



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

Université Mohamed Seddik Ben Yahya - Jijel
Faculté Des Sciences Exactes et Informatique
Département de Chimie

N° d'ordre :

N° de série :

THESE

Pour obtenir le diplôme de Docteur en Sciences

Spécialité : Chimie

THEME

**SEPARATION DE QUELQUES PROFENES (ANTI-
INFLAMMATOIRES NON STEROIDIENS) PAR LA
CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE**

Présentée par

Mme. BOUCHAIR NABILA

Le 12 / 11 / 2015 devant les membres du jury :

Guermouche M. Hassane	Pr.	Président	USTHB – Alger
Hamdi Abderrezak	Pr.	Directeur de thèse	USTHB – Alger
Righezza Michel	Pr.	Co-directeur de thèse	Univ. Aix-Marseille III
Boudah Slimane	Pr.	Examineur	USTHB - Alger
Khelili Smail	Pr.	Examineur	UMSBY - Jijel
Merabet Naima	MCA	Examinatrice	UMSBY - Jijel

Sommaire

I- INTRODUCTION.....	3
II- METHODE D'ANALYSE D'UN MEDICAMENT	8
I. Evaluation d'une méthode d'analyse	9
II. Innovation dans les techniques analytiques.....	11
III- CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE	12
I. Historique.....	13
II. Modes de séparations.....	14
III. Grandeurs chromatographiques	15
IV- COUPLAGE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE – SPECTROMETRIE DE MASSE.....	18
I Introduction.....	19
II Détection par spectrométrie de masse	19
III. Principaux modes d'analyse.....	24
V- CHIRALITE, RECONNAISSANCE CHIRALE et TECHNIQUES D'OBTENTIONS D'ENANTIOMERES PURS.....	26
I Introduction.....	27
II Propriétés physico-chimiques des énantiomères.....	27
III La reconnaissance chirale.....	28
IV. Chiralité et principes actifs	29
V- Techniques d'obtention d'énantiomères purs	34
VI. Méthodes analytiques de discrimination chirale	36
VII. Le sélecteur chiral.....	38
VIII. La reconnaissance chirale.....	38
IX. Classification des sélecteurs chiraux.....	39
VI- PARTIE EXPERIMENTALE	49
PARTIE A.....	50
SEPARATION DE L'IBUPROFENE, DU FLURBIPROFENE ET DE L'ACIDE MANDELIQUE SUR COLONNE CHIRALE ET ACHIRALE.....	52
I. OPTIMISATION	52
I.1 Introduction.....	52
I.3 Appareillage.....	53
I.4 Produits chimiques.....	54

I.5 Recherche des conditions optimales	55
II. RESULTATS ET DISCUSSION	56
II.1 Introduction	56
II.2 Séparation de l'ibuprofène et de ses énantiomères.....	57
II.3 Séparation du flurbiprofène et de ses énantiomères	63
II.4 Séparation de l'acide mandélique et de ses énantiomères	67
PARTIE B	71
SEPARATION DE QUELQUES PROFENES PAR HPLC EN UTILISANT LA VANCOMYCINE COMME PHASE STATIONNAIRE CHIRALE PREPAREE AU LABORATOIRE.....	72
I Introduction.....	72
II. Appareillage, produits chimiques et méthodes	75
III. Recherche des conditions optimales	76
IV. Préparation de la colonne au laboratoire.....	78
V. Résultats et discussion.....	79
Conclusion.....	115
PARTIE C	116
APPLICATION SUR LA COLONNE PREPAREE PAR L'ANALYSE DE QUELQUES SUBSTANCES CHIRALES PRESENTANT UN CARACTERE ACIDE OU BASIQUE.....	117
I. Introduction.....	117
II. Appareillage, produits chimiques et méthodes	118
III. Recherche des conditions optimales	119
IV. Résultats et discussions.....	121
Conclusion.....	140
VII- CONCLUSION GENERALE	141
VII- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	144

I- INTRODUCTION

Aujourd'hui, les innovations se succèdent dans le domaine pharmaceutique qui constitue un secteur de recherche important dans les universités, les hôpitaux et les industries. La plupart des médicaments sont identifiés par l'une des approches suivantes : modification chimique d'une molécule connue, étude systématique de l'activité biologique de produits naturels ou d'entités chimiques découvertes précédemment ou l'élaboration rationnelle d'un médicament basée sur la compréhension des mécanismes biologiques. Les travaux actuels permettent notamment la standardisation de plusieurs produits pharmaceutiques et l'extraction de leurs principes actifs. Ces produits ont été inscrits dans les pharmacopées, conduisant les fabricants à créer leurs propres laboratoires.

Dans la plupart des pays, l'essai des nouveaux médicaments est maintenant réglementé par la législation et surveillé de très près par les instances gouvernementales pour échapper à l'emprise des multinationales et éviter de graves dérives qui peuvent être engendrées par le marché très lucratif du médicament. Ces organismes ont la responsabilité de mettre un frein aux abus ou à l'imprudence des fabricants, en limitant les risques de la mise sur le marché d'un médicament nocif ou inefficace.

Des lois gouvernementales exercent un contrôle très sévère pour l'autorisation de commercialiser des produits pharmaceutiques et ce pour des raisons évidentes de sûreté et de sécurité afin d'éviter de provoquer une catastrophe aussi grave que celle de la thalidomide (composé chiral commercialisé sous forme racémique).

Depuis le dramatique accident lié à l'utilisation de la thalidomide, les différences de réactivités biologiques des isomères optiques ont été mises en lumière et il est devenu nécessaire de mener des études pharmacologiques sur les isomères séparés. Les nouvelles directives de la pharmacopée européenne de mise sur le marché, ont confirmé récemment cet impératif. C'est ainsi que suite à cette tragédie intervenue dans les années 60, que les autorités de santé des pays industrialisés ont peu à peu imposé des contraintes réglementaires liées à la chiralité des molécules organiques.

La chiralité désigne le fait qu'un objet ne soit pas superposable à son image dans un miroir. Les deux formes d'une molécule chirale appelées énantiomères présentent généralement des effets différents. La commercialisation de produits d'intérêt biologique sous forme racémique a été longtemps favorisée par les fabricants car elle permettait d'abaisser le coût de production, la séparation des énantiomères étant relativement difficile et coûteuse.

Le développement des méthodes analytiques de séparation des énantiomères a suscité un grand intérêt dans ces dernières décennies, depuis qu'il s'est avéré que l'activité biologique ou pharmacologique des composés d'intérêt biologique ou pharmaceutique est le plus souvent limitée à l'un des énantiomères. L'énantiomère pharmacologiquement inactif peut présenter des effets secondaires indésirables, des activités antagonistes ou même des effets toxiques. Même si ces effets secondaires ne sont pas drastiques, l'énantiomère non désiré peut être métabolisé dans l'organisme et représente un inconvénient inutile pour l'organisme. De nombreux composés chimiques tels que les médicaments, les engrais et les additifs alimentaires ont été commercialisés sous forme de mélanges racémiques, bien que l'un des deux isomères uniquement possède des propriétés souhaitables. L'évolution de la compréhension des actions biologiques des énantiomères a incité les chercheurs à enquêter sur leurs propriétés pharmacologiques et toxicologiques. A la lumière de la prise de conscience concernant les isomères biologiquement importantes, la FDA a émis certaines des lignes directrices pour la commercialisation de composés racémiques [1]. Par conséquent, il ya une pression considérable pour développer des méthodes d'analyse de séparation des énantiomères pour le contrôle de la pureté énantiomérique, études pharmacologique, enquêtes pharmacodynamiques, études cliniques, etc [1,2].

Quel que soit l'emploi du produit, il est donc nécessaire de connaître sa pureté optique, c'est pour cette raison qu'il s'est avéré nécessaire de développer des méthodes de contrôle analytique de celle-ci. Trois méthodes chromatographiques ont été utilisées pour la séparation des énantiomères :

- La formation de diastéréoisomères et leur séparation ultérieures sur colonne non chirale (voie indirecte)
- L'addition d'un complexant chiral dans la phase mobile (voie directe)
- La mise en œuvre d'une phase stationnaire chirale (voie directe)

Actuellement, la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est devenue une technique de choix pour la séparation et la quantification des énantiomères, étant donné qu'elle permet la séparation directe des racémiques sur des phases stationnaires chirales ou après addition d'un sélecteur chiral à la phase mobile (voie directe). Des séparations par voie indirecte après dérivation en diastéréoisomères sont également possibles en HPLC. La voie directe est de loin la plus utilisée. De nombreux sélecteurs chiraux tels que les acides aminés [3,4], les protéines [5,6], les cyclodextrines [7,8], les dérivés des polysaccharides (amylose et

cellulose) [9,10], les éthers couronnes [11,12] et les antibiotiques macrocycliques [13–20] sont actuellement disponibles.

Dans ce manuscrit, nous présenterons tout d'abord un rappel bibliographique sur les différentes méthodes d'analyse d'un médicament suivi d'une étude sur les méthodes chromatographiques en phase liquide. La technique de couplage chromatographie liquide – Spectrométrie de masse (LC-MS) sera présentée par la suite. Dans le cinquième chapitre sera présenté un rappel bibliographique sur la notion de chiralité, de la reconnaissance chirale ainsi que les incidences biologiques et thérapeutiques de la chiralité. Nous décrirons par la suite les différentes techniques utilisées pour obtenir des énantiomères purs et les caractéristiques des différents sélecteurs chiraux.

Le but essentiel de notre travail expérimental est l'étude de la séparation chirale de quelques substances pharmaceutiques par HPLC en utilisant des phases stationnaires chirales (PSCs) à base d'un antibiotique glycopeptidique (PSC préparée au laboratoire) ou de polysaccharides, et l'optimisation des méthodes de séparations de ces substances chirales.

Il portera dans un premier temps, sur la séparation de l'ibuprofène, du flurbiprofène et de l'acide mandélique par HPLC et HPLC-MS en utilisant une phase stationnaire conventionnelle de type C18 et des phases stationnaires chirales de type polysaccharides. Pour réaliser ce travail, nous avons fait appel à la HPLC en phase normale et en phase inverse, en mode isocratique et en mode gradient d'élution.

Dans un deuxième temps, une colonne chirale à base d'antibiotique glycopeptidique de type vancomycine est préparée au laboratoire. L'immobilisation de la vancomycine est réalisée par amination réductrice sur la surface de la silice fonctionnalisée aldéhyde. Cette colonne est utilisée pour la séparation des énantiomères de six anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) de type profènes par HPLC en phase inverse (RP-HPLC). Cette technique nécessite l'ajustement de plusieurs paramètres ayant une action significative sur la rétention et l'énantioséparation des solutés. Nous avons donc sélectionné, puis recherché les valeurs de ces paramètres pour lesquelles la qualité de l'analyse est optimale.

La stabilité et la robustesse de la colonne préparée au laboratoire à base de la vancomycine ont été étudiées en analysant des substances pharmaceutiques chirales acides ou basiques en utilisant différents modes chromatographique : mode inverse, mode normale et mode polaire ionique. Plusieurs phases mobiles ont été étudiées.

Notre travail expérimental comprend donc trois parties :

Partie A : La séparation de l'ibuprofène, du flurbiprofène et de l'acide mandélique sur une colonne achirale et des colonnes chirales de type polysaccharides.

Partie B : La préparation d'une colonne chirale à base de la vancomycine et utilisation de cette dernière dans la séparation des énantiomères de six profènes.

Partie C : Etude de la stabilité et la robustesse de la colonne préparée dans la partie B par l'analyse de quelques substances pharmaceutiques chirales présentant un caractère acide ou basique en utilisant trois modes chromatographiques.

II- METHODE D'ANALYSE D'UN MEDICAMENT

L'analyse d'un médicament peut inclure celui-ci, ses excipients, ses adjuvants, ses produits de dégradation, ses impuretés (si > 5%) et ses métabolites. Et pour cela, on adopte la technique d'analyse la plus adéquate selon la nature, le nombre et la quantité de ces produits.

I. Evaluation d'une méthode d'analyse

Le choix d'une méthode d'analyse adéquate dépend à la fois de la forme de dosage du médicament mais aussi de ses propriétés physico-chimique, et éventuellement de sa chiralité. Une fois que ce choix est établi, la méthode doit être validée selon les critères de l'ICH (*international conference of harmonisation*).

La sensibilité d'une méthode représente la pente de la droite d'étalonnage. Une méthode est dite sensible si une faible variation de la quantité d'analyte entraîne une variation importante de la valeur d'information. La sensibilité est souvent démontrée par la plus faible différence de concentration du médicament que la méthode analytique peut détecter.

La spécificité est la capacité d'une méthode à déterminer de façon exacte et spécifique l'analyte concerné en présence d'autres composants dans une matrice d'échantillon dans les conditions spécifiées de l'essai.

Quant à la précision, elle concerne la variabilité des multiples déterminations d'une même concentration. Celle-ci sera définie par le coefficient de variation (% CV) ou l'erreur standard relative (RSD), calculé en fonction des résultats obtenus après plusieurs analyses d'une même concentration.

En clinique, les méthodes radio-immunologiques sont souvent les plus utilisées grâce à leur rapidité d'exécution et leur grande précision dans certains cas. Cependant, chez l'homme, il faut utiliser des techniques analytiques ne nécessitant pas l'administration des médicaments radioactifs. D'une manière générale, les méthodes chromatographiques en particulier la chromatographie en phase gazeuse (CPG) lorsque la stabilité thermique du composé en question le permet et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), sont privilégiées en recherche en raison de leur grande sensibilité et leur spécificité.

Il est à noter qu'en industrie pharmaceutique, la HPLC est sans aucun doute la méthode la plus utilisée actuellement, en particulier pour les molécules thérapeutiques thermodégradables.

Ce progrès remarquable peut être attribué à deux raisons majeures à savoir :

- La capacité de la HPLC à analyser pratiquement tous les échantillons pharmaceutiques d'une façon adéquate.
- A l'amélioration drastique dans la technologie de la HPLC. Ce développement a entraîné une grande évolution, principalement dans la technologie des colonnes, des systèmes de pompage, des détecteurs, la manipulation des données et l'automatisation.

Ces progrès récents ont considérablement amélioré le temps d'analyse, la précision, l'exactitude et la fiabilité exigés par l'analyse pharmaceutique.

Très souvent, au cours de l'analyse d'un médicament ou de son dosage dans un échantillon pharmaceutique ou biologique, la chromatographie liquide à phase inverse (RP-HPLC), est le mode le plus largement utilisé et ce, grâce à sa simplicité d'emploi, sa rapidité mais surtout à son vaste champ d'application d'autant plus qu'il peut s'adapter à des composés moléculaires ou ionisés, polaires ou apolaires.

La HPLC offre une méthode rapide et précise pour les essais de stabilité. Compte tenu de sa haute sensibilité et sa grande sélectivité, on peut séparer les produits de décomposition du produit d'origine même à de très faibles concentrations.

Pour les impuretés inconnues, la HPLC semi-préparative s'impose. Les fractions contenant alors ces produits purs, sont collectées pour être analysées par une autre technique qualitative telle que la spectrométrie de masse (SM), l'infrarouge (IR), la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la fluorimétrie.

Les autres méthodes chromatographiques ont toujours leur place, en particulier la chromatographie sur couche mince (CCM) qui reste d'actualité et peut être utilisée dans un premier temps pour une révélation rapide des produits de dégradation.

Quand à l'analyse des métabolites, une telle étude demande la mise au point de techniques analytiques permettant d'identifier et de doser le médicament et ses métabolites dans divers prélèvements (sang, urine,...) qui sont effectués à des temps déterminés après l'administration du médicament étudié, soit en prise unique, soit en prise répétée.

D'une manière générale, on a recours aux techniques chromatographiques, dont l'intérêt principal est de séparer le médicament de ses métabolites et ses constituants physiologiques de l'organisme avant le dosage proprement dit.

II. Innovation dans les techniques analytiques

Une nouvelle approche de l'analyse des médicaments est actuellement développée : c'est l'ère de la chimie combinatoire [21]. Celle-ci s'est imposée depuis le milieu des années 90 au sein des entreprises pharmaceutiques, agrochimiques ou cosmétologiques comme un outil incontournable pour l'analyse des nouvelles molécules actives.

a- Couplage chromatographie gazeuse – spectrométrie de masse

Lorsque le composé en question n'est pas thermolabile, on utilise la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG – SM) qui facilite beaucoup la détermination des structures moléculaires. Ce couplage CPG – SM est une méthode de choix pour la détermination des métabolites. Cependant, seulement 20 à 30% des médicaments à analyser peuvent être soumis à la CPG.

b- Couplage chromatographie liquide – spectrométrie de masse

Le couplage chromatographie phase liquide / spectrométrie de masse (LC – MS) a abouti ces dernières années à la mise au point d'appareillages utilisables en routine [22, 23].

Ce couplage permet le dosage de composés dans une très large gamme de polarité, de volatilité et de masse grâce au développement de différents types de sources d'ionisations entre autres les ionisations à pression atmosphérique tel que l'électrospray (ES) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) qui deviennent prépondérantes pour le dosage de différentes classes médicamenteuses [24]. Actuellement, cette méthode d'analyse est utilisée pour la détermination des métabolites acides [25] et l'analyse qualitative et quantitative de peptides et de protéines thérapeutiques ou toxiques. L'analyse structurale, en particulier celle des métabolites, est déterminée par le couplage en tandem ou LC / MS-MS.

Les couplages LC / MS et GC / MS sont donc complémentaires dans un domaine où il importe d'identifier puis de doser dans les matrices complexes, des substances de nature très différentes et présentes à faibles concentrations.

III- CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE

I. Historique

La chromatographie en phase liquide bien qu'étant la plus ancienne des méthodes chromatographiques [26, 27] avait été relativement peu utilisée et même délaissée au profit d'autres méthodes de séparation en raison principalement de la lenteur des analyses et de l'absence de détecteurs suffisamment sensibles et universels.

En 1941, la chromatographie de partage a vu le jour grâce à la performance des travaux de A.P.J. Martin et R.L.M. Synge [28] qui ont eu le mérite du prix Nobel en 1952.

Dans les années 50, G.A Howard et A.P.J Martin ont été les précurseurs de la chromatographie liquide à phase inverse [29]. Au cours des années 60, des efforts considérables furent déployés et de nombreux travaux ont été réalisés par différents chercheurs, notamment Horváth, Halasz, Kirkland et Snyder, qui ont conduit à l'aboutissement de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) [30-32]. Dès lors, et en particulier dans les années 70, la chromatographie en phase liquide a bénéficié de l'acquis tant théorique qu'instrumental résultant des nombreuses recherches développées en chromatographie en phase gazeuse et depuis, on a assisté à un regain d'intérêt pour cette méthode qui peut être considérée comme complémentaire à la CPG pour l'analyse de solutés peu volatils ou thermodégradables ce qui est le cas de la majorité des molécules thérapeutiques.

La chromatographie en phase liquide, sans être particulièrement concurrente à la chromatographie en phase gazeuse, se distingue de celle-ci par la variété de ses phases stationnaires et de ses phases mobiles ; et en considérant les interactions mises en jeu et à une température moins élevée, la force de ces interactions s'accroît et sa sélectivité augmente.

Actuellement, la chromatographie en phase liquide est devenue un outil analytique incontournable et performant, utilisé dans des domaines variés allant de l'analyse des fluides biologiques à celui des produits pétroliers lourds. Ce développement est dû à la fois à une meilleure compréhension des mécanismes d'interactions qui sont de plus en plus diverses, aux grandes efficacités des phases stationnaires qui sont de plus en plus fines et enfin aux progrès importants effectués dans le domaine de l'appareillage en particulier les détecteurs qui restent essentiels en chromatographie liquide [33].

II. Modes de séparations

La chromatographie en phase liquide est une méthode de séparation mettant en œuvre différents modes à savoir d'adsorption, partage, paire d'ions, échange de ligands, transfert de charges sans oublier les modes d'exclusion stérique et chiral.

- *Classement des méthodes chromatographiques*

La chromatographie en phase liquide est une méthode d'analyse qui permet de séparer les constituants d'un mélange en utilisant les différences entre les constantes d'équilibre de ces corps lors de leur partage entre une phase mobile dans laquelle ils sont solubles et une phase dite fixe ou stationnaire qui exerce sur eux un effet de rétention. Ceci nous conduit à classer les modes de séparation de deux manières différentes :

1) Selon la nature des phases

- a- La phase stationnaire peut être soit un solide ayant des propriétés adsorbantes, soit un liquide qui solvate un solide (on parle alors de gel), soit enfin un solide à la surface duquel on a greffé des molécules appropriées.
- b- La phase mobile est un liquide qui peut être constitué d'un solvant ou de plusieurs solvants

Selon la nature de l'une des phases stationnaires, nous distinguons deux modes de séparation :

- Chromatographie liquide – solide (CLS)
- Chromatographie liquide – liquide (CLL)

2) Selon la nature des phénomènes mis en jeu

Suivant la nature des phénomènes mis en jeu dans une séparation, nous distinguons plusieurs classes de chromatographie. Plusieurs facteurs interviennent dans le choix du mode de séparation des molécules en fonction des mécanismes de séparation, nous citons par exemple :

- la solubilité dans un liquide : chromatographie de partage
- la taille, la forme des molécules : chromatographie d'exclusion
- la polarité : chromatographie d'adsorption
- la charge électrique : chromatographie par échange d'ions
- la présence de groupe d'atomes formant des sites particuliers : chromatographie d'affinité

La classification des différents types de chromatographie repose sur le fait que l'on a privilégié l'effet de l'un des facteurs ci-dessus, cependant aucune méthode ne repose exclusivement sur un seul de ces facteurs.

III. Grandeurs chromatographiques

III.1 Généralités

En chromatographie liquide, une bonne séparation implique que :

- 1) Les divers constituants du mélange sont retenus dans la colonne, donc présentant une affinité suffisante pour la phase stationnaire pour qu'ils apparaissent dans l'effluent après un volume (volume de rétention) supérieur au volume de phase mobile contenu dans la colonne appelé volume mort. Les espèces n'ayant aucune affinité pour la phase stationnaire, ne sont pas retenues par cette dernière.
- 2) Les différents pics soient bien séparés, ce qui, pour deux pics consécutifs, implique que les bandes de solutés se séparent entre elles (sélectivité) plus vite qu'elles ne s'étalent (efficacité)
- 3) L'analyse soit aussi rapide que possible

III.2 Evaluation du facteur de rétention

Lors d'une analyse en chromatographie liquide haute performance, le signal provenant du détecteur et correspondant à chaque composé élué se présente sous forme d'un pic qui, en principe doit être symétrique et gaussien. Le temps de rétention (t_r) représente le temps d'élution au maximum du pic, mesuré à partir de l'injection. Le temps de rétention d'un soluté non retenu (t_0) correspond au temps nécessaire à l'écoulement de la phase mobile contenue dans la colonne. Pour caractériser la rétention d'un composé, on utilise le facteur de rétention (k) défini par la relation suivante :

$$k = (t_r - t_0) / t_0$$

Les espèces n'ayant aucune affinité pour la phase stationnaire ne sont pas retenues et apparaissent dans l'effluent après le temps t_0 dit temps de rétention nul ou temps mort de la colonne.

III.3 Evaluation de la qualité de séparation de deux pics

a) Sélectivité

Pour caractériser la distance séparant les sommets de deux pics consécutifs 1 et 2, on utilise la sélectivité α définie par la relation :

$$\alpha = (t_{r2} - t_{r0}) / (t_{r1} - t_{r0}) = k_2 / k_1$$

t_{r2} et t_{r1} représentent les temps de rétention des pics 1 et 2 ; k_1 et k_2 représentent les facteurs de capacité des pics 1 et 2.

Dans le cas où les deux pics considérés sont des énantiomères, on parle d'énantiosélectivité. Une valeur d' α égale à 1 signifie que les deux pics considérés sont élués en même temps et qu'il n'y a donc pas de séparation.

b) Efficacité d'une colonne

L'efficacité d'une colonne chromatographique dont dépend l'étalement des pics, est mesurée pour chaque composé par le nombre de plateaux théoriques N de la colonne.

En supposant le pic d'éluion gaussien, on établit la relation suivante :

$$N = 16 (t_r / w)^2 = 5,54 (t_r / \delta)^2$$

Où :

w : largeur du pic à la base exprimée en unité de temps, définie comme la distance entre les points d'intersection des tangentes d'inflexion avec la ligne de base.

δ : largeur du pic à mi-hauteur.

Une colonne sera d'autant plus efficace que N est grand.

L'efficacité dépend de la nature et de l'intensité de toutes les interactions mises en jeu et par la suite des conditions expérimentales, des caractéristiques physico-chimiques et de la nature des phases stationnaire et mobile, du débit et de la température et de la nature du soluté.

c) Résolution

La résolution est le critère le plus couramment utilisé pour apprécier la qualité d'une séparation de deux pics adjacents. Elle est définie par la relation :

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

Avec : w_1 et w_2 : largeurs des pics 1 et 2 à la base.

Deux caractéristiques déterminent le degré de recouvrement des pics:

- a) la distance séparant les sommets de deux pics mesurée par $t_{r2} - t_{r1}$;
- b) la largeur des pics à la base w_1 et w_2 .

Dans le cas de pics d'énantiomères, on parle d'énantiorésolution. Généralement, pour des pics sensiblement de même surface, une valeur de R_s de 1,5 correspond à une séparation complète.

Il est à noter que l'expression de la résolution est le résultat de plusieurs approximations lesquelles dans certains cas, peuvent altérer le jugement porté sur une séparation donnée en particulier lorsque les pics sont très asymétriques et / ou les concentrations des solutés sont très différents (à sensibilité de détection voisine).

IV- COUPLAGE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE – SPECTROMETRIE DE MASSE

I Introduction

Dans le domaine de la bioanalyse, il est nécessaire d'avoir à disposition des méthodes rapides et performantes. La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC – MS) constitue une méthode de choix grâce à sa haute sensibilité et sélectivité. L'évolution rapide du couplage LC – MS concerne de nombreux domaines d'application de la spectrométrie de masse. Cette technique trouve des applications dans des domaines aussi variés que l'industrie agroalimentaire, la médecine, la pharmacologie ou l'environnement.

Les premières expériences de couplage chromatographie liquide – spectrométrie de masse remontent aux années 1973 et 1974 [34]. Cependant des difficultés techniques ont été rencontrées pour combiner le volume de la phase mobile issue de la CPL au vide nécessaire au fonctionnement du spectromètre de masse. Elles ont donc limité pendant de nombreuses années l'essor et l'utilisation en routine de la CPL/SM comme méthode d'analyse dans les laboratoires. Une percée technologique intervient suite au développement par l'équipe de John B. Fenn de l'électrospray, une technique où la désolvatation et l'ionisation des analytes se font de façon simultanée. J.B. Fenn a d'ailleurs reçu un prix Nobel de chimie en 2002 pour cette innovation importante, qui permet enfin le développement des appareils commerciaux de LC-MS dans les années 1990. De nombreuses évolutions techniques y ont régulièrement été apportées, et aujourd'hui, deux principales techniques d'ionisation sont commercialisées par la majorité des fabricants de HPLC-MS, l'ionisation par électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Ces sources constituent réellement des systèmes fiables de couplage LC - MS et leurs applications se diversifient de plus en plus dans le domaine de la biochimie, de la chimie organique, de la pharmacocinétique et de l'environnement.

Les techniques d'ionisation à pression atmosphérique API (ESI et APCI) couvrent presque toute la gamme de polarité des molécules hormis les molécules apolaires. Le principe des différentes interfaces LC – MS a été largement décrit dans la littérature [35]. Les interfaces APCI et ESI sont très complémentaires dans le cadre du couplage LC – MS.

II Détection par spectrométrie de masse

1) principe de la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique analytique puissante utilisée pour l'identification et la quantification des composés inconnus, qui s'est fortement implantée dans le domaine biomédical. Elle permet aussi d'élucider les structures chimiques des molécules

par transformation en ions et fragmentation des molécules étudiées. Son principe de fonctionnement repose sur l'action d'un champ électromagnétique sur une particule chargée, afin en particulier d'en déterminer le rapport masse/charge (m/z) [36]. Fondamentalement, les spectromètres de masse sont tous composés des éléments suivants : un système d'introduction de la substance à analyser, une source pour ioniser les molécules introduites, un ou plusieurs analyseurs pour séparer les différents ions générés dans la source en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z), un détecteur pour dénombrer les ions et amplifier les signaux, et enfin un système de traitement des données (l'enregistreur) permettant la visualisation et l'enregistrement des spectres de masse et/ou des chromatogrammes lors d'un couplage avec une technique chromatographique [36, 37].

2) La source

La source d'ionisation consiste à vaporiser les molécules introduites (sous forme liquide en LC - MS) et à les ioniser. La nature de la source utilisée dépend de l'état physique de la substance à analyser. On peut ainsi utiliser une source d'ionisation-désorption lorsque l'analyte est un solide, une source d'ionisation-désolvation lorsqu'il s'agit d'un liquide. Une source d'ionisation peut être utilisée soit en mode positif pour étudier les ions positifs, soit en mode négatif pour étudier les ions négatifs. En couplage avec un chromatographe en phase liquide, les techniques d'ionisations à pression atmosphérique sont les plus utilisés.

L'ionisation à pression atmosphérique (API)

Ces sources ionisent l'échantillon à pression atmosphérique puis transfèrent les ions produits vers le spectromètre de masse. L'ionisation à pression atmosphérique, désignée sous l'acronyme anglais API, regroupe trois modes principaux d'ionisation utilisés en chromatographie liquide à savoir : l'ionisation par électrospray, l'ionisation chimique et la photo-ionisation. Le choix d'un mode d'ionisation par rapport à un autre sera fortement influencé par la polarité et la masse moléculaire des composés à analyser. La figure 1 montre les domaines d'utilisation de ces techniques d'ionisations en fonction de la polarité et de la masse moléculaire du composé analysé.

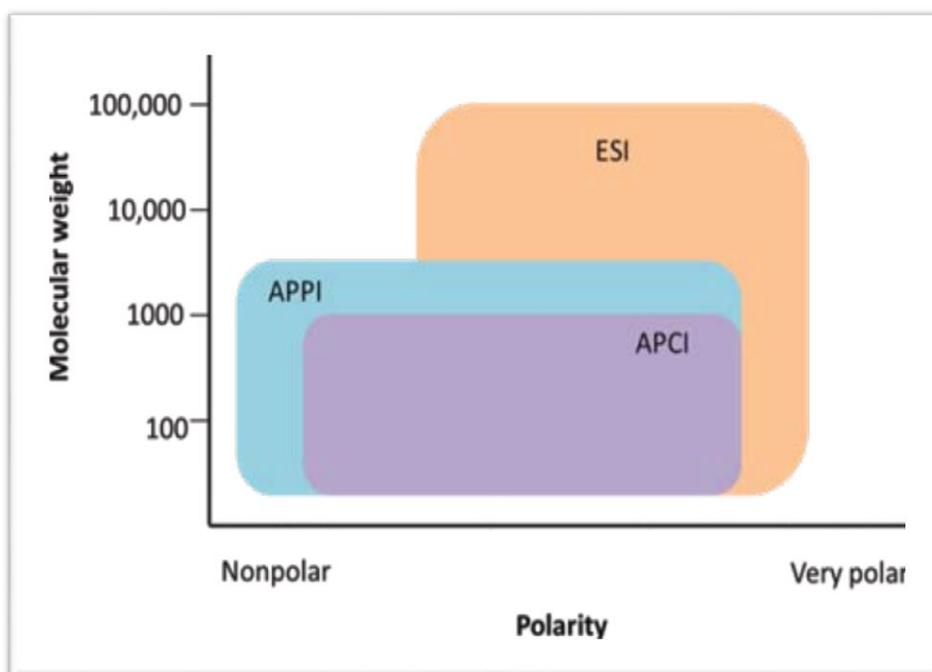


Figure 1. Utilisation des techniques d'ionisations API en fonction de la polarité et de la masse moléculaire du composé analysé [38].

1- Ionisation par électrospray (ESI)

L'ESI est un processus d'ionisation douce qui produit les ions gazeux à partir de composés en solution. A l'heure actuelle, le mécanisme du processus d'ionisation par ESI n'est pas encore clair. Cependant, il peut être décrit comme suit : l'écoulement de l'échantillon provenant de la colonne chromatographique traverse un tube capillaire de la source ESI. Ce dernier est porté à un potentiel électrique élevé positif ou négatif de 3 à 5 kV. Deux étapes ont lieu lors de la formation des ions par ESI.

La première est l'accumulation de charges à la surface du liquide au bout de l'aiguille sous l'action du champ électrique appliqué. Un flux de gaz est simultanément appliqué pour aider à l'évaporation du solvant. La haute tension entraîne les ions de même polarité vers la surface de la solution pour former « un cône de Taylor, qui va se rompre pour former des gouttelettes fortement chargées.

La seconde consiste à éliminer le solvant. Le processus exact de la formation des ions à partir des gouttelettes chargées n'est pas encore clairement élucidé [39, 40]. Une théorie postule que de grandes gouttelettes chargées sont produites par nébulisation pneumatique. L'excès de charges électriques dans chaque gouttelette, combiné à l'évaporation progressive des solvants conduit à un point où les répulsions coulombiennes excèdent les forces de cohésion des

gouttelettes et provoque leur explosion. Ce phénomène induit une cascade d'explosions coulombiennes et conduit à une série de petites gouttelettes faiblement chargées. Les processus de rétrécissement et d'explosion sont répétés jusqu'à l'obtention d'ions individuels. Les analytes se retrouvent alors ionisés en phase gazeuse à l'intérieur de la chambre et peuvent pénétrer dans le spectromètre de masse à l'aide du vide et de potentiel électrique appliqué. Les fragments neutres sont éliminés. Le principe d'ionisation par électrospray est illustré dans la figure 2.

Cette technique d'ionisation douce, conduit à une faible fragmentation de l'ion moléculaire et permet donc l'accès à la masse moléculaire des analytes. C'est l'une des techniques les plus utilisées en couplage LC-MS.

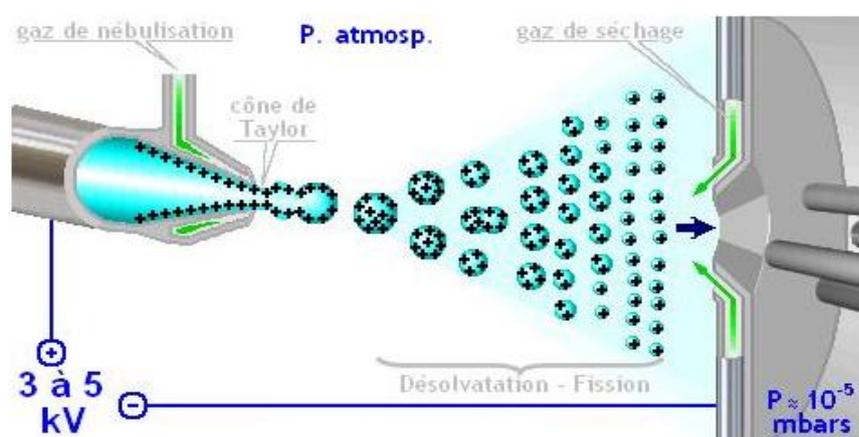


Figure 2. Processus d'ionisation par ESI

Les spectres ESI présentent en général un ensemble de pics correspondants aux ions mono-chargés de type $[M+H]^+$ en mode positif ou $[M-H]^-$ en mode négatif et parfois à des ions de charges multiples appelés ions multi-chargés $[M+nH]^{n+}$ ou $[M-nH]^{n-}$. Des ions correspondant à des adduits formés par combinaison de l'ion moléculaire du composé analysé avec une impureté de la phase mobile (ions sodium, potassium ou ammonium) sont également observés [41].

2- Ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)

L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) met en jeu, le transfert de charge d'un ion à une molécule en phase gazeuse. Un nébuliseur pneumatique chauffé à de hautes températures est utilisé pour produire un fin aérosol. Une aiguille, appelée corona, placée perpendiculairement à la sortie du nébuliseur est responsable de l'ionisation. Une différence de potentiels élevée est appliquée sur cette aiguille et entraîne une génération de

charges électriques qui permettent d'ioniser les gaz ambiants. Le processus d'ionisation se déroule en trois étapes :

1) La décharge corona procure une source continue d'électrons qui permet l'ionisation du gaz « nébulisant » créant ainsi un gaz ionisé autour de la pointe de l'aiguille de l'électrode. Des ions primaires de type N_2^+ (en mode positif) et O_2^- (en mode négatif) sont alors formés.

2) Les ions primaires réagissent préférentiellement avec les molécules du solvant de la phase mobile qui sont en large excès, pour former des ions réactifs.

3) Ces ions réactifs vont ensuite réagir avec les molécules de l'analyte. En ionisation en mode positif, le transfert de proton à partir des ions du solvant conduit à la formation de molécules protonées de l'analyte ($[M+H]^+$). En mode négatif, les ions moléculaires sont obtenus par transfert d'électron ou par abstraction de proton ($[M-H]^-$). (Figure 3)

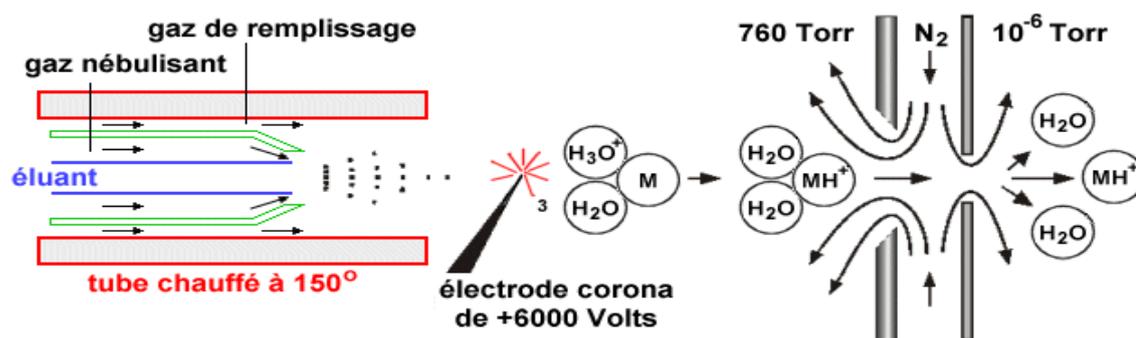


Figure 3. Ionisation chimique à pression atmosphérique

3- Photoionisation à pression atmosphérique (APPI)

La photoionisation à pression atmosphérique (APPI), met en jeu l'interaction des photons provenant d'une lampe à décharge avec l'analyte pour effectuer l'ionisation (Figure 4). Le solvant et le soluté, préalablement nébulisés, sont irradiés par un rayonnement UV intense. L'absorption d'un photon par une molécule génère son état excité. Si l'énergie d'ionisation est plus faible que $h\nu$, la molécule libérera un électron et génère un cation-radical. Ce processus est utilisé pour l'ionisation des molécules contenant des liaisons doubles conjuguées, comme les composés aromatiques [42].



Cependant, lorsque l'énergie d'ionisation est plus grande que $h\nu$, l'utilisation d'un composé absorbant dans l'ultraviolet de façon préférentielle, appelé un agent dopant, est nécessaire. Les dopants les plus utilisés sont le toluène et l'acétone. Ces derniers sont photoionisables et permettent le transfert d'une partie de l'énergie du rayonnement au soluté pour donner l'ion moléculaire M^+ ou l'ion moléculaire protoné $[M+H]^+$. Les spectres de masse de type APPI obtenus en mode positif sont caractérisés par la formation de ces deux types d'ions de l'espèce moléculaire qui peuvent coexister [43]. Cette technique permet de compléter le champ d'investigation du couplage LC-MS vers les molécules peu polaires connus pour être difficilement ionisables en ESI ou en APCI. Elle est notamment performante pour des composés comme les stéroïdes [44], les pesticides [45] et les hydrocarbures aromatiques polycycliques [46].

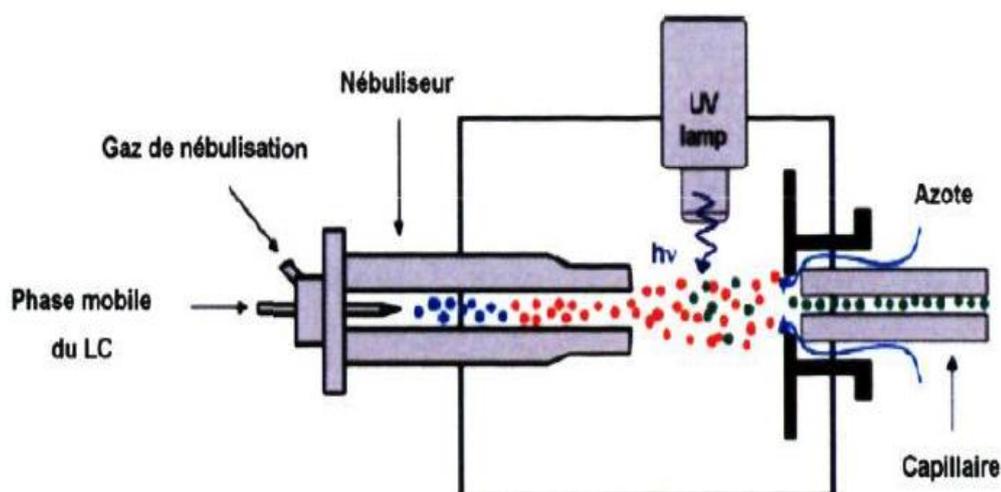


Figure 4. Schéma d'une source APPI

III. Principaux modes d'analyse

1) Analyses en balayage ou « fullscan »

Le mode "balayage" ou "fullscan" est utilisé lorsque l'on souhaite enregistrer des spectres dit "de source", c'est-à-dire des spectres qui permettent l'acquisition de tous les ions produits dans la source à un instant donné. Pour de nombreux utilisateurs de LC-MS, le balayage est la méthode standard d'acquisition de données en raison de la facilité de mise en œuvre et de la disponibilité des bibliothèques de spectres qui permettent l'identification instantanée des

molécules analysées (sous réserve, évidemment, que ces dernières aient été enregistrées dans ces bases de données).

2) *Analyse en SIM ou SIS*

Le terme "SIM" ("Single Ion Monitoring") est employé par les utilisateurs de quadripôles pour désigner le fait de ne détecter que un (ou quelques) ion(s), tandis que Le terme "SIS" ("Single Ion Storage") désigne la même action sur une trappe ionique. Lorsque la molécule recherchée est connue, l'utilisation du mode SIM ou SIS offre une plus grande sélectivité et sensibilité puisqu'ils permettent de ne suivre que un (ou quelques) ion(s) caractéristiques des analytes étudiés (1 à 4, en général). Avec un quadripôle, la durée du balayage des ions est proportionnelle à la gamme de rapports m/z balayée ; en travaillant sur peu de valeurs de m/z , le temps accordé à la détection des ions correspondants augmente considérablement, comparativement au mode "fullscan". Parallèlement, l'élimination des ions indésirables (ions issus de la phase stationnaire de la colonne chromatographique ou d'impuretés de l'échantillon) diminue le "bruit de fond" et supprime les pics chromatographiques associés aux molécules parasites. En trappe ionique, le SIS augmente la sensibilité et diminue donc les seuils de détection car l'élimination des ions "parasites" libère de l'espace pour stocker plus d'ions d'intérêt dans l'analyseur. Les modes SIM et SIS ne sont pas utilisables pour confirmer l'identification par une recherche dans les bases de données spectrales commercialisées, mais sont très performants dans le cadre de la détection de traces en milieux complexes et sont ainsi très utilisés en analyses environnementales et toxicologiques.

**V- CHIRALITE, RECONNAISSANCE CHIRALE
et TECHNIQUES D'OBTENTIONS
D'ENANTIOMERES PURS**

I Introduction

La chiralité peut être définie comme une caractéristique structurale d'une molécule qui désigne sa propriété d'être asymétrique et non superposable à son image dans un miroir. Un exemple simple d'objet chiral est la main humaine : la main gauche et la main droite sont images l'une de l'autre dans un miroir et ne sont pas superposables. Les deux formes, appelées énantiomères (ou encore isomères optiques ou antipodes optiques), présentent des propriétés physico-chimiques identiques dans un environnement non asymétrique, mais leurs comportements sont différents dans un milieu asymétrique.

Deux énantiomères font tourner le plan de polarisation d'une lumière polarisée d'une même valeur d'angle, en sens opposé l'un de l'autre. On les désigne par (+) ou (-) selon qu'ils dévient le plan de polarisation de la lumière dans le sens horaire (molécule dextrogyre (d)) ou dans le sens inverse (molécule lévogyre (l)) respectivement. Toutefois, le sens de déviation du plan de polarisation de la lumière ne donne aucune information concernant la répartition des atomes dans l'espace, que l'on appelle configuration absolue.

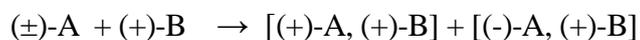
Lors de l'étude des molécules organiques chirales essentielles à la vie, on constate qu'elles se présentent majoritairement sous une seule des deux formes possibles. Ainsi les acides aminés, briques élémentaires des protéines, n'existent pratiquement que sous forme lévogyre et, la connaissance de leur pourcentage dextrogyre permet la datation en géochronologie de composés organiques archéologiquement importants, alors que la double hélice d'ADN s'enroule naturellement vers la droite uniquement. Dans ce dernier cas, on parle de la chiralité liée à l'hélicité dont les deux énantiomères correspondent aux deux sens d'enroulement de l'hélice.

II Propriétés physico-chimiques des énantiomères

Toutes les propriétés physiques des énantiomères sont identiques (température de fusion et d'ébullition, solubilité dans un solvant achiral, densité, etc.). La seule propriété qui permet de distinguer deux énantiomères est l'action de la solution de chacun d'eux sur une lumière polarisée. Si une substance chirale est traversée par un faisceau de lumière polarisée plane, elle provoque une rotation du plan de polarisation de cette lumière. On dit qu'elle possède une activité optique ou un pouvoir rotatoire. Deux énantiomères ont des pouvoirs rotatoires identiques en valeurs absolues mais en signes opposés.

Les énantiomères ont les mêmes propriétés chimiques vis à vis d'un réactif non chiral. La résolution d'un mélange racémique dans un système achiral n'est donc pas possible. En

revanche, deux énantiomères peuvent réagir avec un réactif chiral optiquement pur pour former deux diastéréoisomères. Ces deux nouveaux produits présentent des propriétés physico-chimiques différentes et peuvent donc être séparés par les méthodes d'analyse chimique classiques [33]. Le schéma ci-dessous illustre ce phénomène.



Le principe de la séparation chirale des énantiomères repose donc sur cette stratégie.

III La reconnaissance chirale

La chiralité permet d'expliquer différents phénomènes concernant la réactivité biologique. Dérivant des acides aminés lévogyres naturels, les récepteurs et les enzymes, constituent un environnement asymétrique optiquement pur. L'interaction entre un médicament et son récepteur est fondée sur une adaptation tridimensionnelle de la molécule sur un site actif. Par conséquent, si la molécule est chirale, cette interaction est stéréosélective. Ceci entraîne des différences considérables au niveau des propriétés pharmacologiques des deux énantiomères puisque chacun possède sa propre affinité au niveau des récepteurs. On parle alors de reconnaissance chirale.

En 1933, Easson et Stedman [47] ont introduit la notion d'interaction en trois points pour expliquer les différences de réactivité liées à la stéréochimie. Cette notion a été étudiée plus tard par Ogston [48] et Dalglish [49].

Dans ce concept de reconnaissance chirale, il a été montré que les énantiomères présentent des affinités différentes pour un même récepteur (ou enzyme). Cette affinité est fondée sur un minimum de trois sites d'interaction entre la molécule et le récepteur. Par conséquent, le récepteur sera capable de distinguer les deux énantiomères car un seul énantiomère sera adapté au site chiral du récepteur et sera l'énantiomère actif appelé eutomère. L'autre énantiomère, qui ne peut s'adapter au site chiral du récepteur, est inactif et s'appelle distomère (Figure 5) [50].

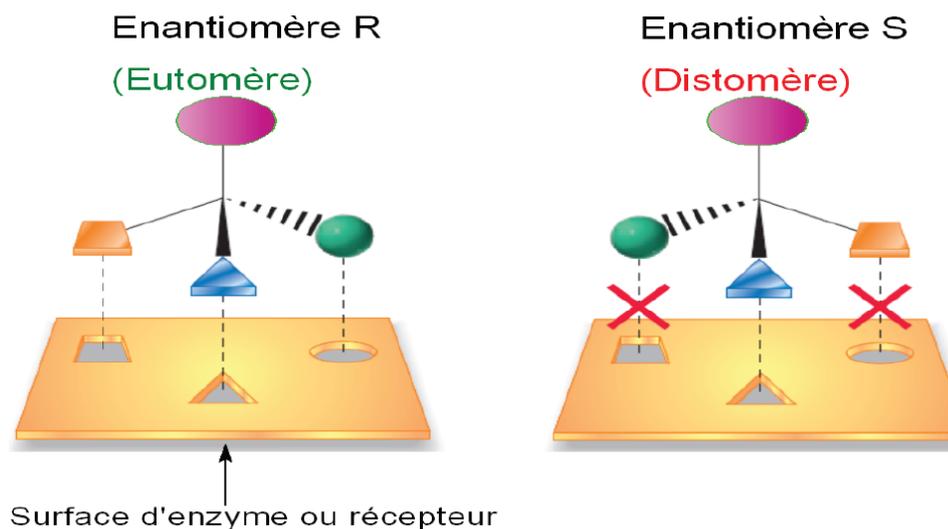


Figure 5. Modèle de reconnaissance chirale [50, 51]

IV. Chiralité et principes actifs

IV.1 Introduction

Les méthodes de synthèse des médicaments chiraux donnent généralement des mélanges racémiques. Aujourd'hui, environ la moitié des médicaments mis sur le marché sont chiraux, et environ 90% de ces médicaments sont commercialisés sous forme diastéréoisomérique ou racémique [52]. De nombreux énantiomères présentent des propriétés pharmacologiques et toxicologiques différentes. Pour cette raison, il est important de procéder à la séparation et à l'analyse du racémique afin de connaître l'isomère responsable de l'activité thérapeutique et d'éliminer l'isomère indésirable.

La thalidomide (Figure 6) constitue l'exemple le plus dramatique (signalé précédemment) dans l'histoire des molécules pharmaceutiques chirales. Ce médicament a été synthétisé en 1954 par la compagnie pharmaceutique Grünenthal, située en Allemagne de l'ouest et commercialisé dans plusieurs dizaines de pays sous forme d'un mélange racémique [53] comme sédatif et antiémétique notamment chez les femmes enceintes. Des études pharmacologiques, effectuées sur le rat avaient montré une action rapide et une faible toxicité à haute dose [54].

Dans les années 60, ce médicament entraîna des ravages considérables en provoquant des dommages irréversibles aux embryons. Des milliers d'enfants sont nés avec des malformations congénitales néfastes. Cet effet tératogène catastrophique semble induit par la

capacité du médicament a inhiber l'angiogénèse en interférant avec le développement des vaisseaux sanguins du fœtus surtout en cas de prise au cours des 25 à 50 premiers jours de la grossesse [55]. Il a été montré par la suite, que l'énantiomère (R) protège contre les nausées, alors que l'activité tératogène était essentiellement due à l'énantiomère (S) [56]. Des études récentes ont montré que les énantiomères du composé sont interconvertibles *in vivo*, et le drame n'aurait pas été évité par l'administration de l'énantiomère R-(+) seul. La molécule fût alors retirée du marché à partir de la fin 1961 [57].

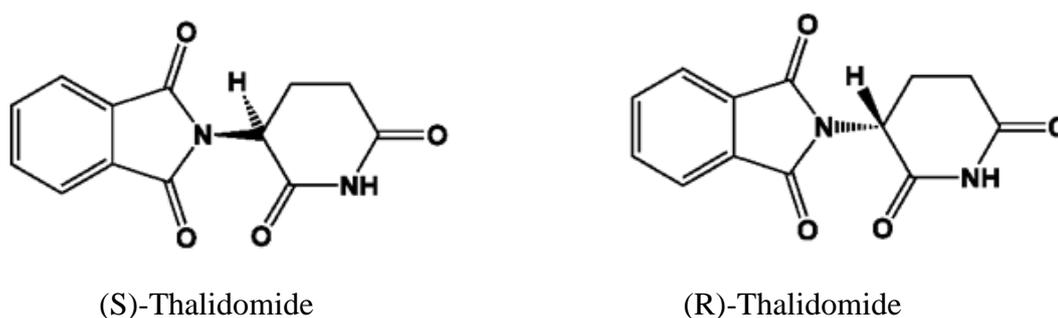


Figure 6. Structure des énantiomères de la thalidomide

Depuis cette tragédie, les différences de réactivités biologiques des isomères optiques ont été prises en considération, et la nécessité de mener des études pharmacologiques et toxicologiques sur chaque isomère et sur le mélange racémique est apparue.

IV.2 Mode d'action d'un principe actif

Environ la moitié des molécules pharmaceutiques mis sur le marché sont chirales et leurs isomères présentent des propriétés pharmacologiques et toxicologiques distinctes.

Le corps, avec ses récepteurs et ses enzymes chiraux va interagir avec les énantiomères du racémique d'un médicament différemment et métaboliser chaque énantiomère par une voie séparée pour générer des activités biologiques différentes. Ainsi, un énantiomère peut produire des activités thérapeutiques souhaitées, tandis que l'autre peut être inactif, d'une activité différente ou d'une activité adverse de son antipode.

La majorité des médicaments racémiques ont un énantiomère biologiquement actif principal (eutomère), l'autre (distomère) est inactif ou moins actif, toxique ou peut exercer d'autres propriétés pharmacologiques désirées ou non désirées.

Quelques situations peuvent être distinguées en fonction des activités pharmacodynamiques, pharmacocinétiques et toxicologiques des deux énantiomères comme il sera décrit ci-dessous.

a) *Enantiomères présentant qualitativement le même type d'activité mais d'intensité différente*

Lorsque les deux énantiomères présentent des activités similaires, l'un d'entre eux peut être métabolisé plus rapidement que l'autre et conduit à des métabolites toxiques ; c'est le cas de la prilocaïne (Figure 7), un anesthésique local qui inhibe de façon réversible la propagation des signaux le long des nerfs. L'isomère R(-) est rapidement métabolisé par un mécanisme hépatique dans l'organisme en ortho-toluidine hautement toxique [58].

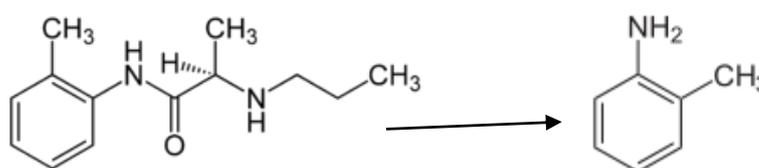


Figure 7. La R(-) prilocaïne et son métabolite ortho-toluidine

Dans le cas où les deux énantiomères possèdent la même activité biologique mais d'intensité différente, l'eutomère correspond au composé dont l'affinité de fixation au site actif du récepteur est complète ou plus forte et implique une interaction stéréosélective. Ainsi, les deux énantiomères de l'adrénaline ont un effet vasoconstricteur, mais cet effet est plus important pour l'isomère R que pour son antipode. Cette différence de réactivité entre les deux énantiomères a été expliquée par la notion d'interactions en trois points d'Easson et Stedman, signalée précédemment. Une des étapes du mécanisme de l'adrénaline fait intervenir la fixation de celle-ci sur un site actif du récepteur qui lui est spécifique. Les deux énantiomères présentent des affinités différentes pour ce site. Ainsi, la meilleure activité de la (R)-adrénaline s'explique par une meilleure fixation de celle-ci au récepteur en formant trois liaisons de faible énergie (une interaction de Van der Waals pour le noyau benzénique, une liaison hydrogène pour l'hydroxyle et une interaction charge-charge de la fonction amine ionisée) alors que la (S)-adrénaline moins active n'en forme que deux [47, 59] (Figure 8). Dans ce cas, la commercialisation de l'énantiomère le plus actif seul a pour avantage d'utiliser une dose plus faible du principe actif.

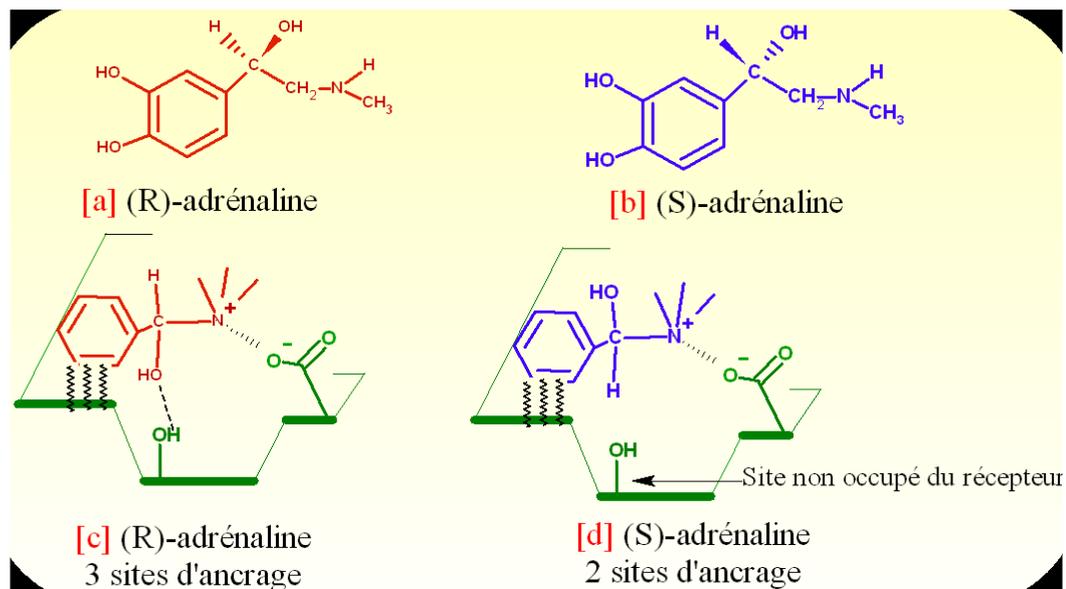


Figure 8. Représentation des énantiomères de l'adrénaline (a et b) et leurs sites de fixation sur un récepteur (c et d) [59, 51]

b) Un des énantiomères est actif tandis que l'autre est inactif

De nombreux médicaments utilisés sous forme racémique appartiennent à cette catégorie, dont un seul énantiomère présente l'activité souhaitée alors que l'autre est inactif et dépourvu d'activités non désirées à la dose administrée. Dans ce cas, la séparation des énantiomères semble peu intéressante, mais l'utilisation d'un énantiomère pur est préférable dans le cas de doses thérapeutiques élevées. C'est le cas du naproxène (Figure 9), anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) qui agit par inhibition de la cyclo-oxygénase et de la formation des prostaglandines, dont seul l'isomère S-(+) est actuellement commercialisé. L'emploi de l'énantiomère actif pur épargne l'organisme de la charge de procéder à la métabolisation et à l'élimination de l'énantiomère inactif, et diminue ainsi les risques d'interactions médicamenteuses.

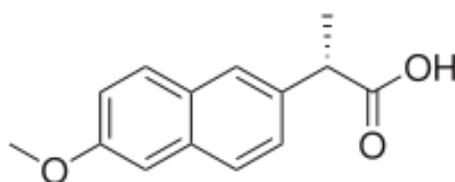


Figure 9. Structure du S-(+)-naproxène

c) *Un des énantiomères est actif tandis que l'autre est toxique*

Dans le cas où un des énantiomères possède l'activité désirée alors que l'autre est source d'effets secondaires, il existe de nombreux exemples de cette situation comme la thalidomide (citée précédemment) et l'éthambutol (Figure 10). Ce dernier est un composé antituberculeux dont seul l'isomère de configuration S,S-(+) est tuberculostatique. Il agit sur les bacilles tuberculeux en phase de multiplication par inhibition de la synthèse des acides mycoliques. Le R,R-(-) est toxique.

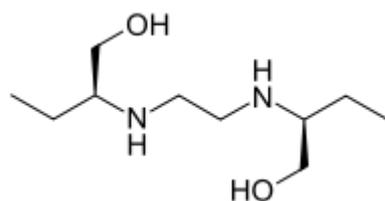


Figure 10. Structure du S,S-(+)-éthambutol

Dans de telles situations, la séparation des énantiomères s'avère obligatoire pour ne retenir que l'énantiomère actif non toxique. De plus, il est indispensable de vérifier que cet isomère ne subit pas une inversion de configuration ou une racémisation métabolique dans l'organisme (comme la thalidomide).

d) *Les deux énantiomères possèdent des activités biologiques différentes*

Il existe aussi le cas où les énantiomères possèdent séparément des propriétés pharmacologiques différentes et bénéfiques. Dans de telles situations, le mélange racémique est inoffensif et l'emploi de ce dernier peut être maintenu, bien que la séparation des énantiomères ait un intérêt économique puisqu'elle permet d'accéder à deux médicaments distincts ayant des effets thérapeutiques différents. C'est par exemple le cas du couple 1S,2R-(+)-dextropropoxyphène et de son énantiomère 1R,2S-(-)-lévopropoxyphène. Le premier isomère est un analgésique commercialisé sous le nom de Darvon. Le second est un antitussif commercialisé sous le nom de Novrad (Figure 11) [60].

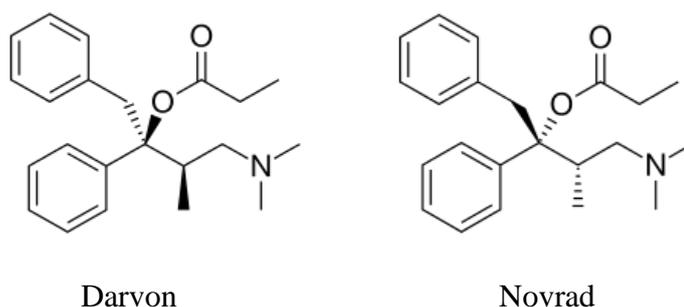


Figure 11. Enantiomères du dextropropoxyphène

e) Un énantiomère inhibe l'autre

Dans certains cas, le distomère est inactif vis-à-vis de l'effet désiré, mais inhibe un effet secondaire nuisible de l'isomère actif (ou d'un métabolite). Certains diurétiques de la famille de l'indacrinone (Figure 12) appartiennent à cette catégorie. L'effet diurétique est dû à l'énantiomère (+) de ce principe actif, cependant, celui-ci entraîne une rétention d'acide urique. En revanche, l'isomère (-), inactif, favorise l'élimination de cet acide urique [61]. Dans cette situation, l'emploi du produit sous forme de mélange des deux énantiomères est préférable, mais, le choix du rapport des deux énantiomères doit être optimal afin d'obtenir le meilleur effet thérapeutique.

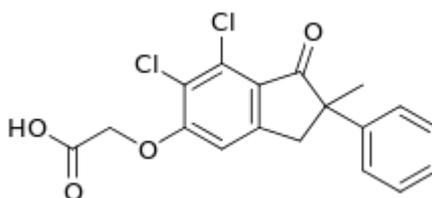


Figure 12. Structure de l'indacrinone racémique

V- Techniques d'obtention d'énantiomères purs

V.1 Synthèse asymétrique

La synthèse asymétrique consiste à préparer un produit chiral non racémique, idéalement sous forme d'un seul énantiomère à partir d'une molécule achirale. Ces réactions nécessitent l'utilisation d'un auxiliaire chiral qui est temporairement lié au substrat, à un réactif ou à un catalyseur. L'auxiliaire chiral aide à orienter la synthèse vers la formation d'un seul énantiomère.

En 1975, W. S. Knowles et ses collègues ont pu créer une synthèse industrielle d'un médicament chiral : la L-DOPA, principe actif utilisé dans le traitement de la maladie de Parkinson. Ce fut la première synthèse asymétrique catalytique [62]. Ce travail lui a valu le prix Nobel en 2001.

L'utilisation des catalyseurs biologiques (enzymes) dans la réalisation de certaines réactions constitue une variante de la synthèse asymétrique. Ainsi, la synthèse industrielle de l'acide L-aspartique à partir de l'acide fumarique et d'ammoniac en présence de l'aspartase en est un exemple (Figure 13). L'enzyme dirige l'addition de la molécule d'ammoniac sur une seule face.

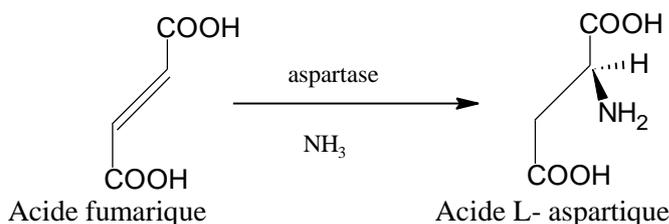


Figure 13. Préparation industrielle de l'acide L-Aspartique par synthèse asymétrique enzymatique

La synthèse asymétrique permet d'introduire un ou deux centres asymétriques dans une molécule. Elle est très adaptée pour la préparation de molécules biologiquement actives chirales telles que les acides aminés, les antibiotiques, les monoterpènes... Cependant, la synthèse asymétrique est complexe à mettre en œuvre et reste peu courante dans les procédés industriels.

V.2 Résolution des racémiques

Actuellement, la majorité des molécules actives énantiopures issues de synthèse sont obtenues par dédoublement. Cette technique consiste à séparer les deux formes du mélange racémique obtenu lors de la synthèse classique. Elle est couramment utilisée dans l'industrie de la pharmacie, de l'agrochimie, de la parfumerie... Il existe différentes méthodes pour réaliser une séparation physique des énantiomères.

La cristallisation est l'une des méthodes de résolution des racémiques les plus utilisées. Cette méthode, découverte par Pasteur, consiste à faire réagir le mélange racémique avec un réactif optiquement actif de haute pureté énantiomérique. Les sels diastéréoisomères obtenus sont séparés et purifiés par cristallisation en raison des différences de leurs propriétés physiques [63]. La décomposition de ces sels diastéréoisomères permet l'obtention des énantiomères purs séparés.

Le dédoublement par cristallisation est de loin la méthode la plus utilisée pour la séparation des racémiques car elle offre de très bons rendements, une grande pureté, une excellente reproductibilité et permet de résoudre des grandes quantités.

Cette méthode a permis la résolution d'un très grand nombre de composés, citons par exemple les dédoublements de la phénylglycine [64] et du naproxène [65]. Pour ces deux molécules, l'énantiomère non désiré est cristallisé et séparé du mélange racémique. Le (S)-2-phénylglycine ou le (S)-naproxène sont obtenus ensuite avec une haute pureté énantiomérique.

Malgré que cette technique présente quelques inconvénients : mise en oeuvre longue, nécessité de posséder un réactif de très haute pureté énantiomérique, ses avantages remarquables ouvrent la voie à de larges applications industrielles basées sur la cristallisation.

VI. Méthodes analytiques de discrimination chirale

Les méthodes chromatographiques et électrophorétiques sont les principales techniques utilisées dans le domaine de la discrimination chirale. Leurs succès est dû à leurs simplicité, sensibilité et robustesse. Elles permettent l'énantioséparation d'un grand nombre de molécules d'intérêt biologique ou pharmaceutique.

Différentes méthodes chromatographiques sont largement employées pour la séparation chirale, citons par exemple la chromatographie liquide à haute performance [66, 67], la chromatographie sur couche mince (CCM) [68, 69], la chromatographie en phase gazeuse (CPG) [70] et la chromatographie en phase supercritique (CPS) [71, 72].

La HPLC représente une technique de choix pour la séparation et la quantification des énantiomères. Elle est de loin la plus utilisée et de nombreux sélecteurs chiraux pour HPLC sont actuellement disponibles. Les méthodes utilisant des phases stationnaires chirales peuvent être développées en utilisant trois modes chromatographiques différents : le mode normale, le mode inverse et le mode polaire organique.

En chromatographie chirale, deux approches de séparation stéréosélective peuvent être utilisées : une approche indirecte et une approche directe. Les méthodes chromatographiques en mode direct sont actuellement les plus utilisées : elles allient à la fois rapidité, efficacité, sensibilité et permettent d'obtenir les deux énantiomères purs.

1- Approche indirecte par formation de diastéréoisomères

L'approche indirecte consiste en la séparation des racémiques après dérivation en deux diastéréoisomères avec un réactif chiral de haute pureté énantiomérique. Ces deux nouveaux

produits présentent des propriétés physico-chimiques différentes et leur séparation est donc possible dans un milieu achiral au moyen de phases stationnaires et mobiles classiques. Toutefois, cette méthode présente quelques inconvénients : elle est limitée aux molécules possédant des groupements fonctionnels permettant la dérivation (amine, alcool, acide carboxylique, etc.) ; elle exige une grande pureté énantiomérique du réactif chiral, et, pour une application préparative, la fixation du réactif chiral sur le substrat puis son élimination ajoutent deux étapes synthétiques supplémentaires.

Actuellement, les séparations chirales par approche indirecte sont en baisse face à l'apparition de nombreux sélecteurs chiraux capables d'effectuer des résolutions de différents énantiomères directement sans utiliser des agents de dérivation.

2- Approche directe par formation de diastéréoisomères labiles

Au cours de ces dernières années, le dédoublement des énantiomères par approche directe, c.-à-d. sans dérivation préalable en diastéréoisomères, est de plus en plus utilisé. Cette méthode permet la séparation directe des racémiques selon deux voies distinctes :

La séparation chirale selon la première voie s'effectue après addition de sélecteurs chiraux à la phase dynamique (phase mobile chirale) tandis que la deuxième voie est fondée sur la séparation au moyen de sélecteurs chiraux fixés à la phase stationnaire (phases stationnaires chirales).

La séparation énantiomérique selon la première voie nécessite l'addition d'un réactif chiral dans la phase mobile (ACPM : Additif chiral en phase mobile), ce qui conduit à la formation de diastéréoisomères labiles. Les phases stationnaires utilisées sont généralement achirales. Cette méthode présente l'inconvénient d'être difficile à mettre en œuvre à cause de la nécessité d'un temps d'équilibre relativement long et d'un contrôle minutieux des différents paramètres afin d'obtenir de bonnes séparations de manière reproductible. En outre, cette voie nécessite une grande quantité du sélecteur chiral, celui-ci étant présent dans la phase mobile, peut absorber dans l'ultraviolet (UV), et compromettre ainsi la sensibilité de la méthode.

Plusieurs types de chromatographie peuvent être utilisées avec cette voie, citons par exemple, les chromatographies d'adsorption, de partage en phase inversée, d'échange de ligands et de paires d'ions.

Dans la deuxième voie, la séparation chirale est fondée sur la formation de diastéréoisomères labiles à la surface de la phase stationnaire chirale (PSC). Cette voie est moins coûteuse et devient de plus en plus fréquente.

Aujourd'hui, un grand nombre de PSCs sont développées et utilisées avec succès en chromatographie. Ces PSCs ont montré leur efficacité dans les séparations chirales et, actuellement, elles sont de loin les plus utilisées dans les domaines pharmaceutiques, biochimiques ... Cependant, il n'existe pas de phase stationnaire capable de séparer toutes les classes de composés. Ainsi, les analystes doivent choisir, parmi une large gamme de sélecteurs chiraux, la PSC la plus adaptée à la séparation désirée.

De nombreux composés chiraux d'origine naturels, semi-synthétiques ou synthétiques ont été utilisés avec succès comme sélecteurs en tant que PSCs ou comme ACPM pour la séparation chirale des racémiques. Dans ce qui suit, nous nous intéresserons aux séparations énantiomériques directes, en particulier au moyen de PSCs, étant donné la simplicité et la rapidité de leur mise en œuvre.

VII. Le sélecteur chiral

Le sélecteur chiral est un composé qui réagit sélectivement avec l'un des énantiomères d'un mélange racémique. Toutefois, certains critères sont essentiels pour qu'un sélecteur chiral soit intéressant [73, 74] :

- Sa structure doit comprendre des groupes fonctionnels et (ou) des cavités pour lui permettre de former des complexes diastéréoisomères de stabilités différentes avec les énantiomères de l'analyte.

- Il doit présenter une bonne solubilité et stabilité dans les conditions d'analyse (température, pH, solvant...), lorsqu'il est utilisé comme additif dans la phase mobile.

- Les sélecteurs chiraux absorbant dans l'ultraviolet ne doivent pas interférer avec la détection des solutés, s'ils sont utilisés comme ACPM.

Ces critères sont importants pour obtenir de bonnes séparations énantiomériques, répétables et reproductibles.

VIII. La reconnaissance chirale

Le processus de reconnaissance chirale en chromatographie est basé sur le principe d'interactions en trois points entre le ligand et le récepteur décrit précédemment.

Dalgliesh a proposé le premier modèle de reconnaissance chirale [49], ce dernier a été ensuite modifié par Pirkle [75]. Ce modèle estime la présence d'un minimum de trois points d'interaction entre le soluté et le sélecteur. La structure chimique de ces deux derniers détermine la nature de ces interactions qui peuvent être attractives ou répulsives [76]. Deux interactions sont permises pour chaque énantiomère dans ce modèle, la troisième, de nature stéréosélective, n'est possible que pour l'un d'entre eux.

Les interactions impliquées dans le phénomène de discrimination chirale sont diverses, pouvant être des attractions ou répulsions coulombiennes, des transferts de charges, des interactions π - π , des encombrements stériques, des effets hydrophobes, des liaisons hydrogène, des phénomènes d'inclusion dans des cavités et des interactions dipôle-dipôle.

IX. Classification des sélecteurs chiraux

Selon la nature du sélecteur chiral (structure chimique) et des interactions mises en jeu lors du processus de reconnaissance chirale, les sélecteurs chiraux peuvent être classés en six familles distinctes.

La première famille de type I : Ces sélecteurs impliquent la formation de complexes diastéréoisomériques « superficiels » basés sur des interactions attractives pour induire la séparation des énantiomères (sélecteurs de type Pirkle).

La deuxième famille de type II : Ce sont les sélecteurs chiraux impliquant une combinaison entre deux types d'interactions : interactions généralement attractives et interactions par formation de complexe d'inclusion. Cette famille regroupe les polymères naturels et synthétiques.

Les sélecteurs de type III permettent la séparation par formation de complexes d'inclusion hydrophobes (cyclodextrines) ou hydrophiles (éthers couronnes).

La famille de type IV regroupe les sélecteurs chiraux faisant intervenir des ions métalliques (échange de ligands).

Les sélecteurs de type V. impliquent une combinaison d'effets hydrophobes et d'interactions polaires. Cette famille regroupe les protéines.

Une nouvelle famille de sélecteurs chiraux regroupe les antibiotiques macrocycliques glycopeptidiques. Ces sélecteurs ont des propriétés énantiosélectives qui se rapprochent de celles des sélecteurs type III par le rôle des cavités, et de celles des sélecteurs de type protéine (V) par les interactions mises en jeu.

1. Groupe de type I

Ce sont les sélecteurs de type Pirkle et analogues. Ces PSCs sont généralement constituées d'un dérivé d'acides aminé greffé de manière covalente à un gel de silice [77]. Ces sélecteurs sont habituellement composés d'un noyau aromatique à caractère accepteur d'électrons π (π -acide) comme les dérivés benzoylés, ou donneur d'électrons π (π -basique) comme les dérivés naphtyles. Un troisième sélecteur chiral est apparu plus tard, constitué des deux types de noyaux aromatiques (accepteur / donneur d'électrons π) (Figure 14). Ce sélecteur peut former des complexes diastéréoisomériques labiles par transfert de charge avec un soluté à caractère donneur ou accepteur d'électrons π . Ces PSCs sont utilisées essentiellement avec des éluants peu polaires non aqueuses.

Des séparations chirales de solutés π -basiques ont été réalisées sur la PSC 1, constituée d'un groupement aromatique π -acide (π accepteur) [78], alors que la PSC 2, qui contient un groupement aromatique π -basique (π donneur), a été utilisée pour la résolution des solutés π -acides [78]. En revanche, la PSC 3 (whelk-01), contenant deux types de groupements aromatiques à la fois (π - donneur et π -accepteur), a été utilisée pour résoudre différents racémates possédant des groupements aromatiques π -acides ou π - basiques [79, 80] (Figure 14).

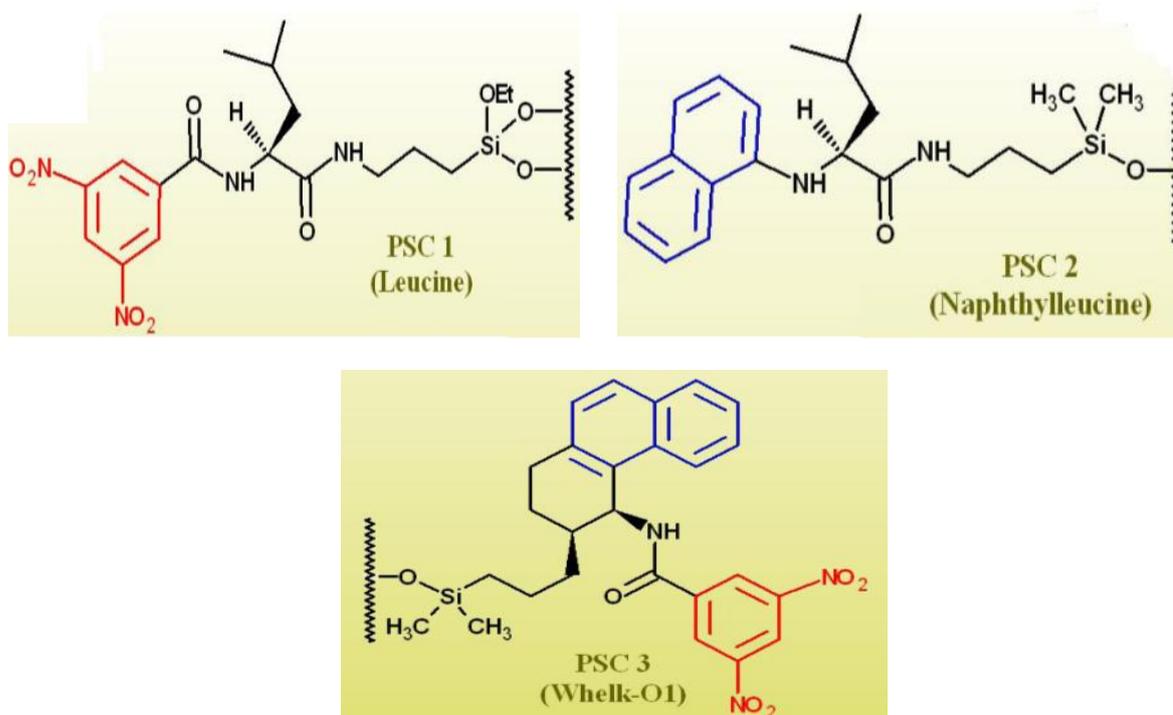


Figure 14. Trois phases stationnaires chirales de type Pirkle commercialisées par Régis (USA) [81, 51].

D'autres sélecteurs chiraux, développés par Dobashi et al. [82] sont similaires à ceux de type Pirkle. Cependant, ces sélecteurs ne possèdent pas de noyau aromatique mais généralement deux fonctions de type amide. Ces groupements peuvent être simultanément donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène (Figure 15).

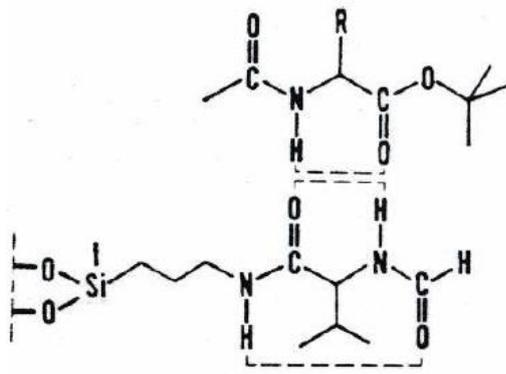


Figure 15. Phase stationnaire chirale conçue par Dobashi et al. et représentation des liaisons hydrogène formées avec un analyte.

Les PSCs de ce groupe sont généralement disponibles sous les deux formes énantiomériques (inversion de l'ordre d'éluion en passant d'une forme à l'autre). Chaque sélecteur chirale agit de manière indépendante avec les racémates. Ces PSCs sont dites indépendantes.

2. Groupe de type II : Polymères naturels et synthétiques

a) Les polymères naturels

Les polysaccharides incluant la cellulose et l'amylose sont de loin les plus utilisés dans la séparation chirale. Ils sont composés d'unités de D-(+)-glucopyranose reliées par des liaisons glycosidiques de type β (1-4) pour la cellulose et de type α (1-4) pour l'amylose. Ces polysaccharides sont parmi les polymères naturels les plus abondants dans la nature. Ils ont une structure hélicoïdale asymétrique enroulée autour de la liaison glycosidique.

Le pouvoir de résolution des énantiomères de la cellulose et l'amylose est généralement faible. Des modifications par dérivation des fonctions -OH libres ont été introduites sur ces deux polymères naturels afin d'améliorer leur capacité de reconnaissance chirale (Figure 16).

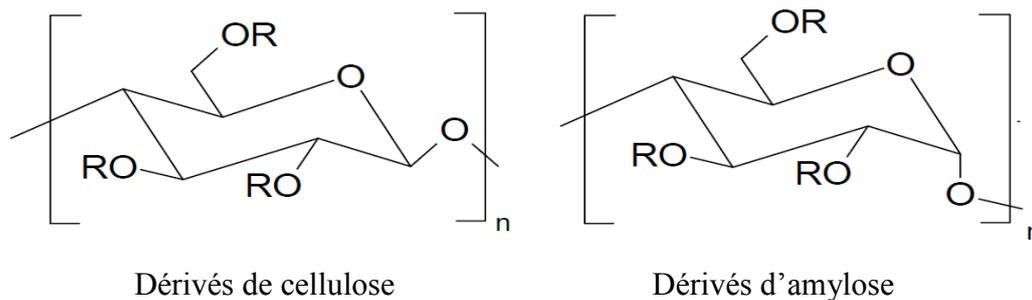


Figure 16. Structure chimique de dérivés de la cellulose et de l'amylose [83].

Ces dérivés conservent la structure hélicoïdale de la molécule d'origine et permettent ainsi des mécanismes d'inclusions stéréosélectives des solutés dans les cavités chirales. Leur capacité de reconnaissance des molécules s'explique par la multiplicité des mécanismes mis en jeu lors d'une séparation, incluant des phénomènes d'inclusion, des liaisons hydrogène, des interactions dipôle-dipôle, des interactions de type π - π et des interactions électrostatiques [84, 85]. Les phases stationnaires à base de dérivés polysaccharidiques ont fait la preuve de leur efficacité en chromatographie liquide à haute performance [86-88], en phase normale ou en polarité de phase inversée [85, 89].

Ces PSCs ont été utilisées avec succès pour la résolution de nombreux médicaments chiraux à caractère acide, neutre ou basique, tels que les alcaloïdes, les β -bloquants, les anti-histaminiques, les anti-inflammatoires, etc. [90-92].

b) Les polymères synthétiques

Ce type de sélecteur chiral a été préparé par Blaschke et al. [93, 94] par polymérisation de monomères chiraux. La structure hélicoïdale particulière du polymère favorise la formation de cavités asymétriques. La reconnaissance chirale est gouvernée par le mécanisme d'inclusion des énantiomères dans ces cavités [90, 95]. Les monomères possèdent des centres chiraux, qui interviennent également dans la discrimination chirale essentiellement par l'établissement de liaison hydrogène et par des interactions de type π - π [96-98].

De nombreux sélecteurs chiraux ont été développés à base de polymères d'origine synthétique tels que les molécules de polyacrylamide, de polyméthacrylate, de polyméthacrylamide et les dérivés du polystyrène, de la polyoléfine, du polyacétylène, du polyamide, d'éther de polyvinyle, du polyéther, du polyuréthane, etc. [99].

Des phases stationnaires à base de ces sélecteurs chiraux ont été utilisées avec succès en chromatographie. Ces sélecteurs ont permis la séparation d'un grand nombre de composés [100]. Citons par exemple les dérivés de prostaglandines [101] et la thalidomide [102].

3. Groupe de type III : Les sélecteurs à cavité : cyclodextrines et éthers couronnes

a) Type II-a : les cyclodextrines

Les cyclodextrines sont des molécules naturelles issues de la dégradation enzymatique de l'amidon. Ce sont des oligosaccharides cycliques, constitués de plusieurs unités du D-glucopyranose, qui se présentent sous forme tronconique. Les monomères sont reliés entre eux par des liaisons glycosidiques α -1-4. Chaque unité glucopyranose possède 5 atomes de carbone asymétriques, et contribue en conséquence à la reconnaissance chirale des racémates avec lesquels elle interagit. La cyclodextrine est généralement greffée sur une silice greffée époxyde. Trois types de phases stationnaires chirales (PSCs) à base de cyclodextrine, ont été largement étudiés : les cyclodextrines α (hexamère, 6 unités de glucose), β (heptamère, 7 unités de glucose) et γ (octamère, 8 unités de glucose) (Figure 17).

Ces sélecteurs chiraux présentent une cavité hydrophobe de forme cyclique. Les groupements alcools secondaires (OH sur C₂ et C₃) entourent l'entrée, côté plus large de cette cavité, alors que le côté opposé, plus étroit est obstrué par les groupements alcools primaires (OH sur C₆) plus rapprochés. Tous les groupements hydroxyles se dirigent vers l'extérieur donnant ainsi à la cyclodextrine la propriété d'être hydrophile.

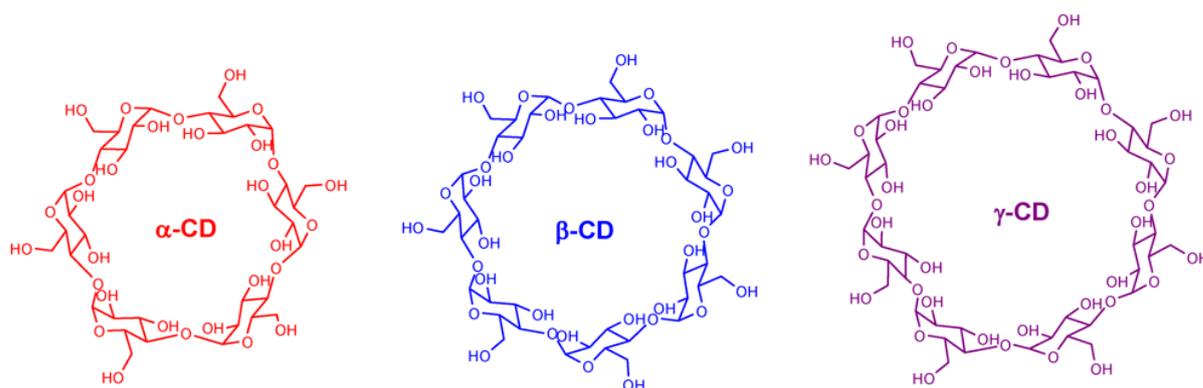


Figure 17. Représentation des trois types de cyclodextrines α , β et γ [103].

Les atomes d'oxygène glucosidiques et les groupements -CH- présents dans la cavité; rendent l'intérieur de celle-ci hydrophobe et apolaire, ce qui permet de former des complexes d'inclusion avec les molécules apolaires ou polaires comportant un motif hydrophobe.

Les fonctions hydroxyles ou leurs substituants participent à la reconnaissance chirale par établissement des liaisons hydrogène et des interactions électrostatiques [104].

Wainer et Drayer [105] ont présenté des règles facilitant la reconnaissance chirale:

- Le soluté doit contenir au moins un noyau aromatique en position α ou β du centre chiral.
- Il doit présenter aussi des groupements polaires proches du centre asymétrique, capables d'interagir avec les groupements hydroxyles de la cyclodextrine par formation de liaisons hydrogène.
- La géométrie du groupement aromatique du soluté doit être compatible avec la taille de la cavité hydrophobe.

Généralement le mécanisme de séparation énantiomérique repose sur le concept de reconnaissance chirale proposé par Dalglish, mettant en jeu trois points d'interaction entre l'énantiomère et la cyclodextrine. Au moins une partie de la molécule hôte (partie hydrophobe) doit interagir avec la cavité apolaire de la cyclodextrine pour former un complexe d'inclusion. Les substituants de l'atome asymétrique doivent être proche des groupements hydroxyles secondaires de l'entrée de la cavité pour permettre aux deux autres points d'interaction d'intervenir (formation de liaisons hydrogène) (Figure 18).

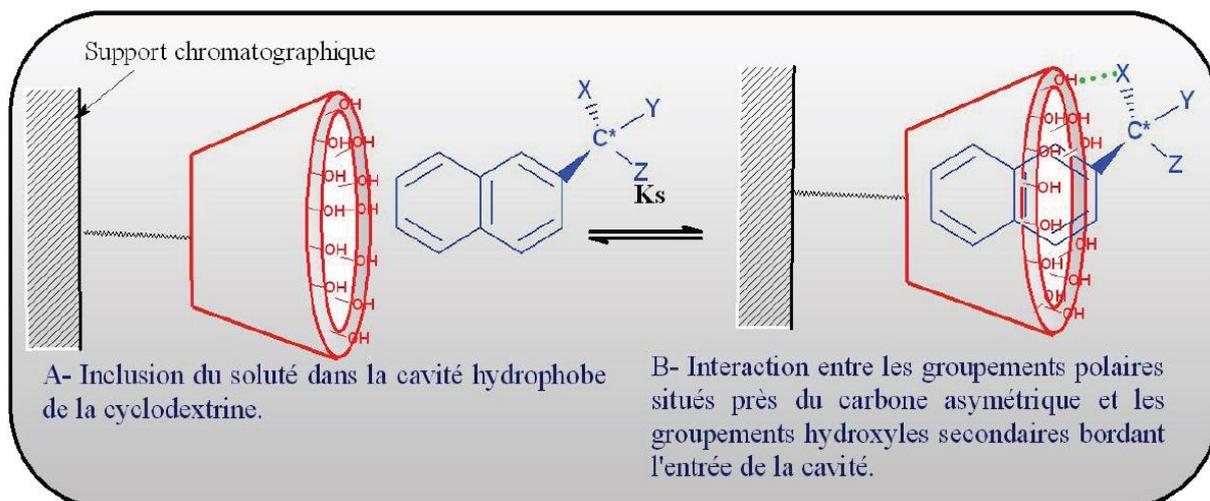


Figure 18. Représentation schématique des deux étapes de discrimination chirale sur PSC de type cyclodextrine [106, 51]

Les cyclodextrines modifiées par substitution de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle par différents groupements (alkyle, hydroxyalkyle, amino, glucosyle, acétyle...) ont été utilisées avec succès en tant que ACPM ou comme PSCs. Les PSCs à base de cyclodextrines ou de leurs dérivées sont utilisées en mode normale ou inverse [51].

b) Type II-b : Les éthers couronnes

Les éthers couronnes sont des oligomères cycliques de formule chimique générale $(C_2H_4O)_n$ (Figure 19) synthétisés en 1967 par Pedersen [107]. On distingue trois types d'éthers couronnes selon le nombre d'unités répété : le 12-couronne-4 (12 C4), le 15-couronne-5 (15 C5) et le 18-couronne-6 (18 C6) constitués de 4, 5 et 6 unités d'éthylèneoxy ($-CH_2-CH_2-O$) respectivement. Ces sélecteurs possèdent des propriétés complexantes vis-à-vis des composés alcalins, alcalino-terreux et les sels d'ammonium quaternaires.

La reconnaissance chirale implique la formation de liaisons hydrogène et d'interactions électrostatiques entre les hétéroatomes bordant la cavité de l'éther couronne et une fonction amine présente dans le composé chiral. Des interactions secondaires entre les substituants de l'éther couronne et les groupes se trouvant près du centre chiral du soluté sont nécessaires pour la reconnaissance chirale [108].

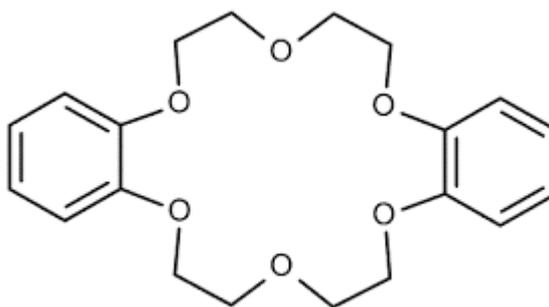


Figure 19. Structure d'un dérivé d'éther couronne de type 18 C6

Les sélecteurs chiraux à base d'éthers couronnes ont été utilisés avec succès pour la séparation chirale de composés présentant une fonction amine à proximité du centre asymétrique tels que les amines aromatiques, les amino-alcools [109], les acides aminés et leurs dérivés [110].

4. Sélecteurs de type IV

Ce sont les phases stationnaires chirales utilisées pour la chromatographie par échange de ligands, introduite par Davankov et al au début des années 70 [111]. Ces phases sont obtenues par greffage chimique d'un ligand chiral, le plus souvent un acide aminé, sur des matrices polymériques organiques, du type polyacrylamide ou polystyrène-divinyl-benzène, ou sur des gels de silice ou plus récemment sur des monolithes. Les acides aminés cycliques conduisent aux meilleures énantiosélectivités et efficacités. Un cation métallique présentant des orbitales vacantes est ensuite fixé par percolation.

La reconnaissance chirale en chromatographie par échange de ligands est gouvernée par la formation de complexes diastéréoisomériques de différentes stabilités, entre un soluté donneur de doublets électroniques et le cation métallique. Les cations métalliques qui donnent des complexes stables avec des ligands très variés sont principalement des métaux de transition comme : Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} .

La séparation chirale par échange de ligands a montré son efficacité pour différentes techniques chromatographiques telles que (CPG [112], CCM [113, 114], CPS [115], HPLC [116]), en électrophorèse capillaire [117] et en électrochromatographie [118].

5. Groupe de type V : Les protéines

La première phase stationnaire chirale à base de protéines a été introduite en 1973. La résolution des énantiomères du tryptophane a été réalisée avec succès en utilisant la BSA-Sépharose (albumine de sérum de boeuf) [119].

De nombreux sélecteurs chiraux à base de protéines permettent la résolution de différents composés chiraux. Parmi ces protéines citons l'avidine [120], l' α 1-glycoprotéine acide (AGP) [5, 121], l'ovomucoïde (OVM) [122], l'albumine de sérum humain (HSA) [123] ou de boeuf (BSA) [124, 125], les enzymes comme la trypsine [120], la cellulase (CBH) [120], la pepsine [126] et le lysozyme [127]. La reconnaissance chirale dans ces sélecteurs est expliquée par la présence de nombreux sites chiraux dans lesquels des effets hydrophobes, des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogène interviennent [128].

La structure particulière de la protéine (structure tertiaire, feuilletts plissés, etc.), qui varie en fonction de la nature et de la teneur en solvant organique de la phase mobile, joue un rôle important dans le mécanisme de reconnaissance chirale [74].

Ces sélecteurs chiraux sont sélectifs envers un grand nombre de principes actifs de médicaments présentant un caractère acide, neutre ou basique ; et différents racémates ont été résolus sur différents sélecteurs protéiques, tels que les énantiomères du propranolol [129], de l'aténolol [130], de l'ibuprofène [131] ou de la warfarine [6]. Ces sélecteurs ont été particulièrement utilisés en tant que phase stationnaire chirale en HPLC, cependant, leur utilisation en tant que ACPM est très rare [132].

6. Les sélecteurs chiraux à base d'antibiotiques macrocycliques

Ces sélecteurs chiraux sont les plus récents. Ils ont été introduits par Armstrong et al. en 1994 [133, 14]. Les antibiotiques macrocycliques ont été utilisés par la suite pour différentes techniques d'analyse (HPLC, CCM, CPG, CPS, EC et ECC). Ils sont utilisés avec succès en tant que phases stationnaires chirales et comme additifs chiraux dans les phases mobiles ou les tampons de migration [134-137].

Les glycopeptides (vancomycine et dérivés, ristocétine A, teicoplanine et dérivés, avoparcine et eremomycine [138]), les ansamycines (rifamycine B et rifamycine SV), les aminoglycosides et les oligopeptides tel que le thiostrepton [134] sont les antibiotiques macrocycliques les plus employés comme sélecteurs chiraux.

Les glycopeptides antibiotiques macrocycliques présentent des propriétés énantiosélectives vis-à-vis d'un grand nombre de composés de structures différentes. Cette sélectivité est liée à la présence, dans leurs structures, de trois ou quatre macrocycles fondus reliés à des unités glucidiques, ce qui implique la présence d'un nombre considérable de centres chiraux et de cavités d'inclusion. On distingue sur ces molécules différents groupements fonctionnels acides, basiques ou neutres (groupements aromatiques, acides carboxyliques, amines...) qui participent également au mécanisme de reconnaissance chiral.

De nombreuses PSCs à base de glycopeptides antibiotiques macrocycliques ont été commercialisées (Figure 20). Citons par exemple les PSCs à base de vancomycine (Chirobiotic V) [14], de ristocétine A (Chirobiotic R), de teicoplanine (Chirobiotic T) [16] et de teicoplanine aglycone (Chirobiotic-TAG) [20]. Cette dernière a été synthétisée en enlevant les parties glucidiques de la teicoplanine.

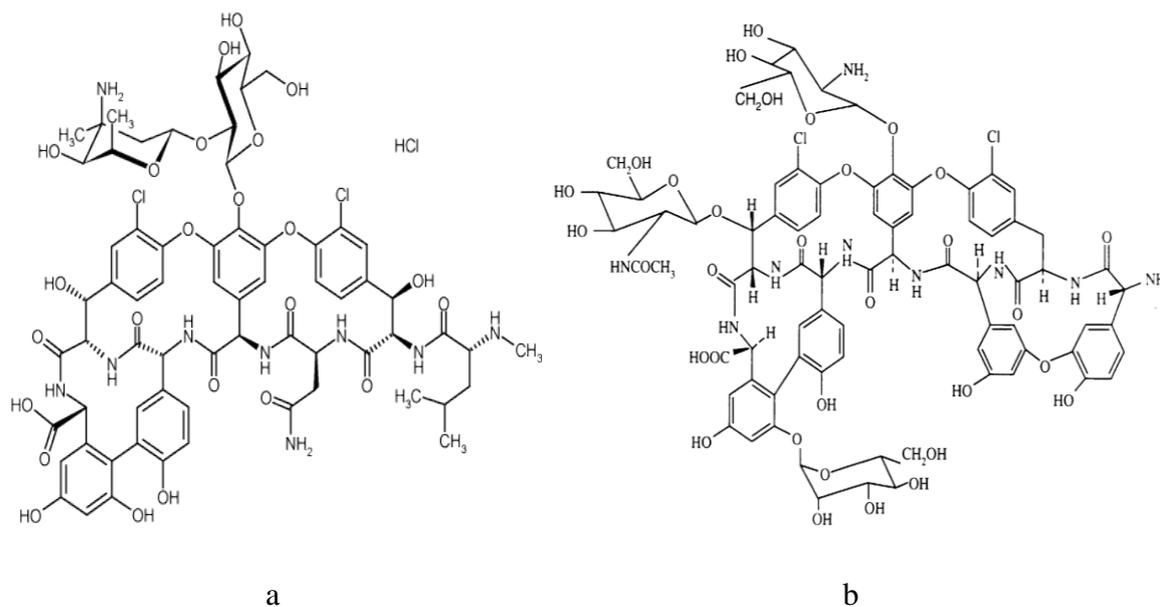


Figure 20 : Structures de : a) la vancomycine, b) la teicoplanine

Le mécanisme de reconnaissance chirale de ces sélecteurs repose sur des mécanismes d'inclusion dans la cavité hydrophobe, des interactions de type π - π , des liaisons hydrogène, des interactions dipôle-dipôle, des interactions électrostatiques ou des répulsions stériques [139-141]. Les propriétés énantiosélectives des antibiotiques macrocycliques se rapprochent de celles des cyclodextrine par le phénomène d'inclusion et de celles des protéines par les différentes interactions mises en jeu entre l'analyte et le sélecteur chiral. Ces PSCs peuvent être utilisées en phase normale ou en polarité de phase inversée. Des phases mobiles relativement polaires non aqueuses peuvent également être utilisées avec ces PSCs [14, 134].

Les PSCs de type antibiotiques macrocycliques ont été utilisées avec succès pour la résolution de différents composés chiraux tels que la warfarine [142], les anti-inflammatoires non stéroïdiens [14, 143], les acides aminés et leurs dérivés [144], l'oxprenolol [14, 140], le propranolol [140], etc.

VI- PARTIE EXPERIMENTALE

PARTIE A

Dans ce travail, nous allons nous intéresser à étudier :

- La rétention de l'ibuprofène, du flurbiprofène et de l'acide mandélique dans une colonne achirale de type C18, et la séparation des formes énantiomériques dans des colonnes chirales de type polysaccharides (OJ-R, OD-RH,...) et de type Pirkle (Whelk-0.1) par HPLC et HPLC-MS.
- La préparation d'une colonne chirale de type glycopeptide antibiotique (Vancomycine), ensuite la séparation des énantiomères de quelques médicament de la famille des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) de type profènes dans cette colonne en utilisant à chaque fois les mêmes conditions pour toutes les molécules.
- L'utilisation de la colonne préparée dans la partie précédente pour la séparation des énantiomères de quelques médicaments de différentes familles à caractère acide ou basique en utilisant à chaque fois les mêmes conditions pour toutes les molécules, dans le but de tester sa performance et sa stabilité.

SEPARATION DE L'IBUPROFENE, DU FLURBIPROFENE ET DE L'ACIDE MANDELIQUE SUR COLONNE CHIRALE ET ACHIRALE

I. OPTIMISATION

I.1 Introduction

Avant de procéder à toute analyse, il est indispensable de rechercher dans un premier temps les paramètres nécessaires au choix de la méthode de séparation des analytes.

L'optimisation simultanée des différents paramètres est délicate, car elle présente un caractère complexe en raison du grand nombre et de l'inter indépendance de ces facteurs expérimentaux.

Le choix d'une méthode de séparation constitue une étape essentielle dans la mise au point de toute analyse par CPL. Aujourd'hui on dispose d'un vaste éventail de méthodes chromatographiques, ce qui complique le choix de la méthode, par ailleurs, il présente l'avantage de permettre certaines séparations avec une sélectivité et une résolution rarement atteinte auparavant.

S'il n'existe pas de méthodologie infaillible, en particulier dans le cas de l'analyse d'un échantillon inconnu, différentes considérations peuvent guider utilement les essais expérimentaux en particulier la masse molaire, la solubilité et la polarité et enfin la structure chimique du composé.

Cependant, la structure chimique du composé à analyser ou à séparer est le guide le plus sûr pour le choix d'une méthode d'analyse. Ainsi, l'existence de certains groupements fonctionnels dans la molécule orientera les essais vers telle ou telle méthode.

C'est dans cette optique que nous avons axé les différentes considérations concernant nos travaux de recherche.

I.3 Appareillage

Le système chromatographique sur lequel nous avons travaillé est constitué de :

a) Pompe et détecteur

- Deux pompes Beckman Coulter, Gold LC-126,
- Un injecteur automatique Beckman LC-508.
- Un détecteur UV- visible à barrettes de diodes Beckman system Gold LC-168.

b) Colonnes

- Les colonnes utilisées avec ce système sont :
 - Colonne de type ODS C18 (50 x 4,6mm DI), la taille des particules est de 3,5µm
 - Colonne de type chiralcel OD-RH (150 x 4,6mm DI) la taille des particules est de 5 µm
 - Colonne de type chiralcel OJ-R (150 x 4,6mm DI) la taille des particules est de 5 µm
 - Ainsi que d'autres colonnes utilisées en mode normale : OD, OJ et Whelk-0.1, taille des colonnes : (150 x 4,6mm DI) et la taille des particules : 5 µm
- Ce système est associé à un ordinateur comprenant un logiciel 32Karat.

Le chromatographe en phase liquide couplé au spectromètre de masse LC/MS utilisé est composé de :

- Une chaîne HPLC de type Waters 2695 de marque Alliance équipée de :
 - Une pompe quaternaire avec un dégazeur intégré.
 - Injecteur automatique.
 - Une colonne de type ODS C18 (50 x 4,6mm DI), la taille des particules est de 3,5µm
 - Détecteur UV à Barrettes de Diodes SURVEYOR
- Détecteur Spectromètre de Masse (Waters Micromass ZQ) quadripolaire couplé à l'HPLC avec source d'ionisation électrospray.

Toutes les expériences sur HPLC ont été réalisées à un débit de 1 ml/min.

I.4 Produits chimiques

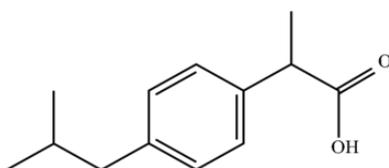
I.4.1 Solutés

a) Standards : l'ibuprofène racémique et le R- (-) et S- (+) – acide mandélique nous ont été fournis par le laboratoire des aminoacides, peptides et protéines de l'université de Montpellier2, France.

b) Produits pharmaceutiques : l'ibuprofène (200 mg) sous forme de comprimés provient de la compagnie SAIDAL.

Le flurbiprofène en comprimé nous a été fourni par le laboratoire des aminoacides, peptides et protéines de l'université de Montpellier2, France.

Les structures des trois composés à analyser et leurs masses moléculaires sont montrées dans la figure 21 :

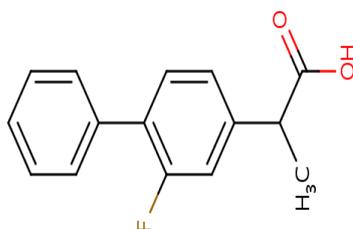


Ibuprofène

M = 206,28 g/mol, pKa = 4,54 à 25°C

Solubilité dans l'eau : 0,043 g/l à 37°C

Soluble dans la plupart des solvants organiques

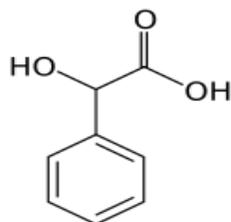


Flurbiprofène

M = 244,26 g/mol, pKa = 4,14 à 25°C

Solubilité dans l'eau : très peu soluble dans l'eau

Soluble dans le DMSO, le DMF, l'acétone, l'éthanol, l'éther, le méthanol et l'acétonitrile



Acide mandélique

M = 152,15 g/mol, pKa = 3,40 à 25°C

Solubilité dans l'eau : 150 g/l à 20°C

Soluble dans le méthanol, l'éther diéthylique, l'éthanol et l'isopropanol

Figure 21. Formules chimiques des trois analytes.

I.4.2 Solvants organiques

L'acétonitrile, l'isopropanol et l'hexane sont de qualité HPLC, et nous ont été fournis par Sigma-Aldrich, France.

I.5 Recherche des conditions optimales

L'optimisation d'une séparation chromatographique ne se limite pas à celle de la résolution ; d'autres critères doivent être pris en considération tels que la durée de la séparation, le nombre de pics séparés, le coût de l'analyse et la sensibilité qui doit être aussi bonne que possible dans l'analyse de traces.

Dans notre travail, la recherche des conditions optimales est effectuée selon une priorité ; à savoir une bonne résolution des composés à analyser avec toutefois des temps d'analyses acceptables. L'optimisation a été faite d'abord dans une colonne conventionnelle, ensuite dans une colonne chirale dans le but de séparer les énantiomères des solutés à analyser.

I.5.1 Optimisation

I.5.1.1 Choix de la longueur d'onde maximale (λ_{\max})

Les analyses ont été effectuées avec un détecteur UV-visible à barrettes de diodes. Tous les spectres ont été enregistrés à la longueur d'onde 214 nm.

I.5.1.2 Choix du type d'élution

Les expériences concernant l'élution de l'ibuprofène ont été effectuées en régime isocratique. Pour le kétoprofène et l'acide mandélique, les éluions ont été réalisées en mode

gradient d'élution avec la colonne C18, alors qu'avec les colonnes chirales, toutes les expériences ont été effectuées en mode isocratique.

I.5.1.3 Choix de la phase stationnaire

Bien que le rôle de la phase stationnaire ait été démontré et que certains travaux aient tenté de mettre en évidence des comportements similaires et d'établir des classifications de nombreuses phases stationnaires disponibles sur le marché, aucune stratégie d'optimisation fondée sur la recherche de la phase stationnaire optimum, n'a encore été développée. Ceci provient sans doute de la difficulté qu'il ya, d'une part à optimiser un paramètre tel que la nature de la phase stationnaire, d'autre part à transposer les résultats obtenus dans une colonne donnée, à une autre colonne de même nature.

Dans notre cas, nous avons opté pour une colonne achirale de phase stationnaire apolaire de type C₁₈ pour l'extraction du racémique des composés à analyser, ensuite nous avons utilisé des colonnes chirales de type polysaccharides ou de type piracle pour séparer les énantiomères.

I.5.1.4 Choix de la phase mobile

Nous avons utilisé le système binaire acétonitrile/eau en mode inverse et le système hexane/isopropanol en mode normale. Pour ces deux systèmes, nous avons étudié l'influence de la polarité du mélange sur la rétention et la séparation.

I.6 Préparation des échantillons

L'échantillon à analyser est dissous dans un mélange de solvants. Pour les analyses effectuées en mode inverse, l'échantillon est dissous dans le mélange ACN/H₂O, en mode normale, le mélange utilisé est iPrOH/Hexane ; ensuite l'échantillon est filtré dans un filtre millipores 0,45 µm.

II. RESULTATS ET DISCUSSION

II.1 Introduction

La phase mobile joue un rôle primordial dans le mécanisme de séparation en chromatographie liquide. La rétention des solutés dépend de la nature et la composition de la phase mobile. Nous avons travaillé avec des mélanges binaires ACN/H₂O en mode inverse, et iPrOH/Hexane en mode normale et nous avons fait varier le pourcentage de chaque solvant.

Nous avons travaillé à la longueur d'onde 214 nm pour toutes les expériences.

II.2 Séparation de l'ibuprofène et de ses énantiomères

II.2.1 Influence de la phase stationnaire

La séparation de l'ibuprofène par la colonne C₁₈ a été effectuée avec le mélange ACN/H₂O, en faisant varier le pourcentage du solvant organique dans l'eau. La figure 22 présente le chromatogramme de l'ibuprofène dans la phase mobile ACN/H₂O, (35/65 % v/v), à la longueur d'onde 214nm.

La séparation des énantiomères de l'ibuprofène a été réalisée sur les colonnes chirales OJ-R et OD-RH en mode inverse. Cependant malgré les nombreuses tentatives de séparation sur les colonnes OJ et OD en mode normale, Ces deux dernières n'ont pas donné de bonnes séparations.

Les résultats de la séparation des énantiomères sur les colonnes OJ-R et OD-RH avec le mélange ACN/H₂O, en faisant varier la concentration de l'acétonitrile dans l'eau sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1. Variation des facteurs de rétention (k_1 et k_2), de la sélectivité (α) et de la résolution (R_s) avec les pourcentages de l'acétonitrile dans la phase mobile (ACN/H₂O) avec les colonnes chirales OJ-R et OD-RH.

Colonne	% ACN	k_1	k_2	α	R_s
OJ-R	32	17,96	19,67	1,09	1,16
	34	13,11	14,34	1,09	1,05
	35	11,35	12,42	1,09	1,23
	40	5,75	6,26	1,09	0,9
OD-RH	30	26,28	27,26	1,04	0,97
	40	5,99	-	1	ns
	50	1,82	-	1	ns
	60	0,97	-	1	ns

ns : non séparés

Nous remarquons que les temps de rétentions augmentent quand la polarité de la phase mobile augmente avec les deux colonnes. Au-delà de 40% d'ACN, aucune amélioration dans les résolutions n'a été observée. Nous avons obtenu une séparation relativement bonne des énantiomères, et des temps de rétentions raisonnables avec la phase mobile constituée de ACN/H₂O, 35/65 % v/v en utilisant la colonne OJ-R, comme le montre la figure 23.

Ces conditions d'analyses sont les conditions optimales obtenues avec les deux colonnes : la colonne conventionnelle C18 et la colonne chirale OJ-R.

Avec la colonne OD-RH, une séparation incomplète des énantiomères est observée à 30% d'acétonitrile, avec des temps de rétentions très longs.

II.2.2 Influence de la polarité de la phase mobile

En RP-HPLC, de nombreux auteurs ont cherché une relation entre le facteur de rétention k et la concentration du modificateur organique pour les mélanges binaires. Il fut établi qu'il est impossible d'établir une relation simple permettant de décrire de façon exacte la variation de k sur l'ensemble du domaine de composition allant de 0 à 100% du modificateur organique.

Dans ce type de chromatographie, la rétention repose sur le caractère hydrophobe des solutés. On concevra aisément que plus la quantité en eau augmente, dans la phase mobile, plus le caractère hydrophobe des solutés sera marqué, et plus la rétention sera importante. On peut généraliser cette notion en disant que la variation du facteur de rétention est proportionnelle à la teneur en eau. Différentes lois de proportionnalités ont été évoquées par les auteurs suivant que l'on s'intéressait aux binaires méthanol/eau ou aux binaires acétonitrile/eau. La loi la plus générale est une relation quadratique entre le logarithme décimal du facteur de rétention k et x la teneur en eau, qui permet de décrire de façon exacte le comportement chromatographique des solutés dans les domaines usuels de composition à savoir pour lesquels k varie de 0,5 à 30. Un tel modèle s'écrit :

$$\text{Log } k = ax^2 + bx + c$$

La simplification du modèle quadratique en un modèle linéaire est plus controversée, en particulier pour les solvants organiques moins polaires que le méthanol tel que le THF, avec lesquels le modèle de rétention de certains solutés présente parfois une courbure importante. Néanmoins ce modèle linéaire a été utilisé avec succès dans de nombreuses procédures d'optimisation décrites dans la littérature [145-149]. Il est admis qu'il constitue une bonne approximation pour les k compris dans un intervalle de 1 à 10.

Dans notre cas, la variation de $\text{Log } k$ en fonction de la teneur en ACN est sensiblement linéaire comme l'indiquent les figures 24 et 25. En conséquence, on peut conclure que dans les domaines considérés des pourcentages de l'acétonitrile, nous avons donc un modèle de rétention linéaire.

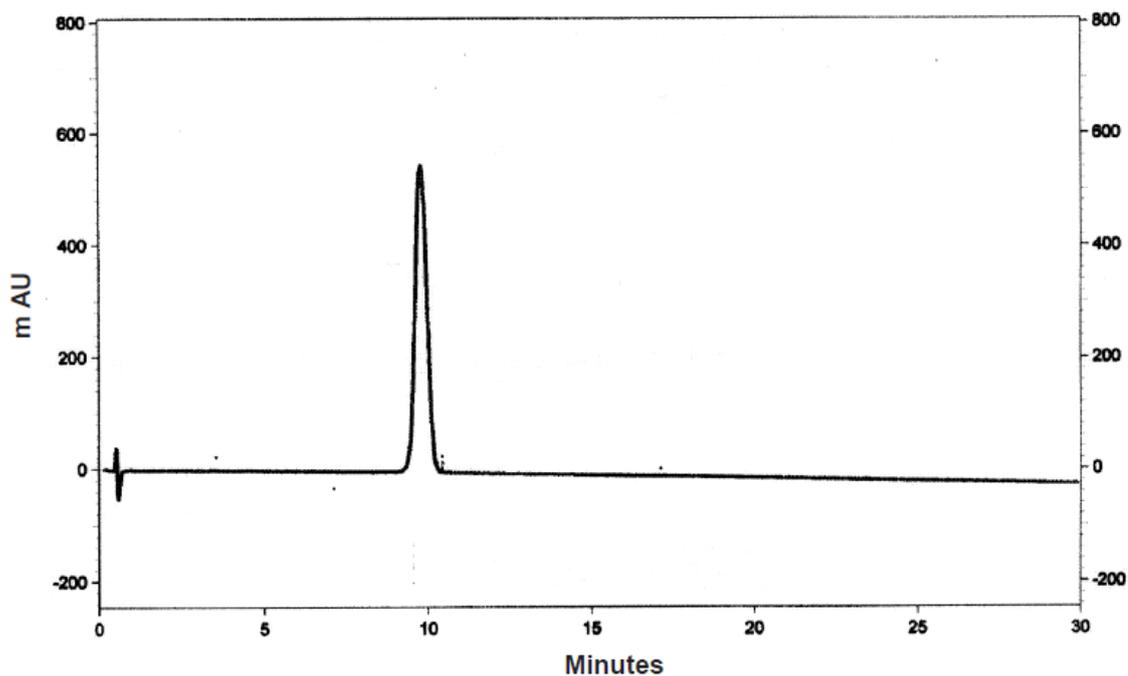


Figure 22. Analyse de l'ibuprofène sur une colonne SymmetryShield RP18, 3,5 μ m, 100 \AA .
Phase mobile : ACN/H₂O, 35/65 % v/v. Détection UV à 214nm.

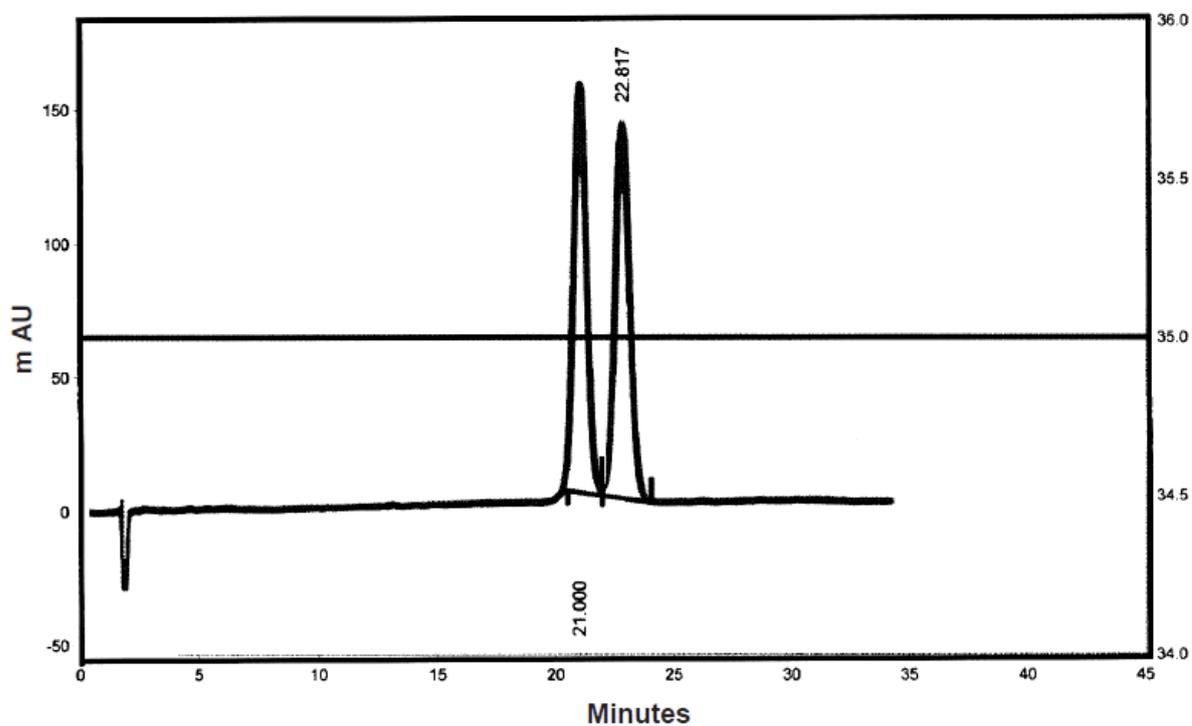


Figure 23. Analyse de l'ibuprofène sur une colonne Chiralcel OJ-R, 5 μ m. Phase mobile :
ACN/H₂O, 35/65 % v/v. Détection UV à 214nm.

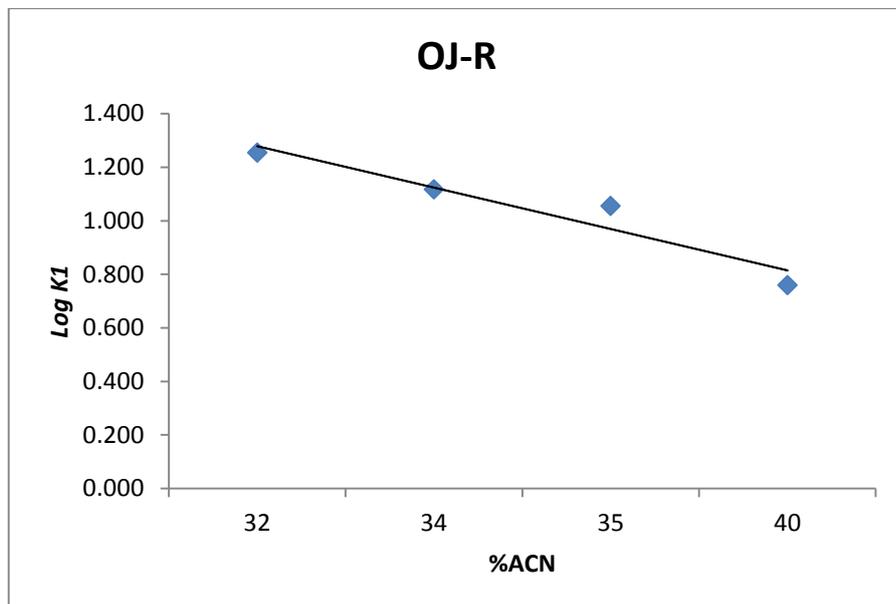


Figure 24. Modèle de rétention dans la colonne OJ-R, $\text{Log } k_1 = f(\% \text{ACN})$.

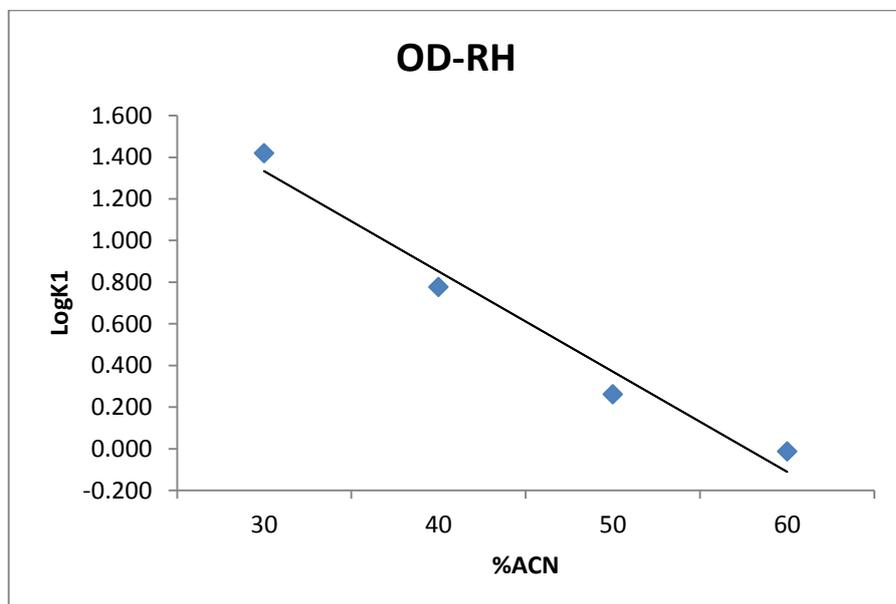


Figure 25. Modèle de rétention dans la colonne OD-RH, $\text{Log } k_1 = f(\% \text{ACN})$.

II.2.3 Application au médicament de l'ibuprofène en utilisant HPLC et HPLC-MS

Préparation de l'échantillon

Dix comprimés de l'ibuprofène ont été écrasés dans un mortier jusqu'à obtention d'une poudre. La quantité moyenne d'un comprimé a été dissoute dans 25 ml d'ACN puis diluée jusqu'à 100ml avec la phase mobile, ensuite filtrée dans un filtre millipores 0,45 μm . Une solution diluée dans la phase mobile à 100 $\mu\text{g/ml}$ a été ensuite préparée.

Analyse par HPLC

Les analyses de l'échantillon avec la colonne C18 et OJ-R ont été réalisées dans les conditions optimales obtenues précédemment. Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus avec l'échantillon étalon (même temps de rétentions et mêmes allures des pics).

Analyse par HPLC-MS

L'analyse de l'échantillon par HPLC-MS a été réalisée en mode positif et négatif dans la phase mobile ACN/H₂O, 35/65 v/v avec une colonne de type C18 (Figure 26) : Le chromatogramme obtenu en mode électrospray négatif montre le pic de l'ion (ibuprofène - H)⁻ (m/z 205) à tr 2,94min (Figure 26a) et en mode positif le pic de l'ion (ibuprofène + H)⁺ (m/z 207) est observé à tr 2,92min (Figure 26b).

La figure 27 montre le spectre de masse acquis en mode balayage (*fullscan*) de l'ibuprofène : En mode électrospray négatif (Figure 27a) : le spectre présente le pic (M-H)⁻ à m/z 205,2 (pic de base). Le pic à m/z 161,4 correspond au fragment (M-COOH)⁻, et le pic de l'ion dimère (2M-H)⁻ à m/z 411,2.

En mode électrospray positif (Figure 27b) : l'ion (M+H)⁺ apparaît à m/z 207,1 et le pic le plus intense à m/z 161,2 correspond au fragment (M-COOH)⁺.

Ceci montre que l'ibuprofène en question est dans son état pur et stable

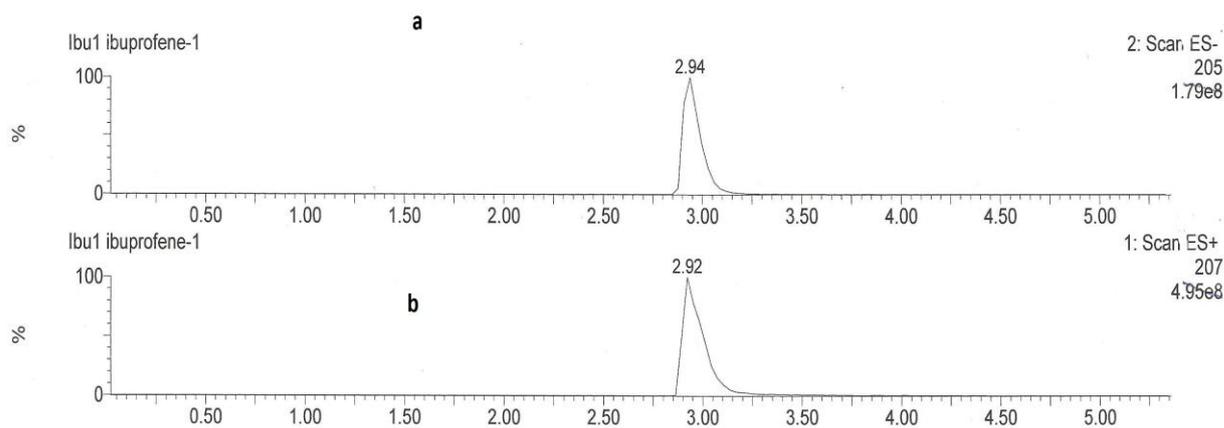


Figure 26. Chromatogramme LC/MS de l'ibuprofène : (a) en mode électrospray négatif, (b) en mode électrospray positif.

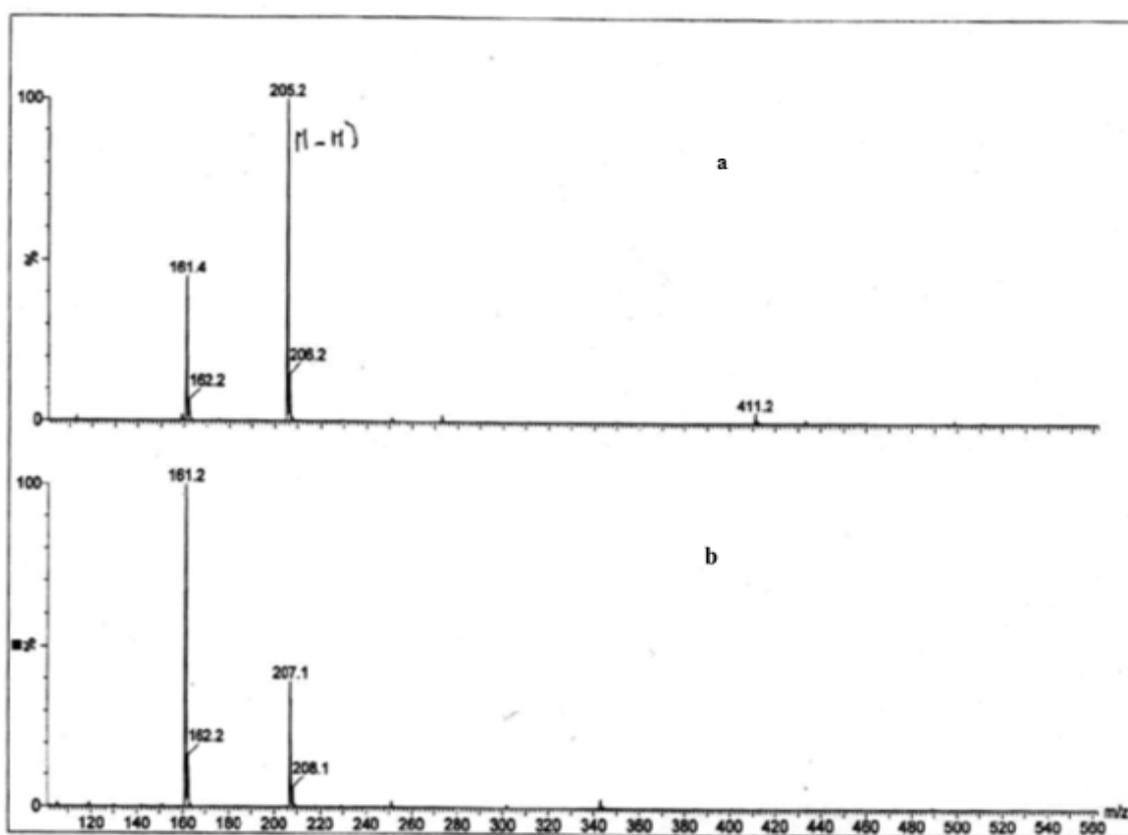


Figure 27. Spectre de masse de l'ibuprofène en « fullscan ». (a) en mode électrospray négatif, (b) en mode électrospray positif.

II.3 Séparation du flurbiprofène et de ses énantiomères

Préparation de l'échantillon

Comme le laboratoire ne disposait pas de l'étalon du flurbiprofène, nous avons travaillé directement avec des échantillons préparés à partir du médicament en comprimé.

Une quantité de flurbiprofène équivalente à un comprimé est dissoute dans 25 ml d'ACN puis diluée jusqu'à 100ml avec la phase mobile, ensuite filtrée dans un filtre millipores 0,45 μm . Une solution diluée à 100 $\mu\text{g/ml}$ dans la phase mobile a été ensuite préparée.

Analyse par HPLC

L'analyse du flurbiprofène sur la colonne C₁₈ a été effectuée en mode gradient d'élution en utilisant un mélange d'ACN et d'eau. La figure 28 présente le chromatogramme du flurbiprofène dans la phase mobile ACN/H₂O : de 0 à 100% ACN de 0 à 15min, puis 100% ACN de 15 à 19min ensuite retour à 0% à la vingtième minute ; le temps d'analyse est de 20min.

Les essais de séparation des énantiomères du flurbiprofène ont été effectués sur la colonne chirale OJ-R en mode inverse et Whelk 01 en mode normale.

En mode normal

Avec la Whelk 01 : Des phases mobiles avec différents pourcentages d'hexane et d'isopropanol (70/30 et 80/20 % v/v) ont été testés. Les temps de rétentions diminuent quand la polarité de la phase mobile diminue, mais la séparation n'a pas été observée. Une séparation incomplète a été observée avec la phase mobile constituée de 90% d'hexane (phase mobile très peu polaire) avec des temps de rétentions courts : t_{r1} 5,517min et t_{r2} 6,033min.

En mode inverse

Les résultats de la séparation des énantiomères sur la colonne OJ-R avec le mélange ACN/H₂O, en faisant varier la concentration de l'acétonitrile dans l'eau montrent que les temps de rétentions augmentent quand la polarité du solvant augmente. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec la phase mobile : ACN/H₂O, 35/65 % v/v, comme le montre la figure 29.

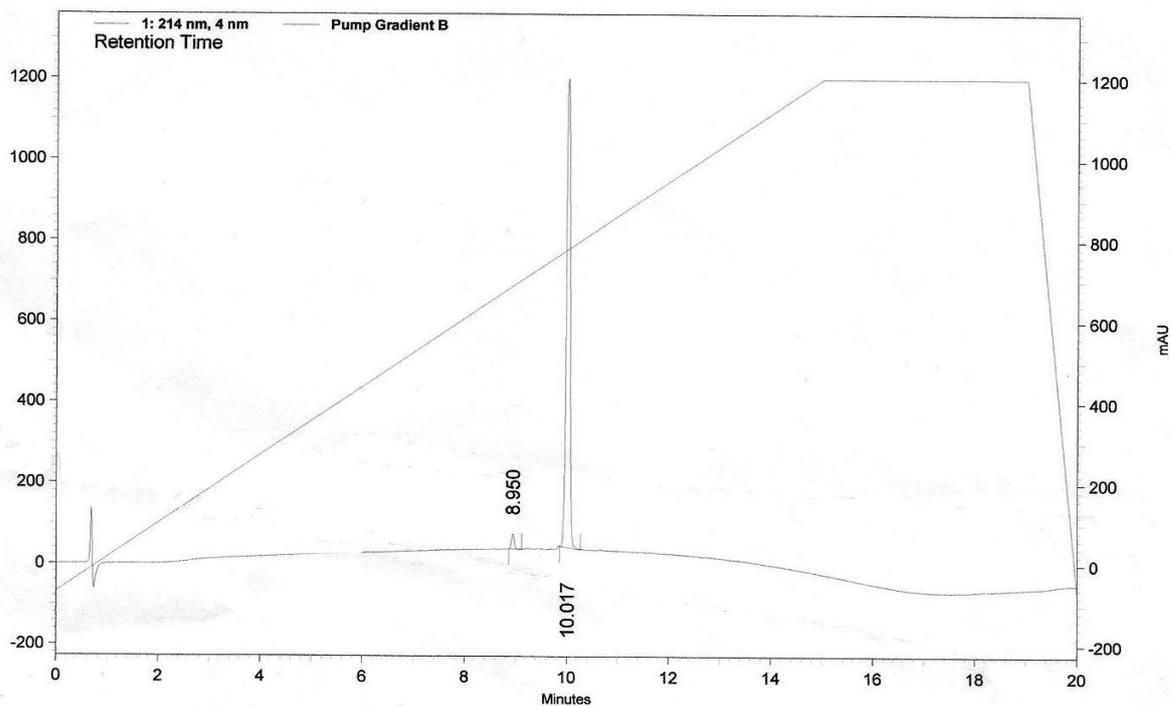


Figure 28. Chromatogramme du flurbiprofène sur la colonne SymmetryShield RP18, 3,5 μ m, 100Å. Phase mobile : ACN/H₂O, de 0 à 100% ACN de 0 à 15min, puis 100% ACN de 15 à 19min ensuite retour à 0% à la 20^{ème} minute. Détection UV à 214nm.

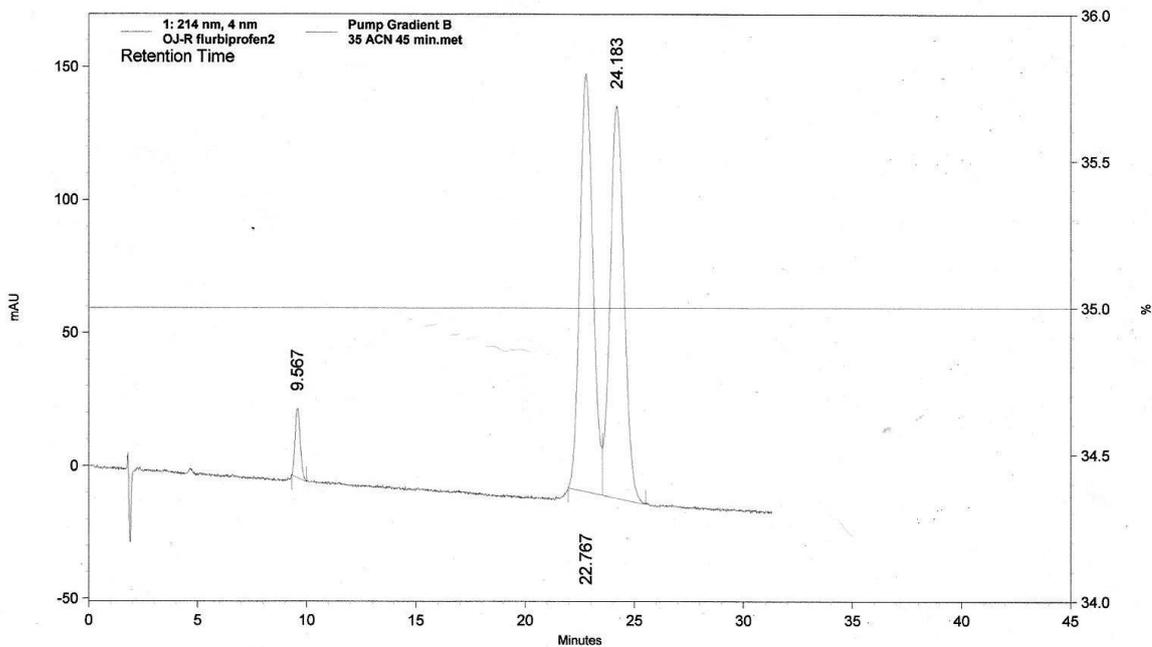


Figure 29. Chromatogramme du flurbiprofène sur la colonne Chiralcel OJ-R, 5 μ m. Phase mobile : ACN/H₂O, 35/65 % v/v. Détection UV à 214nm.

Analyse par HPLC-MS

L'analyse de l'échantillon par HPLC-MS a été réalisée dans la phase mobile constituée de ACN/H₂O, 35/65 % v/v, en mode positif et négatif comme on le voit sur les chromatogrammes présentés ci-dessous (Figure 30). La figure 30a présente le chromatogramme obtenu en mode électrospray négatif. Le temps de rétention de l'ion (M-H)⁻ est de 2,82min et la figure 30b présente le chromatogramme en mode positif de l'ion (M+H)⁺.

Le spectre de masse du flurbiprofène acquis en mode balayage est présenté dans la figure 31 : En mode électrospray négatif (Figure 31a) : le spectre présente le pic (M-H)⁻ à m/z 243,2. Le pic le plus intense à m/z 199,2 correspond au fragment (M-COOH)⁻, et le pic de l'ion dimère (2M-H)⁻ à m/z 487,1.

En mode électrospray positif (Figure 31b) : l'ion (M+H)⁺ apparaît à m/z 245 et le pic le plus long à m/z 199,1 correspond au fragment (M-COOH)⁺.

Le flurbiprofène analysé est un comprimé (présence d'excipient...), ceci explique l'apparition d'un petit pic correspondant à une trace d'impureté dans le chromatogramme à tr 2,62min.

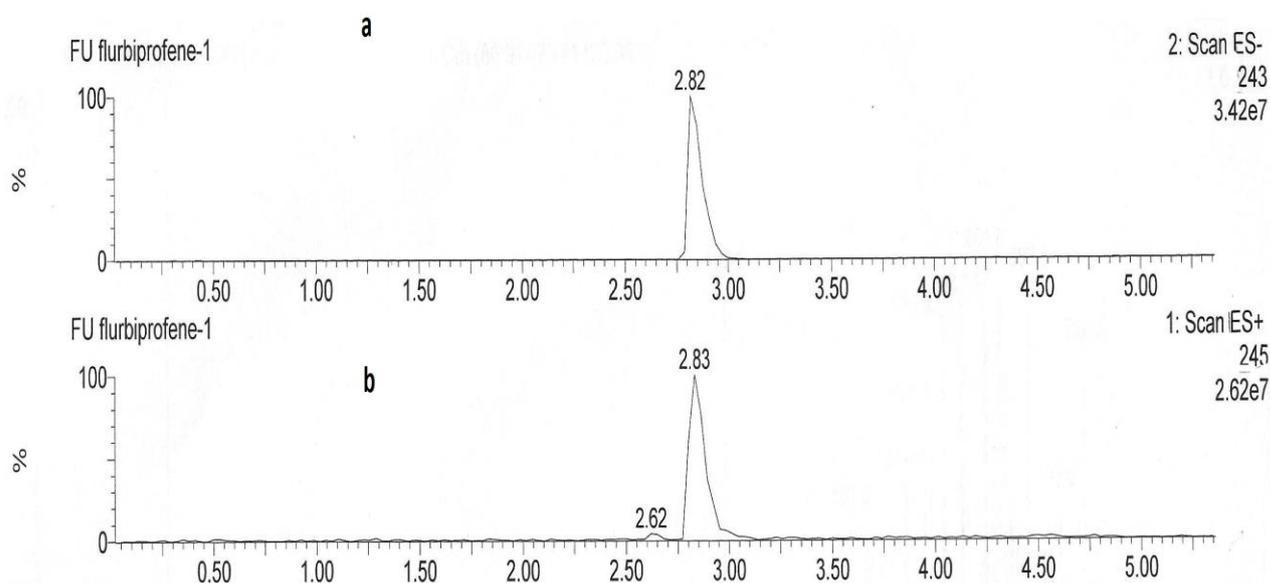


Figure 30. Chromatogramme LC/MS du flurbiprofène : (a) en mode électrospray négatif, (b) en mode électrospray positif.

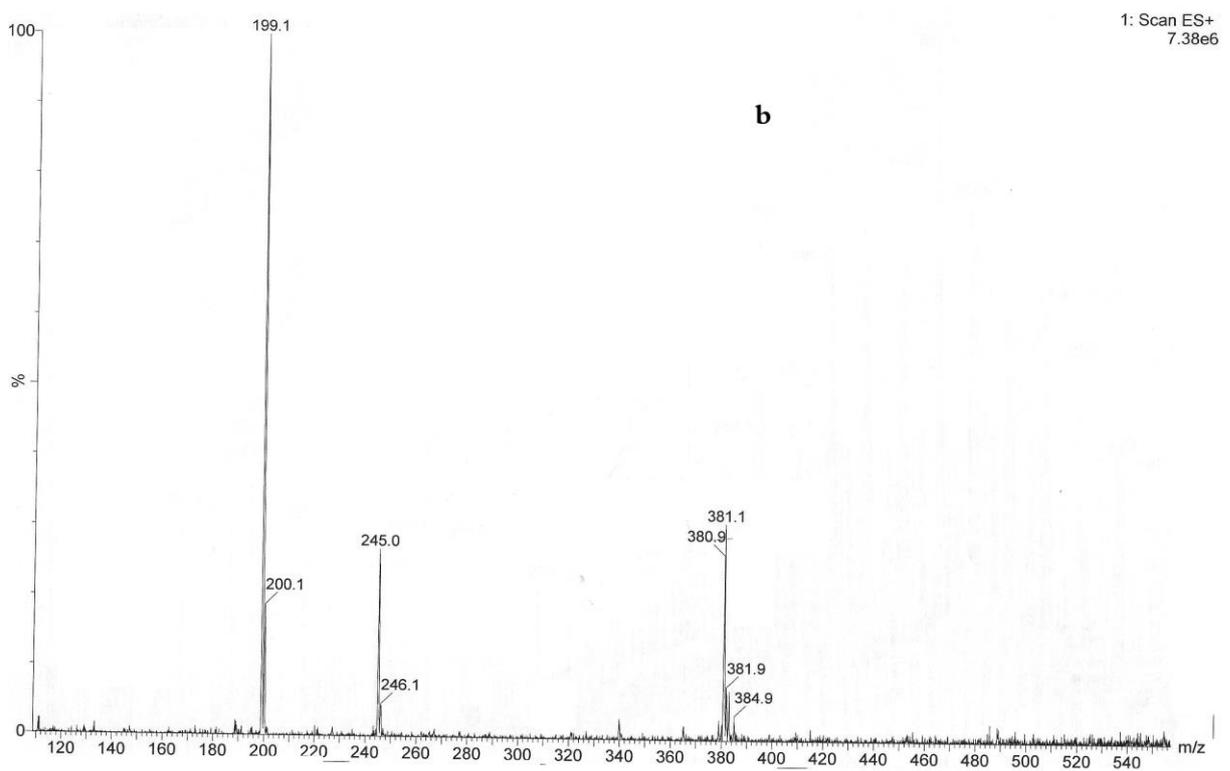
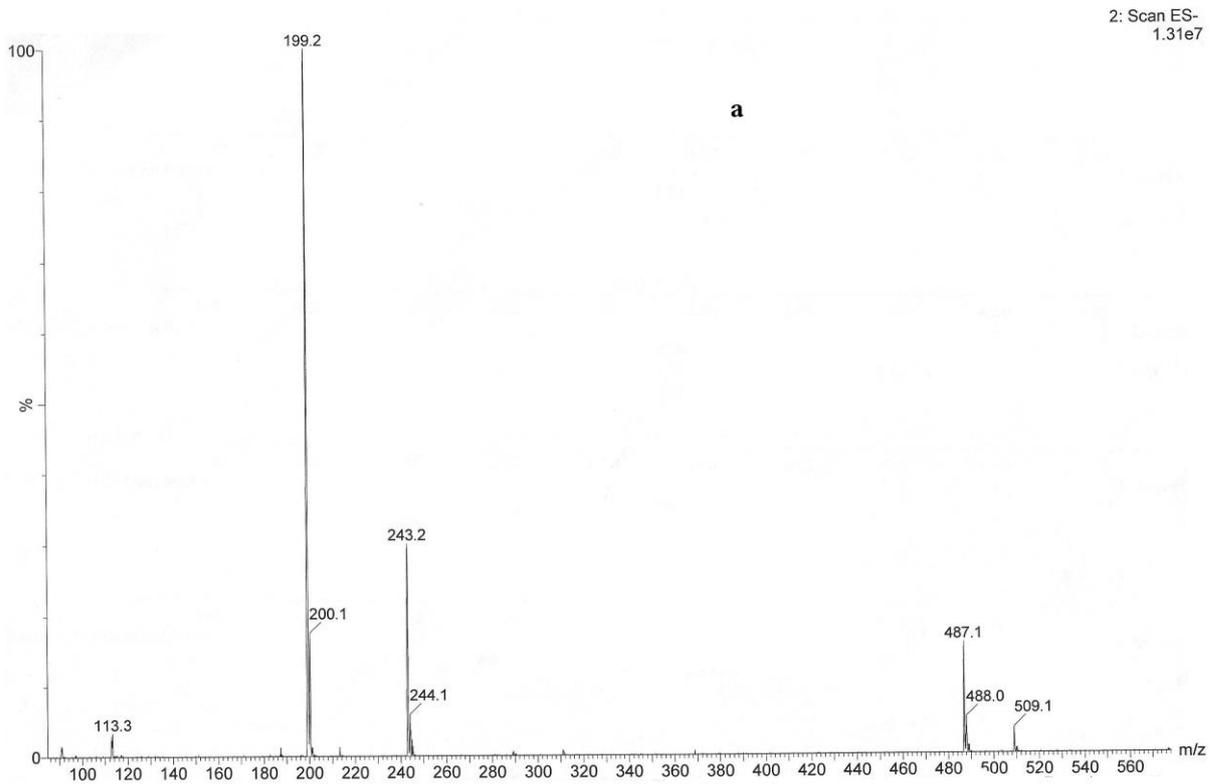


Figure 31. Spectre de masse du flurbiprofène en « fullscan ». (a) en mode électrospray négatif, (b) en mode électrospray positif.

II.4 Séparation de l'acide mandélique et de ses énantiomères

Introduction

L'acide mandélique a été décrit dans la littérature en tant que antiseptique et désinfectant. Ses propriétés sur la cohésion des cornéocytes suggèrent son intérêt dans le traitement des lésions rétentionnelles d'acné [150]. Il entre dans la préparation de quelques médicaments (antibiotiques des voies urinaires par exple). L'activité antibactérienne de l'acide mandélique a été réalisée par sa forme S. La forme R est biologiquement inactive et responsable des effets secondaires indésirables (nausée, vertige, vomissement,...etc.). Ces énantiomères ont été utilisés comme agent chiraux de dédoublement de certains produits racémiques. Plusieurs méthodes de séparation de ces énantiomères ont été décrites dans la littérature. Dans cette partie, nous présentons une étude sur l'analyse de l'acide mandélique par HPLC simple, ensuite par un système de couplage HPLC – MS.

Préparation de l'échantillon

6mg de S (+) et 2,5mg de R (-) acide mandélique ont été mélangés et dissous dans 85ml de la phase mobile composée de ACN/H₂O. La solution obtenue est ensuite filtrée dans un filtre millipores 0,45 µm.

Analyse par HPLC

L'analyse de l'acide mandélique sur la colonne C₁₈ a été effectuée en mode gradient d'élution en utilisant un mélange d'acétonitrile et d'eau. La figure 32 présente le chromatogramme de l'acide mandélique à la longueur d'onde 214nm, dans la phase mobile ACN/H₂O : de 0 à 100% ACN de 0 à 15min, puis 100% ACN de 15 à 19min ensuite retour à 0% de 19 à 20 minute ; le temps d'analyse est de 20min.

Pour déterminer l'ordre d'élution des deux énantiomères, nous avons injecté séparément chaque énantiomère dans la colonne OD-RH préparés dans les mêmes conditions que le mélange.

Afin de tester l'effet de la phase mobile et de la phase stationnaire sur les énantiomères, nous avons préparé un mélange des deux énantiomères selon la méthode citée ci-dessus pour tester la séparation et l'élution.

Les essais de séparation des énantiomères de l'acide mandélique ont été effectués en mode inverse sur la colonne chirale OD-RH. Des phases mobiles avec différents pourcentages volumiques d'ACN dans l'eau (10 ; 5 ; 3 ; 2,5 et 2%) ont été testés. Les temps de rétentions augmentent quand la polarité de la phase mobile augmente.

La séparation des énantiomères a été observée dans toutes les phases mobiles testées, mais la meilleure résolution ($R_s = 2,68$) a été obtenue avec la phase mobile constituée de 3% ACN comme le montre la figure 33. L'énantiomère S est élué en premier.

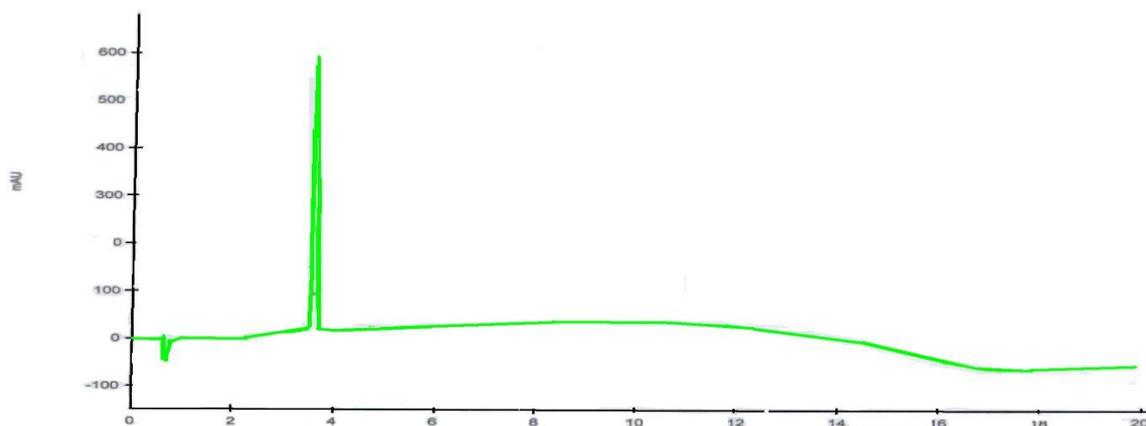


Figure 32. Chromatogramme de l'acide mandélique sur la colonne SymmetryShield RP18, 3,5 μ m, 100Å. Phase mobile : ACN/H₂O, de 0 à 100% ACN de 0 à 15min, puis 100% ACN de 15 à 19min ensuite retour à 0% à la 20^{ème} minute. Détection UV à 214nm.

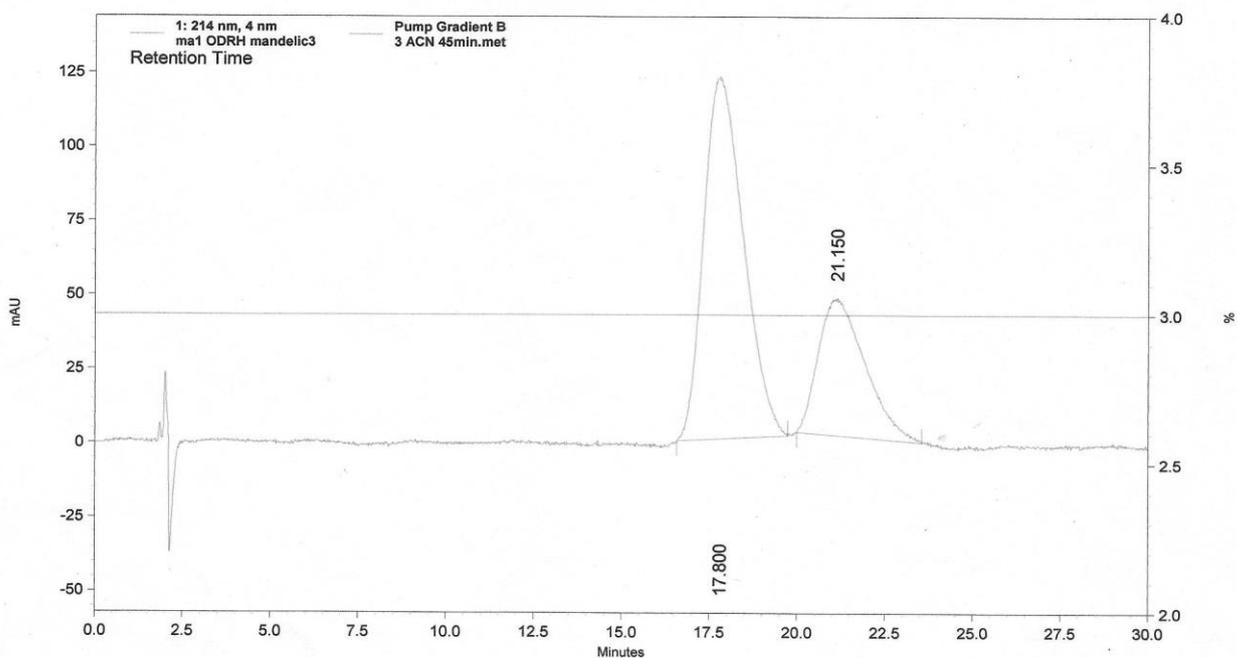


Figure 33. Chromatogramme de l'acide mandélique sur la colonne Chiralcel OD-RH, 5 μ m. Phase mobile : ACN/H₂O, 3/97 % v/v. Détection UV à 214nm.

Par HPLC-MS

Afin de contrôler la pureté et la stabilité de l'échantillon, l'acide mandélique a été analysé par HPLC-MS dans la phase mobile constituée de ACN/H₂O, 3/97 % v/v, en mode électrospray positif. La figure 34 présente le chromatogramme de l'ion (M+H)⁺.

Le spectre de masse en mode électrospray positif de l'acide mandélique acquis en mode balayage est présenté dans la figure 35 : le pic de l'ion (M+H)⁺ apparaît à m/z 153,2 alors que le pic de base à m/z 135,1 correspond au fragment (M-OH)⁺. Le pic m/z 107 correspond à l'ion (M-COOH)⁺.

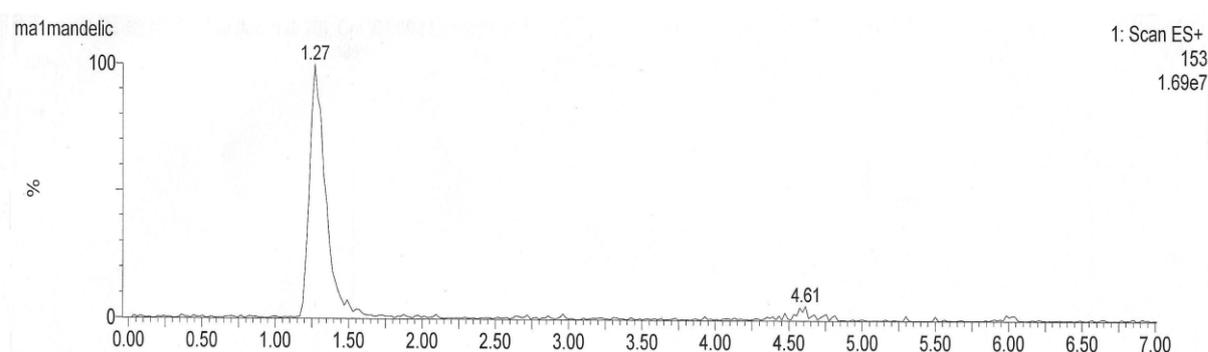


Figure 34. Chromatogramme HPLC/MS de l'acide mandélique en mode électrospray positif.

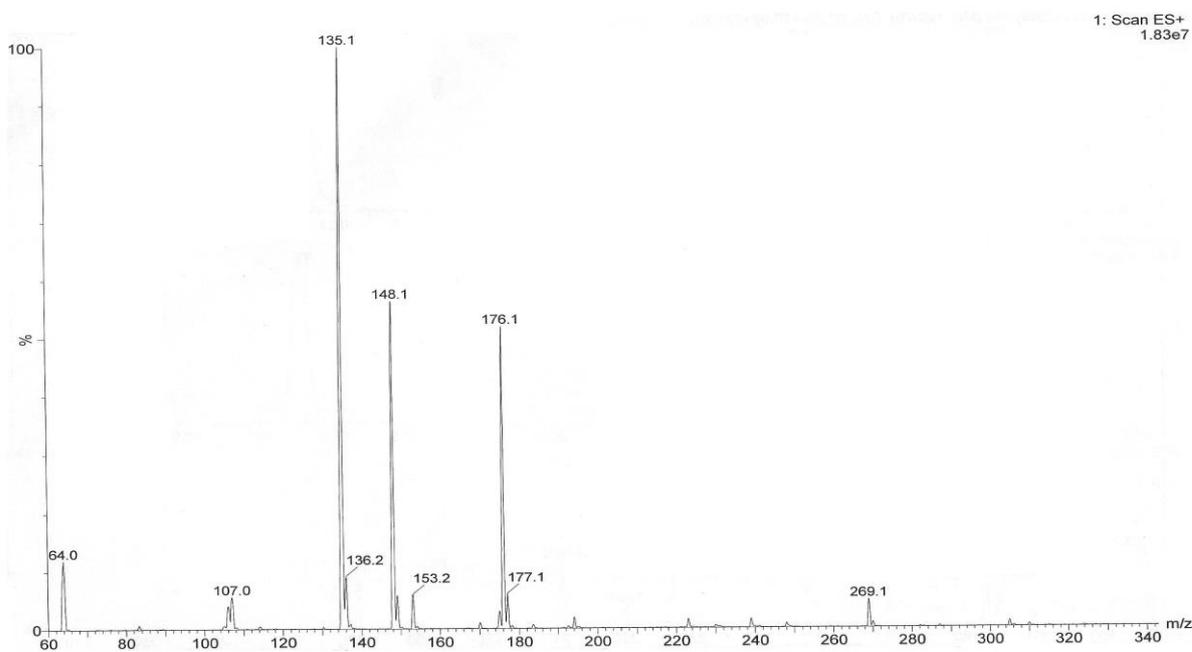


Figure 35. Spectre de masse de l'acide mandélique en « fullscan » en mode électrospray positif.

Conclusion

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'analyse et la séparation de trois substances pharmaceutiques chirales à savoir ; ibuprofène, flurbiprofène et acide mandélique .

Dans un premier temps nous avons procédé à une séparation achirale et la détermination des conditions optimales. Les paramètres chromatographiques optimales ont été déterminés : constituants de la phase mobile et la phase stationnaire (colonne C18) dans deux modes d'élutions (isocratique et gradient d'élution).

Dans un deuxième temps, nous avons effectué une analyse chirale sur différentes phases stationnaires chirales ; type pirklé et polysaccharides. Nous avons examiné deux modes : mode inverse (OJ-R, OD-RH) et mode normal (OD et Whelk-01).

De bons résultats ont été obtenus (bonnes résolutions et temps de rétentions acceptables) en utilisant la colonne OJ-R avec l'ibuprofène et le flurbiprofène, alors que pour l'acide mandélique, de bonnes résolutions ont été obtenus avec la colonne OD-RH et des temps de rétentions qui ne dépassent pas 21min.

Les phases mobiles du système chiral sont constituées d'un mélange variable d'eau et d'acétonitrile.

Le couplage HPLC – MS nous a permis d'obtenir les chromatogrammes des ions des composés étudiés en mode électrospray positif et négatif. Les spectres de masses obtenus dans les deux modes ont été étudiés et confirment la pureté et la stabilité des étalons en question.

Le système d'analyse utilisé est stable, performant et compatible.

Les phases stationnaires à base de polysaccharides ont montré leur efficacité dans la séparation des composés étudiés. Cependant, ces phases ne sont pas capables de séparer les trois solutés en utilisant les mêmes conditions (càd, même phase stationnaire, même phase mobile...). Dans le but de réaliser des séparations de plusieurs composés dans les mêmes conditions, nous étudierons dans la partie B la séparation de quelques composés acides chiraux de la famille des anti-inflammatoires non stéroïdiens en utilisant une colonne chirale préparée au laboratoire à base d'un glycopeptide macrocyclique antibiotique (la vancomycine), et en utilisant la même phase mobile ainsi que les mêmes autres conditions opératoires.

PARTIE B

SEPARATION DE QUELQUES PROFÈNES PAR HPLC EN UTILISANT LA VANCOMYCINE COMME PHASE STATIONNAIRE CHIRALE PRÉPARÉE AU LABORATOIRE

I Introduction

Les acides 2-aryl-propioniques ou profènes appartiennent à la famille thérapeutique des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Ces derniers sont des médicaments qui ont des propriétés analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires. Ces dernières années, les profènes ont dominé cette classe thérapeutique. L'ibuprofène par exemple, est utilisé pour traiter l'arthrite, céphalées, etc...

Les profènes disposent d'un carbone asymétrique attaché à une fonction acide carboxylique, un méthyle et un groupe aryle de différentes structures.

Habituellement, les énantiomères des médicaments racémiques montrent différents effets pharmacologiques. Ainsi, un énantiomère peut être l'agent efficace tandis que l'autre isomère est probablement inactif ou même toxique. Les conséquences de chiralité peuvent s'étendre aux métabolismes des médicaments et à l'interconversion énantiomérique, où un énantiomère est converti en un autre *in vivo*. Ainsi, les acides 2-aryl-propioniques constituent un exemple illustrant. Lorsque le médicament R-ibuprofène a été administré à l'homme, il y avait une apparition rapide du S-ibuprofène dans le sang [151-154].

Ces conséquences de chiralité ont poussé les chercheurs à intensifier les études dans le domaine de la synthèse stéréosélective, de la catalyse chirale, ainsi que dans différentes techniques de séparations chirales. D'autre part, en ce qui concerne la fabrication de médicaments chiraux, il est très important d'examiner la pureté chirale lorsqu'un seul énantiomère doit être utilisé. Il est donc important lors des premiers essais d'un médicament, d'être en mesure d'isoler et de séparer les énantiomères, afin d'évaluer qui est responsable de l'activité, la toxicité et / ou des effets secondaires indésirables.

La chromatographie liquide à haute performance chirale est devenue très populaire vu qu'elle implique l'utilisation d'un sélecteur chiral soit chimiquement lié à la phase stationnaire, ou ajouté à la phase mobile. Dans les deux cas il y a formation de complexes diastéréoisomères réversibles avec les énantiomères du soluté. Les résultats de la séparation résultent de la différence de stabilité entre les complexes et, par conséquent conduit à une différence dans les temps de rétentions.

Actuellement, de nombreuses phases stationnaires chirales pour HPLC ont été décrites dans la littérature, qui se sont révélées être efficaces pour la séparation des énantiomères des médicaments et d'autres composés [4, 14, 19, 155-170]. Cependant, il n'existe pas actuellement de phase stationnaire chirale en HPLC qui est capable de séparer toutes les classes de médicaments, de sorte que les analystes doivent choisir une phase pratique pour une séparation particulière parmi une grande sélection de phases stationnaires chirales.

Depuis l'introduction des antibiotiques macrocycliques comme sélecteurs chiraux par Armstrong et col. en 1994 [14], ces composés, en particulier la vancomycine, la teicoplanine et la ristocétine A, ont servi de phases stationnaires chirales pour une large gamme de médicaments. L'énantiosélectivité élevée de ces composés peut être attribuée à leur capacité à former diverses interactions, par exemple : formation de complexes d'inclusions, liaisons hydrogènes, électrostatiques, interactions π - π , etc.

La vancomycine a été utilisée comme additif chiral dans la phase mobile en chromatographie liquide capillaire pour la séparation des énantiomères de sept anti-inflammatoires non stéroïdiens racémiques, et certains de ces médicaments ont été séparés avec succès [171]. Cependant, il s'est avéré difficile de séparer à l'aide d'une phase stationnaire chirale à base de vancomycine, la majorité des dérivés de profènes en utilisant une phase mobile unique [165, 171].

Dans ce travail, nous avons préparé une phase stationnaire chirale à base de la vancomycine, selon le mode opératoire utilisé par Svensson et col. [172, 173], afin de séparer six anti-inflammatoires non stéroïdiens de type profen par HPLC.

La vancomycine est un antibiotique de la famille des glycopeptides, tricyclique utilisée dans le traitement des infections à bactéries Gram positives en inhibant la biosynthèse des mucopeptides.

La vancomycine possède six valeurs de pKa : 2,18 ; 7,75 ; 8,89 ; 9,59 ; 10,4 et 12,0 [174, 175], 18 centres chiraux, trois cavités et cinq cycles aromatiques dans la partie aglycone qui porte deux unités de sucre. La molécule a un poids moléculaire de 1449 et contient un groupe carboxylique, neuf groupes hydroxyle, sept groupes amides et deux groupes amines [176]. Les groupes fonctionnels responsables de ces valeurs de pKa sont présentés dans la figure 36.

La solubilité de la vancomycine dans l'eau distillée est de 148 mg/ml. Des études réalisées par la FDA montrent que sa solubilité augmente de 140 à 196 mg/ml en passant de pH 1 à 3, puis

diminue jusqu'à 2,9 à pH 4, ensuite la solubilité augmente jusqu'à 17,5 mg/ml à pH 7,5. La colonne Chirobiotic V commercialisée à base de la vancomycine est décrite par les fabricants comme étant stable dans la zone de pH allant de 3,5 à 7.

Les six profènes étudiés sont : le kétoprofène, l'indoprofène, l'ibuprofène, le fénoprofène, le flurbiprofène et le carprofène. La figure 37 montre les structures et les valeurs de pKa des différents profènes utilisés. Les constituants de la phase mobile : modificateurs organiques, pH et la concentration de tampon ont tous été étudiés.

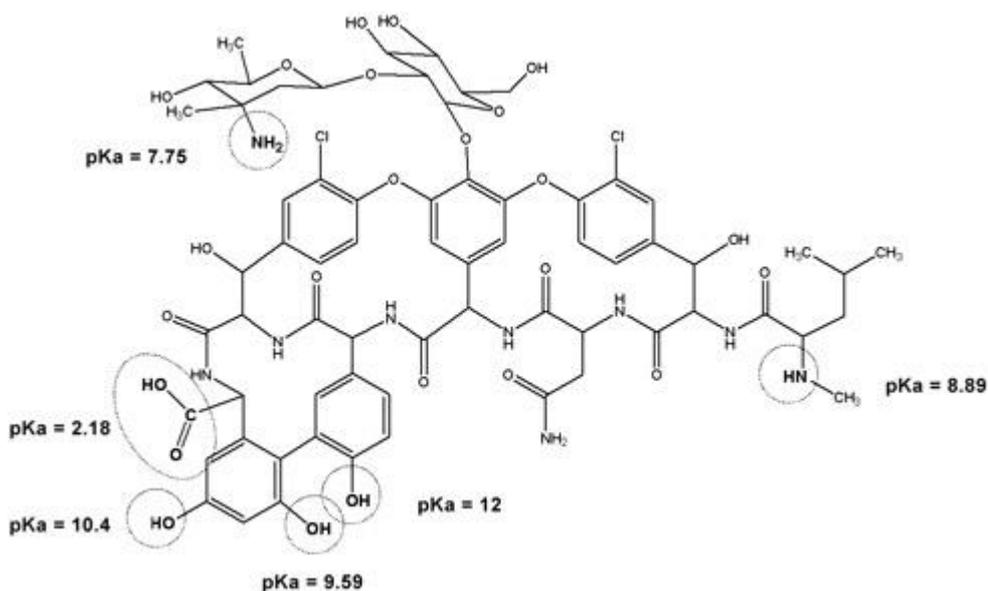


Figure 36. Structure et valeurs de pka de la vancomycine

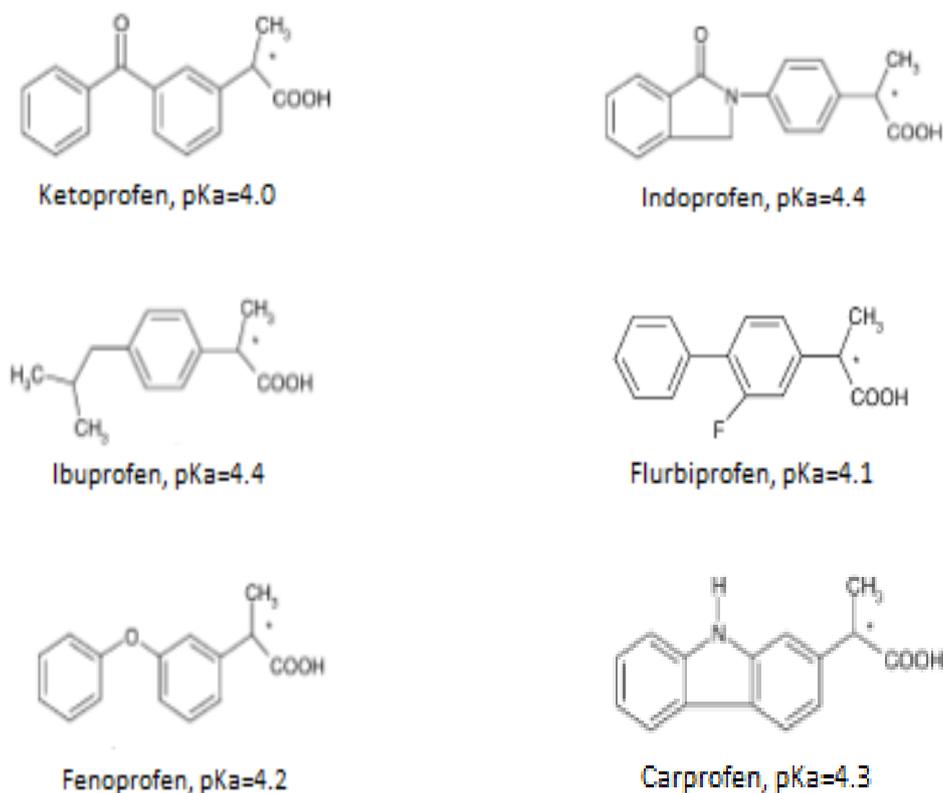


Figure 37. Structures et valeurs de pKa des six profènes

II. Appareillage, produits chimiques et méthodes

II.1 Appareillage

Les expériences sur HPLC ont été réalisées à l'aide d'un système composé de :

- Une pompe (L-6200, VWR International Darmstadt, Germany)
- Un injecteur automatique (AS-2000A, VWR International Darmstadt, Germany)
- Un détecteur UV- visible (L-4250, VWR International Darmstadt, Germany)
- Une colonne chirale préparée au laboratoire à base de vancomycine
- un ordinateur équipé d'un logiciel Ezchrom

II.2 Produits chimiques

1) Solvants organiques

Tous les solvants sont de qualité HPLC. Le méthanol nous a été fourni par Sigma-Aldrich (France), l'acétonitrile par Merck KgaA (Germany), le tétrahydrofurane par Prolabo

(France), le 2-propanol par BDH Laboratory Supplies (England), la triéthylamine par Fluka Analytical (Belgium), l'eau pour HPLC par SDS (France) et l'acide acétique glacial (HOAc) par Carlo Erba Reagents (France).

2) *Solutés et réactifs*

Le nitrate d'ammonium (NH_4NO_3 , $\geq 99.5\%$) nous a été attribué par Sigma-Aldrich (France). Le dihydrogénophosphate de sodium monohydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), l'hydrogénophosphate de sodium anhydre (Na_2HPO_4) et le phosphate de sodium dodécahydraté ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) nous ont été fournis par VWR international (Germany).

L'hydrochlorure de vancomycine ainsi que tous les profènes ont été achetés de Sigma-Aldrich (France).

La colonne Lichrospher 100 DIOL (150 x 3mm .I.D.), 5 μm , nous a été fourni par VWR international (France).

II.3 Conditions opératoires

Les solutions tampons ont été préparées avec des concentrations spécifiques de sel (et de TEA dans certaines phases mobiles). Le pH a été contrôlé avec de l'acide acétique glacial avant l'addition du modificateur organique.

Toutes les expériences ont été réalisées en mode isocratique, à environ 25°C avec un débit de 0,6 ml / min.

II.4 Préparation des échantillons

Les échantillons à analyser sont dissous dans un mélange de solvants de l'éluant étudié, puis dégazés par ultrasons.

III. Recherche des conditions optimales

Le but de ces expériences est de trouver une méthode appropriée pour la séparation des profènes en utilisant une phase stationnaire chirale à base de la vancomycine (préparée au laboratoire).

Afin de trouver les conditions optimales pour la séparation des profènes, les paramètres de la phase mobile, comprenant la concentration du tampon, le pH et les effets des modificateurs

organiques ont été étudiées pour contrôler le facteur de rétention (k), la sélectivité (α) et la résolution des énantiomères (R_s).

III.1 Choix de la longueur d'onde maximale (λ_{\max})

Les analyses ont été effectuées avec un détecteur UV-visible. Tous les profènes présentent une absorption à la longueur 254 nm. Cette longueur d'onde s'est avérée convenable pour nos analyses.

I.2 Choix de la phase mobile

La phase mobile joue un rôle primordial dans le mécanisme de séparation en chromatographie à polarité de phase inversée.

Dans ce type de chromatographie, la rétention du soluté dépend du degré d'ionisation de celui-ci, donc du pH, de la nature et quantité du solvant organique utilisé et de la force ionique due au tampon. Lors de notre étude, nous avons étudié l'influence de chacun de ces facteurs.

1) Effet du pH du tampon

L'effet du pH de la phase mobile aqueuse sur la rétention et l'énantioséparation est fondamental car l'ionisation des analytes acides (profènes) et du sélecteur chiral (vancomycine) peut être contrôlée en fonction de ce paramètre. La colonne Chirobiotic V commercialisée à base de la vancomycine présente une stabilité entre pH 3,5 et 7. Les valeurs des pKa des profènes sont comprises entre 4 et 4,4 (Figure 37) conduisant à des espèces de charges négatives à un pH de 5. Pour suivre l'évolution de la rétention, la sélectivité et la résolution en fonction du pH, nous avons travaillé dans un intervalle de pH allant de 4 à 6.

2) Effet de la concentration du tampon

Une fois que le pH a été sélectionné, nous avons tamponné la phase mobile avec le nitrate d'ammonium ensuite le pH est ajusté par addition d'acide acétique glacial. Pour voir l'évolution de la rétention, la sélectivité et la résolution en fonction de la concentration du tampon, nous avons fait varier la concentration du nitrate d'ammonium dans l'intervalle 30 à 100mM. Plusieurs essais ont été effectués en utilisant des tampons composés de différentes concentrations des sels de phosphate.

3) *Effet du modificateur organique*

Le solvant de base étant l'eau, la rétention et l'énantioséparation des solutés impliquent la nature et le pourcentage du modificateur organique associé. Nous avons travaillé avec les solvants organiques : ACN, MeOH, THF et 2-PrOH.

Une fois que les paramètres précédents ont été sélectionnés, l'effet du pourcentage de chacun de ces modificateurs organiques a été étudié. Il a été constaté en examinant à chaque fois les temps de rétention que la force d'éluion du méthanol est plus faible que celle des autres modificateurs organiques. Le méthanol a été testé aux pourcentages de 40 et 50, alors que les autres modificateurs organiques ont été testés aux pourcentages 20, 25 et 30.

4) *Effet de la triéthylamine*

L'addition d'une amine à la phase mobile a été signalée dans plusieurs publications dans le sens où elle améliore la forme du pic. La triéthylamine et la diméthylamine ont été largement utilisées dans plusieurs systèmes chromatographiques, et il a été montré qu'elles entraînent des modifications dans les temps de rétentions et la forme des pics des solutés.

Afin d'évaluer l'effet de la TEA sur la rétention, la résolution et sur la forme du pic, nous avons examiné les pourcentages de 0,1 à 1% de TEA, dans certaines phases mobiles étudiées précédemment, nous avons ensuite fixé le pourcentage à 0,1% et nous avons comparé les résultats avec ceux obtenus sans TEA.

IV. Préparation de la colonne au laboratoire

La colonne chirale a été synthétisée en utilisant une colonne Lichrospher 100 DIOL selon le mode opératoire décrit précédemment par Svensson et al [172, 173]. La phase stationnaire de silice fonctionnalisée diol a une couverture de la surface de $3,87 \mu\text{mol} / \text{m}^2$ et une surface spécifique de $350 \text{ m}^2 / \text{g}$. La phase stationnaire a été modifiée avec une solution à 70 mM de périodate de sodium dans une solution, H₂O/MeOH 80/20 % v/v refroidie à 0 ° C avec un débit de 0,5 ml / min pendant 4 heures, suivie par un rinçage à l'eau. L'immobilisation du sélecteur chiral est effectuée par une amination réductrice avec une solution à 10 mg / ml de chlorhydrate de vancomycine et du cyanoborohydrure de sodium dans 50 mM NaH₂PO₄ à pH 7 pendant 12 heures. Enfin, la phase stationnaire chirale a été rincée par une solution de nitrate d'ammonium à 50 mM dans H₂O/MeOH (60/40 % v/v) pendant 1 heure.

V. Résultats et discussion

Lors de la préparation de la colonne chirale, l'un ou l'autre des groupes amines présents dans la structure de la vancomycine (Figure 36) peut être impliqué dans l'amination réductrice de l'aldéhyde sur la surface de la silice au cours de l'immobilisation [173].

Il résulte de cela, que la phase stationnaire produite est un mélange de vancomycine liée dans deux positions différentes. La colonne Lichrospher 100 diol, avec la taille des pores de silice de 5 μm , utilisée pour la préparation de la phase stationnaire chirale, possède une grande surface spécifique, ce qui accroît l'immobilisation du sélecteur chiral sur la silice. La colonne préparée a été exploitée, et dans tous les cas, une énantiosélectivité élevée a été obtenue.

Dans nos expériences, et afin d'optimiser l'énantioséparation des solutés, nous avons d'abord évalué les paramètres chromatographiques k , α et R_s en fonction du pH et de la molarité du tampon nitrate d'ammonium en mélange avec du méthanol. Une fois ces deux paramètres ont été sélectionnés, différents modificateurs organiques ont été testés, et tous les paramètres chromatographiques ont été calculés.

1) Influence du pH sur la rétention et l'énantioséparation

Le pH est le facteur le plus déterminant qu'il faut optimiser en premier car dans notre cas, les solutés sont des acides faibles. Il régit essentiellement la rétention et la sélectivité. Le pH étudié est entre 4 et 6.

A partir des valeurs indiquées dans le tableau 1, il apparaît que la reconnaissance chirale fonctionne dans l'intervalle des pH testée. La plupart des composés étudiés ont une bonne énantioséparation entre les valeurs de pH 4 et 6, avec un maximum à pH 5. A cette valeur de pH, le sélecteur chiral possède des charges positives, ce qui lui permet d'interagir de manière électrostatique avec les analytes.

Dans notre cas, le pH influe sur les facteurs de rétention des solutés étudiés. Les temps de rétentions sont raisonnables avec les trois pH testés (ne dépassent pas 14min excepté pour le carprofène et le flurbiprofène), mais une légère rétention (excepté pour le carprofène) se produit à pH 5. En revanche, la plupart des analytes présentent une amélioration dans la sélectivité et la résolution à ce pH comme le montre La figure 38 ; Ce qui laisse présager que les interactions électrostatiques entre le sélecteur chiral et les solutés jouent un rôle important dans la discrimination chirale. Le pH 5 a été choisi.

Les conditions opératoires détaillées (teneur en MeOH, concentration du tampon, etc.) sont décrites sous le tableau 2.

Tableau 2. Effet du pH du tampon sur la rétention et l'énantioseparation

pH		Ketoprofène	Indoprofène	Ibuprofène	Flurbiprofène	Fenoprofène	Carprofène
4	k_1	3.06	3.02	1.71	4.67	3.26	12.54
	k_2	5,07	4,02	2,18	8,42	4,16	15,61
	α	1.66	1.33	1.27	1.80	1.28	1.24
	R_s	2.13	1.01	0.57	2.45	1.08	1.13
5	k_1	3.79	3.75	2.38	6.88	4.43	14.36
	k_2	7,67	6,07	4,14	17,48	7,06	22,48
	α	2.02	1.62	1.74	2.54	1.59	1.57
	R_s	3.62	2.19	1.97	4.1	2.04	1.81
6	k_1	2.63	3.47	2.21	6.45	4.00	16.12
	k_2	4,26	5,08	3,55	15,89	5,89	25,87
	α	1.62	1.46	1.60	2.46	1.47	1.60
	R_s	1.73	1.71	1.42	2.78	1.79	1.84

k_1, k_2 : les facteurs de rétentions du premier et du deuxième énantiomère élué

α : la sélectivité, R_s : la résolution.

Autres conditions chromatographiques :

Phase mobile : 50 Mm tampon nitrate d'ammonium : MeOH (60 :40, v/v%)

Débit : 0.6 ml/min, détection UV 254 nm.

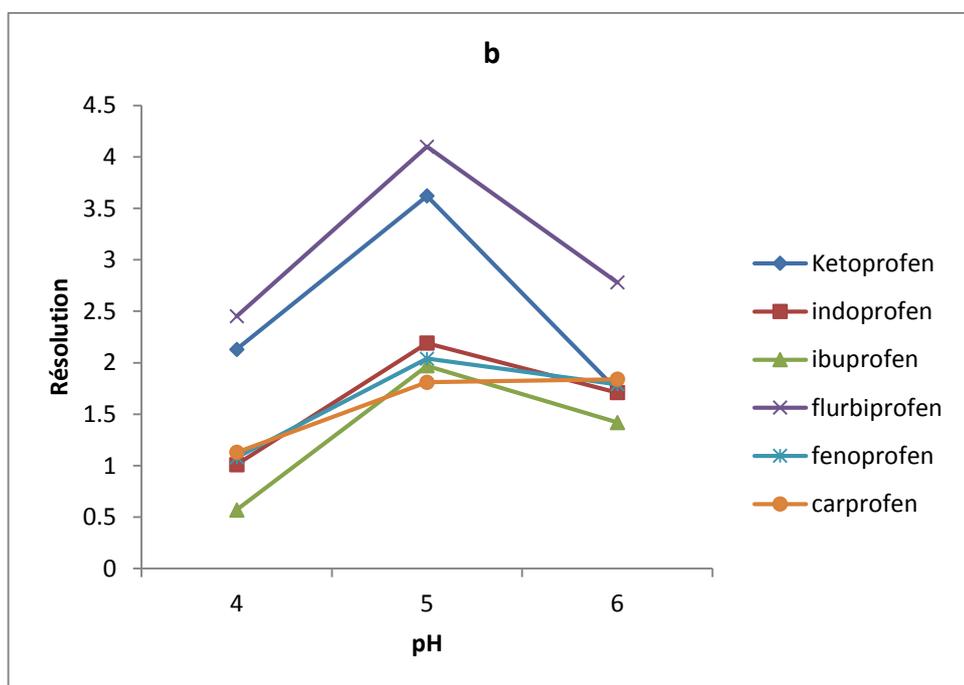
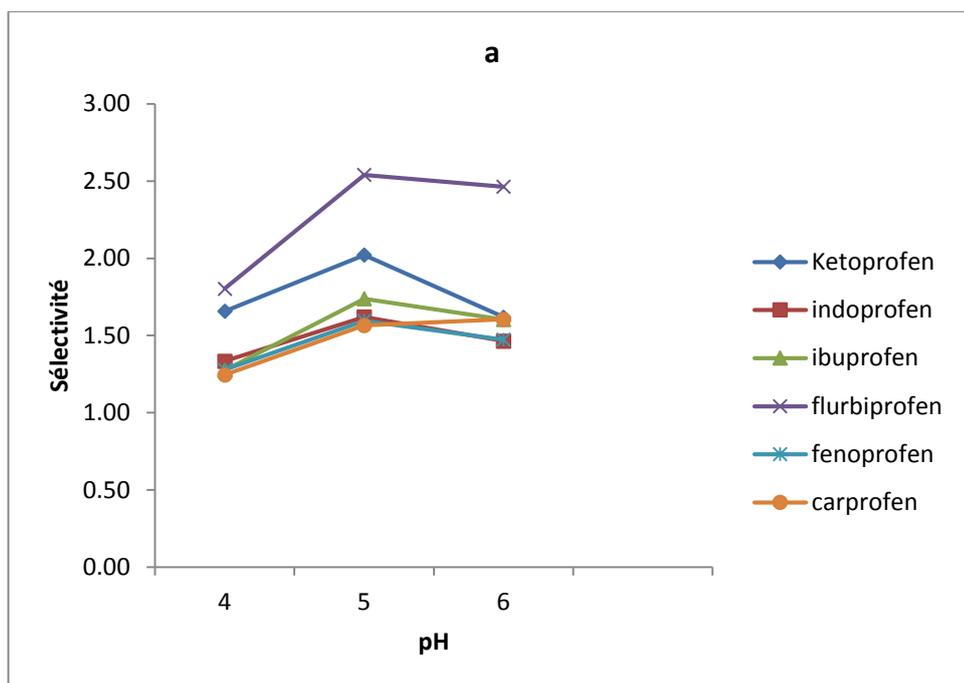


Figure 38. Effet du pH du tampon sur : a) la sélectivité b) la résolution des six profènes.

2) Influence de la concentration du tampon sur la rétention et l'énantioséparation

Une gamme de concentrations du tampon à base de nitrate d'ammonium allant de 30 à 100 mM a été étudiée. Tous les profènes ont été séparés dans cette gamme de concentrations. Dans notre cas, une augmentation de la concentration du tampon entraîne une diminution de la rétention (Figure 39), mais les valeurs de la sélectivité restent quasi constantes. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3. La plupart des profènes présentent des valeurs maximales de résolution à la concentration de 50 mM.

Tableau 3. Influence de la molarité du tampon nitrate d'ammonium sur les facteurs de rétentions, la sélectivité et la résolution des énantiomères des profènes

M (mM)		Ketoprofène	indoprofène	ibuprofène	flurbiprofène	fenoprofène	carprofène
100	k_1	2,69	3,08	1,98	5,27	3,54	12,01
	k_2	5,41	5,02	3,41	12,11	5,54	18,33
	α	2,01	1,63	1,72	2,30	1,56	1,53
	R_s	2,57	2,06	1,52	3,23	2,13	1,73
70	k_1	2,98	3,79	2,29	5,82	3,65	13,82
	k_2	6,12	6,19	3,85	14,08	5,74	20,69
	α	2,06	1,64	1,68	2,42	1,57	1,50
	R_s	3,34	2,05	1,84	3,54	2,22	1,81
50	k_1	3,79	3,75	2,38	6,88	4,43	14,36
	k_2	7,67	6,07	4,14	17,48	7,06	22,48
	α	2,02	1,62	1,74	2,54	1,59	1,57
	R_s	3,62	2,19	1,97	4,10	2,04	1,81
30	k_1	5,80	5,66	3,13	10,65	6,12	20,02
	k_2	11,45	9,46	5,23	25,51	9,68	31,46
	α	1,97	1,67	1,67	2,40	1,58	1,57
	R_s	3,00	2,31	1,37	3,08	2,32	1,71

M : molarité du tampon

k_1, k_2 : les facteurs de rétentions du premier et du deuxième énantiomère élué

α : la sélectivité, R_s : la résolution.

Autre conditions chromatographiques :

Phase mobile : tampon nitrate d'ammonium : MeOH (60 :40, v/v%), pH 5.0

Débit : 0.6 ml/min, détection UV 254 nm.

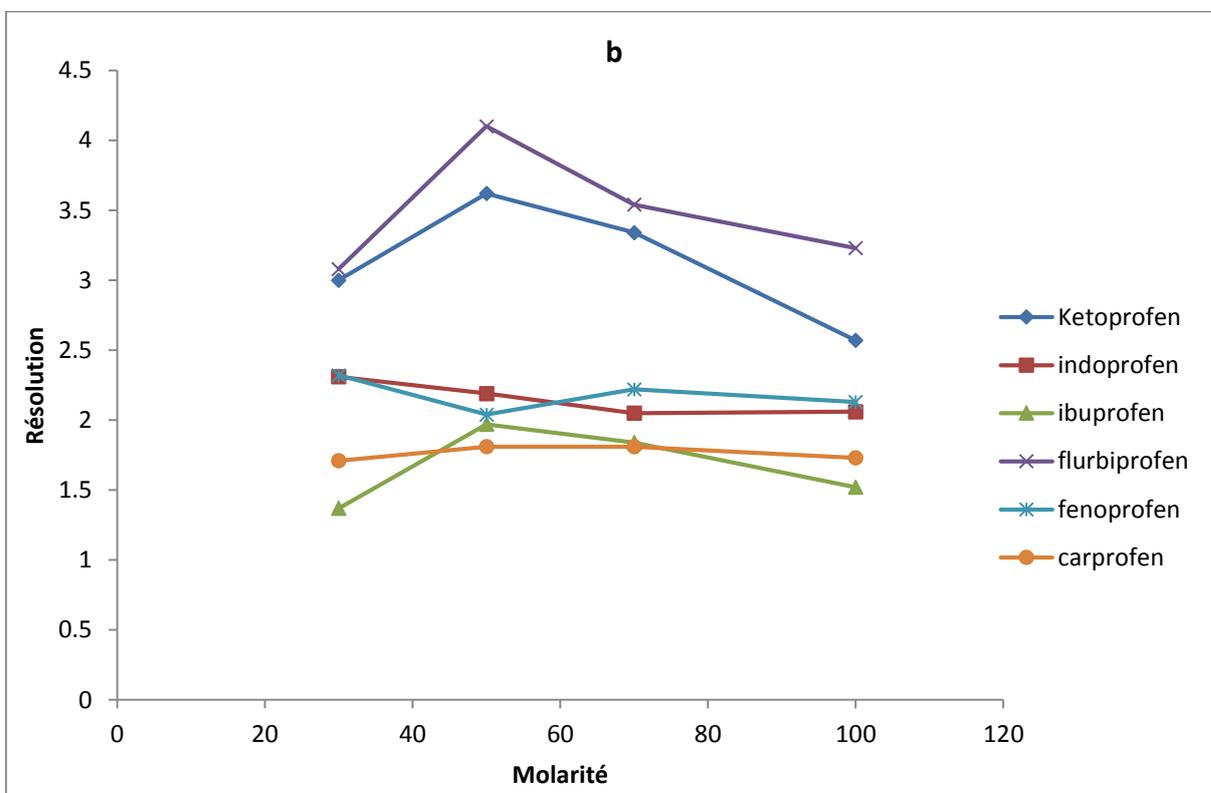
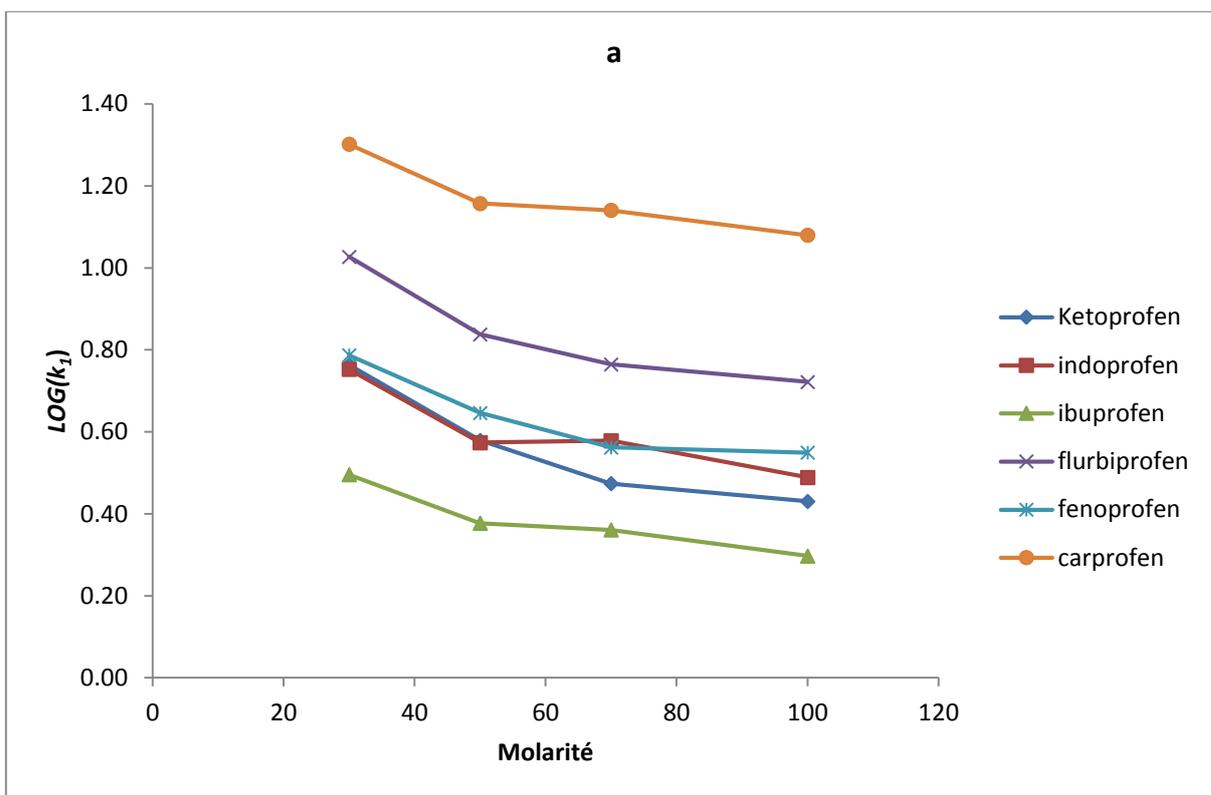


Figure 39. Effet de la molarité du tampon nitrate d'ammonium sur : a) la rétention, b) la résolution des six profènes.

D'après les résultats obtenus, nous avons opté pour une concentration du tampon de 50mM qui semble être la plus adéquate pour des résultats stables et reproductibles, avec des temps de rétentions très corrects.

3) *Influence du modificateur organique sur la rétention et la sélectivité*

En utilisant les conditions chromatographiques optimales déterminées précédemment, quatre modificateurs organiques ont été testés afin d'évaluer leurs effets sur la rétention et l'énantioséparation. Les résultats obtenus montrent que la force éluante du MeOH est plus faible que celle des autres solvants organiques. Le THF et l'ACN ont été testés à des pourcentages de 20, 25 et 30, le 2-PrOH à 25 et 30% alors que les pourcentages du MeOH testés sont de 40 et 50%. Pour tous les solvants organiques testés, la rétention de tous les profènes diminuent avec l'augmentation des teneurs des modificateurs organiques, c'est-à-dire avec la diminution de la polarité de la phase mobile.

a) *Analyse par le tétrahydrofuranne*

Avec les pourcentages du THF testés, tous les énantiomères sont séparés avec succès. Cependant, les temps de rétentions avec 30% de THF sont très courts ; avec 20 et 25%, les temps de rétentions peuvent être considérés comme étant raisonnables à l'exception du carprofène qui a des temps de rétentions relativement longs comme le montre le tableau 4. Les chromatogrammes des six profènes obtenus en utilisant les conditions optimales de pH et de la concentration du tampon avec la phase mobile constituée de 20% de tétrahydrofuranne sont présentés sur la figure 40.

Tableau 4. Variation des facteurs de rétentions, de la sélectivité et de la résolution des énantiomères avec les pourcentages du tétrahydrofurane dans le tampon nitrate d'ammonium (50 Mm, pH 5.0)

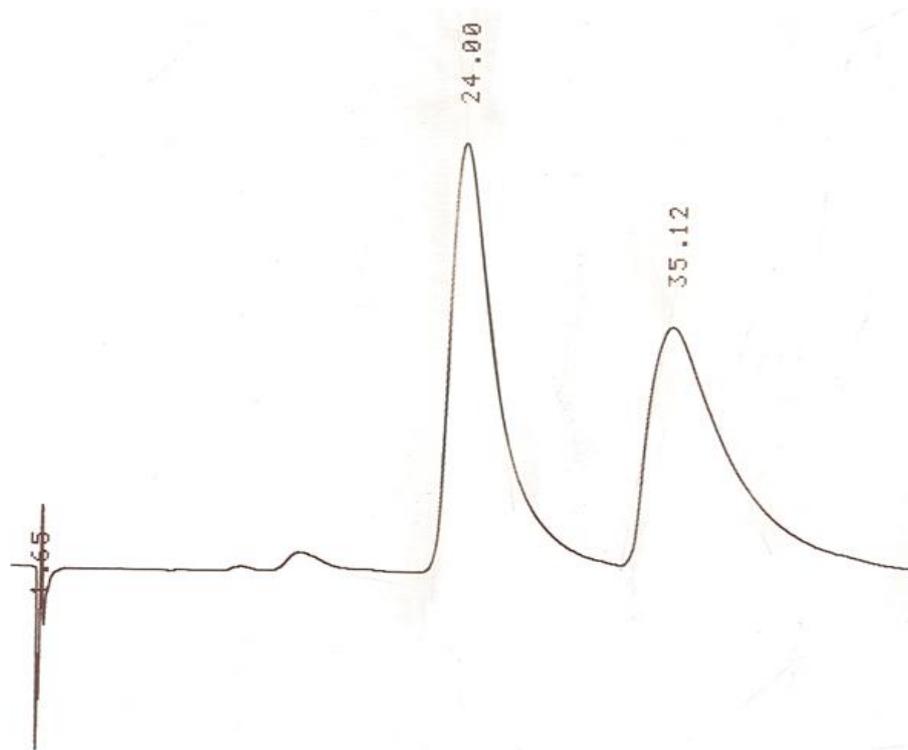
THF %		Ketoprofène	indoprofène	ibuprofène	flurbiprofène	fenoprofène	Carprofène
20	k_1	4,76	4,18	3,51	7,87	5,52	13,12
	k_2	9,32	7,23	5,27	20,55	8,13	19,66
	α	1,96	1,73	1,50	2,61	1,47	1,50
	R_s	2,42	2,35	1,25	3,37	1,71	1,71
25	k_1	3,13	3,05	2,62	4,51	3,77	6,90
	k_2	6,48	7,04	5,48	15,77	6,85	13,61
	α	2,07	2,31	2,09	3,50	1,82	1,97
	R_s	2,19	2,83	1,87	3,01	1,81	1,9
30	k_1	1,78	1,76	1,54	2,41	2,03	2,84
	k_2	3,48	3,99	3,12	8,12	3,41	5,41
	α	1,96	2,26	2,03	3,37	1,68	1,90
	R_s	2,42	2,71	2,24	4,15	1,68	2,19

k_1 et k_2 : les facteurs de rétentions du premier et du deuxième énantiomère élué

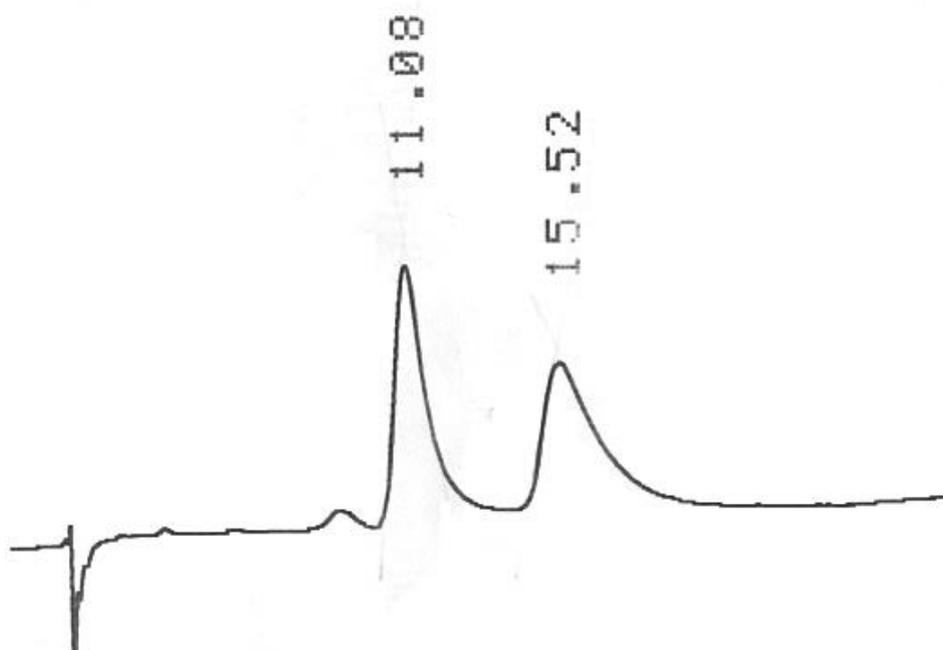
α : la sélectivité, R_s : la résolution.

Autres conditions chromatographiques :

Débit : 0.6 ml/min, détection UV 254 nm.

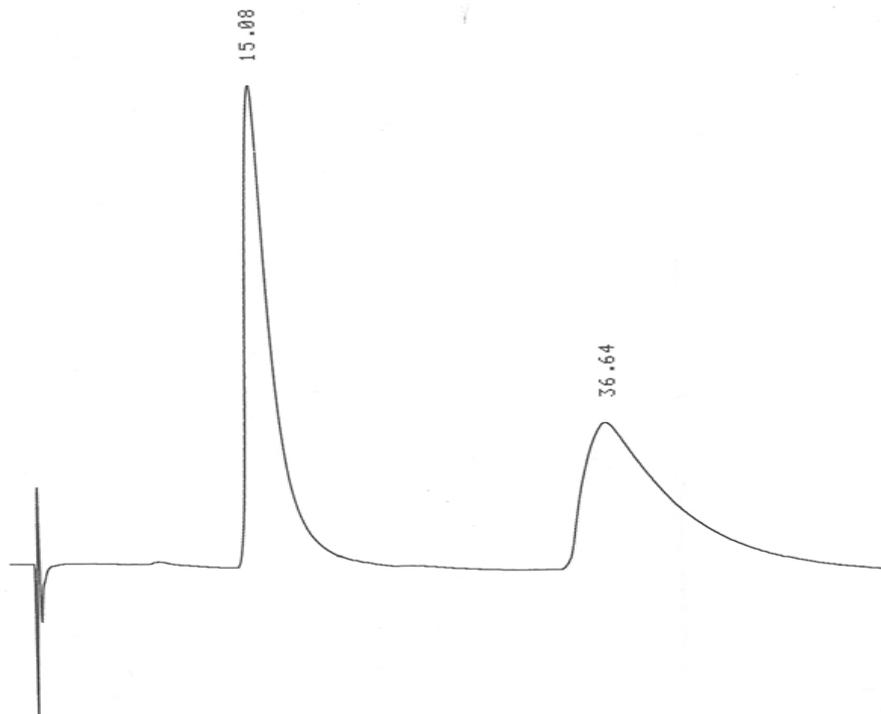


a

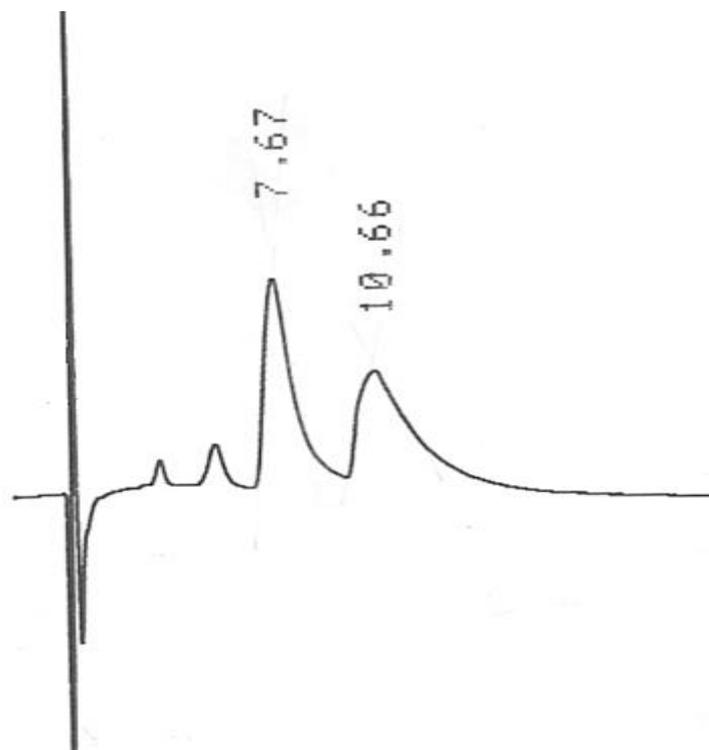


b

Figure 40. Chromatogrammes des profènes dans 50 Mm, pH 5.0 tampon nitrate d'ammonium / THF (80 / 20 % v/v) ; a : carprofène, b : fénoprofène

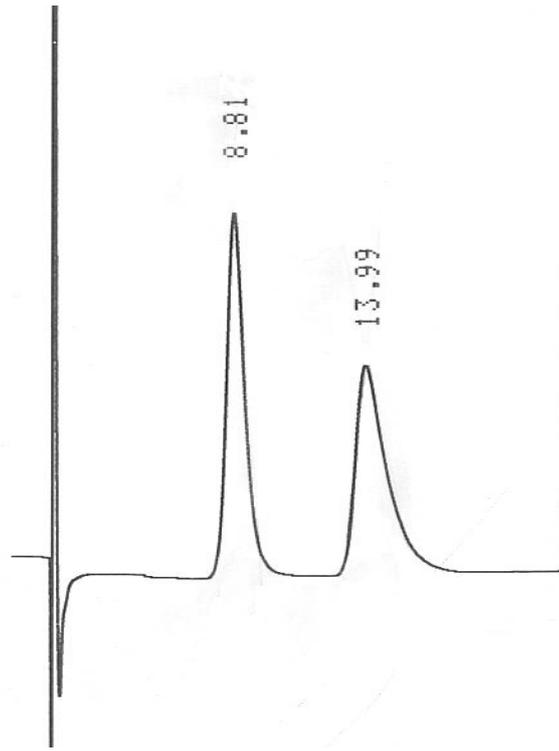


c

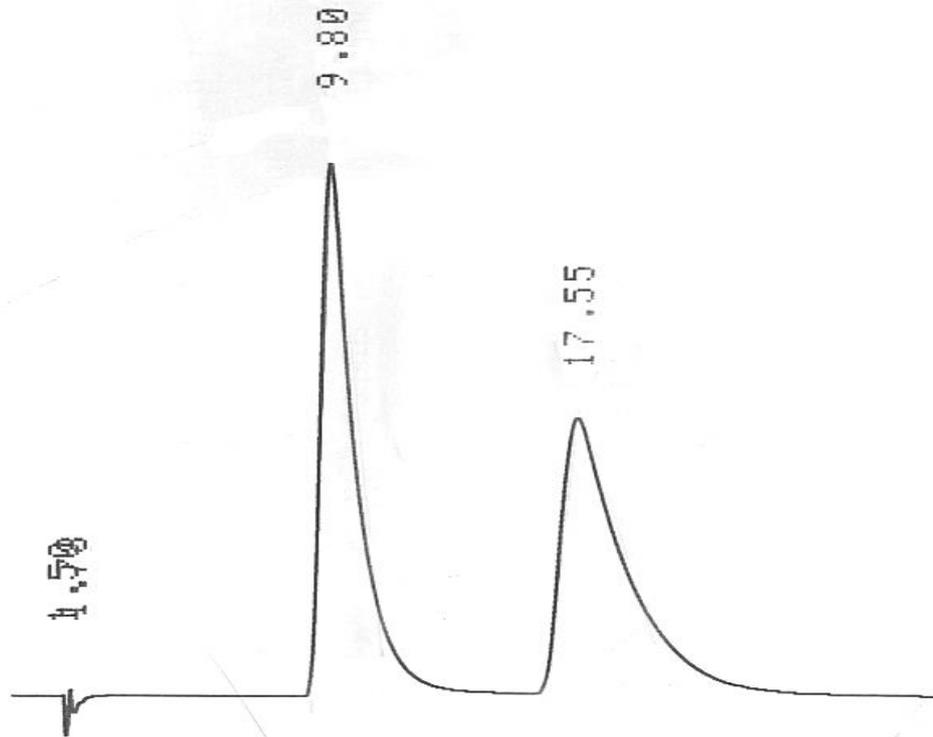


d

Figure 40. (suite) Chromatogrammes des profènes dans 50 Mm, pH 5.0 tampon nitrate d'ammonium / THF (80 / 20 % v/v) ; c : flurbiprofène, d : ibuprofène



e



f

Figure 40. (suite) Chromatogrammes des profènes dans 50 Mm, pH 5.0 tampon nitrate d'ammonium / THF (80 / 20 % v/v) ; e : indoprofène, f : kétoprofène

b) *Analyse par l'acétonitrile*

En passant de 20, 25 à 30% d'acétonitrile, les sélectivités et les résolutions des six profènes diminuent. Avec 20% d'acétonitrile, les énantiomères de tous les solutés présentent de bonnes séparations et des temps de rétentions raisonnables comme on le voit sur les chromatogrammes présentés dans la figure 41.

Les valeurs des facteurs de rétentions, des sélectivités et des résolutions des énantiomères des six profènes sont présentées dans le tableau 5.

Tableau 5. Variation des facteurs de rétentions, de la sélectivité et de la résolution des énantiomères avec les pourcentages de l'acétonitrile dans le tampon nitrate d'ammonium (50 mM, pH 5.0)

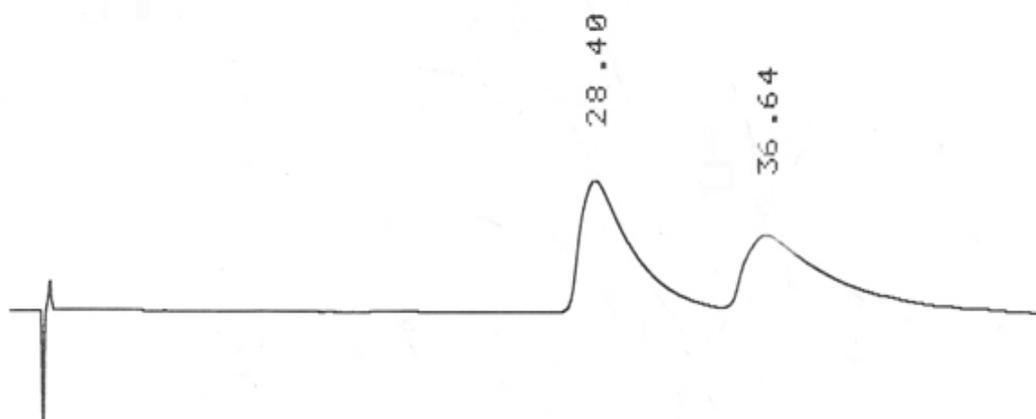
ACN %		Ketoprofène	indoprofène	ibuprofène	flurbiprofène	Fenoprofène	Carprofène
20	k_1	4,04	4,18	4,15	9,56	5,34	15,71
	k_2	6,07	5,52	5,59	16,59	6,92	20,55
	α	1,50	1,32	1,35	1,73	1,30	1,31
	R_s	2,16	1,51	1,22	2,39	1,35	1,37
25	k_1	2,35	2,28	1,96	3,60	2,93	6,93
	k_2	3,35	2,99	2,55	5,89	3,71	8,85
	α	1,43	1,31	1,30	1,64	1,27	1,28
	R_s	1,3	1,21	1	2,17	1,33	1,36
30	k_1	1,49	1,55	1,19	2,09	1,75	3,58
	k_2	2,09	1,99	1,52	3,29	2,17	4,49
	α	1,40	1,28	1,28	1,57	1,24	1,25
	R_s	1,27	0,98	0,88	1,7	0,89	0,97

k_1 et k_2 : les facteurs de rétentions du premier et du deuxième énantiomère élué

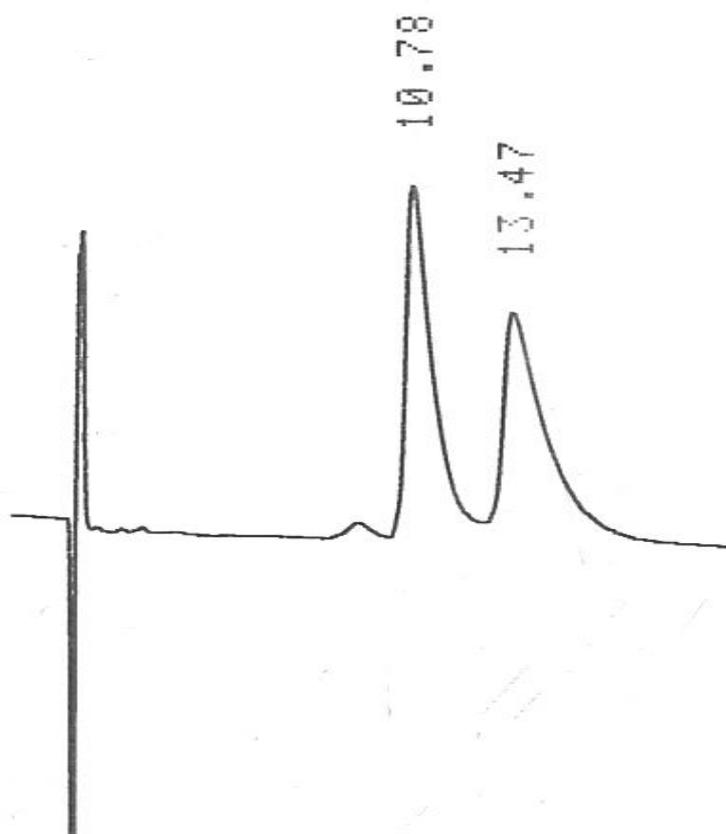
α : la sélectivité, R_s : la résolution.

Autres conditions chromatographiques :

Débit : 0.6 ml/min, détection UV 254 nm.



a



b

Figure 41. Chromatogrammes des profènes dans 50 mM, pH 5.0 tampon nitrate d'ammonium / ACN (80 / 20 % v/v) ; a : carprofène, b : fénoprofène

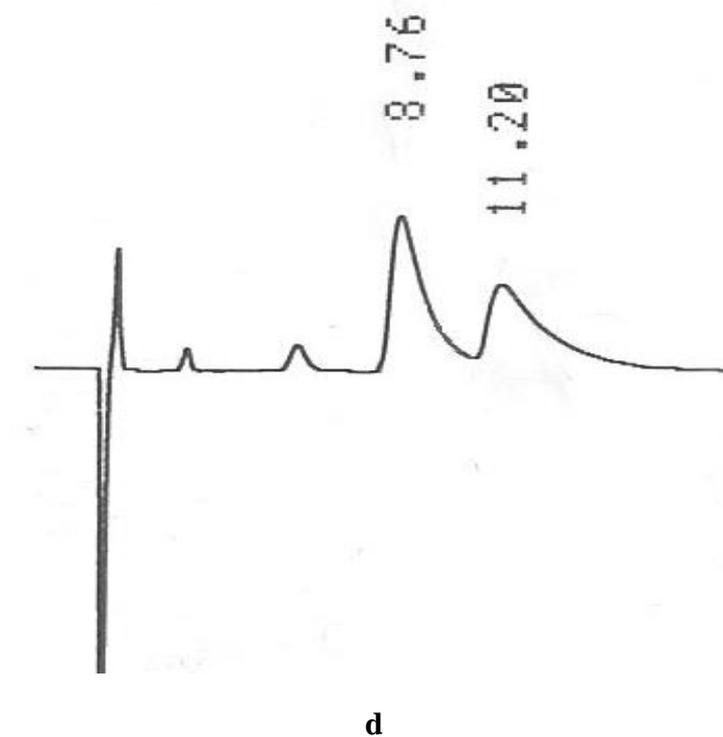
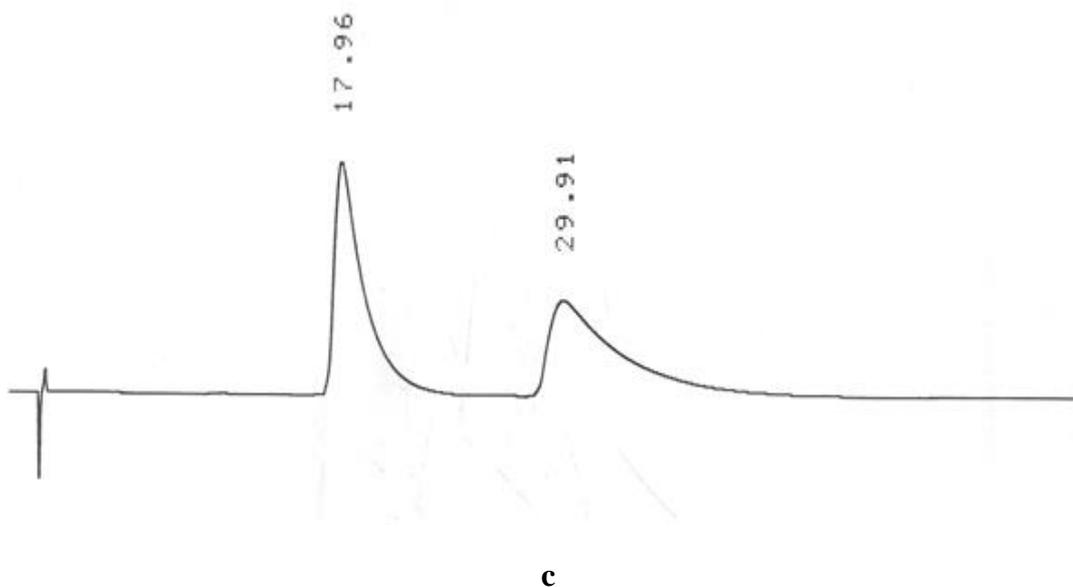
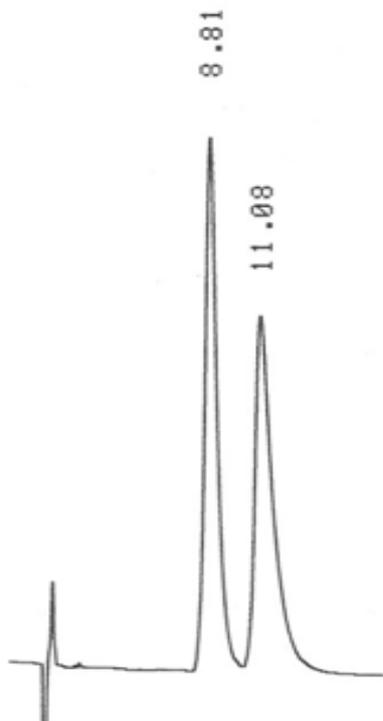
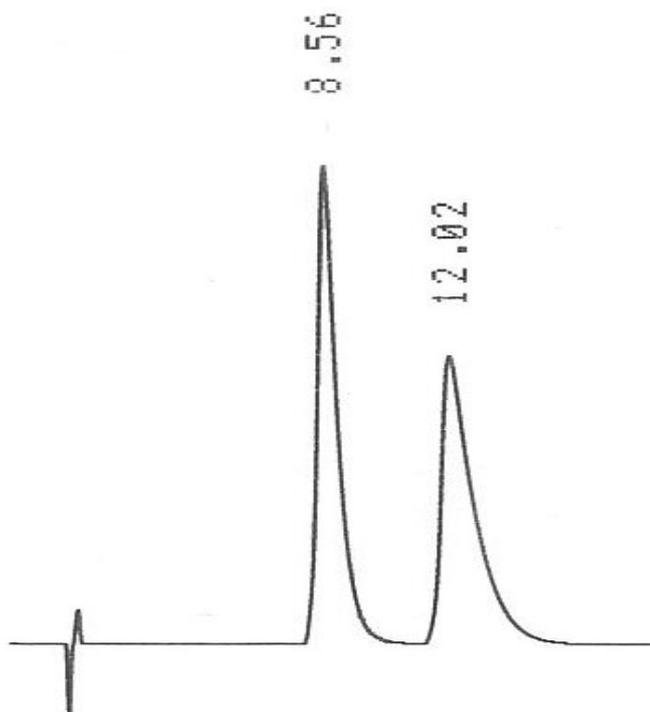


Figure 41. (suite) Chromatogrammes des profènes dans 50 mM, pH 5.0 tampon nitrate d'ammonium / ACN (80 / 20 % v/v) ; c : flurbiprofène, d : ibuprofène



e



f

Figure 41. (suite) Chromatogrammes des profènes dans 50 mM, pH 5.0 tampon nitrate d'ammonium / ACN (80 / 20 % v/v) ; e : indoprofène, f : kétoprofène

c) *Analyse par le 2- propanol*

Deux phases mobiles constituées du tampon nitrate d'ammonium (50mM, pH 5) et d'isopropanol (75/25 et 70/30, v/v) ont été testées. Avec 25% d'isopropanol, la résolution de tous les énantiomères est complète mais les temps de rétentions sont très longs pour la plupart des solutés. Avec 30% d'isopropanol, les énantiomères des six profènes sont séparés avec succès, et les temps de rétentions sont raisonnables. Les résultats obtenus avec ces deux phases mobiles sont regroupés dans le tableau 6.

La figure 42 présente les chromatogrammes de trois profènes (carprofène, flurbiprofène et ibuprofène) dans la phase mobile à 30% d'isopropanol, et la figure 43 montre les chromatogrammes de l'ibuprofène et de l'indoprofène avec la phase mobile constituée de 25% d'isopropanol.

Tableau 6. Variation des facteurs de rétentions, de la sélectivité et de la résolution des énantiomères avec les pourcentages du 2- propanol dans le tampon nitrate d'ammonium (50 mM, pH 5.0)

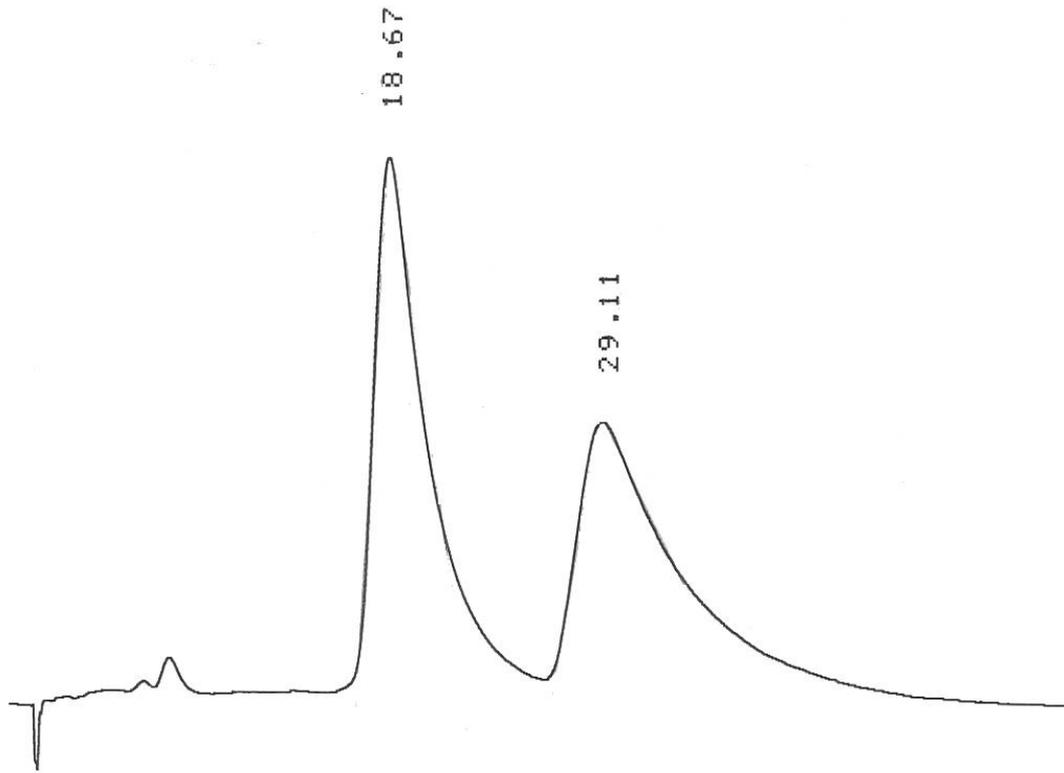
2-PrOH %		Ketoprofen	indoprofen	ibuprofen	flurbiprofen	fenoprofen	carprofen
25	k_1	5,48	6,04	3,54	9,26	7,08	26,03
	k_2	11,11	10,22	5,69	21,62	11,30	43,00
	α	2,03	1,69	1,61	2,34	1,60	1,65
	R_s	2,54	2,09	1,41	2,56	1,88	3,52
30	k_1	4,31	4,39	2,14	5,54	4,32	9,98
	k_2	9,01	7,54	3,47	13,09	7,00	16,12
	α	2,09	1,71	1,62	2,36	1,62	1,62
	R_s	1,45	1,91	1,26	2,47	1,75	2,43

k_1 et k_2 : les facteurs de rétentions du premier et du deuxième énantiomère élué

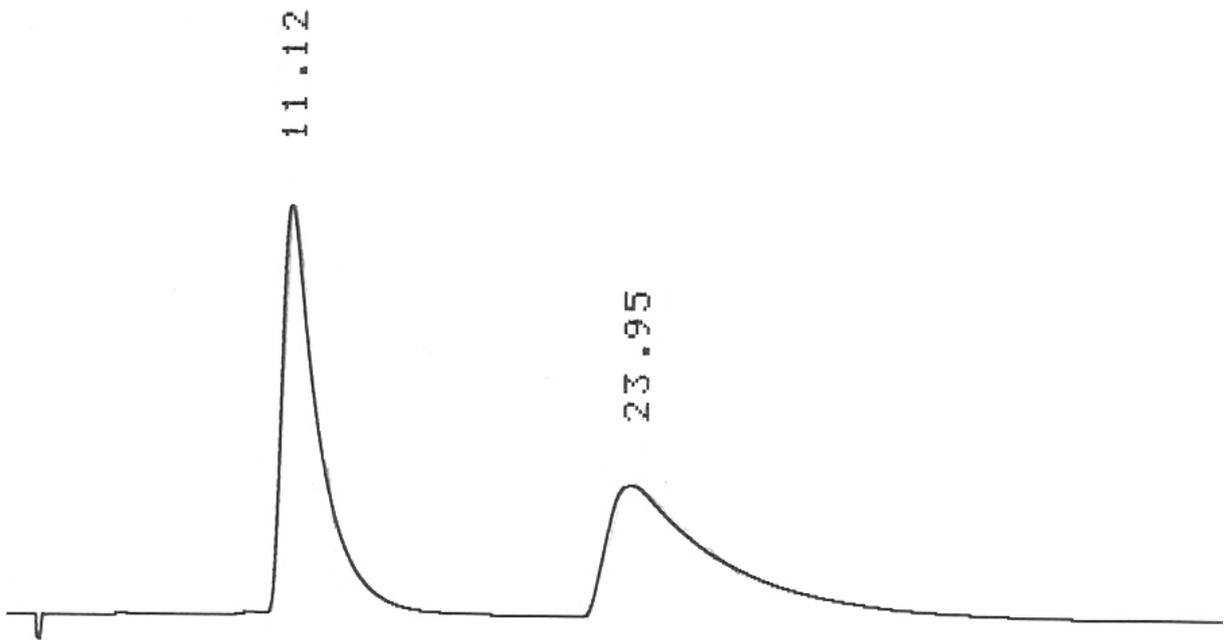
α : la sélectivité, R_s : la résolution.

Autres conditions chromatographiques :

Débit : 0.6 ml/min, détection UV 254 nm.

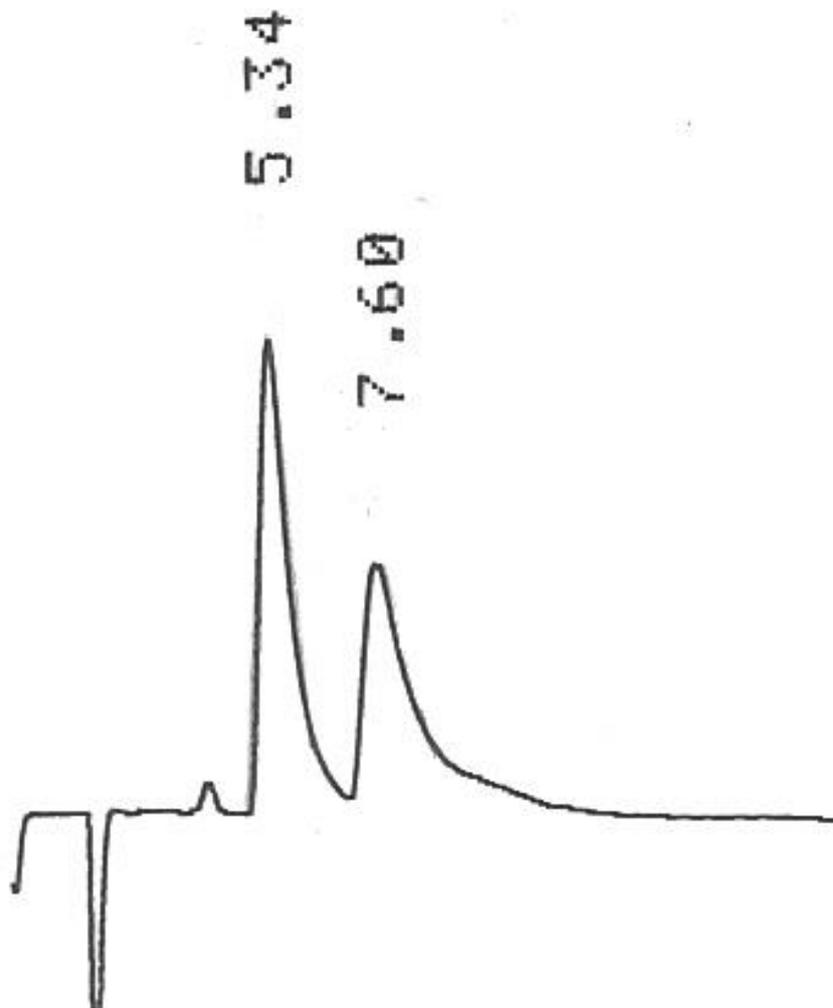


a



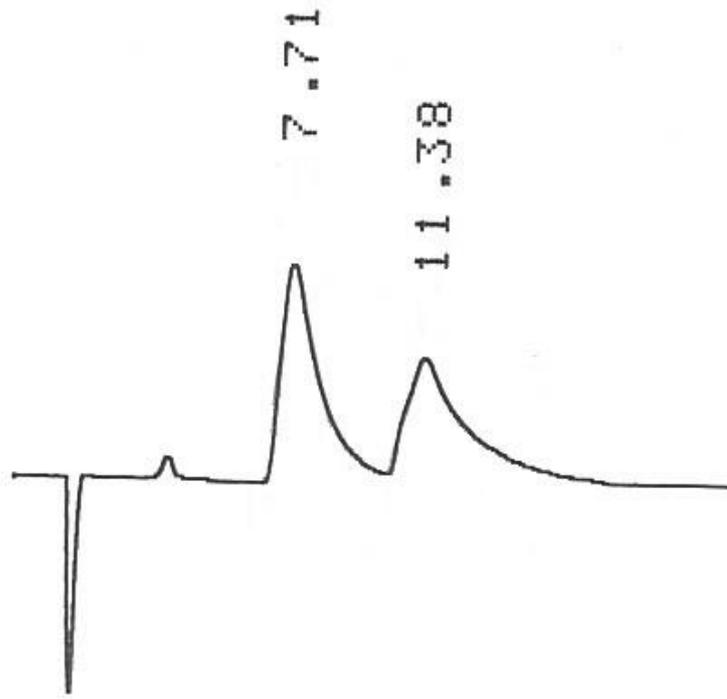
b

Figure 42. Chromatogrammes de : a) carprofène, b) flurbiprofène, dans la phase mobile 50 mM, pH 5.0 tampon nitrate d'ammonium / 2- propanol (70 / 30 % v/v)

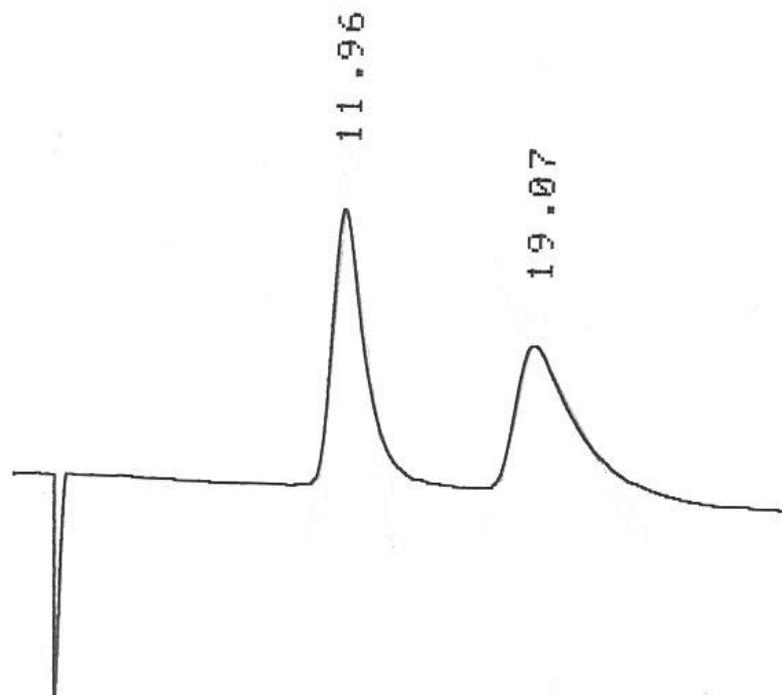


c

Figure 42. (suite) Chromatogramme de : c) ibuprofène, dans la phase mobile : 50 mM, pH 5.0 tampon nitrate d'ammonium / 2- propanol (70 / 30 % v/v)



a



b

Figure 43. Chromatogrammes de : a) ibuprofène, b) indoprofène, dans la phase mobile : 50 mM, pH 5.0 tampon nitrate d'ammonium / 2- propanol (75 / 25 % v/v)

d) *Analyse par le méthanol*

Comme nous l'avons dit précédemment, la force éluante du méthanol est plus faible que celles des autres modificateurs organiques étudiés, ce qui nécessite l'utilisation de phases mobiles avec des pourcentages plus élevés en méthanol. Les deux phases mobiles testées ont permis de séparer les énantiomères de tous les profènes étudiés. Les résultats présentés dans le tableau 7 montrent que la phase mobile constituée de 40% de méthanol donne de meilleurs résultats. A 50% de méthanol, les séparations sont bonnes, mais les temps de rétentions sont très courts pour certains solutés.

La figure 44 présente les chromatogrammes des profènes étudiés dans la phase mobile constituée de 40% de méthanol.

Tableau 7. Variation des facteurs de rétentions, de la sélectivité et de la résolution des énantiomères avec les pourcentages du méthanol dans le tampon nitrate d'ammonium (50 mM, pH 5.0)

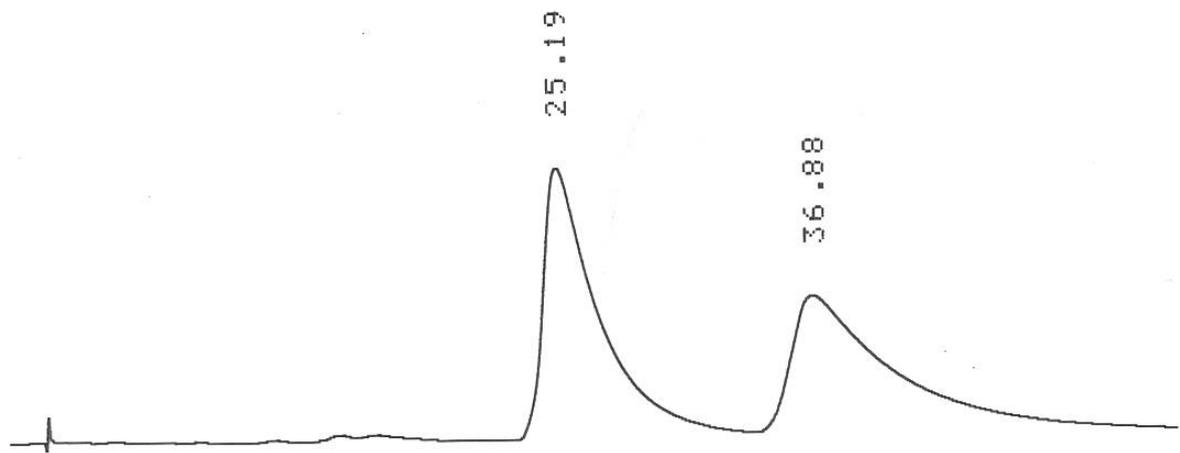
MeOH %		Ketoprofène	indoprofène	ibuprofène	flurbiprofène	fenoprofène	carprofène
40	k_1	3,69	3,79	2,29	5,82	4,71	13,82
	k_2	7,80	6,19	3,85	14,08	7,42	20,69
	α	2,11	1,64	1,68	2,42	1,58	1,50
	R_s	3,34	2,05	1,84	3,54	2,22	1,81
50	k_1	1,68	1,74	1,02	2,40	1,81	4,69
	k_2	3,27	2,80	1,81	5,64	2,82	6,96
	α	1,95	1,61	1,77	2,35	1,56	1,49
	R_s	2,5	1,5	1,31	1,5	1,43	1,48

k_1 et k_2 : les facteurs de rétentions du premier et du deuxième énantiomère élué

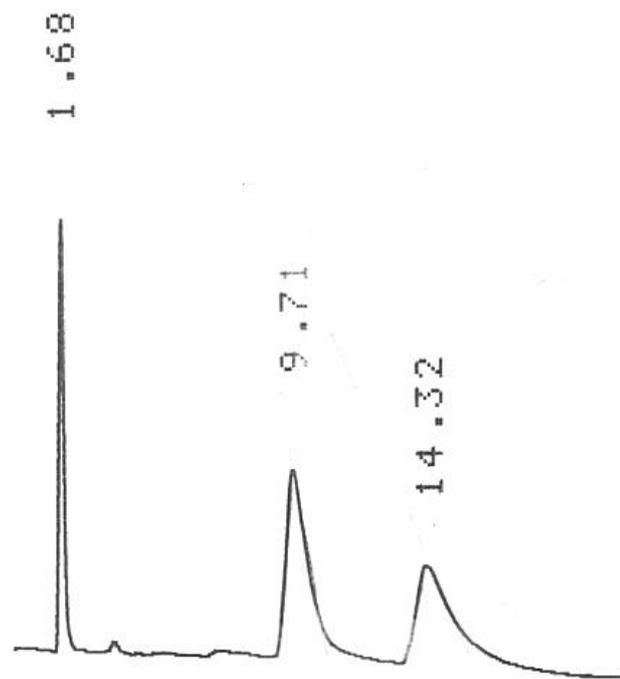
α : la sélectivité, R_s : la résolution.

Autres conditions chromatographiques :

Débit : 0.6 ml/min, détection UV 254 nm.

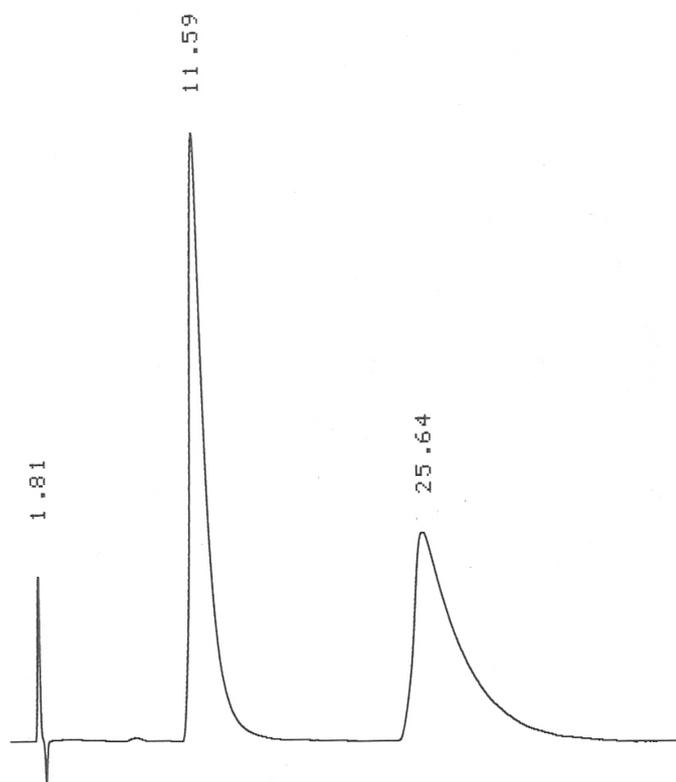


a

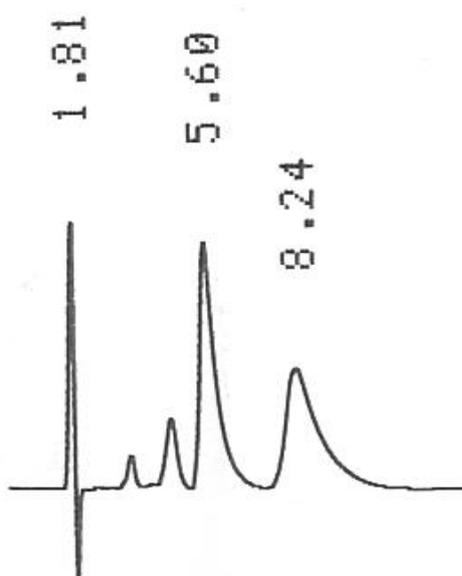


b

Figure 44. Chromatogrammes des profènes dans 50 mM, pH 5.0 tampon nitrate d'ammonium / MeOH (60 / 40 % v/v) ; a : carprofène, b : fénoprofène

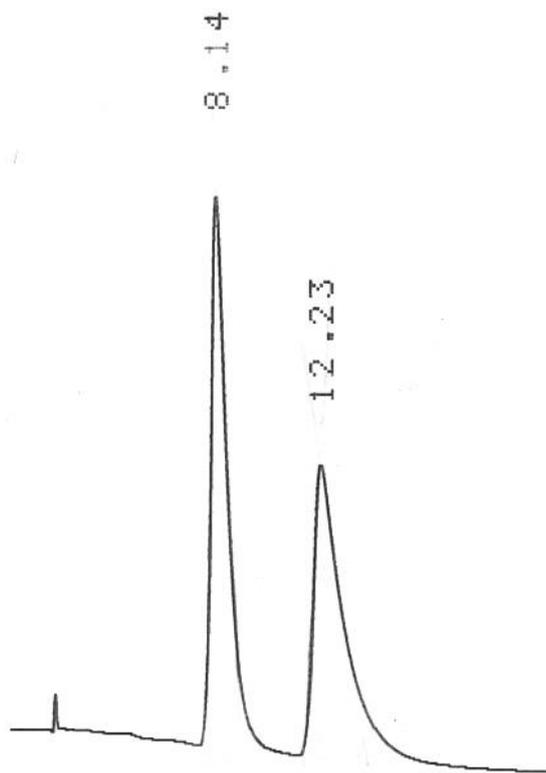


c

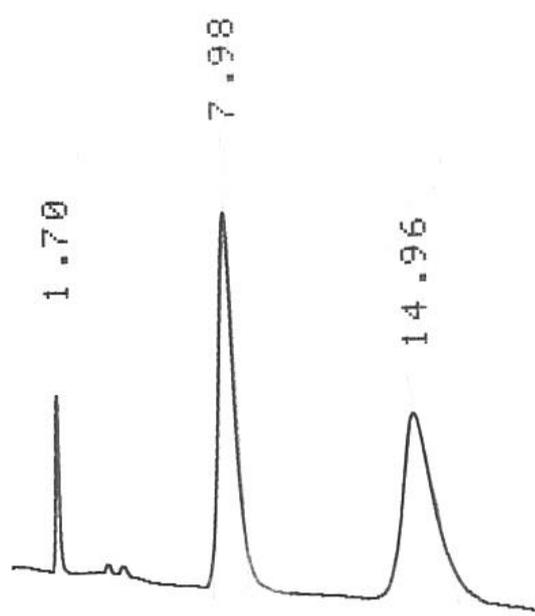


d

Figure 44. (suite) Chromatogrammes des profènes dans 50 mM, pH 5.0 tampon nitrate d'ammonium / MeOH (60 / 40 % v/v) ; c : flurbiprofène, d : ibuprofène



e



f

Figure 44. (suite) Chromatogrammes des profènes dans 50 mM, pH 5.0 tampon nitrate d'ammonium / MeOH (60 / 40 % v/v) ; e : indoprofène, f : kétoprofène

4) Influence de la triéthylamine

L'influence de la triéthylamine sur la rétention et l'énantioséparation a été testée avec deux phases mobiles, l'une est composée de tétrahydrofurane comme modificateur organique et l'autre du 2- propanol.

a) Avec le tétrahydrofurane

Avec cette phase mobile, la TEA entraîne une augmentation des temps de rétentions de la majorité des solutés et une légère amélioration dans la forme des pics ainsi que dans la résolution des énantiomères (Figure 45).

Le tableau 8 rassemble les valeurs des facteurs de rétentions, des sélectivités et des résolutions des six profènes étudiés dans une phase mobile composé de 20% de THF avec et sans TEA.

Tableau 8. Effet de la triéthylamine sur la rétention et l'énantioséparation

THF %		Ketoprofène	indoprofène	ibuprofène	flurbiprofène	fenoprofène	Carprofène
20	k_1	4,76	4,18	3,51	7,87	5,52	13,12
	k_2	9,32	7,23	5,27	20,55	8,13	19,66
	α	1,96	1,73	1,50	2,61	1,47	1,50
	R_s	2,42	2,35	1,25	3,37	1,71	1,71
20*	k_1	4.58	4.25	4.16	8.79	6.34	14.78
	k_2	9,05	8,74	8,05	27,16	10,55	26,15
	α	1.98	2.06	1.94	3.09	1.66	1.77
	R_s	2.92	3.18	1.94	4.46	1.99	2.17

k_1, k_2 : les facteurs de rétentions du premier et du deuxième énantiomère élué

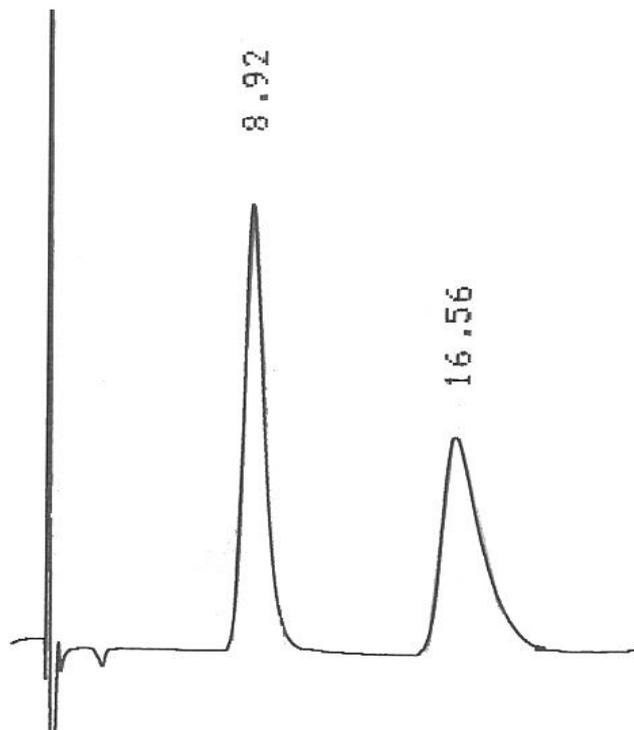
α : la sélectivité, R_s : la résolution.

Autre conditions chromatographiques :

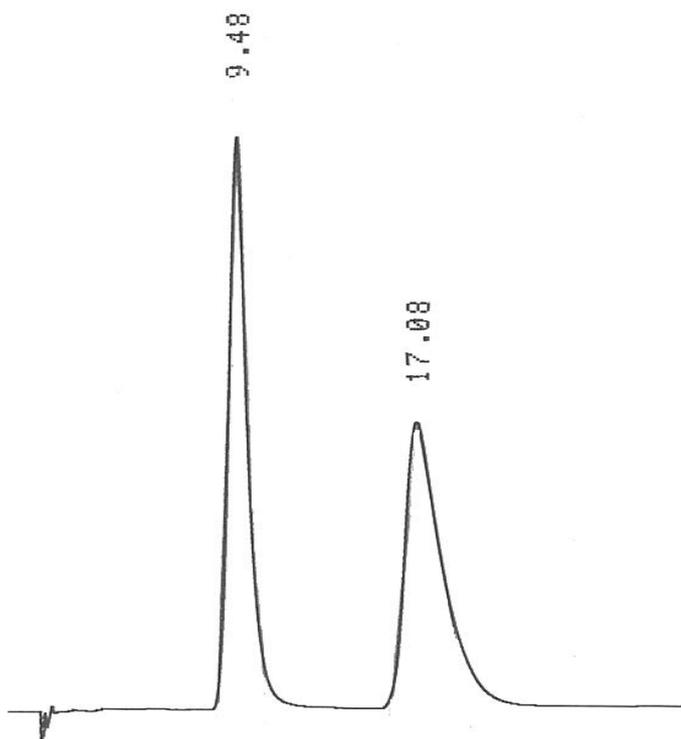
Phase mobile : 50 mM, pH 5, tampon nitrate d'ammonium : THF (80 :20 % v/v)

Débit : 0.6 ml/min, détection UV 254 nm.

*0,1% TEA dans la phase mobile



a



b

Figure 45. Chromatogrammes de : a) indoprofène, b) kétoprofène dans la phase mobile : 50 mM, pH 5.0 tampon nitrate d'ammonium / THF (80 / 20 % v/v) + 0,1% TEA

Une augmentation des temps de rétentions de tous les profènes, à l'exception du kétoprofène, a été observée lorsqu'on ajoute 0,1% de TEA à la phase mobile constituée de 20% de THF.

b) Avec le 2- propanol

L'influence de l'addition de la triéthylamine sur la rétention et l'énantioséparation a été examinée avec la phase mobile composée de 30% de l'isopropanol. Nous avons remarqué que les temps de rétentions de tous les solutés ont diminué, en provoquant, d'une manière générale, une amélioration dans les formes des pics et dans les résolutions (Figure 46). Le tableau 9 montre l'effet de la triéthylamine sur les valeurs des différents paramètres chromatographiques des six profènes analysés. Les résultats obtenus sont comparés avec ceux obtenus dans les mêmes conditions sans triéthylamine.

Tableau 9. Effet de la triéthylamine sur la rétention et l'énantioséparation

2-PrOH %		Ketoprofène	indoprofène	ibuprofène	flurbiprofène	fenoprofène	Carprofène
30	k_1	4,31	4,39	2,14	5,54	4,32	9,98
	k_2	9,01	7,54	3,47	13,09	7,00	16,12
	α	2,09	1,71	1,62	2,36	1,62	1,62
	R_s	1,45	1,91	1,26	2,47	1,75	2,43
30*	k_1	2,78	3,34	1,74	3,95	3,39	7,46
	k_2	5,14	5,37	2,78	8,43	5,09	11,35
	α	1,85	1,61	1,59	2,13	1,50	1,52
	R_s	2,01	1,73	1,26	2,54	2,06	1,5

k_1, k_2 : les facteurs de rétentions du premier et du deuxième énantiomère élué

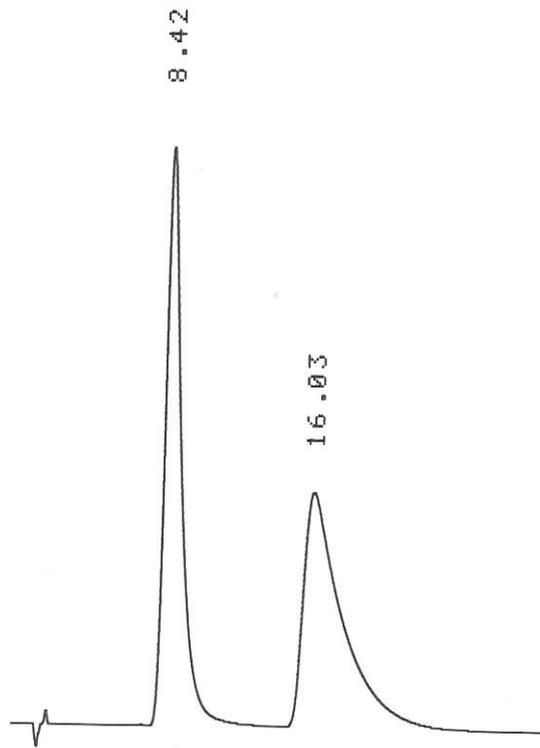
α : la sélectivité, R_s : la résolution.

Autre conditions chromatographiques :

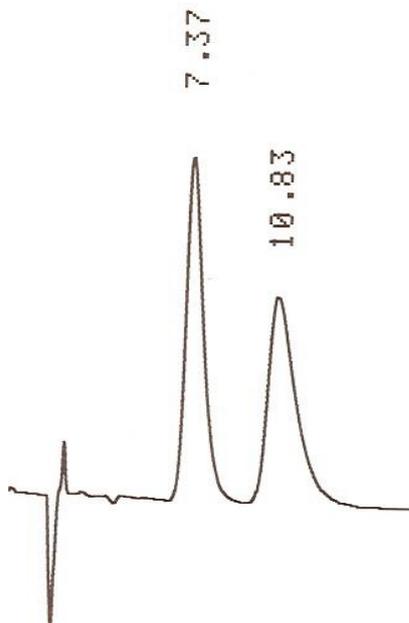
Phase mobile : 50 mM, pH 5, tampon nitrate d'ammonium : 2-PrOH (70 :30 % v/v)

Débit : 0.6 ml/min, détection UV 254 nm.

*0,1% TEA dans la phase mobile



a



b

Figure 46. Chromatogrammes de : a) flurbiprofène, b) indoprofène dans la phase mobile : 50 mM, pH 5.0 tampon nitrate d'ammonium / 2-PrOH (80 / 20 % v/v) + 0,1% TEA

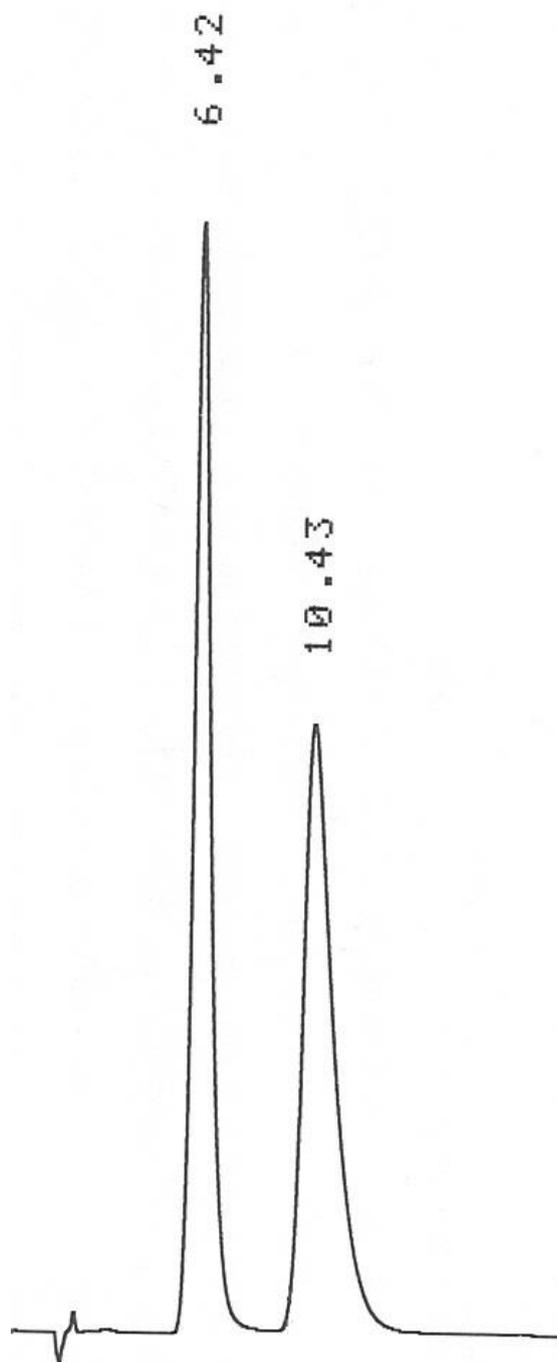


Figure 46. Chromatogramme du kétoprofène dans la phase mobile : 50 mM, pH 5.0 tampon nitrate d'ammonium / 2-PrOH (80 / 20 % v/v) + 0,1% TEA

D'après les résultats obtenus avec les deux modificateurs organiques, on constate que l'addition de la triéthylamine à la phase mobile a un effet remarquable sur la rétention et la résolution des énantiomères, cependant, son effet sur la rétention est irrégulier. Avec le THF, il entraîne une augmentation des temps de rétentions des solutés, alors qu'avec le 2- propanol, il provoque une diminution.

5) Influence du tampon phosphate

Les expériences réalisées précédemment avec le tampon nitrate d'ammonium nous ont permis d'obtenir des résolutions complètes des racémiques étudiés avec toutes les phases mobiles utilisées. Cependant les temps de rétentions de certains solutés (en particulier le carprofène et le flurbiprofène) sont relativement longs. Dans le but d'améliorer à la fois les résolutions et les temps de rétentions, nous avons examiné l'effet du tampon phosphate avec le méthanol. Dans un premier temps, nous avons commencé notre étude en utilisant un tampon phosphate préparé à partir d'un sel de dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4) avec les valeurs optimales de pH et concentrations du sel trouvées précédemment et 40% de méthanol. Les temps de rétentions trouvés avec cette phase mobile sont relativement longs, nous avons donc opté pour un pourcentage de 50% qui donne des bonnes résolutions et des temps de rétention plus raisonnables (Figure 47). Les résultats de ces expériences sont réunis dans le tableau 10.

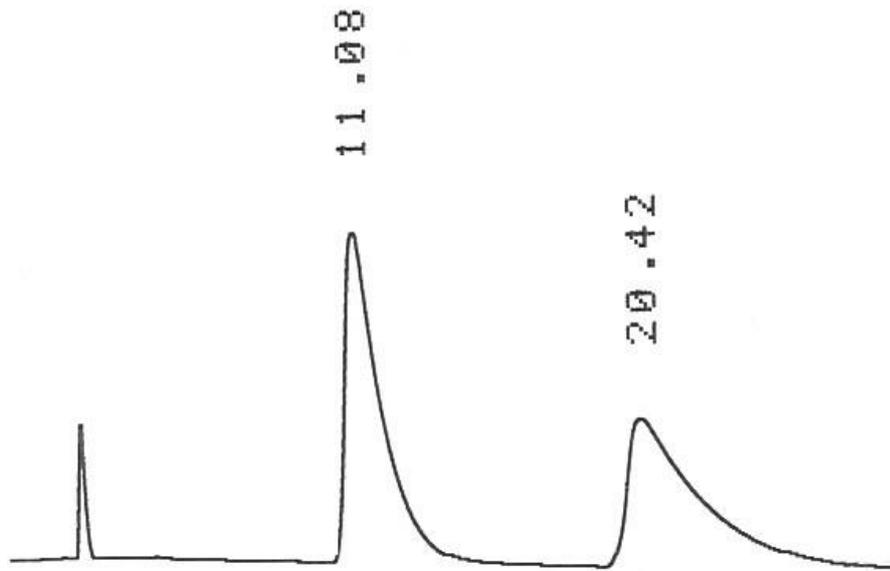
Tableau 10. Variation des facteurs de rétentions, de la sélectivité et de la résolution des énantiomères avec les pourcentages du méthanol dans le tampon dihydrogénophosphate de sodium (50 mM, pH 5.0)

MeOH %		Ketoprofène	indoprofène	ibuprofène	flurbiprofène	fenoprofène	carprofène
40	k_1	5,52	6,13	3,52	9,26	7,20	23,47
	k_2	11,01	10,08	6,04	22,36	11,72	38,69
	α	2,00	1,64	1,72	2,41	1,63	1,65
	R_s	2,75	2,10	1,43	3,08	2,07	2,02
50	k_1	2,70	3,05	1,84	3,86	3,56	8,79
	k_2	5,20	5,07	3,19	9,49	5,58	14,44
	α	1,93	1,66	1,74	2,46	1,57	1,64
	R_s	2,36	1,72	1,28	2,40	1,91	2,07

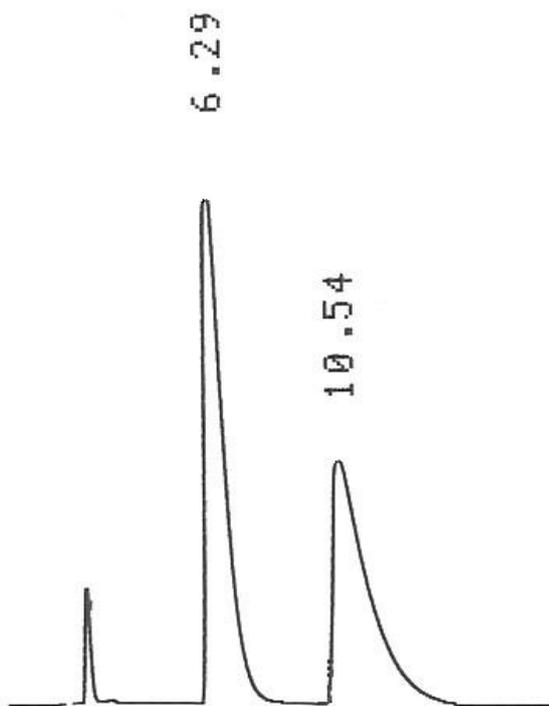
k_1, k_2 : les facteurs de rétentions du premier et du deuxième énantiomère élué

α : la sélectivité, R_s : la résolution.

Autre conditions chromatographiques : Débit : 0.6 ml/min, détection UV 254 nm.



a



b

Figure 47. Chromatogrammes du kétoprofène : a) dans la phase mobile : 50 mM, pH 5.0 tampon NaH_2PO_4 / MeOH (60 / 40 % v/v), b) dans la phase mobile : 50 mM, pH 5.0 tampon NaH_2PO_4 / MeOH (50 / 50 % v/v)

Les résultats obtenus avec ce tampon phosphate à 50% de méthanol montrent que les temps de rétentions de quelques solutés restent relativement longs. Par suite, deux autres tampon phosphates ont été testés : le tampon hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4) et le tampon phosphate de sodium (Na_3PO_4), et nous avons comparé ensuite les résultats avec ceux obtenus avec le tampon nitrate d'ammonium.

Nous avons étudié deux concentrations pour l'hydrogénophosphate de sodium (50 et 25mM), et trois concentrations pour le phosphate de sodium (25, 10 et 5mM) avec 50% de méthanol. Les résultats obtenus en utilisant le tampon hydrogénophosphate de sodium sont regroupés dans le tableau 11.

Tableau 11. Influence de la concentration du tampon hydrogénophosphate de sodium sur la rétention, la sélectivité et la résolution des énantiomères des profènes

Na_2HPO_4		Ketoprofène	indoprofène	ibuprofène	flurbiprofène	fenoprofène	Carprofène
50	k_1	1,53	1,85	1,11	2,31	1,91	5,08
	k_2	2,49	2,66	1,72	4,52	2,61	6,91
	α	1,63	1,44	1,55	1,96	1,37	1,36
	R_s	1,63	1,38	1,3	2,35	1,2	1,41
25	k_1	1,90	2,21	1,32	2,84	2,34	6,13
	k_2	3,12	3,20	2,09	5,73	3,24	8,52
	α	1,64	1,45	1,58	2,02	1,38	1,39
	R_s	2,07	1,2	1,3	2,73	1,34	1,56

k_1, k_2 : les facteurs de rétentions du premier et du deuxième énantiomère élué

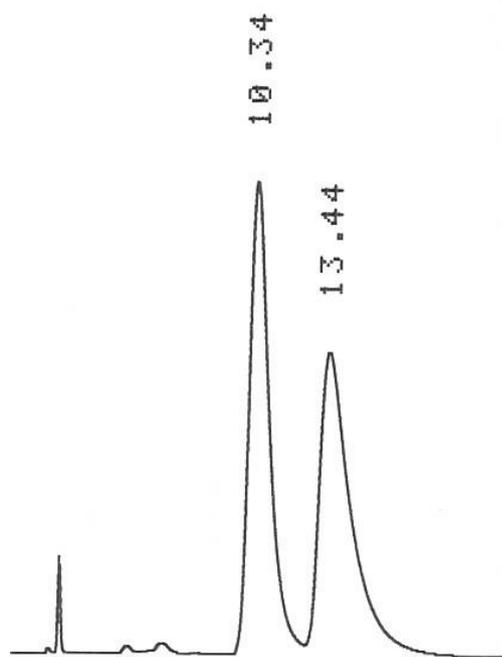
α : la sélectivité, R_s : la résolution.

Autre conditions chromatographiques :

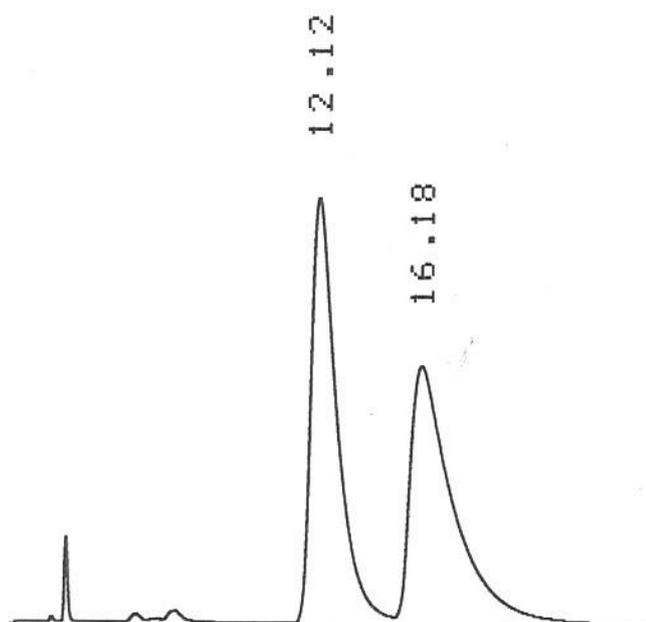
Phase mobile : pH 5, tampon hydrogénophosphate de sodium / MeOH (50/50 % v/v)

Débit : 0.6 ml/min, détection UV 254 nm.

La figure 48 illustre les résolutions élevées et les temps de rétentions raisonnables des solutés analysés dans les deux phases mobiles étudiées.

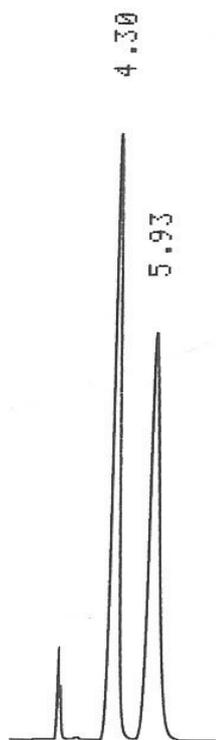


a

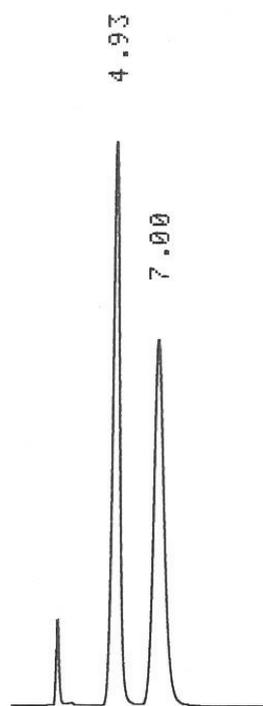


b

Figure 48. Chromatogrammes du carprofène : a) dans la phase mobile : 50 mM, pH 5.0 tampon Na_2HPO_4 / MeOH (50 / 50 % v/v), b) dans la phase mobile : 25 mM, pH 5.0 tampon Na_2HPO_4 / MeOH (50 / 50 % v/v)



c



d

Figure 48. Chromatogrammes du kétoprofène : c) dans la phase mobile : 50 mM, pH 5.0 tampon Na_2HPO_4 / MeOH (50 / 50 % v/v), d) dans la phase mobile : 25 mM, pH 5.0 tampon Na_2HPO_4 / MeOH (50 / 50 % v/v)

La phase mobile constituée du tampon phosphate de sodium a été étudiée à des concentrations plus faibles. Le tableau 12 réunit les valeurs des paramètres chromatographiques des six profènes dans les concentrations du tampon étudiées. Nous remarquons que la plupart des solutés donnent de bons résultats. Les meilleurs résultats concernant la résolution ont été obtenus avec la phase mobile composée du tampon phosphate à 5mM. La figure 49 montre les chromatogrammes de tous les profènes obtenus dans les conditions optimales avec le tampon phosphate de sodium.

Tableau 12. Influence de la concentration du tampon phosphate de sodium sur la rétention, la sélectivité et la résolution des énantiomères des profènes

Na ₃ PO ₄		Ketoprofène	indoprofène	ibuprofène	flurbiprofène	fenoprofène	carprofène
25	k_1	1,44	1,71	1,02	2,14	1,78	4,73
	k_2	2,28	2,39	1,56	4,08	2,39	6,31
	α	1,59	1,40	1,52	1,91	1,34	1,33
	R_s	1,44	1,16	1,14	2,75	1,29	1,35
10	k_1	2,00	2,35	1,41	2,96	2,49	6,49
	k_2	3,29	3,42	2,24	5,98	3,46	9,16
	α	1,65	1,45	1,58	2,02	1,39	1,41
	R_s	2,2	1,29	1,4	1,43	1,64	1,74
5	k_1	2,54	2,92	1,66	3,65	3,02	7,72
	k_2	4,01	4,08	2,51	6,90	4,06	10,51
	α	1,58	1,40	1,51	1,89	1,35	1,36
	R_s	1,83	1,37	1,46	2,63	1,47	1,63

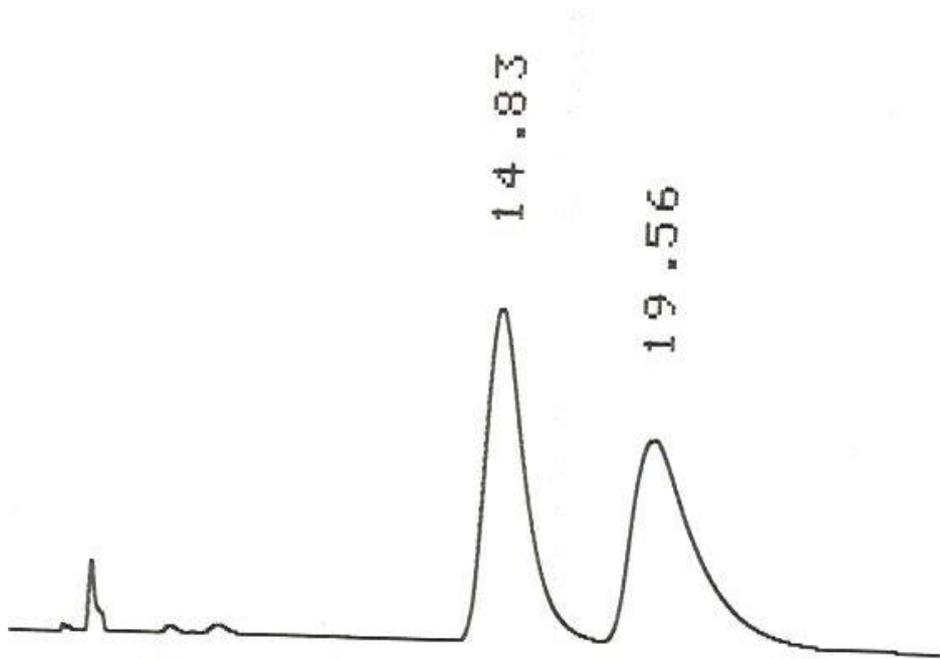
k_1, k_2 : les facteurs de rétentions du premier et du deuxième énantiomère élué

α : la sélectivité, R_s : la résolution.

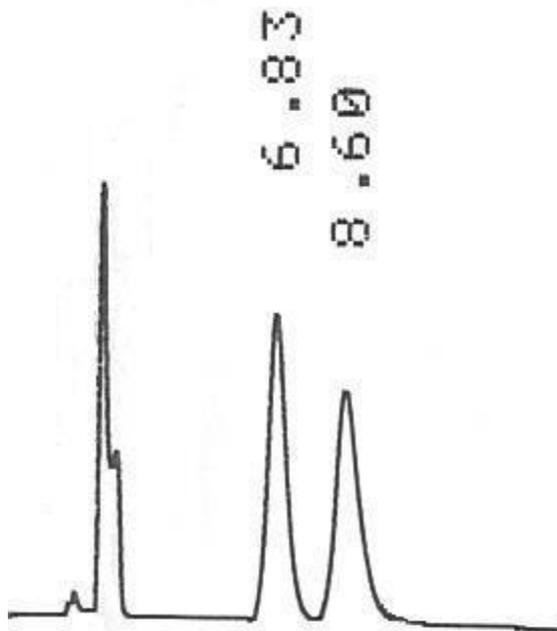
Autre conditions chromatographiques :

Phase mobile : tampon phosphate de sodium / MeOH (50/50, v/v)

Débit : 0.6 ml/min, détection UV 254 nm.

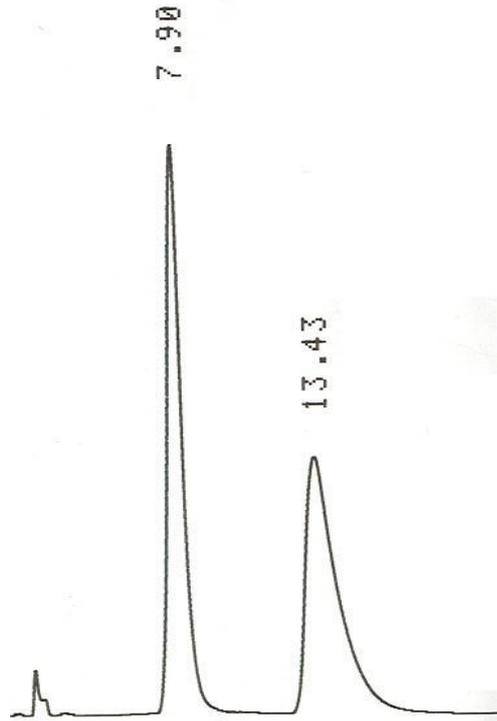


a

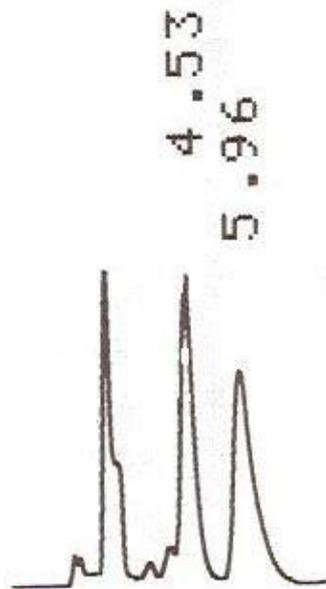


b

Figure 49. Chromatogrammes des profènes dans la phase mobile : 5 mM, pH 5.0 tampon Na_3PO_4 / MeOH (50 / 50 % v/v) ; a) carprofène, b) fénoprofène

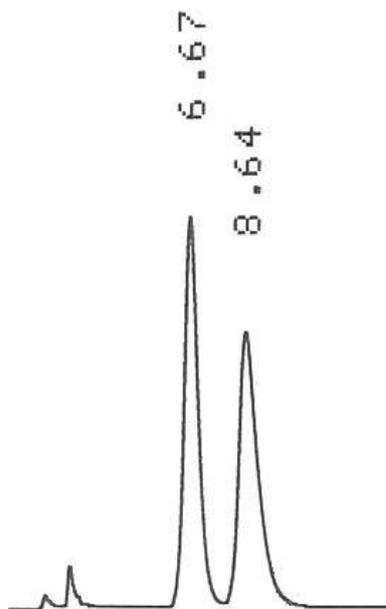


c

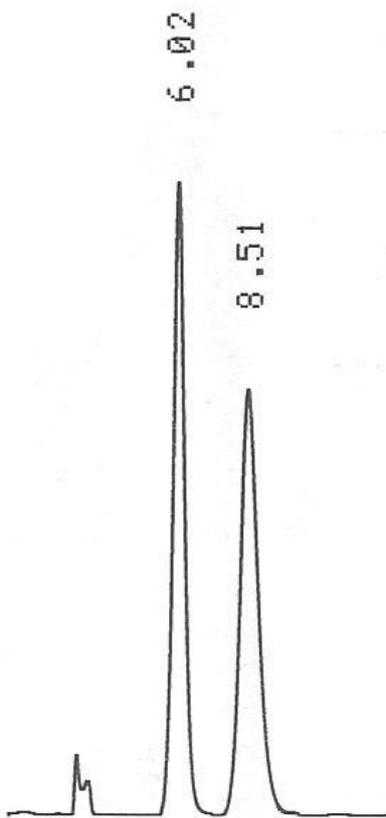


d

Figure 49. (suite) Chromatogrammes des profènes dans la phase mobile : 5 mM, pH 5.0 tampon Na_3PO_4 / MeOH (50 / 50 % v/v) ; c) flurbiprofène, d) ibuprofène



e



f

Figure 49. (suite) Chromatogrammes des profènes dans la phase mobile : 5 mM, pH 5.0 tampon Na_3PO_4 / MeOH (50 / 50 % v/v) ; e) indoprofène, f) kétoprofène

D'après les résultats obtenus, le tampon phosphate a amélioré à la fois les résolutions et les temps de rétentions des profènes étudiés.

Conclusion

Dans ce travail, nous avons préparé une colonne chirale à base de la vancomycine au laboratoire. L'immobilisation du sélecteur chiral est effectuée par amination réductrice sur la surface de la silice fonctionnalisée aldéhyde. Nous avons conduit des analyses avec cette colonne sur un ensemble d'AINS (six profènes) par HPLC chirale. Les effets de différents paramètres expérimentaux sur l'énantioséparation ont été étudiés. Les facteurs de rétention, de sélectivité et les résolutions des racémiques analysés ont été ajustés en faisant varier le pH, la concentration molaire du tampon et le type de modificateurs organiques. De bonnes séparations ont été obtenues pour tous les profènes étudiées dans les conditions optimales : 50 mM de tampon nitrate d'ammonium, pH 5. Le changement du tampon nitrate d'ammonium par le tampon phosphate a amélioré les temps de rétentions en gardant de bonnes séparations. Une concentration de 5mM du tampon phosphate de sodium (Na_3PO_4) semble être la plus adéquate pour des analyses de routine, et pour des résultats reproductibles et corrects.

Malgré plusieurs analyses effectuées, la colonne reste stable et le système présente une haute résistance contre les changements des conditions opératoires (pH, concentration du tampon,...) D'après les résultats obtenus, la phase stationnaire à base de vancomycine a montré sa haute performance, son énantiosélectivité et sa stabilité dans la gamme de pH étudiée.

PARTIE C

APPLICATION SUR LA COLONNE PREPAREE PAR L'ANALYSE DE QUELQUES SUBSTANCES CHIRALES PRESENTANT UN CARACTERE ACIDE OU BASIQUE

I. Introduction

Dans un rapport publié en 1994, Armstrong et col. ont introduit la vancomycine comme additif chiral dans la phase mobile en électrophorèse capillaire [132]. Les glycopeptides avoparcine, teicoplanine, ristocétine A et la vancomycine ont été largement utilisés en tant que sélecteurs chiraux sous forme de phases greffées chirales en HPLC, et des phases stationnaires pour HPLC à base de ces glycopeptides ont été commercialisés.

Dans cette partie, nous décrivons une procédure simple, rapide et pratique pour la séparation des énantiomères de quelques substances pharmaceutiques chirales par HPLC énantiosélective en utilisant la colonne préparée au laboratoire à base de vancomycine, décrite dans la partie précédente. Ces composés ont un caractère acide ou basique. Bien que des travaux antérieurs d'analyse chromatographique ont été menés [177-180] sur ces composés, nous avons jugé utile de reprendre et de procéder à l'analyse dans l'espoir d'améliorer les séparations des composés en question en utilisant la colonne préparée au laboratoire et pour étudier la performance de la phase stationnaire. Nous avons travaillé dans le mode inverse, normale et polaire ionique. L'utilisation de la vancomycine comme additif chiral dans la phase mobile pour renforcer l'énantiosélectivité a été étudié en mode inverse. Les produits étudiés sont : le métoprolol ; le vérapamil ; l'acide tropique ; la prilocaïne ; l'idazoxane ; le bendrofluméthiazide ; l'indapamide et l'acide mandélique ; leurs structures chimiques sont présentées dans la figure 50.

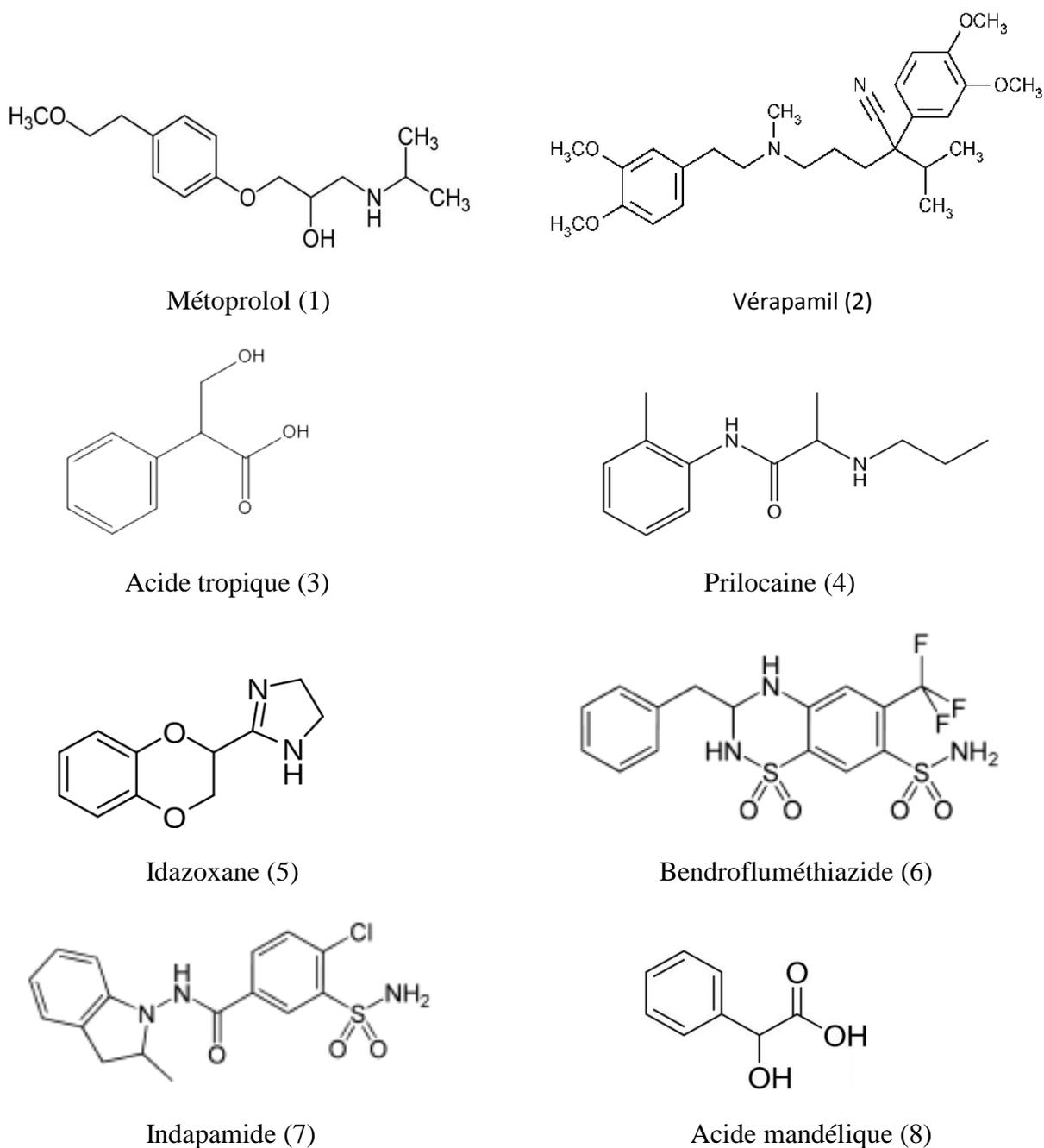


Figure 50. Structures des composés analysés dans la colonne de vancomycine.

II. Appareillage, produits chimiques et méthodes

II.1 Appareillage

Le système HPLC sur lequel nous avons travaillé est composé de :

- Une pompe (L-6200, VWR International Darmstadt, Germany)
- Une vanne d'injection rhéodyne 7725 équipée d'une boucle d'injection de 20 μ l
- Un détecteur UV- visible (L-4200, Merck – Hitachi)

- Une colonne chirale préparée au laboratoire à base de vancomycine
- un ordinateur équipé d'un logiciel Ezchrom

II.2 Produits chimiques

1) Solvants organiques

Tous les solvants sont de qualité HPLC. Le méthanol nous a été fourni par Sigma-Aldrich (France), l'acétonitrile par Merck KgaA (Germany), le tétrahydrofur et l'acétate d'éthyle par Prolabo (France), le 2-propanol par BDH Laboratory Supplies (England), la triéthylamine par Fluka Analytical (Belgium), l'eau pour HPLC par SDS (France), l'acide acétique glacial, l'éthanol anhydre, le dichlorométhane et le n-hexane par Carlo Erba Reagents (France).

2) Solutés et réactifs

L'acétate d'ammonium ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) nous a été attribué par Sigma-Aldrich (France) et le phosphate de sodium dodécahydraté ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) nous a été fourni par VWR international (Germany).

L'hydrochlorure de vancomycine ainsi que tous les solutés étudiés ont été achetés de Sigma-Aldrich (France).

II.3 Conditions opératoires

Les solutions tampons ont été préparées avec des concentrations spécifiques de sel et le pH a été contrôlé avec de l'acide acétique glacial avant l'addition du modificateur organique.

Toutes les expériences ont été réalisées en mode isocratique, à température ambiante avec un débit de 0,6 ml / min.

III. Recherche des conditions optimales

III.1 Choix de la longueur d'onde maximale (λ_{max})

Les analyses ont été effectuées avec un détecteur UV-visible. Les longueurs d'ondes utilisées sont : 254 nm pour la prilocaine, le bendrofluméthiazide et l'indapamide, et 220nm pour les autres solutés.

III.1 Choix de la phase mobile

En phase inverse, nous avons utilisé deux types de tampons : un tampon phosphate (Na_3PO_4) avec les paramètres optima déterminés dans la partie précédente (5mM et pH 5), et un tampon acétate d'ammonium ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) avec les paramètres optima utilisés dans la partie précédente avec le tampon nitrate d'ammonium (50mM et pH 5). Trois modificateurs organiques ont été étudiés.

En mode normal, un mélange binaire composé de différents pourcentages d'hexane et d'éthanol, et un autre mélange ternaire composé d'éthanol, méthanol et d'hexane ont été étudiés

En mode polaire ionique, des mélanges composés de deux ou trois modificateurs organiques avec des petites quantités d'acide acétique et de triéthylamine ont été utilisés dans la séparation des différents solutés.

a) En mode inverse

Deux tampons ont été examinés avec le même solvant organique afin d'étudier leurs effets sur l'énantioséparation des composés analysés. Le tampon acétate d'ammonium et le tampon phosphate avec différents pourcentages de méthanol.

Une fois le tampon convenable choisi, l'effet du pourcentage de trois modificateurs organiques a été aussi examiné. Nous avons travaillé avec : l'acétonitrile, le méthanol et le tétrahydrofuranne.

b) En mode normal

Deux systèmes ont été utilisés : un système binaire et un système ternaire. Un mélange binaire constitué de différents pourcentages d'éthanol et d'hexane, et un autre mélange ternaire composé d'éthanol, de méthanol et d'hexane ont été testés.

c) En mode polaire ionique

La phase mobile joue un rôle essentiel en mode polaire ionique dans la séparation des composés. Une étude a été menée sur l'influence de la nature du solvant organique et sur les concentrations de l'acide et de la base ajoutés à la phase mobile sur la séparation des énantiomères des composés étudiés.

IV. Résultats et discussions

Dans nos expériences, nous avons étudié trois modes chromatographiques : le mode inverse, le mode normal et le mode polaire ionique.

a) En mode inverse

1) Effet de la nature du tampon

Nous avons examiné l'effet de la nature du tampon en faisant varier le pourcentage du méthanol dans le tampon acétate d'ammonium (50mM, pH 5) d'une part et dans le tampon phosphate (5mM, pH 5) d'autre part. Les résultats sont ensuite comparés afin de choisir le tampon le plus approprié pour l'énantioséparation des composés étudiés. Les différents pourcentages du méthanol utilisés sont : 10, 20, 30 et 40%. Les résultats obtenus avec les solutés qui ont montré une séparation dans ces phases mobiles sont présentés dans le tableau 13. Les paramètres chromatographiques k et α ont été évalués dans les différentes phases mobiles étudiées.

Tableau 13. Effet de la nature du tampon dans différents pourcentages de méthanol sur la rétention et la sélectivité.

%MeOH soluté		40		30		20		10	
		k_1	α	k_1	α	k_1	α	k_1	α
2	tp ac amm	1,53	1,26	2,71	1,26	5,18	1,28	10,17	1,27
7		1,69	1,31	3,20	1,38	5,85	1,42	10,16	1,51
8		0,89	1,23	1,00	1,20	1,04	1,17	1,07	1,14
2	tp phosph	1,06	1,00	2,34	1,25	4,62	1,24	10,41	1,23
7		1,47	1,29	3,22	1,34	5,63	1,41	10,21	1,47
8		1,62	1,16	1,72	1,18	1,77	1,16	1,86	1,16

tp ac amm : tampon acetate d'ammonium (50mM, pH 5)

tp phosph : tampon phosphate (5mM, pH 5)

k_1 : le facteur de rétention du premier énantiomère élué

α : la sélectivité

Solutés : 2 : vérapamil, 7 : indapamide, 8 : acide mandélique

Les résultats obtenus montrent que les facteurs de rétentions diminuent quand la concentration du méthanol augmente pour tous les composés analysés et avec les deux tampons étudiés.

Concernant la sélectivité, nous remarquons que le vérapamil a une sélectivité quasi constante avec la phase mobile composée de 10, 20 et 30% de méthanol et le tampon phosphate, et avec toutes les phases mobiles constituées du tampon acétate d'ammonium et du méthanol. Pour l'indapamide, la sélectivité augmente quand le pourcentage du méthanol diminue avec les deux tampons. Pour l'acide mandélique, la sélectivité est quasi constante avec le tampon phosphate et diminue avec la diminution de la concentration en méthanol avec le tampon acétate d'ammonium.

Comme les sélectivités sont peu influencées par la nature du tampon, le choix du tampon s'est basé sur les résolutions qui sont meilleures avec le tampon phosphate. L'effet des deux tampons sur la rétention et l'énantioséparation est montré par les chromatogrammes de l'indapamide et de l'acide mandélique dans la figure 51 et la figure 52 respectivement.

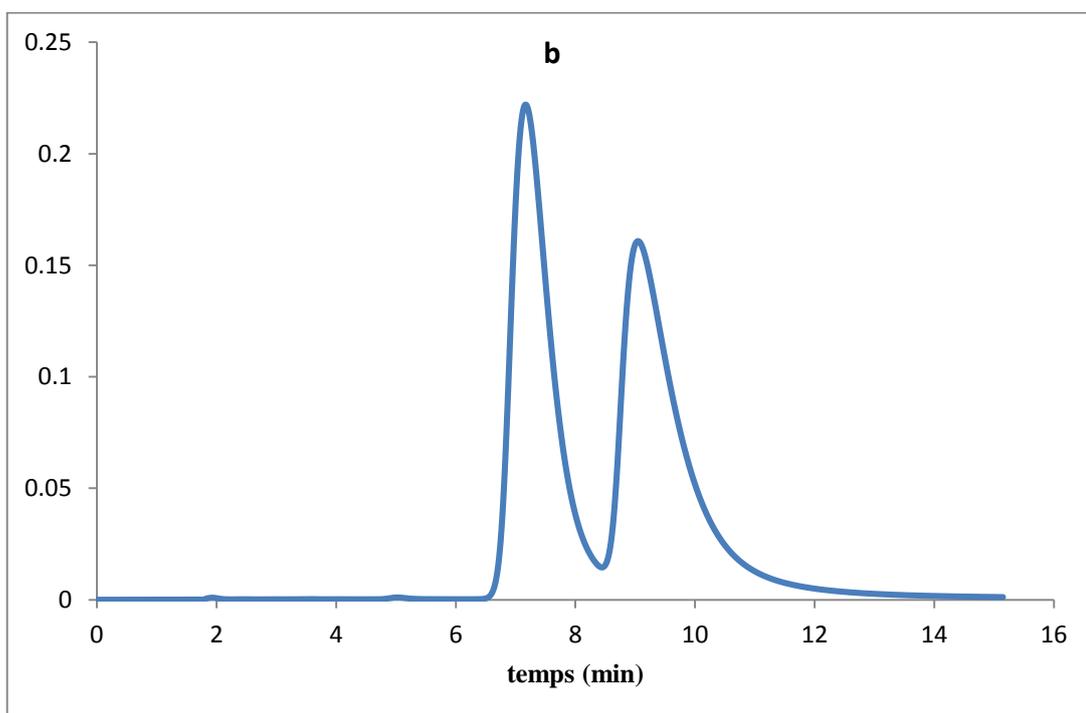
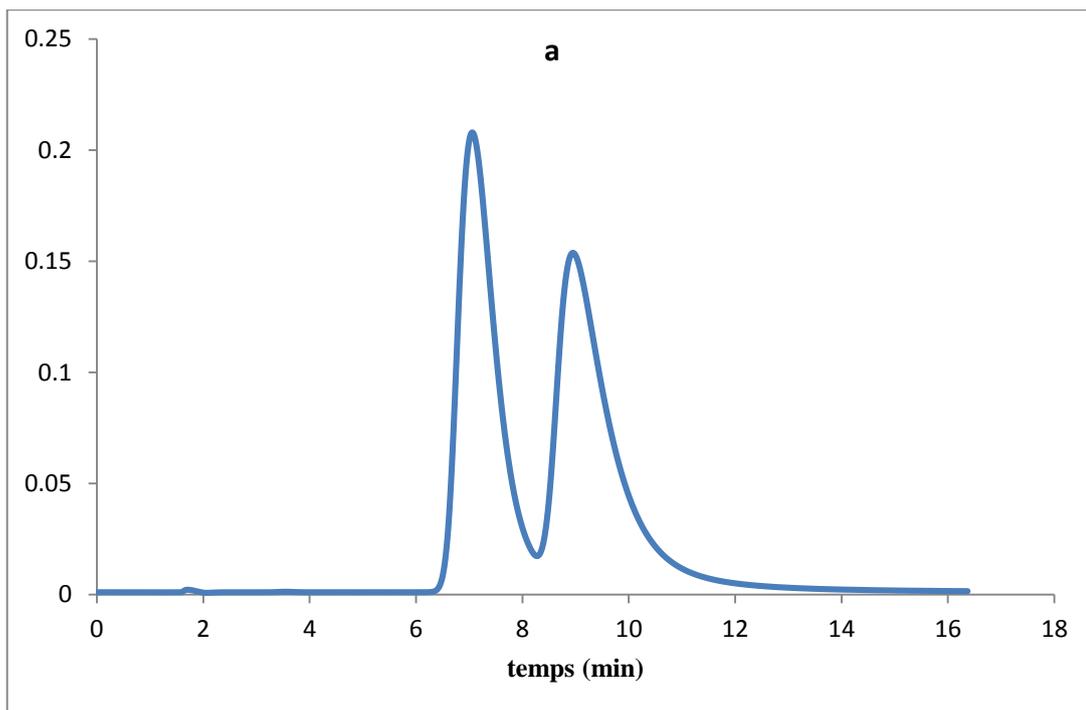


Figure 51. Chromatogrammes de l'indapamide dans les phases mobiles : a) 50mM, pH 5, tampon acétate d'ammonium / MeOH (70/30 % v/v) ; b) 5mM, pH 5, tampon phosphate / MeOH (70/30 % v/v)

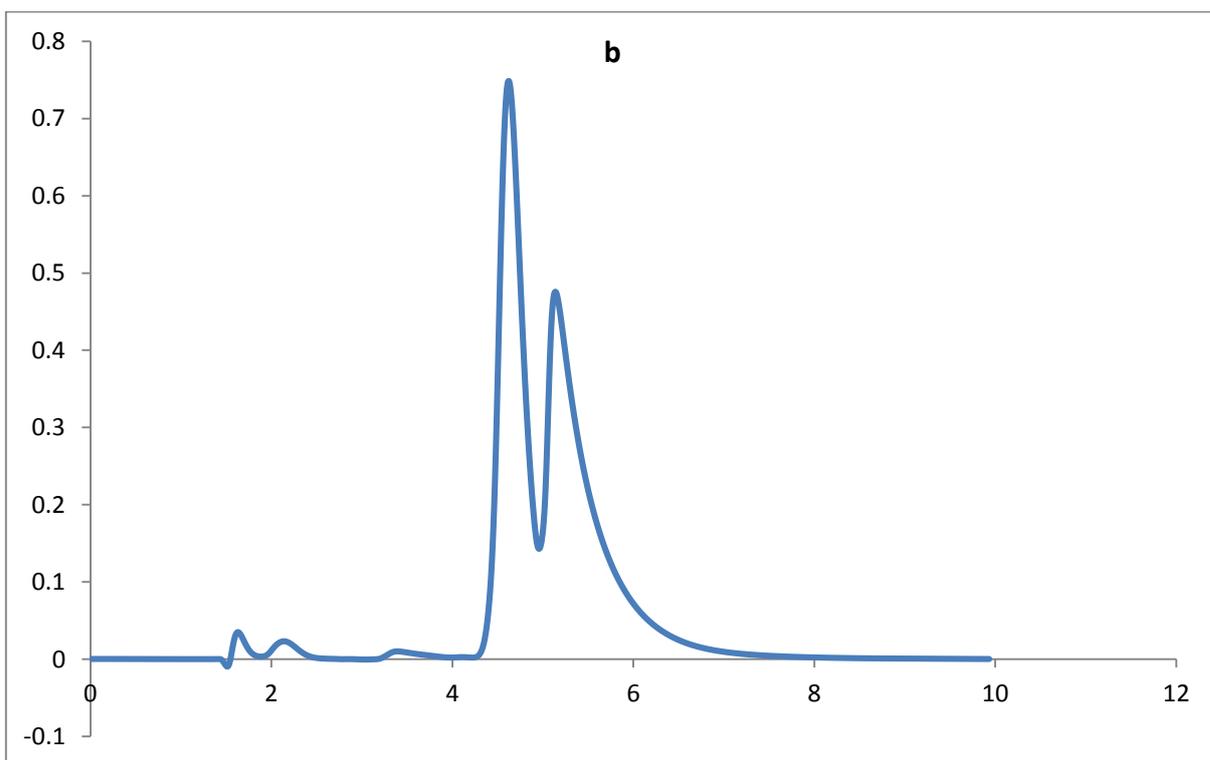
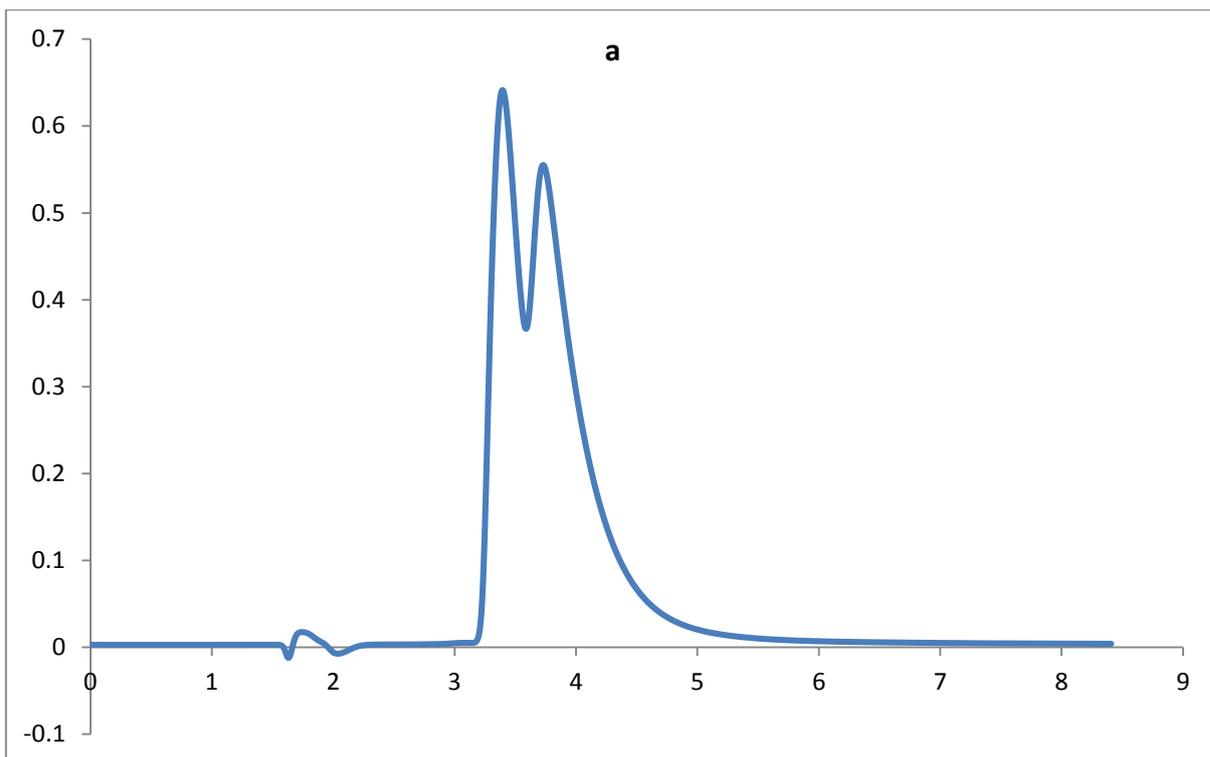


Figure 52. Chromatogrammes de l'acide mandélique dans les phases mobiles : a) 50mM, pH 5, tampon acétate d'ammonium / MeOH (70/30 % v/v) ; b) 5mM, pH 5, tampon phosphate / MeOH (70/30 % v/v)

2) Effet du modificateur organique

Trois modificateurs organiques ont été étudiés : l'acétonitrile, le tétrahydrofurane et le méthanol. L'étude du méthanol a déjà été réalisée dans la partie précédente au fur et à mesure que l'étude de l'effet de la nature du tampon. Notre choix s'est porté sur le tampon phosphate qui montre des meilleures résolutions comme on l'a vu précédemment.

L'effet du tétrahydrofurane a été examiné avec des phases mobiles composées des pourcentages de 10, 20, 30 et 40% de celui-ci, en mélange avec le tampon phosphate à 5mM et pH 5. Les résultats obtenus avec les solutés qui ont montré une séparation dans ces phases mobiles sont résumés dans le tableau 14. Les paramètres chromatographiques k et α ont été évalués dans les différentes phases mobiles étudiées.

Tableau 14. Variation des facteurs de rétentions et des sélectivités des énantiomères avec les pourcentages du tétrahydrofurane dans le tampon phosphate (5 mM, pH 5.0)

%THF soluté	10		20		30		40	
	k_1	α	k_1	α	k_1	α	k_1	α
3	1,06	1,22	0,90	1	0,75	1	0,42	1
7	4,87	1,37	1,77	1,25	0,66	1	0,11	1
8	1,44	1,19	1,31	1,22	0,86	1,58	0,64	1,77

k_1 : le facteur de rétention du premier énantiomère élué

α : la sélectivité

Solutés : 3 : acide tropique, 7 : indapamide, 8 : acide mandélique

Nous remarquons que les facteurs de rétentions de tous les solutés diminuent avec l'augmentation du pourcentage du tétrahydrofurane. Une diminution de la sélectivité de l'indapamide et de l'acide tropique est observée quand le pourcentage du tétrahydrofurane augmente, contrairement à celle de l'acide mandélique qui augmente avec l'accroissement de la concentration du tétrahydrofurane.

La figure 53 montre les chromatogrammes de l'indapamide et de l'acide mandélique dans les phases mobiles à 10 et 30% de tétrahydrofurane respectivement.

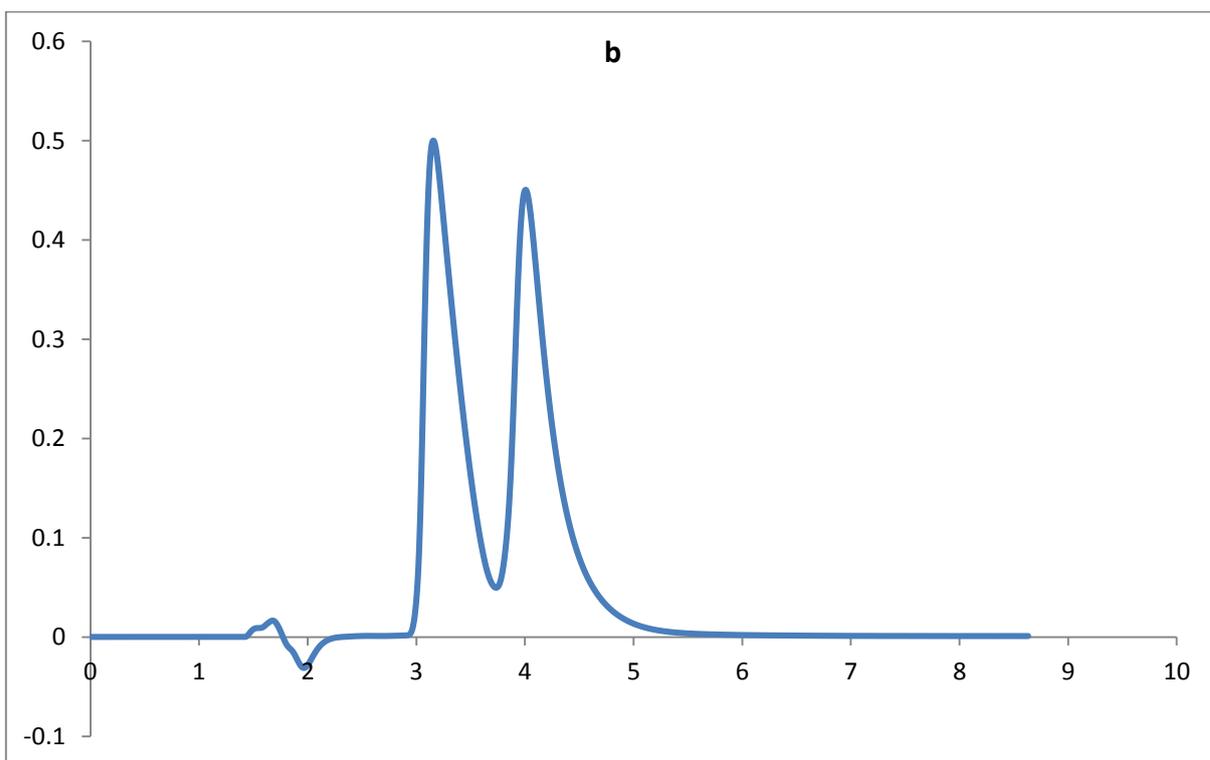
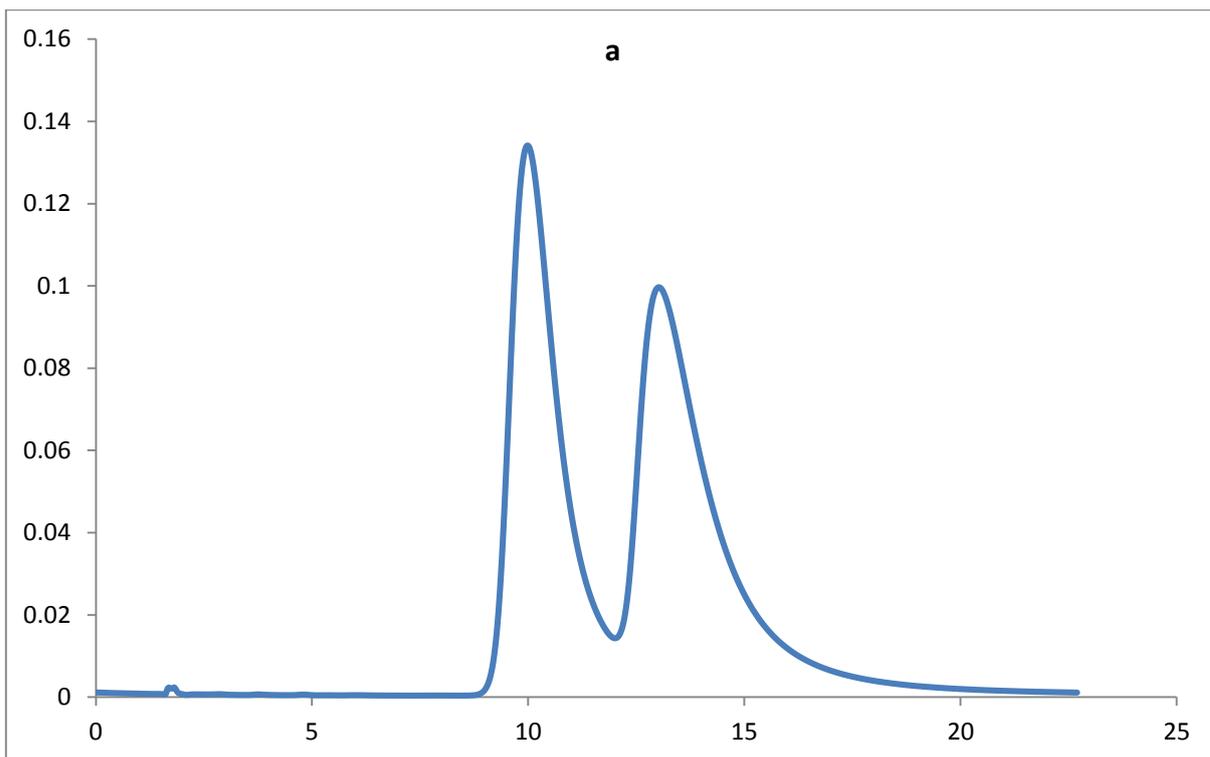


Figure 53. Chromatogrammes de : a) l'indapamide dans la phase mobile : 5mM, pH 5, tampon phosphate / THF (90/10 % v/v), b) l'acide mandélique dans la phase mobile : 5mM, pH 5, tampon phosphate / THF (70/30 % v/v)

D'autres phases mobiles constituées de 10, 20, 30 et 40% d'acétonitrile en mélange avec le tampon phosphate à 5mM et pH 5 ont été étudiées. Les résultats obtenus avec les solutés qui ont montré une séparation dans ces phases mobiles sont réunis dans le tableau 15. Les paramètres chromatographiques k et α ont été évalués dans les différentes phases mobiles étudiées.

Tableau 15. Variation des facteurs de rétentions et des sélectivités des énantiomères avec les pourcentages de l'acétonitrile dans le tampon phosphate (5 mM, pH 5.0)

soluté \ %ACN	10		20		30		40	
	k_1	α	k_1	α	k_1	α	k_1	α
2	3,51	1,19	0,76	1,30	0,20	1	0,02	1
7	6,33	1,38	2,10	1,25	0,70	1,16	0,23	1
8	1,55	1,18	1,22	1,18	0,79	1,43	0,68	1,56

k_1 : le facteur de rétention du premier énantiomère élué

α : la sélectivité

Solutés : 2 : vérapamil, 7 : indapamide, 8 : acide mandélique

Les résultats obtenus montrent que les temps de rétentions de tous les solutés diminuent avec l'accroissement du pourcentage de l'acétonitrile. L'augmentation de la concentration de l'acétonitrile conduit à une diminution de la sélectivité de l'indapamide, et à une augmentation de celle de l'acide mandélique qui présente un maximum avec la phase mobile à 40% d'acétonitrile.

La figure 54 présente les chromatogrammes de l'indapamide et de l'acide mandélique dans la phase mobile à 10 et 20% d'acétonitrile respectivement.

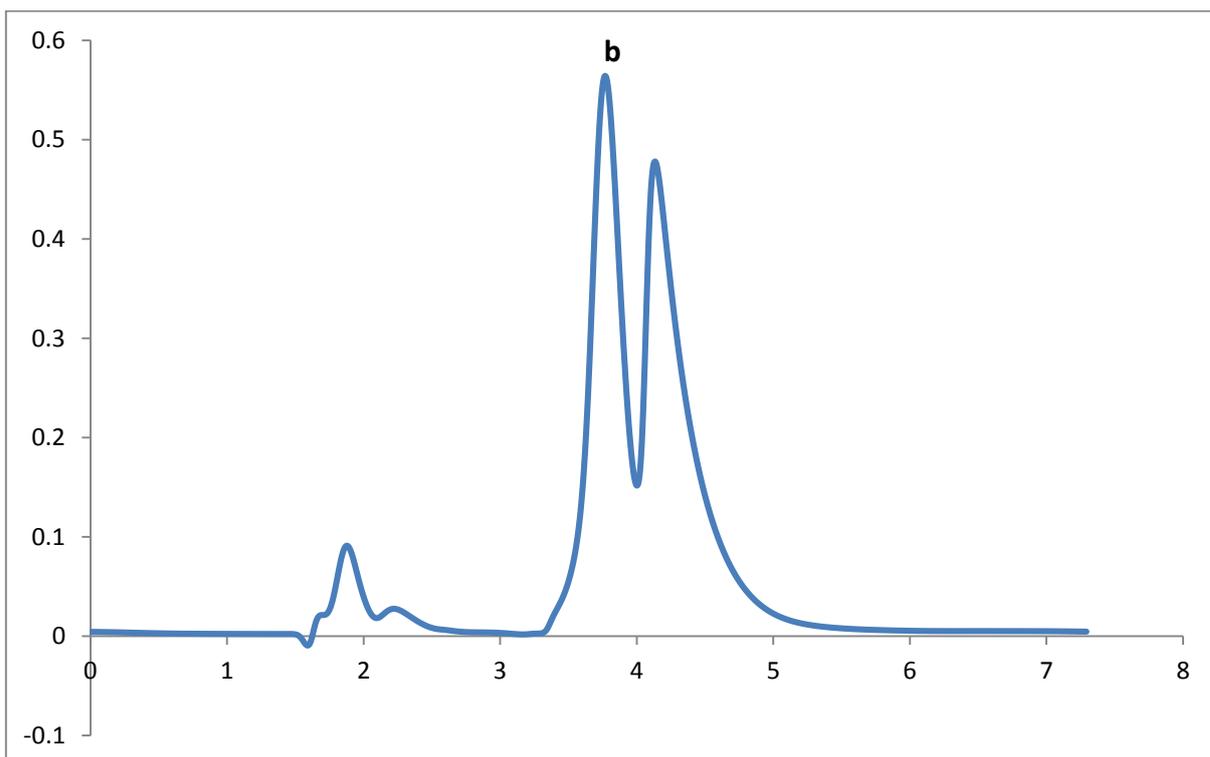
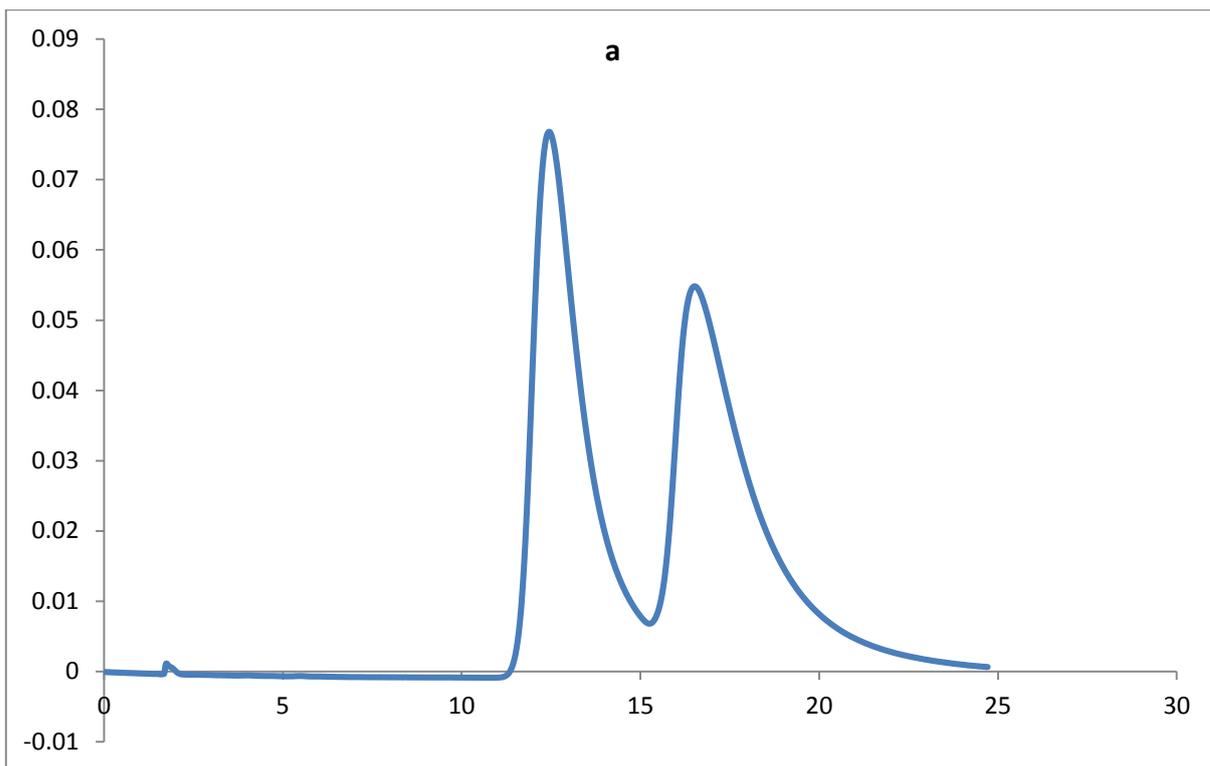


Figure 54. Chromatogrammes de : a) l'indapamide dans la phase mobile : 5mM, pH 5, tampon phosphate / ACN (90/10 % v/v), b) l'acide mandélique dans la phase mobile : 5mM, pH 5, tampon phosphate / ACN (80/20 % v/v)

3) *Effet de l'addition de la vancomycine à la phase mobile*

Dans le but de renforcer l'environnement chiral, on ajoute une quantité de vancomycine à la phase mobile : 5mM, pH 5 tampon phosphate / MeOH (80/20 % v/v) avec la phase stationnaire à base de vancomycine. Nous avons travaillé avec deux phases mobiles ; la première contenant 80mg de vancomycine dans 100ml de phase mobile et la deuxième avec 160mg de vancomycine dans 100ml de phase mobile. Nous avons observé que l'augmentation de la concentration de la vancomycine dans la phase mobile entraîne une légère augmentation des temps de rétentions des analytes. Aucune amélioration au niveau de la sélectivité des solutés non séparés auparavant n'a été observée. La figure 55 montre les chromatogrammes de l'indapamide avec les deux phases mobiles étudiée.

Vu le prix très cher de la vancomycine, et en outre son addition à la phase mobile ne constitue pas un facteur déterminant, nous avons choisi de travailler avec des phases mobiles sans vancomycine.

Dans le but de chercher de meilleures conditions de séparation, nous avons examiné le mode normal et polaire ionique.

b) En mode normal

L'effet du modificateur organique a été étudié dans ce mode chromatographique. Les compositions testées sont des phases mobiles constituées d'un mélange binaire d'éthanol et d'hexane et d'un mélange ternaire constitué d'éthanol, de méthanol et d'hexane. Avec le premier mélange, les temps de rétentions diminuent avec l'augmentation du pourcentage d'éthanol. Les phases mobiles étudiées sont constituée de 60, 80 et 90% d'éthanol. Des séparations incomplètes sont observées avec la prilocaïne seulement. Le mélange ternaire utilisé est : EtOH / MeOH / hexane (86/4/10). La prilocaïne est le seul composé séparé avec une résolution incomplète.

La majorité des composés n'ont montré aucune sélectivité avec ces deux mélanges, ce qui nous a conduit à examiner le mode polaire ionique.

c) En mode polaire ionique

L'étude du mode polaire ionique a été effectuée en utilisant plusieurs mélanges de différents solvants organiques. Nous avons commencé par l'optimisation des concentrations des additifs dans le méthanol seul, ensuite dans un mélange d'éthanol et de méthanol. L'effet de la nature et des pourcentages de différents modificateurs organique avec les concentrations

optimales d'acide et de base sur la rétention et l'énantioséparation de tous les solutés a été étudié par la suite.

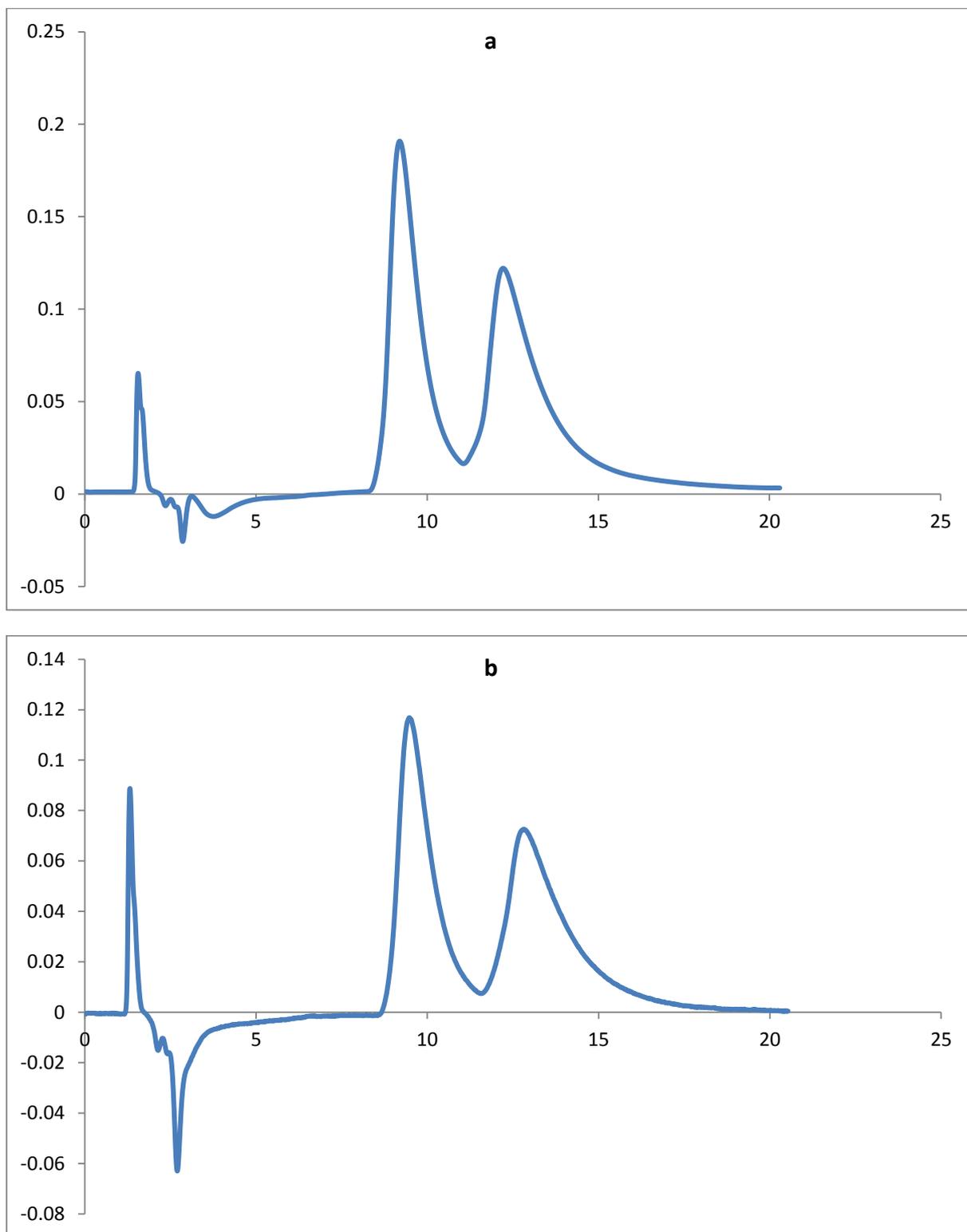


Figure 55. Chromatogrammes de l'indapamide dans la phase mobile : 5mM, pH 5, tampon phosphate / MeOH (80/20 % v/v), a) avec 80mg de vancomycine dans 100ml de phase mobile, b) avec 160mg de vancomycine dans 100ml de phase mobile

1) Effet de la concentration des additifs

Pour voir l'évolution de la rétention, la sélectivité et la résolution vis-à-vis de la concentration des deux additifs acide et basique, nous avons utilisé à chaque fois la même concentration pour l'acide et la base et nous avons fait varier le pourcentage dans l'intervalle de 0,01 à 0,1%.

Nous avons commencé notre étude avec un seul modificateur organique afin de pouvoir évaluer l'effet des deux additifs seulement. Nous avons utilisé deux phases mobiles constituées de méthanol / acide acétique / triéthylamine avec les pourcentages 100/0,01/0,01 et 100/0,1/0,1. Les solutés qui ont montré une séparation sont le vérapamil et l'acide mandélique.

Les résultats obtenus montrent que les temps de rétentions de tous les solutés diminuent avec l'augmentation des concentrations de l'acide acétique et de la triéthylamine, alors que les sélectivités des composés séparés augmentent. Cette phase mobile n'apporte pas d'amélioration au niveau des sélectivités des solutés non séparés auparavant, ce qui nous a conduit à travailler avec une phase mobile composée de deux solvants organiques : le méthanol et l'éthanol, mélangés avec des petites quantités d'acide et de base.

Une étude préliminaire a été effectuée en utilisant des phases mobiles composées de pourcentages fixes de modificateurs organiques, et de différentes quantités d'acide et de base.

En augmentant les concentrations de l'acide et de la base dans cette phase mobile, les temps de rétention diminuent. Ces phases mobiles ont montré une sélectivité pour le métoprolol, mais la résolution n'est pas complète. Nous avons ensuite utilisé des phases mobiles à deux modificateurs organiques (le méthanol et l'éthanol), et nous avons fait varier les pourcentages des solvants organiques et des additifs acide et basique simultanément. Nous avons remarqué que les phases mobiles avec 0,1% d'acide acétique et 0,1% de triéthylamine améliorent les résolutions et les formes des pics. Nous avons donc opté pour des concentrations de 0,1% pour chaque additif. La figure 56 montre les chromatogrammes de l'acide mandélique dans différentes concentrations d'acide acétique et de triéthylamine.

Une autre phase mobile sans méthanol a été utilisée dans le but d'évaluer l'effet des concentrations de l'acide acétique et de la triéthylamine sur la rétention et l'énantioséparation, et aussi de comparer les résultats avec ceux obtenus avec les phases mobiles contenant le

méthanol étudiées précédemment. Les phases mobiles étudiées sont : EtOH / hexane / AcOH / TEA : v/v/v/v : 90/10/0,02/0,02 ; 90/10/0,05/0,05 ; 90/10/0,07/0,07 ; 90/10/0,1/0,1.

Les résultats obtenus montrent que les facteurs de rétentions diminuent avec l'augmentation des concentrations de l'acide et de la base. Ces phases mobiles sont sélectives envers trois composés : le métoprolol, l'idazoxane et l'acide mandélique. Les résolutions de l'acide mandélique sont plus faibles que celles obtenues avec la phase mobile qui contient le méthanol ; par contre le métoprolol présente des résolutions meilleures mais pas complètes. Les concentrations de l'acide et de la base influent peu sur les résolutions des solutés avec ces phases mobiles.

Ces observations ont permis de retenir pour notre étude, une phase mobile composée de méthanol et d'un autre solvant organique en mélange avec les concentrations optimales de l'acide et de la base trouvées précédemment.

2) *Effet de la concentration des modificateurs organiques*

Nous avons d'abord envisagé une étude avec des phases mobiles à deux modificateurs organiques composées de méthanol mélangé avec un autre solvant organique et les concentrations optimales d'acide et de base. Plusieurs phases mobiles ont été utilisées. Nous avons ensuite étudié des phases mobiles à trois modificateurs organiques constituées de méthanol et deux autres solvants organiques ; et à la fin nous avons utilisé des phases mobiles à deux modificateurs organiques sans méthanol.

a) Phases mobiles à deux solvants organiques contenant le méthanol

Plusieurs phases mobiles avec différents pourcentages de méthanol et d'éthanol et 0,1% de chaque additif ont été étudiées. Le tableau 16 récapitule les résultats obtenus avec les phases mobiles étudiées.

Tableau 16. Variation des facteurs de rétentions et des sélectivités des énantiomères avec les pourcentages du méthanol et d'éthanol

soluté \ P.M	PM1		PM2		PM3		PM4		PM5		PM6	
	k_1	α										
1	0,69	1	1,03	1,13	0,90	1,12	1,39	1,17	1,60	1,19	2,13	1,20
8	1,01	1,51	0,91	2,06	1,24	1,47	1,86	1,45	1,69	1,25	2,01	1,21

P.M : phase mobile : EtOH/MeOH/AcOH/TEA : v/v/v/v : (PM1: 2/98/0,1/0,1; PM2: 5/95/0,1/0,1; PM3: 30/70/0,1/0,1; PM4: 60/40/0,1/0,1; PM5: 80/20/0,1/0,1; PM6: 96/4/0,1/0,1)

k_1 : le facteur de rétention du premier énantiomère élué

α : la sélectivité

Solutés : 1 : métoprolol, 8 : acide mandélique

En modifiant les pourcentages des modificateurs organiques, nous avons pu améliorer les sélectivités et les résolutions des composés qui ont montré une sélectivité avec cette phase mobile auparavant. La figure 57 présente les chromatogrammes de l'acide mandélique dans les phases mobiles : EtOH/MeOH/AcOH/TEA : v/v/v/v : (2/98/0,1/0,1 et 30/70/0,1/0,1).

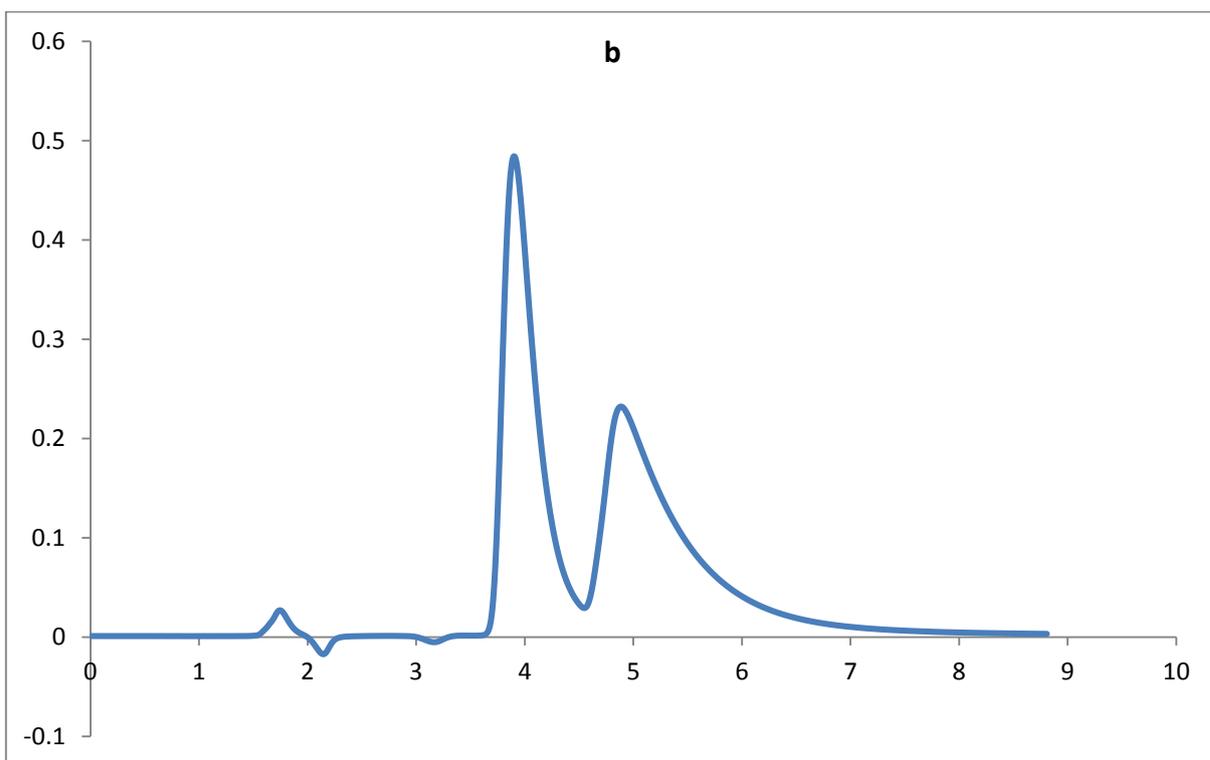
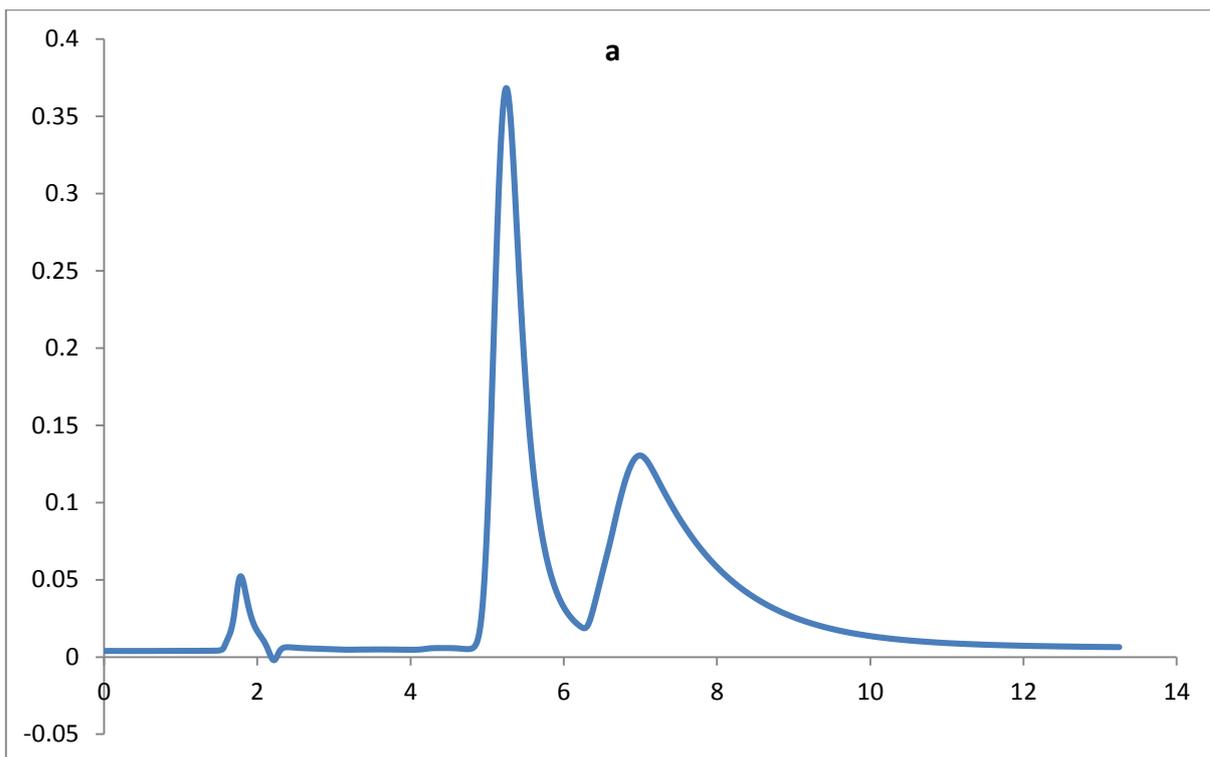


Figure 56. Chromatogrammes de l'acide mandélique a) dans la phase mobile EtOH / MeOH / AcOH / TEA : v/v/v/v : 40/60/0,05/0,05 ; b) dans la phase mobile EtOH / MeOH / AcOH / TEA : v/v/v/v : 40/60/0,1/0,1

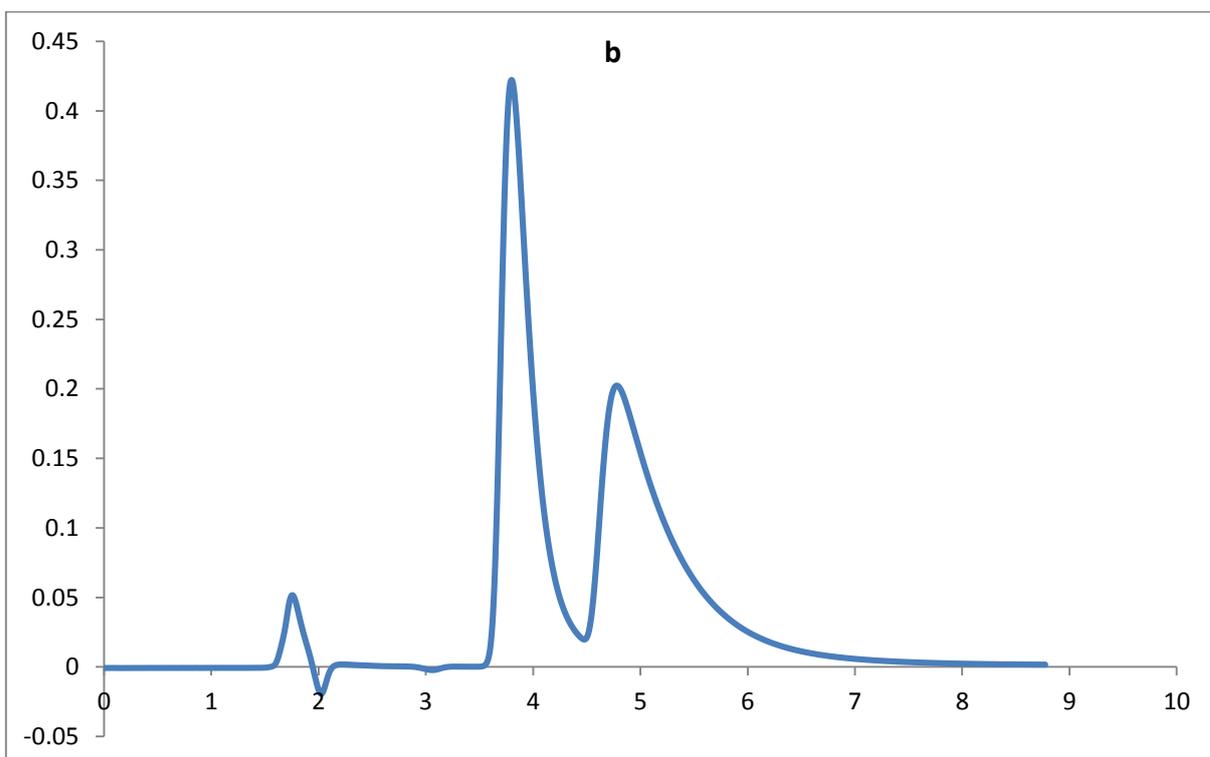
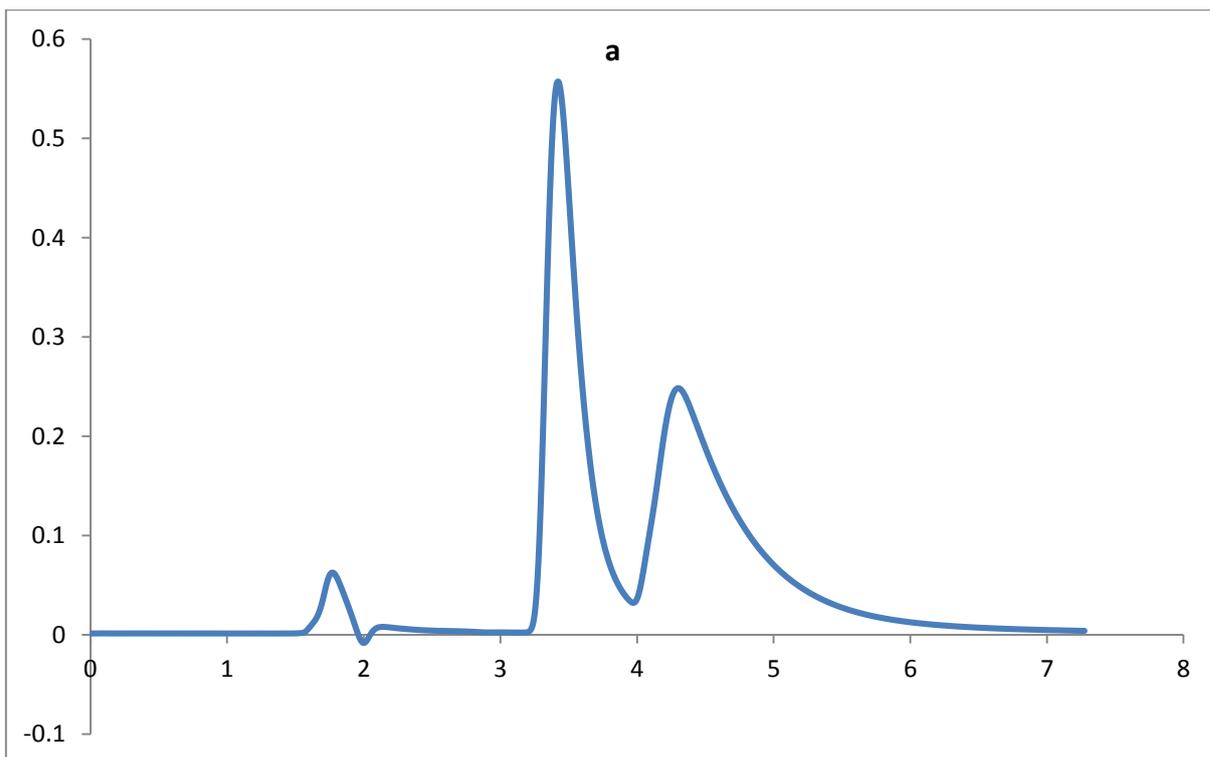


Figure 57. Chromatogrammes de l'acide mandélique a) dans la phase mobile EtOH / MeOH / AcOH / TEA (2/98/0,1/0,1), b) dans la phase mobile EtOH / MeOH / AcOH / TEA (30/70/0,1/0,1)

Nous avons utilisé une autre phase mobile constituée de différents pourcentages de méthanol et d'acétonitrile et les concentrations optimales d'acide et de base. Les phases mobiles étudiées et les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 17. Les chromatogrammes de l'acide mandélique dans deux phases mobiles étudiées sont présentés dans la figure 58.

Tableau 17. Variation des facteurs de rétentions et des sélectivités des énantiomères avec les pourcentages du méthanol et de l'acétonitrile

soluté \ P.M	PM1		PM2		PM3		PM4		PM5		PM6		PM7	
	k_1	α												
1	0,59	1	0,80	1	1,07	1	1,31	1,09	1,81	1,11	3,19	1,09	5,12	1,05
8	0,93	1,49	0,53	1,59	0,57	1,64	0,51	1,77	0,67	1,43	1,08	1,39	1,44	1,17

P.M : phase mobile : ACN/MeOH/AcOH/TEA : v/v/v/v : (PM1: 2/98/0,1/0,1 ; PM2: 20/80/0,1/0,1 ; PM3: 40/60/0,1/0,1 ; PM4: 50/50/0,1/0,1 ; PM5 : 60/40/0,1/0,1 ; PM6: 80/20/0,1/0,1; PM7: 90/10/0,1/0,1)

k_1 : le facteur de rétention du premier énantiomère élué

α : la sélectivité

Solutés : 1 : métoprolol, 8 : acide mandélique

L'effet de la phase mobile constituée du mélange de méthanol et du 2- propanol sur la rétention avec les concentrations optimales d'acide et de base, sur l'énantioséparation a été étudié en utilisant plusieurs phases mobiles. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 18.

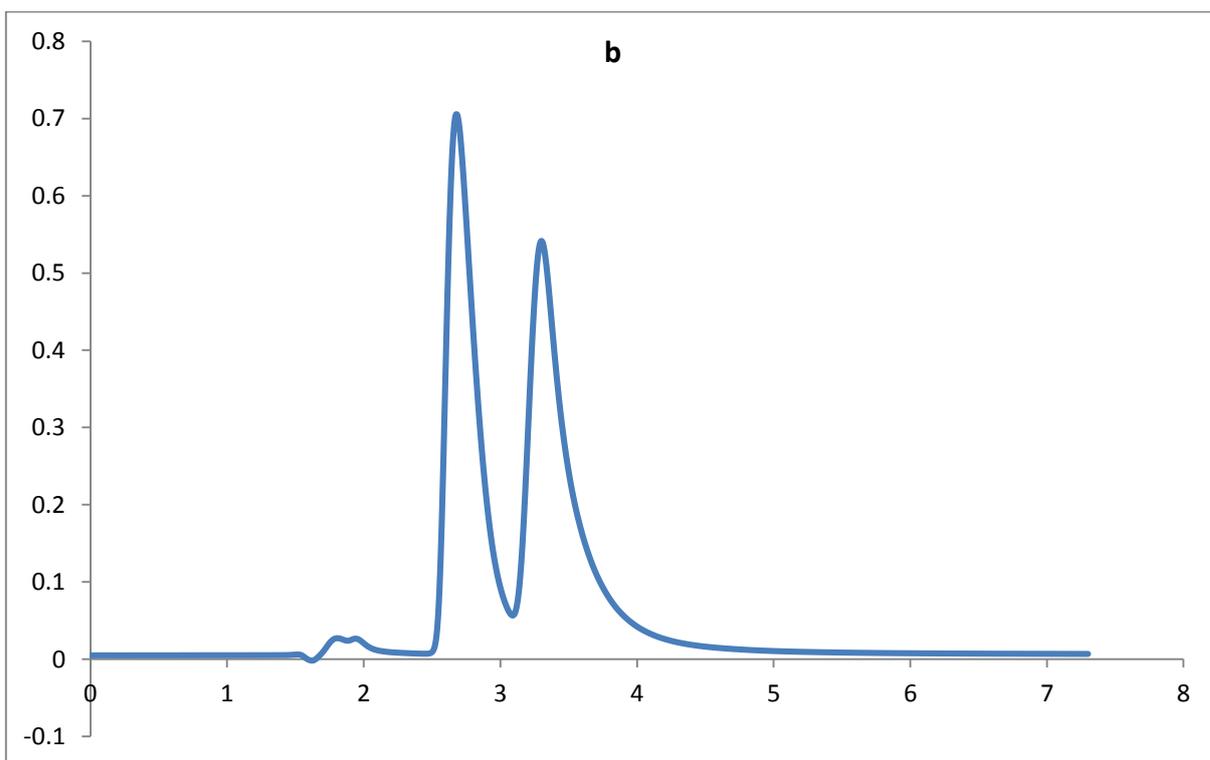
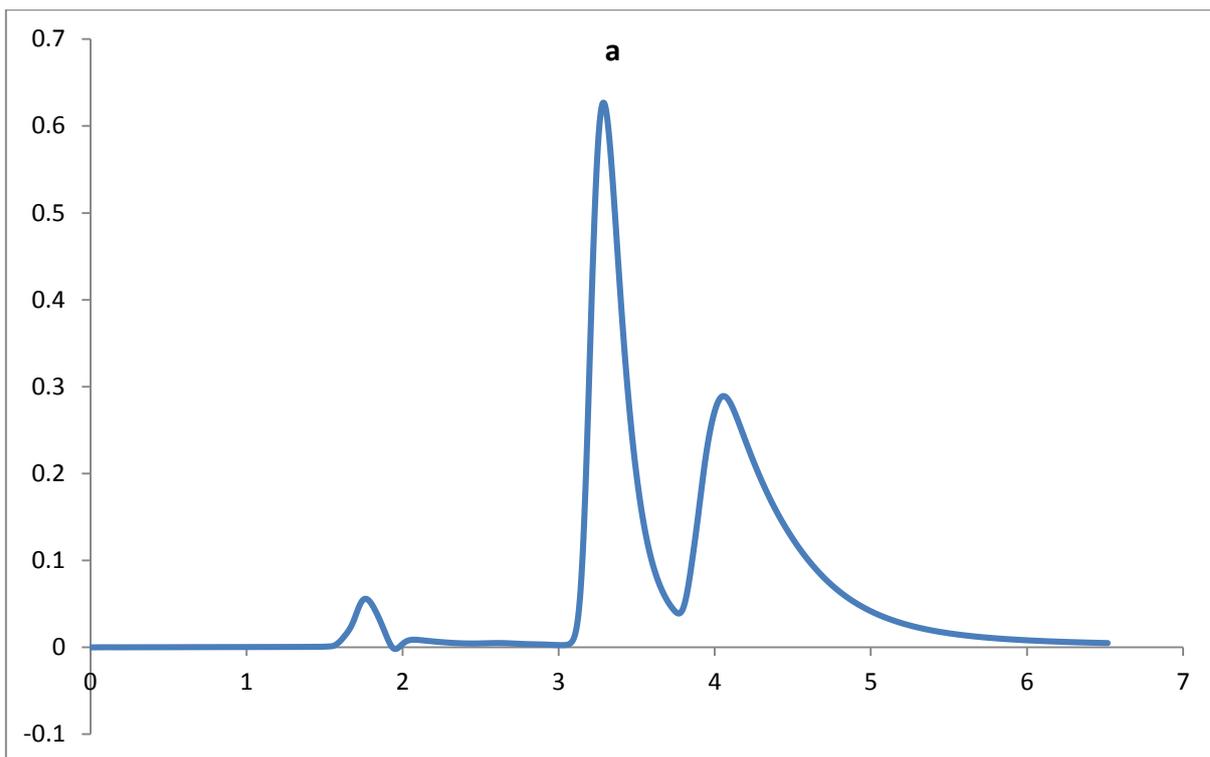


Figure 58. Chromatogrammes de l'acide mandélique a) dans la phase mobile ACN / MeOH / AcOH / TEA (2/98/0,1/0,1), b) dans la phase mobile ACN / MeOH / AcOH / TEA (40/60/0,1/0,1)

Tableau 18. Variation des facteurs de rétentions et des sélectivités des énantiomères avec les pourcentages du méthanol et du 2- propanol

P.M soluté	PM1		PM2		PM3		PM4		PM5	
	k_1	α								
1	0,67	1	0,81	1	0,88	1	1,44	1,15	2,07	1,16
2	1,72	1	2,12	1,12	2,65	1	3,00	1	3,65	1
8	1,03	1,50	1,42	1,43	1,52	1,41	1,79	1,49	2,66	1,33

P.M : phase mobile : 2-PrOH/MeOH/AcOH/TEA : v/v/v/v : (PM1: 3/97/0,1/0,1 ; PM2: 6/94/0,1/0,1 ; PM3: 20/80/0,1/0,1 ; PM4: 40/60/0,1/0,1 ; PM5 : 60/40/0,1/0,1)

k_1 : le facteur de rétention du premier énantiomère élué

α : la sélectivité,

Solutés : 1 : métoprolol, 2 : vérapamil, 8 : acide mandélique

D'après les résultats obtenus, les facteurs de rétentions de tous les solutés augmentent avec l'accroissement du pourcentage du 2- propanol. Cette phase mobile montre une sélectivité envers trois composés, mais les résolutions du métoprolol et du vérapamil restent incomplètes. La figure 59 montre les chromatogrammes de l'acide mandélique dans les phases mobiles : 2- propanol / méthanol /acide acétique / triéthylamine (3/97/0,1/0,1 et 60/40/0,1/0,1)

Nous avons aussi utilisé plusieurs phases mobiles constituées de dichlorométhane, de méthanol, d'acide et de la base, et nous avons fait varier les pourcentages des modificateurs organiques. Les composés qui ont montré une séparation avec cette phase mobile sont : le métoprolol, l'idazoxane et l'acide mandélique, mais la résolution de l'idazoxane est faible.

b) Phases mobiles à trois solvants organiques contenant le méthanol

Les phases mobiles à deux solvants organiques étudiées précédemment n'ont pas montré une bonne sélectivité envers certains composés. Dans le but d'améliorer la sélectivité de ces produits, nous avons utilisé des phases mobiles à trois solvants organiques. Les phases mobiles étudiées sont constituées de méthanol, d'éthanol, d'hexane mélangés avec les concentrations optimales d'acide acétique et de triéthylamine. Les phases mobiles étudiées et les résultats obtenus sont réunis dans le tableau 19. D'après les résultats obtenus, nous avons remarqué que l'ajout de l'hexane comme troisième modificateur organique n'est pas un facteur essentiel pour l'énantioséparation des composés étudiés.

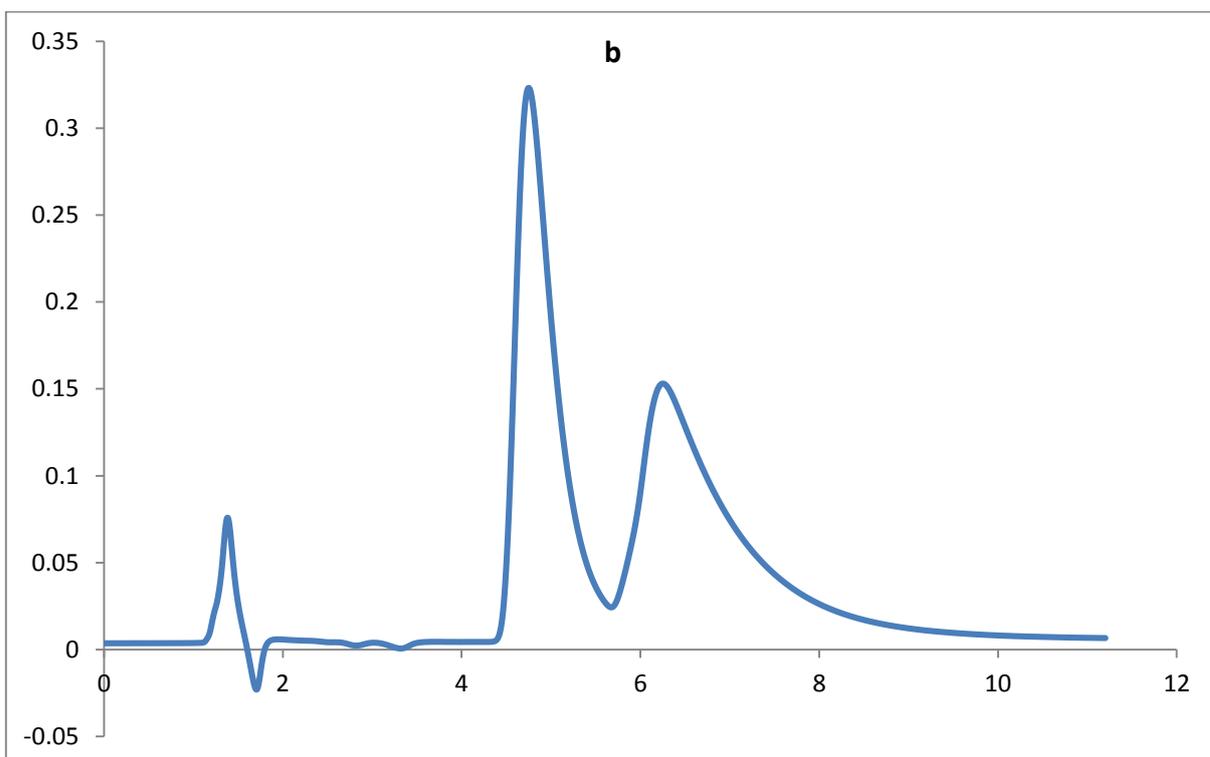
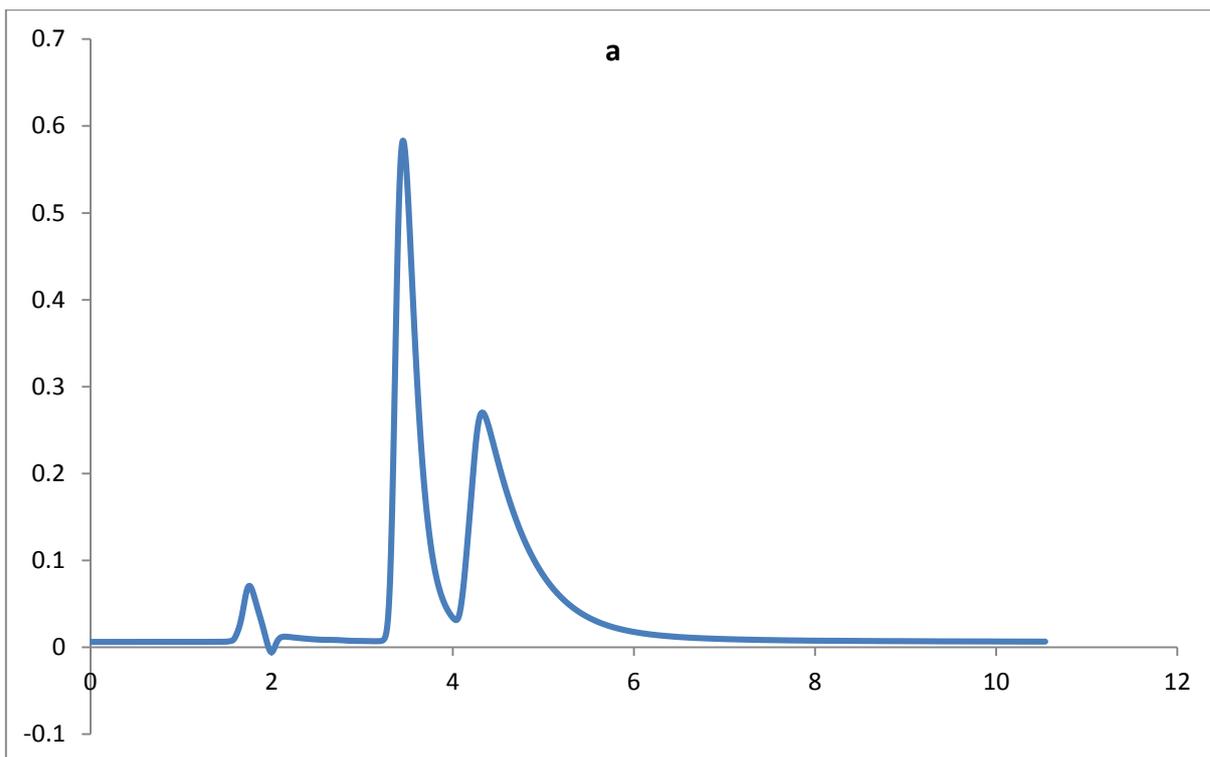


Figure 59. Chromatogrammes de l'acide mandélique a) dans la phase mobile 2-PrOH / MeOH / AcOH / TEA (3/97/0,1/0,1), b) dans la phase mobile 2-PrOH / MeOH / AcOH / TEA (40/60/0,1/0,1)

Tableau 19. Variation des facteurs de rétentions et des sélectivités des énantiomères avec les pourcentages du méthanol, d'éthanol et de l'hexane

soluté	P.M									
	PM1		PM2		PM3		PM4		PM5	
	k_1	α								
1	0,98	1,11	3,82	1,19	3,18	1,21	2,99	1,23	2,29	1,21
2	1,43	1	3,79	1	2,81	1	2,48	1	1,31	1,16
8	1,25	1,37	5,67	1,20	4,19	1,19	3,50	1,22	2,76	1,25

P.M : phase mobile : EtOH/MeOH/hexane/AcOH/TEA : v/v/v/v : (PM1: 20/70/10/0,1/0,1 ; PM2: 56/4/40/0,1/0,1 ; PM3: 66/4/30/0,1/0,1 ; PM4: 76/4/20/0,1/0,1 ; PM5 : 86/4/10/0,1/0,1)

k_1 : le facteur de rétention du premier énantiomère élué

α : la sélectivité,

Solutés : 1 : métoprolol, 2 : vérapamil, 8 : acide mandélique

c) Phases mobiles à deux solvants organiques sans méthanol

Après avoir étudié plusieurs phases mobiles contenant le méthanol, nous avons travaillé avec des phases mobiles à deux solvants organiques sans méthanol et nous avons évalué leurs effets sur la rétention et l'énantioséparation. Les phases mobiles étudiées sont constituées de d'acétonitrile, de dichlorométhane et des concentrations optimales d'acide et de base. Le vérapamil et l'acide mandélique ont été séparés dans ces phases mobiles mais avec des résolutions faibles.

Conclusion

La colonne chirale préparée à base de vancomycine a été exploitée dans la séparation de produits chiraux acides ou basiques. Certains d'entre eux ont été séparés avec succès, soit en mode inverse ou en mode polaire ionique. L'efficacité de la colonne est expliquée par la multiplicité des mécanismes de séparations liée à la présence de différents sites d'interactions avec les composés étudiés. La colonne peut être décrite comme étant robuste du fait qu'elle a été employée avec succès dans trois modes chromatographiques, et les résultats sont reproductibles.

VII- CONCLUSION GENERALE

Actuellement, étant donné que deux énantiomères peuvent présenter des effets complètement différents, le développement de méthodes analytiques de séparation chirale est devenu un sujet d'intérêt croissant dans de nombreux domaines tels que le contrôle de qualité des médicaments et des aliments, la chimie ou la biologie. Par conséquent, les industries pharmaceutiques s'orientent aujourd'hui largement vers la commercialisation d'un principe actif énantiomériquement pur. La production de ce dernier peut être réalisée selon deux stratégies distinctes : soit par la préparation du médicament optiquement pur par des méthodes de synthèses énantiosélectives, soit par la résolution des deux énantiomères du racémique par une méthode de discrimination chirale. Parmi les nombreuses méthodes de discrimination chirale, la cristallisation est l'une des principales méthodes de purification d'énantiomères.

La Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) représente une technique de choix pour l'analyse de la pureté énantiomérique étant donné qu'elle permet la séparation des racémiques sur des phases stationnaires chirales ou après addition de réactifs chiraux à la phase mobile. Un grand nombre de sélecteurs chiraux ont été préparés et utilisés avec succès en HPLC, parmi lesquels, les phases stationnaires chirales (PSCs) à base d'antibiotiques macrocycliques sont maintenant largement utilisées.

Dans ce travail, nous avons abordé une étude bibliographique sur les méthodes d'analyse d'un médicament, les différentes méthodes chromatographiques liquides ainsi que plusieurs aspects concernant la chiralité et les modes d'action des énantiomères d'un principe actif d'un point de vue biologique et pharmaceutique. Nous avons décrit par la suite les différentes PSCs utilisées en HPLC pour la résolution chirale.

Notre travail expérimental s'intéresse à la séparation de quelques substances pharmaceutiques chirales par chromatographie liquide à haute performance.

Dans un premier temps, nous avons procédé à la séparation de quelques substances pharmaceutiques chirales (ibuprofène, flurbiprofène et acide mandélique) par HPLC et HPLC-MS en utilisant des phases stationnaires chirales et achirales. La séparation de ces trois composés sur une colonne achirale a été réalisée avec succès en mode inverse en utilisant des phases mobiles polaires composées d'eau et d'un modificateur organique (acétonitrile).

La séparation des énantiomères a été effectuée sur des colonnes chirales de type polysaccharides avec de bonnes sélectivités et des temps de rétentions raisonnables.

Dans un deuxième temps, une colonne chirale à base de vancomycine, un antibiotique glycopeptidique, immobilisée par amination réductrice sur la surface de la silice fonctionnalisée aldéhyde a été préparée au laboratoire. Cette colonne nous a permis de séparer les énantiomères de six anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) de type profène (carprofène, ibuprofène, indoprofène, fénoprofène, flubiprofène et kétoprofène). Les paramètres de la phase mobile, comprenant la force ionique, le pH et les effets des modificateurs organiques ont été étudiés pour contrôler le facteur de rétention (k), de la sélectivité (α) et la résolution des énantiomères (R_s). Nous avons abouti à la séparation des six profènes avec la même phase mobile. La plupart des phases mobiles étudiées ont donné de bonne résolutions et sélectivités pour tous les profènes et des temps de rétentions raisonnables. La phase stationnaire vancomycine a montré sa haute performance, son énantiosélectivité et sa stabilité dans la gamme de pH étudiée.

Dans la troisième partie, la colonne chirale préparée à base de vancomycine a été utilisée dans la séparation de quelques substances pharmaceutiques chirales en utilisant trois modes chromatographiques : mode normale, mode polaire ionique et mode inverse. Cette colonne a permis la séparation de certains solutés avec une bonne sélectivité dans les différents modes.

L'efficacité de la colonne est expliquée par la multiplicité des mécanismes de séparations liée à la présence de différents sites d'interactions avec les composés étudiés.

La structure de la vancomycine et le nombre et la nature des fonctions présentes permettent différentes interactions : électrostatiques, hydrophobes, liaisons hydrogène, dipôle-dipôle, interactions π - π etc. entre l'analyte et la phase stationnaire.

En conclusion, les résultats obtenus montrent la haute performance de la colonne préparée dans les conditions d'analyses utilisées sans dégradation de la phase stationnaire. Les résultats obtenus se sont avérés être reproductibles et donc la colonne peut être décrite comme étant solide et robuste et peut être utilisé pour l'analyse de routine.

En perspective, ce travail peut être complété par l'étude de la pharmacocinétique des analytes étudiés en utilisant la colonne préparée à base de la vancomycine.

VII- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] US Food and Drug Administration, *Chirality* **4**, 338 (1992)
- [2] J. Knabe, H.P. Buch, G.A. Kirsch, *Arch. Pharm.* **320**, 323 (1987)
- [3] V.A. Davankov, *Adv. Chromatogr. A* **18**, 139 (1980)
- [4] W.H. Pirkle, J.A. Burke, *J. Chromatogr. A* **557**, 173 (1991)
- [5] J. Hermansson, *J. Chromatogr. A* **269**, 71 (1983)
- [6] E. Domenici, C. Bertucci, P. Salvadori, G. Felix, I. Cahagne, S. Motellier, I.W. Wainer, *Chromatographia* **29**, 170 (1990)
- [7] D.W. Armstrong, W. DeMond, *J. Chromatogr. Sci.* **22**, 411 (1984)
- [8] M. Pawlowska, S. Chen, D.W. Armstrong, *J. Chromatogr. A* **641**, 257 (1993)
- [9] K.R. Lindner, A. Mannschreck, *J. Chromatogr. A* **193**, 308 (1980)
- [10] Y. Okamoto, R. Aburatani, K. Hatada, *J. Chromatogr. A* **448**, 454 (1988)
- [11] T. Shinbo, T. Yamaguchi, K. Nishimura, M. Sugiura, *J. Chromatogr. A* **405**, 145 (1987)
- [12] M.H. Hyun, J. Sung, W. Lee, *J. Chromatogr. A* **822**, 155 (1998)
- [13] D.W. Armstrong, *Pittsburg Conference Abstracts, Pittcon, 1994*, p. 572
- [14] D.W. Armstrong, Y.B. Tang, S.S. Chen, Y.W. Zhou, C. Bagwill, J.-R. Chen, *Anal. Chem.* **66**, 1473 (1994)
- [15] D.W. Armstrong, K.L. Rundlett, G.L. Reid III, *Anal. Chem.* **66**, 1690 (1994)
- [16] D.W. Armstrong, Y. Liu, K.H. Ekborg-Ott, *Chirality* **7**, 474 (1995)
- [17] A. Berthod, Y. Liu, C. Bagwill, D.W. Armstrong, *J. Chromatogr. A* **731**, 123 (1996)
- [18] K.H. Ekborg-Ott, Y. Liu, D.W. Armstrong, *Chirality* **10**, 434 (1998)
- [19] A. Berthod, T. Yu, J.P. Kullman, D.W. Armstrong, F. Gasparrini, I. D'Acquarica, D. Misiti, A. Carotti, *J. Chromatogr. A* **897**, 113 (2000)
- [20] A. Berthod, X. Chen, J.P. Kullman, D.W. Armstrong, F. Gasparrini, I. D'Acquarica, C. Villani, A. Carotti, *Anal. Chem.* **72**, 1767 (2000)

- [21] J.Y. Ortholand, *Chem. & Eng.* **6**, 47 (1998)
- [22] H. Hoja, P. Marquet, B. Verneuil, H. Lotfi, B. Penicaut, G. Lachâtre, *J. Anal. Toxicol.* **21**, 116 (1997)
- [23] H. Hoja, P. Marquet, B. Verneuil, H. Lotfi, J.L. Dupuy, G. Lachâtre, *J. Chromatogr. B* **692**, 329 (1997)
- [24] A. Tracqui, P. Kintz, B. Ludes, P. Manguin, *J. Chromatogr. B* **692**, 101 (1997)
- [25] P. Zuccaro, R. Ricciarello, S. Pichini, R. Pacifici, I. Altieri, M. Pellegrini, G. D'ascenzo, *J. Anal. Toxicol.* **21**, 268 (1997)
- [26] R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, *Manuel Pratique de Chromatographie en Phase Liquide*, (éd. 1982)
- [27] V.G. Berezkin, Ed., *Chromatographic Adsorption Analysis: Selected Works of M.S. Tswett* (Ellis Horwood, New York, USA 1990)
- [28] A.J.P. Martin, R.L.M. Synge, *Biochem. J.* **35**, 1358 (1941)
- [29] G.A. Howard, A.J.P. Martin, *Biochem. J.* **46**, 532 (1950)
- [30] C.S. Horvath, S.R. Lipsky, *Nature* **211**, 748 (1966)
- [31] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2nd edition, John Wiley and Sons, New York, 552 (1974)
- [32] I. Halasz, C. Horvath, *Nature* **197**, 71 (1963)
- [33] R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, *Chromatographie en Phase Liquide et Supercritique*, Paris, (éd. 1991)
- [34] P.J. Arpino, M.A. Baldwin, F.W. Mc Lafferty, *Biomed. Mass Spectrom.* **1**, 80 (1974)
- [35] W.M.A. Niessen, A.P. Tinke, *J. Chromatogr. A* **703**, 37 (1995)
- [36] R. Botter, G. Bouchoux, *Techniques de l'ingénieur, Spectrométrie de masse.*
- [37] E.D. Hoffmann, J. Charrette, V. Stroobant, *Spectrométrie de masse, Cours et exercices corrigés*, Dunod (1999)

- [38] C. Wang, *Austin Chromatogr.* **2**, 1032 (2015)
- [39] M.S. Wilm, M. Mann, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **136**, 167 (1994)
- [40] J.B. Fenn, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **4**, 524 (1993)
- [41] O. Núñez, E. Moyano, M.T. Galceran, *Trends in Anal. Chem.* **24**, 683 (2005)
- [42] I. Marchi, S. Rudaz, J.L. Veuthey, *Talanta* **78**, 1 (2009)
- [43] T.J. Kauppila T. Kuuranne, E.C. Meurer, M.N. Eberlin, T. Kotiaho, R. Kostiainen, *Anal. Chem.* **74**, 5470 (2002)
- [44] J. Lembcke, U. Ceglarek, G.M. Fiedler, S. Baumann, A. Leichtle, J. Thiery, *J. Lipid Res.* **46**, 21 (2005)
- [45] N. Yoshioka, Y. Akiyama, K. Teranishi, *J. Chromatogr. A* **1022**, 145 (2004)
- [46] E.A. Straube, W. Dekant, W. Volkel, *J Am. Soc. Mass Spectrom.* **15**, 1853 (2004)
- [47] L.H. Easson, E. Stedman, *Biochem. J.* **27**, 1257 (1933)
- [48] A.G. Ogston, *Nature* **162**, 963 (1948)
- [49] C.E. Dalgliesh, *J. Chem. Soc.* **137**, 3940 (1952)
- [50] P.Y. Bruice, *Organic Chemistry, Fourth Edition*, Prentice Hall 182 (2003)
- [51] M. Zaher, "Nouveaux sélecteurs chiraux à base d'aminoglycosides pour la séparation chirale par échange de ligands", Thèse de doctorat (2010)
- [52] L.A. Nguyen, H. He, C. Pham-Huy, *Int. J. Biomed. Sci.* **2**, 85 (2006)
- [53] K. Zwingenberger, S. Wnendt, *J. Inflamm.* **46**, 177 (1995-96)
- [54] P. D'Arcy, J. Griffin, *Adverse Drug React. Toxicol. Rev.* **13**, 65(1994)
- [55] W.G. McBride, *Lancet* **2**, 1358 (1961)
- [56] H. Ockenfels, F. Köhler, *Experientia* **26**, 1236 (1970)
- [57] <https://fr.wikipedia.org/wiki/Thalidomide>

- [58] N. Calvey, N. Williams, Principles and Practice of Pharmacology for Anaesthetists, Blackwell Publishing, Fifth edition 67 (2008)
- [59] S. Kirkiacharian, Techniques de l'ingénieur **1**, 3340 (2005)
- [60] J.H.L. Spelberg, Enantioselective biocatalytic conversions of epoxydes, Rijksuniversiteit Groningen, these de doctorat (2003)
- [61] A.W. Lloyd, Drug Discv. Today **2**, 127 (1997)
- [62] H. Kagan, L'actualité chimique **10** (2003)
- [63] R. Hegstrom, D.K. Kondepudi, Sci. Am. **262**, 108 (1990)
- [64] K. Maeda, R.A. Miller, R.H. Szumigala, A. Shafiee, S. Karady, J.D. Armstrong, Tetrahedron Lett. **46**, 1545 (2005)
- [65] X. Yuan, J. Li, Y. Tian, G.H. Lee, X.M. Peng, R. Zhu, X. You, Tetrahedron-Asymmetr. **12**, 3015 (2001)
- [66] J. Bojarski, Chem. Anal. (Warsaw) **42**, 139 (1997)
- [67] F. Gasparri, D. Misiti, C. Villani, J. Chromatogr. A **906**, 35 (2001)
- [68] L. Lepri, J. Planar Chromatogr. –Mod. TLC **10**, 320 (1997)
- [69] H.Y. Aboul-Enein, M.I. El-Awady, C.M. Heard, P.J. Nicholls, Biomed. Chromatogr. **13**, 531 (1999)
- [70] V. Schurig, J. Chromatogr. A, **906**, 275 (2001)
- [71] G. Terfloth, J. Chromatogr. A **906**, 301 (2001)
- [72] P. Petersson, K.E. Markides, J. Chromatogr. A **666**, 381(1994)
- [73] N.M. Maier, P. Franco, W. Lindner, J. Chromatogr. A **906**, 3 (2001)
- [74] G. Gübitz, M.G. Schmid, Biopharm. Drug Dispos. **22**, 291 (2001)
- [75] W.H. Pirkle, T.C. Pochapsky, Chem. Rev. **89**, 347 (1989)
- [76] A. Berthod, Anal. Chem. **78**, 2093 (2006)

- [77] W.H. Pirkle, D.L. Sikkenga, *J. Chromatogr. A*, **123**, 400 (1976)
- [78] S.R. Perrin, W.H. Pirkle, (Ahuja, S., ed.), *ACS Symposium Series 471*, Am. Chem. Soc., Washington 43 (1991)
- [79] W.H. Pirkle, C.J. Welch. B. Lamm, *J. Org. Chem.* **57**, 3854 (1992)
- [80] W.H. Pirkle, C.J. Welch, *Tetrahedron-Asymmetr* **5**, 777 (1994)
- [81] M. H. Hyun, Y. J. Cho, "Chiral Separation by HPLC With Pirkle-Type Chiral Stationary Phase, in *Chiral Separation, Methods and Protocols*", (Gübitz G. and Schmid M.G., eds), *Methods Mol. Biol.*, Humana Press Inc. **243**, 197 (2004)
- [82] A. Dobashi, Y. Dobashi, S. Hara, *J. Liq. Chromatogr.* **9**, 243 (1986)
- [83] M. Haroun, "Phases stationnaires chirales à base de teicoplanine et d'aminoglycosides pour la séparation d'énantiomères d'acides aminés", Thèse de doctorat (2007)
- [84] R. Gotti, V. Cavrini, V. Andrisano, G. Macellani, *J. Chromatogr. A* **814**, 205 (1998)
- [85] E. Belloli, C. Foulon, S. Yous, M.P. Vaccher, J.P. Bonte, C. Vaccher, *J. Chromatogr. A* **907**, 1001 (2001)
- [86] P. Franco, A. Senso, L. Oliveros, C. Minguillon, *J. Chromatogr. A* **906**, 155 (2001)
- [87] Y.K. Ye, K.G. Lynam, R.W. Stringham, *J. Chromatogr. A* **1041**, 211 (2004)
- [88] Y.K. Ye, B.S. Lord, L. Yin, R.W. Stringham, *J. Chromatogr. A* **945**, 147 (2002)
- [89] A. Ceccato, B. Boulanger, P. Chiap, PH. Hubert, J. Crommen, *J. Chromatogr. A* **819**, 143 (1998)
- [90] Y. Okamoto, E. Yashima, *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 1020 (1998)
- [91] C. Yamamoto, Y. Okamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **77**, 227 (2004)
- [92] B. Chankvetadze, L. Chankvetadze, S. Sidamonidze, E. Yashima, Y. Okamoto, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **14**, 1295 (1996)
- [93] G. Blaschke, J. Maibaum, *J. Chromatogr. A* **366**, 329 (1986)
- [94] G. Blaschke, *J. Liq. Chromatogr. A* **9**, 341 (1986)

- [95] Y. Okamoto, Y. Kaida, J. Chromatogr. A **666**, 403 (1994)
- [96] E. Yashima, K. Maeda, Y. Okamoto, Nature **399**, 449 (1999)
- [97] Y. Okamoto, T. Nakano, S. Habaue, K. Shiohara, K. Maeda, J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem. **34**, 1771 (1997)
- [98] K. Zhang, R. Krishnaswami, L. Sun, Anal. Chim. Acta **496**, 185 (2003)
- [99] T. Nakano, J. Chromatogr. A **906**, 205 (2001)
- [100] Y. Okamoto, E. Yashima, Macromolecular Design of polymeric materials, Dekker, New York (1997)
- [101] C.P. Clark, B. Snider, P.B. Bowman, J. Chromatogr. A **408**, 275 (1987)
- [102] G. Blaschke, W. Broker, W. Frankel, Angew. Chem. Int. Ed. **25**, 830 (1986)
- [103] M. Vinodh, F.H. Alipour, A.A. Mohamod, T.F. Al-Azemi, Molecules, **17**, 11763 (2012)
- [104] L. Liu, Q.-X. Guo, J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. **42**, 1 (2002)
- [105] F. Bressolle, M. Audran, T.-N. Pham, J.-J. Vallon, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. **687**, 303 (1996)
- [106] M. Caude, N. Bargmann-Leyder, "Séparations chirales par CPL, CPS et CPG", Techniques de l'ingénieur **1**, 1470 (2001)
- [107] C.J. Pedersen, J. Am. Chem. Soc. **89**, 2495 (1967)
- [108] E. Kim, Y. Koo, D.S. Chung, J. Chromatogr. A **1045**, 119 (2004)
- [109] Y. Mori, K. Ueno, T. Umeda, J. Chromatogr. A **757**, 328 (1997)
- [110] M. Blanco, I. Valverde, Trends Anal. Chem. **22**, 428 (2003)
- [111] V.A. Davankov, S.V. Rogozhin, J. Chromatogr. A **60**, 280 (1971)
- [112] V. Schurig, J. Chromatogr. A, **965**, 315 (2002)
- [113] R. Bhushan, D. Gupta, J. Planar Chromat. **19**, 241 (2006)
- [114] K. Günther, J. Chromatogr. A, **448**, 11 (1988)

- [115] V. Schurig, M. Fluck, J. Biochem. Biophys. Meth. **43**, 223 (2000)
- [116] I. Ilisz, D. Tourwé, D.W. Armstrong, A. Péter, Chirality **18**, 539 (2006)
- [117] E. Gassman, J.E. Kuo, R.N. Zare, Science, **230**, 813 (1985)
- [118] M.G. Schmid, N. Grobuschek, C. Tuscher, G. Gubitz, A. Vegvari, E. Machtejevas, A. Maruska, S. Hjerten, Electrophoresis **21**, 3141 (2000)
- [119] J. Haginaka, "Protein Stationary Phases, in Encyclopedia of separation science", (I.D. Wilson, E.R. Adlar, M. Cook, C.F. Pool, eds.), Academic Press 2397 (2000)
- [120] J. Haginaka, J. Chromatogr. A **906**, 253 (2001)
- [121] J. Hermansson, Trends Anal. Chem. **8**, 251 (1989)
- [122] T. Miwa, T. Miyakawa, M. Kayano, Y. Miyake, J. Chromatogr. A **408**, 316 (1987)
- [123] A. Ahmed, D.K. Lloyd, J. Chromatogr. A **766**, 237 (1997)
- [124] X. Zhang, E.W. Davidian, T.H. Nguyen, R.W. Evans, J. Im Sung, G.E. Barker, J. Chromatogr. A **745**, 1 (1996)
- [125] D. Eberle, R.P. Hummel, R. Kuhn, J. Chromatogr. A, **759**, 185 (1997)
- [126] J. Haginaka, Y. Miyano, Y. Saizen, C. Seyama, T. Murashima, J. Chromatogr. A **708**, 161 (1995)
- [127] J. Haginaka, T. Murashima, C. Seyama, J. Chromatogr. A **666**, 203 (1994)
- [128] N.M. Maier, W. Lindner, "Stereoselective Chromatographic Methods for Drug Analysis, in Chirality in drug research", (E. Francotte and W. Lindner, eds.), WILEY-VCH **33**, 189 (2006)
- [129] H. Henriksson, J. Stahlberg, R. Isaksson, G. Pettersson, FEBS Lett. **390**, 339 (1996)
- [130] H. Henrihsson, L.G. Munoz, R. Isaksson, C. Pettersson, G. Pettersson, J. Chromatogr. A **898**, 63 (2000)
- [131] H. Henriksson, S. Jönsson, R. Isaksson, G. Pettersson, Chirality **7**, 415 (1995)

- [132] R. Isaksson, C. Pettersson, G. Pettersson, S. Jönsson, J. Stalberg, J. Hermansson, I. Marle, *Trends Anal. Chem.* **13**, 431 (1994)
- [133] D.W. Armstrong, K.L. Rundlett, J.R. Chen, *Chirality* **6**, 496 (1994)
- [134] T.J. Ward, A.B. Farris, *J. Chromatogr. A* **906**, 73 (2001)
- [135] R. Bhushan, V. Parashad, *J. Chromatogr. A* **736**, 235 (1996)
- [136] F. Hui, K.H. Ekborg-Ott, D.W. Armstrong, *J. Chromatogr. A* **906**, 91 (2001)
- [137] A.S. Carter-finich, N.W. Smith, *J. Chromatogr. A* **848**, 375 (1999)
- [138] K. Petrusevska, M.A. Kuznestov, K. Gedicke, V. Meshko, S.M. Staroverov, A. Seidel-Morg Morgenstern, *J. Sep. Sci.* **29**, 1447 (2006)
- [139] D.W. Armstrong, U.B. Nair, *Electrophoresis* **18**, 2331 (1997)
- [140] T.J. Ward, C. Dann III, A. Blaylock, *J. Chromatogr. A* **715**, 337 (1995)
- [141] T.J. Ward, T.M. Oswald, *J. Chromatogr. A* **792**, 309 (1997)
- [142] D.W. Armstrong, K.L. Rundlett, *J. Liq. Chromatogr.* **18**, 3659 (1995)
- [143] D.W. Armstrong, M.P. Gasper, K.L. Rundlett, *J. Chromatogr. A* **689**, 285 (1995)
- [144] T.J. Ward, K.D. Ward, *The impact of Stereochemistry on drug Development and Use*, (H. –Y. Aboul Enein, I. Wainer, eds), John Wiley & Sons, New York, (1997)
- [145] P.T. Ying, J.G. Dorsey, *Talanta* **38**, 237 (1991)
- [146] M.A. Campanero, B. Sabada, E. Garcia-Quetglas, J.R. Azanza, *J. Chromatogr. B* **706**, 311 (1998)
- [147] Cs. Horvath, W. Melander, I. Molnar, *J. Chromatogr.* **125**, 129 (1976)
- [148] W.J. Cheong, P.W. Carr, *Anal. Chem.* **61**, 1524 (1989)
- [149] P.J. Shoenmakers, H.A.H. Billiet, L. de Galan, *J. Chromatogr.* **185**, 179 (1979)
- [150] E.J. Van Scott, R.J. Yu, *Cutis* **43**, 222 (1989)
- [151] S.S. Adams, P. Bresloff, C.G. Mason, *J. Pharm. Pharmacol.* **28**, 256 (1976)

- [152] A.J. Hutt, J. Caldwell, *J. Pharm. Pharmacol.* **35**, 693 (1983)
- [153] A.M. Evans, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **42**, 237 (1992)
- [154] N.M. Davies, *Clin. Pharmacokinet.* **34**, 101 (1998)
- [155] M.E. Anderson, D. Aslan, A. Clarke, J. Roeraade, G. Hagman, *J. Chromatogr. A* **1005**, 83 (2003)
- [156] J. Szymura-Oleksiak, M. Walczak, J. Bojarski, H.Y. Aboul-Enein, *Chirality* **11**, 267 (1999)
- [157] Y. Okamoto, R. Aburatani, Y. Kaida, K. Hatada, N. Inotsume, M. Nakano, *Chirality* **1**, 239 (1989)
- [158] A. Ducret, M. Trani, P. Pepin, R. Lortie, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **16**, 1225 (1998)
- [159] X.W. Teng, S.W.J. Wang, N.M. Davies, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **33**, 95 (2003)
- [160] E. Ameyibor, J.T. Stewart, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **20**, 855 (1997)
- [161] M. Pawlowska, S. Chen, D.W. Armstrong, *J. Chromatogr. A* **641**, 257 (1993)
- [162] B. Mistry, J.L. Leslie, D.N. Eddington, *J. Chromatogr. B* **758**, 153 (2001)
- [163] K.H. Ekborg-Ott, J.P. Kullman, X. Wang, K. Gahm, L. He, D.W. Armstrong, *Chirality* **10**, 627 (1998)
- [164] F. Pehourcq, C. Jarry, B. Bannwarth, *Biomed. Chromatogr.* **15**, 217 (2001)
- [165] Z. Bosáková, E. Cuřínová, E. Tesařová, *J. Chromatogr. A* **1088**, 94 (2005)
- [166] M.A. Kuznetsov, P.N. Nesterenko, G.G. Vasiyarov, S.M. Staroverov, *Appl. Biochem. Microbiol.* **42**, 536 (2006)
- [167] R. Cirilli, F. La Torre, *J. Chromatogr. A* **818**, 53 (1998)
- [168] F. Barbato, C. Carpentiero, L. Grumetto, M.I. La Rotonda, *Eur. J. Pharm. Sci.* **38**, 472 (2009)
- [169] E. Calleri, G. Massolini, D. Lubda, C. Temporini, F. Loiodice, G. Caccialanza, *J. Chromatogr. A* **1031**, 93 (2004)

- [170] F.C. Normand, D.M. Goudall, S.B. Duckett, M.F.H. Van-Tol, *Chromatographia* **55**, 307 (2002)
- [171] B. Kafková, Z. Bosáková, E. Tesařová, P. Coufal, A. Messina, M. Sinibaldi, *Chirality* **18**, 531 (2006)
- [172] L.A. Svensson, K-E. Karlsson, *J. Microcol. Sep.* **7**, 231 (1995)
- [173] L.A. Svensson, K-E. Karlsson, A. Karlsson, J. Vessman, *Chirality* **10**, 273 (1998)
- [174] K. Takács-Novák, B. Noszál, M. Tóké-Kövesdi, G. Szász, *Int. J. Pharm.* **89**, 261 (1993)
- [175] J.L.H. Johnson, S.H. Yalkowsky, *AAPS. PharmSciTech.* **7**, 33 (2006)
- [176] I. Ilisz, R. Berkecz, A. Péter, *J. Chromatogr. A* **1216**, 1845 (2009)
- [177] N.L. Holder, T-M. Chen, A.C. Matlinger, *Chirality* **17**, S84 (2005)
- [178] K.W. Phinney, L.C. Sander, *Anal. Bioanal. Chem.* **372**, 101 (2002)
- [179] A.X. Wang, J.T. Lee, T.E. Beesley, *LCGC* **18**, 626 (2000)
- [180] E. Calleri, E. De Lorenzi, D. Siluk, M. Markuszewski, R. Kaliszan, G. Massolini, *Chromatographia* **55**, 651 (2002)

ملخص

العديد من الجزيئات الصيدلانية تحتوي على مركز غير متمائل أو أكثر مما يؤدي إلى خلق متماكبات ضوئية ذات خصائص دوائية مختلفة. في مراحل متعاقبة من تطوير الأدوية، يتم تحليل المتماكبات الضوئية للجزيئات بواسطة تقنيات الكروماتوغرافيا لتحديد نقاوتها الضوئية. تمثل الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) مع استخدام طور ثابت كيرال (CSP) حاليا الأسلوب المفضل لفصل المتماكبات الضوئية. تم تحضير عمود كيرال ببتيدي سكري من فئة المضادات الحيوية في المختبر عن طريق تثبيت فانكوميسين على ديول السيليكا، حيث ساعد على فصل متماكبات ضوئية لستة مواد مضادة للالتهاب غير الستيرويدية (المسكنات) من نوع بروفين مع انتقائية جيدة جدا. وقد تم استغلال هذا العمود في فصل مركبات دوائية أخرى حمضية أو قاعدية. العمود المحضر أظهر شدة، وانتقائية عالية واستقرار في مجال من درجة الحموضة. كما استخدمت أنواع أخرى من الأعمدة كيرال (Pirkle والسكريات). سمحت بفصل المتماكبات الضوئية لبعض المواد الدوائية الحمضية.

كلمات مفتاحية: فصل كيرال، انتقاء تماكبي، الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء، طور ثابت كيرال، فانكوميسين.

Résumé

Un grand nombre de molécules pharmaceutiques présente un ou plusieurs centres asymétriques donnant naissance à des énantiomères de propriétés pharmacologiques différentes. Lors des étapes successives de développement d'un médicament, les énantiomères de toute molécule chirale sont analysés par les techniques chromatographiques afin de déterminer leur pureté énantiomérique. La chromatographie liquide haute performance (CLHP) avec l'utilisation d'une phase stationnaire chirale (PSC) constitue à l'heure actuelle la méthode de choix pour séparer des énantiomères. Une colonne chirale de type antibiotique glycopeptidique, préparée au laboratoire par immobilisation de la vancomycine sur la silice fonctionnalisée diol, a permis de séparer les énantiomères de six anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) de type profène avec de très bonnes sélectivités. Cette colonne a été exploitée dans la séparation d'autres composés pharmaceutiques acides ou basiques. La colonne préparée est robuste et présente une grande stabilité et sélectivité dans une gamme de pH. D'autres types de phase stationnaire (polysaccharides et Pirkle) ont été utilisés. Elles ont permis la séparation des énantiomères de quelques substances pharmaceutiques acides.

Mots clés : Séparation chirale, Enantiosélectivité, Chromatographie liquide haute performance, Phase stationnaire chirale, Vancomycine.

Summary

A large number of pharmaceutical drugs possess one or more asymmetric centers giving rise to enantiomers whose pharmacological properties and toxicity are often different. At successive stages of drug discovery, the enantiomers of any chiral molecule are analyzed by chromatographic techniques to determine its enantiomeric purity. The high performance liquid chromatography (HPLC) using a chiral stationary phase represents at present time the method of choice to separate enantiomers. A chiral stationary phase (CSP) was prepared by attachment of macrocyclic glycopeptide antibiotic vancomycin to silica diol. The home prepared sorbent exhibits high enantioselectivity in the separation of six non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) profens. This column has been investigated in the separation of other pharmaceutical compounds acidic or basic. The prepared column is robust and has a high selectivity and stability over a range of pH. Other types of stationary phase (Pirkle and polysaccharides) were used. They allowed the separation of the enantiomers of some acidic pharmaceutical substances.

Key words : Chiral separation, Enantioselectivity, High performance liquid Chromatography, Chiral stationary phase, Vancomycin.