'un barreau aimanté. On rassemble les deux parties de l'appareil (réservoir + couvercle). On fixe l'ensemble pré-colonne-colonne verticalement sur le réservoir contenant la suspension homogénéisée grâce à l'agitation magnétique. Il est préférable d'effectuer le remplissage en envoyant un fort débit de solvant (isooctane) durant le remplissage. Ce dernier est récupéré à la sortie de la colonne (il peut être réutilisé après distillation). Lorsqu'il n'y a plus de solvant à la sortie, ce qui signifie que la pré-colonne est tassée de phase stationnaire, on arrête alors l'arrivée du solvant et on stoppe la pompe. Le cylindre est encore sous pression. Après plusieurs minutes, on ouvre soigneusement le réservoir. Le matériau restant dans le cylindre doit être très dilué. On débranche la colonne du petit tube (pré-colonne) et on place un fritté sur la partie inférieure de la colonne. Pour récupérer la phase piégée dans la pré-colonne, on remet le cylindre sous pression et on envoie une quantité de solvant nécessaire pour déplacer la phase vers la sortie du tube. Cette opération doit être effectuée d'une manière très rapide avant que la phase ne sèche dans le tube. Après cette opération, on range l'appareil après l'avoir bien nettoyé. La colonne ainsi remplie est équilibrée par le passage de l'isopropanol et ensuite du méthanol.

IV-III-2 Méthode 2 :

3 g de phase stationnaire (pour une colonne de 150, 4.6 mm D.I.) ou 1.5 g (150, 2.1 mm D.I.), sont placés dans un bécher contenant 25 ml de méthanol. Le bécher est soumis aux ultrasons pendant quelques secondes. On verse rapidement la suspension dans le réservoir connecté à la colonne analytique, et on complète au besoin avec du liquide de déplacement (isooctane) jusqu'au ras du raccord supérieur. On connecte le réservoir à la vanne en évitant d'emprisonner de l'air, et on enlève le bouchon en bas de colonne, en faisant augmenter la pression au moyen de la pompe jusqu'à atteindre 450 bars. La vanne est brusquement ouverte pour laisser couler le solvant environ 10 mn (dépend de la phase stationnaire et de la dimension de la colonne). On arrête la pompe et on laisse dépressuriser le système. La colonne est débranchée du réservoir et un fritté est placé en haut de la colonne.

V-I INTRODUCTION:

La séparation des énantiomères par la chromatographie en phase gazeuse et la chromatographie en phase supercritique (SFC) est limitée par rapport à la chromatographie en phase liquide. En effet, les deux premières techniques nécessitent souvent des températures élevées qui peuvent provoquer la racémisation ou la décomposition du soluté chiral alors que la CLHP ne souffre pas de ce problème. Depuis les deux dernières décennies, la séparation énantiomérique par la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) suscite un intérêt croissant en raison aussi bien du nombre considérable de travaux publiés que des applications diverses mises en oeuvre. Durant cette période, un grand nombre de phases stationnaires chirales (nouvelles ou améliorées) ont été développées et plusieurs d'entre elles sont actuellement commercialisées.¹⁻⁴ Ces phases stationnaires chirales sont caractérisées par la présence de plusieurs groupements fonctionnels et de centres d'asymétrie leur permettant d'avoir des interactions différentes avec un couple d'énantiomères donné.

Le mécanisme fondamental de la reconnaissance chirale est la "règle des trois points" qui est largement admise.^{3,5} Selon cette règle, pour qu'il y ait énantioséparation, trois interactions au moins doivent avoir lieu entre le sélecteur chiral et l'un des énantiomères du racémique à séparer. L'une de ces interactions au moins doit dépendre de la stéréochimie du centre asymétrique du sélecteur chiral et de celle de l'énantiomère. Les interactions mises en jeu lors du processus de séparation sont généralement de type $\pi-\pi$, dipole-dipole et celles dues aux liaisons hydrogène.

Plusieurs choix de sélecteurs chiraux pour les phases stationnaires et les additifs de phases mobiles sont disponibles pour la chromatographie sur couche mince (CCM), la CLHP et l'électrophorèse capillaire (EC). Les deux dernières techniques offrent des colonnes à haute efficacité permettant une meilleure reproductibilité en comparaison à la CCM. D'énormes progrès ont été effectués pour la séparation des énantiomères par EC malgré le temps de développement relativement court. Cependant, cette technique ne peut être substituée à la CLHP particulièrement à l'échelle préparative. Pour ces raisons la CLHP est actuellement

[1] D.W. Armstrong, A.M. Stalcup, M.L. Hilton, J.D. Duncan, J.R. Faulkner, S.C. Chang, *Anal. Chem.*, 1990, **62**, 1610.

[2] D.W. Armstrong, C.D. Chang, S.H. Lee, *J. Chromatogr. A*, 1991, **539**, 83.

[3] C. Cachau, A. Thienpont, M.H. Soulard, G. Felix, *Chromatographia*, 1997, **44**, 411.

[4] S. Li, W.C. Purdy, *J. Chromatogr.*, 1992, **625**, 109.

[5] C.E. Dalgliesh, *J. Chem. Soc.*, 1952, **137**, 3940.

L'une des techniques les plus utilisées pour la séparation des énantiomères.⁶

Ainsi, dans notre travail, nous avons testé nos phases stationnaires chirales à base de cyclodextrine par CLHP aussi bien en mode de polarité de phases inversée qu'en mode de phase normale et ceci en étudiant la séparation de plusieurs familles de produits optiquement actifs.

Généralement, avec ce type de phases stationnaires chirales, la phase mobile utilisée en mode de phases inversée est l'eau mélangée avec un modifiant organique (méthanol, acétonitrile, acétate d'éthyle, éthanol, etc). La sélectivité, la résolution et les temps de rétention dépendent de plusieurs facteurs à savoir: le type et la quantité du solvant organique, le tampon, le débit, la température, le pH ainsi que le choix de la cyclodextrine. Les solvants organiques les plus utilisés sont le méthanol et l'acétonitrile. Il est à remarquer que la sélectivité de ces deux solvants est souvent différente et il est difficile de prévoir lequel donnerait de meilleurs résultats. Les conditions de phases inversée sont favorables tant que la formation du complexe d'inclusion avec la phase stationnaire est favorisée par la présence d'eau généralement à fortes proportions. L'addition de tampons ou de sels qui augmentent la force ionique de l'eau peut améliorer l'efficacité de ces séparations. Dans plusieurs cas, plus la concentration du tampon augmente plus la rétention diminue et le pic devient plus fin. En outre, il y a lieu de respecter un équilibre entre la concentration du tampon et la quantité du solvant organique afin de tenir compte de la limite de solubilité du tampon dans le solvant organique.^{6,7}

La température de la colonne s'avère être un facteur important pour la séparation de nombreux énantiomères. En effet, des temps de rétention plus longs avec une meilleure résolution peuvent être obtenus à faible température.⁸⁻¹⁰

Il existe plusieurs conditions pour la séparation chirale en mode inverse. La formation d'un complexe d'inclusion est nécessaire mais pas suffisante pour la reconnaissance chirale. La

[6] S.M. Han, *Biomed. Chromatogr.*, 1997, **11**, 259.

[7] K. Fujimura, S. Suzuki, K. Hayashi, S. Masuda, *Anal. Chem.*, 1990, **62**, 2198.

[8] K.G. Feitsma, J. Bosman, B.F.H. Drenth, R.A. De Reeuw, *J. Chromatogr.*, 1985, **333**, 59.

[9] A. Bielejewska, R. Nowakowski, K. Duszcyk, D. Sybilska, *J. Chromatogr. A*, 1999, **840**, 159.

[10] F. Bressole, M. Audran, T.N. Pham, J.J. Vallon, *J. Chromatogr. B*, 1996, **687**, 303.

molécule "invitée" (guest) doit avoir une taille et une structure convenables pour pouvoir pénétrer dans la cavité de la cyclodextrine, ce qui est le cas par exemple avec un noyau aromatique.

Cependant, il n'est pas nécessaire que la molécule "invitée" pénètre entièrement dans la cavité de la CD, car il suffit qu'une portion de cette molécule se complexe avec la CD. Il est également essentiel que les substituants sur le centre chiral de la molécule invitée soient proches pour pouvoir interagir avec les OH résiduels de la CD et/ou les groupements fonctionnels situés sur les deux ouvertures de la cyclodextrine. Il est à noter que l'interaction peut être aussi bien répulsive ou attractive, cependant, les meilleures séparations sont celles dues aux liaisons hydrogène.¹¹⁻¹³

Les PSCs à base de cyclodextrine dérivée ou non sont largement utilisées en mode inverse. Celles à base de CD dérivée conduisent à des temps de rétention et une résolution significativement différents comparées à celles à base de CD non dérivée (ex: les PSCs à base de CD perméthylée/ CD non dérivée).¹⁴

Bien que plusieurs séparations achirales ont été effectuées en mode normal avec des phases stationnaires à base de β -CD non dérivée,¹⁵⁻¹⁷ la séparation des énantiomères en mode normal n'a été reportée que récemment.¹ Comme nous l'avons mentionné précédemment, vu le caractère hydrophobe de la cavité de la cyclodextrine, la possibilité de former un complexe d'inclusion avec le soluté en mode de phase normal est négligeable car c'est le solvant apolaire qui a le plus tendance à occuper la cavité hydrophobe de la cyclodextrine.^{6,12,13} En l'absence du phénomène d'inclusion, la sélectivité énantiomérique n'est souvent pas observée. Pour palier à ce problème, différentes variétés de substituants ont été fixées aux groupements

[11] L. Coventry, Chp. 8, in : *Chiral Liquid Chromatography*, édité par W.J. Lough, BLACKIE & Son Ltd, 1989.

[12] R.A. Menges, D.W. Armstrong, Chp. 4 in: *Chiral Separation by Liquid Chromatography*, édité par Satinder Ahuja, 1990.

[13] T.J. Ward, D.W. Armstrong, Chp.5 in: *Chromatographic Chiral Separation*, édité par M. Zief, L.J. Crane, 1988.

[14] I. Ciucanu, *J. Chromatogr. A*, 1996, **727**, 195.

[15] C.A. Chang, Q. Wu, L. Tan, *J. Chromatogr.*, 1986, **361**, 199.

[16] C.A. Chang, Q. Wu, D.W. Armstrong, *J. Chromatogr.*, 1986, **354**, 454.

[17] H.G. Issaq, J.H. Mc Connell, D.E. Weiss, D.G. Williams, J.E. Saavedra, *J. Liq. Chromatogr.*, 1986, 9(8), 1783.

hydroxyles de la cyclodextrine. Ainsi le soluté pourra être plus ou moins retenu selon sa structure et sa taille grâce aux différents types d'interactions (π - π , dipole-dipole, liaisons hydrogène) qui peuvent intervenir entre l'énantiomère et la cyclodextrine dérivée.¹⁸

Concernant notre travail, nous avons testé nos PSCs à base de CD dérivée en CLHP. Nous avons étudié l'effet de la température sur l'une des phases synthétisées. Ainsi, les phases A et B ont été utilisées en mode inverse alors que les phases C, D, E et F, ont été testées en mode normal. La PSC A a été testée en injectant les isomères de position des dérivés du benzène disubstitués, quelques terpènes ainsi que des produits aromatiques. Quant à la phase B, vu la faible quantité de phase obtenue nous l'avons utilisée pour garnir une colonne de type « narrowbore » et nous l'avons testée en injectant quelques terpènes racémiques en mode de phase inverse également. La phase C (colonne standard) et C' (colonne narrowbore) et les phases D, E et F ont été testées en injectant différentes familles de produits optiquement actifs parmi lesquels des pesticides et des produits pharmaceutiques et ceci en mode normal uniquement.

V-II RESULTATS ET DISCUSSION:

V-II-1 Séparation d'isomères benzéniques disubstitués sur la PSC A en mode inverse:

Les tableaux I et II regroupent les valeurs des facteurs de rétention (k') des isomères de position *ortho*, *méta* et *para* des deux séries nitrophénol et chloroaniline. Le solvant organique utilisé est soit le méthanol soit l'acétonitrile. On remarque pour les deux séries que les k' augmentent lorsque la quantité du solvant organique diminue. L'ordre d'élution obtenu pour la série des nitrophénols est le même lorsqu'on passe du méthanol à l'acétonitrile à savoir *méta*, *para* et *ortho* (Fig. 1 a et b). Ceci signifie que le complexe d'inclusion formé par l'isomère *ortho* avec la CD est le plus stable.¹⁹ Le résultat observé en chromatographie sur couche

[18] A.M. Stalcup, Cyclodextrin Bonded Chiral Stationary Phases in Enantiomer Separation, edited by G. Subramanian, *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*, VCH, Germany, Ch. 5, 1994.

[19] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, Communication au 2^{ème} *Symposium National sur la Chimie Organique Industrielle et Pharmaceutique*, 03-06 / 05 /1996, Biskra.

Tableau I: Effet de la composition du méthanol sur la rétention des isomères de position des deux séries nitrophénol et chloroaniline sur la PSC A

% MeOH	<i>(k')</i> nitrophénol*			<i>(k')</i> chloroaniline*		
	<i>ortho</i>	<i>méta</i>	<i>para</i>	<i>ortho</i>	<i>méta</i>	<i>para</i>
60	0.85	0.38	0.43	0.33	0.47	0.39
50	0.96	0.53	0.57	0.52	0.70	0.72
40	1.94	0.91	1.28	0.69	1.06	1.45
30	4.20	2.74	2.89	2.28	3.36	3.02
25	-	-	-	3.35	5.00	4.77

* Phase mobile: CH₃OH/H₂O; Débit du solvant= 0.6 ml/mn; Détection UV (λ = 254 nm)

Tableau II: Effet de la composition de l'acétonitrile sur la rétention des isomères de position des deux séries nitrophénol et chloroaniline sur la PSC A

% CH ₃ CN	<i>(k')</i> nitrophénol*			<i>(k')</i> chloroaniline*		
	<i>ortho</i>	<i>méta</i>	<i>para</i>	<i>ortho</i>	<i>méta</i>	<i>para</i>
60	-0.29	-0.33	-0.33	-0.12	-0.29	-0.28
50	0.05	-0.04	-0.04	0.04	0.04	0.05
40	0.36	0.18	0.15	0.34	0.33	0.32
30	1.02	0.69	0.69	0.98	0.99	0.87
20	2.51	1.78	1.75	2.23	2.42	2.08
10	6.90	4.92	5.06	-	-	-

* Phase mobile: CH₃CN/H₂O; Débit du solvant= 0.6 ml/mn; Détection UV (λ = 254 nm)

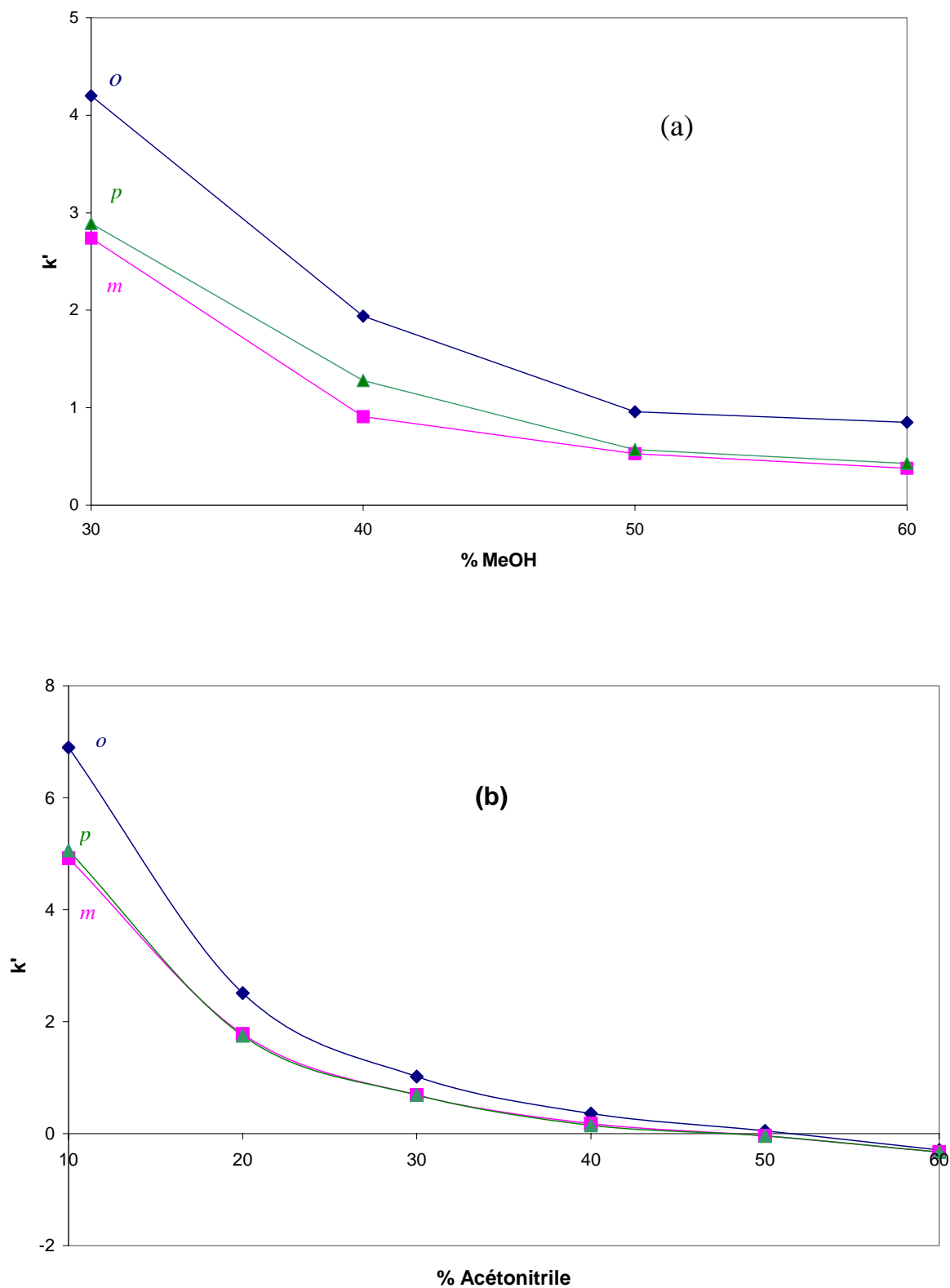


Figure 1: Effet du solvant sur la rétention des isomères de position de la série nitrophénol (a) méthanol (b) acétonitrile

mince chirale à base de β -CD¹³ correspond à l'ordre de rétention croissant dans le sens: *para*, *ortho* et *méta*, alors que sur les PSCs à base de CD non dérivée telles que Cyclobond²⁰ et β -CD/Si-PEI²¹ utilisées en CLHP, l'ordre d'élution des 3 isomères injectés dans les mêmes conditions est totalement différent (*m*, *o* et *p*). Sur une colonne C₁₈ par contre, l'ordre obtenu n'est pas très différent (*p*, *m* et *o*) sauf que la résolution est nettement meilleure sur les colonnes chirales.²¹

Concernant la série des chloroanilines, la meilleure séparation est également obtenue en utilisant le méthanol comme solvant organique. Cependant, une inversion dans l'ordre d'élution des deux isomères *méta* et *para* a été observée entre 30 et 40 % en MeOH (Fig. 2a). Ceci peut être expliqué par les valeurs très proches des pKa des trois isomères (*o*:2.65; *m*:3.46; *p*:4.15). Ce résultat est mieux observé sur la figure 2b où les trois isomères ne sont presque pas résolus.

Dans ce cas la rétention est probablement basée essentiellement sur les interactions acido-basiques entre les isomères et les groupements carbamates situés sur les ouvertures de la β -CD,²¹ alors que dans le cas du MeOH la discrimination des isomères est liée essentiellement à la formation du complexe d'inclusion entre chaque isomère et la β -CD d'où la résolution appréciable des isomères.

Il est à noter que pour une composition de phase mobile pauvre en méthanol, la valeur élevée de *k'* explique la largeur des pics obtenus. Lorsqu'on utilise l'acétonitrile à la place du méthanol les temps de rétention sont plus faibles ce qui indique que la formation des complexes d'inclusion avec la β -CD est défavorisée. Ceci est probablement dû au fait que le MeOH présente simultanément des propriétés donneur et accepteur de liaison hydrogène et il déstabilise moins la structure de l'eau par rapport à l'acétonitrile qui lui est un accepteur de liaison hydrogène uniquement.²²

[20] D.W. Armstrong, W. De Mond, A. Alak, W.L. Hinz, T.E.Riehl, K.H. Bui, *Anal. Chem.*, 1985, **57**, 234.

[21] G. Crini, Y. Leckchini, M. Morcellet, *Chromatographia*, 1995, **40 (5/6)**, 296.

[22] K. Fujimura, T. Ueda, M. Kitagawa, H. Takayanagi, T. Ando, *Anal. Chem.*, 1986, **58**, 2668.

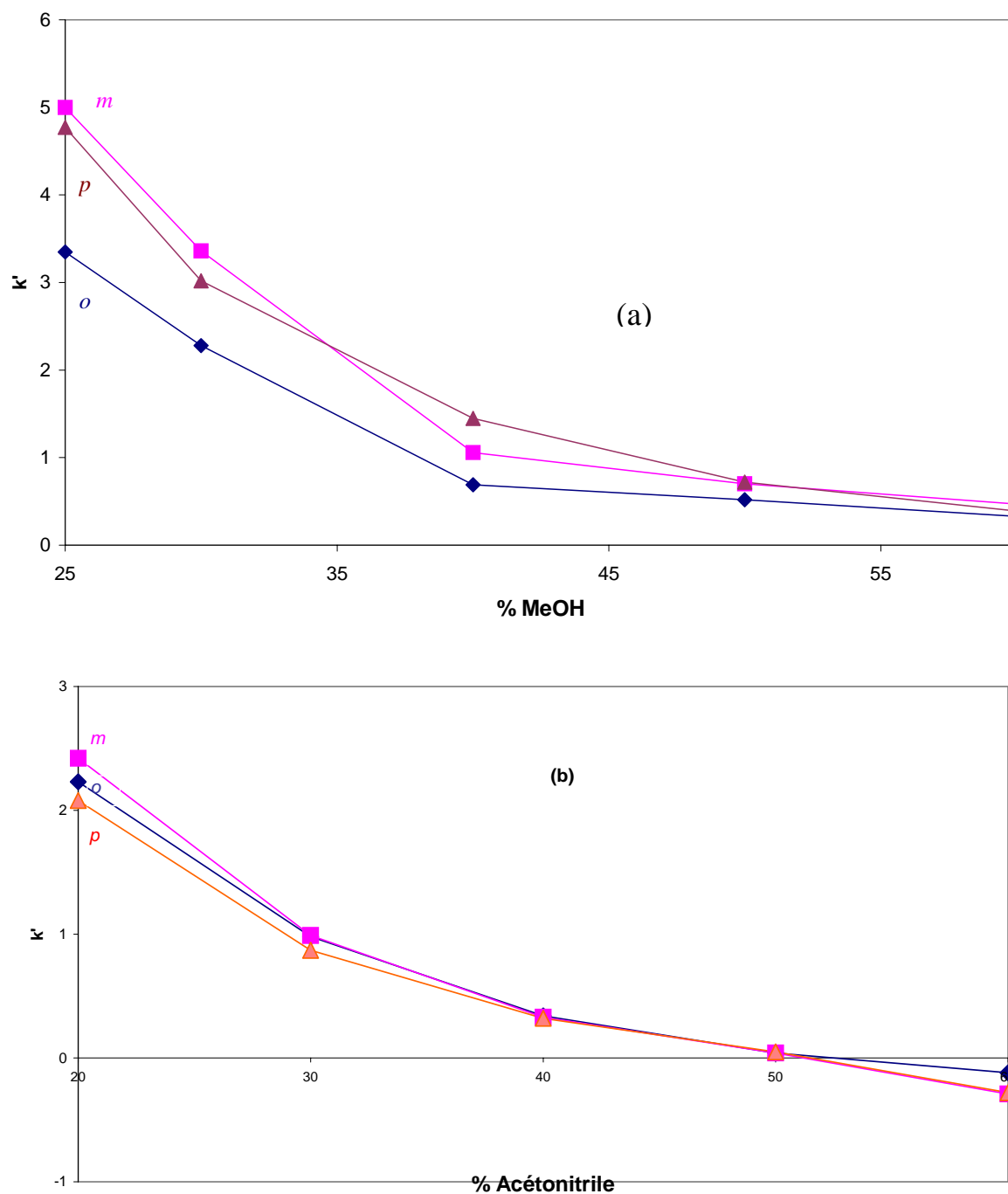


Figure 2: Effet du solvant sur la rétention des isomères de position de la série chloroalinine a (méthanol) b (acétonitrile)

V-II-2 Séparation des terpènes et de quelques produits aromatiques optiquement actifs en mode inverse sur les deux PSCs A et B:

Plusieurs terpènes optiquement actifs ont fait l'objet d'une étude de la rétention sur cette même phase: limonène, α -pinène, β -pinène, acétate de menthyle, acétate de néomenthyle, menthol, α -terpinéol, carvone, pulégone ainsi que deux solutés aromatiques: 1-(1-naphthyl)éthylamine et méthylbenzylamine et ceci en mode inverse. Malheureusement, mis à part trois couples racémiques (carvone, pulégone et naphthyléthylamine) tous les autres couples n'ont pas été séparés.

Plusieurs auteurs ont noté que la séparation des énantiomères peut être améliorée en ajustant le pH de la phase mobile par addition de solutions tampons.^{2,23} D'autre part, puisque la largeur des pics et les temps de rétention longs peuvent être réduits en augmentant la température de la colonne et comme la stabilité du complexe dépend de la température, nous avons étudié la rétention des deux solutés racémiques carvone et naphthylethylamine en fonction de la température dans le domaine 15-50°C (tableau III).

T° C	Carvone			Naphthyléthylamine		
	$k_{(+)}$	$k_{(-)}$	α	$k_{(R)}$	$k_{(S)}$	α
15	-	-	-	3.82	3.29	1.16
20	3.07	2.77	1.11	3.40	3.29	1.03
25	2.95	2.55	1.15	3.11	3.06	1.01
30	2.67	2.58	1.03	2.84	2.80	1.01
35	2.59	2.46	1.05	2.75	2.57	1.07
40	2.23	2.07	1.07	2.46	2.18	1.13
45	2.00	1.84	1.08	-	-	-
50	1.66	1.65	1.00	1.96	1.89	1.04

Phase mobile : MeOH/tampon phosphate (50 :50 (v/v)) ; Débit : 0.6 ml/mn ; $\lambda = 254$ nm

[23] J. Szeman, K. Ganzler, *J. Chromatogr. A*, 1994, **668**, 509.

Bien que de nombreux travaux ont porté sur l'application des cyclodextrines dans différents modes de chromatographie, peu de publications ont étudié l'influence de la température en CLHP et rares sont celles qui se sont intéressées à la discrimination chirale.^{9,24-28} Il est à signaler qu'à une température supérieure à 50°C, la phase stationnaire est susceptible de se décomposer, ce qui implique des précautions particulières.

Nous pouvons constater à partir des figures 3 et 4 une diminution importante et régulière du temps de rétention lorsque la température augmente. Ainsi, la température influe de façon très marquée sur le k' des énantiomères et par conséquent sur le facteur de sélectivité.^{29,30} Ceci signifie que la stabilité du complexe d'inclusion diminue nettement avec la température et explique la faible rétention ainsi que la faible résolution observée à 50°C. Ainsi, la meilleure résolution est obtenue entre 15 et 20°C pour le couple naphthyléthylamine et entre 20 et 25°C pour le couple de la carvone.

Le tableau IV regroupe les valeurs de k' des énantiomères de la carvone et de la pulégone séparés à différentes compositions de la phase mobile acétonitrile/eau obtenues sur une colonne narrowbore (250 x 2.1 mm) remplie avec la phase stationnaire chirale B. Les courbes correspondantes sont représentées sur les figures 5 et 6.

L'évolution du k' est similaire pour les deux cétones insaturées qui sont moins retenues lorsque la quantité d'acétonitrile dans la phase éluante augmente. La séparation des énantiomères a lieu pour une composition inférieure à 20 % pour la carvone et 40 % pour la pulégone. La meilleure résolution des énantiomères de la pulégone est obtenue à 10 % CH₃CN avec une différence de temps de rétention appréciable de 5 minutes.³⁰

[24] H. Lamparczyk, P.K. Zarzycki, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1995, **13**, 543.

[25] P.K. Zarzycki, M. Wierzbowska, H. Lamparczyk, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1996, **14**, 1305.

[26] P.K. Zarzycki, M. Wierzbowska, H. Lamparczyk, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1997, **15**, 1281.

[27] R.M. Mohseni, R.J. Hurtubise, *J. Chromatogr.*, 1991, **537**, 61.

[28] K. Cabrera, D. Lubda, *J. Chromatogr. A*, 1994, **666**, 433.

[29] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, Communication au Second Mediterranean Basin Conference on Analytical Chemistry, 23-28 / 11 / 1997, Rabat, Maroc.

[30] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, G. Dewinter, Montero, *Algerian Journal of Advanced Materials*, 1998, **1 (2)**, 69.

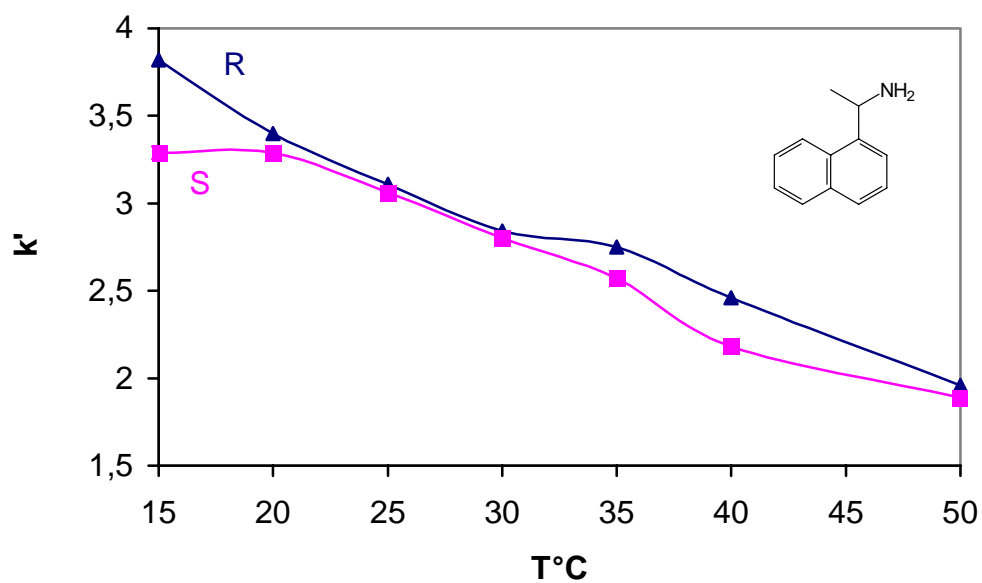


Figure 3: Effet de la température sur la séparation du couple d'énantiomères (R,S)-naphthylethylamine sur la PSC A

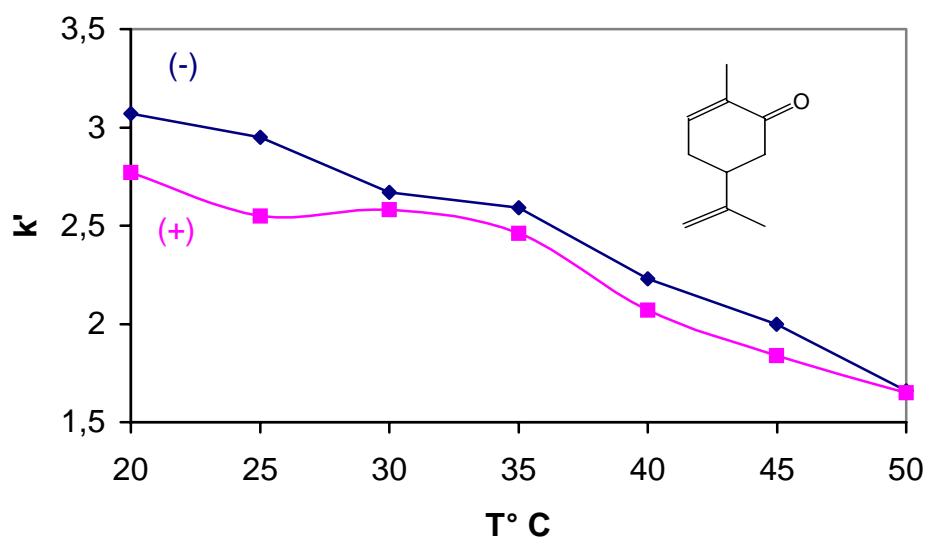


Figure 4: Effet de la température sur la séparation du couple d'énantiomères (+,-)-carvone sur la PSC A

Il est à signaler que d'après certains auteurs les terpènes sont mieux séparés sur des phases stationnaires à base de α -cyclodextrine⁶ dont la cavité a une dimension inférieure à celle de la β -CD et favoriserait ainsi la formation de complexe stable avec cette famille de produits.

Tableau IV: Effet de la composition de la phase mobile sur la sélectivité des énantiomères de la carvone et la pulégone sur la phase stationnaire chirale B						
% CH₃CN	Carvone			Pulégone		
	<i>k</i>₍₊₎	<i>k</i>₍₋₎	α	<i>k</i>₍₊₎	<i>k</i>₍₋₎	α
80	0.15	0.17	1.00	0.11	0.13	1.00
60	0.37	0.36	1.03	0.37	0.37	1.00
50	0.44	0.43	1.02	0.40	0.40	1.00
40	1.15	1.14	1.00	1.32	1.15	1.14
30	1.17	1.17	1.00	1.41	1.19	1.17
20	3.46	3.35	1.03	4.18	4.19	1.00
15	5.72	5.59	1.02	5.54	4.92	1.13
10	10.02	8.91	1.12	10.48	8.4	1.25

Phase mobile: CH₃CN/H₂O; Débit: 0.7 ml/mn; $\lambda = 254$ nm

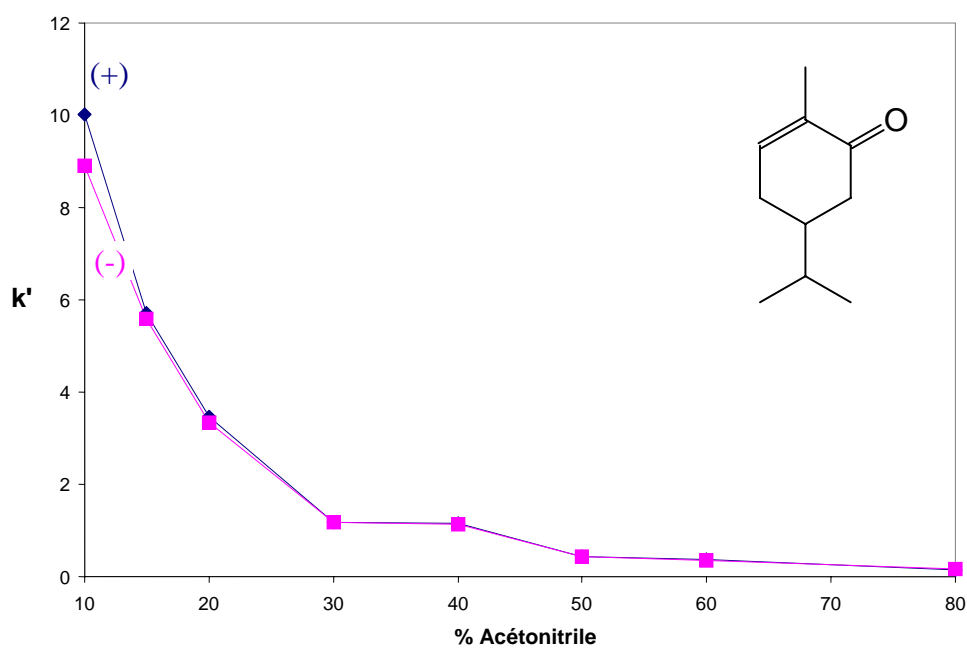


Figure 5 : Effet de la composition quantité d'acétonitrile dans la phase mobile sur le facteur de capacité des énantiomères de la (+,-)-carvone

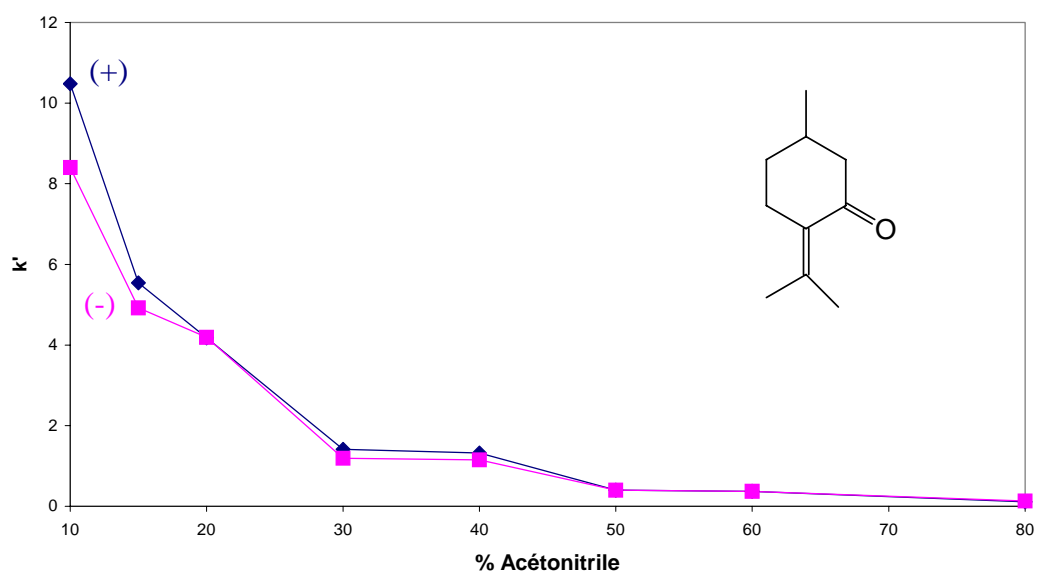


Figure 6 : Effet de la composition de la phase mobile sur le facteur de capacité des énantiomères de la (+,-)-pulegone

V-II-3 Séparation de produits optiquement actifs ainsi que de produits pharmaceutiques chiraux sur les PSCs C, D, E et F en mode normal:

Concernant les phases stationnaires chirales synthétisées C, D, E et F, elles ont été testées en mode de phase normal en utilisant aussi bien le mélange binaire heptane/2-propanol que le mélange heptane/chloroforme. Une quarantaine de solutés a été testée sur ces phases stationnaires chirales, parmi lesquels divers produits pharmaceutiques très utilisés tels que les benzodiazépines (lorazepam, oxazepam, temazepam, lormétazepam), les agents β -bloquants adrénergiques (propranolol, pindolol, métoprolol, tertatolol) et les anti-inflammatoires (ibuprofène, kétoprofène, naproxène). La figure 7 représente les structures des solutés racémiques testés sur les quatre phases stationnaires chirales C, D, E et F. Le tableau V regroupe les valeurs des facteurs de rétention k' et de sélectivité α obtenues à différentes compositions de phase mobile pour chaque soluté racémique.

Parmi les 32 solutés racémiques injectés sur la phase C, 22 couples d'énantiomères ont pu être séparés. Pour les 35 couples injectés sur les 3 autres phases, 8 ont été séparés sur la phase D, 12 sur la phase E et 8 sur la phase F. Il est à remarquer que les résultats obtenus avec les différentes PSCs montrent des propriétés énantiosélectives distinctes. En effet, la phase C se distingue des trois autres phases (D, E et F) lesquelles ne diffèrent entre elles que par la nature du substituant sur le noyau aromatique du dérivé de la β -CD (H sur la PSC D, CH_3 sur la PSC E, et Cl sur la PSC F) (Fig. 5, Chapitre 3). Dans la phase C, le spacer difonctionnel liant la cyclodextrine à la surface de la silice comporte une fonction carbamate, en plus de celles issues de la réaction de l'excès du phenyl isocyanate avec les groupements hydroxyles résiduels de la cyclodextrine. Alors que dans les autres phases D, E et F, le spacer difonctionnel utilisé présente une fonction ester en plus des autres fonctions carbamates fixées sur la cyclodextrine. D'autre part, la longueur de la chaîne du spacer est plus courte dans la phase C (3 atomes de carbone) que dans les phases D, E et F où la longueur de la chaîne comporte 13 atomes de carbone.

La question de l'effet de la longueur du spacer a fait l'objet d'une étude par certains auteurs.¹³ En effet, le greffage entre la silice et la cyclodextrine peut être effectué avec un réactif difonctionnel dont la chaîne alkyle est plus ou moins longue. Avec des chaînes courtes ne comportant que 3 atomes de carbone dans le silane, le greffage de la CD est plus difficile à accomplir à cause de sa taille relativement volumineuse.

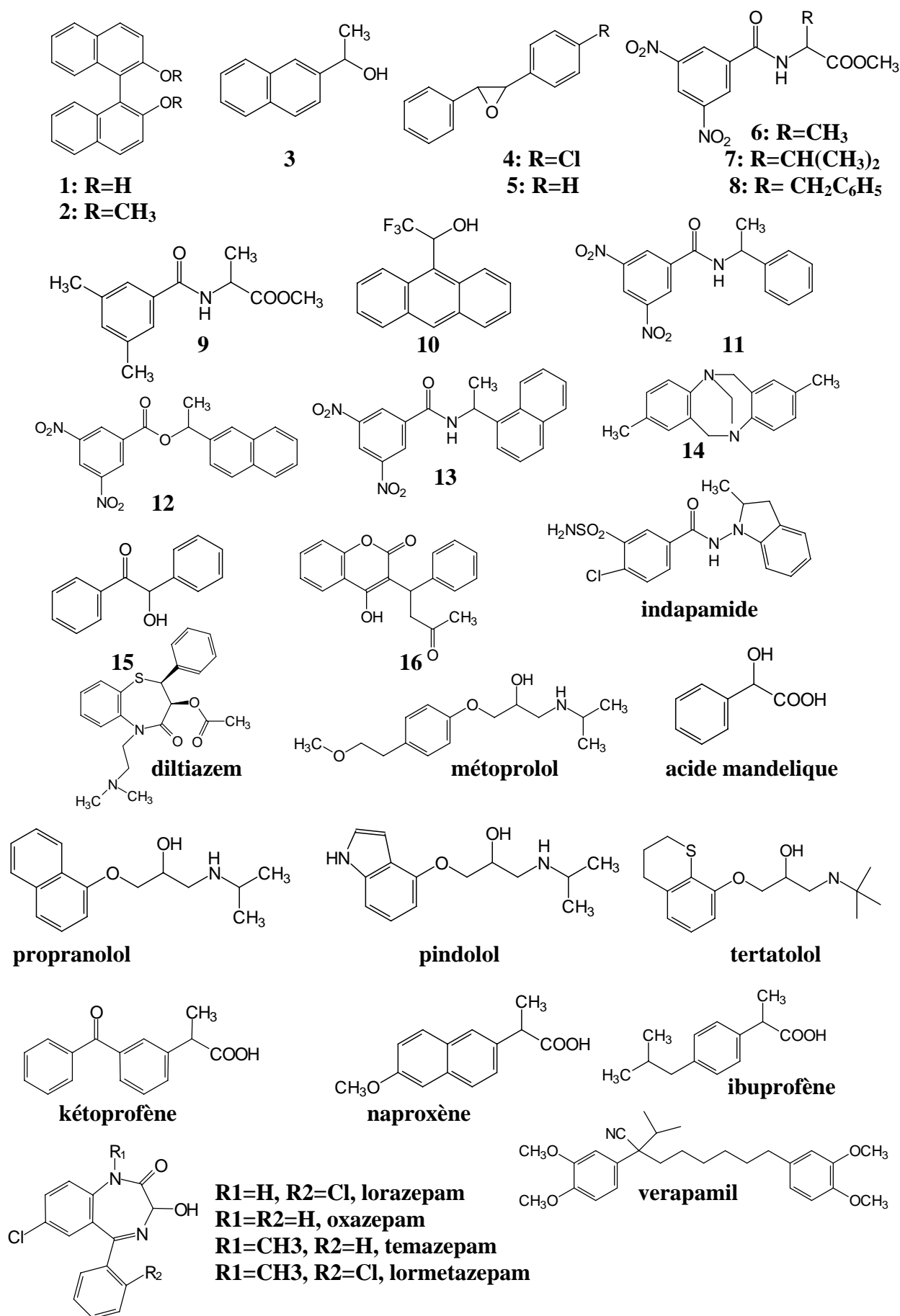


Figure 7 : Structures chimiques des solutés racémiques testés

Tableau V: Séparation des solutés racémiques et des produits pharmaceutiques optiquement actifs sur les 4 phases stationnaires chirales C, D, E et F en utilisant le mélange binaire heptane/2-propanol

Produit	Phase mobile	PSC C			PSC D			PSC E			PSC F		
	Hept/IPA	K'1	k'2	α	k'1	k'2	α	K'1	k'2	α	k'1	k'2	α
1^a	80/20	0,46	-	-	0,21	-	-	0,46	-	-	0,42	-	-
	90/10	0,81	0,88	1,08	0,36	-	-	0,39	-	-	0,31	-	-
	98/2	3,38	4,01	1,19	1,62	1,77	1,09	1,33	1,49	1,12	1,3	1,38	1,06
2^a	98/2	0,53	0,72	1,35	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3^a	80/20	0,35	-	-	0,19	-	-	0,47	-	-	0,41	-	-
	90/10	0,58	-	-	0,36	-	-	0,56	-	-	0,33	-	-
	98/2	2,08	2,16	1,04	1,72	-	-	1,64	-	-	1,38	-	-
4^a	80/20	0,19	0,31	1,62	0,11	-	-	0,13	0,18	1,38	0,08	-	-
	90/10	0,2	0,3	1,49	0,17	-	-	0,14	0,2	1,43	0,08	-	-
	98/2	0,25	0,35	1,39	0,17	-	-	0,15	0,18	1,23	0,19	-	-
5^a	80/20	0,2	-	-	0,1	-	-	0,10	-	-	0,09	-	-
	90/10	1,42	-	-	0,1	-	-	0,10	-	-	0,15	-	-
	98/2	0,17	-	-	0,11	-	-	0,35	-	-	0,15	-	-
6^a	80/20	1,89(d)	2,07	1,09	0,66(d)	0,79	1,20	2,53(d)	4,04	1,59	1,21 (d)	1,44	1,20
	90/10	4,05	4,24	1,05	1,41	1,75	1,24	2,66	4,69	1,76	2,76 (d)	3,12	1,13
	98/2	-	-	-	9,8	12,4	1,26	-	-	-	8,76 (d)	10,0	1,14
7^a	80/20	1,4	1,56	1,11	0,45	0,57	1,27	1,35	1,59	1,18	0,56	0,66	1,18
	90/10	2,73	-	-	0,82	1,1	1,34	1,28	2,00	1,57	0,82	0,98	1,20
	98/2	10,32	10,8	1,04	3,54	4,75	1,34	4,81	6,97	1,45	2,14	2,36	1,10
8^a	80/20	2,02(s)	2,74	1,35	0,83	-	-	3,28(s)	4,72	1,44	0,92	-	-
	90/10	4,01	6,49	1,62	1,77	-	-	3,87	5,46	1,41	4,18	-	-
	98/2	-	-	-	9,37(s)	12,3	1,31	12,94	22,2	1,71	4,59	-	-
9^a	80/20	0,84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	90/10	0,61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	98/2	5,37	5,73	1,07	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^a	90/10	1,54	1,75	1,13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11^a	80/20	1,28	1,5	1,17	0,56	-	-	1,88	2,73	1,45	1,10	1,43	1,30
	90/10	0,03	3,67	1,21	1,22	1,38	1,13	3,00	4,27	1,42	1,29	1,7	1,32
	98/2	19,74	24,9	1,26	8,48	11,3	1,33	12,15	19,9	1,63	4,10	5,45	1,33
12^a	80/20	0,68	0,75	1,09	-	-	-	0,51	-	-	0,24	-	-
	90/10	0,85	0,92	1,09	-	-	-	0,53	-	-	0,20	-	-
	98/2	1,43	1,56	1,09	0,49	-	-	0,74	0,78	1,06	0,33	-	-
13^a	80/20	1,24	1,5	1,21	0,46(s)	0,52	1,13	1,93	2,28	1,18	1,05	1,42	1,35
	90/10	2,82	3,34	1,18	1,03	1,18	1,14	2,33	2,75	1,18	0,65	0,88	1,36
	98/2	-	-	-	6,14	7,17	1,17	8,19	9,83	1,2	3,82	5,04	1,32

Tableau V: suite													
Produit	Phase mobile	PSC C			PSC D			PSC E			PSC F		
		K'1	k'2	α	k'1	K'2	α	K'1	k'2	α	k'1	k'2	α
14^a	80/20	0,94	1,09	1,16	0,93	-	-	1,64	-	-	1,41	-	-
	90/10	1,15	1,3	1,14	1,42	-	-	1,96	-	-	1,34	-	-
	98/2	2,63	-	-	3,93	-	-	3,42	-	-	3,45	-	-
15^a	80/20	0,53	-	-	0,27	-	-	0,48	-	-	0,43	-	-
	90/10	0,77	-	-	0,41	-	-	0,54	-	-	0,65	-	-
	98/2	1,61	-	-	0,99	-	-	0,91	-	-	0,89	-	-
16^a	80/20	0,93	-	-	0,75	-	-	1,49	-	-	3,87	-	-
	90/10	2,29	-	-	1,75	-	-	1,86	-	-	4,02	-	-
	98/2	1,85	-	-	9,04	-	-	7,14	-	-	13,27	-	-
Lorazepam^a	80/20	1,84	2,09	1,13	0,9	-	-	2,82	3,28	1,16	3,51	-	-
	90/10	4,45	5,22	1,17	2,2	-	-	4,47	6,24	1,39	4,26	-	-
	98/2	-	-	-	24,85	-	-	-	-	-	-	-	-
Lormetazepam^a	80/20	2,88	-	-	1,39	-	-	3,74	-	-	3,16	-	-
	90/10	5,92	-	-	2,81	-	-	4,89	-	-	2,55	-	-
Oxazepam^a	80/20	1,73	1,98	1,14	0,87	-	-	2,59	2,93	1,13	2,43	-	-
	90/10	4,13	4,97	1,2	2,14	-	-	4,15	4,88	1,17	4,00	-	-
Temazepam^a	80/20	2,91	3,19	1,09	1,38	-	-	3,53	-	-	3,11	-	-
	90/10	5,92	6,35	1,07	2,99	-	-	5,07	-	-	4,36	-	-
Acide Mandelique^b	98/2/0,5	6,44	6,95	1,08	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ibuprofène^b	98/2/0,5	0,67	-	-	0,2	-	-	0,11	0,17	1,57	0,24	0,32	1,34
Ketoprofène^b	98/2/0,5	2,76	-	-	0,77	-	-	1,62	-	-	0,29	0,36	1,26
Naproxène^b	98/2/0,5	1,81	-	-	0,09	0,17	1,97	0,28	0,64	2,29	0,47	0,58	1,24
Flurbi-profène^b	98/2/0,5	1,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indapamide^c	80/10/0,1	2,69	3,03	1,12	1,55	-	-	2,08	-	-	3,83	-	-
	90/10/0,1	10,28	12,3	1,19	8,08	8,89	1,1	7,39	-	-	17,48	-	-
Diltiazem^c	90/10/0,1	4,59	5,0	1,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metoprolol^c	80/20/0,1	2,54	3,23	1,27	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	90/10/0,1	5,98	7,43	1,24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Propranolol^c	80/20/0,1	1,73	1,82	1,05	1,74	-	-	2,04	-	-	1,60	-	-
	90/10/0,1	3,83	4,03	1,05	5,43	-	-	4,01	-	-	7,90	-	-
Pindolol^c	80/20/0,1	3,82	4,18	1,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	90/10/0,1	12,94	14,1	1,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tertatolol^c	90/10/0,1	4,34	-	-	3,4	-	-	4,25	-	-	7,67	-	-
Verapamil^c	90/10/0,1	3,88	-	-	4,21	-	-	3,44	-	-	5,48	-	-

^a: hept/IPA; 1 ml/mn, $\lambda=254$ nm; ^b: hept/IPA/TFA, 0,5 ml/mn, 210 nm; ^c: hept/IPA/DEA, 1 ml/mn, 230 nm
 hept: heptane; IPA: 2-propanol; TFA: acide trifluoroacétique; DEA: diéthylamine

Inversement, avec les chaînes longues comprenant 18 à 20 atomes de carbone, il y a un risque de perte de résolution durant le processus de séparation, car certains solutés auront tendance à s'associer plus avec le support qu'avec la cyclodextrine.

Dans notre cas les meilleurs résultats ont été obtenus sur la PSC C.³¹ Concernant la résolution des solutés sur les trois autres phases D, E et F, la phase E conduit à une meilleure énantioséparation des solutés testés, suivie de la PSC F et ensuite de la phase D. Cette constatation est mieux observée sur l'histogramme de la figure 8 représentant la sélectivité obtenue des solutés séparés sur l'une des 4 PSCs au moins. Ainsi, il apparaît que la présence d'un substituant sur le noyau aromatique du dérivé de la β -CD contribue à améliorer la résolution des solutés racémiques. En effet, la phase D présente une plus faible reconnaissance chirale par rapport aux phases E et F. D'un autre côté, la présence d'un groupement méthyle sur le noyau aromatique du dérivé de la β -CD, semble favoriser la reconnaissance chirale par rapport à la présence d'un groupement chlore (PSCs E et F). Une seule exception est observée pour le kétoprofène où les deux énantiomères sont résolus sur la phase F ($\alpha=1.26$) alors qu'aucune séparation n'est observée sur la phase E (tableau V). Cette même constatation a été formulée par certains auteurs,³² lesquels ont étudié en détail l'effet de la nature et de la position des substituants sur le noyau aromatique des dérivés phénylcarbammates de la cyclodextrine.

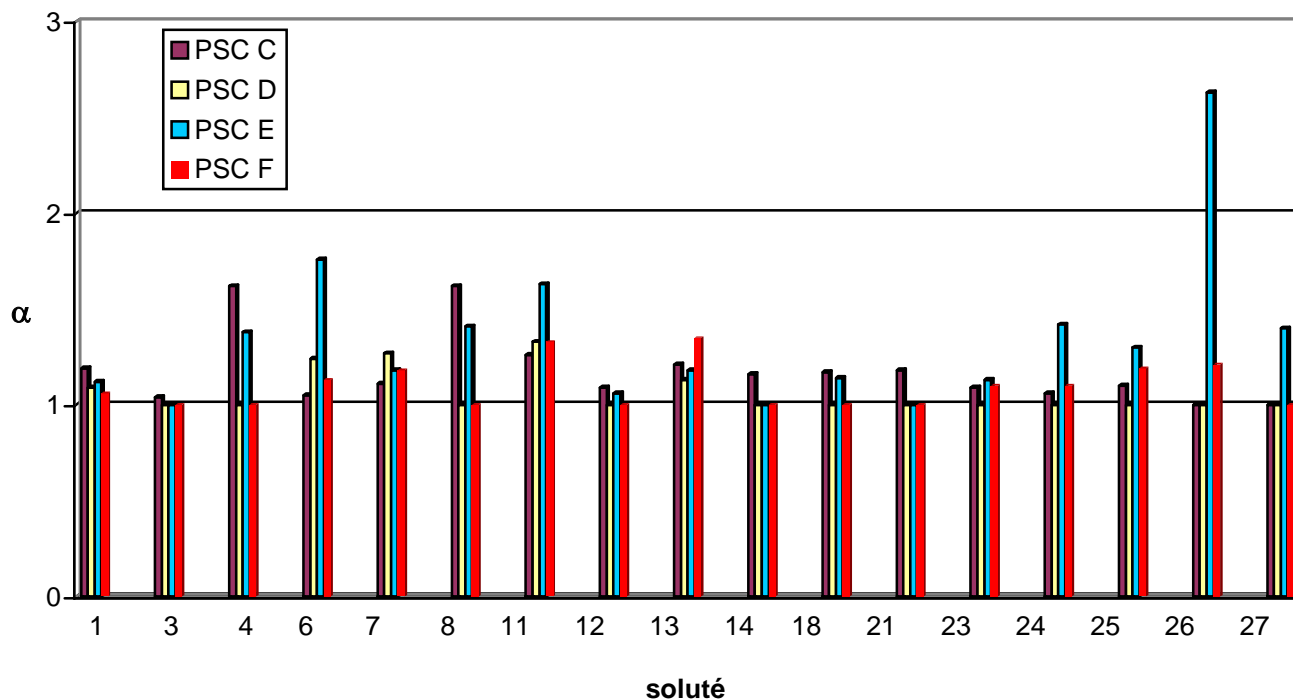
D'une manière générale, la comparaison des k' des solutés analysés montre que les solutés polaires sont les plus retenus. Les liaisons hydrogène semblent être les interactions les plus importantes mises en jeu dans le mécanisme de rétention.

Ainsi, pour les solutés **1-5** et **10** (Fig. 7) leur séparation est due d'une part à la mise en jeu de liaisons hydrogène entre le groupement carbamate localisé sur la phase stationnaire chirale et l'atome d'oxygène présent dans chaque structure. D'autre part, des interactions de type π - π et dipole-dipole entre le noyau aromatique du soluté et ceux de la phase stationnaire peuvent être également suggérées.

[31] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, F. Pilar, C. Minguillon, *Chirality*, **13**, 2001

[32] B. Chankvetadze, E. Yashima, Y. Okamoto, *Chirality*, 1996, **8**, 402.

Figure 8: Séparation des produits optiquement actifs sur les 4 phases stationnaires chirales avec le mélange binaire heptane/2-propanol



La comparaison des structures des solutés **6** et **9** montre que la présence aussi bien d'un groupement donneur d'électrons tel que le groupement méthyle ou un groupement attracteur d'électrons tel que le groupement nitro sur le noyau aromatique ne semble pas affecter la sélectivité sur la phase C.³¹ Avec les racémiques **11**, **12** et **13** les deux types d'interaction $\pi-\pi$ et liaisons hydrogène peuvent être envisagées. Cependant, la meilleure résolution est obtenue pour les solutés **11** et **13** (Fig. 9) ce qui met en relief l'importance de la fonction amide dans le mécanisme de la reconnaissance chirale.³

Les acides 2-aryl propioniques (ou profènes) appartiennent à la famille des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens. Depuis qu'il a été prouvé que les différents énantiomères des profènes ont des propriétés pharmacocinétiques différentes, l'intérêt de leur séparation

s'est accru.³³⁻⁴¹ Plusieurs énantiomères ainsi que leur métabolites profènes ont été séparés aussi bien à partir de leur formes dérivées^{37, 41} et non dérivées⁴² sur différents types de phases stationnaires.

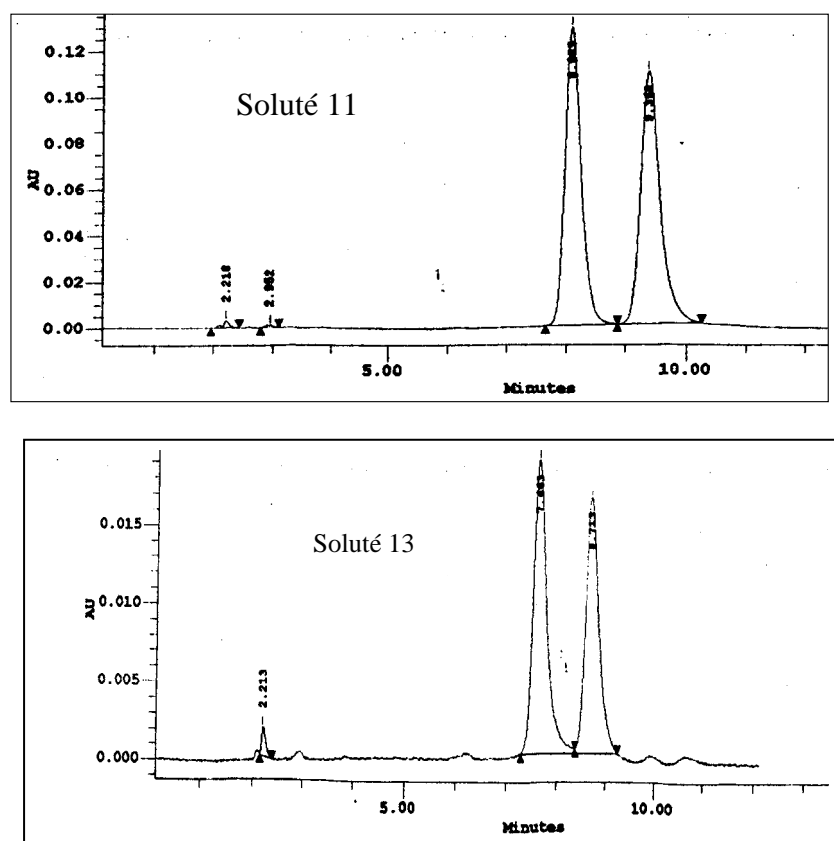


Figure 9: Séparation des énantiomères des soluté 11 (a) et 13 (b) sur la PSC C
Phase mobile: hept/IPA: 90/10 (v/v); 1 ml/mn; $\lambda_{254 \text{ nm}}$

- [33] D. Mc Daniel, B. Snider, *J. Chromatogr.*, 1987, **404**, 123.
- [34] I. Wainer, T. Doyle, *J. Chromatogr.*, 1984, **284**, 117.
- [35] H. Aboul-Enein, S. Bakr, *J. Liq. Chromatogr.*, 1992, **15**, 1983.
- [36] W. Pirkle, P. Murray, *J. Liq. Chromatogr.*, 1990, **13**, 2123.
- [37] W. Pirkle, J. Mc Cune, *J. Chromatogr.*, 1989, **471**, 271.
- [38] W. Pirkle, C. Welch, *J. Liq. Chromatogr.*, 1992, **15**, 1947.
- [39] J. Andersen, S. Hanses, *J. Chromatogr.*, 1992, **577**, 362.
- [40] J. Hermansson, M. Eriksson, *J. Liq. Chromatogr.*, 1986, **9**, 621.
- [41] C. Patterson, C. Gioeli, *J. Chromatogr.*, 1988, **43**, 225.
- [42] M.D. Beeson, G. Vigh, *J. Chromatogr.*, 1993, **634**, 197.

Parmi ces énantiométries, certaines connaissent d'ores et déjà des applications industrielles ou thérapeutiques intéressantes (obtention d'énantiomère actif optiquement pur sur colonne chromatographique préparative, contrôle pharmacocinétique de l'évolution de formes médicamenteuses chirales), alors que de nombreuses autres sont potentiellement prometteuses. Ceci explique l'intérêt sans cesse grandissant des grands groupes pharmaceutiques internationaux pour les techniques de séparation chirale sous toutes les formes.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à la séparation directe de 4 profènes largement utilisés en thérapeutique à savoir: ibuprofène, kétoprofène, flurbiprofène et naproxène sur les quatre phases stationnaires synthétisées (tableau V). Les meilleures séparations ont été obtenues sur la phase F avec des valeurs de facteur de sélectivité satisfaisantes, suivie de la phase E où la séparation de l'ibuprofène et le naproxène a été observée ensuite la phase D qui n'a pu séparer que le naproxène, alors qu'aucune séparation n'a été observée sur la phase C (Fig. 10). Cette différence de discrimination chirale est probablement due, d'une part, à l'effet du substituant sur le noyau aromatique du dérivé de la CD (PSCs E et F/D), et d'autre part à la longueur du spacer (PSCs D, E et F/C). D'un autre côté, lorsqu'on compare la séparation de cette série homologue à celle de l'acide mandélique sur la PSC C nous constatons que ce dernier est plus retenu et donc mieux séparé (même partiellement) que les 4 acides 2-aryl propioniques.^{31,43,44} En effet, le carbone asymétrique de l'acide mandélique est lié simultanément à un groupement hydroxyle et une fonction carbonyle, il peut être donc considéré comme donneur et accepteur d'hydrogènes alors que les 4 autres solutés ne possèdent que la fonction carbonyle.⁴⁵

L'indapamide a été séparé partiellement sur les phases C et D, avec le même mécanisme qui correspond à l'interaction entre la fonction amide et la partie carbamate de la phase stationnaire. La figure 11 représente les chromatogrammes obtenus lors de la séparation de l'ibuprofène et de l'indapamide sur les 2 phases stationnaires C et D.

[43] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, C. Minguillon, Communication au 5^{ème} Congrès de la Société Algérienne de Chimie, 11-13/05/1999, Béjaïa.

[44] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, C. Minguillon, Communication au 23rd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and related Techniques, 30 mai, 1-4/06/1999, Grenade, Espagne

[45] D.W. Armstrong, M. Hilton, L. Koffin, *LC-GC*, 1992, **9**, 647.

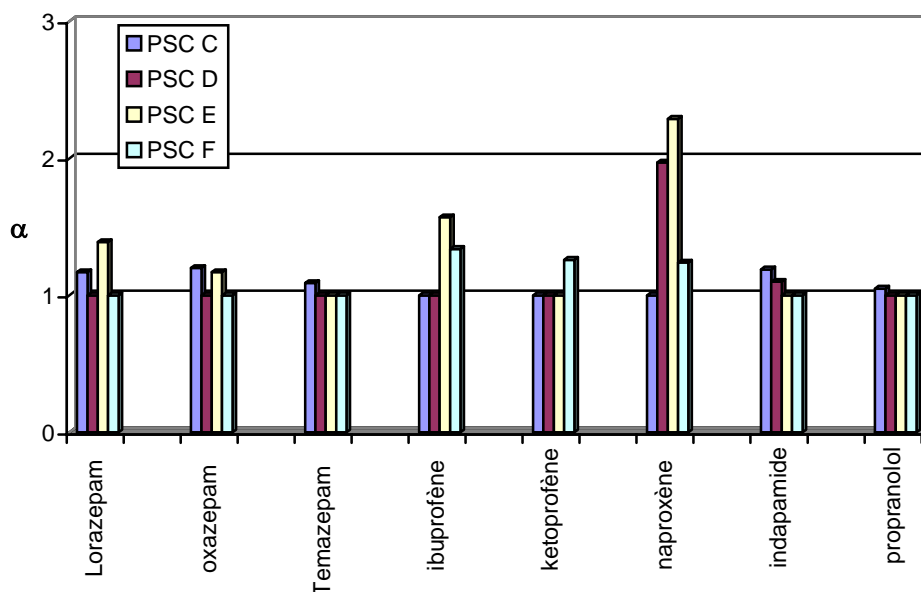


Figure 10 : Séparation des produits pharmaceutiques optiquement actifs sur les 4 PSCs

Nous avons étudié également dans ce travail l'énantiosélectivité de plusieurs aminoalcools β -bloquants adrénergiques. Il est connu que les β -bloquants ont plusieurs utilisations cliniques.⁴⁶ Nous avons reporté quelques unes d'entre elles sur le tableau VI. Comme nous pouvons le constater à partir de leur structure (Fig.7), les β -bloquants sont chiraux et leurs énantiomères ont des effets cliniques différents. Par exemple, l'un des isomères du propranolol qui est plus actif dans la régulation du rythme ventriculaire est beaucoup moins actif en tant que β -bloquant.⁴⁷ Quant au labétolol, l'un de ses isomères est un β -bloquant efficace alors que l'autre est considéré comme un α -bloquant. En raison de ces actions différentes de chaque énantiomère, l'intérêt de la séparation chirale des agents β -bloquants ne fait que croître.⁴⁸

[46] D.W. Armstrong, S. Chen, C. Chang, *J. Liq. Chromatogr.*, 1992, **15**, 545.

[47] F.H. Meyers, E. Jawetz, A. Goldfien, *Review of Medical Pharmacology*, 7th Ed. Lange Medical Publications, Los Altos, 1980, p 95-104.

[48] G. Félix, C. Cachau, A. Thienpont, M.H. Soulard, *Chromatographia*, 1996, **42**, 583.

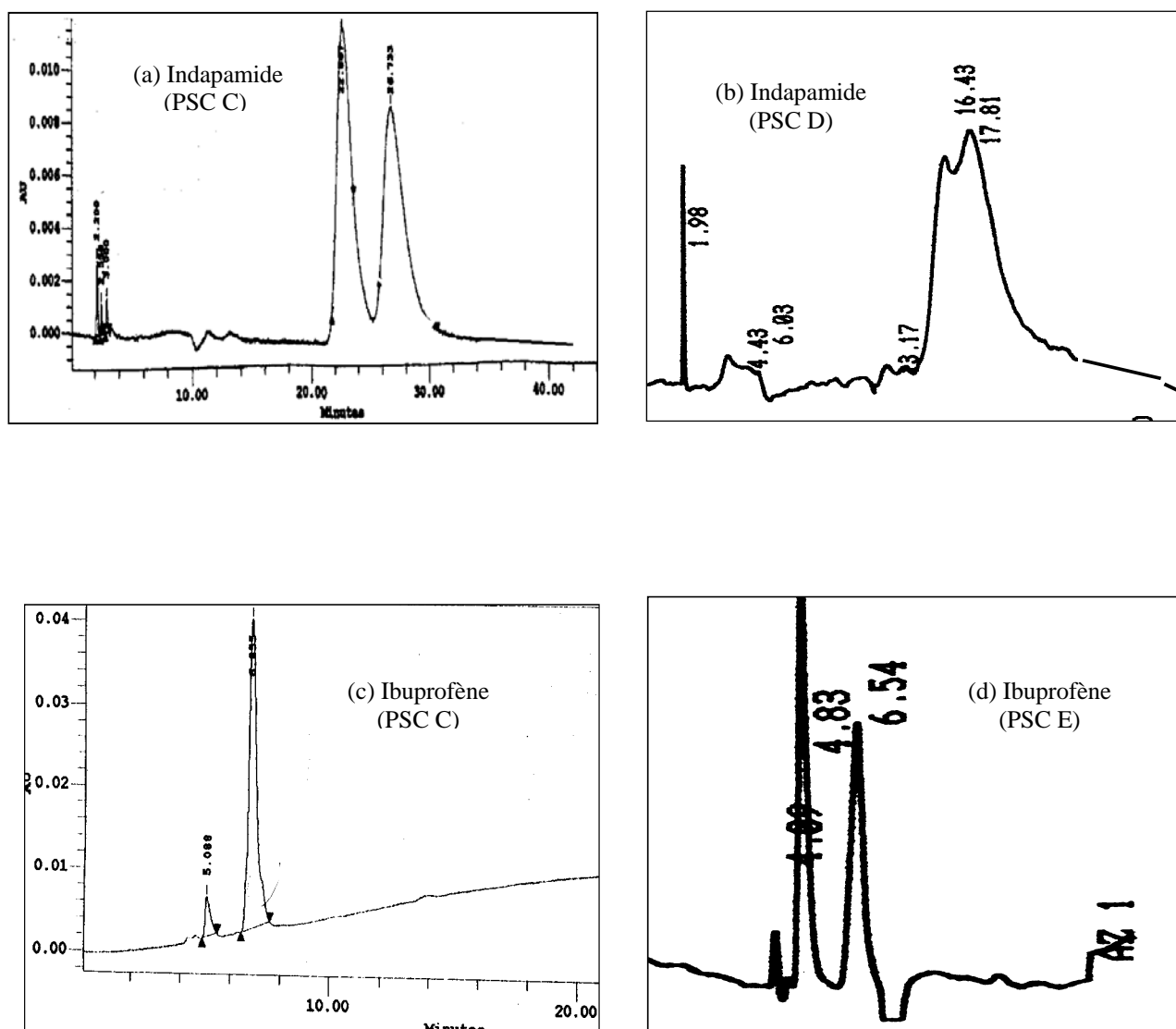


Figure 11 : Chromatogrammes de l'ibuprofène et de l'indapamide obtenus sur les PSCs C, D et E (Phase mobile : Hept/IPA/TFA : a et b : 90/10/0.5 (v/v/v) ; c et d : 98/2/0.5 (v/v/v) ; 0.5 ml/mn ; $\lambda = 254$ nm)

Tableau VI : Quelques utilisations cliniques des β - bloquants

- A** Traitement de l'hypertension
 - B** Prévention de la douleur de l'angine de poitrine
 - C** Traitement des troubles du rythme cardiaque
 - D** Traitement du Glaucome
 - E** Prévention de la migraine
 - F** Traitement de l'infarctus du myocarde
-

Comme nous pouvons le constater à partir du tableau V, parmi les 4 PSCs, seule la PSC C a conduit à de bons résultats pour cette famille de produits.^{49,50} Ceci souligne encore une fois l'effet de la longueur de la chaîne du spacer sur le mécanisme de la reconnaissance chirale. D'autre part, nous remarquons que certains solutés sont mieux séparés sur la phase C par rapport à d'autres. Lorsque le substituant en α du centre chiral est volumineux, les interactions dues aux liaisons hydrogène sont empêchées et ce qui implique une mauvaise sélectivité (propranolol, pindolol) ou encore une perte de résolution (tertatolol). Dans le cas où le noyau aromatique est substitué par un groupement capable de former des liaisons hydrogène, cette influence supplémentaire augmente l'énantiosélectivité ($R_{S(\text{m\`etoprolol})} = 1.84$) comme le montre la figure 12.³¹ Cette même constatation a été rapportée par plusieurs auteurs.⁵¹

La séparation des benzodiazépines a été testée sur les phases stationnaires préparées. Il s'agit du lorazepam, oxazepam, témazepam et lormetazepam. Le tableau V montre qu'aucune séparation de cette famille n'a été obtenue sur les phases D et F. La phase E n'a pu séparer que les énantiomères du lorazepam et de l'oxazepam, alors que la phase C a montré une séparation satisfaisante des 4 solutés racémiques^{52,53} à l'exception du lormetazepam (Fig. 10).

[49] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, C. Minguillon, Communication au 3rd Annual Conference of the Colleges of Pharmacy in the Arab World, 14-16/10/1999, Tanta, Egypt.

[50] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, C. Minguillon, Communication au 3rd Mediterranean Basin Conference on Analytical Chemistry, 4-9/06/2000, Antalya, Turquie.

[51] Y.Z. Hsieh, H.Y. Huang, *J. Chromatogr. A*, 745 (1996) 217.

[52] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, C. Minguillon, communication au Congrès de la Société Française de Chimie, 18-22/09/2000, Rennes, France

[53] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, C. Minguillon, communication au 4^{ème} Symposium National sur la Chimie Organique Industrielle et Pharmaceutique, 14-15/11/2000, Ouargla, Alger.

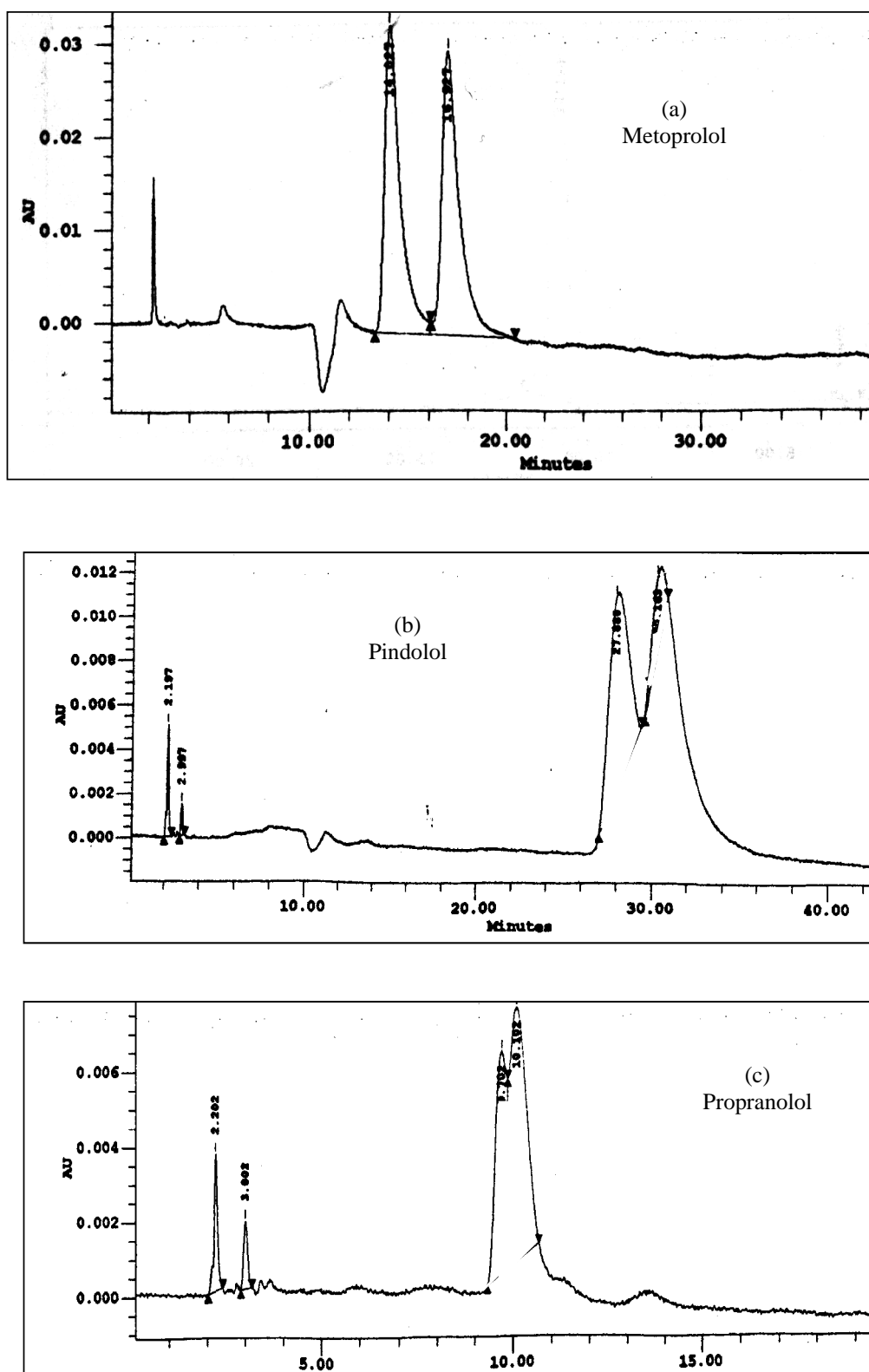


Figure 12: Chromatogrammes des énantiomères de quelques β -bloquants adrénergiques obtenus sur la PSC C

Phase mobile: hept/IPA/DEA: 90/10/0.1 (v/v/v), 1 ml/mn; $\lambda_{230\text{ nm}}$ (a) et $\lambda_{254\text{ nm}}$ (b, c)

La figure 13 montre les chromatogrammes obtenus sur la phase C. Dans cette série, 2 facteurs sont responsables du mécanisme d'interaction entre le soluté et la phase stationnaire: la substitution d'un atome d'hydrogène sur la fonction amide par un méthyle et la présence d'un atome de chlore en position *ortho* sur le noyau aromatique du soluté. Dans le lormetazepam, la fonction amide substituée par le méthyle ne peut pas former de liaisons hydrogène alors que le noyau aromatique ortho-substitué par le chlore est empêché d'interagir avec les noyaux aromatiques de la phase stationnaire, le résultat obtenu est la coélution des 2 énantiomères.³¹ Ces deux effets cumulés ont été observés également pour d'autres types de solutés séparés sur des phases stationnaires chirales similaires aussi bien en mode normal qu'en mode inverse.²

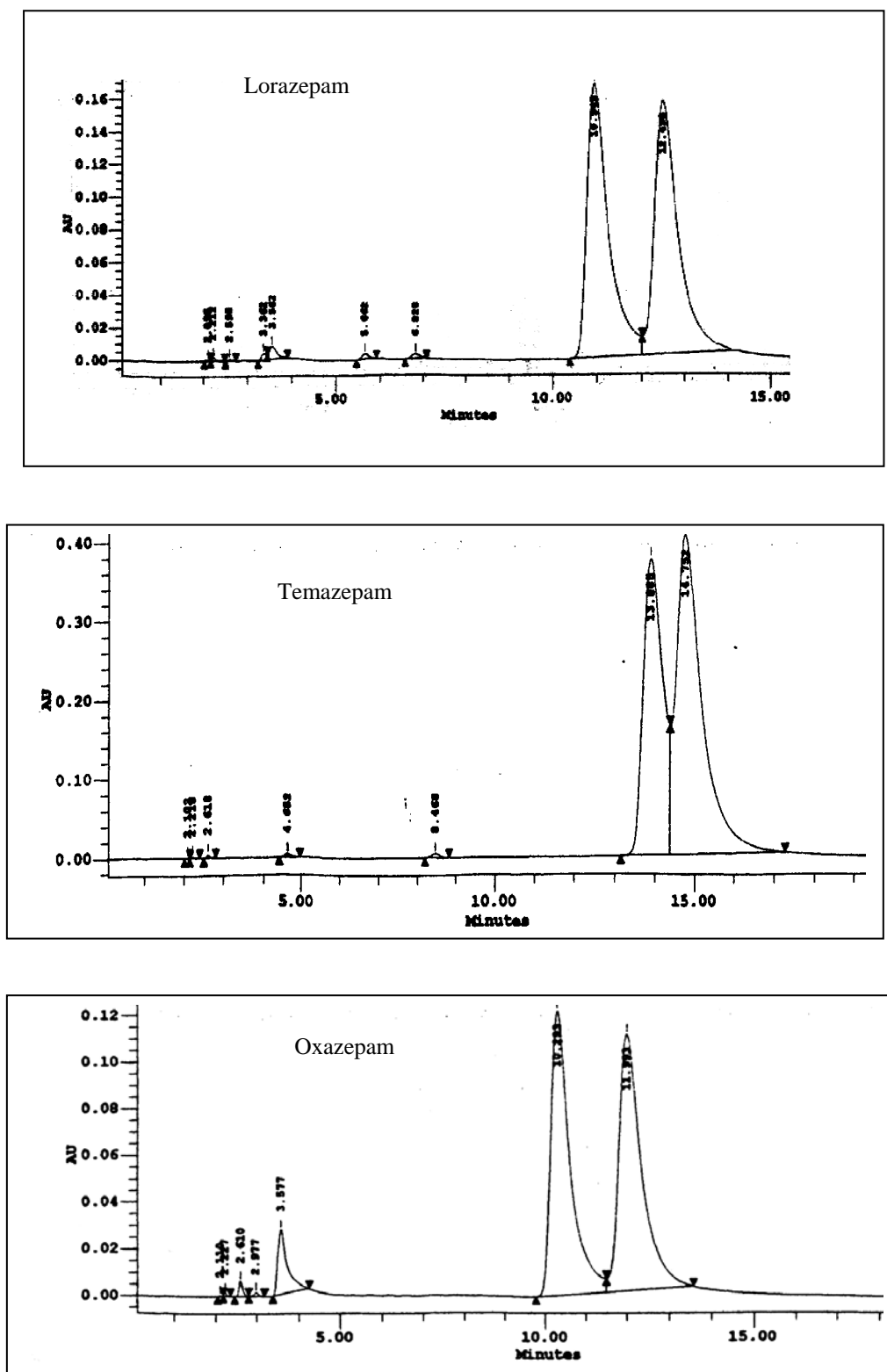


Figure 13: Séparation des benzodiazépines sur la phase stationnaire chirale C
Phase mobile: hept/IPA: 90/10 (v/v); 1 ml/mn; λ 254 nm

V-II-4 Séparation de quelques herbicides chiraux sur les PSCs C, D, E et F :

L'analyse des polluants dans l'environnement par la chromatographie liquide a connu un grand intérêt ces dernières années.⁵⁴⁻⁵⁶ Les pesticides, qui constituent toujours un problème d'actualité, sont considérés comme des polluants prioritaires pour l'environnement à cause de leur toxicité élevée même à faible concentration. Récemment, la biodégradation des herbicides alcanoïques chiraux tels que les acides 2-(2,4-dichlorophenoxy)propionique (dichlorprop) et 2-(4-chloro-2-méthylphenoxy)propionique (mecoprop) a été reportée par Schneiderheinze et al.⁵⁷ Le résultat de cette étude a confirmé l'importance de caractériser les deux énantiomères dans le but de déterminer d'une façon exacte et précise leur distribution et leur sort dans l'environnement. En effet, ils diffèrent non seulement par leurs propriétés mais également par leur comportement et leur évolution sous l'effet des facteurs externes : lumière, humidité, microorganismes, ...

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la séparation des énantiomères des acides et esters phénoxy propioniques couramment utilisés à grande échelle comme herbicides. Il s'agit de 4 esters aryloxyphénoxy propioniques: fluazifop-butyl (**17**), haloxyfop-éthoxyethyl (**18**), clorazifop-éthoxyethyl (**19**) et dichlofop-méthyl (**20**) et de 7 acides phénoxy propioniques: phénoxypropionique (**21**), 2-chloro-phénoxypropionique (**22**), 3-chloro-phénoxypropionique (**23**), 4-chloro-phénoxypropionique (**24**), dichlorprop (**25**), silvex (**26**) et mecoprop (**27**). Ces produits sont considérés comme herbicides sélectifs dont seul l'isomère **R** est généralement l'ingrédient actif.⁵⁸⁻⁶⁰ La structure de ces herbicides est représentée sur la figure 14. Le tableau VII regroupe les résultats obtenus pour cette famille de produits sur les 4 PSCs. Ainsi, malgré la faible rétention des acides phénoxypropioniques, leur séparation a été observée sur les phases C, E et F. Par contre aucune séparation n'a été obtenue sur la phase D.

[54] K. Weber, R. Kreuzig, M. Belhadir, *Chemosphere*, 1997, **35**, 13.

[55] T. Cserhati, E. Forgacs, *J. Chromatogr. B*, 1998, **717**, 157.

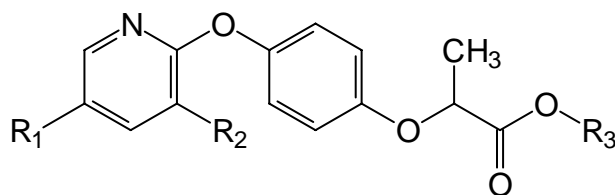
[56] A. Lagana, G. Fago, A. Marino, *J. Chromatogr. A*, 1998, **796**, 309.

[57] J.M. Schneiderheinze, D.W. Armstrong, A. Berthod, *Chirality*, 1999, **11**, 330.

[58] Y.Z. Hsieh, H.Y. Huang, *J. Chromatogr.*, 1996, **745**, 217.

[59] A.W. Garrison, P. Schmitt, A. Kettrup, *J. Chromatogr.*, 1994, **688**, 317.

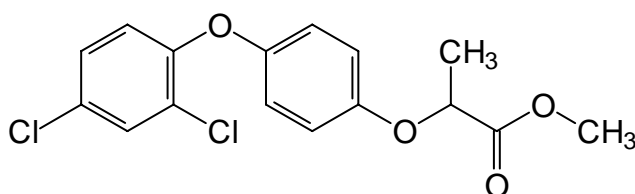
[60] M.W.F. Nielen, *J. Chromatogr.*, 1993, **637**, 81.



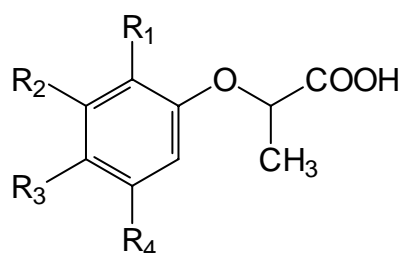
17: R1=CF₃, R2=H, R3=Bu; **fluazifop-butyl**

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

19: R1=R2=Cl, R3=(CH₂)₂OEt; **clorazifop-éthoxyéthyl**



20: dichlofop-methyl



21: R1=R2=R3=R4=H; **acide phenoxypropionique**

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

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

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

25: R1=R3=Cl, R2=R4=H; **dichlorprop**

26: R1=R3=R4=Cl, R2=H; **silvex**

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

Figure 14: Structures chimiques des herbicides chiraux testés

Tableau VII: Séparation des herbicides chiraux sur les 4 phases stationnaires chirales C, D, E et F avec le mélange binaire heptane/2-propanol													
Produit	Phase mobile	PSC C			PSC D			PSC E			PSC F		
		k'1	k'2	α	k'1	k'2	α	k'1	k'2	α	k'1	k'2	α
17 ^a	80/20	0,21	-	-	0,09	-	-	0,19	-	-	0,14	-	-
	90/10	0,28	-	-	0,15	-	-	0,19	-	-	0,19	-	-
	98/2	0,55	-	-	0,27	-	-	0,23	-	-	0,19	-	-
18 ^a	80/20	0,41	-	-	0,18	-	-	0,35	-	-	0,29	-	-
	90/10	0,53	0,6	1,14	0,3	-	-	0,33	-	-	0,63	-	-
	98/2	1,18	1,38	1,17	0,69	-	-	0,77	0,88	1,14	0,61	-	-
19 ^a	80/20	0,26	-	-	0,14	-	-	0,27	-	-	0,22	-	-
	90/10	0,37	-	-	0,23	-	-	0,29	-	-	0,37	-	-
	98/2	0,67	-	-	0,42	-	-	0,38	-	-	0,35	-	-
20 ^a	98/2	0,62	-	-	1,81	-	-	1,72	-	-	1,65	-	-
21 ^b	98/2/0,5	0,97	0,82	1,18	0,25	-	-	0,13	-	-	0,25	-	-
22 ^b	98/2/0,5	0,95	0,80	1,18	0,47	-	-	-	-	-	0,77	-	-
23 ^b	98/2/0,5	0,88	0,81	1,09	0,25	-	-	0,23	0,20	1,13	0,95	0,86	1,1
24 ^b	98/2/0,5	1,00	0,94	1,06	0,25	-	-	0,19	0,13	1,42	0,93	0,84	1,1
25 ^b	98/2/0,50	0,91	0,83	1,1	0,28	-	-	0,12	0,09	1,3	0,38	0,32	1,19
26 ^b	98/2/0,5	0,79	-	-	0,24	-	-	0,04	0,01	2,63	0,25	0,20	1,21
27 ^b	98/2/0,5	0,82	-	-	0,23	-	-	0,11	0,08	1,4	0,67	-	-

a: hept / IPA; 1 ml/mn, λ_{254} nm; b: hept/IPA/TFA; 0.5 ml/mn ; λ_{210} nm

Cette énantioséparation est basée essentiellement sur les interactions entre la fonction carboxylique proche du centre asymétrique de l'énantiomère acide et les groupements carbamates de la β -CD. Mis à part la phase D, les trois autres phases ont montré une énantiosélectivité satisfaisante vis à vis des herbicides acides. Cependant, à l'inverse des phases E et F, la phase C a montré une meilleure résolution pour les solutés dont le groupe phenyl est soit non substitué soit substitué en *ortho* par un atome de chlore.³¹

D'un autre côté, si les autres positions du phenyl sont substituées la rétention diminue et l'énantiosélectivité est sérieusement affectée ou perdue.^{61,62} Quant à la phase E, elle a montré une meilleure reconnaissance chirale pour les 2 solutés: silvex et mecoprop. Ainsi, une certaine complémentarité des 4 phases quant à la séparation de ces herbicides est nettement observée.

[61] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, C. Minguillon, communication aux 2^{ème} Journées sur l'Analyse Physico-Chimique: pesticides et environnement, CRAPC, 8-19/12/1998, Alger.

[62] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, C. Minguillon, communication au 1st North-African and Middle-Eastern Conference on Environmental Analytical and Sanitary Chemistry, 8-11/03/1999, Tunis

La résolution obtenue pour ce type de solutés peut être expliquée aussi bien par les interactions hydrogène entre les groupements carbonyles de l'herbicide et le N-H du carbamate que par les interactions π - π entre les noyaux aromatiques du soluté et ceux de la β -CD. Le même mécanisme peut avoir lieu dans le cas des esters mais la présence de substituants volumineux sur le noyau aromatique conduit à la perte de l'énantiosélectivité à l'exception de l'haloxyfop-ethoxyethyl séparé uniquement sur les phases C et E.^{31,52} Les figures 15 et 16 représentent quelques chromatogrammes obtenus lors de la séparation des herbicides sur les PSCs C, E et F ainsi que les spectres UV des 2 énantiomères de chaque soluté donnés par le détecteur à barrettes de photodiodes (Fig.16). Nous constatons ainsi, d'une manière générale que la présence d'un substituant sur le noyau aromatique du dérivé de la CD (qu'il soit donneur ou attracteur d'électrons) favorise la séparation des acides aryloxyphénoxy propioniques.

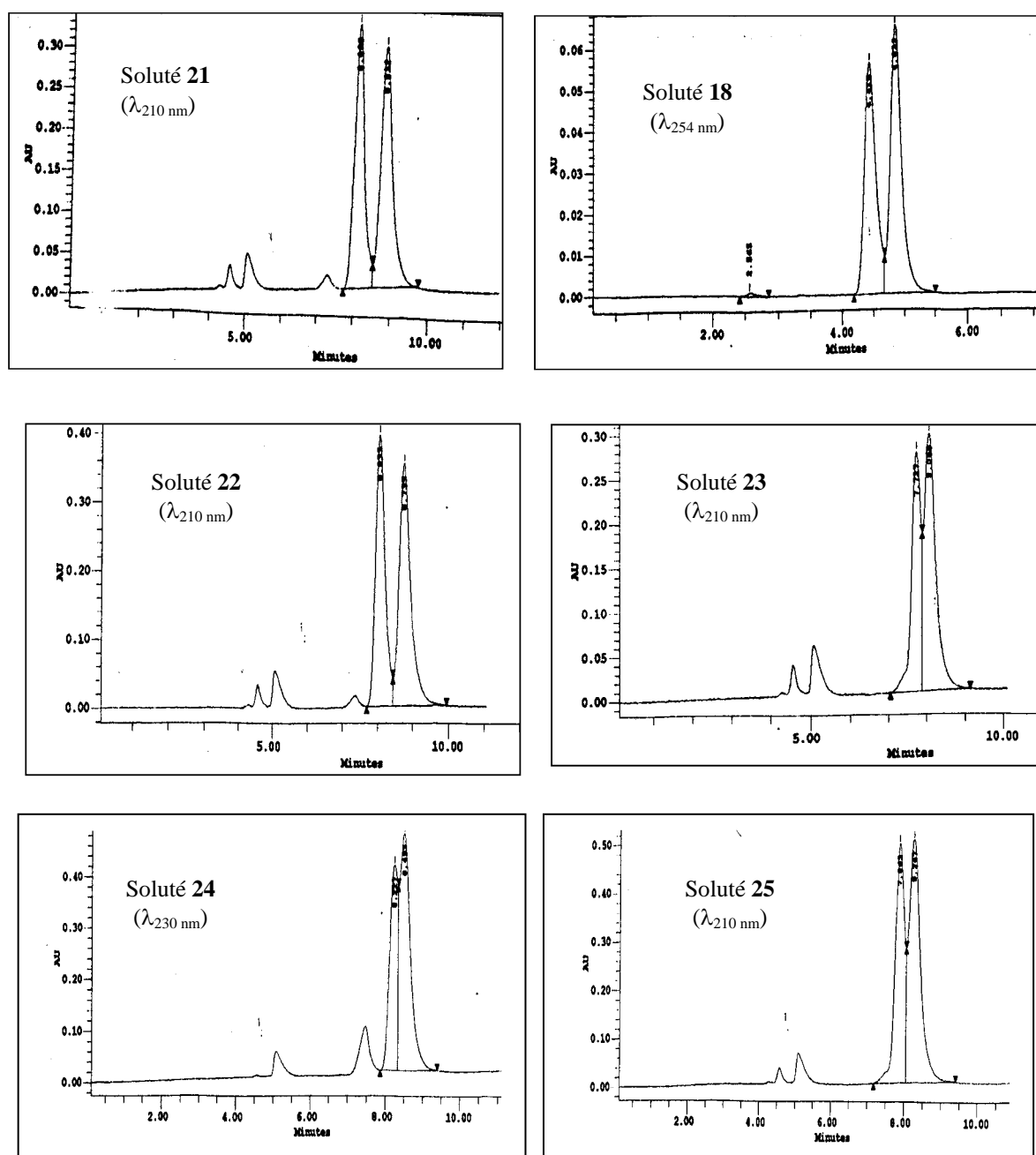


Figure 15 : Séparation de quelques herbicides chiraux sur la PSC C

Phase mobile : hept/IPA/TFA : 98/2/0.5 (v/v/v) ; 0.5 ml/mn

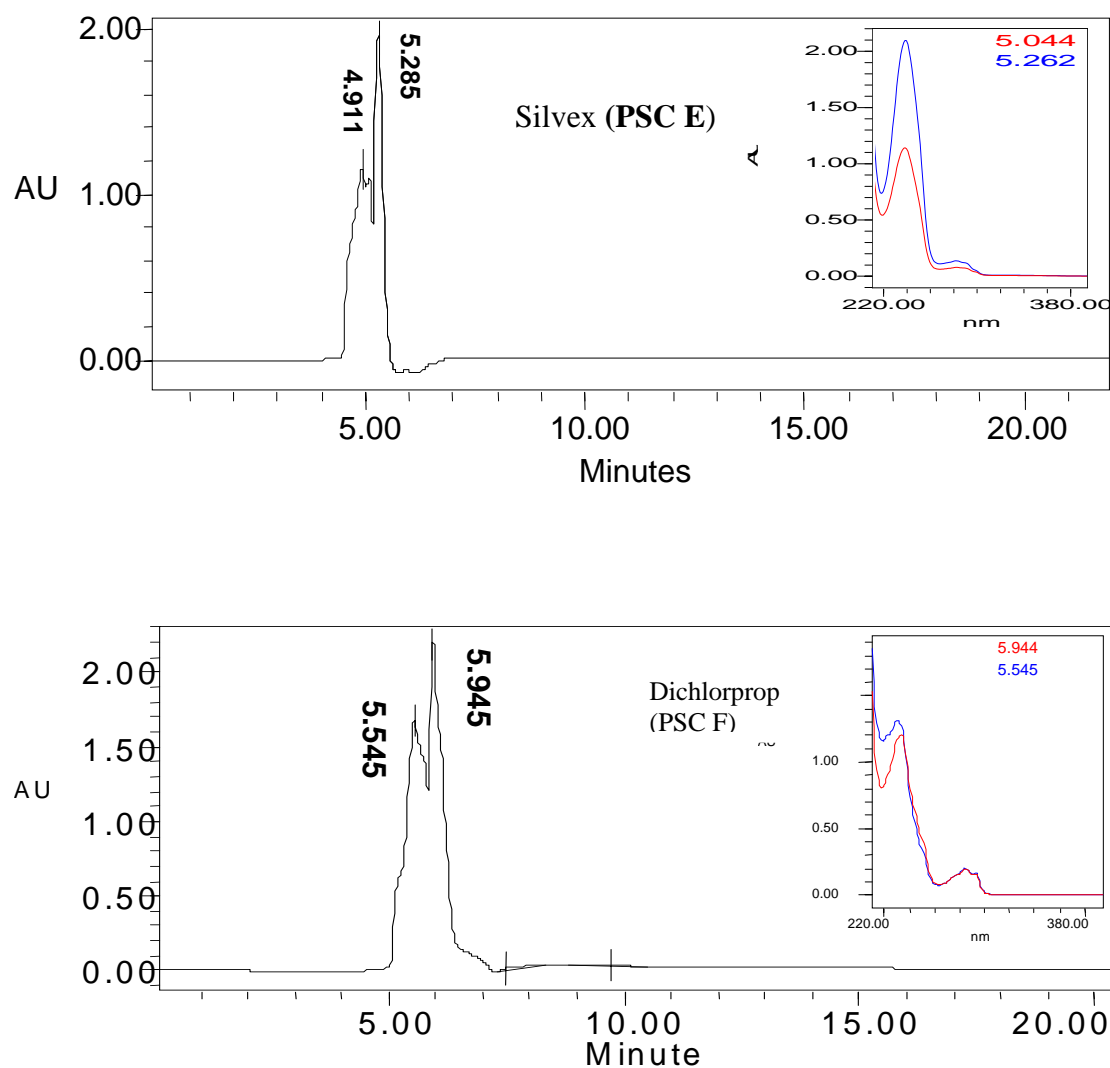


Figure 16 : Chromatogrammes des racémiques Silvex et dichlorprop obtenus sur les PSCs E et F.

Phase mobile : hept/IPA/TFA : 98/2/0.5 ; 0.5 ml/mn ; $\lambda_{210\text{ nm}}$

V-II-5 L'effet du solvant et de la composition de la phase mobile sur la sélectivité :

Ce type de greffage de la cyclodextrine sur la surface de la silice nous a permis d'utiliser d'autres solvants tel que le chloroforme comme modificateur organique de la phase mobile. Le tableau VIII regroupe les résultats chromatographiques obtenus pour différentes compositions de phase mobile.

Nous constatons que la rétention diminue lorsque le % en CHCl_3 augmente. D'un autre côté, les produits sont généralement plus retenus (k' élevé) avec cette phase mobile comparée au 2-propanol. Ainsi, sur une vingtaine de produits injectés sur les 4 PSCs, 10 ont été séparés sur la PSC C, 5 sur la PSC D, 10 sur la PSC E et 6 sur la F. Nous pouvons constater, d'une manière générale, que les solutés bien séparés avec le mélange binaire heptane/2-propanol sont également résolus avec l'éluant heptane/chloroforme. De plus, la sélectivité de certains solutés a été améliorée avec cette dernière phase mobile pour certaines phases stationnaires (**4,12,16**). D'un autre côté la séparation obtenue pour certains racémiques sur les 4 phases stationnaires avec le mélange Hept/IPA n'est pas nécessairement observée avec le mélange Hept/ CHCl_3 (**6,7,8**). Ceci peut être expliqué par les fortes interactions entre le modifiant alcool et le groupement polaire du sélecteur chiral conduisant à une faible rétention pour la plupart des solutés sans pour cela affecter leur énantioséparation.³¹

Tableau VIII: Séparation des solutés racémiques et des produits pharmaceutiques optiquement actifs sur les 4 phases stationnaires chirales C, D, E et F en utilisant le mélange binaire heptane/chloroforme

Produit	Phase mobile Hept/CHCl ₃	PSC C			PSC D			PSC E			PSC F		
		k'1	k'2	α	k'1	k'2	α	k'1	k'2	α	k'1	k'2	α
1	50/50	2,57	2,98	1,16	0,69	-	-	0,44	-	-	0,35	-	-
	75/25	6,63	8,27	1,25	2,37	-	-	2,06	2,21	1,07	1,85	1,94	1,05
	90/10	-	-	-	7,58	8,36	1,1	8,46	-	-	4,98	-	-
3	50/50	2,07	-	-	1,15	-	-	0,85	-	-	0,72	-	-
	75/25	5,27	-	-	3,08	-	-	4,93	-	-	2,72	-	-
	90/10	15,97	-	-	12,53	-	-	10,94	-	-	13,12	-	-
4	50/50	0,11	-	-	0,06	-	-	0,05	-	-	0,03	-	-
	75/25	0,22	0,27	1,21	0,11	0,25	2,13	0,12	-	-	0,11	-	-
	90/10	0,52	0,63	1,21	0,25	0,64	2,58	0,33	-	-	0,33	-	-
	95/5	0,42	0,53	1,27	2,86	3,17	1,11	1,26	1,75	1,38	1,87	2,16	1,16
5	50/50	0,13	-	-	0,07	-	-	0,04	-	-	0,03	-	-
	75/25	0,23	0,31	1,37	0,1	-	-	0,14	-	-	0,14	-	-
	90/10	0,51	0,71	1,4	0,26	-	-	0,62	-	-	0,37	-	-
	95/5	0,38	0,59	1,54	3,03	-	-	1,15	-	-	2,25	-	-
6	25/75	2,38	-	-	0,51	-	-	0,54	-	-	0,21	-	-
	50/50	7,21	-	-	3,34	-	-	0,67	-	-	1,22	-	-
	75/25	-	-	-	13,63	14,35	1,05	14,68	16,6	1,13	12,43	-	-
7	50/50	2,55	-	-	0,69	-	-	0,61	-	-	0,3	-	-
	75/25	15,08	-	-	7,28	-	-	4,78	5,15	1,1	3,18	3,5	1,1
8	25/75	0,94	-	-	0,21	-	-	0,27	-	-	0,05	-	-
	50/50	2,93	3,23	1,1	1,3	-	-	1,09	1,19	1,09	0,36	-	-
	75/25	21,39	25,3	1,18	5,59	-	-	7,76	8,68	1,12	4,85	-	-
11	25/75	1,2	1,31	1,09	0,35	-	-	0,41	-	-	0,1	-	-
	50/50	3,73	4,19	1,12	1,82	2,09	1,15	1,59	1,84	1,16	0,62	-	-
	75/25	14,69	17,6	1,2	7,72	8,84	1,14	9,45	12,4	1,31	6,05	6,94	1,15
12	50/50	0,25	-	-	0,09	-	-	0,06	-	-	0,02	-	-
	75/25	0,94	1	1,07	0,32	-	-	0,41	-	-	0,29	-	-
	90/10	3,74	3,99	1,07	1,19	-	-	1,69	1,75	1,04	0,81	-	-
	95/5	2,99	3,21	1,07	2,25	-	-	-	-	-	1,86	-	-
13	25/75	0,85	0,96	1,12	0,22	-	-	0,34	-	-	0,12	-	-
	50/50	2,79	3,22	1,15	1,34	-	-	0,35	-	-	1,2	-	-
	75/25	10,69	13,1	1,22	6,41	6,85	1,07	6,95	7,7	1,11	4,76	5,3	1,11
14	50/50	5,58	-	-	2,6	-	-	1,84	-	-	1,95	-	-
	75/25	17,39	-	-	5,35	-	-	19,27	-	-	8,93	-	-
15	50/50	0,79	-	-	0,37	-	-	0,29	-	-	0,43	-	-
	75/25	2,31	-	-	1,63	-	-	2,08	-	-	1,24	-	-
	90/10	8,13	-	-	2,72	-	-	5,24	-	-	3,19	-	-
16	0/100	-	-	-	0,21	-	-	0,12	-	-	0,2	-	-
	25/75	-	-	-	0,52	-	-	0,65	-	-	0,29	-	-
	50/50	-	-	-	2,82	-	-	0,6	-	-	1,22	-	-
	75/25	-	-	-	10,46	-	-	11,09	-	-	10,52	-	-

Tableau VIII: suite													
Produit	PSC C			PSC D			PSC E			PSC F			
	k'1	k'2	α	k'1	k'2	α	k'1	k'2	α	k'1	k'2	α	
17	50/50	0,19	-	-	0,09	-	-	0,07	-	-	0,03	-	-
	75/25	0,69	-	-	0,27	-	-	0,68	-	-	0,38	-	-
	90/10	3,32	-	-	1,2	-	-	2,34	-	-	1,16	-	-
18	50/50	0,42	-	-	0,2	-	-	0,13	-	-	0,09	-	-
	75/25	1,73	-	-	0,72	-	-	1,77	-	-	0,72	-	-
	90/10	10,93	-	-	1,13	-	-	7,35	-	-	3,35	-	-
19	50/50	0,21	-	-	0,18	-	-	0,09	-	-	-	-	-
	75/25	0,39	-	-	0,35	-	-	0,7	-	-	0,36	-	-
	90/10	2,89	-	-	0,14	-	-	2,11	-	-	3,14	-	-
20	50/50	0,19	-	-	1,52	-	-	1,1	-	-	0,82	-	-
	75/25	0,59	-	-	4,08	-	-	5,96	-	-	3,46	-	-
	90/10	2,12	-	-	-	-	-	13,2	-	-	17,94	-	-
Lorazepam													
	0/100	6,92	7,23	1,04	1,53	-	-	0,65	-	-	1,39	-	-
	25/75	16,76	17,6	1,05	3,8	-	-	2,98	3,36	1,13	2,26	-	-
	50/50	-	-	-	-	-	-	12,14	13,7	1,13	8,59	-	-
Lormetazepam													
	0/100	1,02	-	-	0,21	-	-	0,1	-	-	0,23	-	-
	50/50	6,5	-	-	1,71	-	-	0,69	-	-	0,32	-	-
	75/25	30,08	-	-	8,41	-	-	27,62	-	-	1,29	-	-
Temazepam													
	0/100	1	-	-	0,21	-	-	0,09	-	-	0,22	-	-
	25/75	2,2	-	-	0,49	-	-	0,23	-	-	0,32	-	-
	50/50	6	-	-	1,63	-	-	1,67	-	-	1,29	-	-
	75/25	26,79	-	-	8,79	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxazepam													
	0/100	-	-	-	1,3	-	-	0,92	-	-	0,36	-	-
	25/75	-	-	-	3,28	-	-	2,21	3,03	1,37	1,91	-	-
	50/50	-	-	-	-	-	-	11,09	12	1,07	7,95	8,42	1,06

Phase mobile: heptane/chloroforme; débit: 1 ml/mn, $\lambda_{254\text{ nm}}$

La figure 17 représente la séparation des solutés **3** et **5** séparés sur la phase C avec la phase mobile Hept/IPA et Hept/CHCl₃.

En ce qui concerne la famille des benzodiazépines, ces derniers sont très retenus avec le mélange hept/CHCl₃ sans pour cela améliorer leur séparation par rapport à la phase mobile Hept/IPA à l'exception de l'oxazepam qui a été séparé sur la phase F également. Quant aux énantiomères du lormetazepam, ils n'ont pu être séparés sur aucune phase aussi bien avec le mélange Hept/IPA qu'avec le mélange Hept/CHCl₃.

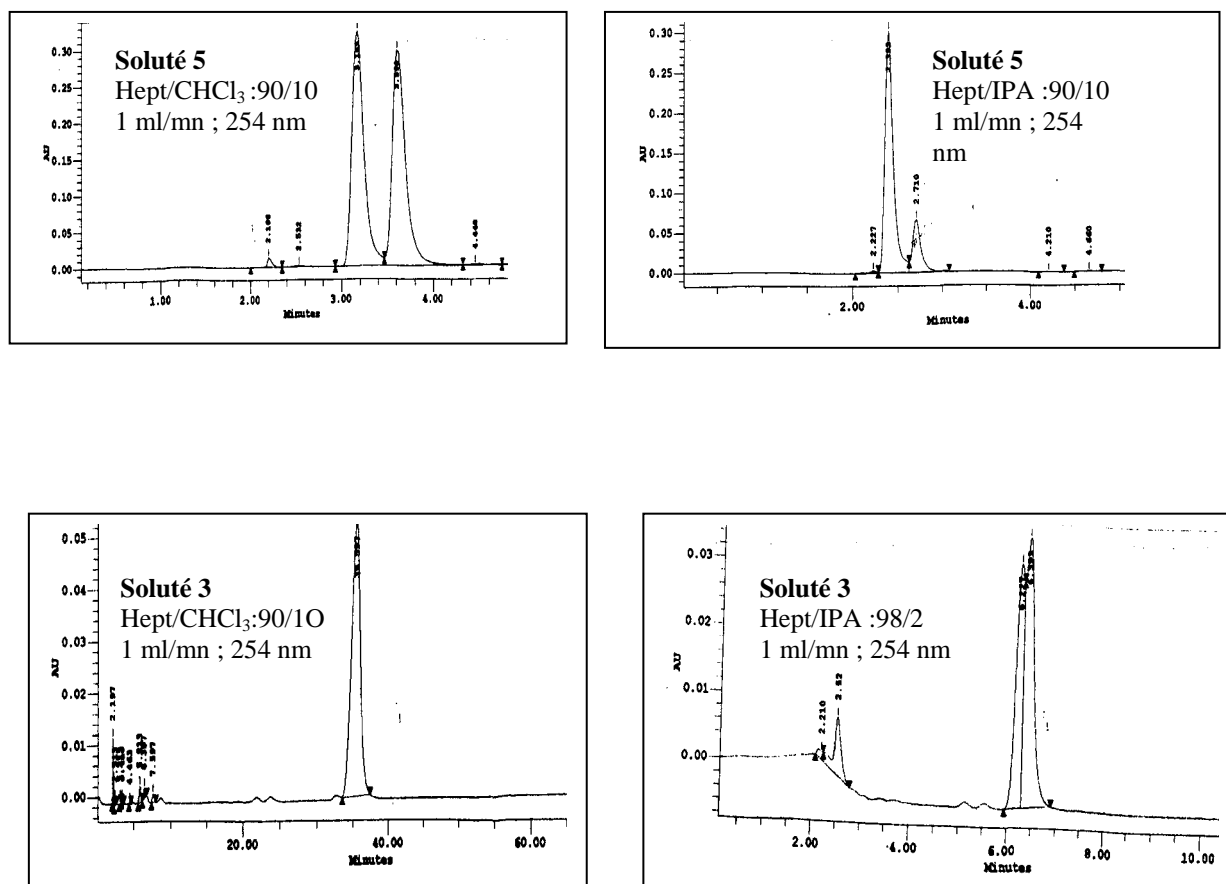


Figure 17 : Effet du solvant sur la séparation de quelques solutés racémiques 3 et 5

L'effet de la composition de la phase mobile sur la séparation de quelques solutés racémiques (**6**, **13**, **lorazepam**) est représenté sur la figure 18. Ainsi, les deux formes énantiomériques du soluté **6** sont séparés sur la phase F à une composition de 95/5 (Hept/IPA) alors que les deux formes *R* et *S* du couple **13** sont séparés à 100 % d'heptane sur la même phase stationnaire. Quant à la séparation chirale du lorazepam racémique, nous constatons que la résolution augmente au fur et à mesure que le pourcentage en chloroforme diminue dans la phase mobile permettant ainsi la résolution complète des deux formes énantiomériques à 20 % d'heptane.^{52,53}

V-II-6 L'effet de la dimension de la colonne sur la sélectivité :

Dans ce travail, nous avons également rempli une colonne de faible diamètre avec la même PSC C (colonne C') afin de comparer l'efficacité des 2 colonnes (standard et narrowbore). En effet, l'utilisation de colonnes de faible diamètre apporte plusieurs avantages:

- 1) faible quantité de phase stationnaire ;
- 2) faible consommation de solvant (débit très faible:0.1-0.3 ml/mn) ;
- 3) facilité de couplage avec la spectrométrie de masse.

Le tableau IX regroupe les valeurs des facteurs de sélectivité et de résolution pour quelques produits testés sur les 2 colonnes. Les résultats obtenus indiquent que d'une manière générale les produits sont moins retenus sur la colonne à faible diamètre (narrowbore) ce qui affecterait la séparation chirale. En effet, sur les 16 produits testés, 6 n'ont pas été séparés sur la colonne C'.⁴⁴

Quant au facteur de sélectivité on retrouve pratiquement la même valeur pour les 2 colonnes, néanmoins la meilleure résolution est obtenue sur la colonne standard. Cette légère diminution d'efficacité a été soulevée dans la littérature.⁵⁹ La figure 19 représente les chromatogrammes de quelques solutés injectés sur les 2 colonnes.

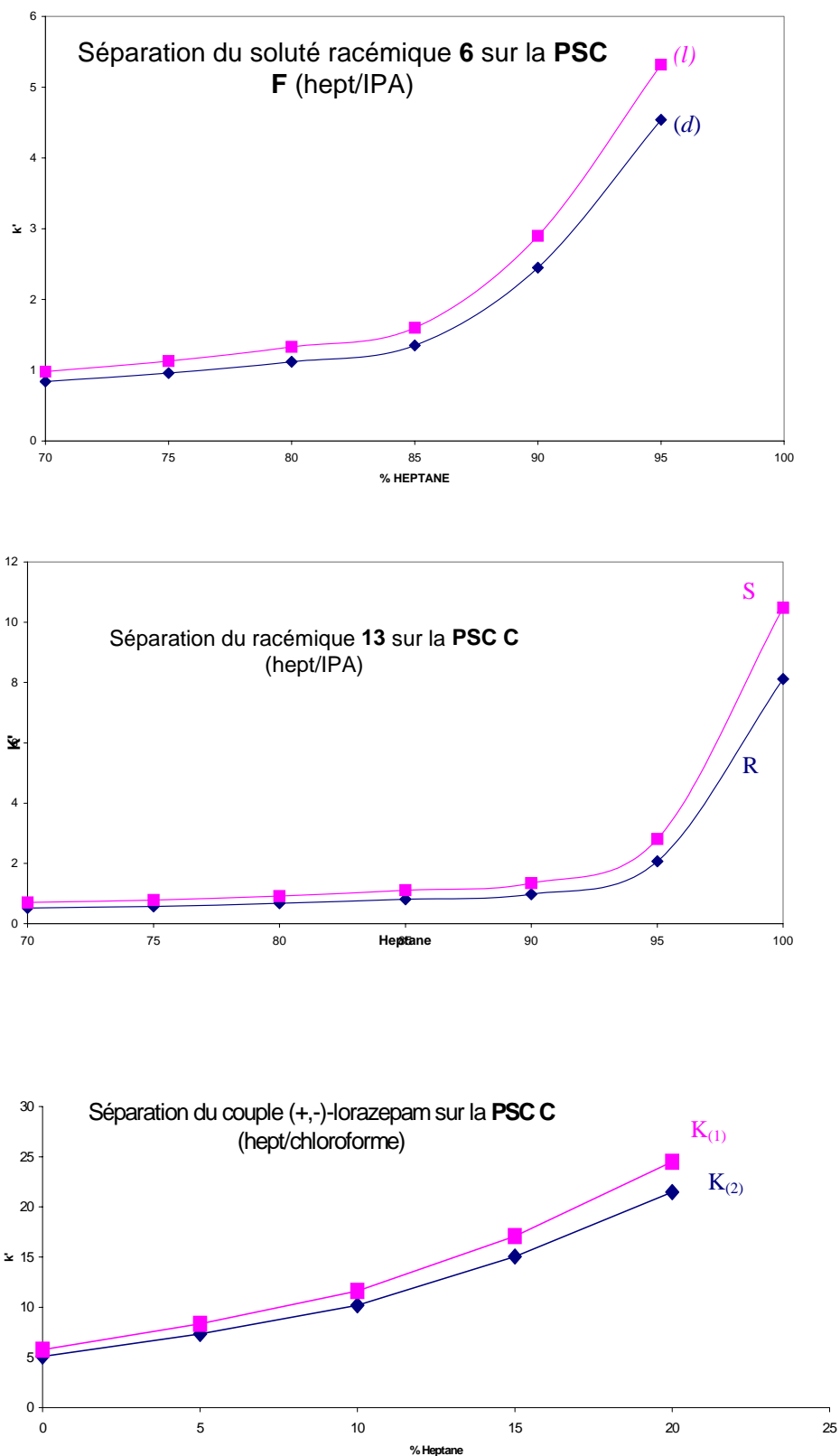


Figure 18 : Effet de la composition de la phase mobile sur la rétention de quelques solutés racémiques

Table IX: Résultats chromatographiques obtenus sur la PSC C utilisant une colonne standard et une colonne à faible diamètre								
Soluté racémique	Colonne standard				Colonne narrowbore			
	k_1	α	R_S	Hept/IPA	k_1	α	R_S	Hept/IPA
1	0.81	1.08	-	90/10	0.58	1.00	-	90/10
2	0.38	1.13	-	90/10	0.31	1.00	-	90/10
3	2.08	1.04	-	98/2	0.38	1.00	-	90/10
4	0.19	1.62	1.49	80/20	0.15	1.67	-	90/10
5	1.89	1.09	0.99	80/20	1.54	1.10	-	90/10
6	1.40	1.11	1.04	80/20	1.16	1.08	-	90/10
7	4.01	1.62	5.65	90/10	3.33	1.47	1.88	90/10
8	5.37	1.07	0.90	98/2	1.13	1.00	-	90/10
9	1.54	1.13	1.50	98/2	0.31	1.00	-	90/10
10	3.03	1.21	2.44	90/10	2.42	1.19	0.95	90/10
11	0.85	1.09	-	90/10	0.81	1.00	-	90/10
12	1.15	1.14	0.97	80/20	2.30	1.14	0.77	90/10
13	1.15	1.14	0.97	90/10	0.57	1.32	0.81	80/20
Oxazepam	4.13	1.20	1.94	90/10	2.76	1.26	1.05	90/10
Temazepam	2.91	1.10	0.89	80/20	2.39	1.09	-	80/20
Lorazepam	4.45	1.17	1.71	90/10	3.07	1.22	0.89	90/10

k_1 = facteur de rétention du premier énantiomère élué; α = facteur de sélectivité; R_S = facteur de résolution; Colonnes: standard (150 x 4.6 mm I.D.) et narrowbore (250 x 2.1 mm I.D.); détection UV $\lambda_{254\text{ nm}}$; débit: 1 ml/min; Hept: heptane; IPA: 2-propanol

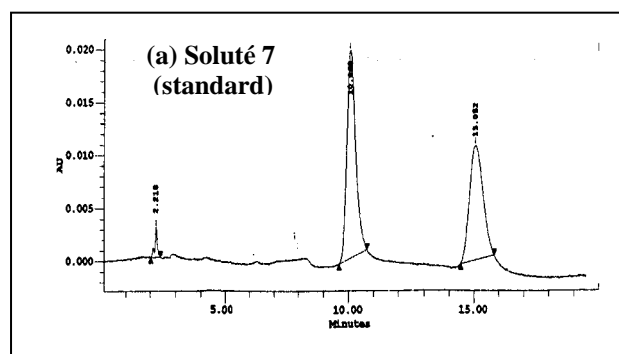
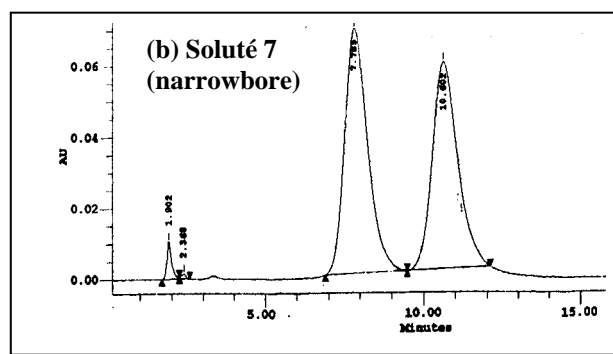
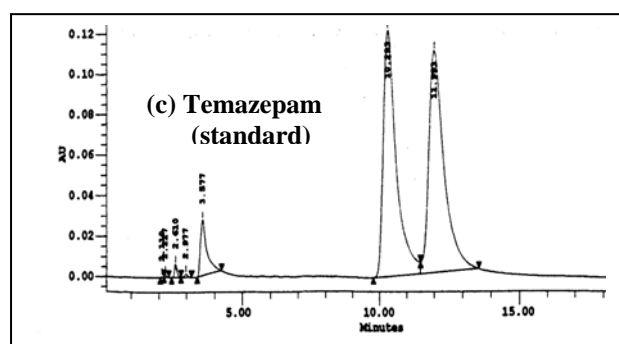
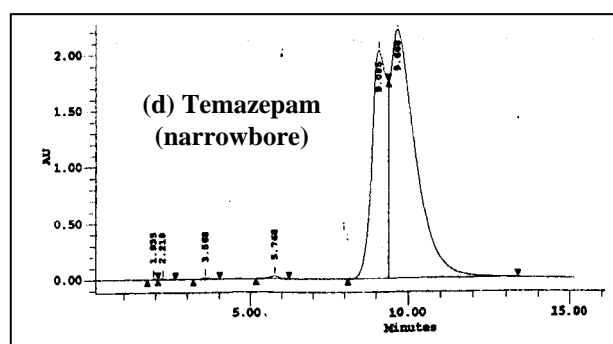
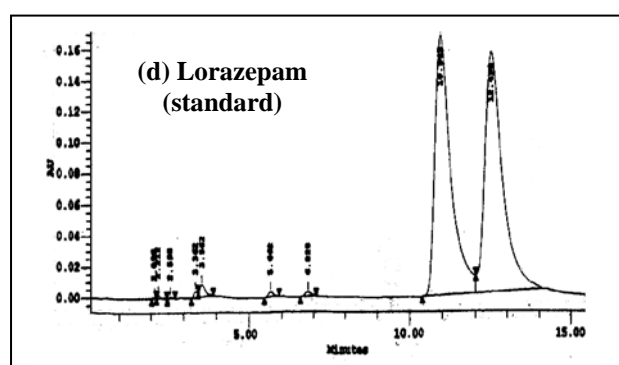
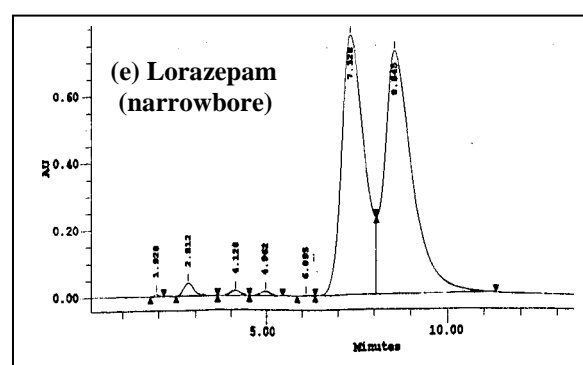
(a) : hept/IPA :90/10 ; 1 ml/mn ; λ_{254} nm(b) : hept/IPA :90/10 ; 0.5 ml/mn ; λ_{254} nm(c) : hept/IPA :90/10 ; 1 ml/mn ; λ_{254} nm(d) : hept/IPA :90/10 ; 0.5 ml/mn ; λ_{254} nm(e) : hept/IPA :90/10 ; 1 ml/mn ; λ_{254} nm(f) : hept/IPA :90/10 ; 0.5 ml/mn ; λ_{254} nm

Figure 19 : Séparation de quelques solutés racémiques sur les 2 colonnes standard et narrowbore

V-II-7 Comparaison des résultats obtenus à ceux donnés par la littérature:

Dans le tableau X, nous avons regroupé les valeurs des facteurs de rétention (k_I) et de sélectivité (α) de quelques solutés racémiques obtenus sur la phase chirale C ainsi que celles obtenues sur des matériaux similaires.^{3,63,64}

Nous pouvons constater, que le pouvoir d'énantiosélectivité est comparable pour la plupart des racémiques.³¹ De plus, plusieurs couples sont mieux séparés sur la PSC C préparée (**10**, **13**, **14** et **métoprolol**).

Tableau X: Comparaison de la rétention de quelques solutés racémiques obtenus sur des phases stationnaires à base de CDs similaires										
Soluté Racémique	PSC 1		PSC 2		PSC 3		PSC 4		PSC 5	
	k_I	α	k_I	α	k_I	α	k_I	α	k_I	α
1	3.38	1.19 ^a	19.10	1.00	14.60	1.26	0.47 ^d	1.25	--	--
3	2.08	1.04 ^a	6.27	1.00	9.85	1.18	--	--	--	--
5	0.17	1.00 ^a	1.23	1.16	1.13	1.24	0.15 ^d	ca.1	--	--
10	1.54	1.13 ^a	1.37	1.00	9.40	1.00	0.29 ^d	1.00	--	--
11	19.74	1.26 ^a	8.00	1.17	16.30	1.00	0.82 ^e	1.36	--	--
12	1.43	1.09 ^a	12.30	1.00	17.70	1.09	--	--	--	--
13	1.24	1.21 ^b	11.20	1.19	13.00	1.00	--	--	--	--
14	0.94	1.16 ^b	2.46	1.00	4.20	1.00	0.38 ^d	ca.1	--	--
Métoprolol	2.54	1.27 ^c	--	--	--	--	--	--	13.98 ^f	1.08
Propranolol	1.73	1.05 ^c	--	--	--	--	--	--	11.36 ^f	1.06
Pindolol	3.82	1.09 ^c	--	--	--	--	--	--	11.32 ^g	1.04

a: Hept/ IPA: 98/2; **b:** 80/20; **c:** Hept/IPA/DEA: 80/20/0.1; **d:** Hex/IPA: 90/10; **e:** Hex/IPA: 70/30; **f:** Hex/IPA: 90/10; **g:** 80/20;

PSC 1: La phase stationnaire β -CD / phenyl carbamate préparée dans ce travail

PSC 2 et PSC 3: Les phases stationnaires β -CD / phenyl carbamate et 3,5- dimethylphenyl carbamate, respectivement, de la référence [3]

PSC 4: La phase stationnaire β -CD / 3,5- dimethylphenyl carbamate de la référence [63]

PSC 5: La phase stationnaire β -CD / S-naphthylethylphenyl carbamate de la référence [64]

[63] T. Hargitai, Y. Kaida, Y. Okamoto, *J. Chromatogr.*, 1993, **628**, 11

[64] A. Bertod, S-C. Chang, D. W. Armstrong, *Anal. Chem.*, 1992, **64**, 395

V-III/ CONCLUSION:

Nous avons montré à travers cette étude la large gamme d'application des six phases stationnaires chirales synthétisées aussi bien en mode normal qu'en mode inverse. Dans un premier lieu, nous avons testé les isomères de position du nitrophénol et de la chloroaniline généralement mal séparés sur une colonne achirale (de type C₁₈ par exemple). Nous avons obtenu la résolution complète des 3 isomères *ortho*, *méta* et *para* pour chaque série.

Sur les phases A et B seuls quelques produits naturels optiquement actifs tels que la carvone et la pulégone ont été résolus. L'ajout d'un tampon phosphate a amélioré leur séparation. L'effet de la température a été également étudié sur la phase B dans le domaine 15-50°C. La meilleure résolution a été obtenue entre 15-20° C pour les 2 couples d'énantiomères carvone et naphthyléthylamine confirmant ainsi la stabilité du complexe formé entre l'énantiomère et la cyclodextrine à basse température.

Pour les phases stationnaires chirales C, D, E et F, testées en mode normal, les meilleurs résultats ont été obtenus sur la phase stationnaire C, suivie de la F ensuite de la E et enfin de la phase D. Cette différence d'énantiosélectivité entre la phase C et les autres montre le rôle important de la longueur du spacer dans le mécanisme de la reconnaissance chirale. Nous avons montré, d'autre part, que la reconnaissance chirale en mode normal est due essentiellement aux interactions de types π - π , dipole-dipole et liaisons hydrogène. Néanmoins, les quatre PSCs ont montré une certaine complémentarité quant à la séparation de certains produits notamment les herbicides. L'effet de la composition de la phase mobile sur la sélectivité a été également étudiée pour certains solutés sur quelques phases stationnaires.

Enfin le remplissage d'une colonne narrowbore avec la phase C nous a permis de constater que la rétention est pratiquement la même sur les deux colonnes alors que la résolution est nettement meilleure sur la colonne standard.

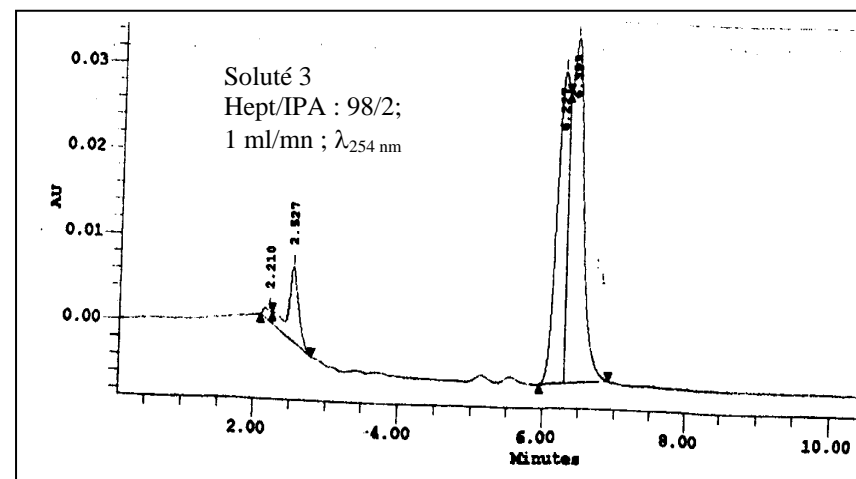
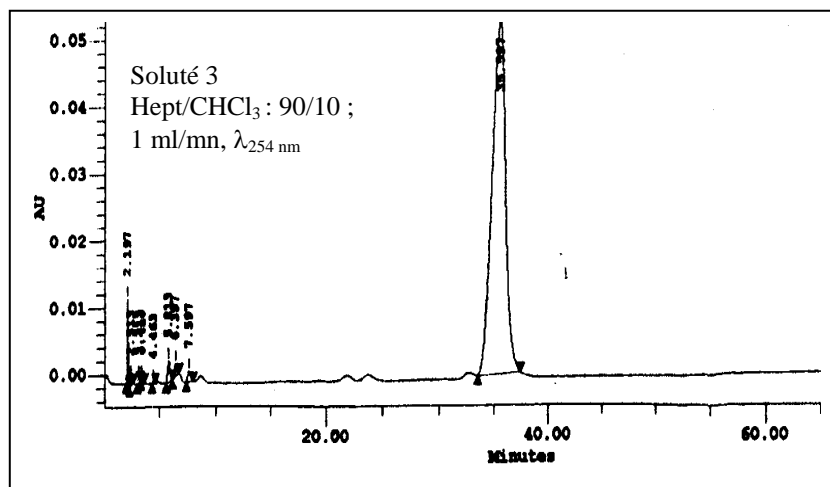
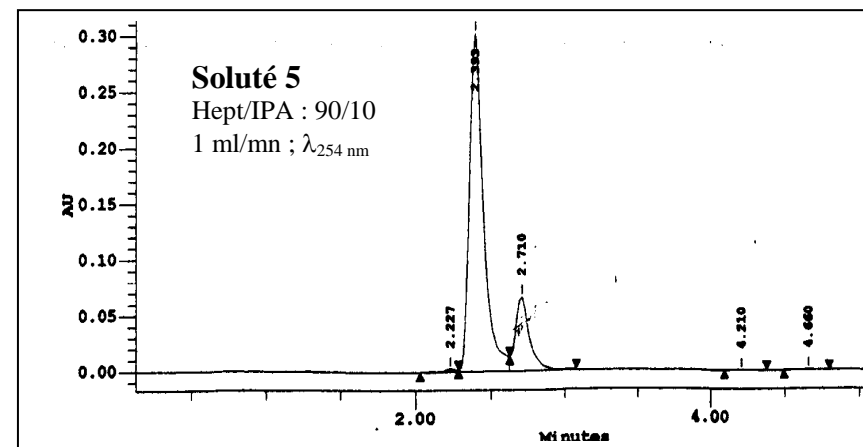
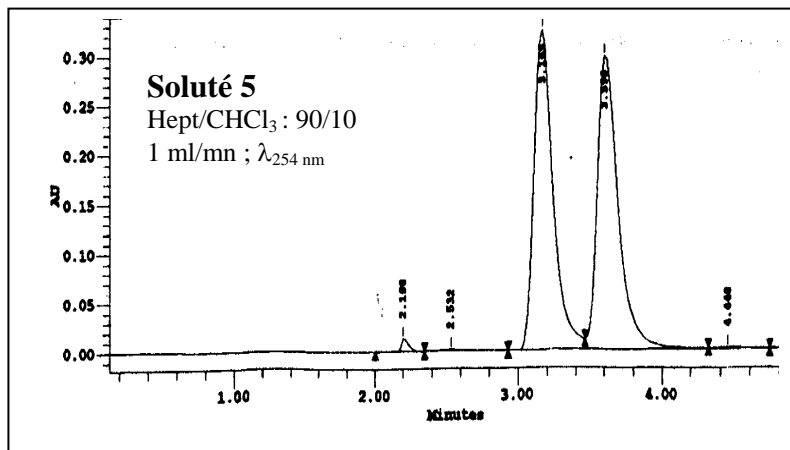


Figure 17 : Effet du solvant sur la séparation des solutés racémiques 3 et 5

Nous nous sommes intéressés, dans de ce travail, aux différentes applications de la β -cyclodextrine en tant que sélecteur chiral en vue de réaliser la séparation d'isomères et d'énantiomères par chromatographie liquide à haute performance.

L'utilisation de la β -cyclodextrine comme additif chiral à la phase mobile en chromatographie liquide sur une colonne achirale commerciale nous a permis de séparer les isomères de position de dérivés disubstitués du benzène, généralement difficile à séparer sur des colonnes classiques. Cependant, malgré les avantages qu'elles offre, cette technique d'analyse est difficile à mettre en œuvre car elle peut endommager certaines parties du système chromatographique.

Aussi, nous nous sommes intéressés dans la deuxième partie de ce travail, à greffer la cyclodextrine sur la surface de la silice par différentes méthodes ce qui nous a permis d'obtenir six phases stationnaires chirales qui diffèrent par le mode de greffage et la nature des substituants.

La caractérisation des sélecteurs chiraux et des matériaux obtenus a été effectuée par la RMN du ^1H en solution, la RMN du ^{13}C et du ^{29}Si de l'état solide ainsi que par l'analyse élémentaire. Les résultats de ces analyses ont confirmé l'obtention du greffage de la cyclodextrine sur la silice avec des taux de recouvrement comparables à ceux obtenus dans la littérature et pour les phases stationnaires du commerce.

Enfin, et après remplissage de différentes colonnes en acier, le test de ces six PSCs en CLHP, a démontré la large gamme d'application de ces phases stationnaires aussi bien en mode de phase normale qu'en mode de phase inversée.

Sur les phases A et B, seuls les racémiques carvone, pulégone et naphthyléthylamine ont été séparés. Ceci est probablement dû à la taille relativement petite des terpènes par rapport à la cavité de la β -cyclodextrine ne permettant pas ainsi la formation d'un complexe d'inclusion suffisamment stable.

Pour les quatre nouvelles phases stationnaires chirales C, D, E et F, testées en mode normal, les résultats obtenus montrent que la phase stationnaire C présente une meilleure reconnaissance chirale par rapport aux autres phases, suivie de la F ensuite de la E et enfin de

la phase D. Cette différence d'énantiosélectivité entre la phase C et les autres montre le rôle prépondérant du spacer (longueur de la chaîne, importance des fonctions carbamate et ester) dans le mécanisme de la reconnaissance chirale.

D'autre part, nous avons montré à travers l'énantiosélectivité des différents solutés injectés appartenant à différentes familles de produits tels que les produits pharmaceutiques (anti-inflammatoires, benzodiazépines et β -bloquants) ainsi que les herbicides que la reconnaissance chirale en mode normal est due essentiellement aux interactions de types π - π , dipole-dipole et liaisons hydrogène et non pas à la formation du complexe d'inclusion formé entre le soluté et la cyclodextrine comme c'est le cas en mode inverse.

L'utilisation d'un autre solvant organique tel que le chloroforme dans la phase mobile s'est avérée bénéfique afin de séparer un maximum de produits. Cependant, les meilleurs résultats ont été obtenus avec le mélange binaire heptane/2-propanol.

Le remplissage d'une colonne à faible diamètre avec la phase C nous a permis de constater que, par comparaison avec une colonne courante, la rétention est pratiquement la même sur les deux colonnes alors que la résolution est nettement meilleure sur la colonne standard confirmant ainsi les quelques résultats cités dans la littérature.

Enfin, la comparaison de la sélectivité obtenue sur l'une des phases stationnaires préparées dans ce travail à celle donnée par la littérature sur des phases similaires à base de β -cyclodextrine, a montré que la phase C a un pouvoir d'énantiosélectivité comparable pour la plupart des solutés racémiques injectés dans les mêmes conditions.

ANNEXE A

Références bibliographiques utilisées dans ce travail:**Chapitre I : Généralités**

- [1] D. Biot, *Annales de chimie et de physique*, 1820, **15**, 222
- [2] L. Pasteur, *Ann. Chim. Phys.*, 1848, **24**, 442
- [3] J. H. van't Hoff, *Arch. Neerl. Sci.. Exactes Natur.*, 1874, **9**, 445
- [4] J. A. Le Bel, *Bull. Soc. Chim.*, Paris, 1874, **22**, 337
- [5] E. Fisher, *Science*, 1938, **88**, 108
- [6] E. Bijovet, *Endeavour*, 1955, **14**, 71
- [7] R. Bishop, I. Hermansson, B. Jaderlund, G. Lindgren, C. Pernow, *Am. Lab.*, 1986, **18**, 138
- [8] H. J. Schmidt, D. Neubert, *Arch. Toxicol.*, 1998, **62**, 2
- [9] M. F. Grenier-Loustalot, H. Casabianca, *l'Actualité Chimique*, Société Française de Chimie, 1999, **11**, 40-43
- [10] V. R. Meyer, *ACS Symp. Ser.*, 1991, **471**, 217
- [11] J. R. Cronin, S. Pizzarello, *Science*, 1997, **275**, 951
- [12] N.M. Maier, P. Franco, W. Lindner., *J. Chromatogr. A*, 2001, **906**, 3
- [13] A. M. Krstulovic, *Chiral Separation by HPLC*, Ellis Horwood, Chichester, 1989
- [14] S. Hara, J. Cazes, Special Issue on Optical Resolution by Liquid Chromatography, *J. Liq. Chromatogr.*, 1986, **9(241)**, 694
- [15] B. Françoise, A. Michel, P. Tuyel-Nga, J. Vallon, *J. Chromatogr. B*, 1996, **687**, 303
- [16] T. Arai, *J. Chromatogr. B*, 1998, **717**, 295
- [17] D. Gil-Av, B. Feibush, R. Charles-Sigies, *Tetrahedron Lett.*, 1988, 1009
- [18] G. D. Y. Sogah, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, **98**, 3038
- [19] A Harada, M. Furue, S. L. Nozakura, *J. Polymer Sci*, 1978, **16**, 189
- [20] D. W. Armstrong, *J. Liq. Chromatogr.*, 1980, **6**, 895
- [21] T. E. Beesley, R. P. Scott, *Chiral Chromatography*. New York : John Wiley & Sons ; 1998. 506 p
- [22] S. G. Allenmark, in: G. Subramanian (Ed.), *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*, VCH, Weinheim, 1994, p. 183, Chapitre 7
- [23] A. Strandberg, A Nyström, S. Behr, A. Karlsson, *Chromatographia*, 1999, **50**, 215
- [24] A.M. Stalcup, in: G. Subramanian (Ed.), *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*, VCH, Weinheim, 1994, p. 95, Chapitre 5
- [25] T. J. Ward, D. W. Armstrong, in: M. Zief, L. J. Crane (Eds.), *Chromatographic Chiral Separations, Chromatographic Science Series*, Vol. 40, Marcel Dekker, New York, 1988, p. 131, Chapitre 5
- [26] R. A. Menges, D. W. Armstrong, in: S. Ahuja (Ed.), *Chiral Separations by Liquid Chromatography, American Chemical Society*, Washington, DC, 1991, pp. 67-100
- [27] S. M. Han, *Biomed. Chromatogr.*, 1997, **11**, 259
- [28] B. Chankvetadze, M. Saito, E. Yashima, Y. Okamoto, *Chirality*, 1998, **10**, 134
- [29] H. Nishi, *J. Chromatogr. A*, 1997, **792**, 327
- [30] R. Gotti, V. Cavrini, V. Andrisano, G. Mascellani, *J. Chromatogr. A*, 1999, **845**, 247
- [31] K. W. Phinney, L. A. Jinadu, L. C. Sander, *J. Chromatogr. A*, 1999, **857**, 285
- [32] A. Berthod, U. B. Nair, C. Bagwill, D. W. Armstrong, *Talanta*, 1996, **43**, 1767
- [33] D. W. Armstrong, Y. Tang, S. Chen, Y. Zhou, C. Bagwill, J. R. Chen, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 1473
- [34] D. W. Armstrong, Y. Liu, K. H. Ekborg-Ott, *Chirality*, 1995, **7**, 474
- [35] S. Fanali, Z. Aturki, C. Desiderio, P. G. Righetti, *J. Chromatogr. A*, 1999, **838**, 223
- [36] C. Rosini, P. Altemura, D. Pini, C. Bertucci, G. Zullino, P. Salvadori, *J. Chromatogr.*, 1985, **348**, 79

- [37] C. Rosini, C. Bertucci, D. Pini, P. Altemura, P. Salvadori, *Tetrahedron Lett.*, 1985, **26**, 3361
- [38] J. Dingenen, in: G. Subramanian (Ed.), *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*, VCH, Weinheim, 1994, p. 115, Chapitre 6
- [39] E. Yashima, Y. Okamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1995, **68**, 3289
- [40] C. Minguillon, P. Franco, L. Oliveros, P. Lopez, *J. Chromatogr. A*, 1996, **728**, 407
- [41] C. Minguillon, A. Senso, L. Oliveros, *Chirality*, 1997, **9**, 145
- [42] C. Pettersson, E. Hedin, in: G. Subramanian (Ed.), *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*, VCH, Weinheim, 1994, p. 279, Chapitre 9
- [43] N. M. Maier, L. Nicoletti, M. Lämmerhofer, W. Lindner, *Chirality*, 1999, **11**, 522
- [44] W. Pirkle, T. Pochapsky, *Chem. Rev.*, 1989, **89**, 347
- [45] W. Lindner, G. Uray, U. Steiner, *J. Chromatogr.*, 1991, **553**, 373
- [46] L. Sousa, G. Sogah, D. Hoffman, D. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, **100**, 4569
- [47] V. A. Davankov, in: V. A. Davankov, J. D. Navratil, H. F. Walton (Eds), *Ligand Exchange Chromatography*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1988
- [48] G. Blaschke, in: M. Zief, L. G. Crane (Eds), *Chromatographic Chiral Separations*, Marcel Dekker, New York, 1988, p. 179, Chapitre 7
- [49] Y. Okamoto, K. Hatada, in: A.M. Krstulovic (Ed.), *Chiral Separations by HPLC-Applications to Pharmaceutical Compounds*, Wiley, New York, 1989, p. 316, Chapitre 12
- [50] Y. Okamoto, S. Honda, I. Okamoto, H. Huki, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 6971
- [51] S. G. Allenmark, S. Andersson, P. Moller, D. Sanchez, *Chirality*, 1995, **7**, 248
- [52] B. Sellergren, in: G. Subramanian (Ed.), *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*, VCH, Weinheim, 1994, p. 69, Chapitre 4
- [53] I. W. Wainer, *Trends in Analytical Chemistry*, 1987, **6**, 5
- [54] W. H. Pirkle, D. W. House, *J. Org. Chem.*, 1979, **44(12)**, 1957
- [55] Y. Okamoto, *Chem. Lett.*, 1986, 1237
- [56] H. T. Karnes, M. A. Sarkar, *Pharmaceutical Research*, 1987, **4**, 287
- [57] Y. Okamoto, E. Yashima, Chromatographic Enantiomer Separation on Chiral Polymers. In: *Chromatographic Separations Based on Molecular Recognition*, Ed. K. Jinnó, Wiley-VCH, 1997.
- [58] W. H. Pirkle, D. W. House, J. M. Finn, *J. Chromatogr.*, 1980, **192**, 143
- [59] P. Franco, A. Senso, L. Oliveros, C. Minguillon, *J. Chromatogr. A*, 2001, **906**, 155
- [60] W. L. Hinze, D. W. Armstrong, *Anal. Lett.*, 1980, **13**, 103
- [61] D. W. Armstrong, *Patents pending*, USA; Japan, Europe, 1984
- [62] F. Bressole, M. Audran, T-N Pham, J. J. Vallon, *J. Chromatogr. B*, 1996, **687**, 303
- [63] B. Perly, F. Pilard, "Les Cyclodextrines et leur Applications", *CLEFS CEA*, **35**, 1997
- [64] Chiral Separations. *A Guide to using Cyclodextrin bonded phases for liquid chromatography*, ASTEC, BAS Technicol, UK, 1997
- [65] T. J. Ward, D. W. Armstrong, *J. Liq. Chromatogr.*, 1986, **9**, 407

Chapitre II : Utilisation de la β -cyclodextrine comme additif chiral à la phase mobile

- [1] E. S. Keulemansova, S. Krysl, *J. Chromatogr.*, 1980, **184**, 347
- [2] E. Ameyibor, J.T. Stewart, *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, 1997, **20 (6)**, 855
- [3] F. Bressolle, M. Audran, T.N. Pham, J.J. Vallon, *J. Chromatogr. B*, 1996, **687**, 303
- [4] A. Bielejewska, R. Nowakowski, K. Duszczak, D. Sybilska, *J. Chromatogr. A*, 1999, **840**, 159
- [5] J. Debowski, D. Sybilska, J. Jurczak, *J. Chromatogr.*, 1982, **237**, 303

- [6] A. Walhagen, L. E. Edholm, *Chromatographia*, 1991, **32 (5/6)**, 215
- [7] K. Uekama, F. Hirayama, K. Ikada, *J. Pharm. Sci.*, 1977, **66 (5)**, 706
- [8] D. W. Armstrong, J. R. Faulkner, S. M. Han, *J. Chromatogr.*, 1988, **448**, 345
- [9] D. W. Armstrong, J. R. Faulkner, S. M. Han, *J. Chromatogr.*, 1988, **452**, 323
- [10] J. D. Duncan, D. W. Armstrong, *J. Planar. Chromatogr.*, 1990, **3**, 65
- [11] J. Debowski, D. Sybilska, J. Jurczak, *Chromatographia*, 1982, **16**, 198
- [12] D. Sybilska, T. Zukowski, J. Borjaski, *J. Liq. Chromatogr.*, 1986, **9 (2&3)**, 591
- [13] M. Gazdag, G. Szepesi, L. Huszar, *J. Chromatogr.*, 1986, **371**, 227
- [14] R.A. Menges, D. W. Armstrong, Chiral Separations Using Native and Functionalized Cyclodextrin-bonded Stationary phases. In : *Chiral Separations by Liquid Chromatography*. Editeur : S. Ahuja, Washington, 1991
- [15] J. P. C. Vissers, *J. Chromatogr. A*, 1999, **856**, 117
- [16] T. Takeuchi, H. Asai, D. Ishi, *J. Chromatogr.*, 1986, **357**, 409
- [17] L. A. St. Pierre, K. B. Sentell, *J. Chromatogr. B*, 1994, **657**, 291
- [18] X. Xu, J. T. Stewart, *J. Pharm & Biom. Anal* , 2000, **23**, 735
- [19] P. Jandera, S. Bunvekova, J. Planeta, *J. Chromatogr. A*, 2000, **871**, 139
- [20] S. M. Han, *Biomedical Chromatography*, 1997, **11**, 259
- [21] C. Roussel, A. Favrou, *J. Chromatogr. A*, 1995, **704**, 67.
- [22] T. Higashi, A. Ogasawara, K. Shimada, *J. Liq. Chrom & Rel. Technol.*, 2000, **23 (16)**, 2475
- [23] S. Gorög, M. Gazdag, *J. Chromatogr. B*, 1994, **659**, 51.
- [24] D. Sybilska, M. Asztemborska, A. Bielejewska, *Chromatographia*, 1993, **35**, 637
- [25] H. Lamparczyk, P. K. Zarzycki, J. Nowakowska, *J. Chromatogr. A*, 1994, **668**, 413
- [26] H. Lamparczyk, P. K. Zarzycki, R. J. Ochocka, D. Sybilska, *Chromatographia*, 1991, **31**, 157
- [27] R. H. Pullen, J. J. Brennan, G. Potanay, *J. Chromatogr. A*, 1995, **691**, 187
- [28] M. Gazdag, G. Szepesi, L. Huszar, *J. Chromatogr.*, 1986, **351**, 128
- [29] K. Fujimura, T. Ueda, M. Kitagawa, H. Takayanagi, T. Ando, *Anal. Chem.*, 1986, **58**, 2668
- [30] M. Gazdag, G. Szepesi, L. Huszar, *J. Chromatogr.*, 1988, **436**, 31
- [31] M. Gazdag, G. Szepesi, K. Mihalyfi, *J. Chromatogr.*, 1988, **450**, 145
- [32] G. B. Cox, R. W. Stout, *J. Chromatogr.*, 1987, **384**, 315
- [33] B. A. Bidlingmeyer, J. K. DelRios, J. Korpl, *Anal. Chem.*, 1982, **54**, 442
- [34] M. Sueyasu, T. Ikeda, K. Otsubo, *J. Chromatogr. B*, 1995, **665**, 133
- [35] A. D. Cooper, T. M. Jefferies, *J. Chromatogr.*, 1993, **637**, 137
- [36] F. Tazerouti, A. Y. Badjah, B. Y. Meklati. *Communication au 3^{ème} Congrès de la Société Algérienne de Chimie (S.A.C.)*, 2-4/5/1995, Annaba.
- [37] G. Crini, M. Morcellet, *J. Chromatogr. Sci*, 1996, **34**, 485

Chapitre III : Synthèse et caractérisation des phases stationnaires chirales à base de β -Cyclodextrine

- [1] Y. Okamoto, E. Yashima, *Chromatographic Separations Based on Molecular Recognition*, edited by K. Jinno, Wiley-VCH, New York, 1997
- [2] D. W. Armstrong, *LC-GC* , 1992 , **9** , 647
- [3] Chiral Separations , *A Guide to Using Cyclodextrins Bonded Phases for HPLC* , Astec, Advanced Separation Technologies Inc . , 1997 , UK .
- [4] A. Harada , M. Furue , S. Nozakura , *J. Polym. Sci.* , 1978, **16**, 187.
- [5] B. Zsardon , F. Szilasi , F. Tudos , J. Szejtli , *J. Chromatogr.*, 1981, **208**, 109.

- [6] B. Zsardon , L. Decsei , M. Szilasi , F. Tudos , *J. Chromatogr.*, 1983, **270**, 127.
- [7] Y. Mizobuchi , M. Tanaka, T. Shono, *J. Chromatogr.*, 1980, **194**, 153.
- [8] Y. Mizobuchi, M. Tanaka, T. Shono, *J. Chromatogr.*, 1981, **208**, 35.
- [9] M. Tanaka, Y. Kawaguchi, M. Nakae, Y. Mizobuchi, *J. Chromatogr.*, 1982, **246**, 207
- [10] K. Fujimura, T. Ueda, T. Ando, *Anal. Chem.*, 1983, **55**, 446
- [11] Y. Kawaguchi, M. Tanaka, M. Nakae, K. Funazo, T. Shono, *Anal. Chem.*, 1983, **55**, 1852
- [12] D. W. Armstrong, W. De Mond, *J. Chromatogr. Sci.*, 1984, **22**, 411
- [13] R. A. Menges, D. W. Armstrong. *Chiral Separations Using Native and Functionalized Cyclodextrin-Bonded Stationary Phases in HPLC: Chiral Separation by Liquid-Chromatography*, edited by S. Ahuja, Ciba-Geigy Corporation, American Chemical Society, Washington, DC 1991, 67
- [14] F. Bressolle, M. Audran, T.N. Pham, J.J. Vallon, *J. Chromatogr. B*, 1996, **687**, 303.
- [15] S.M. Han, *Biomed. Chromatogr.*, 1997, **11**, 259
- [16] N. Thuaud, B. Seville, A. Deratani, B. Popping, C. Pellet, *Chromatographia*, 1993, **36**, 373.
- [17] B. Seville, M. Guillaume, C. Vidal-Madjar, N. Thuaud, *Chromatographia*, 1997, **45**, 383
- [18] N. Thuaud, B. Seville, *J. Chromatogr. A*, 1994, **685**, 15
- [19] A.M. Stalcup , *Cyclodextrin Bonded Chiral Stationary Phases in Enantiomer Separation : A Practical Approach to Chiral Separation by Liquid Chromatography* , edited by Subramanian, 1994, New York.
- [20] K. Nakamura, H. Fujimura, H. Kitagawa, H. Wada, K. Makino, *J. Chromatogr. A*, 1995, **694**, 111.
- [21] F. Tazerouti, A.Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B.Y. Meklati, G. Dewinter, J.L. Montero, *Algerian Journal of Advanced Materials*, 1998, **2**, 69
- [22] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, F. Pilar, C. Minguillon, *Chirality* **13**, sous presse.
- [23] H.J. Schneider, F. Hacket, V. Rudiger, H. Ikeda, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 1755.
- [24] R.M. Silverstein, G.C. Bassler, T.C. Morill, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5^{ème} Edition, John Wiley & Sons, 1991.
- [25] G. Crini , M. Morcellet , *J. Chromatogr. Sci.*, 1996, **34**, 477.
- [26] Y. Berezmitski, M. Jaroniec, M. E. Gangoda , *J. Chromatogr. A*, 1998, **828**, 59.
- [27] M. Pursch, L.C. Sarrder, K. Albert, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 4107
- [28] E. Bayer , K. Albert, T. Reiners, M. Nieder, D. Muller, *J. Chromatogr.*, 1983, **264**, 197.
- [29] K. Albert, E. Bayer, *J. Chromatogr.*, 1991, **544**, 345
- [30] B. Buszewski, R.M. Gadzata-Kopciuch, M. Markuszewski, R. Kaliszan, *Anal. Chem.*, 1997, **69**, 3277.
- [31] J. Nawrocki , *J. Chromatogr. A*, 1997, **779**, 29.
- [32] A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, F. Tazerouti, B. Y. Meklati, Communication au 2nd *Mediterranean Basin Conference on Analytical Chemistry*, 23-28 / 11 / 1997, Rabat, Maroc.
- [33] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, Communication au 2^{ème} *Colloque National sur l'Elaboration et la Caractérisation des Matériaux*, 2-3/06/1998, U.S.T.H.B., Alger.
- [34] G.E. Maciel, D.N. Sindrof, V.J. Bartuska, *J. Chromatogr.*, 1981, **205**, 438.
- [35] G. Schomburg, A. Deege, J. Köhler, U.B. Vogelsang, *J. Chromatogr.*, 1983, **282**, 27
- [36] D. Rong, V. T. D' Souza, *Tetrahedron Lett.*, 1990, **31 (30)**, 4275.

Chapitre IV : Remplissage des colonnes pour chromatographie liquide

- [1] R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, *Manuel Pratique de Chromatographie en Phase Liquide*, Masson, 2^{ème} édition, 1982.
- [2] J.J. Kirkland, *J. Chromatogr. Sci.*, 1972, **10**, 593
- [3] J.J. Kirkland, *J. Chromatogr. Sci.*, 1971, **9**, 206
- [4] R. E. Majors, *Anal. Chem.*, 1972, **44**, 1722
- [5] J. Asshauer, I. Halasz, *J. Chromatogr. Sci.*, 1974, **12**, 139
- [6] B. Coq, C. Gonnet, J. L. Rocca, *J. Chromatogr.*, 1975, **106**, 249
- [7] J. M. Bather, R. A. C. Gray, *J. Chromatogr.*, 1976, **122**, 159
- [8] H. R. Linder, H. P. Keller, R. W. Frei, *J. Chromatogr. Sci.*, 1976, **14**, 234
- [9] J. J. Kirkland, P. E. Antle, *J. Chromatogr. Sci.*, 1977, **15**, 137
- [10] M. Broquaire, *J. Chromatogr.*, 1979, **170**, 43
- [11] W. Strubert, *Chromatographia*, 1973, **6**, 50
- [12] J. H. Knox, A. Pryde, *J. Chromatogr.*, 1975, **112**, 171
- [13] M. Caude, L. Phan, B. Terlain, J. P. Thomas, *J. Chromatogr. Sci.*, 1975, **13**, 390
- [14] D. Bar, M. Caude, R. Rosset, *Analisis*, 1976, **4(3)**, 108
- [15] P.A. Bristow, P.N. Brittain, C.M. Rilley, B.F. Williamson, *J. Chromatogr.*, 1977, **131**, 57
- [16] E. J. Kikta, Jr., *J. Liq. Chromatogr.*, 1979, **2(1)**, 129

Chapitre V : Application des PSCs synthétisées en C.L.H.P.

- [1] D.W. Armstrong, A.M. Stalcup, M.L. Hilton, J.D. Duncan, J.R. Faulkner, S.C. Chang, *Anal. Chem.*, 1990, **62**, 1610.
- [2] D.W. Armstrong, C.D. Chang, S.H. Lee, *J. Chromatogr. A*, 1991, **539**, 83.
- [3] C. Cachau, A. Thienpont, M.H. Souldard, G. Felix, *Chromatographia*, 1997, **44**, 411.
- [4] S. Li, W.C. Purdy, *J. Chromatogr.*, 1992, **625**, 109.
- [5] C.E. Dalgliesh, *J. Chem. Soc.*, 1952, **137**, 3940.
- [6] S.M. Han, *Biomed. Chromatogr.*, 1997, **11**, 259.
- [7] K. Fujimura, S. Suzuki, K. Hayashi, S. Masuda, *Anal. Chem.*, 1990, **62**, 2198.
- [8] K.G. Feitsma, J.Bosman, B.F.H. Drenth, R.A. De Reeuw, *J. Chromatogr.*, 1985, **333**, 59.
- [9] A. Bielejewska, R. Nowakowski, K. Duszcyk, D. Sybilska, *J. Chromatogr. A*, 1999, **840**, 159.
- [10] F. Bressole, M. Audran, T.N. Pham, J.J. Vallon, *J. Chromatogr. B*, 1996, **687**, 303.
- [11] L. Coventry, Chp. 8, in : *Chiral Liquid Chromatography*, édité par W.J. Lough, BLACKIE & Son Ltd, 1989.
- [12] R.A. Menges, D.W. Armstrong, Chp. 4 in : *Chiral Separation by Liquid Chromatography*, édité par Satinder Ahuja, 1990.
- [13] T.J. Ward, D.W. Armstrong, Chp.5 in : *Chromatographic Chiral Separation*, édité par M. Zief, L.J. Crane, 1988.
- [14] I. Ciucanu, *J. Chromatogr. A*, 1996, **727**, 195.
- [15] C.A. Chang, Q. Wu, L. Tan, *J. Chromatogr.*, 1986, **361**, 199.
- [16] C.A. Chang, Q. Wu, D.W. Armstrong, *J. Chromatogr.*, 1986, **354**, 454.
- [17] H.G. Issaq, J.H. Mc Connell, D.E. Weiss, D.G. Williams, J.E. Saavedra, *J. Liq. Chromatogr.*, 1986, **9(8)**, 1783.
- [18] A.M. Stalcup, *Cyclodextrin Bonded Chiral Stationary Phases in Enantiomer Separation*, edited by G. Subramanian, *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*, VCH, Germany, Ch. 5, 1994.

- [19] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, Communication au 2^{ème} *Symposium National sur la Chimie Organique Industrielle et Pharmaceutique*, 03-06 / 05 /1996, Biskra.
- [20] D.W. Armstrong, W. De Mond, A. Alak, W.L. Hinz, T.E.Riehl, K.H. Bui, *Anal. Chem.*, 1985, **57**, 234.
- [21] G. Crini, Y. Leckchini, M. Morcellet, *Chromatographia*, 1995, **40 (5/6)**, 296.
- [22] K. Fujimura, T. Ueda, M. Kitagawa, H. Takayanagi, T. Ando, *Anal. Chem.*, 1986, **58**, 2668.
- [23] J. Szeman, K. Ganzler, *J. Chromatogr. A*, 1994, **668**, 509.
- [24] H. Lamparczyk, P.K. Zarzycki, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1995, **13**, 543.
- [25] P.K. Zarzycki, M. Wierzbowska, H. Lamparczyk, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1996, **14**, 1305.
- [26] P.K. Zarzycki, M. Wierzbowska, H. Lamparczyk, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1997, **15**, 1281.
- [27] R.M. Mohseni, R.J. Hurtubise, *J. Chromatogr.*, 1991, **537**, 61.
- [28] K. Cabrera, D. Lubda, *J. Chromatogr. A*, 1994, **666**, 433.
- [29] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, Communication au 2nd *Mediterranean Basin Conference on Analytical Chemistry*, 23-28 / 11 / 1997, Rabat, Maroc.
- [30] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, G. Dewinter, J. L. Montero, *Algerian Journal of Advanced Materials*, 1998, **1 (2)**, 69.
- [31] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, F. Pilar, C. Minguillon, *Chirality*, sous presse
- [32] B. Chankvetadze, E. Yashima, Y. Okamoto, *Chirality*, 1996, **8**, 402.
- [33] D. Mc Daniel, B. Snider, *J. Chromatogr.*, 1987, **404**, 123.
- [34] I. Wainer, T. Doyle, *J. Chromatogr.*, 1984, **284**, 117.
- [35] H. Aboul-Enein, S. Bakr, *J. Liq. Chromatogr.*, 1992, **15**, 1983.
- [36] W. Pirkle, P. Murray, *J. Liq. Chromatogr.*, 1990, **13**, 2123.
- [37] W. Pirkle, J. Mc Cune, *J. Chromatogr.*, 1989, **471**, 271.
- [38] W. Pirkle, C. Welch, *J. Liq. Chromatogr.*, 1992, **15**, 1947.
- [39] J. Andersen, S. Hanses, *J. Chromatogr.*, 1992, **577**, 362.
- [40] J. Hermansson, M. Eriksson, *J. Liq. Chromatogr.*, 1986, **9**, 621.
- [41] C. Patterson, C. Gioeli, *J. Chromatogr.*, 1988, **435**, 225.
- [42] M.D. Beeson, G. Vigh, *J. Chromatogr.*, 1993, **634**, 197.
- [43] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, C. Minguillon, Communication au 5^{ème} *Congrès de la SAC*, 11-13/05/1999, Béjaïa.
- [44] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, C. Minguillon, Communication au 23rd *International Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and related Techniques*, 30 mai, 1-4/06/1999, Grenade, Espagne
- [45] D.W. Armstrong, M. Hilton, L. Koffin, *LC-GC*, 1992, **9**, 647.
- [46] D.W. Armstrong, S. Chen, C. Chang, *J. Liq. Chromatogr.*, 1992, **15**, 545.
- [47] F.H. Meyers, E. Jawetz, A. Goldfien, *Review of Medical Pharmacology*, 7th Ed. Lange Medical Publications, Los Altos, 1980, p 95-104.
- [48] G. Félix, C. Cachau, A. Thienpont, M.H. Soulard, *Chromatographia*, 1996, **42**, 583.
- [49] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, C. Minguillon, Communication au 3rd *Annual Conference of the Colleges of Pharmacy in the Arab World*, 14-16/10/1999, Tanta, Egypt.
- [50] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, C. Minguillon, Communication au 3rd *Mediterranean Basin Conference on Analytical Chemistry*, 4-9/06/2000, Antalya, Turquie.

- [51] Y.Z. Hsieh, H.Y. Huang, *J. Chromatogr. A*, 745 (1996) 217.
- [52] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, C. Minguillon, communication au *Congrès de la Société Française de Chimie*, 18-22/09/2000, Rennes, France
- [53] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, C. Minguillon, communication au *4^{ème} Symposium National sur la Chimie Organique Industrielle et Pharmaceutique*, 14-15/11/2000, Ouargla, Alger.
- [54] K. Weber, R. Kreuzig, M. Belhadir, *Chemosphere*, 1997, **35**, 13.
- [55] T. Cserhati, E. Forgacs, *J. Chromatogr. B*, 1998, **717**, 157.
- [56] A. Lagana, G. Fago, A. Marino, *J. Chromatogr. A*, 1998, **796**, 309.
- [57] J.M. Schneiderheinze, D.W. Armstrong, A. Berthod, *Chirality*, 1999, **11**, 330.
- [58] Y.Z. Hsieh, H.Y. Huang, *J. Chromatogr.*, 1996, **745**, 217.
- [59] A.W. Garrison, P. Schmitt, A. Kettrup, *J. Chromatogr.*, 1994, **688**, 317.
- [60] M.W.F. Nielen, *J. Chromatogr.*, 1993, **637**, 81.
- [61] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, C. Minguillon, communication aux *2^{ème} Journées sur l'Analyse Physico-Chimique: pesticides et environnement*, CRAPC, 8-19/12/1998, Alger.
- [62] F. Tazerouti, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B. Y. Meklati, C. Minguillon, communication au *1st North-African and Middle-Eastern Conference on Environmental Analytical and Sanitary Chemistry*, 8-11/03/1999, Tunis.
- [63] T. Hargitai, Y. Kaida, Y. Okamoto, *J. Chromatogr.*, 1993, **628**, 11.
- [64] A. Bertod, S-C Chang, D. W. Armstrong, *Anal. Chem.*, 1992, **64**, 395.

ANNEXE B

Chapitre II: UTILISATION DE LA CYCLODEXTRINE COMME ADDITIF CHIRAL A LA PHASE MOBILE EN CLHP

Chromatographe Waters comprenant :

- 2 pompes M 6000 A;
- Injecteur U6 K;
- Détecteur à absorptiométrie UV-V , M 440 à λ : 254 nm;
- Dispositif gradient d'élution;
- Colonne Waters (μ -Bondapack C₁₈), (300 x 4,6 mm D.I.)
- Intégrateur : ChromJet.

La composition de la phase mobile est: méthanol/eau : 40:60 (v/v). On fait varier la concentration de la β -CD de 0-5 mM en travaillant avec 2 pompes (A et B) où A correspond à 100 % (MeOH/H₂O : 40/60) et B correspond à une solution de 40 % MeOH contenant 5 mM de CD.

L'éluant doit être filtré puis dégazé aux ultrasons.

Le temps mort est obtenu par injection d'un soluté non retenu (NaNO₃).

Chapitre III: REMPLISSAGE DES COLONNES POUR LA CLHP

Méthode 1 : Appareil Micromeritics, model 705, USA (colonne A).

Méthode 2 : Chromatem System, Touzart & Matignon (France), pompe Haskel (colonnes B et C) et ColoChrom (Paris) (colonnes D, E et F)

Chapitre V: APPLICATION DES PSCs SYNTHETISEES EN CLHP

I) Colonnes A et B :

Appareil Waters : Injecteur U6 K;

2 pompes M 6000 A;

Dispositif gradient d'élution;

Détecteur UV : Model 441 à longueur d'onde λ = 254 nm;

Intégrateur : ChromJet.

II) Colonnes C et C' :

Appareil Waters : Autosampler 717;

Pompe 600;

Détecteur à barettes de photodiodes (PDA) 996 (Waters, Milford, MA,USA).

III) Colonnes D, E et F :

- a) Appareil TSP : Système de dégazeur de phase mobile;
Pompe : SpectraSERIES P200;
Autosampler : SpectraSERIES AS 300;
Décteur UV à longueur d'onde variable : SpectraSERIES UV 150;
Intégrateur : ChromJet.
- b) Appareil Waters : Pompe quaternaire 600 E;
Injecteur réodine 7725 i (boucle 20 µl);
Décteur à barettes de photodiodes (PDA) 996 (Waters, Milford, MA, USA).