

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE

HOUARI BOUMEDIENE

Faculté de Chimie



MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de MAGISTER

EN : CHIMIE

Spécialité : CHIMIE ORGANIQUE APPLIQUEE

Par

M^r DERBOUZ Sofiane

Sujet

***Application de la chromatographie liquide
à l'analyse de molécules basiques
biologiquement actives***

Soutenu publiquement, le 03/10/2011, devant le jury composé de :

M A. DAHMANI	<i>Professeur à l'U.S.T.H.B</i>	<i>Président</i>
M^{me} S. GUERMOUCHE	<i>Professeur à l'U.S.T.H.B</i>	<i>Directrice de mémoire</i>
M^{me} O. FERROUKHI	<i>Maître de Conférences A à l'U.S.T.H.B</i>	<i>Examinatrice</i>
M Y. FOUJIL-CHERIF	<i>Maître de Conférences A à l'U.S.T.H.B</i>	<i>Examineur</i>

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de chromatographie de la faculté de chimie de l'USTHB, dirigé par monsieur le professeur Moulay Hassan Guermouche. Qu'il trouve ici mes sincères remerciements pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et fait découvrir la grande richesse des sciences analytiques et séparatives.

Je tiens à remercier sincèrement madame le professeur GUERMOUCHE Saliha d'avoir voulu accepter d'être mon directeur de thèse. Aussi, je la remercie encore pour la confiance qu'elle m'a accordée et de la liberté qu'elle m'a laissée pour mener à bien ce travail.

Je remercie encore :

Monsieur A. DAHMANI, professeur au sein de notre faculté, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de mémoire.

Monsieur, Y. FOUJIL-CHERIF maître de conférences au sein de notre faculté, qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de mémoire.

Madame O. FERROUKHI, maître de conférences, qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de mémoire.

Je remercie tout qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Enfin, je tiens à remercier ma famille pour son soutien permanent.

DEDICACES

Je dédie mon mémoire de magister :

*A mon père qui n'est plus. Que Dieu l'accueille
dans son vaste Paradis*

A ma mère.

A mes chers frères.

A mes sœurs.

A toute ma famille, surtout Zahia.

A tous mes ami(e)s.

ABBREVIATIONS

Log P_{ow} : Logarithme du coefficient de partage octanol-eau

GPC : Chromatographie de perméation sur gel

GFC : Chromatographie de filtration sur gel

poly (META-co-PETA) : Copolymérisation de 2-(méthacryloyloxy)éthyltriméthylammonium méthyl sulfate (META) et pentaérythritol triacrylate (PETA).

SPE : Extraction en phase solide

PP : Précipitation des protéines

LLE : Liquide-liquide extraction

ESI-MS : Ionisation par électronébuliseur - masse spectrométrie

LC-MS : Liquide chromatographie masse spectrométrie

LC-MS/MS : Liquide chromatographie tandem masse spectrométrie

CDP-Choline : Cytidine 5'-diphosphate choline

PHBM : Parahydroxybenzoate de méthyle

PHBP : Parahydroxybenzoate de propyle

Qsp : Quantité suffisante pour

RSDinter : Erreur systématique inter laboratoire (manipulateurs)

RSDintra : Erreur systématique intra laboratoire (méthode et appareillage)

RSDtotale : Erreur systématique totale

SOMMAIRE

Introduction	2
GENERALITES SUR LA CHROMATOGRAPHIE	
Historique et développement	5
Classification des méthodes chromatographiques	5
1. Classification selon la nature des phases	5
2. Classification selon le phénomène chromatographique	6
3. Classification selon les procédés utilisés	6
4. Classification selon les paramètres intervenant dans la séparation	7
Buts de la chromatographie	7
Objectif analytique	7
Objectif préparatif	7
Système chromatographique	8
Un ou plusieurs réservoirs	8
La pompe	8
L'injecteur	9
La colonne	9
Le détecteur	9
L'intégrateur – enregistreur	10
La théorie de la chromatographie	10
Description des paramètres	10
Paramètres liés à la rétention	11
Paramètres liés à la l'efficacité	12
Paramètres liés à la séparation	13
Les modes de la chromatographie en phase liquide a haute performance	14
1. La phase normale	14
1.1.La phase stationnaire	14
1.2.La phase mobile	14
1.3.Influence de la polarité des composés	14
1.4.Influence de la polarité de la phase mobile	15
1.5.Influence de la température	16
2. La phase inverse	17
2.1.La phase stationnaire	17
2.2.La phase mobile	17
2.3.Influence de la composition de la phase mobile	17
2.4.Influence du pH	18

3. La chromatographie ionique -----	19
3.1.La phase stationnaire -----	19
3.2.La phase mobile -----	19
3.3.Influence de la charge du soluté -----	19
3.4.Influence de la force ionique -----	19
4. La chromatographie d'exclusion -----	20
4.1.La phase stationnaire -----	20
4.2.La phase mobile -----	20
5. La chromatographie d'interactions hydrophiliques -----	21
5.1.Historique -----	21
5.2.La phase stationnaire -----	22
5.3.La phase mobile -----	22
5.3.1. La partie organique -----	22
5.3.2. La partie aqueuse -----	23
5.4.Mécanismes de séparation -----	23
5.5.Domains d'application -----	24
5.6.Les avantages -----	25
5.7.Les inconvénients -----	25

VALIDATION D'UNE METHODE ANALYTIQUE

Introduction -----	27
Définition de la validation d'une méthode analytique -----	27
Objectif de la validation -----	27
Les critères de validation -----	27
1. La spécificité -----	28
2. Linéarité -----	28
3. La linéarité en présence du placebo -----	28
4. la fidélité -----	29
4.1.La répétabilité -----	29
4.2.La fidélité intermédiaire -----	29
5. Exactitude -----	29
6. Limite de détection LOD et limite de quantification LOQ -----	30
7. Stabilité -----	30

CITICOLINE

Généralité -----	32
Pharmacocinétique -----	32
Propriétés -----	33

PARTIE EXPERIMENTALE

1. Appareillage -----	35
2. Réactifs -----	35
3. Préparation des solutions -----	35
3.1. Préparation de la phase mobile -----	35
3.2. Le diluant -----	35
4. Préparation des échantillons pour la validation -----	35
4.1.La spécificité -----	35
4.2.La linéarité -----	36
4.3.La linéarité en présence du placebo -----	37
4.4.La fidélité -----	37
4.5.L'exactitude -----	37
4.6.Limite de détection et limite de quantification -----	38
4.7.La stabilité -----	38
5. L'analyse du produit fini -----	38

RESULTATS ET DISCUSSION**OPTIMISATION DE LA PHASE MOBILE**

1. Choix de la phase stationnaire -----	41
2. Optimisation de la phase mobile -----	41
2.1. Influence de la quantité d'eau -----	41
2.2. Influence de la force ionique -----	42
2.3. Influence du pH -----	43
2.4. Influence de la température -----	45
2.5. Influence du débit de la phase mobile -----	47
Conditions retenues pour l'analyse de la citicoline en mode HILIC -----	48
3. Choix de la longueur d'onde -----	49

VALIDATION DE LA METHODE

1. La spécificité -----	51
2. La linéarité -----	53
3. La linéarité en présence du placebo -----	56
4. La fidélité -----	57
5. L'exactitude -----	58
6. Limite de détection et limite de quantification -----	59
7. La stabilité -----	59

DOSAGE DU PRODUIT FINI

Dosage du produit fini -----	61
Conclusion -----	64
Références -----	67

INTRODUCTION

Introduction :

La chromatographie liquide est, de loin, le mode de séparation le plus utilisé dans le domaine de l'analyse des produits pharmaceutiques. Pour couvrir un nombre important d'applications, plusieurs modes d'interactions ont été développés en fonctions des caractéristiques des molécules à analyser. Par exemple : la chromatographie à polarité de phase inversée (RPLC) et la chromatographie à polarité de phase normale (NPLC). Avec l'apparition des phases greffées, notamment la silice microporeuse greffée octadécyle C18, et l'utilisation de phases mobiles hydro-organiques, son champ d'utilisation s'est largement développé. La mise au point de phases stationnaires dans le but d'améliorer l'efficacité des colonnes, la stabilité vis-à-vis du pH et la sélectivité a permis de répondre aux besoins croissants de l'analyse. Cependant, les molécules très polaires sont toujours difficiles à analyser. En HPLC, une analyse acceptable exige des facteurs de rétention supérieurs à 2. Les molécules polaires, lorsqu'elles sont analysées en mode inverse ont des temps de rétention proches du temps mort et en mode normale elles sont fortement retenues par la phase stationnaire. En plus dans ce mode, l'adsorption du soluté peut devenir irréversible ce qui entrainera une modification de la phase stationnaire.

La chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC) est considérée comme une alternative à la RPLC pour l'analyse des composés polaires, solubles dans l'eau. Connue depuis plus de 35 ans, cette technique n'est rentrée que récemment dans le langage courant. La chromatographie d'interactions hydrophiliques (HILIC) est un mode chromatographique tout indiqué pour l'analyse de petites molécules polaires sur une phase stationnaire polaire, à l'aide d'une phase mobile hydro-organique. Les phases mobiles utilisées sont un mélange d'eau, de tampon et de solvants organiques. Les phases stationnaires sont des supports polaires présentant une forte hydrophilie tels que la silice, les phases polaires greffées, les polymères polaires et les échangeurs d'ions, qui présentent toutes une facilité à adsorber l'eau. Le mode HILIC est également appelé «phase normale aqueuse» ou «phase inverse inversée». Il s'avère être une alternative très intéressante aux modes normale et inverse. En effet, la nature des phases mobiles utilisées s'accorde bien avec la préparation des échantillons biologiques (plasma, urine, aliments, etc.) et permet un couplage aisé avec des détecteurs

nécessitant une désolvatation tels les spectromètres de masse (SM) et les détecteurs évaporatifs à diffusion de lumière (DEDL). De plus, il existe sur le marché une grande variété de phases stationnaires permettant la séparation et le dosage de molécules polaires très diverses. L'acétonitrile est le solvant de choix pour la chromatographie en mode HILIC et ce, malgré son coût et sa disponibilité qui a connu récemment des aléas. Dans ce contexte, le méthanol peut aussi être utilisé en mode HILIC. Il constitue non seulement une alternative économique intéressante mais offre de plus une sélectivité différente permettant de mener à bien certaines séparations. Ce mode connaît un développement important ces dernières années illustré par le nombre croissant d'articles publiés.

Dans ce travail, nous nous proposons de rechercher les conditions optimales de l'analyse de la citicoline par chromatographie liquide en mode HILIC. En effet, la polarité de ce composé : $\log P_{ow} = -7.07$, nous laisse penser que le mode HILIC est tout indiqué pour son analyse.

Le premier chapitre comprend un aperçu bibliographique sur la chromatographie, la validation d'une méthode analytique et quelques propriétés de la citicoline.

La technique expérimentale utilisée au cours de notre travail, l'HPLC sera présentée dans le chapitre II.

Dans une troisième partie, nous nous intéresserons à la recherche des conditions optimales de l'analyse de la citicoline en mode HILIC. Pour cela, l'optimisation sera faite sur la base de l'étude de l'influence de différents paramètres sur les grandeurs chromatographiques (temps et facteur de rétention, facteur de symétrie, efficacité). Il s'agit de :

- % en eau
- Force ionique
- pH
- Température.

La méthode retenue sera validée en déterminant les paramètres classiques de validation. Il s'agit de la spécificité, la linéarité, la fidélité, l'exactitude, les limites de détection et de quantification et la stabilité.

La méthode validée sera appliquée au dosage de la citicoline dans une préparation pharmaceutique.

GENERALITES
SUR
LA
CHROMATOGRAPHIE

Historique et développement :

La chromatographie est une méthode physico-chimique de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases. L'une d'elles, la phase stationnaire, est constituée par un lit de matériau fixe où s'infiltré la deuxième phase qui est la phase mobile.

Chaque constituant adopte une vitesse de migration qui lui est propre en fonction de sa solubilité dans la phase mobile et/ou de son affinité pour la phase stationnaire qui tend à le retenir. Elle a été découverte par le botaniste russe Tswet en 1903. Après 10 ans, Palmer et Dhere ont constaté le même phénomène décrit par Tswet.

En 1931, Leadrek, Kuhn et Winterstein ont travaillé sur la purification des xanthophylles sur une colonne CaCO_3 suivant le processus décrit par Tswet.

Martin et Synge suite à leurs travaux sur la chromatographie de partage ont obtenu le prix Nobel de chimie en 1952.

La nouvelle forme de la chromatographie liquide est attribuée à Horvath qui après avoir développé des phases stationnaires pour la chromatographie en phase gazeuse les a utilisées en chromatographie liquide. Ces phases ont montré une grande résistance au débit de la phase mobile. Les avancées technologiques ont permis d'assurer un écoulement constant de la phase mobile, c'est l'origine de la chromatographie liquide à haute pression. Après, en 2001, le mot pression a été remplacé par performance [1,2].

Classification des méthodes chromatographiques :

On peut classer les différents types de chromatographie de plusieurs façons :

1. Classification selon la nature des phases :

- ✚ La phase mobile est un fluide : un liquide, un gaz ou un fluide supercritique. Selon le fluide utilisé, la technique sera nommée chromatographie en phase liquide CPL (LC), chromatographie en phase gazeuse CPG (GC) et chromatographie en phase supercritique CPS (SFC).
- ✚ La phase stationnaire est solide ou liquide (fixé sur un support solide).

La combinaison de ces possibilités conduit à :

- Pour la chromatographie en phase liquide :
 - Chromatographie liquide/solide (LSC).
 - Chromatographie liquide/liquide (LLC).
- Pour la chromatographie en phase gazeuse :
 - Chromatographie gaz/solide (GSC).
 - Chromatographie gaz/liquide (GLC).
- La chromatographie supercritique (SFC) : elle représente un cas intermédiaire entre la chromatographie en phase liquide et la chromatographie en phase gazeuse, les fluides supercritiques possèdent des propriétés à la frontière entre celles des liquides et celles des gaz.

2. Classification selon le phénomène chromatographique :

Ce dernier dépend de la nature et de la structure de la phase stationnaire utilisée. On distinguera donc :

- ✚ La chromatographie d'adsorption (LSC, GSC) : lorsque la phase stationnaire est solide.
- ✚ La chromatographie de partage (LLC, GLC) : lorsque la phase stationnaire est un liquide non miscible avec la phase mobile (mise en jeu de coefficients de partage).
- ✚ La chromatographie d'échange d'ions (IEC) : où la phase stationnaire porte des groupes fonctionnels acides ou basiques, destinés à séparer des composés ionisés.
- ✚ La chromatographie d'exclusion (SEC) : où la phase stationnaire (poreuse) se comporte comme un tamis et sépare les composés en fonction de leur taille; on parle aussi de chromatographie sur gel (GPC, GFC).

3. Classifications selon les procédés utilisés :

- ✚ Selon le conditionnement de la phase stationnaire :
 - La chromatographie sur colonne.
 - La chromatographie sur papier.

- La chromatographie sur couche mince.

✚ Selon les modalités de migration de la phase mobile :

- La chromatographie par développement (les constituants de l'échantillon restent sur la phase stationnaire).
- La chromatographie d'élution (les substances sont entraînées hors de la phase stationnaire).

4. Classification selon les paramètres intervenant dans la séparation :

Les paramètres physico-chimiques sur lesquels reposent les principes de séparation sont :

- La polarité et/ou l'hydrophobicité : phase normale, inverse ou interactions hydrophiliques.
- La charge électrique : échange d'ions.
- La taille et la forme : exclusion sur gel.

Buts de la chromatographie :

On peut distinguer deux objectifs principaux :

Objectif analytique :

Il s'agit d'identifier des solutés qualitativement et/ou quantitativement, l'opération se fait par le seul processus chromatographique, auquel peuvent être associées, en passage direct, d'autres techniques analytiques chimiques ou physico-chimiques destinées à faciliter l'analyse qualitative (on qualifie cela le couplage). Les quantités analysées doivent être extrêmement minimales afin de ne pas s'écarter des règles d'idéalité de la thermodynamique (le coefficient de partage n'est autre qu'une constante d'équilibre thermodynamique, où les activités intervenant ne sont égales aux concentrations que si elles sont très faibles). Les systèmes de détection devront donc être très sensibles.

Objectif préparatif :

Les concentrations des solutés sont ici importantes et on travaille hors des règles d'idéalité thermodynamiques. Les quantités produites demeurent cependant faibles

(de l'ordre du kg/jour) et le procédé ne sera utilisé que pour préparer des substances rares, sensibles à la chaleur.

Système chromatographique :

Une installation de chromatographie liquide à haute performance comporte divers modules spécialisés. Ces modules sont reliés entre eux par l'intermédiaire de canalisations de très faible diamètre interne (0,1 mm) et résistant à des fortes pressions (350 bars) pour assurer la circulation de la phase mobile.

Le système chromatographique se compose de :

✚ Un ou plusieurs réservoirs :

C'est une(des) bouteille(s) en verre dans laquelle(lesquelles) plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon. Elle(s) contient la phase mobile en quantité suffisante, qui peut être soit un solvant pur soit des mélanges de solvants dans des proportions fixées, filtrée avant utilisation.

✚ La pompe :

Toute installation d'HPLC comporte au moins une pompe pour forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne.

Les pompes doivent répondre aux exigences suivantes :

- ✓ Fournir des pressions élevées jusqu'à 400 bars.
- ✓ Assurer un débit stable
- ✓ Résister à la corrosion quel que soit le solvant utilisé.

Il existe deux modes de fonctionnement :

- *Le mode isocratique* : pour lequel la composition de la phase mobile est fixe.
- *Le mode gradient de solvant* : pour lequel on fait varier la composition de la phase mobile en cours d'analyse. Les gradients de solvant nécessitent des pompes particulières permettant de faire varier la composition du mélange éluant. Cette variation est programmable, l'utilisateur définit à l'avance le profil du gradient désiré selon les objectifs prévus.

✚ **L'injecteur :**

L'injection d'un volume précis de l'échantillon en tête de la colonne doit se faire en un temps bref pour éviter toute perturbation du régime de circulation de la phase mobile. On utilise pour ce faire, une vanne à plusieurs voies, manuelle ou motorisée dans le cas des injecteurs automatiques, placée juste avant la colonne. Il s'agit d'une pièce de précision qui doit résister à des pressions pouvant dépasser 300 bars.

✚ **La colonne :**

C'est le cœur du système, c'est elle qui joue le rôle prépondérant. La colonne est un cylindre calibré généralement en acier inoxydable parfois doublé d'un matériau inerte (verre ou plastique spéciaux), dont la longueur et le diamètre présentent des différences selon les modèles. La colonne est souvent précédée d'une précolonne remplie de la même phase stationnaire, courte (0,4 à 1 cm), qui sert à retenir certaines impuretés pour augmenter ainsi la durée de vie de la colonne principale en préservant ses performances. La précolonne est changée périodiquement.

La recherche d'une bonne résolution chromatographique et par voie de conséquence d'une efficacité élevée, a conduit à la mise au point de phases stationnaires de nature et de structures variées. Elles sont classées selon :

- ✓ Type (particule, monolithique, polymérique ou semi poreuse).
- ✓ Géométrie (formes et taille des particules, diamètre, surface spécifique).
- ✓ Surface chimique (type et quantité du greffon).
- ✓ Matériaux (silice, zirconium, aluminium).

✚ **Le détecteur :**

Il permet à la fois, de mettre en évidence les solutés et de donner un signal proportionnel à la quantité de chacun des solutés dans un mélange. Un détecteur est caractérisé par :

- ✓ Réponse proportionnelle à la concentration de la substance détectée.
- ✓ Sensibilité élevée.

Les détecteurs plus utilisés en HPLC :

- Spectrophotomètre UV-Visible.
- Fluorimètre.
- Réfractomètre.
- Polarimètre.
- Conductimètre.
- Détecteur électrochimique.
- Spectromètre de masse.

 ***L'intégrateur - enregistreur :***

Il s'agit en fait d'un petit ordinateur qui récupère toutes les données issues des détecteurs, trace les chromatogrammes et intègre la surface des pics [3-6].

La théorie de la chromatographie :

La théorie de la chromatographie peut être divisée en deux aspects : aspect cinétique responsable de l'efficacité et aspect thermodynamique responsable de la rétention. Du point de vue de l'analyte, les facteurs cinétiques déterminent la largeur du pic tandis que les facteurs thermodynamiques déterminent la position du composé (sélectivité) dans le chromatogramme. Les deux aspects sont importants et une bonne séparation peut être achevée par l'optimisation des deux [1,3,5,6].

Description des paramètres :

L'information issue d'une expérience de chromatographie est, en général, contenue au niveau d'un chromatogramme (fig.1). En plus des informations sur l'analyse qualitative et quantitative, le chromatogramme nous permet de déduire les paramètres chromatographiques tels que le facteur de rétention, l'efficacité, la sélectivité et la résolution.

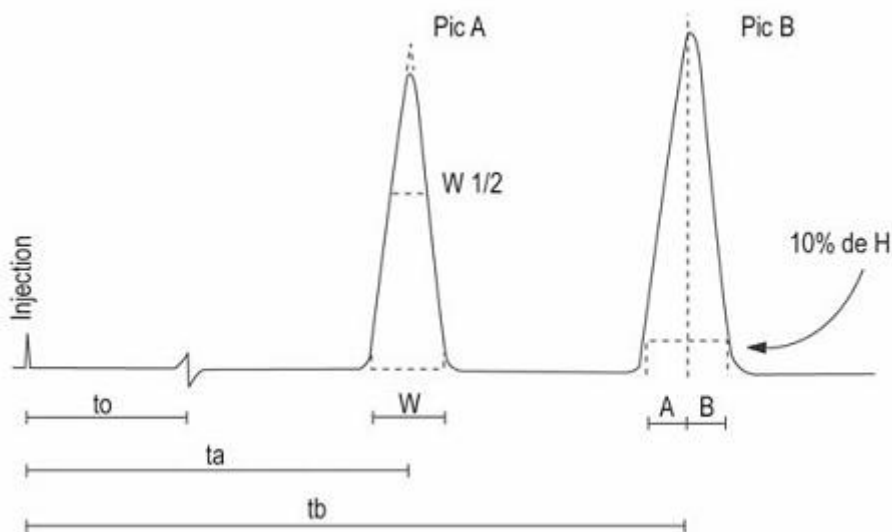


Fig.1 : Paramètres chromatographiques.

t_0 : Temps mort.

t_a : Temps de rétention du composé A.

t_b : Temps de rétention du composé B.

W : Largeur du pic à la base.

$W_{1/2}$: Largeur du pic à mi-hauteur.

H : Hauteur du pic.

A et B : Largeur du pic par rapport à l'axe du temps de rétention.

Ces paramètres peuvent être classés en :

1) Paramètres liés à la rétention :

Ces paramètres sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Paramètres de rétention.

Constante	Définition	Commentaires
t_0	Temps mort : pour un composé non retenu (min)	Un composé non retenu est un composé sans interaction avec la phase stationnaire

Tableau 1 : Suite.

t_R	Temps de rétention (min)	Temps passé par le composé dans l'appareillage chromatographique mais qui est susceptible de varier en fonction : <ul style="list-style-type: none"> ➤ Du débit ➤ De la température ➤ De la phase mobile ➤ De la phase stationnaire
k'	Facteur de rétention $k' = (t_R - t_0)/t_0$	Paramètre fondamentale caractérisant la rétention du composé dans le système chromatographique choisi, indépendant du débit.

2) Paramètres liés à l'efficacité :

Ils sont donnés dans le tableau 2 :

Tableau 2 : Paramètres d'efficacité.

Constante	Définition	Commentaires
N	Efficacité $N = 16 (t_R/w)^2$ $= 5.54 (t_R/w_{1/2})^2$	On appelle plateau théorique la portion de phase stationnaire dans laquelle un soluté est en équilibre de répartition entre la phase mobile et stationnaire.
H	Hauteur équivalente d'un plateau théorique HEPT (plateaux/m) $H = L/N$ L : longueur de la colonne	Un H petit signifié une meilleure efficacité.
S	Facteur de symétrie $S = B/A$	Il représente le trainé d'un pic qui est dû à la non idéalité de l'équilibre entre la phase mobile et stationnaire.

3) *Paramètres liés à la séparation :*

Ces paramètres sont groupés dans le tableau 3 :

Tableau 3 : Paramètres de séparation.

Constante	Définition	Commentaires
α	Sélectivité $\alpha = k'_b / k'_a$	Précise les positions relatives de deux pics adjacents.
R_s	Résolution $R_s = 2(t_b - t_a) / (\omega_a + \omega_b)$	Une bonne résolution est représentée par un retour à la ligne de base du premier pic avant que le second démarre.

Les modes de la chromatographie liquide à haute performance :

1. La phase normale :

C'est le premier mode de la chromatographie liquide, découvert en 1903 par Tswett. Ce modèle basé sur l'adsorption a été proposé par Synder [1,7-9] pour décrire la rétention sur la silice et l'alumine.

La rétention est due à l'établissement de liaisons de surface (forces intermoléculaires) entre l'adsorbant et les molécules adsorbées. Les forces responsables de cette attraction peuvent être classées comme suit :

- a) Forces de dispersion : forces de London.
- b) Force des dipôles : orientation et induction.
- c) Liaison hydrogène.
- d) Liaison covalente faible : interactions acide-base, formation d'un complexe [9].

Les solutés apolaires (ex : alcanes) sont peu adsorbés alors que les solutés polaires (ex : méthanol) le sont fortement. On utilisera de préférence l'alumine pour séparer des solutés basiques comme les amines et le gel de silice pour les phénols et les acides pour éviter toute adsorption irréversible des solutés entraînant une modification de structure de la phase stationnaire.

1.1. La phase stationnaire :

Dans le mode normal, la phase stationnaire est polaire : adsorbant inorganique comme la silice [1,10-17], l'alumine [18-20], le titane [18-21], le zirconium [18-20], ou un greffon polaire comme le cyano [22,23,26,29], diol [22,24,27,29], amine [22,25,28,29]...etc.

1.2. La phase mobile :

La phase mobile est apolaire non aqueuse [1,9,15].

1.3. Influence de la polarité des composés :

En chromatographie d'adsorption, la capacité d'adsorption des composés sur la phase stationnaire est en relation directe avec leur polarité. Plus un composé est polaire,

plus fortement il sera adsorbé sur les sites actifs de la phase stationnaire et moins vite il se déplacera [1,9,15]. L'ordre de polarité des principaux groupements fonctionnels est représenté dans la figure suivante.

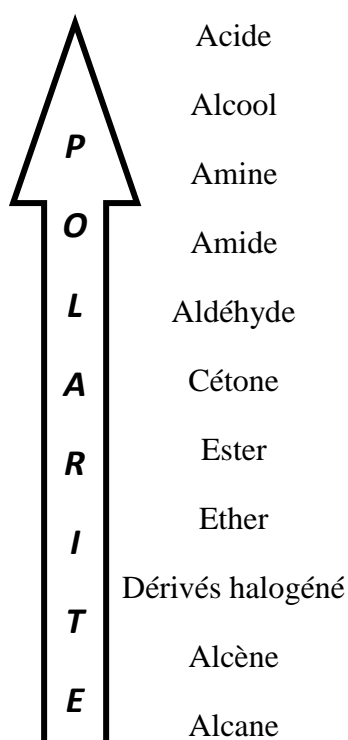


Fig.2 : Ordre de polarité des composés organiques.

1.4. Influence de la polarité de la phase mobile :

Lorsqu'on exploite le phénomène d'adsorption en chromatographie, la polarité de l'éluant a une influence considérable sur la vitesse de déplacement des composés d'un mélange. Plus l'éluant est polaire, plus les composés se déplacent rapidement. En effet, l'éluant est également adsorbé sur les sites actifs de la phase stationnaire et entre en compétition avec les composés du mélange [1,9,15]. La figure 3 montre l'ordre de polarité des solvants les plus utilisés.

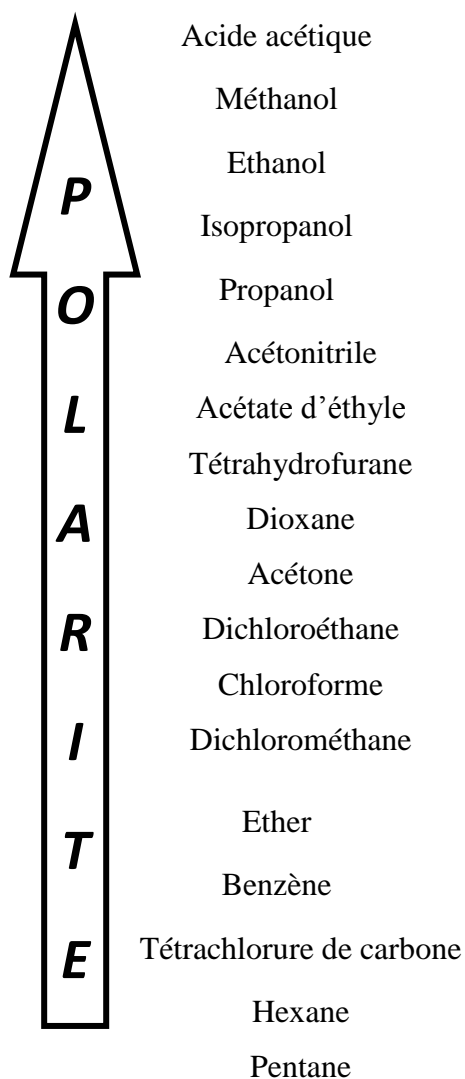


Fig.3 : Ordre de polarité des solvants organiques.

1.5. Influence de la température :

L'adsorption est généralement exothermique, donc une augmentation de la température favorise la désorption et diminuera le temps de rétention [1,9,15].

2. La phase inverse :

C'est un type de chromatographie en phase liquide où la phase stationnaire est apolaire et la phase mobile est polaire. Plus de 80% des analyses chromatographiques se font en mode inverse [1]. La rétention est fondée sur la différence de solubilité des substances à séparer dans deux fluides parfaitement immiscibles. Le facteur principal qui intervient est le coefficient de partage entre chaque phase. On peut séparer des solutés dont les coefficients de partage entre les deux phases sont différents. Un autre facteur qui intervient est la polarité de la phase : ainsi en HPLC on peut utiliser des phases stationnaires peu ou non polaires, la phase mobile étant polaire (eau ou mélange eau - méthanol) : on parlera alors de chromatographie de partage à polarité de phase inversée [1,9,15].

2.1.La phase stationnaire :

L'introduction des phases stationnaires modifiées chimiquement est un paramètre important en chromatographie liquide, la phase stationnaire devient hydrophobe en introduisant des ligands sous forme d'alkyles de différentes tailles (C1, C2, C4, C8, C18, C30 [30], phényle [31,32]...).

2.2.La phase mobile :

L'utilisation de phases mobiles hydro-organiques est un avantage puisque une grande gamme de solvants existe en particulier l'eau. La présence d'une partie aqueuse a facilité l'utilisation des sels et des tampons pour contrôler le pH. En plus on peut utiliser des additifs ioniques organiques de la chromatographie à paires d'ions [1,9,15].

2.3.Influence de la composition de la phase mobile :

En chromatographie en phase inverse, la partie organique est considérée comme le solvant de grande force d'éluion, plus la polarité du solvant et/ou la fraction est grande plus le temps de rétention diminue. La composition de la phase mobile n'influe pas sur la sélectivité si les composés sont neutres, par contre elle est importante pour les composés ioniques [1,9,15].

2.4. Influence du pH :

La présence de groupements fonctionnels ionisables comme les amines et les acides carboxyliques nécessite l'utilisation de tampons puisque la prédominance d'une des formes (ionisée ou neutre) dépend du pH [1,9,15].

3. La chromatographie ionique :

Elle consiste en un échange réversible d'ions entre la phase mobile et la phase stationnaire. Ce type de chromatographie s'adresse aux produits ioniques ou ionisables [1,6,9,15].

3.1. La phase stationnaire :

Elle est porteuse de groupements ionisés fixes et d'ions mobiles assurant l'électroneutralité. La phase stationnaire la plus courante est constituée de polystyrène sous forme de sphères de quelques micromètres de diamètre, lesquelles ont été chimiquement transformées en surface pour faire apparaître des sites ioniques. Ces phases permettent l'échange de leurs contre-ions mobiles avec des ions de même signe, présents dans la phase mobile. La séparation repose sur les coefficients de distribution ionique entre les deux phases [1].

3.2. La phase mobile :

La phase mobile est une solution tampon aqueuse.

3.3. Influence de la charge du soluté :

Plus la charge portée par le soluté est grande plus il sera retenu.

3.4. Influence de la force ionique :

La présence d'une quantité élevée d'ions dans la phase mobile diminue l'échange ionique, ce qui réduit le temps de rétention [33].

4. La chromatographie d'exclusion :

Cette technique est encore appelée filtration sur gel ou perméation sur gel selon la nature de la phase mobile (aqueuse ou organique). Les molécules sont plus ou moins retenues suivant leurs tailles et leurs possibilités de pénétrer dans les pores de la résine. Les solutés sont élués dans l'ordre des masses molaires décroissantes. Le coefficient de partition s'appelle dans ce cas le coefficient de diffusion [1,6,15].

4.1. La phase stationnaire :

La phase stationnaire est généralement un polymère poreux dont les pores ont des dimensions choisies en rapport avec la taille des espèces à séparer.

4.2. La phase mobile :

La phase mobile ne doit pas réagir avec la phase stationnaire et doit solubiliser les molécules de soluté.

5. La chromatographie d'interactions hydrophiliques :

Les applications fiables de la chromatographie en phase liquide nécessitent un facteur de rétention supérieur à deux. Un des grands challenges de l'HPLC est l'analyse des composés polaires. En effet, ces composés de part de leurs structures, sont fortement retenus en mode normal et vite élués en mode inverse. L'addition dans la phase mobile d'un agent ionique de charge opposée à celle de la(les) substance(s) à analyser comme les alkylsulfonates pour les solutés chargés positivement en solution et les alkylammoniums pour les solutés chargés négativement en solution peut modifier la rétention, la partie hydrophobe de cet agent (la chaîne alkyle) augmentant alors l'interaction avec la phase stationnaire apolaire, mais le problème reste posé pour les substances neutres. On peut aussi faire une dérivation en transformant la fonction polaire en fonction apolaire hydrophobe pour augmenter l'interaction. Par ailleurs, cette transformation peut augmenter la sensibilité de la substance. Par contre, le passage par la dérivation doit être rapide et microquantitatif (une réaction totale spécifique) ce qui est difficile lorsque la molécule possède plusieurs sites actifs. L'utilisation d'une phase stationnaire polaire pour augmenter l'interaction et une phase mobile hydro-organique pour avoir une meilleure solubilité serait la solution au problème posé pour l'analyse des produits polaires par HPLC. Cette technique, connue depuis plus de 35 ans, **la chromatographie liquide d'interactions hydrophiliques (HILIC)** a pris de plus en plus d'importance au cours de ces dernières années pour l'analyse de composés polaires. Le mode HILIC combine les avantages de la chromatographie à polarité de phase normale (rétention et séparation des composés polaires) avec ceux de la chromatographie à polarité de phase inversée (utilisation de phases mobiles hydro-organiques).

5.1.Historique :

La chromatographie d'interactions hydrophiliques ou *HILIC* est un type de chromatographie en phase liquide où la phase stationnaire est polaire et la phase mobile est organique aqueuse. Ce nom est donné par Alpert en 1990 [34] mais l'origine de la HILIC remonte à 1941, Martin et Synge [35] publièrent un article sur la séparation des acides aminés sur une colonne silice avec de l'eau saturée en

chloroforme [36]. En 1975, Linden et Lawhead [37] et Palmer [38] ont séparé les carbohydrates sur une colonne amine avec des phases mobiles hydro-organiques (acétonitrile – eau 75 : 25 et 80 : 20 respectivement.). Le mode HILIC est également appelé «phase normale aqueuse» ou «phase inverse inversée» [36,39].

5.2. La phase stationnaire :

En chromatographie d'interactions hydrophiliques, la phase stationnaire est polaire donc il y a une grande variété de composés polaires qui peuvent être utilisés, ces composés ont la propriété d'adsorber l'eau. Plusieurs types de phase sont utilisés, soit classiques comme la silice [40-50], silice monolithique [51], silice semi poreuse [52,53], amine [48,50,54-58], polyamine[59], amide [48,58,60,61], diol [48,62-65], diol polymérique [66], polyhydroxyaspartamide [48,61,67], saccharide [68-74], cyano [75,76], polysuccinimide et leur dérivés [34,77], pentafluorophényle (PFP) [76,78-80], phénylhexyl [81], soit synthétique par polymérisation et copolymérisation comme l'acide polyacrylique [60,82,83] et poly(META-co-PETA) [84] et les phases chirales comme les cyclodextrines [85], teicoplanine [85-89], vancomycine [87].

5.3. La phase mobile :

La phase mobile utilisée en mode HILIC est particulière, elle se compose d'une partie organique hydrosoluble et une partie aqueuse dont les proportions varient de 60/40 à 90/5 v/v respectivement [36], un maximum de 98% [90-92] et un minimum de 50% [93-95] en solvant organique ont été utilisés.

5.3.1. La partie organique :

Le solvant le plus utilisé est l'acétonitrile à cause de sa faible transparence pour une meilleure détection et sa faible viscosité pour une grande efficacité. En plus, ce solvant aprotique ne perturbe pas la formation de la couche d'eau sur la surface de la phase stationnaire [96] ; mais l'utilisation des autres solvants comme le méthanol [54-56], l'éthanol [97], le tétrahydrofurane, isopropanol, dioxane [98], diméthylformamide DMF[98,99], propanol [98], l'acétone [68,92],

methyl *t*-butylether [100] ou un mélange de ces solvants [101-103] est largement décrite dans la littérature.

5.3.2. La partie aqueuse :

On peut utiliser l'eau [34,38,104], eau acidifié par l'acide formique, acide acétique [105], acide trifluoroacétique TFA [106], acide phosphorique [107], acide nitrique [75], acide propanoïque [88,108], acide hexanoïque [88], acide méthanesulfonique [109] et les acides perfluorocarboxyliques comme l'acide heptafluorobutanoïque HFBA, acide nonafluoropentanoïque NFPA, acide tridecafluorooctanoïque PDFOA et l'anhydride pentafluoropropionique PFPA [77,110], ces acides perfluoriques sont utilisés comme paires d'ions anioniques volatils. Des composés basiques comme la triéthylamine TEA [40,45,88], triméthylamine TMA et diéthylamine DEA [88] ont été utilisés. Plusieurs articles traitent de l'addition de sels dans la phase mobile : formiate, acétate, carbonate [111], dihydrogèno phosphate [44], chlorure [112] d'ammonium, phosphate et citrate de potassium [55], triéthylammonium phosphate TEAP [67,77,113], triéthylammonium acétate TEAA [87], perchlorate, méthylphosphonate CH_3PO_4 [67,77,107], acétate [114], dihydrogèno phosphate [115], trifluoroacétate [116] de sodium,. Le rôle du sel est de diminuer les interactions électrostatiques avec la phase stationnaire [116].

5.4.Mécanismes de séparation :

En chromatographie liquide d'interactions hydrophiliques, la phase stationnaire adsorbe une quantité de la phase mobile pour former une fine couche riche en eau sur la surface (figure 4). Cette couche immobilisée rend le(s) composé(s) susceptible(s) de se partager entre la phase mobile et cette couche [34,36,117] comme l'a décrit Alpert [34]. Mais d'autres mécanismes sont décrits : échange ionique [50,118], interactions hydrophobiques sur les siloxanes [119,120], liaison hydrogène [36] et répulsion électrostatique (la chromatographie liquide de répulsion électrostatique ERLIC) [107,121]. Le mécanisme qui prédomine dépend du soluté (charge, taille), de la phase stationnaire (neutre, chargée) et des conditions chromatographiques

(pH, composition). Dans ce mode de séparation, les composés polaires seront plus retenus que les composés apolaires contrairement à l'évolution de la rétention en RPLC.

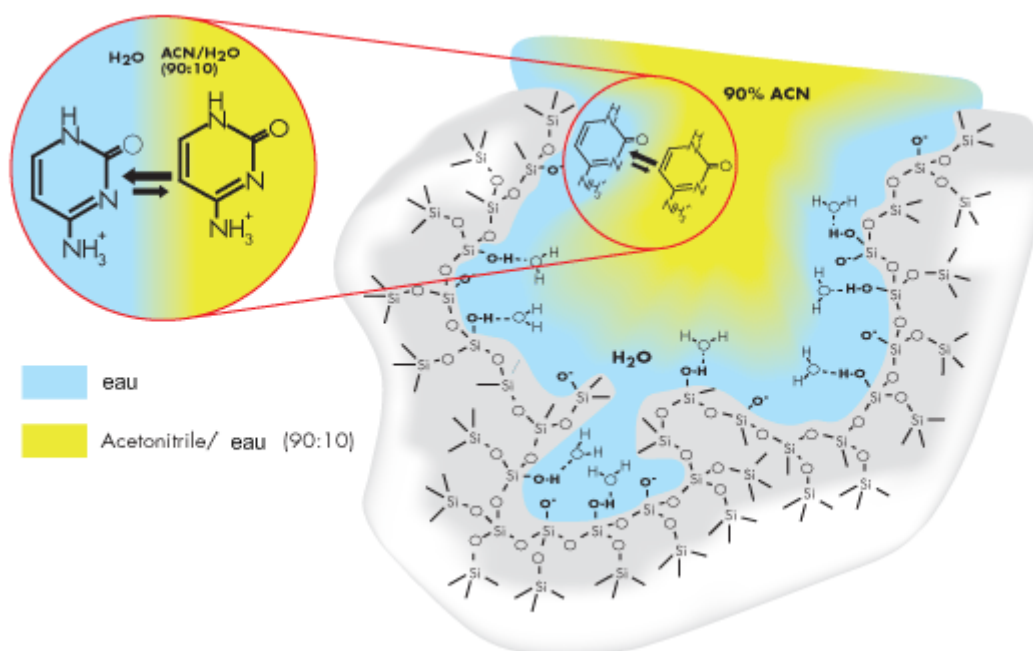


Fig.4 : Schéma du mécanisme de séparation (partage) dans le mode HILIC.

5.5.Domaines d'application :

Une recherche bibliographique sur la chromatographie liquide d'interactions hydrophiliques ou HILIC montre que le nombre de publications a fortement augmenté ces dernières années et ceci dans différents domaines : bioanalyse et pharmacocinétique [122-124], antibiotiques et cytostatiques [43,54,125,126], développement pharmaceutique et découverte des médicaments [95,127], carbohydrates et dérivés [69,128-131], acides aminés et peptides [34,58,65,77, 132-134], protéines [135], vitamines hydrosolubles [62,64,136,137], environnement [138-141], agriculture et chimie alimentaire [54,84,142,143], préparation des

échantillons par HILIC-SPE [144,145], chromatographie préparative [146-148], cosmétique [149], mesure de la lipophilicité des médicaments [150,151] et analyse des impuretés [78,152,153].

5.6. Les avantages :

- ✓ Une bonne rétention des composés polaires ce qui était difficile à réaliser avec les autres méthodes chromatographiques.
- ✓ Une grande résolution entre les composés hydrophiles et hydrophobes.
- ✓ Une faible viscosité de la phase mobile due à la grande quantité en solvant organique ce qui se traduit par une faible pression
- ✓ Les solvants d'élution en SPE, PP et LLE ont une force d'élution plus faible que la phase mobile de la HILIC, les extraits sont directement injectés sans le passage par l'évaporation et la reconstitution, ce qui fait gagner beaucoup de temps (50%) et éviter la perte de masse [154-157].
- ✓ Une phase mobile plus volatile pour les détecteurs basés sur le principe d'évaporation (ESI-MS, DEDL, Corona, etc.).
- ✓ La compatibilité de ce mode de chromatographie avec couplage LC-MS et LC-MS/MS : ce mode de détection est devenu la méthode de choix pour l'analyse [158].

5.7. Les inconvénients :

- ✓ La consommation élevée des solvants organiques (effet sur l'environnement).
- ✓ Mécanisme très compliqué et difficilement contrôlable.
- ✓ L'équilibre de la colonne nécessite beaucoup de temps [159].

VALIDATION
D'UNE
METHODE
ANALYTIQUE

Introduction :

L'acceptation d'une méthode analytique, quant à sa fiabilité, est généralement décidée sur la base du calcul des limites de confiance des mesures d'exactitude et l'estimation de sa fidélité au moyen du calcul des coefficients de variation. Cette approche est, en fait, basée sur l'outil statistique comme un moyen d'analyse et de prise de décision en même temps.

Définition de la validation d'une méthode analytique :

La validation d'une méthode est la procédure par laquelle on démontre et on confirme, preuves expérimentales à l'appui, que les performances de la méthode permettent de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée. Elle est fondée sur une analyse statistique basée sur un certain nombre de critères aboutissant à des méthodes analytiques permettant de donner des résultats fiables [1,3].

Objectif de la validation :

La validation a pour but de démontrer que la procédure analytique est appropriée à l'usage auquel elle est destinée.

Les critères de validation :

Depuis de très nombreuses années, l'approche des analystes a été de caractériser les performances des méthodes d'analyse en évaluant au travers de travaux expérimentaux des caractéristiques [1]. Les caractéristiques le plus souvent citées sont :

- Spécificité
- Linéarité
- Linéarité en présence du placebo
- Fidélité
- Exactitude
- Limite de détection et limite de quantification
- Stabilité

1. La

spécificité :

Cette caractéristique est étudiée en premier. C'est la capacité d'une procédure de permettre une évaluation univoque de l'analyte en présence de produits susceptibles d'être présents (impuretés, produits de dégradation, matrice).

Très souvent la spécificité se fonde sur une absence d'interférence en comparant les chromatogrammes du (des) principe(s) actif(s) et du placebo [1,3].

2. La linéarité :

C'est la possibilité qu'offre une méthode pour obtenir une réponse directement proportionnelle à la concentration de l'analyte dans un domaine déterminé [1,3]. Le terme linéarité est utilisé quand la courbe d'étalonnage est une droite. En pratique, les études de linéarité se font simultanément sur le principe actif seul et sur la forme pharmaceutique reconstituée. L'évaluation de cette caractéristique, permet de préciser le domaine d'utilisation de la méthode en fonction de « l'erreur de linéarité » que l'on est prêt à accepter. On détermine le biais, défini comme l'écart entre la valeur théorique et la valeur calculée à partir de l'équation de la droite.

L'équation de la droite $Y = aX + b$ donc :

$S = aC + b$ (S est la surface du pic et C la concentration).

On calcule la concentration corrigée $C_{\text{Corrigée}}$ qui représente la projection de la surface sur l'axe des concentrations.

$$C_{\text{Corrigée}} = (S - b) / a$$

$$\text{Biais} = 100 C_{\text{corrigée}} / C_{\text{théorique}}$$

Biais moyen = Moyenne des biais

3. La linéarité en présence du placebo :

C'est la même chose que la spécificité, mais quantitativement. La gamme utilisée dans la linéarité est utilisé dans ce cas.

4. La fidélité :

La fidélité est l'étroitesse de l'accord entre les résultats des essais multiples d'un même échantillon obtenus dans des conditions bien stipulées [1,3].

Elle s'effectue sur le produit fini sur deux jours avec deux manipulateurs.

- 1^{er} jour : le manipulateur 1 prépare 4 solutions essais. Chaque solution est injectée par chaque manipulateur dans le désordre.
- 2^{ème} jour : le manipulateur 2 prépare 4 solutions essais. Chaque solution est injectée par chaque manipulateur dans le désordre.

L'étude de la fidélité nécessite la détermination de :

4.1.La répétabilité :

C'est les résultats d'essais indépendants obtenus par la même méthode par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps. La répétabilité représente la valeur minimale de la fidélité de la méthode lorsqu'elle est utilisée par le laboratoire, elle est souvent quantifiée par un écart-type noté S_r .

4.2.La fidélité intermédiaire :

C'est les résultats d'essais indépendants obtenus par la même méthode, par deux opérateurs différents dans deux jours. Elle exprime la variabilité intra-laboratoire : jour différents, analystes différents et appareillage) [1].

5. Exactitude :

C'est l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir de série d'essai et une valeur de référence acceptée [3]. La détermination de ce paramètre ne nécessite pas de manipulations, les données sont issues de la fidélité. Elle fournit des informations sur les erreurs systématiques.

Méthode d'étude :

On considère les pourcentages de recouvrements (PR%) entre les valeurs x_i introduites et les valeurs x_i^* estimées à partir de la gamme d'étalonnage.

$$PR = [x_i^*/x_i] \cdot 100$$

On détermine :

- La moyenne des résultats de la fidélité.
- Le pourcentage de récupération PR
- Limite inférieure LI : $LI = PR - t_{0.975} \cdot SD$
- Limite supérieure LS : $LS = PR + t_{0.975} \cdot SD$
Avec $t=0.975$: coefficient de Student.
- La précision = $100 - PR$

6. Limite de détection LOD et limite de quantification LOQ :

La limite de détection d'une méthode analytique est la plus petite quantité d'analyte qui peut être détectée mais pas nécessairement quantifiée comme une valeur exacte, et si cette quantité peut être déterminée quantitativement avec une fidélité et une exactitude appropriée, elle sera nommée la limite de quantification [1].

7. Stabilité :

Une solution est considérée comme pratiquement stable lorsque, dans un laps de temps déterminé, ses propriétés essentielles ne changent pas ou changent au plus dans des proportions acceptables. Elle doit être conservée dans des conditions appropriées et prescrites de température, d'humidité et d'exposition à la lumière. Les solutions étalons préparées sont injectées à des intervalles de temps précis au moins deux temps, trois mesures par temps. On calcule pour chaque temps le rapport :

$$R = 100 \cdot \text{résultat moyen obtenu} / \text{résultat au temps 0.}$$

LA
CITICOLINE

Généralité :

La citicoline (figure 5) est une molécule organique complexe qui stimule la synthèse des phospholipides impliqués dans la réparation des membranes cellulaires. Connue sur le nom CDP-choline et cytidine diphosphate choline, la citicoline appartient à la famille des nucléotides. Elle est composée de la cytosine, ribose (ces deux molécules forment la cytidine par une liaison osidique), pyrophosphate (diphosphate) et la choline. Elle possède une action cholinergique (source de la choline) et neuroprotective. Plusieurs travaux traitent des différentes indications de la citicoline. La citicoline est également expérimentée dans le traitement des maladies d'Alzheimer, de Parkinson et de l'ischémie cérébrale.

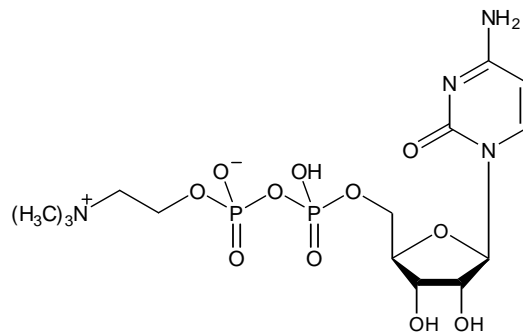


Fig.5 : Structure de la citicoline.

Pharmacocinétique :

La citicoline est un composé hydrosoluble avec une biodisponibilité supérieur à 90%. Elle est métabolisée dans le foie. Les études pharmacocinétiques utilisant ^{14}C ont montré que l'élimination se fait principalement par voie respiratoire et urinaire. Les périodes biologiques (temps de demi-vie) sont respectivement de 56 heures et 71 heures [161-163].

Propriétés :

Le tableau 4 représente quelques propriétés de la citicoline.

Tableau 4 : Quelques propriétés de la citicoline [160].

Nom systématique	[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-amino-2-oxopyrimidin-1-yl)-3,4-dihydroxyoxolan-2-yl]methoxy-hydroxyphosphoryl] 2-(trimethylazaniumyl)ethyl phosphate
Aspect	Poudre amorphe blanche hygroscopique
Synonyme	CDP-Choline
Formule chimique	C ₁₄ H ₂₆ N ₄ O ₁₁ P ₂
Masse molaire	488.33
Numéro d'enregistrement	CAS : 987-78-0 PubChem : CID 13805
Solubilité	Eau : 100 mg/ml Ethanol : pratiquement insoluble Acétone : pratiquement insoluble Chloroforme : pratiquement insoluble
[α]_D²⁵	+19.0° (c = 0.86 in H ₂ O)
pKa	4.4
Classe thérapeutique	Neuroprotective

PARTIE
EXPERIMENTALE

1. Appareillages :

Les expériences ont été réalisées sur un système équipé d'une pompe quaternaire 600 Controller (Waters) avec un dégazeur online Supelco Mobile Phase Degassing System (Supelco), l'acétonitrile dans la voie A et le tampon dans la voie B. La colonne utilisée était Atlantis HILIC Silica 4.6 mm X 50 mm, 3 µm (Waters), cette colonne a été thermostatée dans un four Waters Temperature Control Module (Waters). La détection a été réalisée avec un détecteur à barrette de diode 996 (Waters) et les chromatogrammes sont enregistrés sur un ordinateur en utilisant un logiciel Empower Pro build 1154 (Waters). Les mesures de pH ont été réalisées avec un pH-mètre HANNA pH 211 (HANNA) et les pesées sur une balance Kern ABS (Kern).

2. Réactifs :

L'eau purifiée (18 MΩ.cm) est obtenue d'un système Direct-Q 3 (Millipore), l'acide formique RECTAPUR (98-100%) (PROLABO), l'ammoniaque 32% (HETAC), l'acétonitrile HPLC grade (Sigma-Aldrich) et la citicoline sodique dihydratée.

3. Préparation des solutions :**3.1. Préparation de la phase mobile :**

Elle se compose d'un mélange d'acétonitrile et de tampon formiate d'ammonium. Le tampon est préparé par dissolution de la quantité nécessaire d'acide formique dans l'eau et le pH est ajusté par l'ammoniaque.

3.2. Le diluant :

Le solvant de dilution est constitué d'un mélange 75/25 eau/acétonitrile (v/v).

4. Préparation des échantillons pour la validation :**4.1. La spécificité :**

Le placebo contient tous les excipients qui se trouvent dans le produit fini. Ces excipients sont dissous dans le diluant.

Liste des excipients et leurs quantités :

Sorbitol 70%	25 g
Glycérol	2 g
PHBM	110 mg
PHBP	28 mg
Citrate de sodium	300 mg
Saccharine sodique	50 mg
Sorbate de potassium	100 mg
Acide citrique	300 mg
Eau purifiée qsp	100 ml

4.2.La linéarité :

Une gamme de 50 à 150% (voir tableau 5) du principe actif est préparée dans 100 ml de diluant. Cinq solutions pour chaque concentration sont préparées indépendamment avec une quantité de 20 mg pour la valeur de base (100%).

Tableau5 : Gamme de la linéarité :

La prise d'essai théorique (mg)	% C_{théorique}	La prise d'essai expérimentale (mg)	% C_{expérimentale}
10	50	9.9	49.5
15	75	15.4	77
20	100	19.6	98
25	125	25.1	125.5
30	150	31.3	156.5

Chaque solution est injectée quatre fois, les injections sont faites dans le désordre.

4.3. La linéarité en présence du placebo :

On dilue 10 fois le placebo en prenant 2.5 ml du placebo et on complète à 25 ml par le diluant. On prépare la même gamme que celle de la linéarité (tableau 6), on ajoute 2 ml de la solution diluée du placebo et on complète à 100 ml par le solvant de dilution.

Tableau 6 : Gamme de la linéarité en présence du placebo.

La prise d'essai théorique (mg)	% C _{théorique}	La prise d'essai expérimentale (mg)	% C _{expérimentale}
10	50	10.3	51.5
15	75	14.6	73
20	100	19.8	99
25	125	25.1	125.5
30	150	29.3	146.5

4.4. La fidélité :

La valeur indiquée sur le produit fini est de 100 mg/ml. Pour atteindre la concentration de 0.2 mg/ml (100%), on mélange 2.5 ml du produit fini avec la quantité suffisante du diluant pour 25 ml, puis on prélève 2 ml de cette solution et on complète à 100 ml par le même solvant. la fidélité est faite sur deux jours par deux manipulateurs, l'un des manipulateurs prépare quatre solutions avec le même protocole et les deux injectent, et on répète la même chose dans le deuxième jour sauf que le deuxième manipulateur prépare les solutions.

4.5. L'exactitude :

Ce paramètre est issu de la fidélité.

4.6.Limite de détection et limite de quantification :

Le calcul de la limite de détection et de quantification est basé sur le bruit de fond de la phase mobile. Pour cela, on a laissé la phase mobile pendant une durée de 30 minutes dans les mêmes conditions chromatographique et on a déterminé la surface moyenne du bruit. LOD égale trois fois cette moyenne et LOQ dix fois.

4.7.La stabilité :

On divise la solution de référence utilisée dans la linéarité en deux, l'une est maintenue à température ambiante et l'autre dans le réfrigérateur. Des injections seront faites dans des intervalles de temps précis.

5. L'analyse du produit fini :

Une solution étalon à 100% a été préparée, et elle a été injectée cinq fois. Par ailleurs, cinq solutions essais ont été préparées selon le procédé décrit dans la fidélité, et chaque solution a été injectée trois fois.

RESULTATS
ET
DISCUSSION

OPTIMISATION
DE
LA
PHASE MOBILE

Recherche des conditions optimales pour l'analyse de la citicoline par HPLC en mode HILIC :

Elles ont été recherchées en modifiant les différents facteurs pouvant influencer les paramètres chromatographiques.

1. Choix de la phase stationnaire :

La littérature suggère pour l'analyse de molécules biologiquement actives des phases stationnaires en silice vierge [49].

Nous avons donc utilisé une colonne en silice : Atlantis HILIC Silica 50 mm x 4.6 mm id, 3 μ m.

2. Optimisation de la phase mobile :

L'étude de l'influence de différents paramètres sur les grandeurs chromatographiques a été réalisée.

2.1. Influence de la quantité d'eau :

Un minimum de 3% en eau est nécessaire pour le mode HILIC. Nous avons fait varier la teneur en eau de 20 à 35%. L'acétonitrile est le solvant organique retenu : étant aprotique, il n'y aura pas de compétition avec la molécule d'eau lors de la formation de liaisons hydrogène avec la silice.

La force d'éluion de la phase mobile est l'un des paramètres les plus importants en mode HILIC, contrairement à la RPLC. L'eau est l'éluant fort et le solvant organique (l'acétonitrile dans notre cas) est le solvant faible. L'évolution des différents paramètres est illustrée sur la figure 6.

Le temps et le facteur de rétention observés sont inversement proportionnels à la quantité d'eau dans la phase mobile. Cette augmentation du temps de rétention avec la fraction de l'acétonitrile est caractéristique du mode HILIC. En effet, une augmentation du solvant organique dans la phase mobile diminue la polarité de la phase et augmente ainsi la rétention du composé [1,2, 30, 92].

Le nombre de plateaux suit la même variation.

Concernant le facteur de symétrie, l'influence est faible mais la symétrie du pic est meilleure pour une fraction aqueuse voisine de 30 (1.01 pour 25% et 1.08 pour 30%), alors qu'une valeur de 1.22 est obtenue pour 35%. Ceci peut être attribué aux interactions de la molécule

avec les deux phases, une grande quantité d'eau dans la phase mobile se traduit par une élution rapide avec un pic dissymétrique.

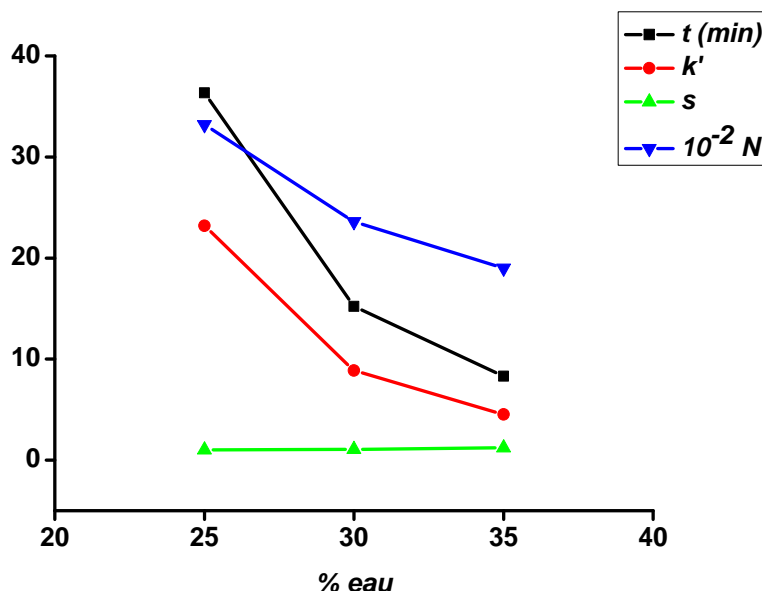


Fig.6 : Influence de la proportion d'eau. Colonne Atlantis HILIC Silica 50 mm x 4.6 mm id, 3 μm, acétonitrile / 200 mM formiate d'ammonium à pH=5, débit=0.5 ml/min et T=30°C.

2.2. Influence de la force ionique :

A cause de la grande quantité en solvant organique dans la phase mobile, la concentration du sel utilisé est limitée par la solubilité. L'influence de la force ionique sur les grandeurs chromatographiques est illustrée dans la figure 7.

La citicoline porte une charge positive (ammonium quaternaire) et la silice porte une charge négative (échangeuse de cation faible) à cause de la déprotonation des silanols [95] favorisant ainsi les échanges. Une augmentation de la concentration du sel augmente l'échange ionique qui se traduit par une diminution du temps de rétention [33]. Les résultats montrent l'inverse ; le temps de rétention est proportionnel à la force ionique prouvant ainsi que le mécanisme principal n'est pas l'échange cationique.

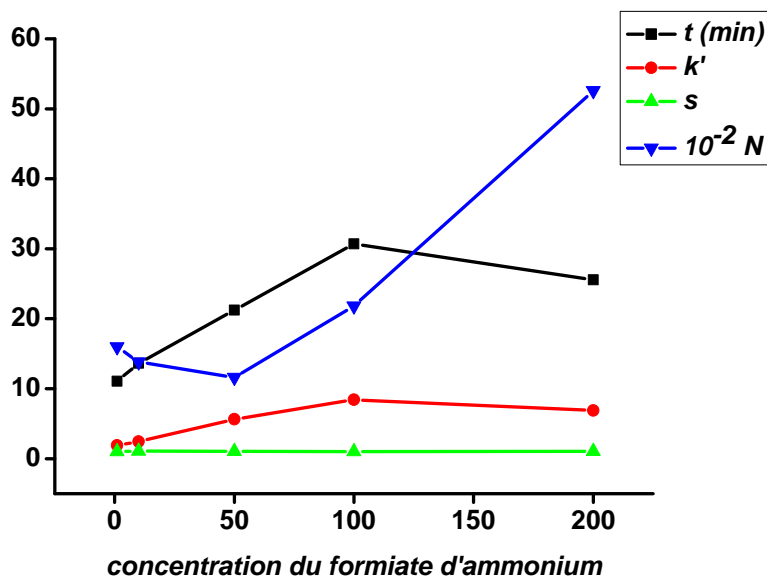


Fig.7 : Influence de la force ionique. Colonne Atlantis HILIC Silica 50 mm x 4.6 mm id, 3µm, 70/30 v/v acétonitrile / formiate d'ammonium à pH=5, débit 0.2 ml/min, T=30°C.

Le phénomène observé peut être expliqué par le fait que le sel étant plus soluble dans l'eau que dans la phase mobile riche en solvant organique, va préférentiellement se diriger vers la couche d'eau immobilisée à la surface de la phase stationnaire, ce qui la rendra plus hydrophile et augmentera ainsi la rétention de la citicoline ($\text{LogP}_{\text{ow}} = -7.07$) [111]. Pour des concentrations supérieures à 100 mM, la couche d'eau adsorbée est saturée en sel et les silanols sont occupés par les ammoniums ce qui élimine les interactions électrostatiques et diminue le temps de rétention.

Pour le nombre de plateaux, la largeur du pic due à l'échange d'ions est la cause de la diminution de ce facteur (pour l'intervalle 0 à 50 mM). Pour des concentrations supérieures à 50 mM, l'échange ionique diminue, ce qui affine les pics et augmente l'efficacité.

En ce qui concerne la symétrie des pics, l'influence de la force ionique est faible.

2.3. Influence du pH :

Dans le cas des substances ionisables, il est nécessaire de contrôler le pH de la phase mobile. En effet selon le pH du milieu l'espèce sera présente sous forme moléculaire neutre, sous forme ionique ou même sous les deux formes si on est à

un pH proche du pKa. L'espèce ionique présente une plus grande affinité avec la phase aqueuse et l'espèce neutre une plus grande affinité pour la phase organique. Si la phase mobile est polaire et particulièrement si elle est aqueuse, les temps de rétention sensiblement diminueront quand l'espèce ionique sera présente en grande quantité, inversement les temps de rétention seront élevés si l'espèce neutre est majoritaire. Les facteurs de rétention varieront donc sensiblement avec le pH.

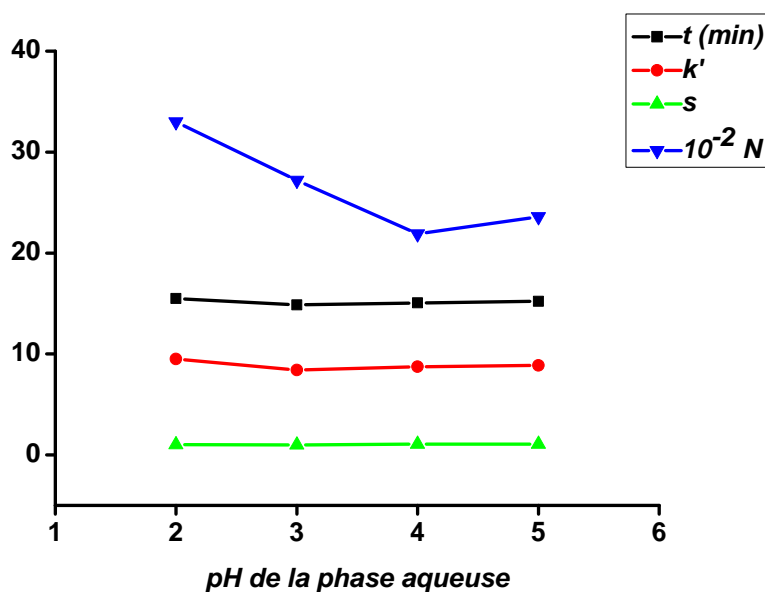


Fig8 : Influence du pH. Colonne Atlantis HILIC Silica 50 mm x 4.6 mm id, 3µm, 70/30 v/v acétonitrile / 200 mM formiate d'ammonium, débit=0.5 ml/min et T=30°C.

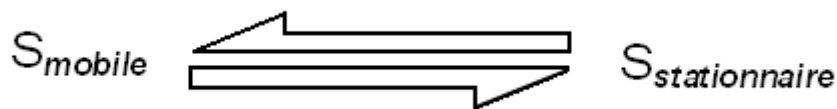
La figure 8 représente l'effet du pH. Pour un pH=2 de la phase aqueuse, (pH=4 pour la phase mobile), la citicoline est sous forme cationique (ammonium quaternaire) ce qui entraîne une attraction avec les silanols donnant lieu à un temps de rétention élevé t = 15.5 min. Lorsque le pH passe de 2 à 3 (4 à 5 pour la phase mobile), la citicoline se trouve sous une forme zwitterionique et on observe une diminution du temps de rétention (t = 14.85 min) due à la répulsion électrostatique.

Lorsque le pH augmente (4 et 5), la forme basique du formiate devient prédominante dans la phase aqueuse adsorbée ce qui augmente son caractère hydrophile et augmente le temps de rétention, t = 15.05 et 15.21 min respectivement.

L'influence sur l'efficacité est remarquable. Elle a la même variation que le temps de rétention avec une anomalie pour un pH=4, le temps de rétention augmente et l'efficacité ne subit aucune variation.

2.4. Influence de la température :

Au niveau de la colonne, il existe un équilibre du soluté S entre la phase mobile et la phase stationnaire (couche d'eau).



Cet équilibre est caractérisé par une constante d'équilibre K :

$$K = \frac{\text{concentration du soluté dans la phase stationnaire}}{\text{concentration du soluté dans la phase mobile}}$$

La constante d'équilibre ne dépend que de la température et l'effet de la température est donné par la loi de Lechatelier :

Une augmentation de la température favorise le sens endothermique.

Et la loi de Van't Hoff (sachant que K est directement proportionnelle à k') :

$$\ln k' = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \varphi$$

k' : facteur de rétention

ΔH : enthalpie

ΔS : entropie

R : constante des gaz parait

T : température

φ : fraction du solvant organique dans la phase mobile

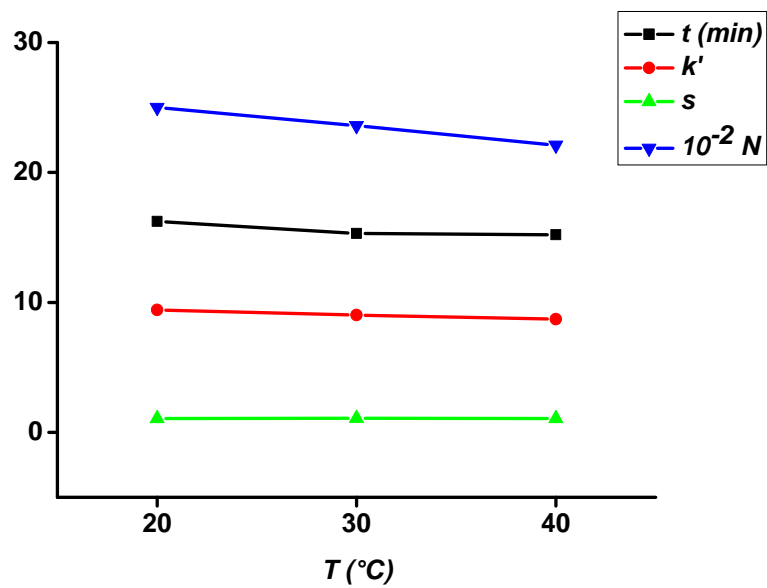


Fig.9 : Influence de la température. Colonne Atlantis HILIC Silica 50 mm x 4.6 mm id, 3 μ m, 70/30 v/v : acétonitrile / 200mM formiate d'ammonium à pH= 5, débit=0.5 ml/min.

On constate dans la figure 9 que l'effet de la température sur les paramètres chromatographiques est négligeable sauf pour le temps de rétention pour lequel on observe une légère décroissance 16.23, 15.3 et 15.2 min pour 20, 30 et 40°C respectivement. Pour essayer d'expliquer ce phénomène, nous avons tracé la courbe $\ln k' = f(1/T)$ comme l'illustre la figure suivante :

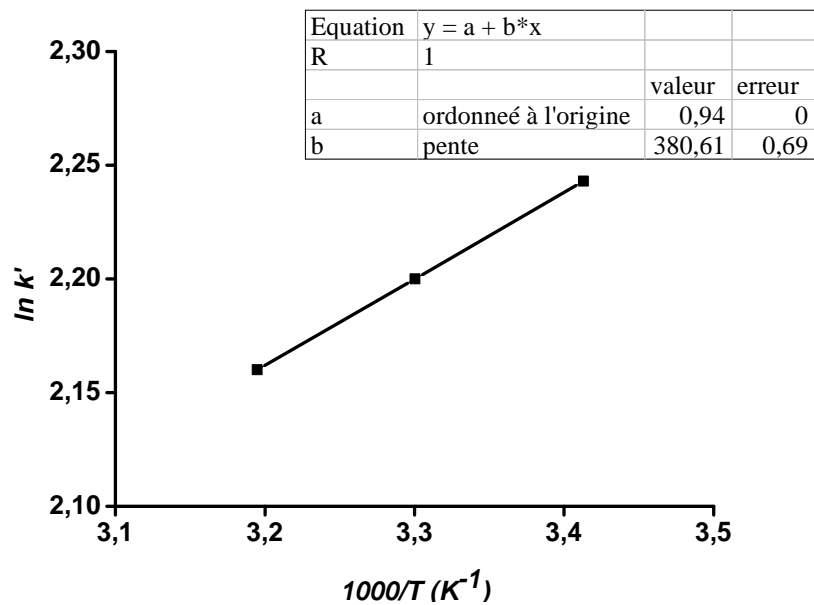


Fig.10 : Courbe de Van't Hoff.

La courbe $\ln k'$ en fonction de $1000/T$ est une droite de pente $-\Delta H/R$

La pente = 380.61 K, donc $\Delta H = -756,3$ cal/mol.

La valeur de ΔH est négative, l'équilibre est donc exothermique. Une augmentation de la température favorisera le sens endothermique, donc le passage du soluté de la phase stationnaire (couche d'eau) vers la phase mobile ce qui diminuera son temps de rétention.

2.5. Influence du débit de la phase mobile :

La courbe de Van Deemter (fig.11) exprime la hauteur équivalente d'un plateau théorique (HEPT) en fonction du débit de la phase mobile. Le débit optimal pour lequel l'efficacité de la colonne est maximale correspond au minimum de cette courbe.

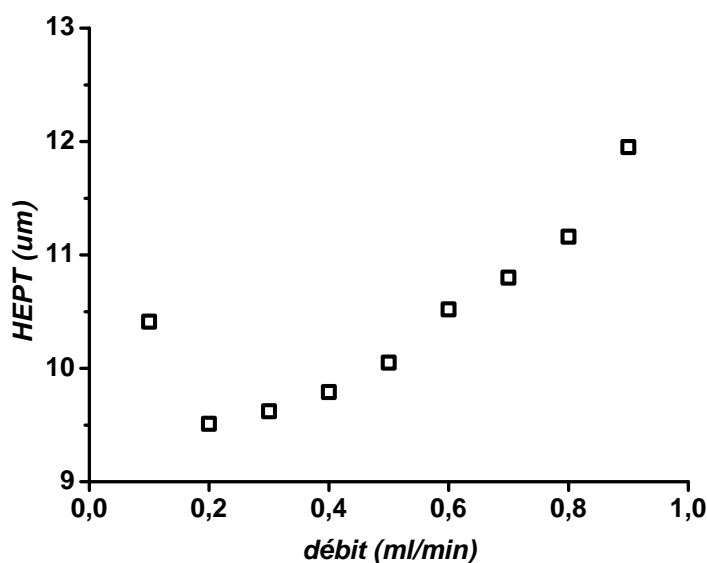


Fig.11 : La courbe de Van Deemter. Colonne Atlantis HILIC Silica 50 mm x 4.6 mm id, 3µm, 70/30 v/v acétonitrile / 200mM formiate d'ammonium à pH=5, T=30°C.

La courbe présente un minimum pour un débit de 0.2 ml/min qui correspond à une HEPT de 9.5 µm. Cependant, avec un débit aussi faible, le temps de rétention de la citicoline est élevé. Nous avons donc retenu le débit de 0,5 ml/min qui nous permet d'avoir une bonne rétention sans perte importante de l'efficacité.

Conditions retenues pour l'analyse de la citicoline en mode HILIC :

Après l'étude de l'influence de plusieurs facteurs (composition, force ionique, pH, température et débit) sur les différents paramètres chromatographiques (temps de rétention, facteur de rétention, symétrie du pic et l'efficacité de la colonne), les conditions retenues sont :

Colonne : Atlantis HILIC Silica 50 mm x 4.6 mm id, 3µm.

Le débit : 0.5 ml/min.

La composition : 70% acétonitrile : 30% tampon (v/v).

La force ionique : 200 mM.

Le pH : 3.

La température : 30°C.

3. Choix de la longueur d'onde :

Le choix de la longueur d'onde est effectué après le choix de la phase mobile en prenant un spectre UV de la molécule dans ce solvant. Le spectre obtenu est illustré sur la figure 12.

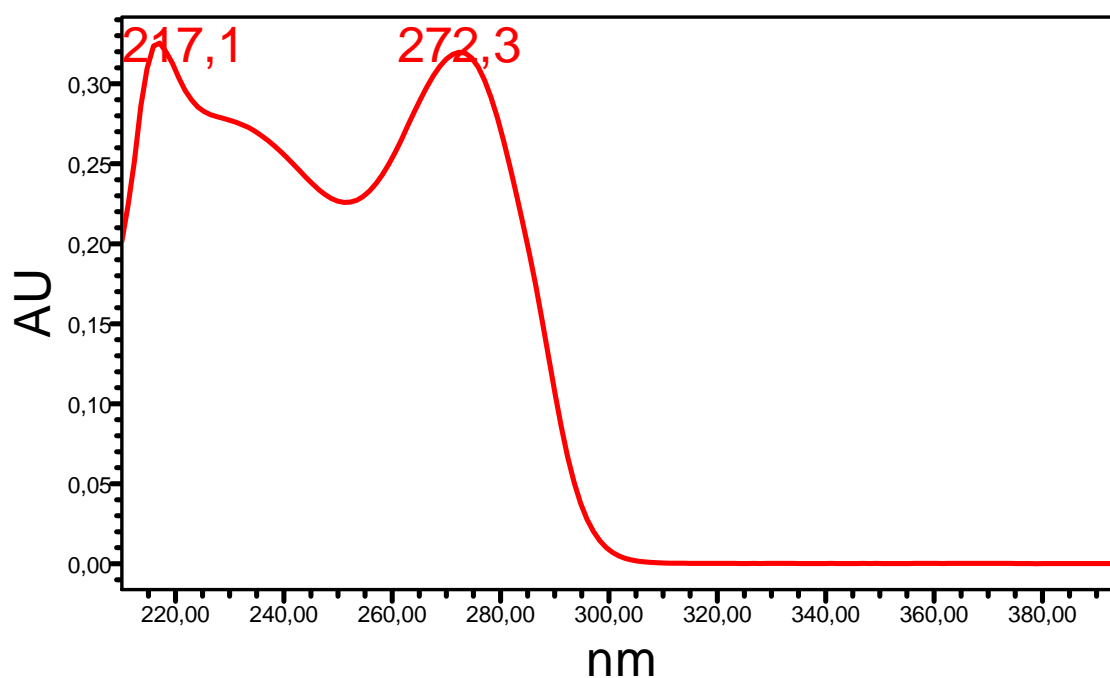


Fig.12 : Spectre UV de la citicoline dans phase mobile.

Nous avons donc retenu 270 nm.

VALIDATION
DE
LA
METHODE

Validation de la méthode :

Toutes les solutions sont analysées selon les conditions chromatographiques (tableau 7) retenues pour l’analyse de la citicoline.

Tableau 7 : Conditions chromatographiques.

Phase stationnaire	Atlantis HILIC Silica 50 mm x 4.6 mm id, 3 µm
Phase mobile	70/30 v/v Acétonitrile/ 200 mM formiate d’ammonium à pH=3
Longueur d’onde	270 nm
Température	30°C
Volume injecté	20 µL
débit	0.5 mL/min

1. La spécificité :

Les chromatogrammes obtenus lors de l’injection du placebo et du principe actif sont représentés dans les figures suivantes :

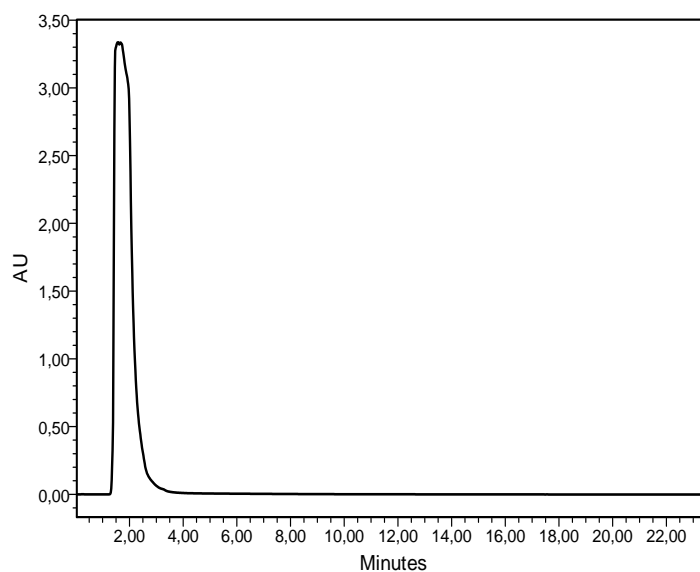


Fig.13 : Chromatogramme du placebo.

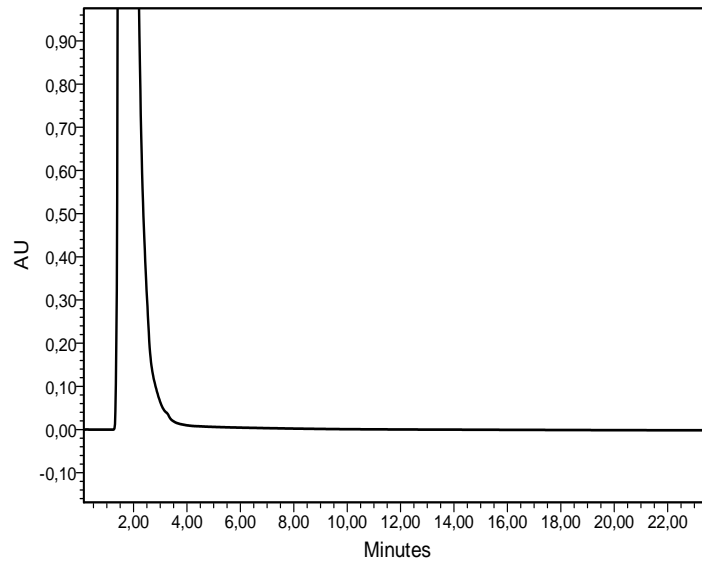


Fig.14 : Agrandissement du chromatogramme du placebo.

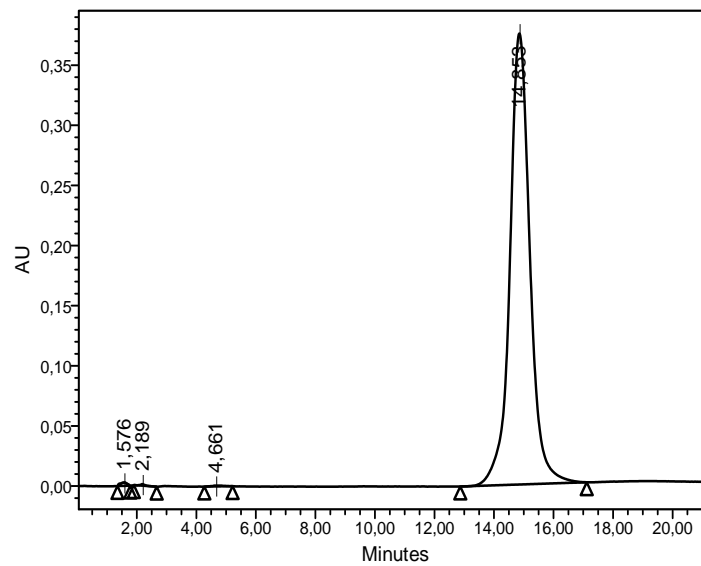


Fig.15 : Chromatogramme du principe actif.

Une comparaison des deux chromatogrammes obtenus montre l'absence d'interférence entre la citicoline et l'un des constituants du placebo. Ceci nous permet de confirmer que la méthode retenue est spécifique.

2. La linéarité :

Les différentes solutions préparées pour l'étude de la linéarité sont injectées. Les surfaces des pics sont données dans le tableau suivant :

Tableau 8 : Surface des pics de la linéarité.

$C_{\text{théorique}}$	Numéro de l'injection	La surface du pic
50	1	4,1877E6
	2	4,14534E6
	3	4,1095E6
	4	4,11171E6
75	1	6,4302E6
	2	6,46189E6
	3	6,47718E6
	4	6,48218E6
100	1	8,12518E6
	2	8,1273E6
	3	8,14697E6
	4	8,16269E6
125	1	1,07338E7
	2	1,07337E7
	3	1,0748E7
	4	1,07678E7
150	1	1,366E7
	2	1,33669E7
	3	1,33945E7
	4	1,34524E7

La courbe exprimant la surface des pics en fonction de la concentration de la citicoline est représentée dans la figure 16 :

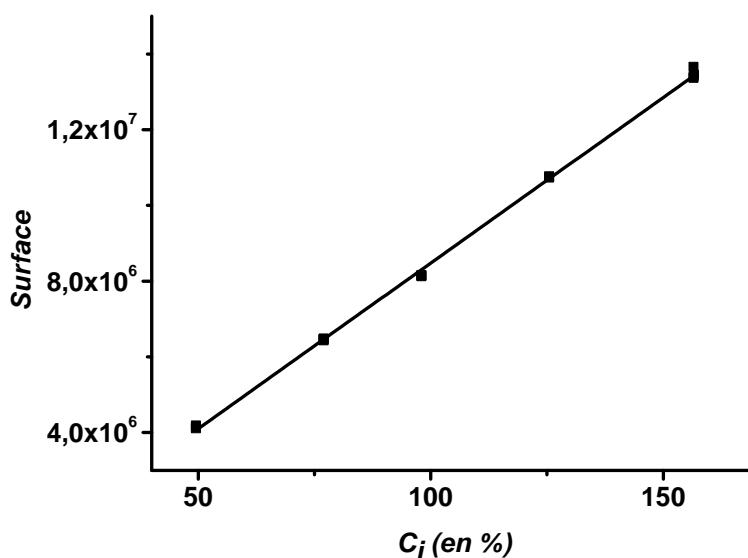


Fig.16 : Courbe de la linéarité.

Les résultats issus de cette courbe sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau 9 : Résultats de la linéarité.

	Linéarité
Equation de la droite	$Y = 87476.16 X - 270521.95$
Pente	$87476,16 \pm 640,65$
Ordonné à l'origine	$- 270521,95 \pm 69138,89$
R^2	0.999

Le coefficient de corrélation R est 0.9995 ($R^2 = 0.999$) proche de 1 montre que la méthode est linéaire.

Pour le calcul du biais, les résultats sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Calcul du biais.

% C _{théorique}	% C _{expérimentale}	Surface	% C _{Corrigée}	Bi
50	49,5	4,1877E6	50,96	102,95
		4,14534E6	50,48	101,98
		4,1095E6	50,07	101,15
		4,11171E6	50,10	101,21
75	77	6,4302E6	76,60	99,48
		6,46189E6	76,96	99,95
		6,47718E6	77,14	100,18
		6,48218E6	77,19	100,25
100	98	8,12518E6	95,98	97,94
		8,1273E6	96,00	97,96
		8,14697E6	96,23	98,19
		8,16269E6	96,41	98,38
125	125,5	1,07338E7	125,80	100,24
		1,07337E7	125,80	100,24
		1,0748E7	125,96	100,37
		1,07678E7	126,19	100,55
150	156,5	1,366E7	159,25	101,76
		1,33669E7	155,90	99,62
		1,33945E7	156,21	99,81
		1,34524E7	156,88	100,24

$Bi_{Moy} = 100.12 \pm 1.33$

Donc $95 < Bi_{Moy} < 105$.

Ce résultat nous permet de dire que dans le cas du dosage de la citicoline par cette méthode on utilise un seul point d'étalonnage.

3. La linéarité en présence du placebo :

Les surfaces des pics obtenues sont groupées dans le tableau 11 :

Tableau 11 : Surface des pics de la linéarité en présence du placebo.

% C _{théorique}	% C _{expérimentale}	Surfaces
50	51,5	4,14979E6
		4,13907E6
		4,13712E6
		4,13317E6
75	73	6,31824E6
		6,2927E6
		6,30611E6
		6,29222E6
100	99	8,39916E6
		8,39865E6
		8,39909E6
		8,36756E6
125	125,5	1,06324E7
		1,06185E7
		1,06752E7
		1,06847E7
150	146,5	1,28217E7
		1,27729E7
		1,27699E7
		1,27285E7

On trace la droite de la linéarité en présence du placebo et celle du produit pur sur un même graphe (figure 17).

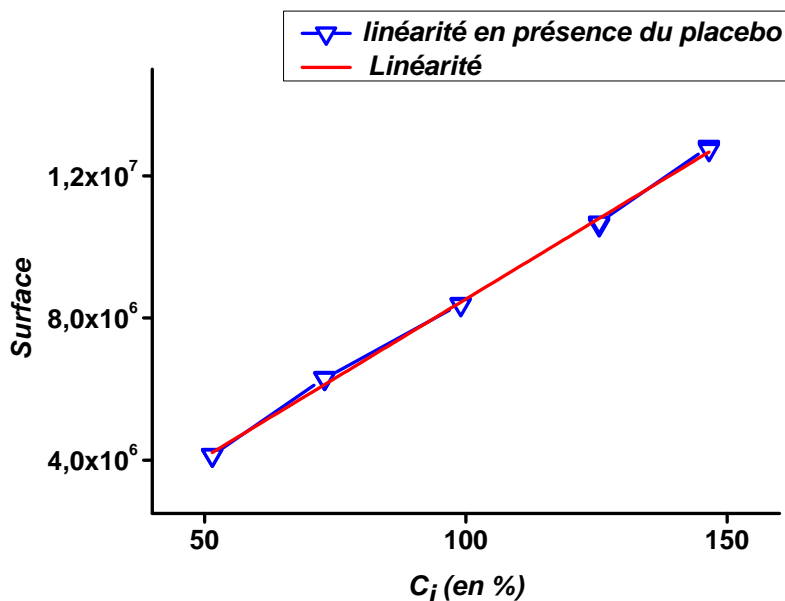


Fig. 17 : Courbes de la linéarité et la linéarité en présence du placebo.

On constate qu’elles sont pratiquement confondues indiquant qu’il n’y a aucune interférence entre le principe actif et les excipients. Cela confirme que la méthode est spécifique qualitativement et quantitativement.

Le tableau 12 représente la comparaison entre les résultats des deux linéarités.

Tableau 12 : Résultats de la courbe de la linéarité et la linéarité en présence du placebo.

	Linéarité	Spécificité
Equation de la droite	$Y = 87476.16 X - 270521.95$	$Y = 89004.63 X - 368527.74$
Pente	$87476,16 \pm 640,65$	$89004,63 \pm 831,91$
Ordonné à l’origine	$- 270521,95 \pm 69138,89$	$-368527,74 \pm 87247,10$
R ²	0,999	0,998

4. La fidélité :

Les résultats des injections des deux manipulateurs sont regroupés dans le tableau 13 :

Tableau 13 : Surfaces des pics de la fidélité.

	Surfaces			
Série 1 manipulateur 1	9,35657E6	9,45458E6	9,57753E6	9,53448E6
Série 2 manipulateur 1	9,68728E6	9,40781E6	9,19768E6	9,53749E6
Série 1 manipulateur 2	9,3981E6	9,45348E6	9,52418E6	9,48454E6
Série 2 manipulateur 2	9,68119E6	9,36916E6	9,17673E6	9,55148E6

Les calculs statistiques donnent les résultats suivants :

Tableau 14 : Calcul des erreurs systématiques RSD.

RSD intra	1,96%	<2%
RSD inter	1,16%	<2%
RSD totale	1,58%	<2%

Les coefficients de variation <2% montrent que la méthode est fidèle.

5. L'exactitude :

Les tableaux 15 et 16 regroupent les résultats de l'exactitude.

Tableau 15 : Résultats de l'exactitude.

	Valeur de référence	Valeur expérimentale			
Série 1 manipulateur 1	100	98,89	99,92	101,22	100,77
Série 2 manipulateur 1	100	102,38	99,43	97,21	100,80
Série 1 manipulateur 2	100	99,32	99,91	100,66	100,24
Série 2 manipulateur 2	100	102,32	99,02	96,98	100,95

Tableau 16 : Calcule de l'exactitude.

PR	LI	LS	exactitude
99,999	98,786	101,214	0.002%

On voit clairement que le PR est compris entre LI et LS avec une bonne précision, exactitude < 2.5%, ce qui confirme que la méthode est exacte.

6. Limite de détection et limite de quantification :

La surface moyenne déterminée sur le bruit de fond de la phase mobile est de 44.84, pour cela on a :

$$\begin{aligned} \text{LOD} &= 3 * 44.84 \\ &= 134.52 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Donc LOD} &= 3.17 \text{ ng/ml} \\ &= 3.17 \text{ ppb} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{LOQ} &= 10 * 44.84 \\ &= 448.40 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Donc LOQ} &= 10.57 \text{ ng/ml} \\ &= 10.57 \text{ ppb} \end{aligned}$$

7. La stabilité :

Les solutions n'ont montré aucune dégradation pendant huit jours aux deux températures, l'une à température ambiante et l'autre à 4°C indiquant qu'elles sont stables durant cette période.

DOSAGE
DU
PRODUIT FINI

Dosage du produit fini :

La méthode retenue a servi au dosage de la citicoline dans une solution buvable et les résultats sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Résultats du dosage.

solutions	Surface des pics	Concentration mg/ml
Standard	1,0168383E7	Pe = 23.6 mg Moyenne du standard : 1,0178871E7
	1,0172418E7	
	1,0137740E7	
	1,0192177E7	
	1,0223636E7	
Essai S1	9,8006E6	101,05
	9,79567E6	100,99
	9,80969E6	101,14
Essai S2	9,80194E6	101,06
	9,82304E6	101,28
	9,82681E6	101,32
Essai S3	9,44319E6	97,36
	9,40381E6	96,95
	9,34922E6	96,39
Essai S4	9,64193E6	99,41
	9,68877E6	99,89
	9,6968E6	99,98
Essai S5	9,83248E6	101,37
	9,76069E6	100,63
	9,81393E6	101,18

La moyenne est : 100.00 ± 1.72 mg/ml

Le résultat obtenu est dans les normes $100 \pm 5\%$ mg/ml

Les chromatogrammes de la solution témoin et la solution essai sont représentés dans les figures ci-dessous :

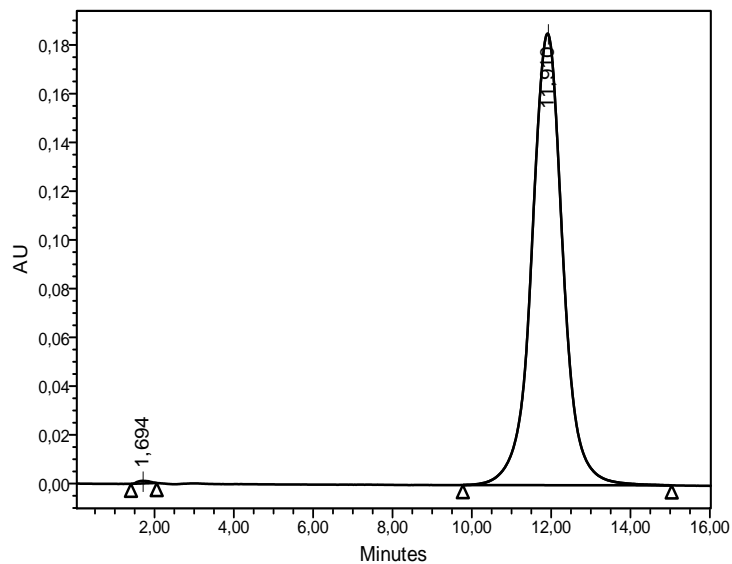


Fig.18. chromatogramme de la solution témoin.

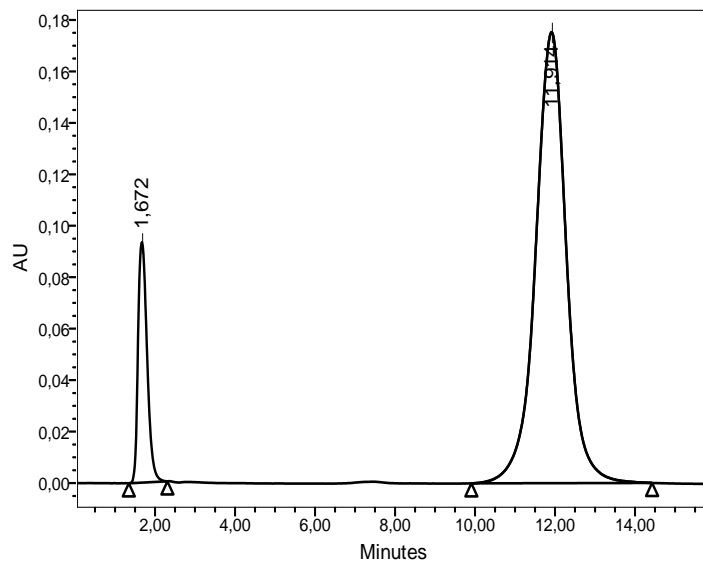


Fig.19. chromatogramme de la solution essai.

CONCLUSION

Conclusion :

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au dosage de la citicoline par HPLC. Cette molécule douée d'une polarité élevée (Log P= -7.07) est vite éluée en mode inverse et fortement retenue en mode normal. La chromatographie d'interaction hydrophilique est toute indiquée pour son analyse.

En vue de l'optimisation des conditions d'analyse, nous avons étudié l'influence des paramètres suivants sur les facteurs chromatographiques :

- Le pourcentage de modificateur organique,
- La concentration en sel,
- Le pH,
- La température.

Les conditions opératoires retenues sont :

- ❖ Colonne : Atlantis HILIC 50 mm x 4.6 mm id, 3µm.
- ❖ Le débit : 0.5 ml/min.
- ❖ La composition : 70% acétonitrile : 30% tampon (v/v).
- ❖ La force ionique : 200 mM.
- ❖ Le pH : 3.
- ❖ La température : 30°C

La mise sur le marché d'un médicament nécessite le respect de certaines normes qui peuvent être publiées ou confidentielles. Elles concernent le contrôle des matières premières, le contrôle de routine et spécifications, le contrôle du produit fini, la validation des méthodes etc.....

Les techniques chromatographiques font partie des méthodes les plus utilisées en analyse pharmaceutique et ont fait l'objet d'un travail important dans le domaine de la validation.

La méthode retenue pour l'analyse de la citicoline par chromatographie en mode HILIC a été validée.

Les résultats obtenus ont montré que :

- ✓ La méthode est spécifique quantitativement et qualitativement.
- ✓ Une linéarité et une fidélité satisfaisantes.
- ✓ Un bon pourcentage de récupération confirmant que la méthode est exacte.
- ✓ La stabilité (influence de la température), paramètre facultatif de la validation a été évaluée.

L'étude a été réalisée à 2 températures (4°C et ambiante). Les solutions se sont révélées stables pendant 8 jours aux deux températures.

- ✓ Les limites de détection et de quantification nous permettent de conclure que la méthode est sensible et peut être utilisée dans la recherche des traces et dans le dosage de la citicoline dans les milieux biologiques.

La méthode d'analyse validée a été ensuite appliquée avec succès au dosage de la citicoline dans une forme pharmaceutique.

REFERENCES

- [1] Y. Kazakevich, R. Lobrutto, *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, John Wiley & Sons, Inc., USA, 2007.
- [2] R.L. Wixom, C.W. Gehrke, *Chromatography: A Science of Discovery*, John Wiley & Sons, Inc., USA, 2010.
- [3] P.C. Sadek, *Illustrated Pocket Dictionary of Chromatography*, John Wiley & Sons, Inc., USA, 2004.
- [4] J.F.K. Huber, *Instrumentation for High-Performance Liquid Chromatography*, *J. Chromatogr. Lib. V. 13*, Elsevier Scientific Publishing Company, Netherlands, 1978.
- [5] R.E. Majors, P.W. Carr, *LCGC 19 (2001) 124*.
- [6] M.D. Licker, *Dictionary of Chemistry*, The McGraw-Hill Company Inc., USA, 2nd Ed. 2003.
- [7] L. R. Snyder, T. C. Schunk, *Anal. Chem. 54 (1982) 1764*.
- [8] L. R. Snyder, J. L. Glajch, and J. J. Kirkland, *J. Chromatogr. 218 (1981) 299*.
- [9] E. Heftmann, *Chromatography: A Laboratory Handbook of Chromatographic and Electrophoretic Methods*, Van Nostrand Reinhold Company, New York, 3rd Ed. 1975.
- [10] A. Berthod, *J. Chromatogr. 549 (1991) 1*.
- [11] M.R. Buchmeiser, *J. Chromatogr. A 918 (2001) 233*.
- [12] J. Nawrocki, *Chromatographia 31 (1991) 177*.
- [13] J. Nawrocki, *Chromatographia 31 (1991) 193*.
- [14] E. Katz, R. Eksteen, P. Schoenmakers, N. Miller, *Handbook of HPLC*, Marcel Dekker Inc., USA, 1998.
- [15] M.C. McMaster, *HPLC A Practical User's Guide*, John Wiley & Sons, Inc. USA, 2nd Ed. 2007.
- [16] Y. Wei, T. Lan, T. Tang, L. Zhang, F. Wang, T. Li, Y. Du, W. Zhang, *J. Chromatogr. A 1216 (2009) 7466*.
- [17] B. Vaisman, A. Shikanov, A.J. Domb, *J. Chromatogr. A 1064 (2005) 85*.
- [18] C.P. Jaroniec, M. Jaroniec, M. Kruk, *J. Chromatogr. A 797 (1998) 93*.
- [19] A. Kurganov, U. Trüdinger, T. Isaeva, K. Unger, *Chromatographia 42 (1996) 217*.

- [20] M. Grün, A.A. Kurganov, S. Schacht, F. Schüth, K.K. Unger, *J.Chromatogr. A* 740 (1996) 1.
- [21] J. Winkler, S. Marmé, *J. Chromatogr. A* 888 (2000) 51.
- [22] P. L. Smith, W. T. Cooper, *J. Chromatogr.* 410 (1987) 249.
- [23] E. L. Weiser, A. W. Salotto, S. M. Flach, R. L. Snyder, *J. Chromatogr.* 303 (1984) 1.
- [24] A.W. Salotto, E. L. Weiser, K. P. Caffey, R. L. Carty, S. C. Racine, R. L. Snyder, *J. Chromatogr.* 498 (1990) 55.
- [25] L. D. Olsen, R. J. Hurtubise, *J. Chromatogr.* 479 (1989) 5.
- [26] T. Hamoir, D.L. Massar, *J. Chromatogr. A* 673 (1994) 1.
- [27] H. Kažoka, *J. Chromatogr. A* 1189 (2008) 52.
- [28] D. Cho, S. Park, J. Hong, T. Chang, *J. Chromatogr. A* 986 (2003) 191.
- [29] J. Nawrocki, C. Dunlap, J. Li, J. Zhao, C.V. McNeff, A. McCormick, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 31.
- [30] Y. V. Kazakevich, R. LoBrutto, F. Chan, T. Patel, *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 75.
- [31] F. Chan, L.S. Yeung, R. LoBrutto, Y.V. Kazakevich, *J. Chromatogr. A* 1082 (2005) 158.
- [32] F. Chan, L.S. Yeung, R. LoBrutto, Y.V. Kazakevich, *J. Chromatogr. A* 1069 (2005) 217.
- [33] J. Wei, *Handbook of Ion Chromatography V. 1*, John Wiley & Sons, Inc. USA, 3rd Ed. 2005.
- [34] A.J. Alpert, *J. Chromatogr.* 499 (1990) 177.
- [35] A.J.P. Martin, R.L. M. Synge, *Biochem. J.* 35 (1941) 1358.
- [36] P. Hemström, K. Irgum, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1784.
- [37] J.C. Linden, C.L. Lawhead, *J. Chromatogr.* 105 (1975) 125.
- [38] J.P. Palmer, *Anal. Lett.* 8 (1975) 215.
- [39] M. Lämmerhofer, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 679.
- [40] M.S. Ali, M. Ghori, S. Rafiuddin, A.R. Khatri, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 158.
- [41] S.D. Braon, C.A. White, M.G. Bartlett, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16 (2002) 1871.

- [42] H.Y. Ji, D.W. Jeong, Y.H. Kim, H.H. Kim, D.R. Sohn, M.S. Lee, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 622.
- [43] J. Zhou, J. Zhao, X. Xue, J. Zhang, F. Chen, Y. Li, L. Wu, C. Li, J. Mi, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 4164.
- [44] F. Alrimawi, *Saudi Pharmaceutical Journal* 18 (2010) 103.
- [45] R. Heydari, *Anal. Lett.* 41 (2008) 965.
- [46] D. desoubzdanne, C. Claparols, N. Martins-Froment, C. Zedde, S. Balayssac, V. Gilard, F. Tersé, R. Martino, M. Malet-Martino, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 2723.
- [47] X. Wu, W. Huang, L. Lu, L. Lin, X. Yang, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 1319.
- [48] S. Van Dorpe, V. Vergote, A. Pezeshki, C. Burvenich, K. Peremans, B. De Spiegeller, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 728.
- [49] B. Dejaegher, Y.V. Heyden, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 698.
- [50] B.A. Olsen, *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 113.
- [51] B.W. Pack, D.S. Risley, *J. Chromatogr. A* 1073 (2005) 269.
- [52] D.V. McCalley, *J. Chromatogr. A* 1193 (2008) 85.
- [53] F. Gritti, A.D.S. Pereira, P. Sandra, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 683.
- [54] M. De Person, A. Hazotte, C. Elfakir, M.J. Lafosse, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 174.
- [55] J.C. Valette, C. Demesmay, J.L. Rocca, E. Verdon, *Chromatographia* 59 (2004) 55.
- [56] A.R. Oyler, B.L. Armstrong, J.Y. Cha, M.X. Zhou, Q. Yang, R.I. Robinson, R. Dunphy, D.J. Burinsky, *J. Chromatogr. A* 724 (1996) 378.
- [57] Y. Guo, A. Huang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 1191.
- [58] Y. Yang, R.I. Boysen, M.T.W. Hearn, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5518.
- [59] <http://www.shodex.com/english/dc030237.html> et <http://www.shodex.com/english/dc030238.html>.
- [60] T. Ikegami, H. Fujita, K. Horie, K. Hosoya, N. Tanaka, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 578.
- [61] Y.Y. Tolskikov, O. Fiehn, *Anal. Biochem.* 301 (2002) 298.
- [62] A.E. Karatapanis, Y.C. Fiamegos, C.D. Stalikas, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 909.

- [63] N.S. Quiming, N.L. Denola, Y. Saito, A.P. Catabay, K. Jinno, *Chromatographia* 67 (2008) 507.
- [64] A. Tai, E. Gohda, *J. Chromatogr. B* 853 (2007) 214.
- [65] H. Tanaka, X. Zhou, O. Masayoshi, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 119.
- [66] F. Švec, M. Petro, J.M.J. Fréchet, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 66 (2001) 1047.
- [67] C.T. Mant, R.S. Hodges, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 2754.
- [68] Z. Guo, A. Lei, Y. Zhang, Q. Xu, X. Xue, F. Zhang, X. Liang, *Chem. Commun.* 24 (2007) 2491.
- [69] D. Armstrong, H. Jin, *J. Chromatogr.* 462 (1989) 219.
- [70] H. Zhang, Z. Guo, F. Zhang, Q. Xu, X. Liang, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1623.
- [71] C. Wang, Z.S. Breitbach, D.W. Armstrong, *Sep. Sci. Technol.* 45 (2010) 447.
- [72] Q. Fu, Z. Guo, T. Liang, X. Zhang, Q. Xu, X. Liang, *Anal. Methods* 2 (2010) 217.
- [73] H. Huang, Y. Jin, M. Xue, L. Yu, Q. Fu, Y. Ke, C. Chu, X. Liang, *Chem. Commun.* 45 (2009) 6973.
- [74] Z. Guo, Y. Jin, T. Liang, Y. Liu, Q. Xu, X. Liang, A. Lei, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 257.
- [75] C. McClintic, D.M. Remick, J.A. Peterson, D.S. Risley, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 26 (2003) 3093.
- [76] S.R. Needham, P.R. Brown, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000) 597.
- [77] C.T. Mant, R.S. Hodges, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1573.
- [78] M. Liu, E.X. Chen, R. Ji, D. Semin, *J. Chromatogr. A* 1188 (2008) 255.
- [79] D.S. Bell, A.D. Jones, *J. Chromatogr. A* 1073 (2005) 99.
- [80] S.R. Needham, P.M. Jeanville, P.R. Brown, E.S. Estape, *J. Chromatogr. B* 748 (2000) 77.
- [81] L. Tölgyesi, P. Kele, K. Torkos, *Chromatographia* 71 (2010) S75.
- [82] K. Horie, T. Ikegami, K. Hossy, N. Saad, O. Fiehn, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A* 1164 (2007) 198.

- [83] T. Ikegami, K. Horie, J. Jaafar, K. Hosoya, N. Tanaka, *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 31.
- [84] J. Lin, J. Lin, X. Lin, Z. Xie, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 801.
- [85] D.S. Risley, M.A. Strege, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1736.
- [86] M. Lämmerhofer, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 814.
- [87] E. Tešařová, K. Záruba, M. Flieger, *J. Chromatogr. A* 844 (1999) 137.
- [88] J. Lehotay, K.H. Robonova, J. Cizmarik, M. Reneova, D.W. Armstrong, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 24 (2001) 609.
- [89] E. Tesařová, Z. Bosáková, V. Pacáková, *J. Chromatogr. A* 838 (1999) 121.
- [90] L. Matysová, L. Havliková, R. Hájková, A. Krivda, P. Solich, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50 (2009) 23.
- [91] C.R. Mitchell, Y. Bao, N.J. Benz, S. Zhang, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 4133.
- [92] G. Jin, Z. Guo, F. Zhang, X. Xue, Y. Jin, X. Liang, *Talanta* 76 (2008) 522.
- [93] J.K. Fountain, J. Xu, M.D. Diehl, D. Mourrison, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 740.
- [94] W. Naidong, H.Z. Bu, Y.L. Chen, W.Z. Shou, X. Jiang, T.D.J. Halls, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 1115.
- [95] T. Kimura, K. Nakagawa, Y. Saito, K. Yamagishi, M. Suzuki, K. Yamaki, H. Shinmoto, T. Miyazawa, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 1415.
- [96] F.H. Rabel, A.G. Caputo, E.T. Butts, *J. Chromatogr.* 126 (1976) 731.
- [97] M. Liu, J. Ostovic, E.X. Chen, N. Cauchon, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2362.
- [98] P. Hemström, Y. Nygren, E. Björn, K. Irgum, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 599.
- [99] Y. Nygren, P. Hemström, C. Åstot, P. N.E. Björn, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 948.
- [100] Y.J. Xue, J. Liu, S. Unger, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 979.
- [101] P. Zuccaro, R. Ricciarello, S. Pichini, R. Pacifici, I. Altieri, M. Pellegrini, G.D'Ascenzo, *J. Anal. Toxicol.* 21 (1997) 268.
- [102] K. Vishwanathan, R.L. Tackett, J.T. Stewart, M.G. Bartlett, *J. Chromatogr. B* 748 (2000) 157.

- [103] H. Koc, M.H. Mar, A. Ranasinghe, J.A. Swenberg, S.H. Zeizel, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4734.
- [104] K. Hosoy, N. Hira, K. Yamamoto, M. Nishimura, N. Tanaka, *Anal. Chem.* 78 (2006) 5729.
- [105] M. Pelzer, T.L.W. Addison, X. Jiang, W. Naidong, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 25 (2002) 1019.
- [106] Z.S. Wilson, N. Weng, *J. Chromatogr. B* 825 (2005) 186.
- [107] A.J. Alpert, *Anal. Chem.* 80 (2008) 62.
- [108] W.Z. Shou, W. Naidong, *J. Chromatogr. B* 825 (2005) 186.
- [109] C.E. Wujcik, J. Tweed, E.P. Kadar, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 826.
- [110] Y. Hsieh, C.J. Duncan, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 573.
- [111] Y. Guo, S. Gaiki, *J. Chromatogr. A* 1074 (2005) 71.
- [112] X. Wang, W. Li, H.T. Rasmussen, *J. Chromatogr. A* 1083 (2005) 58.
- [113] A.J. Alpert, M. Shubla, A.K. Shubla, L.R. Zieske, S.W. Yuen, M.A.J. Ferguson, A. Mahlert, M. Pauly, R. Orlando, *J. Chromatogr. A* 676 (1994) 178.
- [114] Q. Ma, M. Chen, H.R. Yin, Z.G. Shi, Y.Q. Feng, *J. Chromatogr. A* 1212 (2008) 61.
- [115] M.S. Ali, M. Ghori, S. Rafiuddin, M. Ghori, A.R. Khatri, *Chromatographia* 67 (2008) 517.
- [116] Z. daunoravicius, I. Juknaite, E. Naujalis, A. Padarauskas, *Chromatographia* 63 (2006) 373.
- [117] L.A.T. VerHaar, B.F.M. Kuster, *J. Chromatogr.* 234 (1982) 57.
- [118] S. Vikingsson, R. Kronstrand, M. Josefsson, *J. Chromatogr. A* 1187 (2008) 46.
- [119] T. Yoshida, *J. Biochem. Biophys. Meth.* 60 (2004) 265.
- [120] A. Berthod, S.S.C. Chang, J.P.S. Kullman, D.W. Armstrong, *Talanta* 47 (1998) 1001.
- [121] U. Lewandrowski, K. Lohrig, R.P. Zahedi, D. Wolters, A. Sickmann, *Clin. Proteomics* 4 (2008) 25.
- [122] S.D. Garbis, A. Melse-Boonstra, C.E. West, R.B. VanBremen, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5358.

- [123] Y.S. Hsieh, J.W. Chen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 3031.
- [124] J.H. Beumer, E. Joseph, M.J. Egorin, J.M. Corey, J.L. Eigeman, *J. Chromatogr. B* 831 (2006) 147.
- [125] R. Pisano, M. Breda, S. Grassi, C.A. James, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 738.
- [126] L. Kavalova, C.S. Mc Ardell, J. Hollender, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1100.
- [127] H.L. Koh, A.J. Lan, E.C.Y. Chan, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 1237.
- [128] N.N. Aronson, B.A. Halloran, M.F. Alexyev, L. Amable, J.D. Madura, L. Pasupulati, C. Worth, P. VanRoey, *Biochem. J.* 376 (2003) 87.
- [129] J.K. Troyer, K.K. Stephenson, J.W. Fahey, *J. Chromatogr. A* 919 (2001) 299.
- [130] J.A. Beutler, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 20 (1997) 2415.
- [131] G. Karlsson, S. Winge, H. Sandberg, *J. Chromatogr. A* 1092 (2005) 246.
- [132] B.Y. Zhu, C.T. Mant, R.S. Hodges, *J. Chromatogr.* 548 (1991) 13.
- [133] J.M. Lobenhoffer, S.M.B. Böger, *Clin. Chem.* 52 (2006) 488.
- [134] T. Langrock, P. Czihal, R. Hoffmann, *Amino Acids* 30 (2006) 291.
- [135] P. Jenö, P.E. Scherer, U. Manningkri, M. Horst, *Anal. Biochem.* 215 (1993) 292.
- [136] L. Nováková, D. Solichová, P. Solich, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1634.
- [137] L. Nováková, D. Solichová, P. Solich, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4574.
- [138] M.J. Farre, S. Brosillon, X. Domenech, J. Peral, *J. Photochem. Photobiol. A* 189 (2007) 364.
- [139] T. Sano, H. Takagi, K. Nagano, M. Nishikawa, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4344.
- [140] R. Li, Y. Zhang, C.C. Lee, R. Lu, Y. Huang, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1799.
- [141] C.S.K. Raju, A. Cassmer, H. Scharf, U. Panne, D. Lück, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 55.
- [142] B. Zwicki, G. Catchpole, J. Draper, O. Fiehn, *Anal. Biochem.* 336 (2005) 178.
- [143] L. Chen, H. Chen, M. Chen, Z. Zhou, A. Ma, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 3736.
- [144] N. Lindegardh, T. Singtoroj, A. Annerberg, N.J. White, N.P. Day, *Therap. Drug Monit.* 27 (2005) 503.

- [145] N. Lindergardh, W. Hanpithakpong, Y. Wattanagoon, P. Singhasivanon, N.J. White, N.P.J. Day, *J. Chromatogr. B* 859 (2007) 74.
- [146] H. Sage, R.B. Vernon, L. Iruela-Arispe, T ;f ; Lane. *J. Cell. Biol.* 125(1994)929.
- [147] J.X. Huang, R.P. Li, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 28 (2005) 2737.
- [148] L. Ouerdane, S. Mari, P. Czernic, M. Lebrun, R. Lobiński, *J. Anal. At. Spectrom.* 21 (2006) 676.
- [149] T. Doi, K. Kajimura, S. Takatori, N. Fukiri, S. Tagushi, S. Iwagani, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 1005.
- [150] B. Band, P.A. Carrupt, S. Martel, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 3416.
- [151] C. Giaginis, A. Tsantili-Kakoulidou, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 31 (2008) 79.
- [152] J. Hmelnickis, O. Pugovičs, H. Kažoka, A. Viksna, I. Susinskis, K. Kokums, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 649.
- [153] S.I. Kawano, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 907.
- [154] W. Naidong, W.Z. Shen, T. Addisson, S. Maleki, X. Jiang, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16 (2002) 1965.
- [155] Y. Hsieh, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1418.
- [156] Q. Song, W. Naidong, *J. Chromatogr. B* 830 (2006) 135.
- [157] C. Apostolou, C. Kousoulos, Y. Dotsikas, Y.L. Lonkas, *Biomed. Chromatogr.* 22 (2008) 1393.
- [158] H.P. Nguyen, K.A. Schug, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1465.
- [159] D.V. McCalley, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 858.
- [160] M. Windholz, *The Merk Index, Merk and Co Ink., USA, 9th Ed.* 1976.
- [161] A. Couturier, O. Calvetti, *Ophthalmologies* 3 (2009) 94.
- [162] S.C. Sweetman, *Martindale: The Complete Drug Reference, Pharmaceutical Press, USA, 36th Ed.* 2009.
- [163] R. Canant, A.G. Schauss, *Alter. Med. Rev.* 9 (2004) 17.