



HAL
open science

Cyclodextrines hydrophiles : caractérisation et étude de leurs propriétés énantiométriques et complexantes. Utilisation de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse.

Romain Jacquet

► **To cite this version:**

Romain Jacquet. Cyclodextrines hydrophiles : caractérisation et étude de leurs propriétés énantiométriques et complexantes. Utilisation de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse.. Autre. Université d'Orléans, 2006. Français. NNT : . tel-00185542

HAL Id: tel-00185542

<https://theses.hal.science/tel-00185542>

Submitted on 6 Nov 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE D'ORLEANS

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE D'ORLEANS

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ORLEANS

Discipline : Chimie et physicochimie des composés d'intérêt biologique

PAR

Romain JACQUET

Cyclodextrines hydrophiles : caractérisation et étude de leurs propriétés énantiométrique et complexante. Utilisation de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse

Soutenue publiquement le 22 novembre 2006

Membres du jury

M. Denis WOUESSIDJEWÉ	Président	Professeur à l'Université de Grenoble
M. Jean-Luc VEUTHEY	Rapporteur	Professeur à l'Université de Genève
M. Olivier LAPREVOTE	Rapporteur	Directeur de recherche CNRS à l'ICSN de Gif sur Yvette
Mme Claire ELFAKIR	Examinatrice	Professeur à l'Université d'Orléans
M. Michel LAFOSSE	Examineur	Professeur à l'Université d'Orléans

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés à l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), au sein du laboratoire des sciences analytiques, sous la direction des professeurs Michel Lafosse et Claire Elfakir. Je tiens à leur adresser ma profonde gratitude pour m'avoir suivi pendant ces quatre années, pour la confiance qu'ils m'ont témoignée et pour leur constant soutien.

Je remercie également le professeur Gérard Guillaumet, ancien directeur de l'ICOA, de m'avoir permis d'intégrer son institut.

Je tiens à exprimer ma vive reconnaissance au professeur Jean-Luc Veuthey de l'Université de Genève et à Olivier Laprévotte, directeur de recherche à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif sur Yvette pour avoir accepté de juger ces travaux et d'en être les rapporteurs. Je remercie également le professeur Denis Wouessidjewe de l'Université de Grenoble d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je souhaite également remercier les enseignants chercheurs du laboratoire, Philippe Morin, Patrick Chaimbault, Patrick Favetta, Raphael Delepée, Caroline West et Emilie Destandau pour leurs conseils et leur soutien.

Je tiens à remercier Karim Keddadouche pour m'avoir formé à l'utilisation des spectromètres de masse ainsi que pour son aide, sa sympathie et sa grande disponibilité.

Je remercie tout spécialement les docteurs et doctorants avec qui j'ai partagé cette expérience unique, Marine de Person, Vincent Bézy, Aristotelis Antonopoulos, Marie Lorin et Raluca Chirita pour les nombreuses discussions, scientifiques ou non, que nous avons eues, pour leur sympathie et pour leur soutien.

Je veux également remercier mes amis et collègues du laboratoire, Bérengère Claude, Pascale Denis, Alexandre Darré, Sandrine Zubrzycki, Franck Himbert, Martine Beaufour, Bérengère Merelli, Marie-Elisabeth Lucchesi, Azziz Assoumani, Boutayna Rhourri, Rodolphe Pennanec, Barbara de Beaunay, Sébastien Durix, Borja Garcia Calvo, Raquel Alvaro Bruna et tous les autres, pour leur patience, leur aide et les échanges de toutes sortes que nous avons pu entretenir. De même, je remercie le personnel technique et administratif de l'ICOA de m'avoir permis d'effectuer ces travaux dans de bonnes conditions.

Enfin, je voudrais remercier la Région Centre pour son apport financier à la réalisation de ces travaux.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

Liste des abréviations	9
Introduction générale	10
CHAPITRE 1 – Etude bibliographique	13
I. GENERALITES SUR LES CYCLODEXTRINES	14
I.1. Historique	14
I.2. Production, structure et caractéristiques physicochimiques	16
I.2.1. Production	16
I.2.2. Structure	17
I.2.3. Caractéristiques physicochimiques	18
I.3. Propriétés des cyclodextrines et applications	19
I.3.1. Propriété de complexation des CDs	19
I.3.1.1. Généralités sur la complexation	19
I.3.1.2. Les « forces conductrices » de la complexation	20
I.3.1.3. Conséquences de la complexation et applications	22
I.3.2. Propriété de reconnaissance chirale des CDs	24
I.3.2.1. Origine de la propriété de reconnaissance chirale	24
I.3.2.2. Applications des CDs en chimie analytique	25
I.4. Les cyclodextrines modifiées	26
I.4.1. But des modifications	26
I.4.2. Difficultés des modifications	27
I.4.3. Exemples de CDs modifiées	27
II. LES b-CYCLODEXTRINES SULFOBUTYLEES ET METHYLEES	28
II.1. Les sulfobutyléther-b-cyclodextrines (SBE-b-CDs)	28
II.1.1. Synthèse	28
II.1.2. Propriétés et applications	29
II.1.3. Caractérisation des SBE- β -CDs	30
II.2. Les b-cyclodextrines méthylées (Me-b-CDs)	36
II.2.1. Généralités	36
II.2.2. Caractérisation des DM- β -CDs	37
III. CONCLUSIONS	41
IV. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	42

Chapitre 2 – Caractérisation de b-cyclodextrines sulfobutylées et méthylées	45
INTRODUCTION	46
A. ANALYSE DE LA SBE-b-CD MONOSUBSTITUEE	47
I. INTRODUCTION	47
II. LE CARBONE GRAPHITE POREUX (PGC)	48
II.1. Structure du PGC	48
II.2. Propriétés physiques du PGC	49
II.3. Mécanismes de rétention du PGC	50
II.4. Applications du PGC à l'analyse de composés saccharidiques	50
III. RESULTATS ET DISCUSSIONS	51
III.1. Détection des SBE-b-CDs	51
III.2. Composition de la phase mobile	51
III.3. Influence de la température	52
III.4. Influence du pourcentage d'acétonitrile	55
III.5. Influence de la concentration en sel	56
IV. CONCLUSIONS	58
B. CARACTERISATION D'UNE ME-b-CD FAIBLEMENT SUBSTITUEE	59
I. INTRODUCTION	59
II. RESULTATS ET DISCUSSIONS	61
II.1. Analyse par RMN	61
II.2. Analyse par CPL	61
II.3. Analyse par MALDI-SM	67
II.4. Analyse par ESI-SM	72
II.4.1. Influence de la composition du solvant d'infusion	73
II.4.2. Influence du débit d'infusion	76
II.4.3. Influence du sel	77
II.4.4. Influence de la concentration en Me-β-CD	77
II.4.5. Détermination du DS moyen et du profil de substitution	78
II.4.6. Analyse par CPL-ESI-SM	79
II.5. Choix du support chromatographique pour la caractérisation des Me-b-CDs par RPLC	82
III. CONCLUSIONS	84
IV. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	85

Chapitre 3 – Evaluation du système chromatographique Carbone Graphite Poreux / β -cyclodextrines méthylées pour la séparation chirale en CPL

88

I. INTRODUCTION	89
I.1. Utilisation des CDs en tant que sélecteurs chiraux dans la phase mobile en CPL	89
I.2. Les séparations chirales sur carbone graphite poreux	90
I.3. Objectifs	92
II. PRESENTATION DES EXPERIENCES EFFECTUEES	93
III. RESULTATS ET DISCUSSIONS	96
III.1. Détermination des quantités de DM-β-CD adsorbées sur le PGC	96
III.1.1. Influence de la concentration de DM- β -CD dans la phase mobile	97
III.1.2. Influence du pourcentage d'ACN dans la phase mobile	99
III.2. Influence de la concentration de DM-β-CD dans la phase mobile	100
III.3. Influence de la proportion d'ACN dans la phase mobile	104
III.4. Influence du type de DM-β-CD utilisée	107
III.5. Influence de la température de la colonne	109
III.6. Influence de la phase stationnaire	112
III.7. Etude du mécanisme de reconnaissance chirale	117
IV. CONCLUSIONS	122
V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	123

Chapitre 4 – Etude des complexes de cyclodextrines par expériences de partage liquide-liquide et par spectrométrie de masse à ionisation électrospray

126

I. INTRODUCTION	127
II. ETUDES DES COMPLEXES PAR EXPERIENCES DE PARTAGE	129
II.1. Présentation des expériences de partage	129
II.1.1. Principes des expériences de partage	129
II.1.2. Présentation du système biphasique utilisé	130
II.2. Etude du système biphasique	131
II.2.1. Etude de l'influence de la composition de la phase organique sur le partage	132
II.2.2. Etude de l'influence de la composition de la phase aqueuse sur le partage	134
II.2.3. Etude de l'influence de la quantité de CDs ajoutée sur le partage	136

II.3. Etude de l'influence du degré de substitution des Me-b-CDs sur la complexation	138
II.4. Conclusions	139
III. ETUDES DES COMPLEXES PAR ESI-SM	140
III.1. Analyse ESI-SM des CDs seules	140
III.1.1. Influence du degré de substitution des CDs sur les signaux obtenus	141
III.1.2. Influence de la concentration en CD	143
III.1.3. Influence de la concentration en sel	144
III.2. Analyses ESI-SM des complexes de CDs	145
III.2.1. Influence de la stoechiométrie des solutions infusées	145
III.2.2. Influence de la tension de cône	147
III.2.3. Influence du débit d'infusion	149
III.2.4. Influence de la proportion d'acétonitrile	150
III.2.5. Etudes des différentes CDs	152
III.2.6. Discussions de la nature des complexes détectés	157
IV. CONCLUSIONS	159
V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	160
Conclusion générale	162
Annexes	165
Annexe I - Conditions expérimentales du chapitre 2 (partie A)	166
Annexe II - Conditions expérimentales du chapitre 2 (partie B)	168
Annexe III - Caractéristiques des colonnes chromatographiques utilisées dans les chapitres 2 et 3	172
Annexe IV - Conditions expérimentales du chapitre 3	173
Annexe V - Conditions expérimentales du chapitre 4	175
Annexe VI - Rapports m/z des adduits ammonium de b-cyclodextrines méthylées et de leurs complexes	182
Annexe VII - Communications	183

LISTE DES ABBREVIATIONS

TECHNIQUES

AE : analyse élémentaire
APCI : ionisation chimique à pression atmosphérique
C18 : octadécyle
CCM : chromatographie sur couche mince
CEI : chromatographie d'échange d'ions
CPG : chromatographie en phase gazeuse
CPL : chromatographie en phase liquide
CPS : chromatographie en phase supercritique
DEDL : détecteur évaporatif à diffusion de la lumière
EC : électrophorèse capillaire
ESI : électrospray
FAB : bombardement par atomes rapides
MALDI : ionisation laser assistée par matrice
PGC : carbone graphite poreux
RMN : résonance magnétique nucléaire
RPLC : chromatographie à polarité de phases inversée
SM : spectrométrie de masse
UV : ultraviolet

PRODUITS

5M5PH : 5-méthyl-5-phénylhydantoïne
ACN : acétonitrile
AcOEt : acétate d'éthyle
CD : cyclodextrine
DM- β -CD : diméthyl- β -cyclodextrine
EtOH : éthanol
iPrOH : isopropanol
Me : méthyle
Me- β -CD : méthyl- β -cyclodextrine
MeOH : méthanol
PrOH : propanol
SBE- β -CD : sulfobutyléther- β -cyclodextrine
TFA : acide trifluoroacétique
THF : tétrahydrofurane
TM- β -CD : triméthyl- β -cyclodextrine

DIVERS

DS : degré de substitution
R_c : rapport de complexation

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Depuis leur découverte en 1891 par Villiers, les cyclodextrines (CDs) ont reçu une grande attention de la communauté scientifique. Obtenues par dégradation enzymatique de l'amidon, les CDs sont des oligosaccharides cycliques qui possèdent au sein de leur structure une cavité hydrophobe. Celle-ci leur permet de former des complexes d'inclusion avec un grand nombre de molécules dont les propriétés physicochimiques sont alors modifiées : solubilité dans l'eau, réactivité, stabilité, etc.

De par cette propriété de complexation, les CDs sont utilisées dans l'industrie pharmaceutique pour améliorer la biodisponibilité des principes actifs, diminuer leurs effets secondaires, etc. mais aussi dans les industries cosmétique ou agroalimentaire pour stabiliser des produits volatils ou oxydables, masquer des odeurs indésirables, etc.

De plus, les CDs possèdent la capacité de distinguer les composés structurellement proches tels que les isomères, les homologues et surtout, les énantiomères. C'est la raison pour laquelle les CDs sont couramment utilisées en chimie analytique dans diverses méthodes séparatives telles que la chromatographie ou l'électrophorèse capillaire.

Afin de modifier leurs propriétés physicochimiques ou celles des complexes formés, les CDs peuvent être modifiées par substitution des nombreux groupes hydroxyles présents sur la molécule. De nombreux dérivés ont ainsi été synthétisés pour différentes applications. Toutefois, la réaction de substitution étant difficilement sélective, ces CDs modifiées se présentent le plus souvent sous la forme de mélanges de plusieurs dérivés ayant différents degrés de substitution, chacun ayant en plus de nombreux isomères.

La composition de ces mélanges a une grande influence sur la capacité de complexation ainsi que sur la propriété de reconnaissance chirale. C'est la raison pour laquelle il est important de caractériser ces mélanges et d'en déterminer la composition le plus finement possible.

Dans le chapitre 1 de ce manuscrit, après avoir rappelé les généralités concernant les CDs, deux familles de CDs modifiées seront plus particulièrement décrites et leurs méthodes d'analyse présentées : les β -CD méthylées (Me- β -CDs) et sulfobutylées (SBE- β -CDs) qui sont parmi les CDs plus utilisées.

Le second chapitre sera consacré, dans sa première partie, à l'analyse de la SBE- β -CD monosubstituée par chromatographie en phase liquide sur une colonne de carbone graphite poreux (PGC). Ce support chromatographique atypique montre en effet une grande sélectivité vis-à-vis des composés structurellement proches comme les isomères. L'étude a plus particulièrement porté sur l'effet de la température sur la séparation et l'étude des mécanismes de rétention.

Dans la seconde partie de ce chapitre, nous décrivons la caractérisation d'une nouvelle Me- β -CD récemment mise sur le marché et caractérisée par un faible degré de substitution. Plusieurs méthodes ont été utilisées afin d'obtenir des informations complémentaires sur la composition du mélange. Nous verrons qu'il a été nécessaire d'adapter les méthodes de caractérisation décrites pour les Me- β -CDs plus substituées.

Le troisième chapitre sera consacré à l'évaluation du système chromatographique composé du PGC en tant que phase stationnaire et de Me- β -CDs en tant que sélecteurs chiraux pour la séparation chirale en CPL. Le PGC sera comparé à deux autres colonnes de silice greffée octadécyle (C18) plus communément utilisées.

Le quatrième chapitre sera consacré à l'étude des complexes de CDs méthylés de divers degrés de substitution. Une méthode utilisant des expériences de partage liquide-liquide sera utilisée afin d'évaluer rapidement le pouvoir complexant d'une CD donnée vis-à-vis d'un soluté en solution. Ces complexes seront ensuite analysés par spectrométrie de masse avec ionisation de type électrospray. Les informations obtenues par ces deux méthodes seront ensuite comparées.

CHAPITRE 1

Etude bibliographique

CHAPITRE 1

Etude bibliographique

I. GENERALITES SUR LES CYCLODEXTRINES

I.1. Historique

L'histoire des cyclodextrines (CDs) a commencé il y a plus d'un siècle et depuis, de nombreux chercheurs ont apporté leur contribution à l'étude de ces molécules. C'est à eux que nous devons la connaissance des différents aspects des CDs : leur production, leur structure et caractéristiques physicochimiques ainsi que leurs propriétés.

En 1891, Villiers rapporte l'obtention de 3 g d'une substance cristalline après digestion bactérienne de 1000 g d'amidon [1]. Il détermine la composition de ce produit comme étant $(C_6H_{10}O_5)_2 \cdot 3H_2O$ et lui donne le nom de « cellulosine » car certaines de ses propriétés sont similaires à celles de la cellulose (résistance à l'hydrolyse acide et absence de propriétés réductrices). Il observe déjà deux formes cristallines différentes, probablement l' α -CD et la β -CD.

En 1904, Schardinger isole la souche bactérienne *Bacillus Macerans* responsable de la formation de ces produits cristallins [2, 3]. En 1911, il distingue les 2 formes produites, désignées « α -dextrine » et « β -dextrine » (les dextrines étant les produits de la dégradation partielle de l'amidon) grâce à la couleur de leurs complexes avec l'iode [4].

Vers 1930, Pringsheim *et al*, malgré des expériences entachées d'erreurs, découvrent que ces dextrines cristallines ont une forte tendance à former des complexes avec divers composés organiques [5, 6].

C'est à la fin des années 1930 que la structure des CDs commence à être élucidée. En effet, c'est à cette époque que Freudenberg *et al* arrivent à la conclusion que les « dextrines de Schardinger » sont composées d'unités maltose et qu'elles ne contiennent que des liaisons glycosidiques α -1,4 [7-9]. Ils décrivent le

premier schéma d'isolement de fractions pures et homogènes et font l'hypothèse que ces dextrines cristallines ont une structure cyclique [10]. En 1948, ils découvrent la γ -CD et élucident sa structure [11].

En 1953, Freudenberg, Cramer et Plieninger déposent un brevet couvrant les aspects les plus importants des CD dans la formulation pharmaceutique [12]. Ils y démontrent que la complexation par les CD permet la protection de substances facilement oxydables par l'oxygène de l'air, l'augmentation de la solubilité dans l'eau de composés peu solubles, la réduction des pertes de substances très volatiles, etc.

En 1957, French rapporte l'existence de CD plus grandes et publie la première revue sur les CD [13].

A la fin des années 1960, la préparation des CD, leurs structures, leurs propriétés physicochimiques ainsi que leur capacité à former des complexes d'inclusion ont été élucidées.

Après que des études toxicologiques aient prouvé que la toxicité attribuée initialement aux CD provenait en fait d'impuretés complexées, de voies d'administration inadéquates ou de surdosages, le nombre de publications concernant les CD a connu une croissance exponentielle (figure 1.1) [14]. Ainsi, à la fin de 2003, ce nombre était supérieur à 26000 [15].

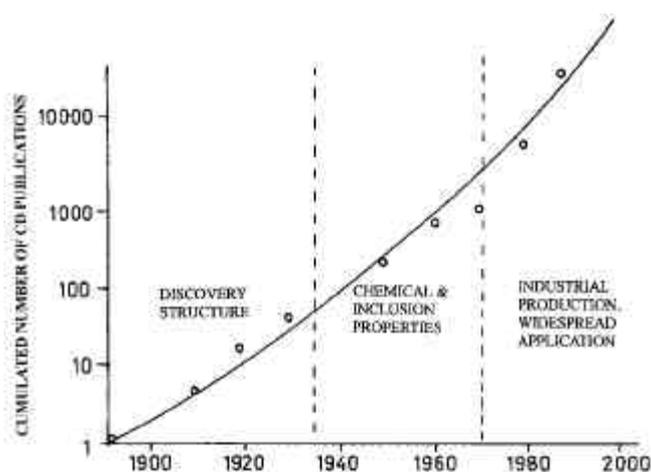


Figure 1.1. Evolution du nombre de publications (articles, brevets, résumés de conférences, etc.) relatives aux CD depuis leur découverte. D'après [14].

En 1981 est organisé le premier symposium international sur les CD qui a lieu tous les deux ans depuis 1984.

Alors que dans les années 1970, les CDs n'étaient disponibles qu'en petites quantités et à des prix très élevés (environ 2000 \$/kg pour la β -CD), elles sont aujourd'hui produites par près d'une dizaine de fabricants à hauteur d'environ 10000 tonnes/an et ont vu leur prix nettement diminué (quelques \$/kg pour la β -CD) [15]. De nombreux dérivés sont maintenant produits industriellement et d'autres sont disponibles commercialement en plus petites quantités.

I.2. Production, structure et caractéristiques physicochimiques

I.2.1. Production

Les CDs sont des oligosaccharides cycliques obtenus par dégradation enzymatique de l'amidon, ou plus précisément de l'amylose. L'enzyme impliquée, la cyclodextrine glycosyl transférase (CGTase) est produite par différents microorganismes comme *Bacillus macerans*, *Klebsiella oxytoca*, etc. [14].

L'amidon est mis en solution aqueuse à haute température et partiellement hydrolysé pour réduire la viscosité. La CGTase est ensuite ajoutée au mélange. Au cours de la réaction, la structure hélicoïdale de l'amylose est détruite au profit d'une structure cyclique. Les spires que forme naturellement cette macromolécule en solution aqueuse sont reliées par transfert de liaisons pour donner des oligosaccharides cycliques [16].

Les principales CDs ainsi obtenues sont l' α -CD, la β -CD et la γ -CD, constituées respectivement de 6, 7 et 8 unités glucose. Il est possible de favoriser la formation d'une CD donnée en ajoutant au milieu réactionnel un solvant formant avec elle un complexe insoluble. Ainsi, l'ajout de toluène entraîne la formation d'un complexe β -CD - toluène qui est immédiatement éliminé par filtration, ce qui permet d'orienter la réaction en faveur de la β -CD [14]. De même, les proportions relatives des différentes CDs obtenues varient selon les microorganismes à l'origine de la CGTase utilisée.

Après séparation des complexes par filtration, les solvants utilisés pour la formation de ces complexes sont éliminés par distillation ou extraction. Suivent alors plusieurs étapes de purification (traitement sur charbon actif, filtration, cristallisation) au terme desquelles les CDs sont obtenues avec une pureté généralement supérieure à 99%.

I.2.2. Structure

Les CDs sont des oligosaccharides cycliques constitués d'unités α -D-glucopyranose. Les principales CDs sont l' α -CD (6 unités glucopyranose), la β -CD (7 unités) et la γ -CD (8 unités).

Ces unités glucopyranose, en conformation chaise, sont reliées entre elles par des liaisons glycosidiques α -1,4. Cet arrangement est à l'origine de la forme des CDs, celle d'un cône tronqué (ou d'un abat-jour) possédant une cavité centrale (figure 1.2) dont les ouvertures sont bordées de groupes hydroxyle [15].

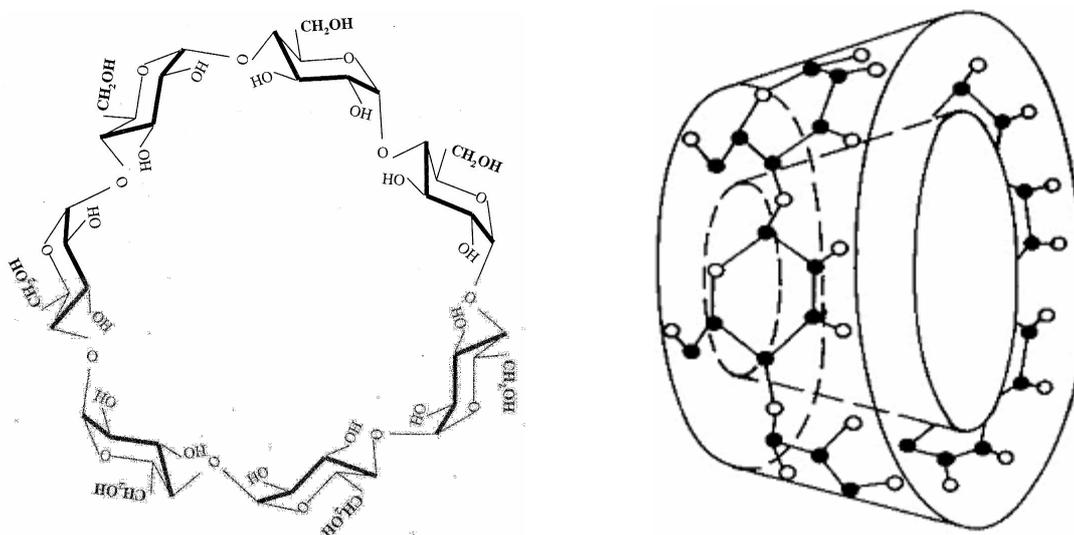


Figure 1.2. Structure de la β -CD

Les groupes hydroxyle secondaires des unités glucopyranose, portés par les carbones C2 et C3, sont situés autour de l'entrée la plus large de la cavité et on parle souvent de « face secondaire ». La formation de liaisons hydrogène entre les groupes hydroxyle situés sur les carbones C2 et C3 de deux unités adjacentes augmente la rigidité de la structure des CDs. Les groupes hydroxyle primaires, portés par les carbones C6, sont localisés autour de l'autre ouverture (« face primaire »), rendue plus étroite par leur libre rotation. Ces nombreux groupes hydroxyle procurent à l'extérieur des CDs un caractère hydrophile [15].

La paroi de la cavité centrale est constituée d'atomes de carbone, d'hydrogène et de liaisons étheroxydes. Les doublets non-liants des atomes d'oxygène formant les liaisons glycosidiques sont dirigés vers l'intérieur de la cavité où la densité

électronique est donc élevée. L'intérieur des CDs est donc une cavité relativement apolaire et hydrophobe [15].

En résumé, les CDs ont une structure macrocyclique dont l'extérieur est hydrophile et l'intérieur hydrophobe. Ces caractéristiques structurales sont à l'origine des propriétés très particulières des CDs [16].

Notons que les CDs font l'objet de plusieurs dénominations qui varient selon les époques et les auteurs. Ainsi, la β -CD est aussi désignée sous les termes de β -dextrine de Schardinger, cyclomaltoheptaose, cycloheptaamylose, BCD, etc.

I.2.3. Caractéristiques physicochimiques

Les trois principales CDs natives sont des composés cristallins, homogènes et non hygroscopiques. Leurs principales caractéristiques physicochimiques sont rassemblées dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1. Caractéristiques physicochimiques des principales CDs natives.
D'après [14].

	α -CD	β -CD	γ -CD
Nombre d'unités glucopyranose	6	7	8
Formule brute	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
Masse molaire (g/mol)	972	1135	1297
Diamètre externe (nm)	$1,46 \pm 0,04$	$1,54 \pm 0,04$	$1,75 \pm 0,04$
Hauteur (nm)	$0,79 \pm 0,01$	$0,79 \pm 0,01$	$0,79 \pm 0,01$
Diamètre de la cavité (nm)	0,47 – 0,53	0,60 – 0,65	0,75 – 0,83
Volume de la cavité (nm ³)	0,174	0,262	0,472
Solubilité dans l'eau (g/L à 25°C)	145	18,5	232
pKa à 25°C	12,3	12,2	12,1
$[\alpha]_D$ à 25°C	$150 \pm 0,5$	$162,5 \pm 0,5$	$177,4 \pm 0,5$

La hauteur de ces trois molécules est la même mais les autres dimensions varient avec le nombre d'unités glucopyranose. Ainsi, le diamètre externe et le volume de la cavité augmentent de l' α -CD à la γ -CD. De par la taille de sa cavité, la β -CD est celle qui complexe le plus grand nombre de composés et elle et ses dérivés sont les plus utilisées de toutes les CDs [17].

La solubilité dans l'eau varie de façon plus inattendue. En effet, la β -CD, bien que possédant un nombre d'unités glucopyranose intermédiaire entre l' α -CD et la γ -CD, possède la solubilité la plus faible. Ceci peut s'expliquer par les liaisons hydrogène intramoléculaires qui s'établissent entre les fonctions hydroxyle secondaires [15]. Au sein de la β -CD, une ceinture complète de ces liaisons est formée, ce qui lui confère une structure relativement rigide et une plus faible solubilité dans l'eau. Dans l' α -CD, cette ceinture est incomplète car l'une des unités glucopyranose est dans une position distordue. La γ -CD, non planaire et plus flexible, possède la plus grande solubilité dans l'eau.

La β -CD étant la plus intéressante du point de vue de la complexation, plusieurs méthodes ont été développées pour améliorer sa solubilité en solution. L'une d'elles consiste en l'addition de solvants organiques. Il a été montré que l'acétonitrile et l'éthanol permettent d'augmenter cette solubilité, contrairement au méthanol [18, 19]. Une autre méthode consiste à substituer les groupes hydroxyle par divers autres groupes fonctionnels, ce qui fera l'objet du paragraphe I.4.

Notons enfin que les CDs sont biodégradables, ce qui, ajouté au fait qu'elles sont produites à partir d'une ressource renouvelable, constitue une autre caractéristique encourageant leur utilisation.

I.3. Propriétés des cyclodextrines et applications

I.3.1 Propriété de complexation des CDs

De par leur structure cyclique et leur cavité, les CDs peuvent former des complexes d'inclusion avec un grand nombre de molécules (neutres, chargées, polaires ou apolaires). Cette propriété, mise en évidence dans les années 1930 [5, 6] et largement acceptée à partir des années 1950 [12, 13], est à l'origine de la plupart des applications industrielles des CDs.

I.3.1.1. Généralités sur la complexation

Un complexe d'inclusion est une association d'au moins deux molécules (figure 1.3) dont l'une, le substrat (ou « invité ») est encapsulée de façon totale ou partielle par l'autre, le récepteur (ou « hôte ») sous l'effet d'interactions faibles [16]. Aucune

liaison covalente n'est créée, ce qui permet une dissociation aisée et douce du complexe formé. Les CDs, ainsi que d'autres types de molécules comme les éthers couronnes, les calixarènes, etc. peuvent jouer le rôle de molécule hôte.

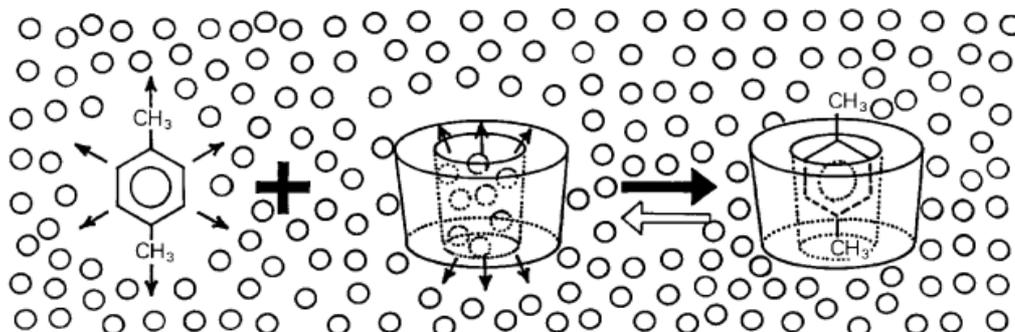
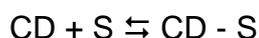


Figure 1.3. Représentation schématique de la formation d'un complexe d'inclusion CD - xylène et de sa dissociation.

Les petits cercles représentent les molécules d'eau. D'après [14].

L'association d'une CD et d'une molécule invitée S, ainsi que la dissociation du complexe formé CD – S, est gouvernée par un équilibre thermodynamique de la forme [20] :



La stabilité du complexe peut être exprimée par la constante de stabilité K_S ou la constante de dissociation K_D :

$$K_S = 1 / K_D = ([\text{CD-S}] / ([\text{CD}][\text{S}]))$$

où $[\text{CD-S}]$, $[\text{CD}]$ et $[\text{S}]$ sont les concentrations du complexe, de la CD et du soluté, respectivement.

Les complexes CD - S formés sont généralement du type 1:1, comme celui décrit ci-dessus, c'est-à-dire qu'une CD complexe une molécule de soluté. Toutefois, il existe aussi des complexes du type 2:1, 1:2, 2:2 ou d'ordre supérieur [20].

1.3.1.2. Les « forces conductrices » de la complexation

Le phénomène de complexation est la résultante de nombreuses interactions mettant en jeu la molécule hôte, la molécule invitée et le solvant et conduisant à l'état thermodynamique le plus stable. La nature et l'importance relative des différents phénomènes responsables de la formation d'un complexe CD-soluté sont encore mal connues et font toujours l'objet d'une controverse. Les « forces directrices »

(traduction de l'expression couramment et improprement employée « driving forces ») les plus discutées sont les suivantes [21] :

- Interactions électrostatiques (ion-ion, ion-dipôle, dipôle-dipôle),
- Interactions de van der Waals (dipôle-dipôle induit, dipôle induit-dipôle induit),
- Interactions hydrophobes,
- Liaisons hydrogènes (qui sont en fait de nature électrostatique),
- Soulagement des contraintes de conformation de la CD (tension),
- Exclusion des molécules d'eau initialement présentes dans la cavité,
- Interactions de transfert de charges (type d'interaction de van der Waals).

Notons qu'il existe une ambiguïté attachée au terme d'interactions de van der Waals et les auteurs qui l'emploient ne désignent pas toujours les mêmes phénomènes. Dans le domaine des CDs, les chercheurs désignent généralement par ce terme soit la combinaison des forces d'induction (forces de Debye) et des forces de dispersion (forces de London), soit les forces de dispersion uniquement [20]. Les forces de Keesom sont implicitement incluses dans les interactions électrostatiques.

Pour certains auteurs, le phénomène régissant la complexation serait la substitution des molécules d'eau présentes dans la cavité par la molécule invitée. Ces molécules d'eau se trouvent dans un état énergétique défavorable à cause des interactions polaire-apolaire et leur exclusion s'accompagne d'une diminution de l'enthalpie [14].

Toutefois, d'autres auteurs avancent le fait que ces molécules d'eau doivent avoir un degré de liberté conformationnelle plus grand que celles présentes dans la solution et entretenant des liaisons hydrogène avec leurs voisines. Leur exclusion est donc un processus au cours duquel enthalpie et entropie se compensent et elle ne constitue pas un facteur déterminant lors de la complexation [20, 21]. De même, la modification des contraintes conformationnelles de la CD ne semble pas être déterminant mais permet par contre de maximiser les différentes interactions entre le soluté et la CD.

Les interactions hydrophobes et de van der Waals semblent être les plus importantes [20, 21]. L'existence d'interactions hydrophobes est vérifiée par plusieurs observations : la complexation du soluté concerne généralement sa partie la plus apolaire et la complexation est corrélée à l'hydrophobie de celui-ci. De plus,

elle diminue par ajout de solvant et est accrue par ajout de sels. Les interactions de van der Waals sont elles aussi suspectées d'intervenir comme le prouve le fait que l'on peut observer des complexes stables dans des solvants organiques comme le DMF, le DMSO ou l'heptane.

De même, les liaisons hydrogène et les interactions électrostatiques faisant intervenir les fonctions hydroxyle ou leurs substituants seraient impliquées, en particulier, dans l'orientation relative des deux molécules [21].

Il existe donc plusieurs interactions pouvant s'établir entre la CD et le soluté, celles-ci dépendant de la nature des substituants de la CD et de la nature du soluté complexé.

En plus des interactions discutées ci-dessus, la complexation fait intervenir des paramètres stériques, c'est-à-dire les dimensions et la géométrie des deux molécules qui interagissent [14]. La cavité doit être assez grande pour contenir la molécule invitée ou au moins une partie mais pas trop grande pour que cette molécule ne se contente pas de traverser la cavité sans y établir d'interactions. Nous avons vu au paragraphe 1.2.3 que les trois CDs natives ont des cavités de tailles différentes. Cela a pour conséquence que l' α -CD complexe d'avantage les molécules de faibles masses moléculaires ou ayant une chaîne aliphatique, la β -CD complexe les molécules aromatiques ou hétérocycliques tandis que la γ -CD complexe les molécules plus grosses contenant plusieurs cycles comme le pyrène [17].

1.3.1.3. Conséquences de la complexation et applications

L'inclusion des molécules invitées dans la cavité des CDs constitue une encapsulation moléculaire et ces molécules voient leurs propriétés physicochimiques modifiées. Parmi ces modifications, on peut citer [15-17] :

- L'amélioration de la dissolution et de la solubilité du soluté et l'augmentation de sa biodisponibilité (dans le cas de principes actifs),
- La modification de ses propriétés spectrales (déplacements chimiques en RMN, longueur d'onde du maximum d'absorption en UV, intensité de la fluorescence, etc.),

- La modification de sa réactivité (en règle générale diminuée). Le soluté bénéficie ainsi d'une protection contre la dégradation thermique ou photochimique, l'oxydation, l'hydrolyse et voit sa stabilité accrue,
- La diminution de sa diffusion, de sa volatilité et de sa sublimation.

La propriété des CDs à former ces complexes d'inclusion est utilisée dans différents domaines d'applications comme le montre la figure 1.4.

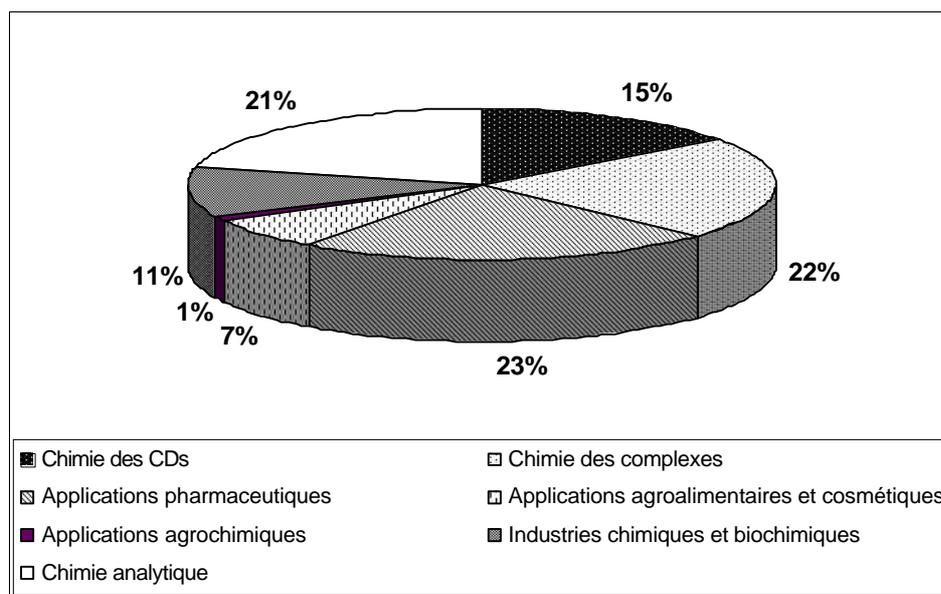


Figure 1.4. Répartition des publications concernant les CDs par domaine de recherche en 2001. D'après [15].

Sur la totalité des publications concernant les CDs et parues en 2001, environ 15% traitent des fondamentaux de la chimie des CDs (production, propriétés physicochimiques, toxicologie, dérivés, etc.) et près de 22% sont dédiées à l'étude du phénomène de complexation (thermodynamique et cinétique de l'inclusion, analyse des complexes, étude des corrélations entre complexation et divers paramètres structuraux, etc.).

Une grande partie des publications restantes concerne l'application des CDs dans différentes industries. Avec 23% des publications, le domaine le plus étudié concerne les applications pharmaceutiques et plus précisément, la formulation. Grâce à l'absence de toxicité de certains dérivés et la diminution de leur prix, il existe de nos jours une trentaine de produits pharmaceutiques incorporant des CDs [15]. Toutefois, l'industrie pharmaceutique utilise moins de 10% de la quantité produite de CDs.

Bien que le domaine des industries agroalimentaire et cosmétique ne soit pas très représentées dans la littérature (7% des publications), elles constituent les plus gros consommateurs de CDs (70% de la production).

Le tableau 2 regroupe des exemples d'utilisation des CDs dans ces différents domaines d'applications.

Tableau 1.2. Exemples de propriétés améliorées par l'utilisation de CDs dans divers domaines d'applications. D'après [16].

Exemples de propriétés	Produits ou substances concernés
Applications pharmaceutiques	
Augmentation de la solubilité	Prostaglandines, vitamines A, D, E, K
Amélioration de la biodisponibilité	Indométacine
Diminution des effets secondaires	Phénylbutazone
Applications alimentaires	
Stabilité des produits volatils	Menthol, moutarde, confiseries
Extraction de composants indésirables	Cholestérol (beurre, lait, œuf)
Applications cosmétologiques	
Masquage d'odeurs désagréables	Mercaptans
Stabilité des parfums	Essence de citron
Applications agrochimiques	
Diminution de la toxicité	Herbicides, fongicides

Enfin, les CDs sont très étudiées dans le domaine de la chimie analytique où elles sont employées en tant qu'agents de séparation dans différentes techniques principalement séparatives.

I.3.2 Propriété de reconnaissance chirale des CDs

Les CDs sont capables de différencier les énantiomères et, plus généralement, les composés structurellement proches comme les isomères, les homologues, etc. Cette propriété est mise à profit dans le domaine de la chimie analytique et plus particulièrement dans celui des méthodes séparatives [22].

I.3.2.1. Origine de la propriété de reconnaissance chirale

Les CDs possèdent de nombreux centres chiraux. En effet, chaque unité glucose contient 5 carbones asymétriques, tous différents les uns des autres. De plus, la forme des unités glucose n'étant pas la même au sein du cycle, celles-ci sont toutes différentes les unes des autres [23]. La β -CD contient donc 35 centres chiraux différents.

A ceux-ci peuvent encore s'ajouter les centres chiraux présents dans les éventuels substituants des groupes hydroxyle.

I.3.2.2. Applications des CDs en chimie analytique

La capacité de reconnaissance chirale des CDs est utilisée dans de nombreuses techniques séparatives [22] et plus particulièrement dans les méthodes chromatographiques et l'électrophorèse capillaire car celles-ci bénéficient des avantages suivants [23] :

- Détermination d'excès énantiomériques (e.e.) supérieurs à 99% sur une gamme étendue de linéarité dans des échantillons de faibles concentrations et dans des matrices complexes,
- Possibilité de déterminer l'e.e. de plusieurs composés en une seule analyse,
- Possibilité de coupler des techniques d'identification structurale comme la spectrométrie de masse,
- Analyses rapides et automatisées.

Les techniques les plus utilisées pour l'analyse des molécules chirales et des principes actifs en particulier sont l'électrophorèse capillaire (EC) et la chromatographie en phase liquide (CPL) [23, 24].

En EC, selon la littérature, plus des deux tiers des séparations chirales ont été effectuées avec des CDs [23]. Celles-ci présentent en effet les avantages suivants :

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

- Elles peuvent augmenter la solubilité et la stabilité des analytes peu solubles dans l'eau,
- Il existe plusieurs dérivés peu onéreux disponibles.

Les CDs sont aussi fréquemment employées en CPL où elles sont utilisées en tant que phase stationnaire (greffées sur un support comme la silice) ou en tant qu'additifs dans la phase mobile (pour les mêmes raisons qu'en EC) [23-25].

L'un des avantages des phases stationnaires à base de CDs est la possibilité de les utiliser dans différents modes chromatographiques : polarité de phase normale, polarité de phase inversée et mode polaire non aqueux [25]. Il est donc possible lorsqu'une séparation est impossible dans l'un des ces modes de passer à un autre mode.

Notons dès à présent que complexation et reconnaissance chirale ne sont pas forcément liées entre elles. En effet, il existe de nombreux exemples dans lesquels les énantiomères de molécules complexées ne sont pas séparés. A l'inverse, il peut y avoir reconnaissance chirale dans des milieux dans lesquels on sait que la complexation est inhibée, comme en CPL à polarité de phase normale ou en mode polaire non-aqueux. Même si la complexation est souvent le facteur clé de la reconnaissance chirale, elle n'en est pas pour autant indispensable [23].

I.4. Les cyclodextrines modifiées

I.4.1. But des modifications

Comme nous l'avons vu au paragraphe I.2.2, chaque unité glucose constituant le cycle des CDs possède trois fonctions hydroxyle. Les CDs peuvent donc être modifiées par substitution de l'atome d'hydrogène ou du groupe hydroxyle tout entier par une grande variété de groupes, neutres ou ioniques tels que les groupes alkyles, hydroxyalkyles, sulfobutyles, glucosyles, acetyles, etc. [15]. Parmi les objectifs visés lors de ces modifications, on peut citer :

- L'amélioration de la solubilité de la CD (en particulier celle de la β -CD),
- L'amélioration de la capacité de complexation,
- La fixation d'un groupe spécifique (pour la modélisation enzymatique),

- La formation de polymères de CDs, etc.

I.4.2. Difficultés des modifications

La difficulté des modifications des CDs est liée à la présence de nombreux groupes hydroxyle et à la cavité. En effet, les groupes hydroxyle présents aux positions 2, 3 et 6 de chaque unité glucose (figure 1.5) entrent en compétition vis-à-vis du réactif et rendent les modifications sélectives difficiles [26]. De plus, la cavité peut interférer en complexant le réactif et diriger son activité à une place inattendue.

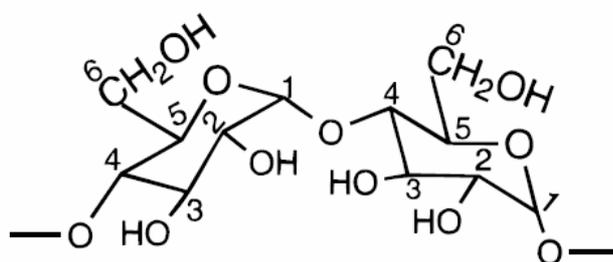


Figure 1.5. Schéma des unités glucose formant le cycle des CDs.

Les groupes hydroxyle se situent aux positions 2, 3 et 6 de chaque unité glucose.

La modification sélective étant difficile et coûteuse à réaliser, les CDs commerciales sont généralement des mélanges de dérivés qui diffèrent non seulement par le nombre de substituants mais aussi par leurs positions sur le cycle, comme nous le verrons dans le paragraphe II avec les β -CDs méthylées et sulfobutylées. Ces dérivés ont donc souvent des propriétés de complexation et de reconnaissance chirale différentes les uns des autres [27-29], ce qui peut rendre leur utilisation plus délicate et moins reproductible.

I.4.3. Exemples de CDs modifiées

Plus de 1500 dérivés de CDs ont été décrits dans la littérature mais la plupart d'entre eux ne connaîtront aucune utilisation à grande échelle à cause des difficultés liées à leur synthèse et du coût élevé qui en résulte [15]. On peut dénombrer une centaine de dérivés commercialement disponibles, principalement utilisés en chimie analytique ou comme intermédiaire de synthèse.

En terme de quantité produite ou d'utilisation, les CDs les plus importantes sont les dérivés ayant une grande solubilité dans l'eau, en particulier [30] :

- Les β -CDs méthylées,
- Les β - et γ -CDs hydroxypropylées,
- Les β -CDs sulfobutylées,
- Les CDs branchées (glucosylées, maltosylées),
- Les CDs sulfatées.

Dans le paragraphe suivant, nous allons nous intéresser plus particulièrement à deux d'entre elles, les β -CDs sulfobutylées et méthylées.

II. LES β -CYCLODEXTRINES SULFOBUTYLEES ET METHYLEES

II.1. Les sulfobutyléther- β -cyclodextrines (SBE- β -CDs)

II.1.1. Synthèse

La synthèse des SBE- β -CDs, et plus généralement des CDs sulfoalkylées, a fait l'objet de deux brevets déposés en 1992 et 1994 par Stella et Rajewski [31, 32].

Cette synthèse est relativement simple. La β -CD native est d'abord dissoute dans une solution aqueuse fortement basique à température élevée. Les groupes hydroxyle ainsi déprotonés vont attaquer le réactif ajouté par la suite, la 1,4-butane sultone, par substitution nucléophile (figure 1.6).

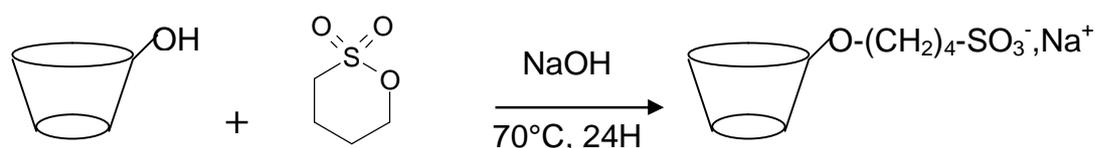


Figure 1.6. Schéma de synthèse des SBE- β -CDs.

La solution est ensuite refroidie, diluée, neutralisée puis dialysée pour éliminer les produits secondaires de la réaction. La β -CD résiduelle peut être éliminée par

passage sur une résine échangeuse d'anions. Après concentration par ultrafiltration et lyophilisation, les SBE- β -CDs sont obtenues sous forme de sels de sodium.

Cette voie de synthèse n'étant pas sélective, les SBE- β -CDs ainsi obtenues se présentent sous forme de mélanges complexes dans lesquels les dérivés diffèrent non seulement par le nombre de substituants mais aussi par la position de ces substituants. Ce sont donc des mélanges de plusieurs degrés de substitution (DS, défini comme étant le nombre total de substituants sur la CD) ayant chacun de nombreux isomères de position.

Il est possible de contrôler le DS moyen des mélanges obtenus en modifiant le nombre d'équivalent de 1,4-butane sultone ajouté au milieu réactionnel. De plus, des travaux menés au laboratoire ont montré qu'il est possible de favoriser la substitution des groupes hydroxyle secondaires en diminuant la concentration du milieu réactionnel ou de favoriser celle des groupes hydroxyle primaires en effectuant la synthèse dans le DMF en présence d'hydroxyde de lithium [33].

II.1.2. Propriétés et applications

Les SBE- β -CDs ont été initialement développées pour la formulation pharmaceutique, pour solubiliser et stabiliser les principes actifs peu solubles dans l'eau [31, 32].

Plusieurs groupes hydroxyle étant substitués, la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires est réduite et, associée à la solvation des groupes sulfonate, cela confère aux SBE- β -CDs une grande solubilité dans l'eau (supérieure à 500 g/L). De plus, le caractère hétérogène et amorphe des mélanges supprime les risques de cristallisation au niveau des reins (l'un des problèmes majeur de la β -CD native) [31, 32]. Même à hautes doses, les SBE- β -CDs ne présentent pas d'effets secondaires néfastes [15]. Enfin, ces CDs ont une bonne capacité de complexation, comparable à celle des β -CDs hydroxypropylées, autres dérivés très utilisés en formulation [34, 35].

Les SBE- β -CDs présentent donc toutes les qualités nécessaires à un agent vecteur de principes actifs utilisable par voie parentérale [36] et sont utilisées dans deux formulations pharmaceutiques actuellement sur le marché [15].

Les SBE- β -CDs ont aussi été très largement utilisées comme sélecteurs chiraux, principalement en EC [23, 37]. La mobilité électrophorétique propre que leur confère leur charge permet de séparer les énantiomères de molécules neutres et agrandit la fenêtre de séparation. Elles peuvent être utilisées seules [38, 39] ou en mélange avec d'autres CDs [40].

Notons enfin qu'il a été montré que le DS des SBE- β -CDs a une influence tant sur la capacité de complexation [27] que sur la résolution des énantiomères [41]. Il est donc nécessaire de pouvoir caractériser les mélanges obtenus et d'en déterminer la composition.

II.1.3. Caractérisation des SBE- β -CDs

Afin de faire ressortir la puissance croissante des méthodes utilisées pour la caractérisation des mélanges de SBE- β -CDs, celles-ci seront discutées par ordre chronologique.

Dans les brevets décrivant la synthèse des SBE- β -CDs, la caractérisation des mélanges obtenus est sommaire [31, 32]. En effet, les seules indications de la composition du mélange sont le DS moyen, obtenu par analyse élémentaire (AE) à partir du rapport carbone/soufre, et la teneur en β -CD résiduelle, déterminée par CCM.

Dès 1992, une méthode d'EC est mise au point pour analyser ces mélanges et en révéler la complexité puis elle est améliorée quatre ans plus tard [42, 43]. Les SBE- β -CDs sont chargées sur toute la gamme de pH et la mobilité électrophorétique d'un analyte est fonction de sa charge. Les différents constituants sont donc séparés selon le nombre de substituants, autrement dit selon leur DS. L'électrophérogramme ainsi obtenu montre le profil de substitution qui permet d'estimer la proportion relative apparente de chacun des DS (figure 1.7).

Cette méthode est alors utilisée pour évaluer la reproductibilité de la synthèse des SBE- β -CDs et l'influence des conditions de réaction (durée, température, basicité) sur la distribution des dérivés obtenus.

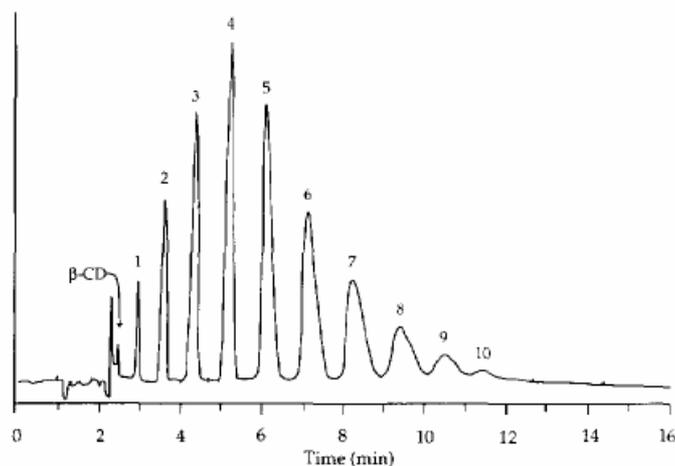


Figure 1.7. Electrophérogramme d'un mélange de SBE- β -CDs de DS moyen égal à 4.

Conditions : capillaire de 50 μm de diamètre interne, 60 cm de longueur totale et 30 cm de longueur effective ; électrolyte support constitué de 30 mM de tampon acide benzoïque-Tris à pH 6 ; champ électrique de 417 V/cm ; détection indirecte à 230 nm ; injection hydrodynamique de 5 sec à 0,5 psi ; température ambiante. D'après [43].

En 1996, les SBE- β -CDs sont analysées par spectrométrie de masse (SM) en mode positif avec différentes techniques d'ionisation : ESI, MALDI et FAB [44]. Les différents DS présents au sein du mélange sont identifiés sous forme d'adduits du type $[M+\text{Na}]^+$. La technique FAB souffrant d'un bruit de fond important, seuls l'ESI et le MALDI sont considérés adaptés à l'analyse rapide de ces molécules. Toutefois, le processus de formation des ions n'étant pas le même, les intensités relatives des pics varient d'une technique à l'autre et les spectres obtenus à partir d'un même mélange ne montrent pas le même profil de substitution (figures 1.8 et 1.9).

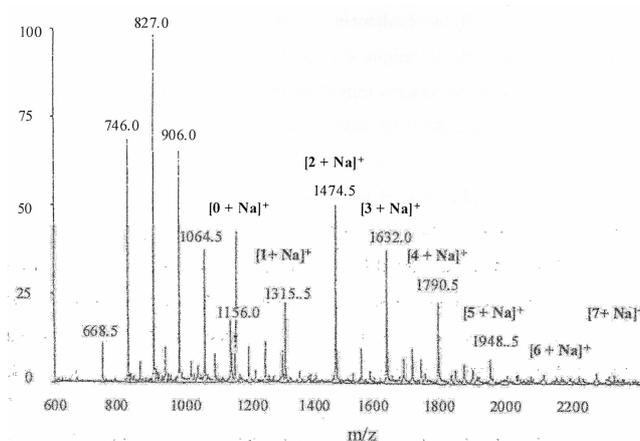


Figure 1.8. Spectre de masse ESI de SBE- β -CDs (DS 0 à 6) en mode positif.

Conditions : solvant d'infusion : eau ; débit d'infusion : 2-10 $\mu\text{L}/\text{min}$; tension de spray : 5 kV ; tension d'orifice : 80-180 V. D'après [44].

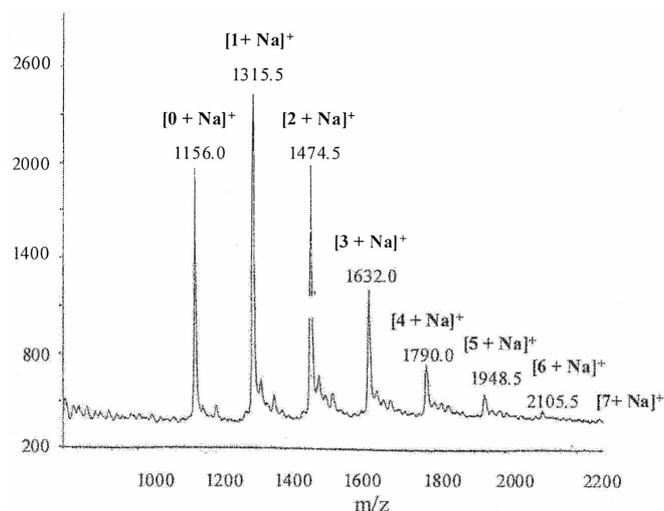


Figure 1.9. Spectre de masse MALDI de SBE- β -CDs (DS 0 à 7) en mode positif. Conditions : matrice : 0,2 mol d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque et 0,6 mol de 1-hydroxyisoquinoline dans un mélange H₂O/ACN 50/50 ; tension d'accélération : 28 kV. D'après [44].

En 1997, un mélange de SBE- β -CDs est fractionné par chromatographie préparative d'échange d'ions avec un gradient de sel [45]. Les différents DS sont isolés et caractérisés par EC (méthode ci-dessus), RMN et SM afin d'en vérifier la pureté. Le but est d'expliquer les différences observées entre les valeurs de DS moyen obtenues par AE et RMN d'un côté et par EC de l'autre. Il est montré que la réponse des SBE- β -CDs en EC augmente avec le DS et le DS moyen calculé en prenant cette augmentation en compte est plus proche des valeurs obtenues en AE et RMN.

Ces travaux sont poursuivis par une étude se focalisant sur le DS 1 qui ne compte que trois isomères correspondant aux trois positions de substitution d'une unité glucopyranose (positions 2, 3 et 6) [46]. En adaptant la méthode de chromatographie préparative d'échange d'ions précédente, chacun des isomères est isolé, caractérisé par EC, et identifié par RMN 2D. Cette étude permet pour la première fois d'étudier les isomères de position et de déterminer les positions de substitution préférentielles (figure 1.10).

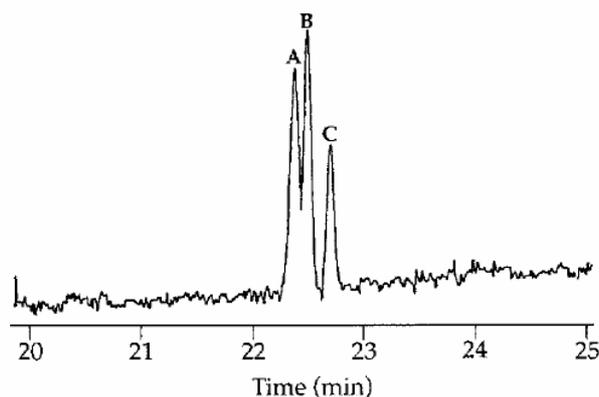


Figure 1.10. Electrophérogramme des trois isomères de la SBE-b-CD de DS 1.

Conditions : capillaire de 50 μ m de diamètre interne, 120 cm de longueur totale et 90 cm de longueur effective ; électrolyte support constitué de 15 mM de tampon acide benzoïque-Tris à pH 6 ; champ électrique de 167 V/cm ; détection indirecte à 230 nm ; injection hydrodynamique de 1 sec à 5 psi ; température ambiante. D'après [46].

En 1999, la caractérisation des SBE- β -CDs est poursuivie en utilisant la chromatographie de paire d'ions [47]. Après une étude de l'influence de la nature et de la concentration d'amines aliphatiques (utilisées comme agents de paire d'ions) et de la nature du modificateur organique, une séparation des différents DS est obtenue (figure 1.11). Celle-ci est complémentaire de la méthode mise au point en EC.

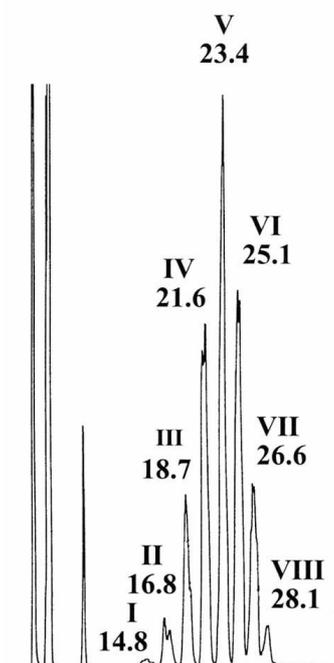


Figure 1.11. Empreinte chromatographique d'une SBE-b-CD de DS moyen égal à 7.

Conditions : colonne Spherisorb ODS 1 (250 x 4,6 mm) ; éluant A : formiate d'heptylammonium à 5 mM, éluant B : MeOH ; gradient de 30 à 50% de B en 25 min puis 50% de B pendant 15 min ; débit : 1 mL/min ; détection par DEDL. D'après [47].

Toutefois, l'agent d'appariement d'ions, même compatible avec le DEDL, pose des problèmes de transposition en SM à cause des nombreux adduits formés avec les analytes et rend la chromatographie préparative plus problématique.

En 2000, une nouvelle méthode CPL est mise au point par chromatographie d'échange d'ions [48]. Utilisant des compétiteurs électroniques volatils compatibles avec le DEDL, la méthode permet de séparer les différents DS des mélanges de SBE- β -CDs (figure 1.12) et de les isoler de façon semi-préparative.

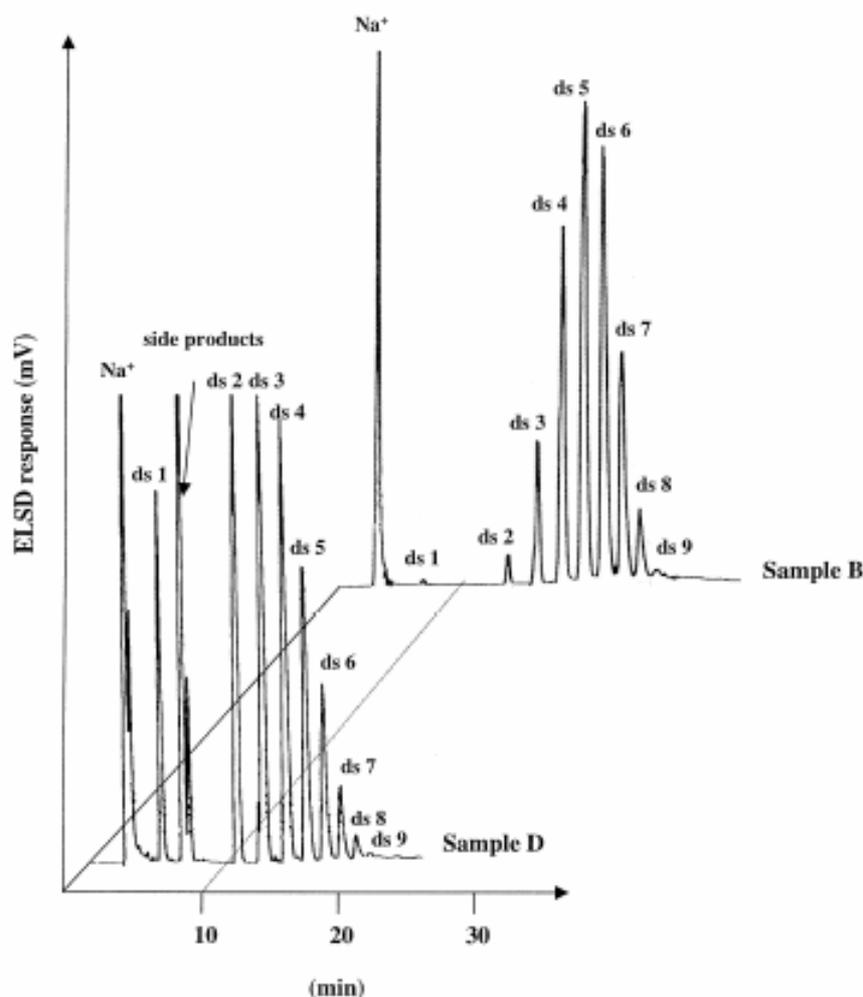


Figure 1.12. Empreintes chromatographiques de deux échantillons de SBE- β -CDs de DS 5,3 (échantillon B) et 3,5 (échantillon D).

Conditions : colonne Vydac 302 IC (250 x 4,6 mm) ; éluant A : 10 mM d'acétate d'ammonium dans H₂O/ACN (70/30), éluant B : 250 mM d'acétate d'ammonium dans H₂O/ACN (70/30) ; gradient : 100% de A pendant 5 min à 100% de B en 20 min ; débit : 1 mL/min ; détection par DEDL. D'après [48].

En 2001, cette méthode est couplée à l'ESI-SM en mode négatif afin d'identifier les différents DS en ligne (figure 1.13) [49]. Les DS moyen calculés par SM, CPL-DEDL et CPL-SM sont similaires.

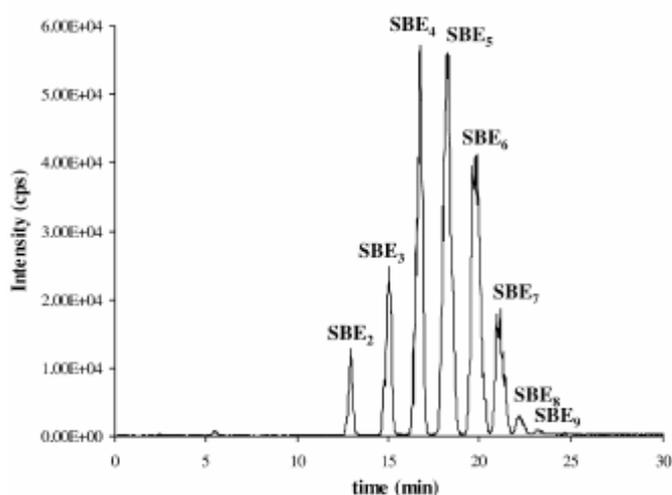


Figure 1.13. Empreinte chromatographique obtenues en SIM d'un échantillon de SBE-b-CD de DS moyen 5,0.

Détection en mode SIM des ions $[M-2H]^{2-}$. Même conditions chromatographiques que la figure 1.12. Conditions de SM : tension de spray : -4,8 kV ; tension d'orifice : -60 V. D'après [49].

En 2002, différentes β -CDs sulfoalkylées sont synthétisées et caractérisées par AE, RMN et SM afin d'en déterminer le DS moyen ainsi que les positions de substitution préférentielles [50]. D'après les auteurs, pour les SBE- β -CDs, des conditions de synthèse très basiques favoriseraient la substitution des groupes hydroxyle en position 6.

La même année, une thèse préparée au sein du laboratoire rapporte l'analyse de CDs anioniques, dont les SBE- β -CDs, en ESI-SM, EC et CPL-ESI-SM sur colonne de carbone graphite poreux (PGC) [33]. Le PGC se révèle être un outil de choix pour l'analyse des différents DS du mélange ainsi que pour la séparation des 3 isomères de la SBE- β -CD DS1 (figure 1.14). Ceux-ci sont ainsi isolés de manière semi-préparative et identifier par RMN 2D. Cette méthode permet ainsi de déterminer les positions de substitution préférentielle et d'étudier l'influence des conditions de synthèse sur la sélectivité de la réaction.

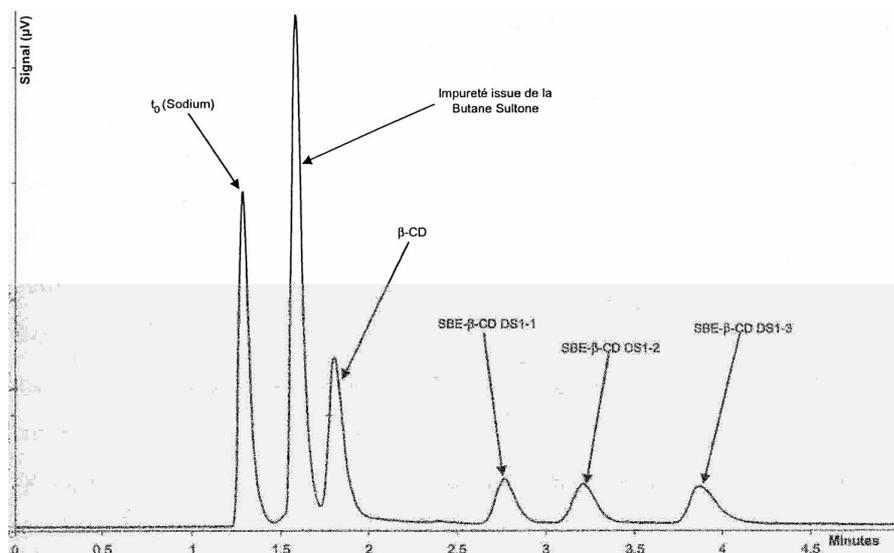


Figure 1.14. Séparation des trois isomères de la SBE-b-CD de DS1 sur colonne Hypercarb.

Conditions : colonne hypercarb (100 x 4,6 mm ; 5 µm) ; phase mobile : 50 mM de tampon acide formique/ammoniaque pH 3 dans H₂O/ACN 81/19 ; débit 1 mL/min ; détection par DEDL. Les SBE-β-CDs notées 1, 2 et 3 sont substituées en position 3, 6 et 2, respectivement. D'après [33].

Comme nous venons de le voir, la caractérisation des mélanges de SBE-β-CDs a nécessité la mise au point de plusieurs méthodes et outils. Parmi ceux-ci, le PGC offre une intéressante capacité de séparation des isomères et permet d'obtenir des informations supplémentaires quant à la sélectivité de la substitution.

II.2. Les b-cyclodextrines méthylées (Me-b-CDs)

Les Me-β-CDs ont déjà fait l'objet de nombreux travaux et publications [30], notamment au sein du laboratoire [51, 52]. Nous ne ferons donc ici qu'un bref rappel de leurs principales caractéristiques puis nous nous intéresserons plus particulièrement à la caractérisation des Me-β-CDs utilisées lors des travaux présentés dans les chapitres 3 et 4.

II.2.1. Généralités

La substitution des groupes hydroxyle par des groupes méthyle améliore considérablement la solubilité de la β-CD native. Cette solubilité augmente jusqu'à environ treize ou quatorze groupes méthyle puis diminue à mesure que l'on

s'approche de la méthylation totale [30]. C'est la raison pour laquelle les dérivés les plus utilisés sont les diméthyle- β -cyclodextrines (DM- β -CDs) qui portent un total d'environ quatorze groupes soit une moyenne de deux groupes par unité glucose. Contrairement aux SBE- β -CDs, le DS est en effet défini par le nombre de substituants par unité glucose et non par CD.

En plus de cette grande solubilité dans l'eau (supérieure à 500 g/L), les DM- β -CDs possèdent une forte capacité de complexation pour un grand nombre de composés peu solubles dans l'eau [30]. Mais leur affinité pour le cholestérol est si forte qu'elles peuvent l'extraire des membranes cellulaires et provoquer l'hémolyse, ce qui en limite les applications pharmaceutiques.

Par contre, un grand nombre de publications rapportent leur utilisation en tant que sélecteurs chiraux en EC ou en CPL [23, 25, 40]. Le chapitre 3 en sera d'ailleurs une illustration.

Tout comme les SBE- β -CDs, les DM- β -CDs commerciales sont généralement des mélanges de plusieurs constituants et nécessitent donc une caractérisation.

II.2.2. Caractérisation des DM- β -CDs

Les Me- β -CDs sont sans doute les CDs modifiées dont la caractérisation a fait l'objet du plus grand nombre de publications et de nombreuses techniques ont été employées (RMN, SM, CCM, CPG, CPL, CPS, EC) [52]. Certains de ces travaux seront cités dans le chapitre 2 pour la caractérisation d'une Me- β -CD de faible DS.

Dans ce paragraphe, nous illustrerons la caractérisation des Me- β -CDs en nous focalisant sur les travaux effectués sur les DM- β -CDs utilisées dans le chapitre 3 et 4 : la DM- β -CD de DS 1,8 de Wacker et la DM- β -CD de DS 2,1 de Ikeda.

La DM- β -CD Wacker a été analysée pour la première fois en CPG en 1993 [53]. Afin de rendre les constituants du mélange plus volatils, ceux-ci subissent une étape de silylation avant l'analyse. Le chromatogramme obtenu (figure 1.15) montre que le mélange contient un grand nombre de dérivés.

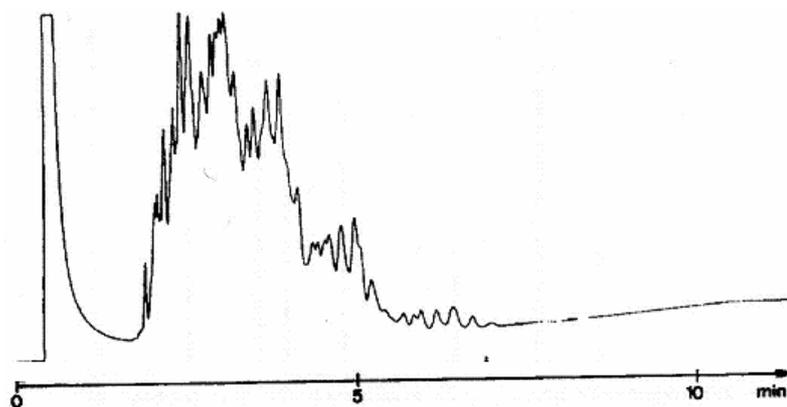


Figure 1.15. Analyse CPG de la DM-b-CD Wacker après silylation par CPG.
 Conditions : colonne méthylphénylpolysiloxane OV-17 de 13 m x 0,27 mm ;
 température : 350 à 370 °C à 2 °C/min, 3 min à 370 °C ; gaz vecteur : hydrogène à
 0,05 MPa. D'après [53].

L'hétérogénéité du mélange est confirmée par l'analyse de cette DM- β -CD en SM (figure 1.16) [54]. Le mélange contient plus de 7 dérivés de DS différents. Plusieurs techniques d'ionisation (ESI, MALDI, APCI) sont utilisées pour déterminer le DS moyen et il est montré que celui-ci varie très peu d'un lot à l'autre.

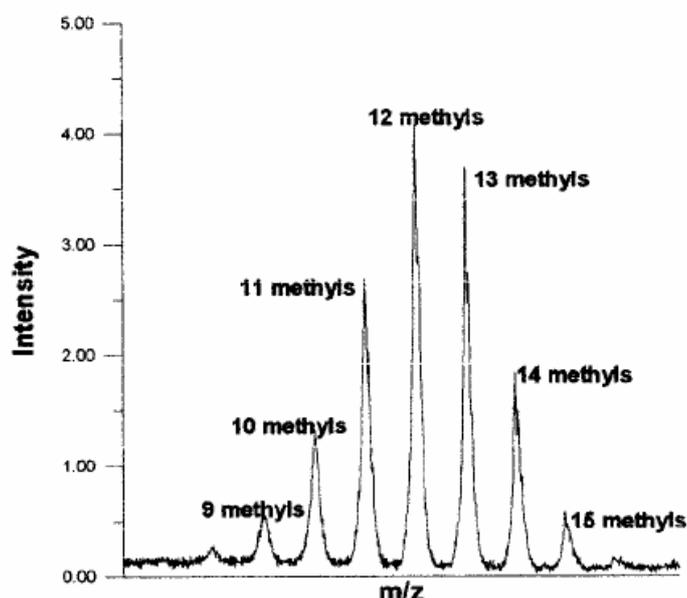


Figure 1.16. Spectre MALDI-SM de la DM-b-CD Wacker (adduits sodium).
 Conditions : Matrice : acide dihydroxybenzoïque ; tension d'accélération : 4,6 kV ;
 Accumulation de 150 tirs laser. D'après [54].

La caractérisation des DM- β -CDs en CPL a fait l'objet de plusieurs travaux, notamment au laboratoire [52]. Il a été montré que le choix de la colonne chromatographique est d'une importance cruciale pour obtenir une empreinte la plus

riche possible. Ainsi, pour la chromatographie à polarité de phase inversée, parmi plusieurs colonnes de silice greffées octadécyle ou phényle, les plus sélectives se révèlent être celles qui présentent des interactions polaires renforcées (avec les silanols résiduels) [55, 56].

Ces méthodes chromatographiques sont ensuite couplées à l'ESI-SM afin d'identifier les différents pics (figures 1.17 et 1.18) [52].

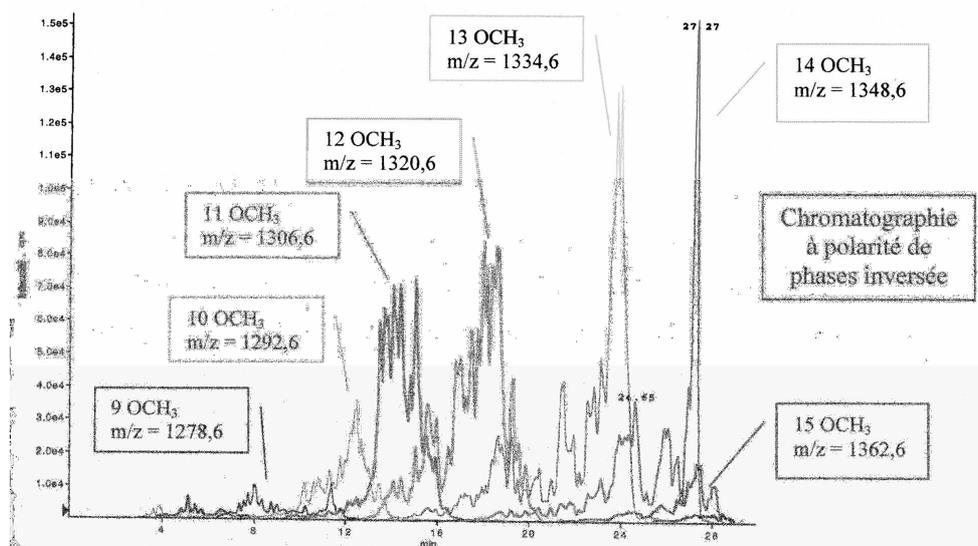


Figure 1.17. Chromatogramme reconstitué de la DM-b-CD Wacker.

Conditions : colonne Nucléosil 50-5-C8 ; phase mobile H₂O/ACN 80/20 ; débit : 1 mL/min. Liquide additionnel en sortie de colonne : éthanol/acétate d'ammonium à 40 mM (90/10) à 5 µL/min. Source Turbolon Spray. D'après [52].

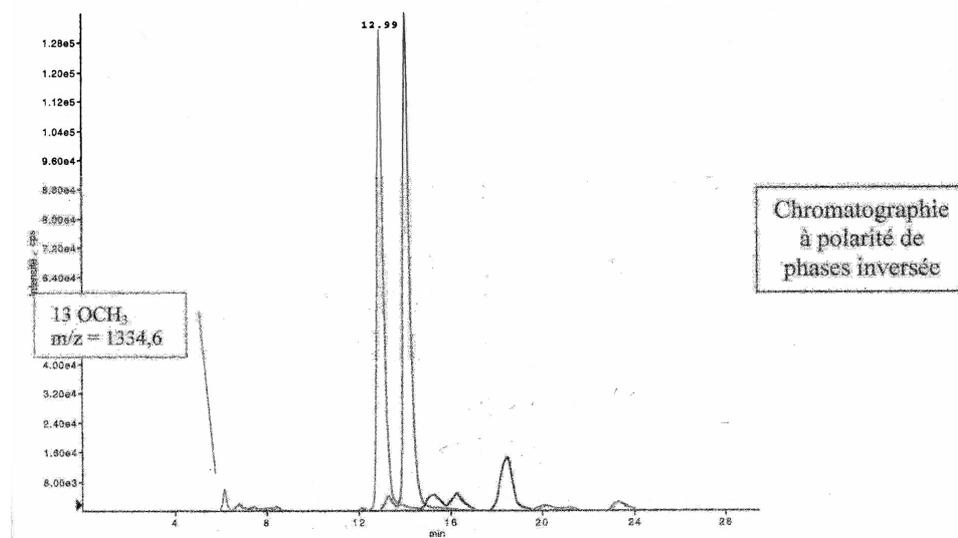


Figure 1.18. Chromatogramme reconstitué de la DM-b-CD Ikeda.

Conditions : identiques à la figure 1.17 sauf phase mobile : H₂O/ACN 66/34. D'après [52].

Ces chromatogrammes reconstitués montre que ces deux DM- β -CDs sont très différentes l'une de l'autre. La DM- β -CD Wacker contient un grand nombre de dérivés ayant des DS et des temps de rétention différents. Au contraire, la DM- β -CD Ikeda ne contient que deux dérivés principaux, proches l'un de l'autre. Cela permet d'avoir une première évaluation de la sélectivité des méthodes de méthylation utilisées pour obtenir ces CDs modifiées.

Le couplage de l'ESI-SM a aussi été réalisé en CPS, qui permet d'obtenir d'autres sélectivités et d'autres empreintes chromatographiques complémentaires de celles obtenus en CPL [57, 58]. Les conclusions quant à la composition de chacune des deux DM- β -CDs sont les mêmes : la DM- β -CD Wacker est un mélange beaucoup plus hétérogène que la DM- β -CD Ikeda. De plus, il est montré que cette dernière est méthylée de façon symétrique. La figure 1.19 montre en effet que la fragmentation du dérivé portant 14 groupes méthyle produit principalement des unités glucose ayant chacune deux groupes méthyle.

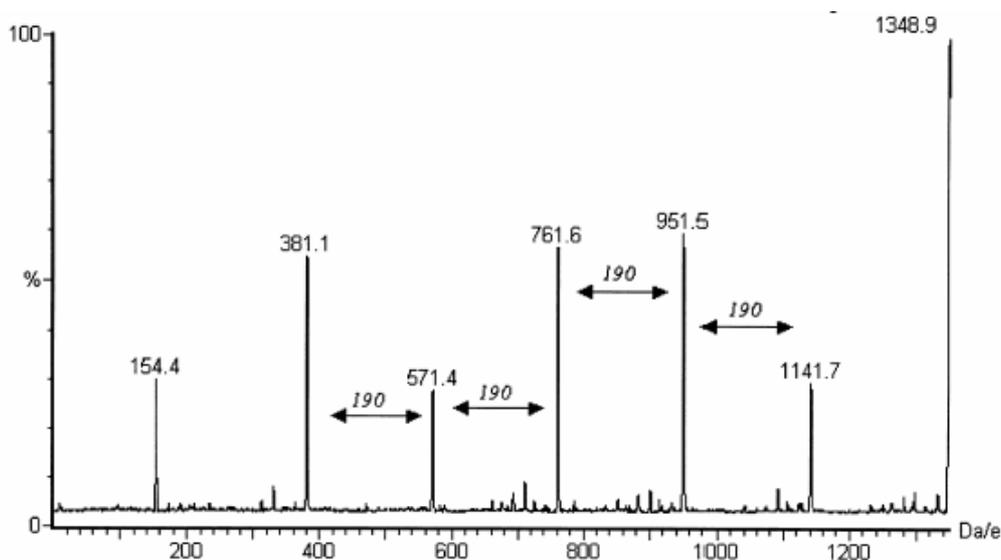


Figure 1.19. Spectre de masse des ions fils obtenus par SM/SM de l'ion de m/z 1349 ([14Me-b-CD+NH₄]⁺) de la DM-b-CD Ikeda.

Conditions : source Turbolon Spray utilisée en mode positif. D'après [58].

Une autre méthode de caractérisation consiste à effectuer l'hydrolyse acide des DM- β -CDs afin d'en obtenir les différentes unités glucose (non méthylées et mono-, di- et triméthylées). Celles-ci peuvent ensuite être séparées par CPL, CPG ou CPS et leurs temps de rétention sont comparés à celui de standards [51, 59]. Il est ainsi possible de déterminer la composition de chacune des DM- β -CDs.

Au final, ces différentes méthodes d'analyse ont montré que la DM- β -CD Wacker possède un profil de substitution très large puisque le mélange est constitué d'environ 8 dérivés de DS différents et que la substitution est effectuée de façon aléatoire en positions 2, 3 et 6 des unités glucose. Au contraire, la DM- β -CD Ikeda ne comporte essentiellement que deux dérivés majoritaires (les CDs portant 14 et 15 groupes méthyle) dont la substitution a préférentiellement lieu sur les positions 2 et 6 [51, 52].

On peut donc constater que l'analyse des DM- β -CDs a fait l'objet de nombreux travaux et que les différentes méthodes utilisées donnent des informations complémentaires. Les mélanges commerciaux de DM- β -CDs peuvent donc être caractérisés de façon très fine.

III. CONCLUSIONS

Nous avons vu dans ce chapitre que les CDs et leurs dérivés sont utilisés dans de nombreux domaines d'applications.

Toutefois, la synthèse des CDs modifiées conduisant le plus souvent à des mélanges de plusieurs dérivés aux propriétés différentes, il est nécessaire de mettre au point des méthodes permettant d'analyser ces mélanges le plus finement possible.

Une fois caractérisées, les CDs peuvent être employées pour effectuer des séparations chirales en EC ou en CPL par exemple. Elles présentent en effet de nombreuses qualités et sont parmi les sélecteurs chiraux les plus employés.

Enfin, elles possèdent la capacité de complexer de nombreuses molécules et d'en modifier ainsi les propriétés physicochimiques, ce qui en fait des molécules très attractives pour de nombreuses industries.

Notons enfin que les CDs sont produites à partir d'une ressource renouvelable ce qui laisse penser qu'elles seront disponibles à des prix raisonnables pour longtemps encore.

IV. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] A. Villiers, Compt. Rend. 112 (1891) 536.
- [2] F. Schardinger, Wien. Klin. Wochenschr. 17 (1904) 207.
- [3] F. Schardinger, Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Abt. II 14 (1905) 772.
- [4] F. Schardinger, Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Abt. II 29 (1911) 188.
- [5] H. Pringsheim, *A Comprehensive Survey Of Starch Chemistry*, Ed. Chemical CatalogueCo, R. Walton, New York, 1928.
- [6] H. Pringsheim, *Chemistry of the Saccharides*, McGraw-Hill, New York, 1932.
- [7] K. Freudenberg, W. Rapp, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 69 (1936) 2041.
- [8] K. Freudenberg,, H. Boppel, M. Meyer-Delius, Naturwissenschaften 26 (1938) 123.
- [9] K. Freudenberg, M. Meyer-Delius, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 71 (1938) 1596.
- [10] K. Freudenberg, G. Blomquist, L. Ewald, K. Soff, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 69 (1936) 1258.
- [11] K. Freudenberg, F. Cramer, Z. Naturforsch 3 (1948) 464.
- [12] K. Freudenberg, F. Cramer, H. Plieninger, Ger. Patent 895,769 (1953).
- [13] D. French, Adv. Carbohydr. Chem. 12 (1957) 189-260.
- [14] J. Szejtli, Chem. Rev. 98 (1998) 1743-1753.
- [15] J. Szejtli, Pure Appl. Chem. 76 (2004) 1825-1845.
- [16] G. Crini, M. Morcellet, N. Morin, L'actualité chimique 247 (2001) 18-25.
- [17] E. Martin del Valle, Proc. Biochem. 39 (2004) 1033-1046.
- [18] M. Taghvaei, G. Stewart, Anal. Chem. 63 (1991) 1902-1904.
- [19] A. Chatjigakis, C. Donzé, A. Coleman, Anal. Chem. 64 (1992) 1632-1634.
- [20] K. Connors, Chem. Rev. 97 (1997) 1325-1357.
- [21] L. Liu, Q.-X. Guo, J. Incl. Phenom. 42 (2002) 1-14.
- [22] E. Schneiderman, A. Stalcup, J. Chromatogr. B 745 (2000) 83-102.
- [23] Z. Juvancz, J. Szejtli, Trends Anal. Chem. 21 (2002) 379-388.

- [24] F. Bressolle, M. Audran, T.-N. Pham, J.-J. Vallon, J. Chromatogr. B 687 (1996) 303-336.
- [25] S. Han, Biomed. Chromatogr. 11 (1997) 259-271.
- [26] A. Khan, P. Forgo, K. Stine, V. D'Souza, Chem. Rev. 98 (1998) 1977-1996.
- [27] V. Zia, R. Rajewski, V. Stella, Pharm. Res. 17 (2000) 936-941.
- [28] E. Francotte, L. Brandel, M. Jung, J. Chromatogr. A 792 (1997) 379-384.
- [29] A. Salvador, E. Varesio, M. Dreux, J.-L. Veuthey, Electrophoresis 20 (1999) 2670-2679.
- [30] L. Szente, J. Szejtli, Adv. Drug. Deliv. Rev. 36 (1999) 17-28.
- [31] V. Stella, R. Rajewski, US Patent 5,134,127 (1992).
- [32] V. Stella, R. Rajewski, US Patent 5,376,645 (1994).
- [33] R. Pennanec, *Synthèses dirigées, purification et analyse de cyclodextrines anioniques par différentes méthodes séparatives et leurs couplages avec la spectrométrie de masse*, thèse, décembre 2002.
- [34] K. Okimoto, R. Rajewski, K. Uekama, J. Jona, V. Stella, Pharm. Res. 13 (1996) 256-264.
- [35] V. Zia, R. Rajewski, V. Stella, Pharm. Res, 5 (2001) 667-673.
- [36] T. Irie, K. Uekama, J. Pharm. Sci. 86 (1997) 147-162.
- [37] S. Fanali, J. Chromatogr. A 875 (2000) 89-122.
- [38] R. Tait, D. Thompson, V. Stella, J. Stobaugh, Anal. Chem. 66 (1994) 4013-4018.
- [39] C. Desiderio, S. Fanali, J. Chromatogr. A 716 (1995) 183-196.
- [40] M. Fillet, P. Hubert, J. Crommen, J. Chromatogr. A 875 (2000) 123-134.
- [41] D. Skanchy, G.-H. Xie, R. Tait, E. Luna, C. Demarest, J. Stobaugh, Electrophoresis 20 (1999) 2638-2649.
- [42] R. Tait, D. Skanchy, D. Thompson, N. Chetwyn, D. Dunshee, R. Rajewski, V. Stella, J. Stobaugh, J. Pharm. Biomed. Anal., 10 (1992) 615-622.
- [43] E. Luna, E. Bornancini, R. Tait, D. Thompson, J. Stobaugh, R. Rajewski, V. Stella, J. Pharm. Biomed. Anal., 15 (1996) 63-71.

- [44] B. Chankvetadze, G. Endresz, G. Blaschke, M. Juza, H. Jakubetz, V. Schurig, *Carbohydr. Res.* 287 (1996) 139-155.
- [45] E. Luna, E. Bornancini, R. Tait, D. Thompson, R. Rajewski, V. Stella, *Carbohydr. Res.* 299 (1997) 103-110.
- [46] E. Luna, D. Vander Velde, R. Tait, D. Thompson, R. Rajewski, V. Stella, *Carbohydr. Res.* 299 (1997) 111-118.
- [47] S. Grard, C. Elfakir, M. Dreux, *Chromatographia* 50 (1999) 695-700.
- [48] S. Grard, C. Elfakir, M. Dreux, *J. Chromatogr. A* 897 (2000) 185-193.
- [49] S. Grard, C. Elfakir, M. Dreux, *J. Chromatogr. A* 925 (2001) 79-87.
- [50] Q. Qu, E. Tucker, S. Christian, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem* 43 (2002) 213-221.
- [51] A. Salvador, *Cyclodextrines méthylées : analyse, caractérisation et utilisation comme sélecteurs chiraux électrophorèse capillaire et chromatographie en phase supercritique*, thèse, décembre 1998.
- [52] I. Caron, *Cyclodextrines méthylées : analyse et caractérisation par chromatographie en phase liquide. Utilisation en électrophorèse capillaire*, thèse, décembre 2002.
- [53] A. Deege, H. Husmann, E. Hübinger, F. Kobor, G. Schomburg, *J. High Resol. Chromatogr.* 16 (1993) 587-593.
- [54] J-P. Mercier, J-L. Debrun, M. Dreux, C. Elfakir, B. Hakim, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14 (2000) 68-70.
- [55] I. Caron, C. Elfakir, M. Dreux, *Chromatographia* 47 (1998) 383-390.
- [56] I. Caron, C. Elfakir, M. Dreux, *J. High Resol. Chromatogr.* 21 (1998) 554-560.
- [57] I. Caron, A. Salvador, C. Elfakir, B. Herbreteau, M. Dreux, *J. Chromatogr. A* 746 (1996) 103-108.
- [58] A. Salvador, B. Herbreteau, M. Dreux, *J. Chromatogr. A* 855 (1999) 645-656.
- [59] A. Salvador, B. Herbreteau, M. Lafosse, M. Dreux, *Analisis* 25 (1997) 263-266.

CHAPITRE 2

Caractérisation de β -cyclodextrines sulfobutylées et méthylées

CHAPITRE 2

Caractérisation de β -cyclodextrines sulfobutylées et méthylées

INTRODUCTION

Dans le chapitre 1, nous avons vu que les CDs modifiées se présentent généralement sous la forme de mélanges constitués de CDs qui diffèrent non seulement par le nombre de substituants mais aussi par la position de ces substituants. En d'autres termes, ces mélanges contiennent plusieurs dérivés de DS différents, chacun d'entre eux ayant de nombreux isomères de position.

On sait que la composition de ces mélanges a une grande influence sur leurs propriétés énantiosélective et complexante, comme l'illustreront les chapitres 3 et 4.

Il est donc nécessaire de développer des méthodes permettant de caractériser ces mélanges et d'en déterminer la composition. Il est ensuite possible d'effectuer le contrôle qualité en sortie d'usine, comparer des mélanges provenant de différents fournisseurs, vérifier la répétabilité de la synthèse entre différents lots ou encore déterminer l'influence des conditions de synthèse sur la composition qualitative et quantitative.

Ce chapitre traite de la caractérisation de β -cyclodextrines sulfobutylées (SBE- β -CDs) et méthylées (Me- β -CDs), qui sont, comme décrit dans le chapitre 1, parmi les plus utilisées.

La partie A sera consacrée à l'optimisation de l'analyse par CPL de la SBE- β -CD monosubstituée sur PGC et la partie B portera sur la caractérisation d'une Me- β -CD faiblement substituée (DS<1) par RMN, par CPL (sur différents supports chromatographiques de type phase inverse), par SM (MALDI et ESI) et par couplage CPL-SM.

A. ANALYSE DE LA SBE- β -CD MONOSUBSTITUEE

I. INTRODUCTION

Les travaux précédemment menés au laboratoire ont montré que le carbone graphite poreux (PGC) est un support chromatographique de choix pour l'analyse des SBE- β -CDs [1]. L'étude de la rétention de ces CDs anioniques sur PGC a montré que celle-ci est le résultat de la combinaison de deux mécanismes : l'un typique de la chromatographie à polarité de phase inversée (RPLC) et l'autre, s'apparentant à celui de la chromatographie d'échange d'ions (CEI). L'élution sur PGC de ces composés anioniques ne peut se faire en effet qu'en présence d'anions compétiteurs dans la phase mobile hydro-organique et la rétention d'un constituant donné de SBE- β -CD augmente avec son état de charge. Toutefois, bien que le PGC puisse être utilisé sur une large gamme de température, l'influence de ce paramètre sur la séparation n'a pas encore été explorée.

Nous avons entrepris d'étudier l'influence de la température de la colonne sur l'analyse d'un mélange de SBE- β -CD monosubstituée avec deux objectifs en tête. Le premier, d'aspect théorique, était d'approfondir et de compléter la connaissance des mécanismes de rétention du PGC en comparant le comportement de ces CDs anioniques avec celui de la β -CD native. Le second objectif, à caractère pratique, était de déterminer si la température constituait un paramètre important à prendre en considération pour améliorer la séparation des trois isomères de la SBE- β -CD monosubstituée. Une meilleure séparation rendrait la quantification relative de chaque isomère plus aisée, permettant ainsi de déterminer les positions de substitutions préférentielles et donc la sélectivité de la voie de synthèse. De plus cela permettrait de faciliter l'isolement à l'échelle semi-préparative de chacun de ces isomères afin d'étudier séparément leurs propriétés complexe et énantiosélective.

Les CDs natives, qui sont des molécules neutres, ont été analysées sur PGC dans les conditions de RPLC et il a été montré que leur rétention augmente avec la température de la colonne avec une phase mobile composée d'eau et d'acétonitrile (ACN) [2] alors qu'elle reste constante ou diminue avec une phase mobile constituée d'eau et d'alcool comme le méthanol (MeOH) ou l'éthanol (EtOH) [3].

Rappelons enfin que la température est susceptible d'avoir une influence sur la rétention (et donc sur le temps d'analyse), la sélectivité, l'efficacité ou la forme des

pics [4]. Selon Greibrokk *et al*, l'augmentation de la température de la colonne présente deux avantages [4] :

- La solubilité des analytes augmente ainsi que leurs coefficients de diffusion ce qui améliore le transfert de masse et donc l'efficacité de la séparation,
- La viscosité de la phase mobile diminue ce qui engendre une diminution de la perte de charge et permet l'utilisation de plus hauts débits ou de plus longues colonnes.

Les conséquences d'une augmentation de température sur la rétention et la sélectivité diffèrent selon le type de chromatographie [5] :

- En RPLC, on observe généralement une diminution de la rétention et, dans une moindre mesure, de la sélectivité,
- En CEI, la rétention est peu affectée et la sélectivité diminue parfois légèrement.

Tout comme la composition de la phase mobile, la température de la colonne est donc un paramètre à prendre en compte lors de la mise au point d'une séparation.

Avant de présenter les résultats obtenus lors de cette étude, la spécificité du PGC et ses caractéristiques seront rappelées.

II. LE CARBONE GRAPHITE POREUX (PGC)

II.1. Structure du PGC

Le PGC [6] est exclusivement composé de feuillets plans d'atomes de carbone hybridés sp^2 disposés selon un motif hexagonal [7]. La valence de ces atomes étant complètement satisfaite, la surface du PGC est dépourvue de groupements fonctionnels et est comparable à une grande molécule polycyclique aromatique [8, 9].

Le PGC a la structure d'un graphite à 2 dimensions car, contrairement au graphite à 3 dimensions, il n'y a pas d'organisation stricte des atomes entre les feuillets (figure 2.1). Cette structure serait à l'origine de sa grande stabilité mécanique.

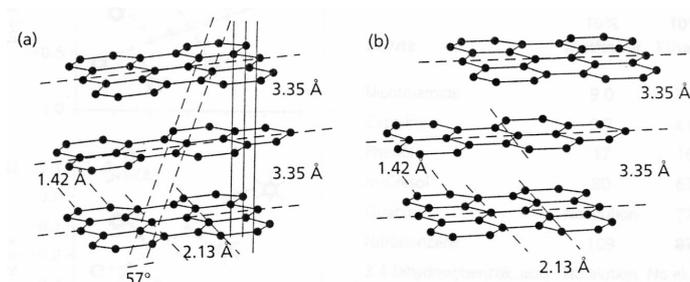


Figure 2.1. Structures de graphites 3D (a) et 2D (b).

II.2. Propriétés physiques du PGC

Le PGC est le résultat des recherches menées pendant plusieurs années pour obtenir un matériau à base de carbone adapté à la CPL [6-8]. Sa surface spécifique est de $120 \text{ m}^2/\text{g}$, le diamètre moyen des pores est de 250 \AA et la porosité est de 75%. De par sa structure, le PGC présente une grande stabilité physique et chimique qui permet l'utilisation de phases mobiles ayant des pH de 0 à 14 ainsi que le travail à hautes pressions (supérieures à 400 bars) et à hautes températures (supérieures à 300°C). Le PGC peut donc être utilisé dans des conditions que ne supportent pas les supports chromatographiques plus traditionnels à base de silice ou de polymères.

En outre, le PGC se distingue de ces supports par une surface cristalline plane et très adsorbante (figure 2.2). Celle-ci est responsable de la sélectivité accrue du PGC envers les composés structurellement proches tels que les isomères et les diastéréoisomères [10, 11].

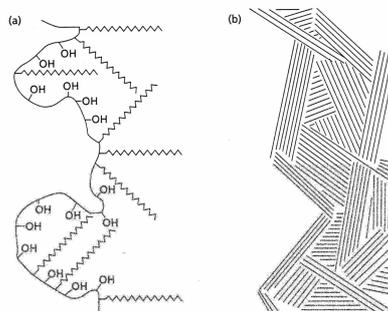


Figure 2.2. Schéma des surfaces d'une silice greffée (a) et du PGC (b).

II.3. Mécanismes de rétention du PGC

Le PGC a été initialement décrit comme un support très adsorbant et très hydrophobe pour la RPLC [6, 7]. Mais ses propriétés de rétention et de sélectivité sont très différentes des supports conventionnels. En effet, sur le PGC, la rétention augmente souvent avec la polarité des analytes. Ce phénomène encore mal compris (désigné par le sigle PREG pour « polar retention effect on graphite ») semble lié à la forte polarisabilité du nuage électronique du graphite [11].

En RPLC, la rétention sur PGC serait la combinaison de plusieurs mécanismes et ferait intervenir [12] :

- Des interactions dispersives (forces de London) entre le PGC et l'analyte d'une part et le PGC et la phase mobile d'autre part
- Des interactions hydrophobes, qui tendent à chasser l'analyte de la phase mobile
- Des interactions de charge induite entre un analyte polaire et la surface polarisable du graphite.

La rétention des anions ferait intervenir des interactions électroniques (transfert de charge donneur-accepteur) entre leurs doublets d'électrons non liants et les électrons π du PGC [13].

D'autre part, la rétention est largement déterminée par la surface de contact entre l'analyte et le graphite ainsi que par la nature et l'orientation des groupes fonctionnels voisins de cette surface [10, 11]. La rétention est donc augmentée pour les molécules planes et elle est réduite pour les molécules très structurées et rigides qui ne peuvent entrer en contact avec le graphite qu'avec une petite partie de leur surface moléculaire.

II.4. Applications du PGC à l'analyse de composés saccharidiques

Le PGC a été utilisé pour l'analyse de nombreux composés tels que des molécules aromatiques portant divers groupements fonctionnels, des principes actifs, des pesticides, des ions... [14]. La stéréosélectivité de sa surface en fait un outil de choix pour la séparation d'isomères ou de diastéréoisomères, peu ou pas résolus sur les autres supports chromatographiques.

Le PGC a été utilisé avec succès pour la séparation de saccharides anioniques structurellement proches tels que les glucosinolates [15], les disaccharides sulfatés [13], les oligosaccharides sulfatés [16] ou les carraghénanes [17, 18].

Par ailleurs, la séparation et la rétention des CDs natives (α -CD, β -CD et γ -CD) sur le PGC a été étudiée [2, 3, 19]. Il ressort de toutes ces études que la rétention des CDs natives sur PGC est supérieure à celle observée sur colonne C18 et que l'ordre de rétention est différent, ce qui indique que les mécanismes de rétention des CDs natives ne sont pas les mêmes sur ces deux types de phases stationnaires. Le PGC a aussi été utilisé pour séparer des isomères de CDs maltosylées [2], non résolus sur silice greffée. Enfin, les premiers DS de SBE- β -CDs ont été séparés sur PGC ainsi que les isomères du dérivé monosubstitué [1].

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les conditions expérimentales détaillées, produits et matériels utilisés sont regroupés en annexe I.

III.1. Détection des SBE- β -CDs

Les SBE- β -CDs ne possédant pas de groupements chromophores détectables en UV, leurs analyses ont été menées avec un détecteur à diffusion de la lumière (DEDL). Ce mode de détection est particulièrement adapté à l'analyse de mélanges complexes de SBE- β -CDs [20, 21] et à la détection des CDs en général [22]. De plus, il a été montré qu'en mode d'élution isocratique, les trois isomères de la SBE- β -CD monosubstituée ont le même coefficient de réponse, ce qui permet de déterminer facilement et rapidement leurs proportions relatives dans un mélange [1].

De par son principe de fonctionnement, le DEDL nécessite une phase mobile volatile [22]. Le principal critère de choix des constituants de la phase mobile est donc leur volatilité.

III.2. Composition de la phase mobile

Les SBE- β -CDs sont chargées négativement sur toute la gamme de pH. Leur élution sur une colonne PGC nécessite donc une phase mobile contenant à la fois un modificateur organique, comme l'ACN, et un modificateur électronique, comme l'anion acétate. En effet, l'addition d'un modificateur organique est rendue indispensable par le caractère très hydrophobe du PGC tandis que le compétiteur électronique est nécessaire pour entrer en compétition avec les analytes anioniques à la surface du PGC selon un mécanisme comparable à celui de la CEI.

Les mêmes besoins ont été rapportés pour l'analyse des disaccharides sulfatés [13], des oligosaccharides sulfatés [16] ou des carraghénanes [17, 18].

L'analyse des SBE- β -CDs sur PGC a donc été effectuée avec une phase mobile composée d'un mélange eau/ACN contenant de l'acétate d'ammonium. Le MeOH n'a pas été retenu car il possède un pouvoir éluant beaucoup plus faible que l'ACN, tant pour les CDs natives [2] que pour les oligosaccharides sulfatés [17]. En effet, les premières analyses ont montré que, même à forte concentration en sel, une proportion de 60% de MeOH dans la phase mobile n'était pas suffisante pour éluer les SBE- β -CDs avant 30 min et que les pics obtenus étaient larges, asymétriques et peu résolus. En outre, de telles proportions de MeOH dans la phase mobile posent des problèmes de solubilité, tant pour le sel que pour les CDs sulfobutylées ou natives [23]. L'acétate d'ammonium a été choisi car sa volatilité le rend compatible avec le DEDL [24].

III.3. Influence de la température

Avec le PGC, l'influence de la température de la colonne sur la séparation est difficilement prévisible. Comme nous l'avons vu précédemment, l'évolution de la rétention des CDs natives sur PGC en fonction de la température dépend de la composition de la phase mobile [2, 3]. D'autres travaux ont montré que la rétention de disaccharides sulfatés augmente avec la température avec une phase mobile acide contenant 40% d'ACN mais diminue avec une phase mobile basique contenant 5% d'ACN [13]. Enfin, la rétention des carraghénanes n'est que peu modifiée par la température [17].

Après une étape préliminaire d'optimisation de la composition de la phase mobile à température ambiante, l'influence de la température de la colonne sur la séparation des 3 isomères de la SBE- β -CD monosubstituée a été étudiée en mode

isocratique avec une phase mobile H_2O/ACN (83/17) contenant 30 mM de $NH_4CH_3CO_2$. Le mélange analysé a été synthétisé au laboratoire en modifiant les conditions de réaction décrites dans le brevet de Stella et Rajewsky [25] de façon à n'obtenir que la SBE- β -CD monosubstituée (voir annexe I). La figure 2.3 montre les chromatogrammes obtenus à 30, 45, 60 et 75°C. Les pics des trois isomères sont désignés par les lettres A, B et C par ordre de rétention croissante et correspondent respectivement aux 3-O-SBE- β -CD, 6-O-SBE- β -CD et 2-O-SBE- β -CD [1]. Le mélange contient aussi une importante concentration de β -CD native n'ayant pas réagi lors de la réaction de substitution. Si l'on considère que les réponses de la β -CD native et des trois isomères sont équivalentes [22], on peut évaluer le rapport β -CD/SBE- β -CDs à 95/5. Les conditions de synthèse sont telles que seule une petite fraction de la β -CD est substituée. Les autres solutés détectés correspondent aux ions Na^+ , élués en volume mort et aux produits secondaires de la réaction tel que l'acide 4-hydroxybutane sulfonique.

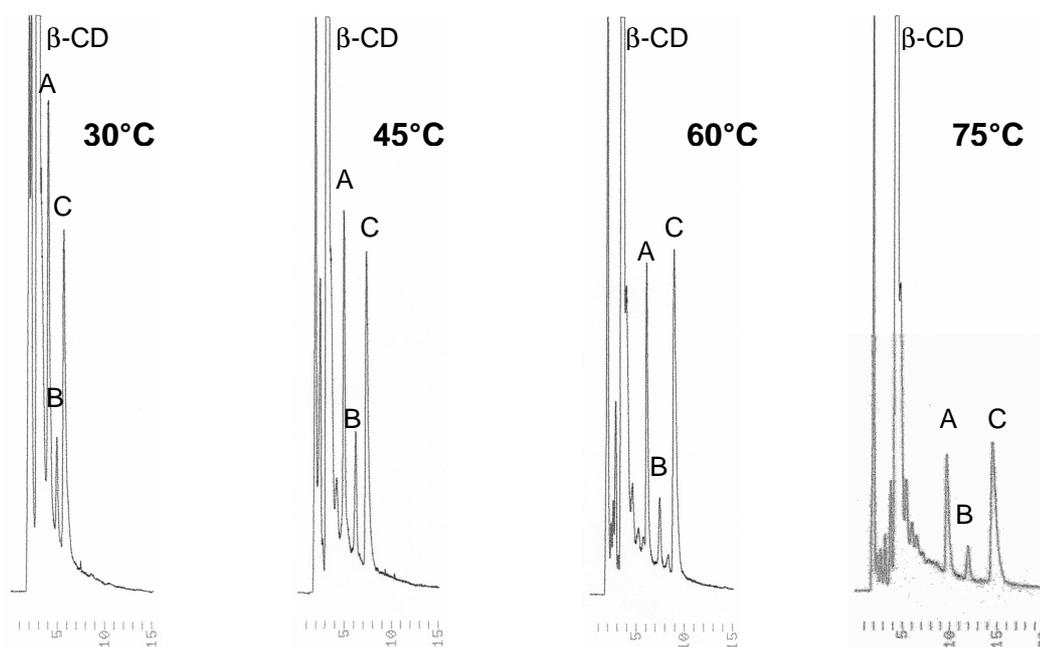


Figure 2.3. Influence de la température de la colonne sur la séparation chromatographique des trois isomères de la SBE- β -CD monosubstituée.

Conditions : colonne Hypercarb (100 x 4,6 mm ; 5 μ m) ; phase mobile : H_2O/ACN (83/17) + 30 mM de $NH_4CH_3CO_2$; température de la colonne : 30, 45, 60 et 75°C ; débit : 1 mL/min ; détection : DEDL.

Ordre d'éluion : A : 3-O-SBE- β -CD, B : 6-O-SBE- β -CD, C : 2-O-SBE- β -CD.

La figure 2.3 montre que la rétention des trois isomères de SBE- β -CD monosubstituée augmente avec la température de la colonne. Entre 30 et 75°C, les

facteurs de rétention sont multipliés par 3. De même, comme attendu [2], la rétention de la β -CD native augmente mais plus faiblement que celle des SBE- β -CDs. Accroître la température de la colonne permet donc d'augmenter la sélectivité entre les pics des isomères et celui de la β -CD, présente en grande concentration dans le mélange injecté.

Afin d'apporter des éléments pour mieux interpréter cet effet de température plus marqué sur la rétention des SBE- β -CDs, le comportement chromatographique de l'ion sulfate sur PGC a été étudié entre 25 et 85°C avec une phase mobile H₂O/ACN (80/20) contenant 10 mM de NH₄CH₃CO₂. La rétention du dianion inorganique est constante et ne varie pas avec la température. Il semble donc que la différence de comportement chromatographique entre les trois isomères de SBE- β -CD et la β -CD native vis-à-vis de la température soit due plutôt à la partie alkyle du substituant qu'à sa charge ionique.

Par ailleurs, la solubilité des CDs dans une phase mobile principalement aqueuse augmente avec la température [23], ce qui pourrait provoquer une diminution de leur rétention. Or c'est l'effet inverse qui est observé. Cette augmentation de rétention pourrait s'expliquer en partie par une moins grande rigidité des CDs à haute température, ce qui leur permettrait d'augmenter leur surface de contact avec le PGC et donc leur rétention (paragraphe II.3.).

Le tracé du logarithme du facteur de rétention en fonction de l'inverse de la température, $\ln k = f(1/T)$ (courbe de Van't Hoff) montre une linéarité satisfaisante ($r^2 > 0.96$) et des pentes de l'ordre de -3000 pour les trois isomères. Pour la β -CD native, cette pente est de l'ordre de -2200 , montrant que sa rétention est moins influencée par la température que celle des isomères. La pente étant égale à $-\Delta H/R$, on en déduit que ΔH (enthalpie de transfert du soluté de la phase mobile vers la phase stationnaire) est positif, autrement dit, le processus de transfert de la β -CD ($\Delta H = 18,3$ kJ/mol) et des trois isomères ($\Delta H = 25$ kJ/mol) de la phase mobile vers la phase stationnaire est endothermique. Ces valeurs d'enthalpie sont du même ordre de grandeur que celle rencontrées lorsque l'effet de la température est inverse (rétention diminuée).

Entre 30 et 75°C, la sélectivité entre les isomères est faiblement affectée par l'augmentation de température de la colonne puisque le facteur de séparation α entre les deux premiers isomères, A et B, passe de 1,45 à 1,30 et qu'il reste proche de 1,26 entre B et C. En revanche cette augmentation de température a un effet

bénéfique sur l'efficacité de la séparation puisque celle-ci augmente pour les trois dérivés passant d'environ 900 à 3000 plateaux théoriques pour le dernier isomère (pic C).

Globalement, une température de colonne élevée permet d'améliorer la séparation des trois isomères de SBE- β -CD monosubstituée : entre 30 et 75°C, la résolution passe de 2,4 à 4 entre les pics A et B et de 1 à 2,5 entre les pics B et C.

En résumé, l'augmentation de la température de la colonne a un effet bénéfique sur la séparation, en partie grâce à une meilleure efficacité, ce qui est le phénomène attendu [4, 5].

Notons toutefois que la comparaison rigoureuse de résultats obtenus dans différentes conditions chromatographiques nécessite de travailler à vitesse réduite constante, ce qui n'a pas été le cas ici. En effet, le coefficient de diffusion des analytes augmente avec la température ce qui entraîne une diminution de la vitesse réduite. Il aurait donc été préférable d'accroître le débit de la phase mobile à mesure que la température de la colonne augmentait.

Afin de déterminer si les mécanismes de rétention à 75°C sont les mêmes qu'à température ambiante, l'étude de l'influence de la composition de la phase mobile a été effectuée à cette température.

III.4. Influence du pourcentage d'acétonitrile

L'influence du pourcentage d'ACN dans la phase mobile a été étudiée à 75°C avec une phase mobile contenant 30 mM de $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$ et une proportion variable d'ACN comprise entre 16 et 19%. La figure 2.4 montre les chromatogrammes obtenus.

La rétention des analytes diminue lorsque la proportion de modificateur organique augmente. Le logarithme du facteur de rétention varie linéairement en fonction de la proportion volumique d'ACN dans la phase mobile tant pour les trois isomères que pour la β -CD native ($r^2 > 0,99$), comme on l'observe en RPLC. Les coefficients directeurs des droites correspondant aux isomères sont similaires et proches de -15 montrant que la sélectivité entre les isomères n'est pas influencée par la proportion d'ACN dans la gamme étudiée. De même, efficacité et résolution ne sont pas modifiées.

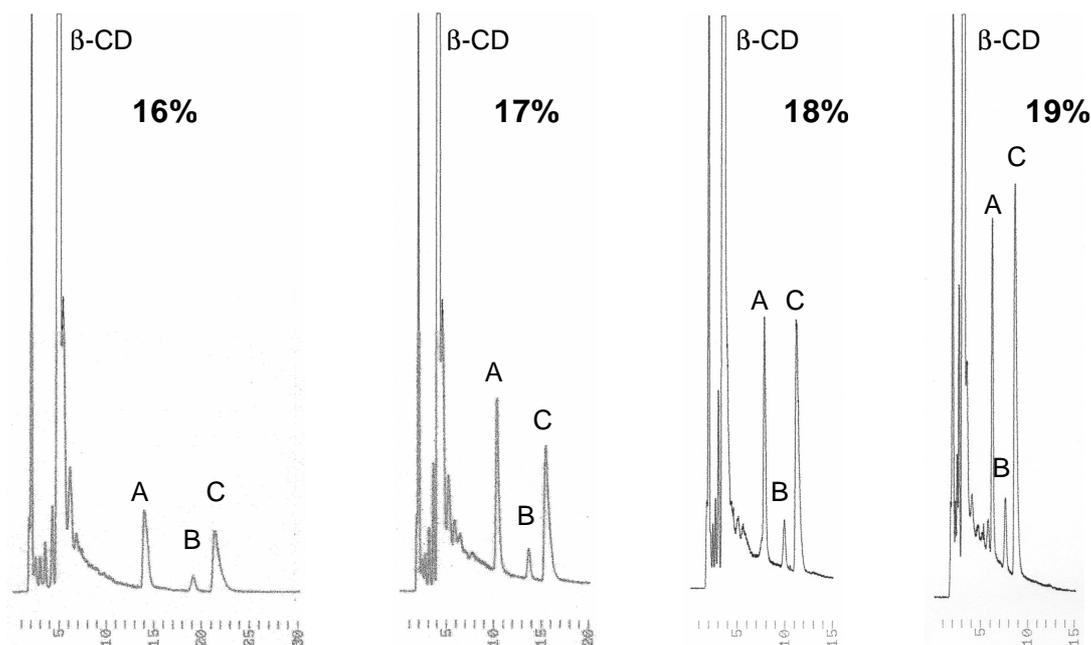


Figure 2.4. Influence de la proportion d'ACN sur la séparation chromatographique des trois isomères de la SBE- β -CD monosubstituée.

Conditions : colonne Hypercarb (100 x 4,6 mm ; 5 μ m) ; phase mobile : H₂O/ ACN + 30 mM de NH₄CH₃CO₂ ; température de la colonne : 75°C ; débit : 1 mL/min ; détection : DEDL.

Ordre d'élution : A : 3-O-SBE- β -CD, B : 6-O-SBE- β -CD, C : 2-O-SBE- β -CD.

La figure 2.4 montre qu'une faible augmentation du pourcentage d'ACN induit une considérable diminution de la rétention des isomères. La proportion d'ACN dans la phase mobile doit donc être précisément ajustée pour obtenir des analyses répétables.

III.5. Influence de la concentration en sel

Initialement, deux sels ont été utilisés en tant que compétiteurs électroniques : l'acétate d'ammonium et l'hydrogencarbonate d'ammonium, choisis pour leur compatibilité avec le DEDL [24]. Rétention et séparation n'ont pas montré de différence significative avec la nature du sel. L'hydrogencarbonate d'ammonium étant un peu moins stable en solution (dégagement de dioxyde de carbone), l'acétate a été choisi pour poursuivre les travaux.

L'influence de la concentration en sel a été étudiée à 75°C avec une phase mobile contenant 17% d'ACN. La figure 2.5 montre les chromatogrammes obtenus avec 15, 30, 50 et 80 mM de sel.

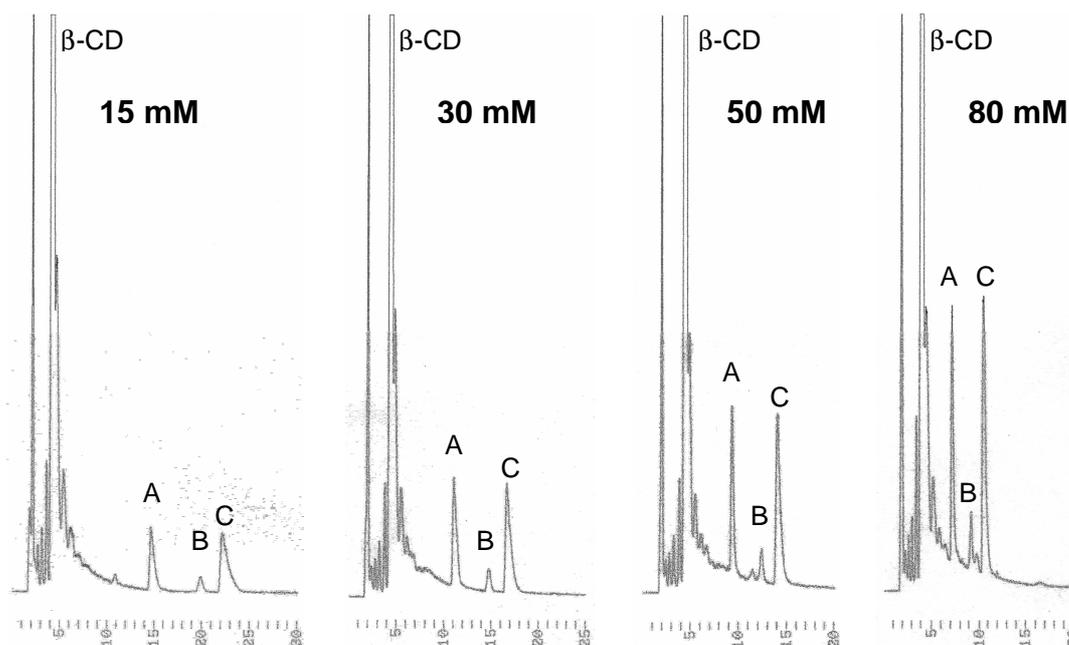


Figure 2.5. Influence de la concentration en sel sur la séparation chromatographique des trois isomères de la SBE- β -CD monosubstituée.

Conditions : colonne Hypercarb (100 x 4,6 mm ; 5 μ m), phase mobile : H₂O/ ACN (83/17) + NH₄CH₃CO₂ ; température de la colonne : 75°C ; débit : 1 mL/min ; détection : DEDL.

Ordre d'élution : A : 3-O-SBE- β -CD, B : 6-O-SBE- β -CD, C : 2-O-SBE- β -CD.

Il apparaît que la rétention des isomères diminue lorsque la concentration en sel augmente tandis que la rétention de la β -CD native n'est pas modifiée. Malgré l'absence de groupements échangeurs d'ions sur la surface du PGC, les courbes obtenues en traçant le logarithme du facteur de rétention des isomères en fonction du logarithme de la concentration en sel montrent une bonne linéarité ($r^2 > 0,98$), caractéristique de la chromatographie d'échange d'ions. Les droites correspondant aux trois isomères ont un coefficient directeur similaire et proche de 0,54, montrant que la sélectivité n'est pas affectée par la concentration en sel. De même, efficacité et résolution ne sont pas modifiées.

Notons qu'en CEI, le coefficient directeur de telles droites est égal au rapport de la charge de l'analyte sur la charge de l'ion compétiteur. Les SBE- β -CDs étant chargées quelque soit le pH, la charge du dérivé monosubstitué est égale à 1, tout comme celle de l'ion acétate. Dans un mécanisme d'échange d'ions pur, le coefficient des droites devrait donc être égal à 1, comme cela a été montré lors de l'analyse des SBE- β -CDs sur une colonne échangeuse d'anions à base d'amine

quaternaire [21]. La plus faible valeur obtenue ici montre bien que le PGC ne se comporte pas comme un vrai support échangeur d'ions.

IV. CONCLUSIONS

Cette étude a permis de mettre en évidence l'avantage d'utiliser le PGC à température élevée pour la séparation des trois isomères de SBE- β -CD monosubstituée : à hautes températures, la résolution est améliorée.

A température élevée comme à température ambiante, la rétention est principalement gouvernée par des mécanismes de chromatographie à polarité de phase inversée, les interactions électroniques jouant un rôle secondaire mais toutefois nécessaire.

Une température de colonne de 75°C et une phase mobile eau/ACN (83/17) contenant 15 mM de sel permettent la séparation totale des trois isomères. De plus, le DEDL permet la détermination de leurs proportions relatives. Celles-ci ont été calculées à partir de l'aire des pics et sont égales à 35/7/58 pour les 3-/6-/2-O-SBE- β -CDs, respectivement, dans le mélange analysé. Ces proportions montrent que la substitution a majoritairement eut lieu sur les fonctions hydroxyles secondaires (positions 2 et 3). Ces résultats montrent que des conditions de réaction douces (milieu dilué, température ambiante) permettent de favoriser la substitution des positions 2 et 3 tandis que des conditions plus dures entraînent majoritairement la substitution de la position 6 [1].

Cette méthode d'analyse permet donc d'estimer la stéréosélectivité de la réaction de synthèse des SBE- β -CDs. De plus, grâce à la grande résolution obtenue, elle permet une transposition facilitée à l'échelle semi-préparative en vue d'isoler les isomères.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article dont les références sont :

Liquid Chromatography analysis of monosubstituted sulfobutylether- β -cyclodextrin isomers on porous graphitic carbon.

R. Jacquet, R. Pennanec, C. Elfakir, M. Lafosse, J. Sep. Sci. 27 (2004) 1221-1228.

B. CARACTERISATION D'UNE ME-b-CD FAIBLEMENT SUBSTITUEE

I. INTRODUCTION

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, la caractérisation des Me- β -CDs a fait l'objet de nombreuses publications. Toutefois, ces travaux ont principalement porté sur l'analyse de mélanges de CDs diméthylées (DM- β -CDs, DS voisin de 2) ou triméthylées (TM- β -CDs, DS = 3). A notre connaissance, la caractérisation de CDs faiblement méthylées ($DS \leq 1$) est très peu décrite.

Cette partie présente la caractérisation d'une nouvelle Me- β -CD récemment mise sur le marché sous le nom de Kleptose® Crysmeb par la société Roquette. Son DS moyen annoncé par le fabricant et déterminé par infusion directe en spectrométrie de masse (ESI-MS), est compris entre 0,4 et 0,7 [26]. Cette nouvelle CD a été initialement développée pour des applications principalement pharmaceutiques mais aussi cosmétiques.

D'après le fabricant, cette CD se caractérise par une bonne solubilité dans l'eau qui, contrairement à celle des DM- β -CDs, augmente avec la température (tableau 2.1). De plus, sa capacité à solubiliser certains composés à travers la formation de complexes d'inclusion est améliorée (tableau 2.2) et les résultats des premières analyses toxicologiques indiquent une bonne tolérance biologique (tableau 2.3).

Tableau 2.1. Comparaison des solubilités dans l'eau (g/100 mL) de la β -CD native et de Me-b-CDs commerciales.

	25°C	40°C	55°C
β -CD ¹	1,9	3,4	5,3
Crysmeb ²	22	32	48
DM- β -CD ¹	65,8	31,3	6,1

¹ : d'après [27], ² : d'après [26].

Tableau 2.2. Comparaison du pouvoir de solubilisation dans l'eau de diverses CDs modifiées à une concentration de 5 g/100 mL vis-à-vis de l'hydrocortisone. D'après [26].

	Hydrocortisone solubilisée (mg/mL)
Crysmeb	10,5
HPB ¹	5,1
RAMEB ²	7,1
DIMEB ³	8,8

¹ : HPB = HP- β -CD, ² : RAMEB = DM- β -CD de DS 1,8 substituée de manière aléatoire, ³ : DIMEB = DM- β -CD de DS 2 substituée spécifiquement en position 2 et 6.

Tableau 2.3. Comparaison de l'hémolyse¹ provoquée par diverses CDs modifiées.

D'après [26].

	Concentration	Hémolyse in vitro
Crysmeb	Jusqu'à 10%	Non significative
HPB	Jusqu'à 20%	Non significative
RAMEB	De 5 jusqu'à 14%	Hémolyse intense

¹ : Hémolyse, destruction des globules rouges du sang.

Comme on peut le constater à la lecture des tableaux ci-dessus, les propriétés physico-chimiques de cette Me- β -CD faiblement substituée sont différentes de celles des DM- β -CDs, largement utilisées. On peut donc raisonnablement penser que la caractérisation d'un tel mélange nécessitera une adaptation des méthodologies mises au point pour l'analyse des DM- β -CDs.

Nous avons donc entrepris la caractérisation de cette Me- β -CD faiblement substituée en utilisant les techniques analytiques suivantes : RMN, CPL, SM (MALDI et ESI) ainsi que CPL-SM. Notre objectif était de vérifier la sélectivité de la réaction de méthylation (substitution préférentielle en position 2 d'après le fabricant [26]) et de déterminer la réelle complexité du mélange en mettant en évidence ses différents constituants.

II. RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les conditions expérimentales détaillées, produits et matériels utilisés sont regroupés en annexe II.

II.1. Analyse par RMN

La Me- β -CD a d'abord été analysée par RMN ^1H afin de déterminer son DS moyen et tenter de déterminer les positions de substitution majoritaires. L'utilisation de D_2O permet d'éliminer les signaux provenant des protons des groupes hydroxyles, remplacés par des atomes de deutérium, et ainsi de simplifier le spectre. La β -CD a été analysée dans les mêmes conditions. La figure 2.6 montre les spectres obtenus.

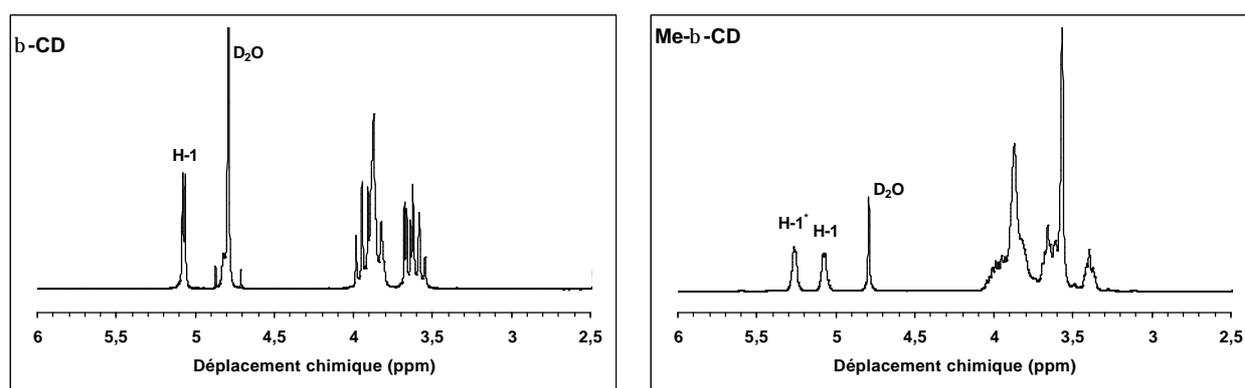


Figure 2.6. Spectres RMN ^1H (250 MHz) de la b-CD et de la Me-b-CD dans D_2O . Le signe * indique les protons H-1 des unités glucopyranose substituées en position 2.

Le DS moyen est calculé à partir de la différence d'intégration entre le spectre de la β -CD native et celui de la Me- β -CD. Cette dernière présente 14,38 protons supplémentaires soit $14,38 / 3 = 4,79$ groupes méthyle par CD. Le DS est donc égal à $4,79 / 7 = 0,68$ groupes méthyle par unité glucopyranose. Cette valeur est en accord avec la gamme donnée par le fabricant qui est de 0,4 – 0,7 [26].

Dans ces conditions d'analyse, les 7 protons H-1 de la β -CD native sont détectés sous la forme d'un doublet à 5,07 ppm [28] tandis que ceux de la Me- β -CD sont détectés sous la forme de deux doublets à 5,07 et 5,27 ppm. Le dernier de ces doublets correspond aux protons H-1 des unités glucopyranose méthylées en

position 2. Les groupes hydroxyle situés en position 3 et 6 sont en effet trop éloignés du proton H-1 pour que leur méthylation en affecte le déplacement chimique. Si cette Me- β -CD portant 4,79 groupes méthyle en moyenne n'était substituée qu'en position 2, l'intégration des doublets se trouvant à 5,27 et 5,07 ppm devrait donner un rapport de 4,79 / 2,21, respectivement. Or, dans le cas présent, ce rapport est de 3,6 / 3,4 ce qui indique qu'il n'y a que 3,6 groupes méthyles en position 2 et $4,79 - 3,6 = 1,19$ groupes méthyles en position 6, celle-ci étant plus réactive et accessible que la position 3. La présence de groupes méthyles en position 6 est d'ailleurs confirmée par le fabricant qui annonce toutefois que ces substitutions ne sont présentes que sous forme de traces [26]. Les présents résultats montrent pourtant que, dans notre échantillon, les groupes hydroxyles substitués lors de la réaction de méthylation se trouvaient à 75% sur la position 2 et à 25% sur la position 6. La voie de synthèse utilisée n'est donc pas totalement sélective.

II.2. Analyse par CPL

La Me- β -CD a ensuite été analysée par CPL afin d'obtenir une empreinte chromatographique du mélange et en évaluer la réelle complexité. La CPL permet en effet de distinguer les isomères de substitution et apporte donc des informations complémentaires sur les constituants du mélange.

La chromatographie à polarité de phases inversée (RPLC) a été préférée à la chromatographie à polarité de phases normale (NPLC) en vue d'effectuer le couplage CPL-ESI-SM. Les solvants utilisés en RPLC sont en effet plus compatibles avec cette technique d'ionisation [29] et ne nécessitent pas l'ajout d'un liquide additionnel.

Toutefois, avant que le couplage ne soit réalisé, la séparation a été optimisée avec une détection par DEDL. En effet, comme les SBE- β -CDs, les Me- β -CDs n'absorbent pas en UV et le DEDL a déjà été utilisé avec succès pour l'analyse de DM- β -CDs par CPL et SFC [30].

De précédents travaux ont montré que la résolution de mélanges complexes de DM- β -CDs par RPLC est grandement influencée par la nature du support chromatographique utilisé [31, 32]. En effet, parmi diverses colonnes greffées C8, C18 et phényle, les supports monomériques ou à base de silice présentant des interactions hydrophobes et polaires renforcées ont montré les meilleures

performances. Les colonnes Nucléosil 50-5-C8 [32] et Zorbax Phényle [31] sont apparues comme les meilleures alternatives pour obtenir de bonnes séparations. En outre, pour ces analyses, les phases mobile H₂O/ACN ont montré de meilleures sélectivité et efficacité que les phases mobiles H₂O/MeOH [31].

Les présents travaux ont donc été entrepris dans un premier temps avec ces deux colonnes chromatographiques (voir leurs caractéristiques en annexe III) et une phase mobile composée d'eau et d'ACN. Un gradient d'élution a été nécessaire pour séparer les différents constituants du mélange. La figure 2.7 montre que ces deux colonnes, de dimensions similaires mais ayant des greffons différents, fournissent des empreintes chromatographiques comparables, tant au niveau de la rétention que de la sélectivité.

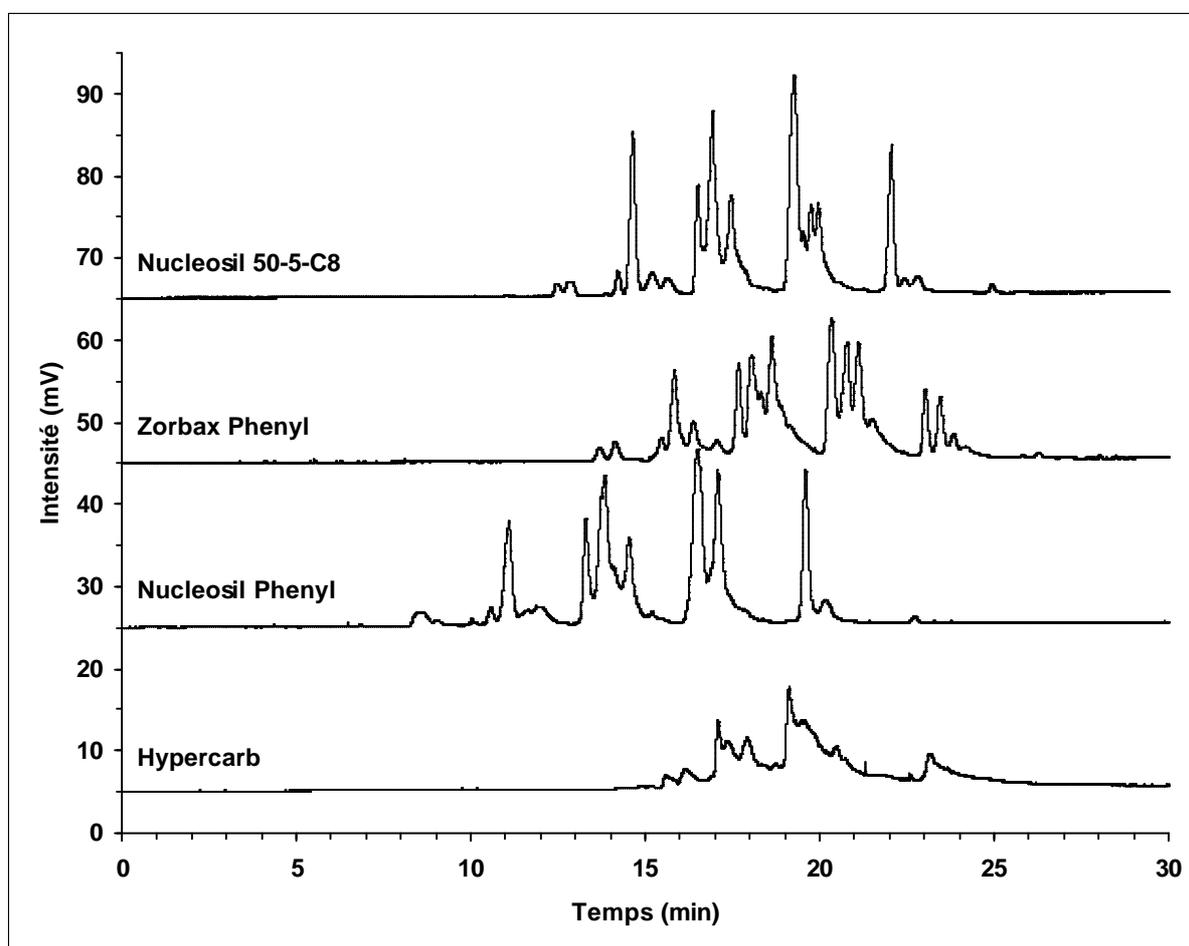


Figure 2.7. Comparaison des chromatogrammes de la Me-b-CD obtenus sur différentes colonnes.

Conditions : colonnes Nucléosil C8 (250 x 4,6 mm ; 5 μ m), Zorbax Phényl (250 x 4,6 mm ; 7 μ m), Nucléosil phényl (150 x 4,6 mm ; 7 μ m), Hypercarb (100 x 4,6 mm ; 5 μ m) ; phase mobile : H₂O/ACN 95/5 à 55/45 en 40 min ; débit : 1 mL/min ; détecteur : DEDL.

La même analyse a été menée sur une colonne Nucléosil Phényle afin d'observer l'influence du support chromatographique d'une part, et celle de la nature des greffons d'autre part. Le chromatogramme obtenu montre une plus faible sélectivité qu'avec les deux colonnes précédentes, ce qui souligne à nouveau l'importance du choix de la colonne pour l'analyse des Me- β -CDs.

Cette Me- β -CD étant moins méthylée que les DM- β -CDs, elle est aussi plus polaire et moins hydrophobe. Afin d'obtenir une empreinte chromatographique plus riche pour cette Me- β -CD, il s'est avéré judicieux de l'analyser sur une colonne présentant des interactions hydrophobes renforcées par rapport à celles des colonnes précédentes. Les caractéristiques de la colonne Purospher Star RP18 EC (silice très pure sans trace de métaux, greffage et désactivation des silanols résiduels ayant pour conséquence une structure de type multicouches) en font un support très hydrophobe. Comme le montre la figure 2.8, l'utilisation de cette colonne, pourtant plus courte que les précédentes, a permis l'obtention d'une plus grande sélectivité et d'une meilleure efficacité.

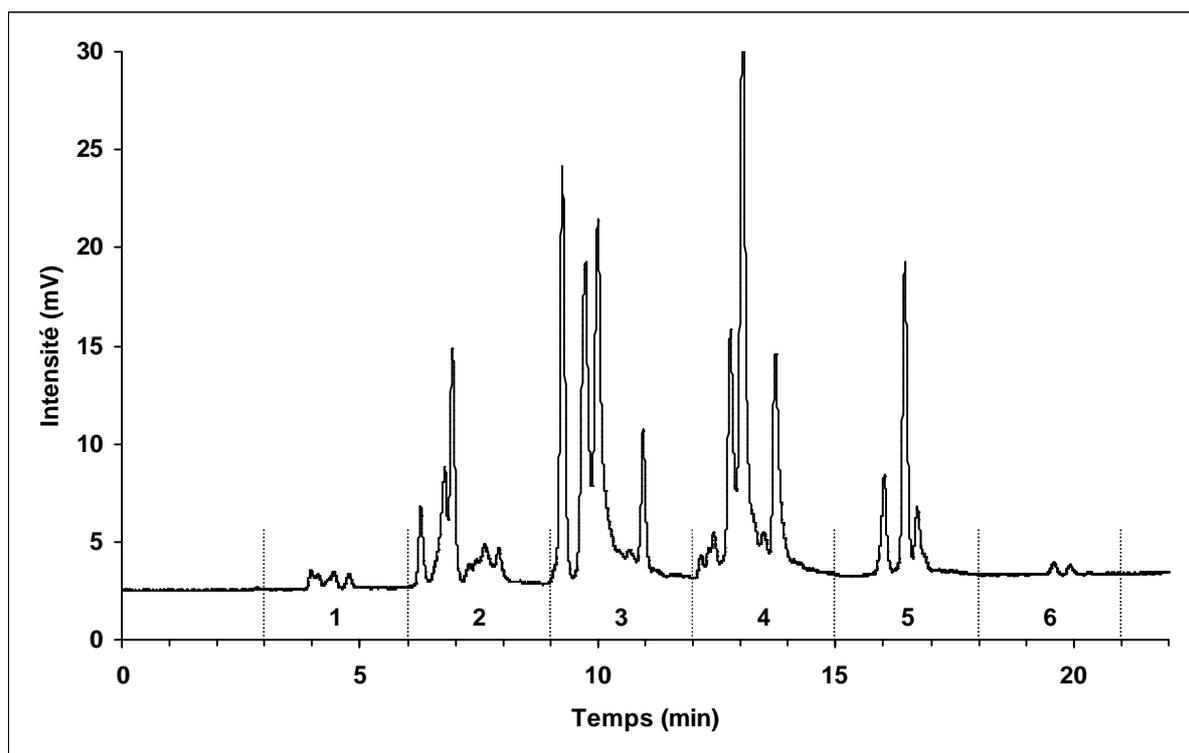


Figure 2.8. Chromatogramme de la Me- β -CD obtenu sur colonne Purospher Star RP18 EC (125 x 4 ; 5 μ m).

Conditions : phase mobile : H₂O/ACN 95/5 à 55/45 en 40 min ; débit : 1 mL/min ; détecteur : DEDL.

Les pointillés et les chiffres indiquent respectivement les limites et numéros des fractions collectées ultérieurement par chromatographie semi-préparative.

Puisque l'augmentation des interactions hydrophobes s'est révélée avantageuse, il nous a semblé alors intéressant de transposer l'analyse sur un support de carbone graphite poreux (PGC). Ce support est en effet plus hydrophobe que les colonnes à base de silice greffées C18 et permet la séparation de composés structurellement proches, comme nous l'avons vu pour les trois isomères de la SBE- β -CD monosubstituée (partie A). Toutefois, l'utilisation de cette colonne conduit à un chromatogramme caractérisé par une faible résolution des différents groupes de pics ainsi qu'à une faible efficacité (figure 2.7).

L'étude a donc été poursuivie avec la colonne Purospher Star, qui, comme le montre la figure 2.8, a permis l'obtention de l'empreinte chromatographique la plus riche. Le chromatogramme, obtenu en utilisant un gradient d'éluion, se compose de plusieurs pics de différentes intensités ayant des temps de rétention compris entre 3 et 21 min. Ceci est un indice de l'hétérogénéité du mélange et en particulier de la large gamme de polarité des constituants. A l'opposé, les principaux constituants des mélanges de DM- β -CDs sont séparés en condition isocratique [30-32]. En résumé, la gamme de polarité des constituants de cette Me- β -CD faiblement substituée est plus large que celle des mélanges de DM- β -CDs. L'addition d'un groupement méthyle semble donc modifier plus fortement les propriétés d'une CD portant seulement 5 groupes méthyle que celles d'une CD portant déjà 14 groupes méthyles.

Afin d'obtenir plus d'informations sur les constituants de cette Me- β -CD, leur identification par SM a été envisagée. Le spectromètre MALDI-SM étant le seul disponible à ce stade des travaux, le mélange brut a été fractionné par chromatographie semi-préparative afin d'en analyser chacune des fractions par MALDI-SM. Comme l'indique la figure 2.8, les pics détectés par DEDL ont été regroupés en 6 groupes selon leurs temps de rétention. Ces différents groupes ont tout d'abord été considérés comme correspondant aux CDs portant différents nombres de groupes méthyle, les dérivés les plus retenus étant les plus substitués car les plus apolaires, comme dans le cas des DM- β -CDs [31, 32].

Le fractionnement a donc été conduit en augmentant la concentration de l'échantillon injecté, de 2 à 10 g/L. La résolution n'a pas été modifiée par cette surcharge, montrant la grande capacité de cette colonne. Six fractions ont ainsi été collectées correspondant aux six groupes de pics de la figure 2.8.

Le DEDL étant un détecteur destructif, il a été déconnecté du système chromatographique pendant le fractionnement afin de récupérer le maximum d'échantillon. L'isolement des fractions a ainsi été conduit sans détection et uniquement sur la base du suivi des temps de rétention. Afin de vérifier la pureté des fractions collectées, celles-ci ont ensuite été analysées par RPLC dans les mêmes conditions que le mélange brut. La figure 2.9 comparée à la figure 2.8 met en évidence que le fractionnement « en aveugle » a bien été effectué comme prévu : chaque fraction collectée contient le mélange de constituants sélectionné sur la figure 2.8.

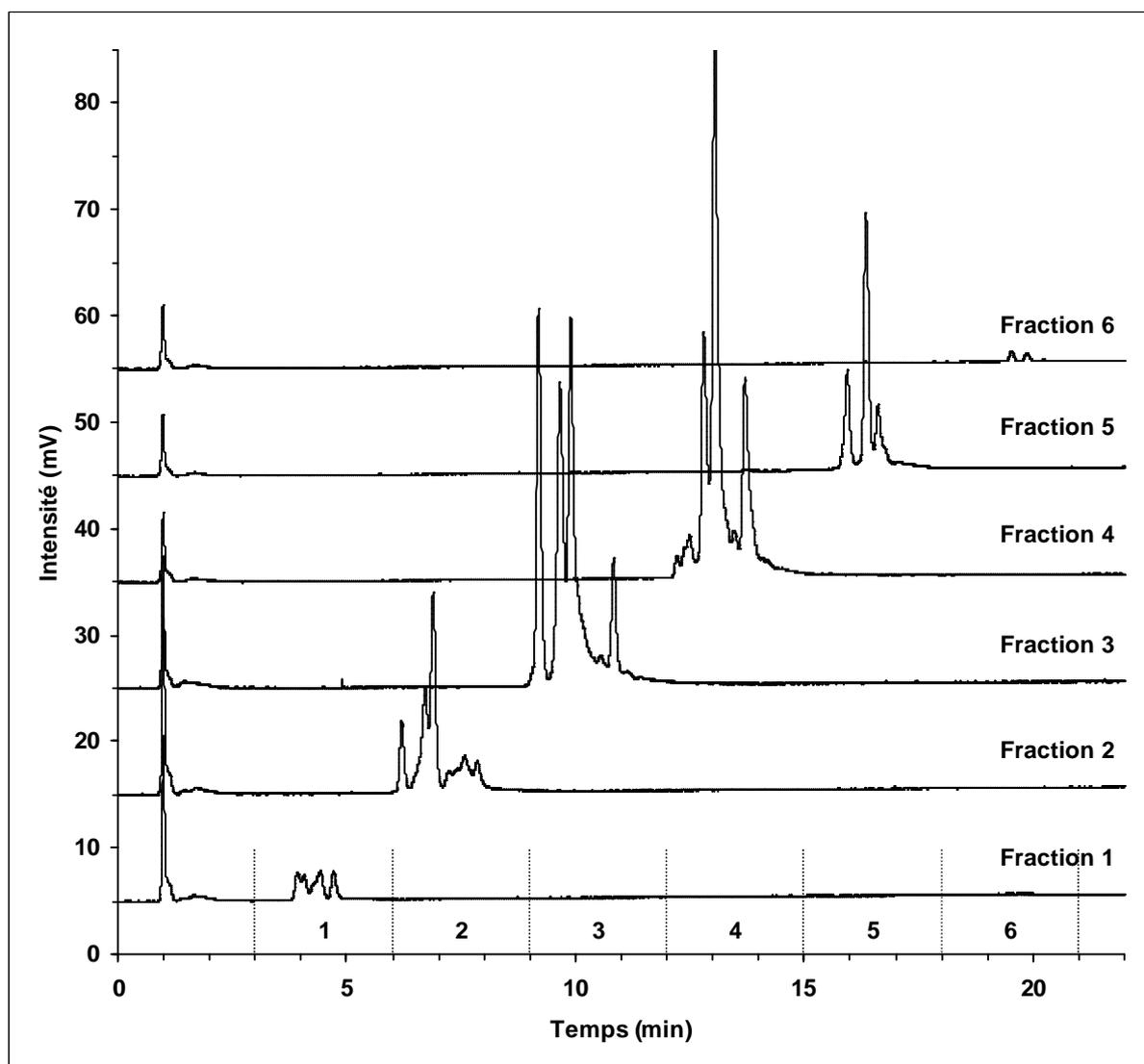


Figure 2.9. Chromatogrammes des fractions de Me-b-CD obtenus sur colonne Purospher Star RP18 EC (125 x 4 ; 5 μ m).

Conditions : phase mobile : H₂O/ACN 95/5 à 55/45 en 40 min ; débit : 1 mL/min ; détecteur : DEDL.

Les pointillés et les chiffres indiquent respectivement les limites et numéros des fractions collectées par chromatographie semi-préparative.

Ces fractions ont ensuite été analysées par spectrométrie de masse en mode MALDI afin de déterminer la masse des composés à l'intérieur de chacune d'elles et d'élucider les mécanismes de rétention en jeu dans cette séparation.

II.3. Analyse par MALDI-SM

Les analyses par MALDI-SM ont tout d'abord été conduites sur le mélange brut afin de déterminer le profil de substitution du mélange, confirmer la valeur du DS obtenu par RMN et définir les meilleures conditions d'analyse pour les appliquer par la suite aux fractions collectées, celles-ci n'étant disponibles qu'en faible quantité.

La technique MALDI-SM est un outil de choix pour l'analyse des composés saccharidiques [33] et elle a été appliquée avec succès à la caractérisation de diverses CDs modifiées (voir chapitre 1). Cette technique repose sur l'utilisation d'une matrice, molécule que l'on dépose sur la cible avec l'échantillon afin d'en obtenir l'ionisation et donc en permettre l'analyse.

Pour commencer, 4 matrices, déjà utilisées pour l'analyse de CDs neutres ou ioniques, ont été comparées : l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) [34, 35, 36], l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) [35, 37, 38], la 1-hydroxy-isoquinoléine (HIQ) [38] et l'acide 3-hydroxypicolinique (HPA) [36]. L'analyse des cristaux de matrice seule (sans analytes) a tout d'abord été effectuée pour vérifier l'absence de signaux entre 1000 et 1500 Da, gamme de masse attendue pour les différents dérivés potentiellement présents dans le mélange de Me- β -CDs. Aucun pic n'a été détecté dans cette gamme de masse. Différents seuils d'ionisation ont été trouvés selon la matrice utilisée : seulement 40% de la puissance du laser ont suffi pour ioniser CHCA alors que 60% ont été nécessaires pour DHB et HIQ et 80% pour HPA.

La Me- β -CD a ensuite été analysée avec chacune de ces matrices afin de déterminer la plus appropriée. Avec HIQ et HPA, les signaux ont été difficiles à obtenir et les spectres obtenus montraient une mauvaise résolution. Ces deux matrices ont donc été abandonnées. L'utilisation de CHCA et DHB a mené à des spectres comparables ayant des résolutions similaires. L'utilisation de CHCA présentait l'avantage de nécessiter une puissance de laser plus faible pour l'obtention d'un signal, ce qui permet de limiter d'éventuelles fragmentations [35]. Cette matrice a donc été choisie pour la suite des travaux.

Dans ces conditions d'analyse, les différents dérivés constituant le mélange ont été détectés sous la forme d'adduits sodium $[M+Na]^+$. La formation d'adduits potassium $[M+K]^+$ a été limitée par l'ajout de NaCl dans les échantillons analysés, comme cela a déjà été décrit pour les DM- β -CDs [37]. En effet, la détermination du DS requiert la quantification relative des différents dérivés, ce qui est plus simple lorsque ceux-ci ne sont détectés que sous un seul type d'ions.

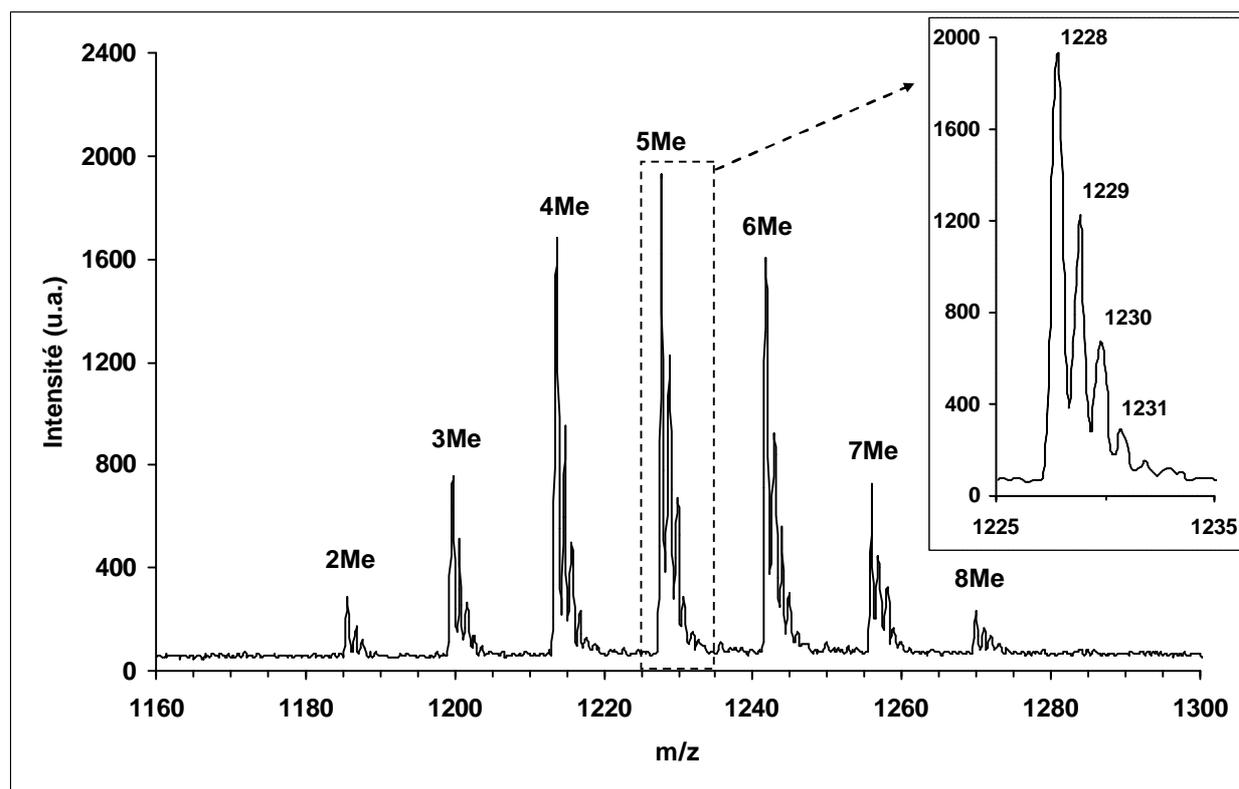


Figure 2.10. Spectre de masse MALDI-SM de la Me-b-CD.

Conditions : matrice : CHCA ; dépôt des échantillons par méthode des couches minces ; accumulation de 50 tirs laser.

Le nombre de groupes méthyle par CD est indiqué au-dessus du massif isotopique correspondant.

Le spectre obtenu (figure 2.10) montre 7 dérivés différents portant de 2 à 8 groupes méthyle par CD. Chacun de ces dérivés est détecté sous la forme d'un massif isotopique identique à celui obtenu pour la β -CD native dans les mêmes conditions. La différence de masse de 14 Da entre deux dérivés consécutifs correspond à la méthylation d'un groupe hydroxyle. La résolution, définie par $R = M / \Delta M_{FWMH}$, où M est le rapport m/z d'un pic et ΔM_{FWMH} , sa largeur à mi-hauteur (Full Width at Half Maximum), a été mesurée sur le pic le plus intense de chaque massif

isotopique et était comprise entre 2000 et 2500, valeurs identiques à celles obtenues lors de l'analyse de DM- β -CDs avec un spectromètre muni d'un reflectron [35].

Le profil gaussien de la distribution des dérivés illustre clairement le type de mélange obtenu par méthylation des CDs et la difficulté de n'obtenir qu'un seul dérivé. Le DS moyen a été calculé à partir de la hauteur des pics, méthode de quantification des dérivés de CDs équivalente à celle utilisant les aires [34]. En supposant que les dérivés ont la même réponse, la valeur obtenue est de 0,71 ce qui est en bon accord avec celle calculée à partir des analyses RMN et égale à 0,68.

Notons que le spectre de la figure 2.10 a été obtenu en déposant l'échantillon selon la méthode des couches minces [39] (voir annexe II). Les études préliminaires ont révélé que la méthode de dépôt de l'échantillon avait une grande influence sur les résultats obtenus. Avec la méthode des couches minces, les spectres sont reproductibles et le DS calculé est constant. Au contraire, les spectres obtenus avec la méthode usuelle de la goutte sèche sont plus variables et montrent une augmentation de l'intensité relative des pics correspondant aux dérivés les plus substitués par rapport aux autres dérivés (figure 2.11), ce qui mène à une considérable surestimation du DS.

A notre connaissance, une telle influence de la méthode de dépôt de l'échantillon sur le spectre MALDI-SM de Me- β -CDs n'a jamais été rapportée. Par ailleurs, la méthode de la goutte sèche a été utilisée avec succès pour l'analyse quantitative de DM- β -CDs où une très bonne corrélation ($r^2 > 0,995$) a été trouvée entre réponse et concentration [34].

Il a été rapporté qu'avec plusieurs techniques d'ionisation (MALDI, ESI et APCI), l'efficacité d'ionisation et donc la réponse des Me- β -CDs augmente avec le nombre de groupes méthyle [37]. Les auteurs de cette étude, qui ont utilisé la méthode de la goutte sèche, ont déterminé que c'est avec le MALDI que cette augmentation est la plus faible. Dans notre cas, avec la méthode des couches minces, aucun effet de ce type n'a pu être détecté puisque le DS calculé d'après le spectre de masse est en bon accord avec celui de la RMN. Seule la méthode de la goutte sèche semble donc conduire à une telle augmentation de l'efficacité d'ionisation avec le nombre de groupes méthyle. Cela pourrait s'expliquer par une influence de ces groupes méthyle sur la co-cristallisation des dérivés avec la matrice et donc sur leur rendement d'ionisation, les dérivés les substitués étant les plus facilement ionisés.

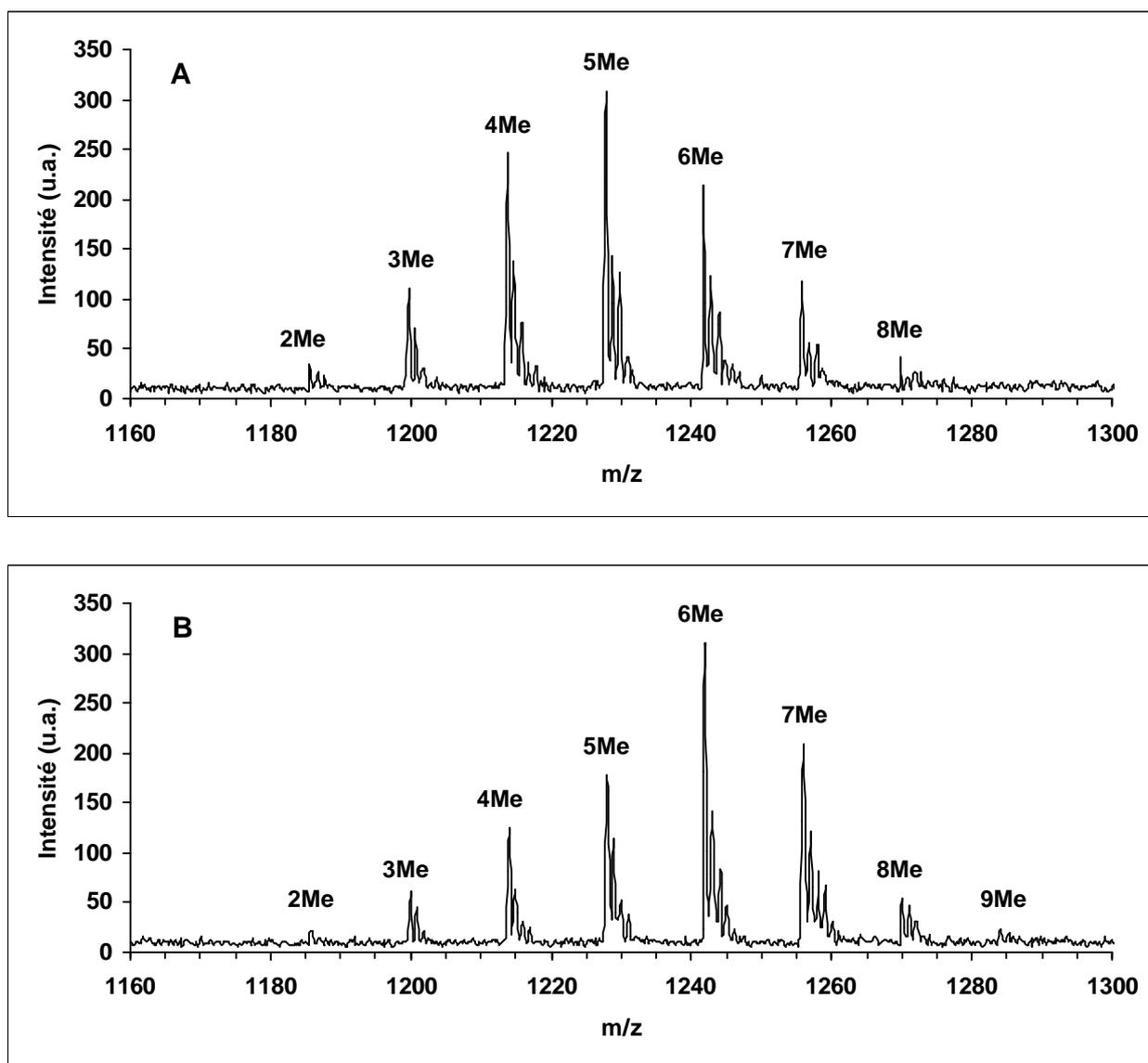


Figure 2.11. Spectres de masse MALDI-SM de la Me-b-CD.

Conditions : matrice : CHCA ; dépôt des échantillons par méthode des couches minces (A) et de la goutte sèche (B) ; accumulation de 10 tirs laser.

Le nombre de groupes méthyle par CD est indiqué au-dessus du massif isotopique correspondant.

Les conditions opératoires étant fixées, les fractions précédemment recueillies par chromatographie semi-préparative ont été analysées par MALDI-SM. La figure 2.12 montre que le fractionnement effectué selon le principe reporté sur la figure 2.8, ne correspond pas à un fractionnement simple des dérivés selon leur DS. En effet, dans la fraction 1, seul un dérivé est détecté mais les autres fractions présentent 2 ou 3 dérivés différents. La fraction 4, par exemple, contient des CDs portant 5, 6 ou 7 groupes méthyle. La première conclusion que l'on peut tirer est que des CDs portant différents nombres de groupes méthyle peuvent avoir des temps de rétention proches. D'autre part, un dérivé de DS donné peut se trouver dans plus d'une

fraction. Ainsi, des CDs portant 6 groupes méthyle sont détectées dans les fractions 3, 4 et 5. La seconde conclusion est que les différents isomères d'un même DS peuvent avoir une large gamme de temps de rétention et par conséquent, présenter des différences d'hydrophobie notable.

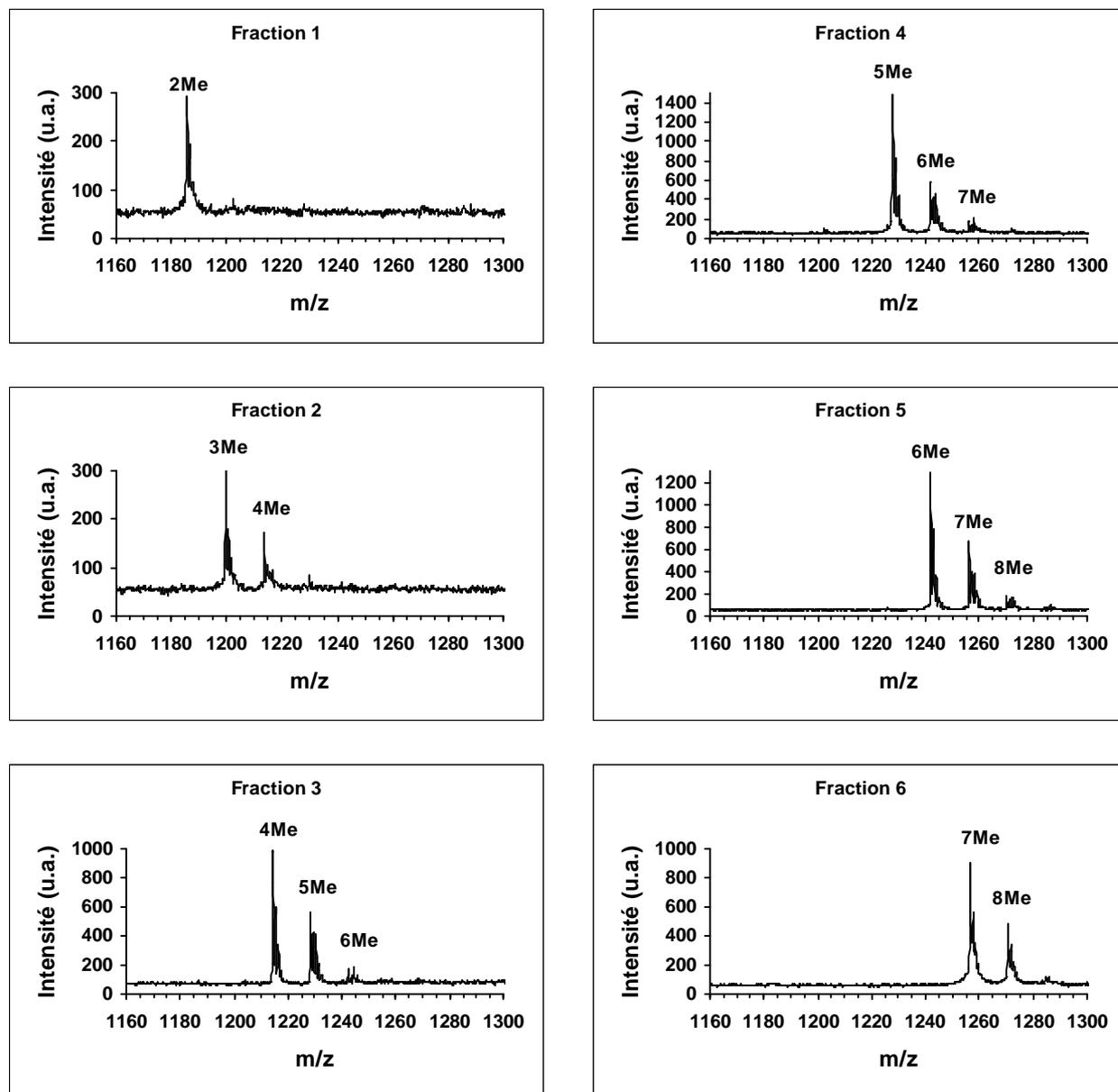


Figure 2.12. Spectres de masse MALDI-SM des fractions de Me-b-CD.

Conditions : matrice : CHCA ; dépôt des échantillons par méthode des couches minces ; accumulation de 50 tirs laser.

Le nombre de groupes méthyle par CD est indiqué au-dessus du massif isotopique correspondant.

En résumé, la rétention des différents dérivés, qui traduit leur polarité, n'est pas seulement influencée par le DS. En effet, plusieurs dérivés sont plus retenus que

leurs homologues moins méthylés, comme le montre la figure 2.12 où des CDs portant 5 groupes méthyle sont détectés dans la fraction 4 alors que des CDs portant un groupe supplémentaire sont détectés dans la fraction 3. La rétention des dérivés semble donc influencée, dans une certaine mesure, par la position des groupes méthyle sur la CD, constituée de 7 unités glucopyranose ayant chacune 3 positions de substitution possibles (positions 2, 3 et 6).

Afin de déterminer l'influence du DS sur la rétention globale des dérivés, le nombre moyen de groupes méthyle par CD a été calculé pour chaque fraction et représenté en fonction du temps de rétention des fractions. Comme le montre la figure 2.13, une bonne corrélation ($r^2=0.99$) a été trouvée, indiquant que la rétention est principalement gouvernée par le DS et globalement augmente avec le DS. En résumé, malgré une influence nette de la position de substitution, la rétention globale de ces dérivés, qui traduit leur polarité, est bien en relation directe avec leur DS.

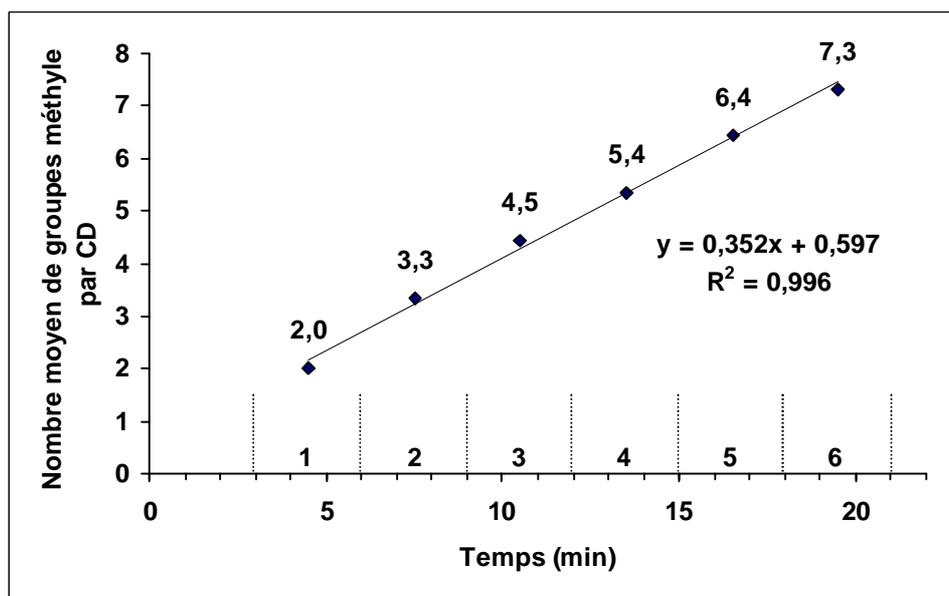


Figure 2.13. Représentation du nombre moyen de groupes méthyle par CD dans les différents fractions en fonction du temps de rétention des fractions.

Les pointillés et les chiffres indiquent respectivement les limites et numéros des fractions collectées par chromatographie semi-préparative.

II.4. Analyse par ESI-SM

Avant d'effectuer le couplage CPL-ESI-SM, la Me- β -CD a été infusée en ESI-SM afin d'une part, d'optimiser les conditions d'analyse et d'autre part, de confirmer

les résultats obtenus lors de l'utilisation du spectromètre MALDI-SM (profil de substitution et valeur du DS).

Tout comme pour les analyses effectuées en MALDI-SM, la détermination du DS moyen par ESI-SM requiert la quantification relative de chacun des dérivés présents dans le mélange, ce qui est plus aisé lorsqu'un seul type d'ions est produit. La composition de la solution infusée a donc été optimisée pour obtenir des spectres ne montrant que des CDs monochargées ayant un seul type d'adduit et sans fragmentation. Cette optimisation a été effectuée en gardant à l'esprit le couplage ultérieur de la CPL avec l'ESI-SM.

II.4.1 Influence de la composition du solvant d'infusion

Comme les groupes hydroxyles des CDs ne sont pas facilement protonés ou déprotonés, l'analyse en ESI-SM de ces molécules est généralement effectuée en présence de sel afin d'améliorer leur détection [37, 40, 41]. Les sels d'ammonium peuvent être utilisés grâce à leur volatilité [24] et génèrent la formation d'adduits ammonium $[M+NH_4]^+$ [37, 41].

L'optimisation a donc été entreprise en infusant une solution de la Me- β -CD (10 mg/L) et d'acétate d'ammonium (10mM) dans l'eau à 10 μ L/min. Dans ces conditions, les CDs sont détectées sous la forme d'adduits ammonium monochargés et dichargés, $[CD+NH_4]^+$ et $[CD+2NH_4]^{2+}$, respectivement (figure 2.14 A). Des fragments correspondant à la perte séquentielle d'unités glucopyranose $[(Glc)_n+NH_4]^+$ sont aussi produits, comme ceux observés en SM tandem [41, 42].

Plusieurs solutions d'échantillons ont été préparées dans des mélanges eau / solvant organique (50/50) avec MeOH, EtOH, PrOH, iPrOH et ACN, solvants communs en CPL, et ont été infusées dans les mêmes conditions que précédemment. La figure 2.14 montre que la composition de la solution infusée a une influence significative sur l'intensité et l'abondance relative des différentes espèces détectées. En effet, lorsque l'on passe de H₂O à H₂O/MeOH (50/50) puis H₂O/ACN (50/50), les espèces dichargées disparaissent. Ceci est dû d'une part, à la basicité croissante du solvant d'infusion qui va donc présenter une affinité croissante pour les ions NH₄⁺ et se les accaparer et d'autre part, à sa tension de vapeur croissante qui facilite la désolvatation (contrairement aux milieux protiques polaires).

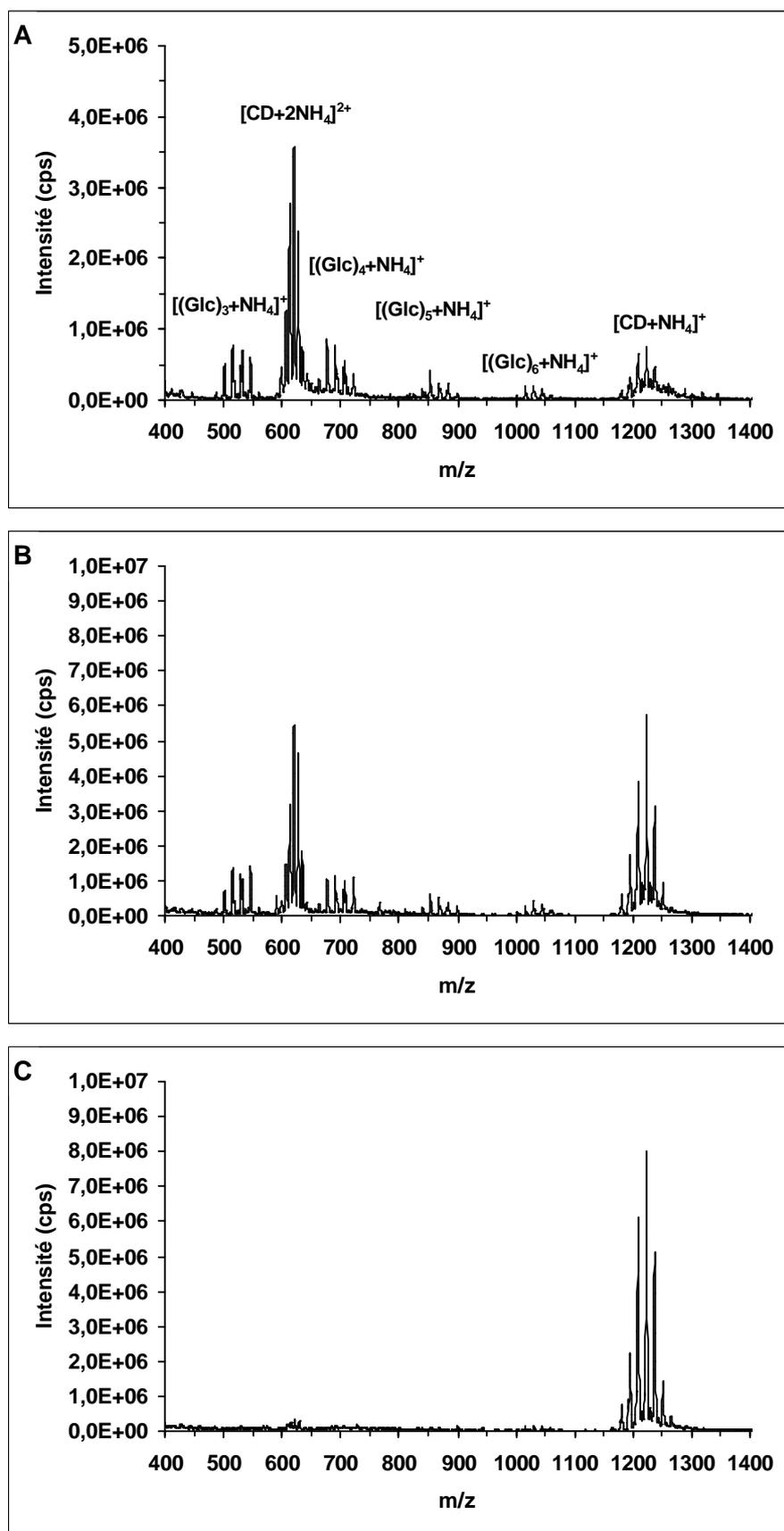


Figure 2.14. Influence de la composition du solvant d'infusion sur les spectres de masse ESI de la Me-b-CD.

Conditions : $[Me-\beta-CD] = 10 \text{ mg/L}$, $[NH_4CH_3CO_2] = 10 \text{ mM}$, solvant : eau (A), eau/MeOH (50/50) (B) et eau/ACN (50/50) (C) ; débit = $10 \mu\text{L/min}$.

Afin de faciliter l'interprétation des résultats et de comparer plus aisément les conditions analytiques, plusieurs valeurs ont été mesurées pour chaque solution infusée : le courant ionique total (TIC) et les intensités du pic le plus intense de CDs monochargés (I_{1+} , mesuré à $m/z = 1223$ Th), de CDs dichargés (I_{2+} , 620,5 Th) et de fragments (I_{fr} , 515,5 Th, $[(Glc)_2+NH_4]^+$). Le TIC et I_{1+} ont été utilisés pour comparer les intensités absolues et les rapports I_{1+}/I_{2+} et I_{1+}/I_{fr} ont été utilisés pour comparer l'intensité relative des CDs monochargés avec celle des CDs dichargés et des fragments, respectivement. L'optimisation a consisté à augmenter ces valeurs.

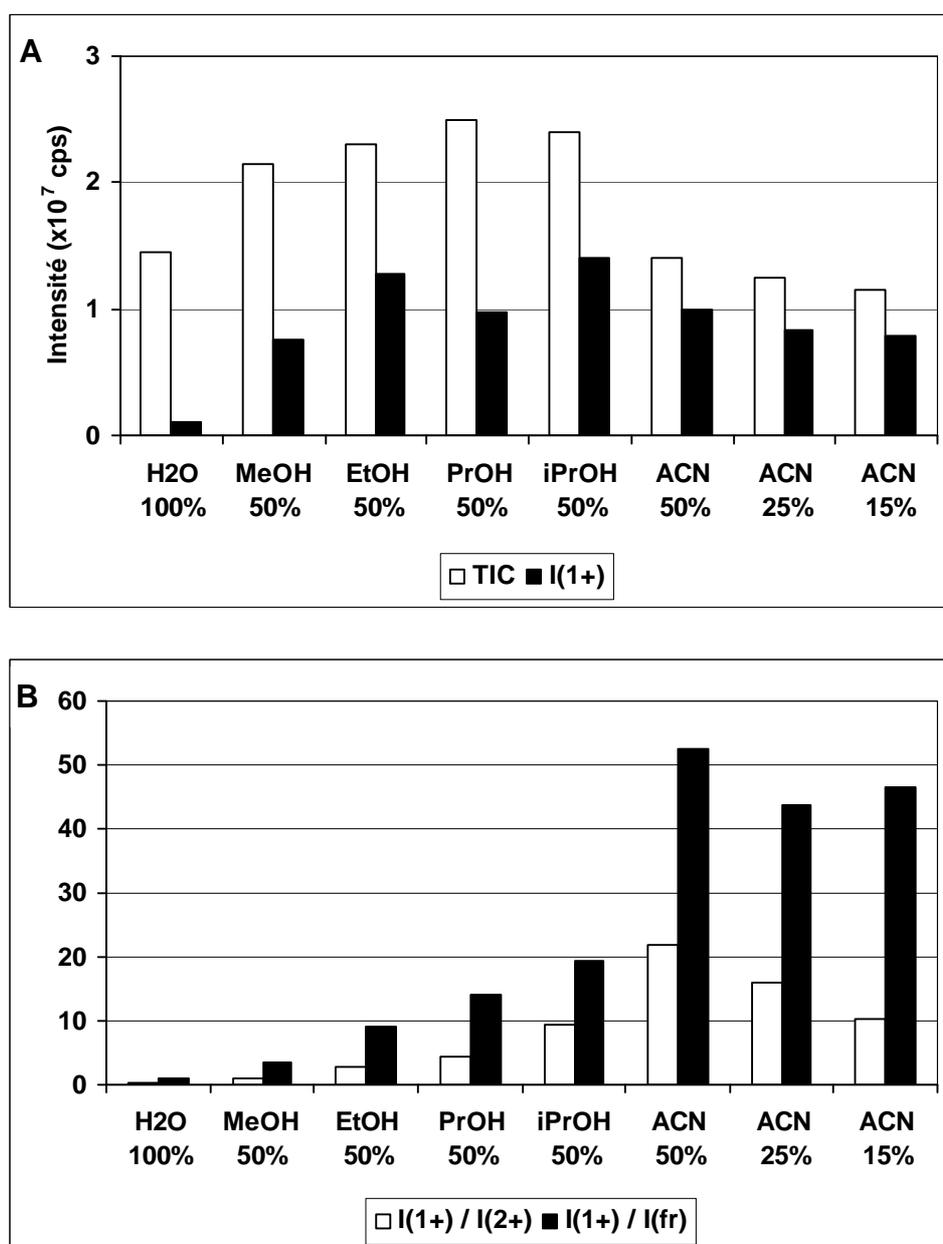


Figure 2.15. Influence de la composition du solvant d'infusion sur les intensités absolues (A) et relatives (B) des pics détectés sur les spectres ESI de la Me-b-CD.

Conditions : $[Me-\beta-CD] = 10$ mg/L, $[NH_4CH_3CO_2] = 10$ mM ; débit = 10 μ L/min.

Les résultats concernant le TIC et I_{1+} sont résumés dans la figure 2.15 (A). Comme attendu, l'addition d'un solvant organique dans la phase aqueuse conduit à des signaux plus intenses qu'avec l'eau seule. L'efficacité de formation des ions est en effet augmentée grâce à la plus faible tension de surface et la plus grande volatilité de la solution infusée [43].

Les résultats concernant les rapports I_{1+}/I_{2+} et I_{1+}/I_{fr} sont résumés dans la figure 2.18 (B). Ils montrent que l'intensité relative des CDs monochargées par rapport aux autres espèces augmente selon l'ordre suivant : eau, MeOH, EtOH, PrOH, iPrOH et ACN. Plus que tout autre solvant, l'ACN permet donc de privilégier la formation des CDs monochargées. De plus, comme décrit précédemment (paragraphe II.2), les phases mobiles eau/ACN conduisent à des séparations plus sélectives et plus efficaces des Me- β -CDs que les phases mobiles eau/MeOH. L'ACN est donc le solvant de choix pour l'analyse de ces CDs par CPL-ESI-SM.

L'influence de la proportion d'ACN dans la solution infusée a ensuite été étudiée (figure 2.15). Comme 15% est le pourcentage d'ACN moyen au cours de l'analyse de cette Me- β -CD par RPLC, et considérant que les valeurs obtenues pour le TIC, I_{1+} , et les rapports I_{1+}/I_{2+} et I_{1+}/I_{fr} sont suffisamment élevées, les travaux ont été poursuivis avec une solution d'infusion eau/ACN (85/15).

II.4.2 Influence du débit d'infusion

L'influence du débit d'infusion a été étudiée afin d'adapter la valeur de la division de flux entre la colonne chromatographique et le spectromètre de masse pour les analyses en CPL-ESI-SM.

La figure 2.16 montre l'effet bénéfique d'une augmentation du débit d'infusion entre 5 et 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. À 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, aucun fragment n'est détecté et la formation d'espèces dichargées est grandement réduite. En effet, lorsque le débit d'infusion est accru, la pression dans l'interface augmente, ce qui a pour effet de favoriser les collisions et donc la désolvation.

Le débit a donc été maintenu à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ pour le reste de l'étude et la division du flux chromatographique a été réglée à 1/20. De plus grands débits n'ont pas été utilisés afin de limiter la pollution dans le spectromètre de masse.

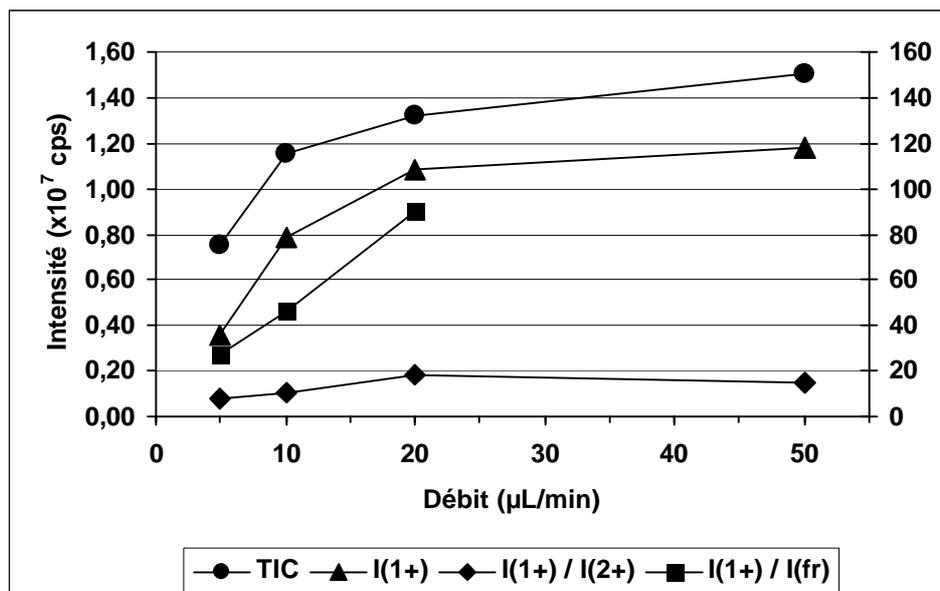


Figure 2.16. Influence du débit d'infusion sur les intensités absolues et relatives des pics détectés sur les spectres de la Me-b-CD.

Conditions : [Me- β -CD] = 10 mg/L, [NH₄CH₃CO₂] = 10 mM, solvant : eau/ACN 85/15.

II.4.3 Influence du sel

L'utilisation de trois sels d'ammonium différents (acétate, hydrogénocarbonate et formiate) a conduit à des résultats similaires. L'acétate a donc été utilisé par la suite et l'influence de sa concentration dans la solution infusée a été étudiée. La seule différence significative a été relevée au niveau des intensités absolues : de 5 à 50 mM de sel, les valeurs du TIC et de I_{1+} sont divisées par 1,34 et 3,3, respectivement, ce qui est une conséquence connue d'une trop grande concentration en sels [43]. Celle-ci a donc été fixée à 5 mM afin d'améliorer la sensibilité de détection.

II.4.4 Influence de la concentration en Me-b-CD

Enfin, la dernière étape de cette phase d'optimisation a consisté à faire varier la concentration de la Me- β -CD (20, 10, 5 et 1 mg/L). Une diminution de cette concentration a eu comme conséquence une diminution des valeurs du TIC et de I_{1+} , comme attendu, mais aussi une diminution de la proportion des adduits potassium (figure 2.17), ce qui laisse penser que les ions potassium sont issus du mélange analysé.

II.4.5 Détermination du DS moyen et du profil de substitution

Les conditions d'analyse ESI-SM optimisées de cette Me- β -CD sont donc : 1 mg/L de Me- β -CD et 5 mM de $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$ dissous dans un mélange eau/ACN 85/15 infusé à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. Le spectre de masse correspondant (figure 2.17 B) montre 7 dérivés portant de 2 à 8 groupes méthyle. Le DS, calculé à partir de la hauteur des pics, est égal à 0,69, ce qui est en accord avec les valeurs trouvés par RMN ^1H et MALDI-SM qui étaient de 0,68 et 0,71, respectivement.

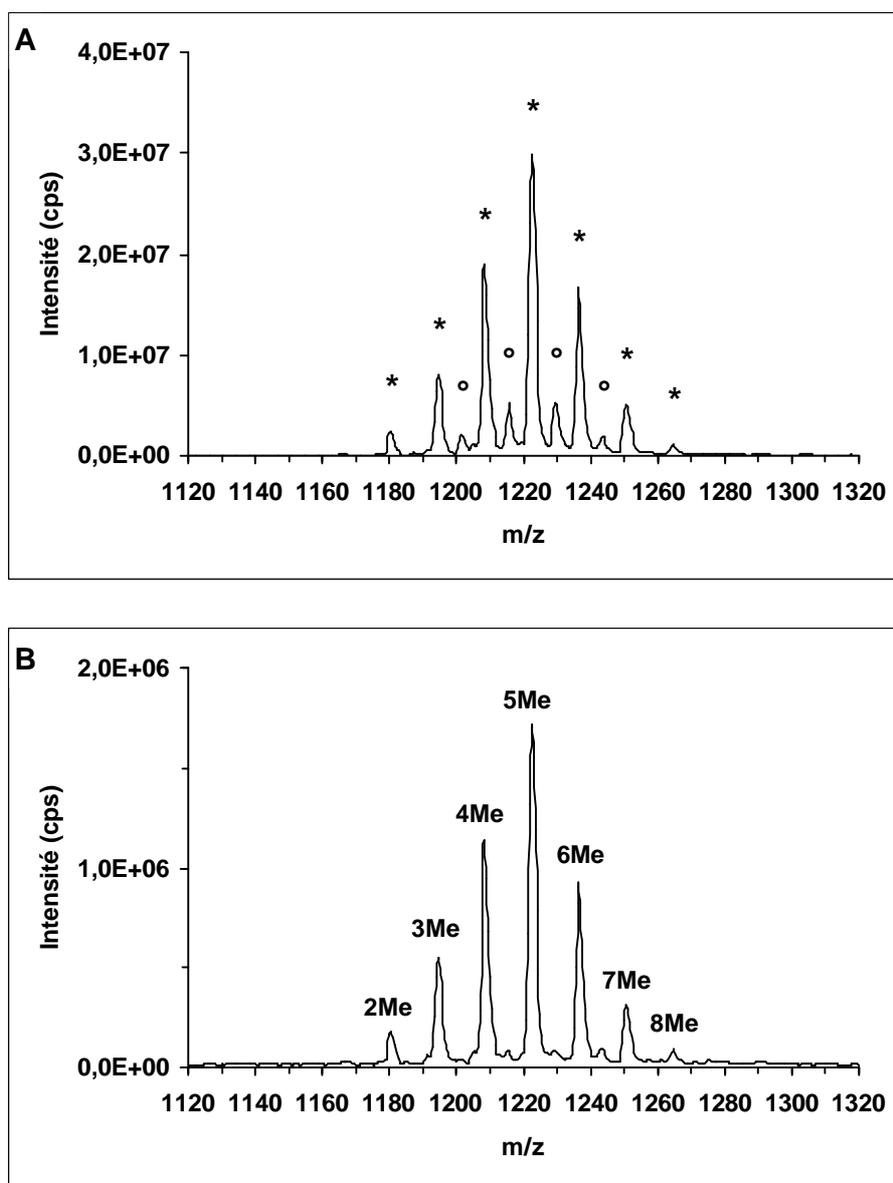


Figure 2.17. Influence de la concentration de la Me- β -CD sur les spectres de masse ESI.

Conditions : [Me- β -CD] = 20 mg/L (A), 1 mg/L (B), [$\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$] = 5 mM, solvant : eau/ACN (85/15) ; débit = 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les signes * et ° correspondent aux adduits ammonium et potassium, respectivement.

Toutefois, si les valeurs de DS issues des analyses par ESI-SM et MALDI-SM sont similaires, ces deux techniques ne fournissent pas exactement le même profil de substitution. La figure 2.18 montre que la proportion des différents dérivés n'est pas la même selon la technique utilisée mais les différences observées ne sont pas vraiment significatives.

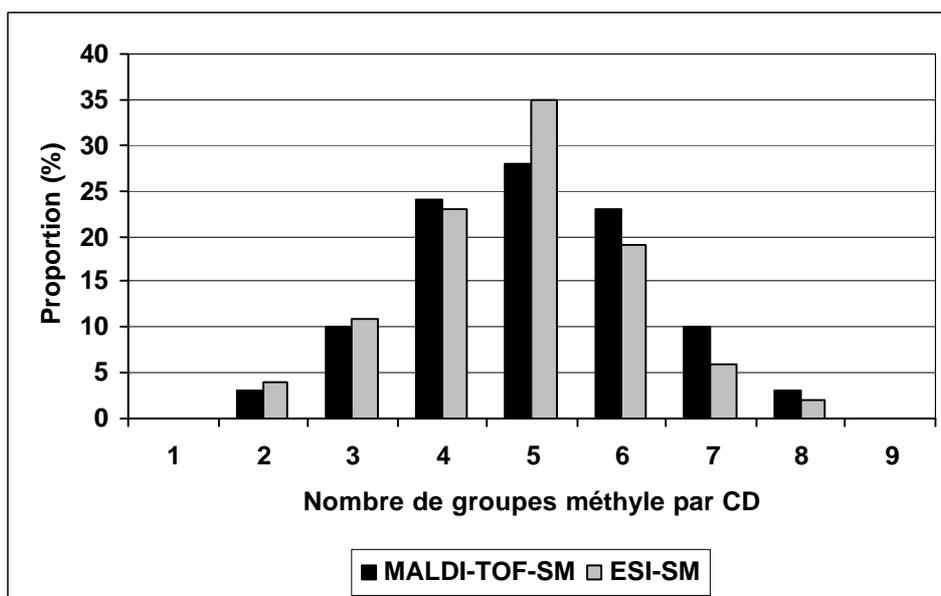


Figure 2.18. Composition de la Me-b-CD déterminée par MALDI-SM et ESI-SM. Conditions ESI-SM : voir figure 2.17 (B). Conditions MALDI-SM : voir figure 2.10.

Le DS a aussi été calculé d'après les spectres des figure 2.14 (B) (avec les CDs monochargées et dichargées), 2.14 (C) et 2.17 (A). Les valeurs ainsi trouvées sont égales à 0,68, 0,73, 0,69 et 0,69, respectivement. Autrement dit, malgré la présence de fragments, de CDs dichargées et d'adduits potassium, les valeurs de DS sont similaires. Cela semble indiquer que, quantitativement, les différents dérivés du mélange ont la même tendance à former des fragments, des CDs dichargées ou des adduits potassium. Le nombre de groupes méthyle par CD semble donc n'avoir qu'une faible influence sur le comportement des différents dérivés de cette Me- β -CD en ESI-SM.

II.4.6 Analyse par CPL-ESI-SM

La transposition d'une méthode CPL-DEDL à une méthode CPL-ESI-SM est généralement facilitée par le fait que ces deux détecteurs nécessitent la nébulisation et l'évaporation de la phase mobile [22, 43]. La Me- β -CD a donc été analysée par CPL-ESI-SM avec la méthode précédemment mise au point (paragraphe II.2) en remplaçant le DEDL par le spectromètre de masse. Seules deux modifications ont été apportées : une division du flux chromatographique à 1/20 entre la colonne et le spectromètre afin de réduire le débit de 1 mL/min à 50 μ L/min et l'ajout de 5 mM d'acétate d'ammonium dans la phase mobile pour produire des adduits ammonium détectables en SM. L'empreinte chromatographique n'a pas été modifiée par l'ajout du sel jusqu'à une concentration de 40 mM, concentration la plus haute ayant été testée.

L'empreinte obtenue en CPL-ESI-SM (figure 2.19 A) s'est révélée être similaire à celle obtenue avec le DEDL (figure 2.8). Seule l'intensité des pics peut être modifiée à cause de la réponse logarithmique du DEDL [22]. Comme noté précédemment, l'empreinte chromatographique révèle la complexité du mélange ainsi que la large gamme de temps de rétention, et donc de polarité, des différents dérivés.

Afin d'obtenir plus d'informations sur chaque dérivé, la même analyse a été effectuée en suivant les ions détectés durant l'analyse ESI-SM (mode SIM). La figure 2.19 B montre que le chromatogramme de chaque dérivé est composé de plusieurs pics de différentes intensités correspondant aux isomères. Comme précédemment conclu des analyses des fractions par MALDI-SM, les isomères d'un même dérivé peuvent avoir une large gamme de temps de rétention, et donc de polarité, conduisant à la coélution de dérivés de DS différents.

On peut constater que le chromatogramme correspondant aux CDs portant 7 groupes méthyle présente plusieurs pics. Ceci est une preuve supplémentaire que la réaction de méthylation n'est pas totalement sélective en position 2 des unités glucose et confirme les résultats des analyses RMN (paragraphe II.1). En effet, si la substitution était totalement sélective, les 7 groupes méthyle se trouveraient sur les 7 positions 2 de la β -CD et un seul dérivé serait alors détecté.

On peut remarquer que pour les dérivés portant de 4 et 8 groupes méthyle, les pics chromatographiques peuvent être grossièrement scindés en deux groupes, le second rassemblant les pics les plus intenses. Ces pics pourraient correspondre aux

CDs principalement substituées en position 2, le premier groupe de pics étant celui des isomères ayant un plus grand nombre de groupes méthyle en position 6.

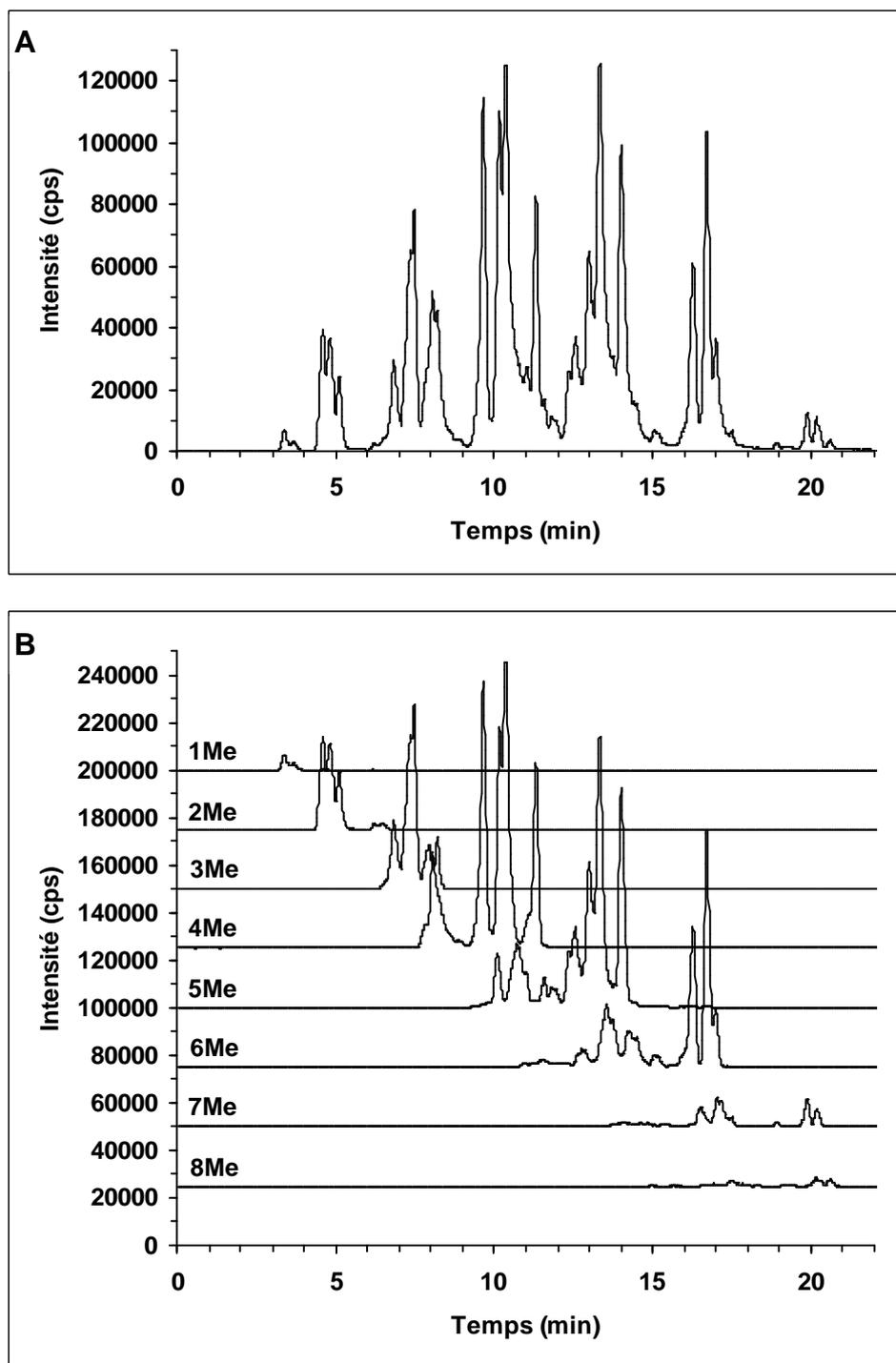


Figure 2.19. TIC (A) et SIM (B) de l'analyse CPL-ESI-SM de la Me-b-CD.

Conditions : colonne Purospher Star RP18 EC (125 x 4 ; 5 μ m) ; phase mobile : eau/ACN (95/5) à (55/45) en 40 min, $[\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2] = 5 \text{ mM}$; débit = 1 mL/min ; division à 1/20.

Cette méthode d'analyse par CPL-ESI-SM constitue donc un outil puissant pour déterminer la réelle complexité du mélange et en étudier les différents dérivés. Elle permet en particulier de mettre en évidence les isomères d'un même dérivé et ainsi d'évaluer la sélectivité de la réaction de substitution. Il serait intéressant de disposer d'un lot de cette Me- β -CD synthétisé dans des conditions où la substitution est plus sélective de la position 2 et d'un autre où la substitution est plus sélective de la position 6. On pourrait ainsi déterminer les temps de rétention de ces différents isomères pour chaque dérivé et mettre au point une échelle permettant de déterminer rapidement la sélectivité de réactions de méthylation ultérieures.

II.5. Choix du support chromatographique pour la caractérisation des Me- β -CDs par RPLC

Nous avons vu au paragraphe II.2 que c'est avec la colonne Purospher Star RP18 EC que nous avons obtenu l'empreinte chromatographique la plus riche de la Me- β -CD étudiée. Parmi les autres colonnes testées, figurait pourtant la colonne Nucléosil 50-5-C8. Il a été montré que celle-ci est la plus performante de nombreuses autres colonnes greffées C8 ou C18 pour l'analyse des DM- β -CDs et la séparation de leurs constituants majoritaires [32].

Nous avons donc décidé de comparer ces deux colonnes en analysant une DM- β -CD de DS 2,1 afin de déterminer si la colonne Purospher est aussi plus performante que la Nucléosil pour l'analyse des DM- β -CDs.

La figure 2.20 montre que, contrairement à ce qui a été observé précédemment avec la Me- β -CD de DS 0,7, la colonne Nucléosil se montre supérieure à la colonne Purospher en terme de séparation. En effet, la colonne Nucléosil permet la séparation de trois constituants de cette DM- β -CD de DS 2,1, dont les deux majoritaires (les dérivés portant 14 et 15 groupes méthyle [32]) alors que la colonne Purospher en est incapable.

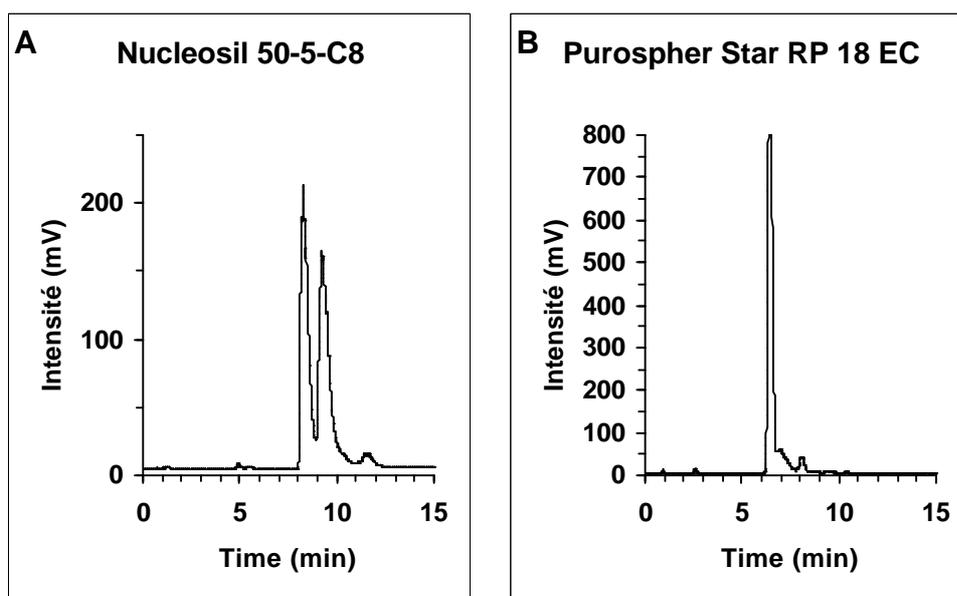


Figure 2.20. Comparaison des colonnes Purospher Star RP18 EC (125 x 4 mm ; 5 μ m) et Nucléosil 50-5-C8 (250 x 4 ; 5 μ m) pour l'analyse d'une DM-b-CD. Conditions : phase mobile : H₂O/ACN 60/40 (A) et 65/35 (B) ; débit : 1 mL/min ; détecteur : DEDL.

Il apparaît donc que le choix d'une colonne chromatographique utilisée pour l'analyse des différents Me- β -CDs doit être effectué en prenant en compte le DS moyen des mélanges. Ceci peut s'expliquer par le fait que les mécanismes de rétention d'une CD en RPLC sont peu à peu modifiés au fur et à mesure de la méthylation de ses groupes hydroxyles. En effet, il a été montré que l'ordre de rétention des trois CDs natives sur une colonne C18 n'est pas le même que celui des trois homologues triméthylés [3, 44], ce qui montre l'influence des groupes méthyles sur le comportement chromatographique des CDs.

Ainsi pour les mélanges faiblement méthylés, il sera nécessaire de choisir une colonne C18 ayant des interactions hydrophobes renforcées et sans silanols résiduels (type Purospher Star) pour que la rétention ne fasse intervenir que les groupes méthyle de la Me- β -CD. La différence de rétention des dérivés portant un faible nombre de groupes méthyles sera ainsi exaltée. En revanche pour les mélanges les plus substitués, il sera nécessaire de choisir une colonne C8 ou C18 développant des interactions polaires accessibles (type Nucléosil C8) afin d'exalter les différences de rétention liée au faible nombre de groupes hydroxyle restant non substitués sur la CD. Il n'existe donc sans doute pas une colonne unique que l'on pourrait qualifier d'« universelle » permettant d'obtenir une séparation optimale de n'importe quel mélange de CDs méthylées.

III. CONCLUSIONS

L'utilisation de plusieurs techniques analytiques a permis d'obtenir des informations complémentaires et de parvenir à une meilleure caractérisation de cette nouvelle Me- β -CD faiblement substituée.

Tout d'abord, la valeur du DS moyen (0,7) a été déterminée, par trois méthodes différentes (RMN, ESI-SM et MALDI-SM) qui ont donné des résultats en bon accord.

De plus, il a été montré que la réaction de méthylation utilisée pour la production n'est pas totalement sélective. La substitution a bien majoritairement lieu sur les positions 2 des unités glucose mais des substitutions en position 6 sont bien présentes et ce, en proportion non négligeable.

Enfin, il a été montré que la gamme de polarité des constituants de ce mélange est supérieure à celle que l'on retrouve au sein des DM- β -CDs.

Il a été nécessaire, pour mener à bien cette caractérisation, d'adapter les méthodes mises au point pour l'analyse des DM- β -CDs, comme la méthode de dépôt des échantillons analysés en MALDI-SM ou, plus encore, le choix de la colonne chromatographique.

L'ensemble des travaux effectués au laboratoire sur la caractérisation des Me- β -CDs couvre maintenant toute la gamme de degré de substitution, de la β -CD native à la TM- β -CD.

Ces travaux ont fait l'objet de deux articles dont les références sont :

Characterization of a new methylated β -cyclodextrin with a low degree of substitution by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and liquid chromatography using evaporative light scattering detection.

R. Jacquet, P. Favetta, C. Elfakir, M. Lafosse, J. Chromatogr. A 1083 (2005) 106-112.

Characterization of a new methylated β -cyclodextrin with a low degree of substitution by electrospray ionization mass spectrometry and liquid chromatography/mass spectrometry.

R. Jacquet, C. Elfakir, M. Lafosse, Rapid Commun. Mass Spectrom. 19 (2005) 3097-3102.

IV. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] R. Pennanec, *Synthèses dirigées, purification et analyse de cyclodextrines anioniques par différentes méthodes séparatives et leurs couplages avec la spectrométrie de masse*, thèse, décembre 2002.
- [2] K. Koizumi, Y. Okada, M. Fukuda, *Carbohydr. Res.* 215 (1991) 67-80.
- [3] A. Kwaterczak, A. Bielejewska, *Anal. Chim. Acta* 537 (2005) 41-46.
- [4] T. Greibrokk, T. Andersen, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 743-755.
- [5] R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, *Chromatographies en phases liquide et supercritique*, Ed. Masson, Paris, 1991.
- [6] J. Knox, M. Gilbert, US Patent 4,263,268 (1981).
- [7] J. Knox, B. Kaur, *J. Chromatogr.* 352 (1986) 3-25.
- [8] P. Ross, J. Knox, *Advances in Chromatography* 37 (1997) 73-119.
- [9] T. Hanai, *J. Chromatogr. A* 989 (2003) 183-196.
- [10] E. Roycroft, P. Ross, R. McNeill, *LC-GC Int.* 4 (1998) 32-37.
- [11] P. Ross, *LC-GC Europe* 13 (2000) 310-319.
- [12] E. Forgacs, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 229-243.
- [13] P. Koivisto, M. Stefansson, *Chromatographia* 57 (2003) 37-45.
- [14] P. Ross, J. Knox, *Advances in Chromatography* 37 (1997) 121-162.
- [15] C. Elfakir, M. Dreux, *J. Chromatogr. A* 727 (1996) 71-82.
- [16] K. Thomsson, N. Karlsson, G. Hansson, *J. Chromatogr. A* 854 (1999) 131-139.
- [17] A. Antonopoulos, B. Herbreteau, M. Lafosse, W. Helbert, *J. Chromatogr. A* 1023 (2004) 231-238.
- [18] A. Antonopoulos, P. Favetta, M. Lafosse, W. Helbert, *J. Chromatogr. A* 1059 (2004) 83-87.
- [19] I. Clarot, D. Clédât, L. Boulkanz, E. Assidjo, T. Chianéa, P. Cardot, *J. Chrom. Sci.* 38 (2000) 38-45.
- [20] S. Grard, C. Elfakir, M. Dreux, *Chromatographia* 50 (1999) 695-700.
- [21] S. Grard, C. Elfakir, M. Dreux, *J. Chromatogr. A* 897 (2000) 185-193.

- [22] I. Caron, C. Elfakir, M. Dreux, J. Liq. Chrom. 20 (1997) 1015-1035.
- [23] A. Chatjigakis, C. Donzé, A. Coleman, Anal. Chem. 64 (1992) 1632-1634.
- [24] K. Petritis, H. Dessans, C. Elfakir, M. Dreux, LC-GC Eur. 15 (2002) 98-102.
- [25] V. Stella, R. Rajewski, US Patent 5,134,127 (1992).
- [26] Roquette, Kleptose® Crysmeb Exp, bulletin technique, mars 2004.
- [27] Y. Kubota, T. Tanimoto, S. Horiyama, K. Koizumi, Carbohydr. Res. 192 (1989) 159-166.
- [28] H.-J. Schneider, F. Hacket, V. Rüdiger, Chem. Rev. 98 (1998) 1755-1785.
- [29] R. Cole, *Electrospray ionization mass spectrometry*, Ed. John Wiley & Sons, New-York, 1997.
- [30] I. Caron, A. Salvador, C. Elfakir, B. Herbreteau, M. Dreux, J. Chromatogr. A 746 (1996) 103-108.
- [31] I. Caron, C. Elfakir, M. Dreux, Chromatographia 47 (1998) 383-390.
- [32] I. Caron, C. Elfakir, M. Dreux, J. High Resol. Chromatogr. 21 (1998) 554-560.
- [33] D. Harvey, Int. J. Mass Spectrom. 226 (2003) 1-35.
- [34] H. Bartsch, W. König, M. Strassner, U. Hintze, Carbohydr. Res. 286 (1996) 41-53.
- [35] K. Linnemayr, A. Rizzi, G. Allmaier, J. Chromatogr. A 791 (1997) 299-306.
- [36] A. Amini, T. Rundlöf, M.-B. Grön Rydberg, T. Arvidsson, J. Sep. Sci. 27 (2004) 1102-1108.
- [37] J.-P. Mercier, J.-L. Debrun, M. Dreux, C. Elfakir, B. Hakim, Rapid Commun. Mass Spectrom. 14 (2000) 68-70.
- [38] B. Chankvetadze, G. Endresz, G. Blaschke, M. Juza, H. Jakubetz, V. Schurig, Carbohydr. Res. 287 (1996) 139-155.
- [39] O. Vorm, P. Roepstorff, M. Mann, Anal. Chem. 66 (1994) 3281-3287.
- [40] J. Metzger, M. Jung, D. Schmalzing, E. Bayer, V. Chürig, Carbohydr. Res. 222 (1991) 23-35.
- [41] A. Salvador, B. Herbreteau, M. Dreux, J. Chromatogr. A 855 (1999) 645-656.
- [42] E. Huang, J. Henion, Rapid Commun. Mass Spectrom. 4 (1990) 467-471.
- [43] A. Bruins, J. Chromatogr. A 794 (1998) 345-357.

- [44] A. Bielejewska, M. Kozbial, R. Nowakowski, K. Duszczuk, D. Sybilska, *Anal. Chim. Acta* 300 (1995) 201-206.

CHAPITRE 3

**Evaluation du système chromatographique
Carbone Graphite Poreux / β -cyclodextrines
méthylées pour la séparation chirale en CPL**

CHAPITRE 3

Evaluation du système chromatographique Carbone Graphite Poreux / β -cyclodextrines méthylées pour la séparation chirale en CPL

I. INTRODUCTION

Nous avons vu, dans le chapitre 1, que les CDs sont couramment utilisées en tant que sélecteurs chiraux dans différentes méthodes séparatives telles que la CPL ou l'EC.

Dans le chapitre 2, nous avons pu constater que le PGC est un support chromatographique atypique, tant par sa structure que par les mécanismes impliqués dans la rétention des analytes.

Le présent chapitre sera consacré à l'étude, en CPL, du système chromatographique composé du PGC en tant que phase stationnaire et de DM- β -CDs en tant que sélecteurs chiraux, dissous dans la phase mobile.

Dans la première partie de cette introduction, nous ferons quelques rappels sur l'utilisation des CDs dans ce mode chromatographique.

Dans la deuxième partie, nous ferons un rapide état des lieux des séparations chirales effectuées sur PGC.

Enfin, nous exposerons les objectifs de cette étude et les éléments qui nous ont poussé à l'entreprendre.

I.1. Utilisation des CDs en tant que sélecteurs chiraux dans la phase mobile en CPL

Les CDs et leurs dérivés les plus fréquemment utilisés sont généralement solubles dans les solutions aqueuses ou hydro-organiques et peu solubles dans les solvants organiques. Leur utilisation en tant que sélecteurs chiraux dans la phase mobile se fait donc le plus souvent en chromatographie à polarité de phases inversée (RPLC) [1, 2].

Dans ces conditions, la résolution des énantiomères implique la formation de complexes d'inclusion, favorisée par la présence d'eau, généralement en grande proportion. L'énantiosélectivité (c'est-à-dire la sélectivité entre les deux énantiomères

d'un même soluté, $\alpha=k_1/k_2$) repose alors sur la différence de stabilité de ces complexes et/ou sur leur différence de partage entre phase mobile et phase stationnaire [1, 3].

L'utilisation des CDs dans ce mode de séparation chromatographique a permis la résolution d'un grand nombre de paires d'énantiomères [2-4]. Plusieurs méthodes ont ainsi été mises au point pour déterminer la pureté énantiomérique de principes actifs chiraux dans diverses préparations pharmaceutiques [5, 6], détecter leur présence dans des fluides biologiques [7], etc.

Ce mode chromatographique est aussi utilisé pour déterminer les constantes de complexation de diverses molécules avec les CDs et leurs dérivés [8, 9].

Pour ces deux types d'applications, les phases stationnaires utilisées sont le plus souvent des silices greffées octadécyle (C18) [2, 5-7, 9].

L'un des avantages de ce mode de séparation est l'utilisation de colonnes moins coûteuses que les colonnes chirales. Les inconvénients majeurs sont la difficulté du couplage avec la SM (l'effluent chromatographique contenant une importante concentration de CDs) et l'importante consommation de sélecteurs chiraux (qui peut toutefois être limitée en les recyclant, en utilisant la phase mobile en circuit fermé ou en utilisant des systèmes chromatographiques miniaturisés [5]).

On sait que de nombreux facteurs ont une influence sur les analyses effectuées dans ces conditions [1, 3]: type et concentration de la CD utilisée, nature et proportion du modificateur organique, pH, nature et concentration du tampon, force ionique, température de la colonne et enfin, type de phase stationnaire. La possibilité de modifier ces nombreux paramètres permet d'optimiser une séparation par différents moyens.

I.2. Les séparations chirales sur carbone graphite poreux

La séparation d'énantiomères sur PGC a été réalisée pour la première fois en 1989 [10] et a fait l'objet, depuis cette date, de près d'une trentaine de publications [11-36]. Majoritairement effectuées en CPL et, dans une moindre mesure, en CPS [23-25, 28], ces séparations ont été réalisées dans des conditions chromatographiques très diverses (nature du sélecteur chiral, composition de la phase mobile...). Elles ont été revues en 1997 par Ross et Knox [37].

Comme nous l'avons vu au chapitre 2 (partie A, paragraphe II.1), le PGC est dépourvu de groupements fonctionnels, ce qui rend impossible le greffage de

sélecteurs chiraux de façon covalente. Toutefois, sa surface plane et hydrophobe permet d'adsorber fortement des molécules polycycliques aromatiques, comme le pyrène ou le chrysène (désignées « ancrés » ou « pieds ») qui sont liées de façon covalente à des sélecteurs chiraux. Le PGC peut alors être utilisé comme une phase stationnaire chirale.

Les séparations d'énantiomères sur PGC peuvent donc être scindées en deux grands groupes, selon la façon dont le sélecteur chiral est introduit au sein du système chromatographique :

1. Le premier groupe rassemble les séparations utilisant une phase mobile chirale [10-25]. Le sélecteur chiral est donc introduit en permanence et peut s'adsorber de façon plus ou moins forte sur le PGC. Le processus de reconnaissance chirale peut avoir lieu dans la phase mobile aussi bien que sur la phase stationnaire.
2. Le second groupe se compose des séparations pour lesquelles le sélecteur chiral est adsorbé sur le PGC avant l'analyse [26-36]. La phase mobile employée par la suite est alors achirale et le processus de reconnaissance chirale a lieu au niveau de la phase stationnaire.

Les travaux portant sur la séparation des énantiomères sur PGC ont révélé que celui-ci offrait plusieurs avantages sur les supports chromatographiques plus traditionnels.

Tout d'abord, de par sa grande résistance chimique, le PGC autorise l'emploi de solvants agressifs et peut être utilisé sur toute la gamme de pH. Il permet donc des séparations énantiomériques difficilement réalisables sur d'autres supports chromatographiques plus fragiles [10-12, 14, 29].

De plus, le PGC permet généralement d'obtenir, avec un sélecteur chiral donné, de meilleures résolutions qu'avec des colonnes à base de silice. Ceci a été montré pour les deux grands groupes de séparations définis ci-dessus, lorsque le sélecteur chiral est introduit en permanence par l'intermédiaire de la phase mobile [13-15] et lorsqu'il est préalablement adsorbé sur la phase stationnaire et utilisé avec une phase mobile achirale [28, 29]. Ross et Knox [37] ont donné de ce phénomène l'explication suivante : si la surface plane du graphite participe aux interactions entre le sélecteur chiral et les énantiomères, le PGC peut fournir une meilleure séparation qu'une silice greffée utilisée avec le même sélecteur chiral. En revanche, si le

graphite ne joue qu'un rôle mineur dans ces interactions spécifiques, les séparations obtenues sur le PGC et sur une silice seront vraisemblablement similaires.

Enfin, les divers systèmes chromatographiques mis au point pour la séparation d'énantiomères sur PGC bénéficient généralement d'un équilibrage rapide [13, 20, 24, 25] et d'une grande stabilité [14, 20, 24-27, 31-33]. De plus, plusieurs travaux ont montré que les résultats obtenus sont répétables et reproductibles [24, 25] et qu'ils varient peu entre des colonnes de différents lots [14, 20].

Certains systèmes chromatographiques ainsi obtenus ont permis de mesurer des teneurs en énantiomères minoritaires inférieures à 0,2% [20] ou 0,1% [23].

I.3. Objectifs

Le PGC semble donc être un support chromatographique de choix pour la séparation des énantiomères, ses principaux avantages étant sa grande résistance chimique et sa capacité à accroître la résolution par rapport à celle observée sur d'autres matériaux comme la silice greffée.

Pourtant, le PGC n'a été que peu employé en combinaison avec les CDs en CPL chirale, contrairement aux autres supports chromatographiques de RPLC comme les silices greffées C18 [2, 5-7, 9]. Seules quelques séparations de principes actifs ont été rapportées il y a près de vingt ans, sans étude approfondie des mécanismes de séparation ou des effets des divers paramètres expérimentaux [10-12].

Ce faible engouement pour l'utilisation du PGC dans ces conditions peut être expliqué par son caractère très hydrophobe. En effet, comparé aux supports chromatographiques plus classiques, l'élution sur PGC nécessite généralement de plus grandes proportions de modificateur organique, ce qui peut avoir deux conséquences néfastes sur la séparation :

1. La solubilité des CDs dans la phase mobile diminue, ce qui réduit d'autant la concentration maximale de CDs pouvant être utilisée [12].
2. La complexation des analytes par les CDs est défavorisée ce qui entraîne une diminution de l'énantiosélectivité [2]. C'est d'ailleurs pour cette raison qu'il est généralement conseillé d'utiliser des colonnes dont l'hydrophobicité est modérée [3].

Devant le faible nombre de travaux concernant ce sujet, nous avons décidé d'examiner l'utilisation conjointe du PGC en tant que phase stationnaire et de DM- β -CDs en tant que sélecteurs chiraux en CPL. L'objectif était d'étudier les mécanismes de rétention d'un tel système chromatographique et de comparer les performances du PGC avec celles de colonnes de silice greffées C18.

Nous avons été encouragés en cela par plusieurs travaux. Tout d'abord, Salvador *et al* ont montré, au sein du laboratoire, que la combinaison du PGC et de DM- β -CDs permettait la réalisation de séparations chirales en CPS et constituait un système stable donnant des résultats répétables et reproductibles [24, 25]. D'autre part, il a été montré que la rétention des Me- β -CDs est plus grande sur PGC que sur silice greffée C18 [38]. On peut donc espérer que les CDs adsorbées sur le PGC masqueront sa surface et diminueront ainsi la rétention des analytes. Dans ce cas, la proportion de solvant organique nécessaire à leur élution sera diminuée et cela permettra d'éviter les problèmes cités ci-dessus.

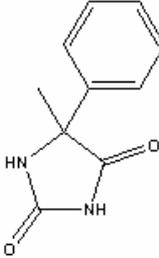
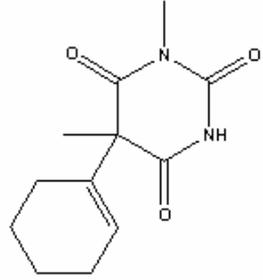
II. PRESENTATION DES EXPERIENCES EFFECTUEES

Afin de limiter les quantités de solvants organiques et de CDs utilisées, les analyses chromatographiques ont été effectuées avec des colonnes de 2 ou 2,1 mm de diamètre interne et un débit de 0,2 mL/min.

Les séparations ont porté sur les énantiomères de deux solutés test, l'hexobarbital et la 5-méthyl-5-phénylhydantoïne (5M5PH), dont les caractéristiques sont rassemblées dans le tableau 3.1. Initialement étudiés lors de travaux effectués en CPC, ces solutés ont été choisis pour leur rétention sur PGC. En effet, celle-ci est modérée et la sélectivité est telle entre ces deux molécules que les énantiomères de chacune d'elle peuvent être séparés au cours de la même analyse sans grand risque de chevauchement des pics. Leur détection a été effectuée en UV.

Deux DM- β -CDs différentes ont été utilisées. La plus grande partie de l'étude a été effectuée avec la DM- β -CD Ikeda de DS 2,1 et certaines analyses ont été répétées avec la DM- β -CD Wacker de DS 1,8. Elles ont été utilisées à des concentrations dans la phase mobile variant de 2 à 32 mM. La figure 3.1 montre les spectres de ces CDs obtenus en ESI-SM dans les conditions d'analyse développées au chapitre 2 pour la Me- β -CD de DS 0,7.

Tableau 3.1. Caractéristiques physico-chimiques des deux solutés test.

	5M5PH	Hexobarbital
N° CAS	6843-49-8	56-29-1
Formule brute	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₂	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₃
Formule développée		
Masse molaire (g/mol)	190,20	236,27
Température de fusion (°C)	199-201	145-147
Solubilité dans l'eau (g/L à 25°C)	6,600 ¹	0,435 ¹
Log P (oct/eau)	0,94 ¹ ; 0,50 ²	1,98 ¹ ; 0,73 ²
pKa	8,83 ²	8,2 ¹ ; 7,46 ²
Propriétés	Anticonvulsif	Hypnotique, sédatif

¹ : d'après [39], ² : d'après [40].

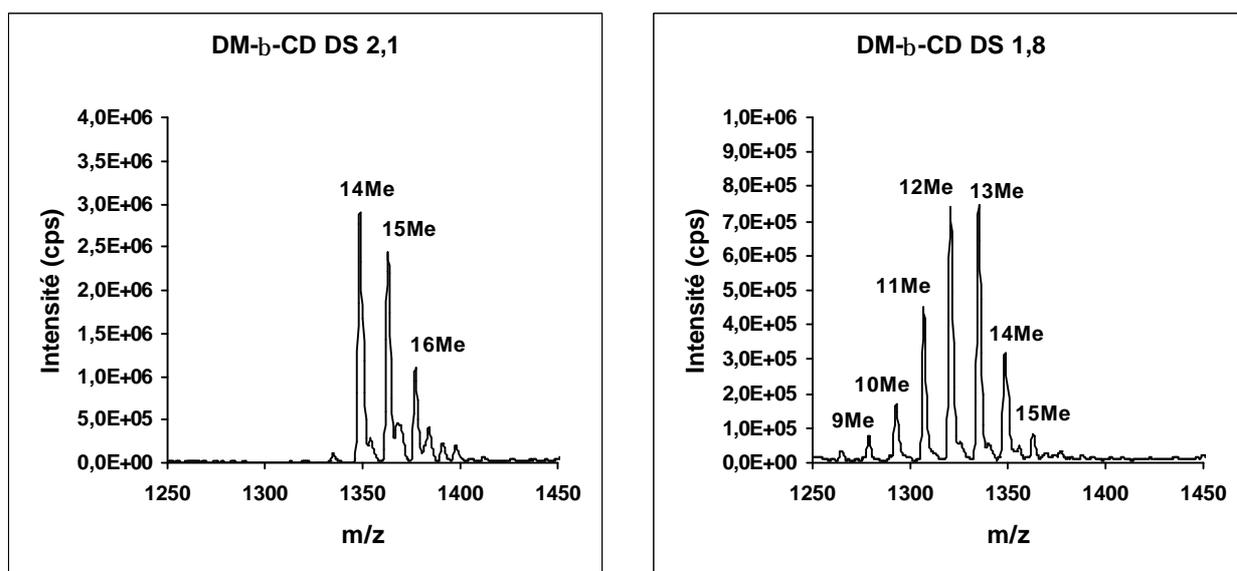


Figure 3.1. Spectres ESI-SM des deux DM-b-CDs utilisées en tant que sélecteurs chiraux.

Conditions identiques à celles de la figure 2.17 (B).

On peut constater que la DM- β -CD Wacker possède un profil de substitution très large et on sait de plus que la méthylation est effectuée de façon aléatoire en positions 2, 3 et 6 des unités glucose (chapitre 1, paragraphe II.2.2). Au contraire, la DM- β -CD Ikeda ne comporte essentiellement que deux dérivés majoritaires et la substitution a préférentiellement lieu sur les positions 2 et 6. L'utilisation de ces deux DM- β -CDs permettra donc d'observer les différences d'énantiosélectivité que peuvent engendrer des mélanges de compositions très différentes.

Les DS ont été calculés à partir de la hauteur des pics et les valeurs obtenues se sont bien révélées en accord avec celles annoncées par les fabricants. La préparation des phases mobiles a donc été effectuée en prenant une masse molaire de 1341 g/mol pour la DM- β -CD de DS 2,1 et 1311 g/mol pour la DM- β -CD de DS 1,8.

Les premières analyses ont été effectuées avec l'ACN comme modificateur organique. Celui-ci a été choisi pour deux raisons principales : il est plus solubilisant pour les CDs que le MeOH ou l'EtOH [41, 42] et il est aussi plus éluant vis-à-vis des deux solutés test, ce qui permet de l'utiliser en plus faible proportion. Quelques essais ont été effectués avec des phases mobiles composées d'eau et de MeOH ou d'EtOH. Devant les fortes pertes de charge rencontrées alors, nous avons préféré ne pas utiliser ces solvants afin de préserver la pompe chromatographique, celle-ci fonctionnant déjà à un débit pour lequel elle n'est pas vraiment conçue. La totalité des travaux présentés ci-dessous a donc été réalisée avec l'ACN.

Les conditions expérimentales détaillées, produits et matériels utilisés sont regroupés en annexe III et IV.

Au cours de ces travaux, plusieurs paramètres expérimentaux ont été modifiés afin d'en déterminer l'influence sur la séparation. Après avoir évalué la quantité de DM- β -CD adsorbée sur le PGC, nous étudierons l'influence de la concentration en CDs et de la proportion d'ACN dans la phase mobile, les effets de la température et l'influence de la nature de la CD utilisée sur la séparation. Ensuite, le PGC sera comparé à deux colonnes de silice greffée C18 et enfin, nous tenterons d'élucider les mécanismes de reconnaissance chirale.

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.1. Détermination des quantités de DM- β -CD adsorbées sur le PGC

Pour mieux comprendre les mécanismes de rétention impliqués lorsqu'un sélecteur chiral est utilisé dans la phase mobile, il est utile de déterminer son affinité envers la phase stationnaire. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, avec ce mode chromatographique, la reconnaissance chirale peut avoir lieu aussi bien dans la phase mobile qu'au niveau de la phase stationnaire.

Les quantités de DM- β -CD adsorbées sur le PGC dans les conditions d'analyse utilisées ont donc été déterminées, par analyse frontale [43], méthode simple et rapide, déjà employée lors de l'étude effectuée en CPS par Salvador *et al* [25].

Cette méthode consiste à percoler la phase mobile contenant les DM- β -CDs à travers la phase stationnaire en enregistrant le signal du détecteur. Lorsque la phase stationnaire est saturée, les DM- β -CDs ne sont plus retenues et sont donc éluées de la colonne chromatographique vers le détecteur, au niveau duquel elles vont générer un signal. Les CDs n'absorbant pas en UV, la détection a été effectuée avec le DEDL. La figure 3.2 montre l'allure des courbes d'adsorption ainsi obtenues.

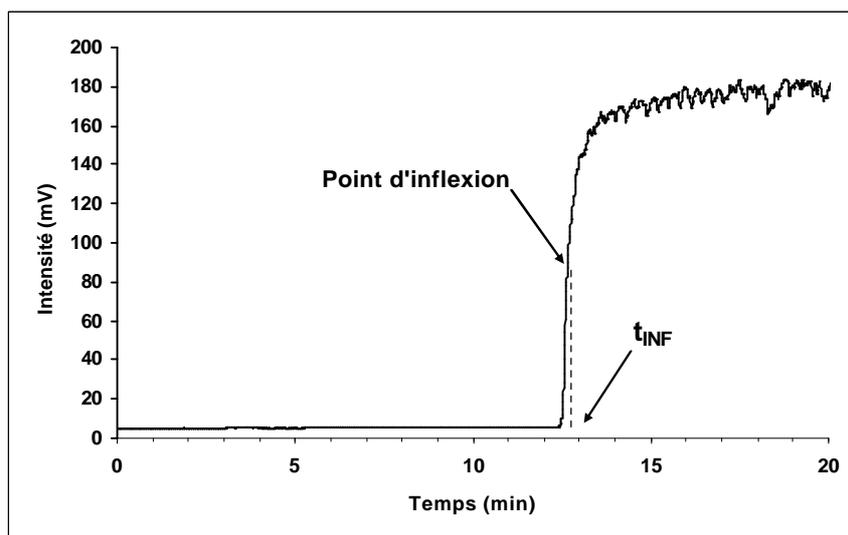


Figure 3.2. Allure des courbes d'adsorption des DM-b-CDs sur le PGC.

Conditions : colonne Hypercarb (100 x 2,1 mm ; 5 μ m) ; phase mobile H₂O/ACN (80/20) + 32 mM de DM- β -CD (DS 2,1) ; débit : 0,2 mL/min ; température ambiante ; détection : DEDL.

Dans la pratique, l'enregistrement du signal issu du détecteur débute lorsque la phase mobile contenant les DM- β -CDs commence à percoler à travers la colonne. Celle-ci est initialement parcourue par une phase mobile identique mais ne contenant pas de CDs. Le calcul de la quantité de DM- β -CD adsorbée doit donc prendre en compte le temps s'écoulant entre le début du pompage d'une nouvelle phase mobile et son arrivée au détecteur après passage dans la colonne. Ce temps dépend principalement de la pompe chromatographique, des dimensions de la colonne utilisée et des tubulures. Avec le montage utilisé et une colonne PGC de 100 mm de longueur et de 2,1 mm de diamètre interne, ce délai est de 7 min. La quantité de DM- β -CD adsorbée sur le PGC est donc donnée par :

$$Q_{\text{ads}} = D \cdot (t_{\text{inf}} - 7) \cdot [\text{CD}]$$

Avec Q_{ads} : quantité de DM- β -CD adsorbée sur la phase stationnaire, en mol,

D : débit de la phase mobile, en L/min,

t_{inf} : temps au point d'inflexion de la courbe d'adsorption, en min,

$[\text{CD}]$: concentration de DM- β -CDs dans la phase mobile, en mol/L.

III.1.1. Influence de la concentration de DM- β -CD dans la phase mobile

Cette étude a été réalisée à 25°C en utilisant une phase mobile H₂O/ACN (80/20) contenant la DM- β -CD de DS 2,1 à des concentrations de 2, 4, 8, 16 ou 32 mM et pompée à un débit de 0,2 mL/min. La figure 3.3 (A) indique la quantité de DM- β -CD adsorbée sur le PGC en fonction de sa concentration dans la phase mobile.

On peut constater que la quantité de DM- β -CD adsorbée sur le PGC augmente avec sa concentration dans la phase mobile. Avec une concentration de 32 mM, la quantité adsorbée est de 37,1 μ mol, soit 50 mg.

Notons que la courbe d'adsorption obtenue n'est pas caractéristique d'une isotherme de Langmuir. En effet, la quantité adsorbée augmente progressivement sans montrer de palier de saturation aux plus grandes concentrations.

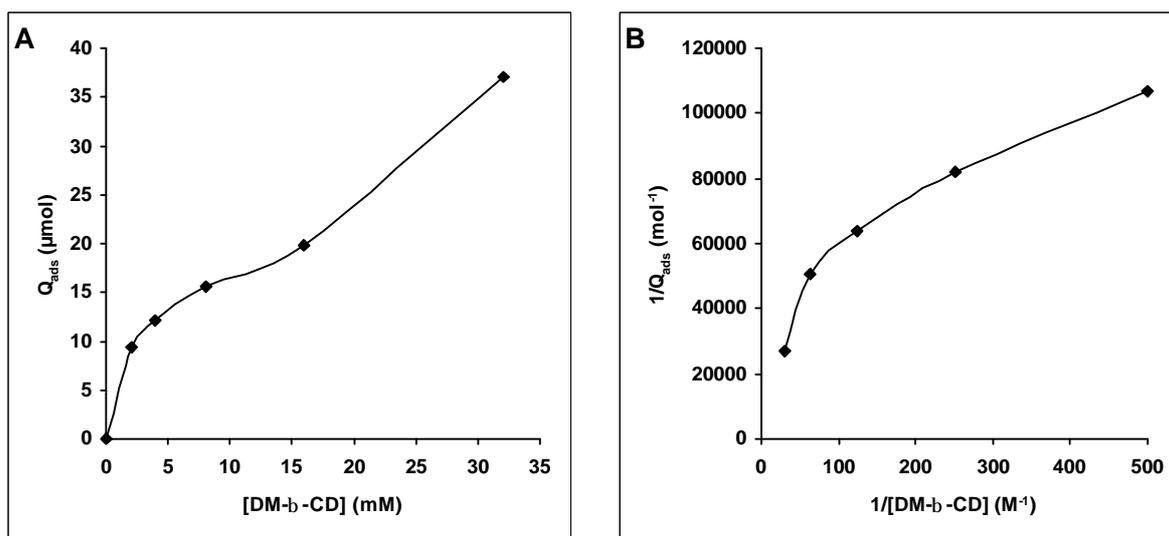


Figure 3.3. Influence de la concentration de DM-b-CD (DS 2,1) dans la phase mobile sur la quantité adsorbée sur le PGC.

Conditions : colonne Hypercarb (100 x 2,1 mm ; 5 µm) ; phase mobile H₂O/ACN (80/20) + DM-β-CD (DS 2,1) ; débit : 0,2 mL/min ; température ambiante ; détection DEDL.

Selon le modèle d'adsorption de Langmuir, l'espèce adsorbée se fixe à la surface du solide sous forme d'une monocouche. A l'équilibre, lorsque vitesses d'adsorption et de désorption sont égales, la relation suivante est vérifiée [25] :

$$1/Q_{ads} = 1/(K_A \cdot [CD] \cdot Q_{max}) + 1/Q_{max}$$

avec K_A : rapport des constantes de proportionnalité k_{ads}/k_{des} ,

Q_{max} : quantité maximale de CDs pouvant être adsorbée sur la phase stationnaire, en mol.

Dans le cas d'une adsorption suivant le modèle de Langmuir, la représentation de $1/Q_{ads}$ en fonction de $1/[CD]$ est une droite de pente $1 / (K_A \cdot Q_{max})$ et d'ordonnée à l'origine $1/Q_{max}$. Cette relation permet ainsi de calculer les quantités maximales de CDs pouvant être adsorbées sur la phase stationnaire (Q_{max}) et de comparer les forces d'adsorption des CDs dans différentes conditions chromatographiques (K_A) [25, 44]. Salvador *et al* ont ainsi pu déterminer qu'avec une colonne PGC de dimensions 100 x 4,6 mm, la quantité maximale de DM-β-CD adsorbée était de 44 µmol avec une phase mobile CO₂/MeOH (80/20) et 63 µmol avec une phase mobile CO₂/MeOH (95/5).

La figure 3.3 (B) montre que dans notre cas, la courbe obtenue n'est pas une droite, confirmant que, dans ces conditions, l'adsorption des DM-β-CDs sur le PGC

ne suit pas le modèle de Langmuir, contrairement à ce qui a été observé en CPS [25] et en CPL sur colonne C18 [44]. Dans le cas présent, la quantité de CDs adsorbée sur le PGC à une concentration de 32 mM est proche de la valeur maximale déterminée par Salvador *et al* dans leurs conditions chromatographiques [25], bien que la colonne utilisée ici ait un diamètre deux fois plus petit. Par contre, cette valeur reste bien inférieure à celle obtenue sur colonne C18 avec une phase mobile H₂O/EtOH (80/20) où plus de 200 μ mol de TM- β -CDs sont adsorbées [44].

Notons toutefois que la quantité de CDs adsorbées sur le PGC croît moins rapidement que la quantité de CDs restant dans la phase mobile puisque la courbe $1/Q_{\text{ads}} = f(1/[CD])$ tend à s'infléchir au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration.

III.1.2. Influence du pourcentage d'ACN dans la phase mobile

Cette étude a été réalisée en utilisant une phase mobile contenant 15, 20, 25 ou 30% d'ACN et 2 mM de DM- β -CD de DS 2,1, pompée à un débit de 0,2 mL/min. Les pourcentages inférieurs à 15% d'ACN n'ont pas été étudiés à cause des temps de rétention trop importants des analytes avec de telles phases mobiles. Les pourcentages supérieurs à 30% n'ont pas été utilisés car ils nuisent à la complexation des analytes par les CDs [2].

La figure 3.4 montre que de 15 à 30% d'ACN dans la phase mobile, la quantité de CDs adsorbée sur le PGC diminue légèrement. Ceci s'explique par la force éluante croissante de la phase mobile, le solvant organique étant en compétition avec les CDs pour s'adsorber à la surface du PGC [25, 44]. Cette variation est toutefois bien moins importante que celle observée lorsque la concentration en CDs dans la phase mobile varie de 2 à 32 mM pour un pourcentage donné en ACN.

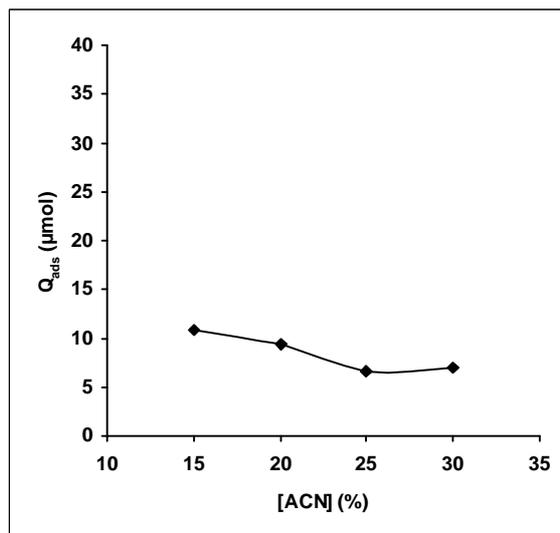


Figure 3.4. Influence de la proportion d'ACN dans la phase mobile sur la quantité de DM-b-CD adsorbée sur le PGC.

Conditions : colonne Hypercarb (100 x 2,1 mm ; 5 µm) ; phase mobile H₂O/ACN + 2 mM de DM- β -CD (DS 2,1) ; débit : 0,2 mL/min ; température ambiante ; détection : DEDL.

Ce que l'on peut conclure de cette étude des quantités de DM- β -CDs adsorbées sur le PGC, c'est que leur rétention est telle que même avec 30% d'ACN et une concentration de seulement 2 mM dans la phase mobile, une partie d'entre elles sera adsorbée sur le PGC. Autrement dit, une phase stationnaire chirale sera générée dynamiquement. Les CDs étant présentes dans les deux phases, on peut s'attendre à ce que la complexation ait lieu aussi bien à la surface du PGC que dans la phase mobile, comme cela a été observé sur colonne C18 avec une phase mobile contenant des β -CDs native et triméthylée [44].

III.2. Influence de la concentration de DM-b-CD dans la phase mobile

Après avoir mis en évidence un phénomène d'adsorption de la DM- β -CD sur le PGC et observé que la quantité adsorbée est très dépendante de sa concentration dans la phase mobile, nous avons étudié l'influence de cette même concentration sur la rétention et l'énantiosélectivité des deux solutés test, la 5M5PH et l'hexobarbital.

La figure 3.5 montre les chromatogrammes obtenus avec une phase mobile H₂O/ACN (80/20) et contenant de 0 à 32 mM de DM- β -CD de DS 2,1.

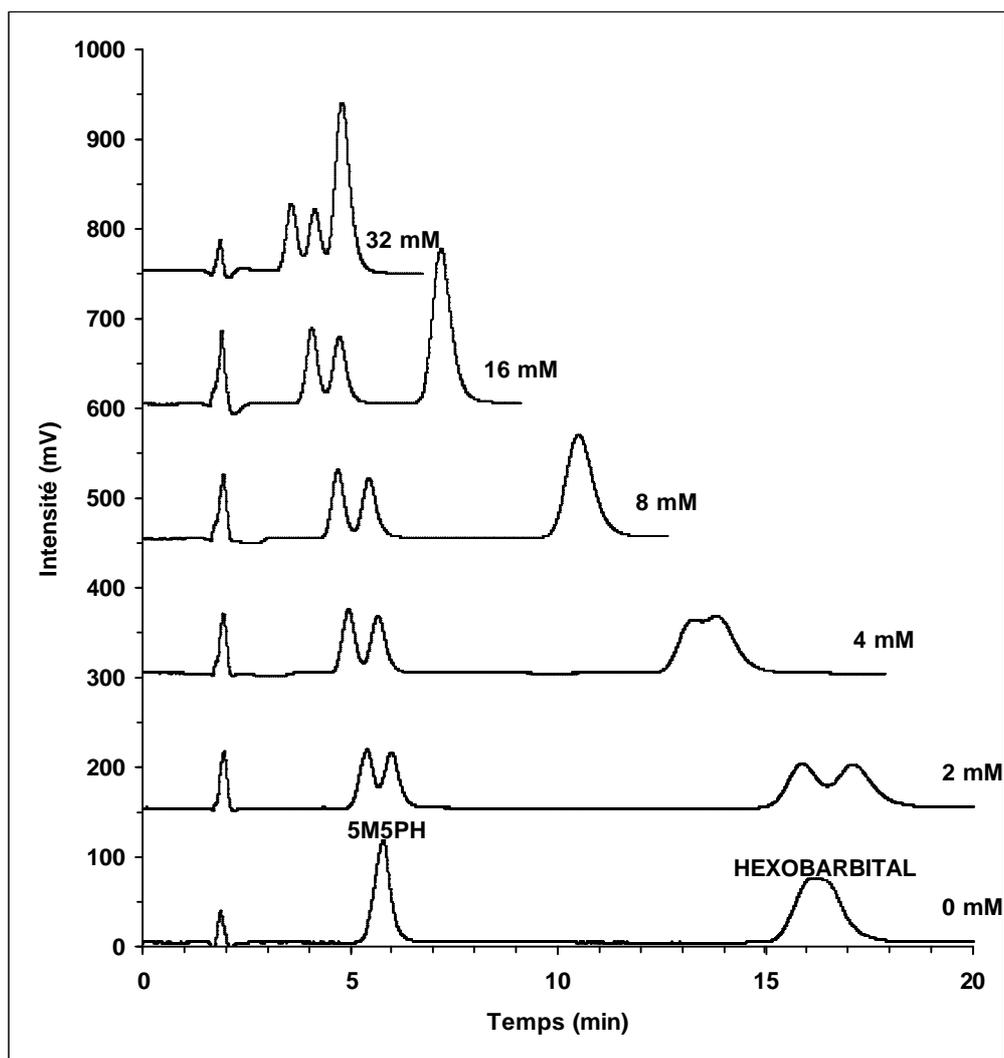


Figure 3.5. Influence de la concentration de DM-b-CD (DS 2,1) dans la phase mobile sur la rétention de la 5M5PH et de l'hexobarbital.

Conditions : colonne Hypercarb (100 x 2,1 mm ; 5 μ m) ; phase mobile H₂O/ACN (80/20) + DM- β -CD (DS 2,1) ; débit : 0,2 mL/min ; température ambiante ; détection UV.

En l'absence de CDs dans la phase mobile, les énantiomères ne sont bien évidemment pas séparés. Le pic correspondant à l'hexobarbital est relativement large et traduit une faible efficacité de colonne. Celle-ci aurait pu être améliorée en ajoutant 0,1 ou 1% d'acide trifluoroacétique dans la phase mobile comme il est courant de le faire sur le PGC. Toutefois, nous voulions maintenir une phase mobile de composition simple qui soit compatible avec les colonnes C18. Nous nous sommes donc interdit l'emploi de TFA et avons continué dans ces conditions.

L'ajout de seulement 2 mM de CDs dans la phase mobile permet la séparation des deux énantiomères de chaque soluté. Les chromatogrammes montrent

clairement que la concentration en CDs a une influence tant sur la rétention que sur l'énantiosélectivité des solutés.

La figure 3.6 montre l'influence de cette concentration sur la rétention du second énantiomère de chacun des solutés pour différentes proportions d'ACN. On peut constater que, globalement, lorsque la concentration en CDs augmente, la rétention des deux solutés diminue, ce qui est le résultat de deux phénomènes.

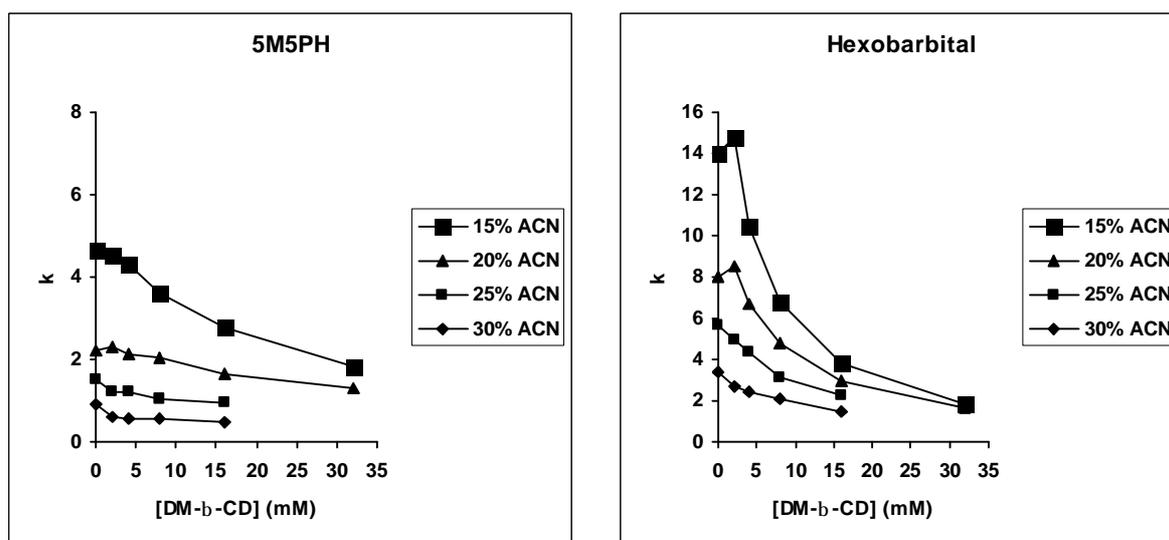


Figure 3.6. Influence de la concentration de DM-b-CD (DS 2,1) dans la phase mobile sur la rétention du second énantiomère de chacun des solutés.

Conditions : colonne Hypercarb (100 x 2,1 mm ; 5 μ m) ; phase mobile H₂O/ACN + DM- β -CD (DS 2,1) ; débit : 0,2 mL/min ; température ambiante ; détection UV.

Le premier phénomène, classique et attendu dans ces conditions, est la formation de complexes entre les solutés et les CDs en excès croissant dans la phase mobile. Cette complexation entraîne une diminution des interactions hydrophobes possibles entre les solutés et la phase stationnaire et donc une diminution de leur rétention [45]. Les complexes sont en effet généralement moins retenus que les solutés seuls à cause de l'hydrophilie des CDs [46].

A ce phénomène, il faut rajouter, dans notre cas, le fait que la quantité de CDs adsorbée sur le PGC augmente avec leur concentration dans la phase mobile, ce qui a pour effet de masquer la surface du PGC et d'en réduire l'accès aux solutés [25].

On peut constater que la rétention de l'hexobarbital est plus affectée par la concentration de DM- β -CDs que celle de la 5M5PH. En effet, avec 20% d'ACN par

exemple, entre 0 et 32 mM de CDs dans la phase mobile, le facteur de rétention de l'hexobarbital est divisé par 4,8 alors que celui de la 5M5PH n'est divisé que par 1,7. Cette différence indique que l'hexobarbital forme un complexe plus stable en solution que ne l'est celui de la 5M5PH [47, 48]. Cela peut s'expliquer par la plus grande hydrophobicité de l'hexobarbital (tableau 3.1). Le fait que ce soluté soit plus complexé que la 5M5PH par ces DM- β -CDs sera d'ailleurs confirmé dans le chapitre 4.

On peut remarquer qu'avec une phase mobile composée de 15 ou 20% d'ACN et contenant 2 mM de DM- β -CD, la rétention de l'hexobarbital est tout d'abord légèrement accrue. Ce phénomène, observé en CPL sur colonne C18 [49, 50] et en CPS [25] a pour origine la complexation des solutés par les CDs adsorbées sur la phase stationnaire. Nous avons vu que même à 2 mM seulement de CDs dans la phase mobile, il y a génération d'une phase stationnaire chirale, constituée de CDs adsorbées. Les solutés complexés sont donc ralentis au niveau de la phase stationnaire. A plus grandes concentrations en CDs, c'est la complexation au sein de la phase mobile qui devient prépondérante et les solutés complexés sont entraînés par la grande quantité de CDs présente dans la phase mobile.

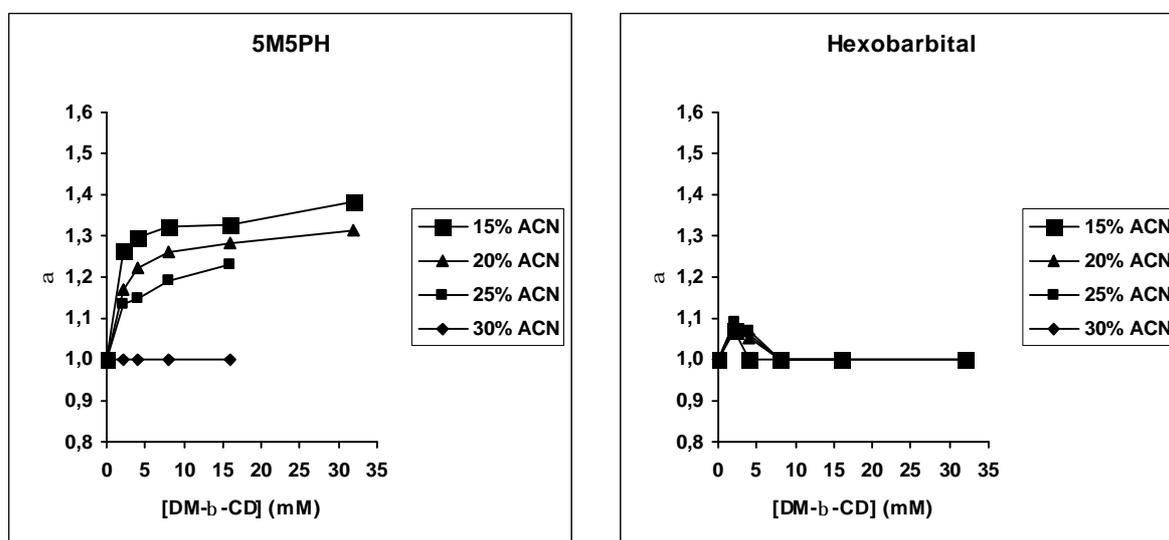


Figure 3.7. Influence de la concentration de DM-b-CD (DS 2,1) dans la phase mobile sur l'énantiosélectivité.

Conditions : colonne Hypercarb (100 x 2,1 mm ; 5 μ m) ; phase mobile H₂O/ACN + DM- β -CD (DS 2,1) ; débit : 0,2 mL/min ; température ambiante ; détection UV.

L'influence de la concentration de DM- β -CDs dans la phase mobile sur l'énantiosélectivité est montrée dans la figure 3.7. Le comportement des 2 solutés

diffère largement. En effet, pour la 5M5PH, l'énantiosélectivité augmente avec la concentration en CDs, rapidement d'abord puis de façon plus modérée. D'une manière générale, l'énantiosélectivité est en effet accrue lorsque la concentration en CDs augmente, que ce soit en CPS [25] ou en CPL [1-3, 7]. Notons qu'avec 30% d'ACN, les énantiomères ne sont plus séparés.

L'hexobarbital montre un comportement tout à fait différent. Les énantiomères ne sont séparés qu'à faibles concentrations de DM- β -CDs et l'énantiosélectivité est maximale à 2 mM. Pour de plus grandes concentrations, aucune séparation n'est observée. Il semble donc que les énantiomères de l'hexobarbital ne soient séparés que lorsque la complexation a principalement lieu au niveau de la phase stationnaire.

Pour la suite de notre étude, nous travaillerons principalement avec une concentration de DM- β -CDs dans la phase mobile égale à 2 mM afin d'avoir une séparation des énantiomères de chacun des solutés.

III.3. Influence de la proportion d'ACN dans la phase mobile

L'influence de l'ACN sur la séparation a été étudiée en utilisant des phases mobiles contenant 15, 20, 25 ou 30% d'ACN. La figure 3.8 montre les chromatogrammes obtenus avec 2 mM de DM- β -CDs dans la phase mobile.

On peut constater que la rétention des deux analytes diminue lorsque la proportion d'ACN augmente. Quelque soit la concentration en DM- β -CDs dans la phase mobile (de 0 à 32 mM), la relation entre le logarithme du facteur de rétention du deuxième énantiomère de chacun des solutés et la proportion d'ACN est linéaire ($r^2 > 0,98$), comme ce que l'on observe généralement en RPLC [51]. Tout se passe comme si la rétention des solutés sur le PGC ne dépendait que des interactions hydrophobes entre les solutés libres (non complexés) et la phase stationnaire [45].

On peut voir sur la figure 3.9 que l'influence de la proportion d'ACN sur la rétention diminue à mesure que la concentration en CDs augmente. En effet, avec 2 mM de DM- β -CD, le facteur de rétention de l'hexobarbital est divisé par plus de 5 entre 15 et 30% d'ACN alors qu'avec 16 mM de DM- β -CD, il n'est divisé que par 2,5. Ceci s'explique par le fait qu'à mesure que la concentration de DM- β -CD augmente, les solutés, plus complexés au sein de la phase mobile, rentreront moins en compétition avec le modificateur organique au niveau de la phase stationnaire [45].

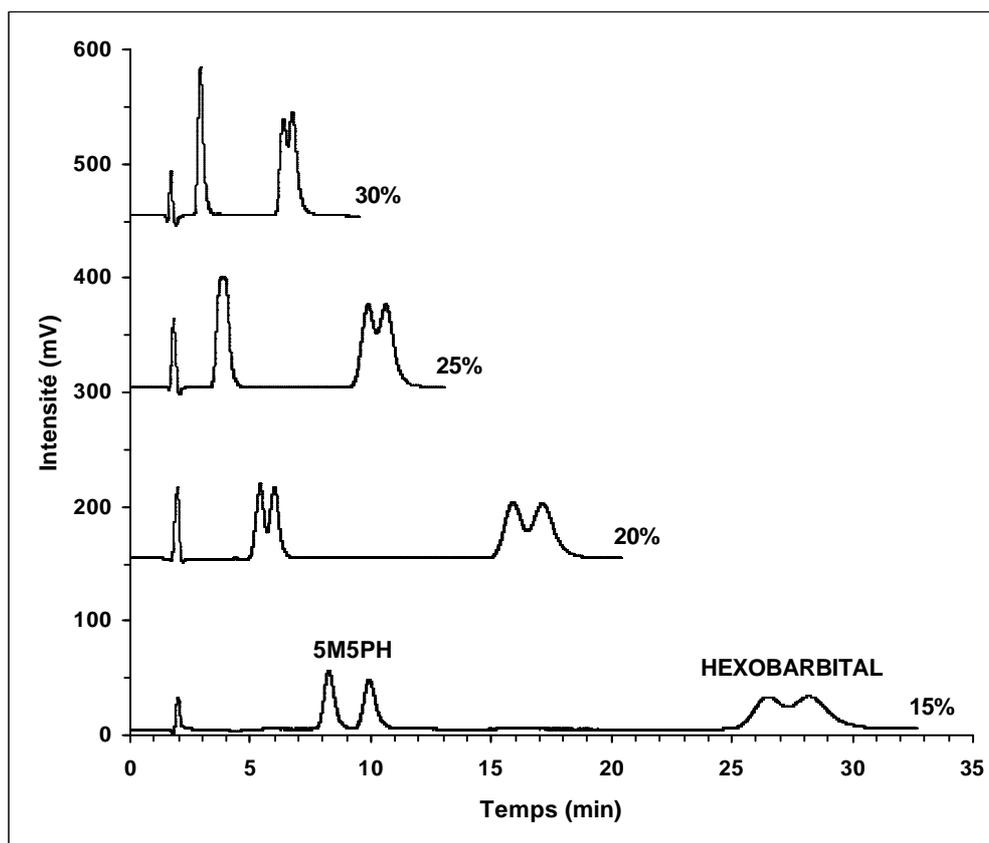


Figure 3.8. Influence de la proportion d'ACN dans la phase mobile sur la rétention de la 5M5PH et de l'hexobarbital.

Conditions : colonne Hypercarb (100 x 2,1 mm ; 5 μ m) ; phase mobile H₂O/ACN + 2 mM de DM- β -CD (DS 2,1) ; débit : 0,2 mL/min ; température ambiante ; détection UV.

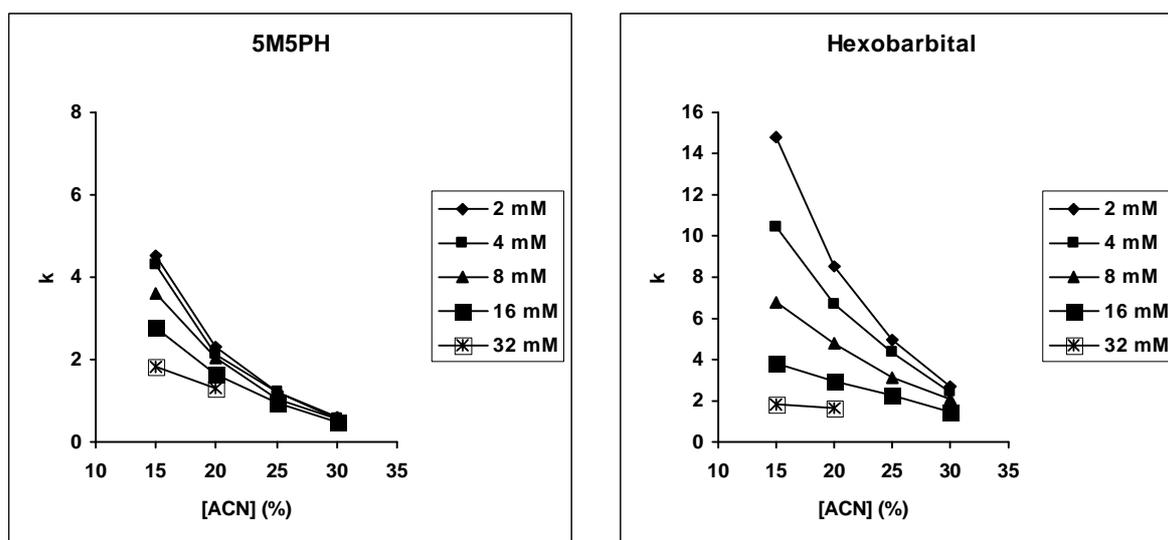


Figure 3.9. Influence de la proportion d'ACN dans la phase mobile sur la rétention du second énantiomère de chacun des analytes.

Conditions : colonne Hypercarb (100 x 2,1 mm ; 5 μ m) ; phase mobile H₂O/ACN + DM- β -CD (DS 2,1) ; débit : 0,2 mL/min ; température ambiante ; détection UV.

L'énantiosélectivité est elle aussi influencée par la proportion d'ACN. La figure 3.10 montre que pour la 5M5PH et quelque soit la concentration en DM- β -CD, l'énantiosélectivité décroît lorsque la proportion d'ACN dans la phase mobile augmente, ce qui est un phénomène couramment observé [2, 3, 7]. Par exemple, avec 2 mM de CDs dans la phase mobile, la sélectivité est de 1,26 à 15% d'ACN alors qu'elle est égale à 1 avec 30% d'ACN. D'ailleurs, à 30% d'ACN, la sélectivité est nulle quelque soit la concentration en CDs dans la phase mobile.

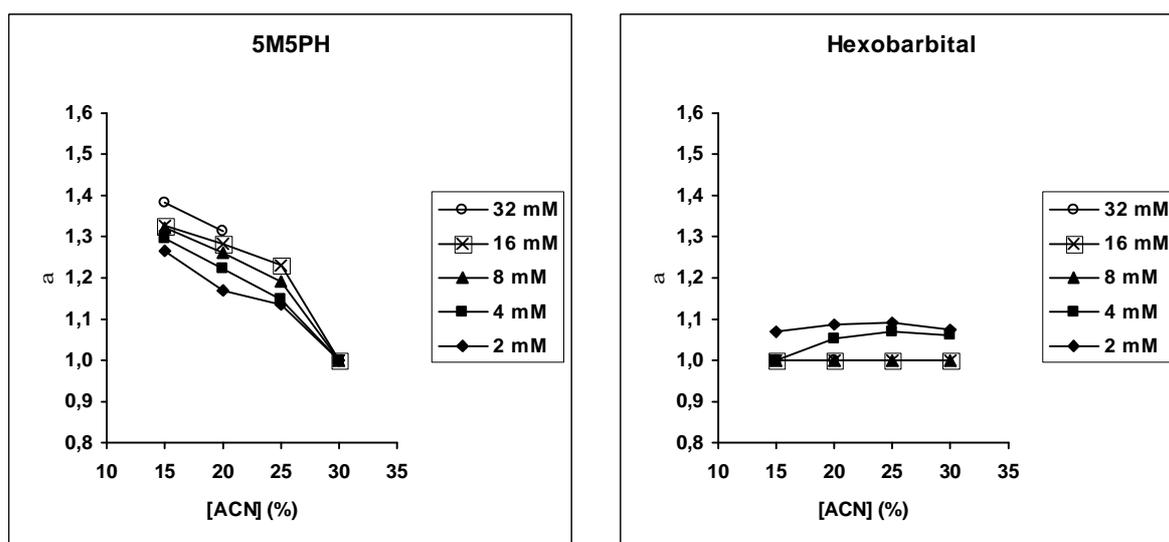


Figure 3.10. Influence de la proportion d'ACN dans la phase mobile sur l'énantiosélectivité.

Conditions : colonne Hypercarb (100 x 2,1 mm ; 5 μ m) ; phase mobile : H₂O/ACN + DM- β -CD (DS 2,1) ; débit : 0,2 mL/min ; température ambiante ; détection UV.

Cette perte de sélectivité avec l'augmentation de la proportion du modificateur organique peut être expliquée par deux mécanismes complémentaires. Tout d'abord, l'ACN entre en compétition avec les solutés pour former un complexe d'inclusion avec les CDs [48]. De plus, lorsque la proportion d'ACN augmente, la polarité de la phase mobile diminue. La complexation d'une molécule hydrophobe n'est donc pas aussi forte que lorsque la phase mobile n'est constituée que d'eau ou d'un faible pourcentage de solvant organique. Ces deux mécanismes ont comme conséquence commune de déstabiliser les complexes et donc, d'une manière générale en RPLC, de diminuer la sélectivité.

Pour l'hexobarbital, l'énantiosélectivité observée avec 2 et 4 mM de CDs dans la phase mobile, varie peu avec la proportion d'ACN. Elle est quasiment constante avec 2 mM de CDs mais augmente légèrement avec la proportion d'ACN avec 4 mM.

Pour la suite de notre étude, il apparaît qu'une phase mobile constituée d'un mélange H₂O/ACN (80/20) contenant 2 mM de DM- β -CD est un bon compromis pour observer une séparation des énantiomères de chacun des solutés.

III.4. Influence du type de DM-b-CD utilisée

La nature des CDs utilisées en tant que sélecteurs chiraux est connue pour avoir une grande influence sur les séparations chirales. En partant des conditions optimisées de phase mobile (H₂O/ACN (80/20) et 2 mM de DM- β -CDs), nous avons comparé les résultats d'analyses effectuées sur le PGC avec deux DM- β -CDs de compositions différentes : la DM- β -CD de DS 2,1 et la DM- β -CD de DS 1,8.

Préalablement, la quantité de DM- β -CD de DS 1,8 adsorbée sur le PGC a été déterminée et comparée à la valeur obtenue avec la DM- β -CD de DS 2,1. La quantité adsorbée de DM- β -CD de DS 1,8 (6,2 μ mol) représente les deux tiers de celle obtenue dans les mêmes conditions avec la DM- β -CD de DS 2,1 (9,3 μ mol). Ceci est en accord avec le fait que, sur silice greffée octadécyle ou phényle, la rétention des Me- β -CDs est d'autant plus grande qu'elles sont substituées, comme nous l'avons vu dans le chapitre 2.

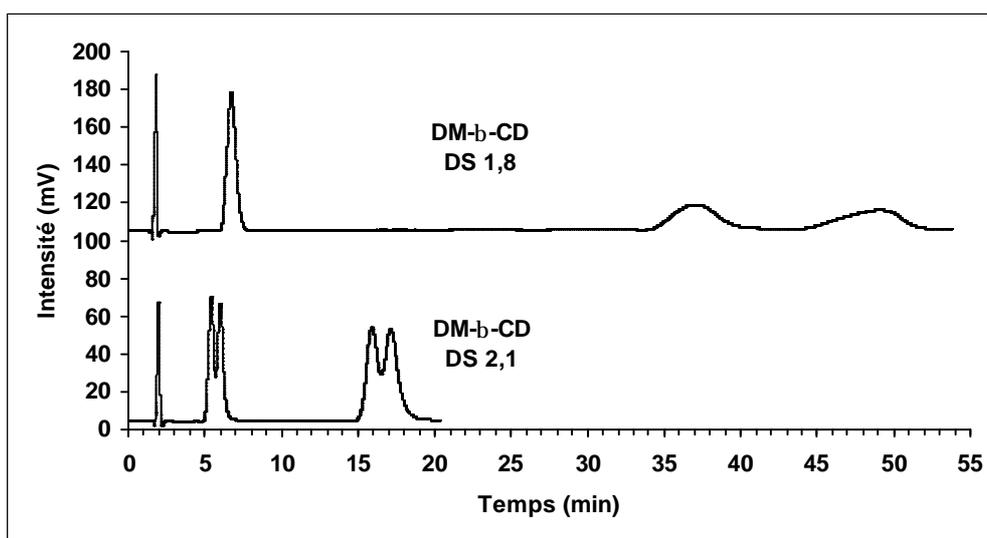


Figure 3.11. Influence de la nature de la DM-b-CD utilisée comme sélecteur chiral sur la rétention de la 5M5PH et de l'hexobarbital.

Conditions : colonne Hypercarb (100 x 2,1 mm ; 5 μ m) ; phase mobile H₂O/ACN (80/20) + 2 mM de DM- β -CD ; débit : 0,2 mL/min ; température ambiante ; détection UV.

La figure 3.11 montre les chromatogrammes obtenus avec 2 mM de CDs dans la phase mobile. Ils montrent de façon flagrante que le type de DM- β -CD utilisée a une grande influence sur la rétention et l'énantiosélectivité. La rétention de la 5M5PH est faiblement modifiée par la nature de la DM- β -CD et ses énantiomères ne sont séparés qu'avec la DM- β -CD de DS 2,1. L'hexobarbital est beaucoup plus retenu en présence de la DM- β -CD de DS 1,8 et ses énantiomères sont totalement séparés, contrairement à ce qui est observé avec la DM- β -CD de 2,1.

La figure 3.12 montre que jusqu'à 8 mM de DM- β -CD de DS 1,8 (la plus grande concentration testée avec cette CD), l'effet de la concentration en DM- β -CD sur la rétention de la 5M5PH est très faible. De plus contrairement à ce qui a été observé avec la DM- β -CD de DS 2,1 (figure 3.7), pour ce composé, l'énantiosélectivité reste égale à 1 quelque soit la concentration en CD.

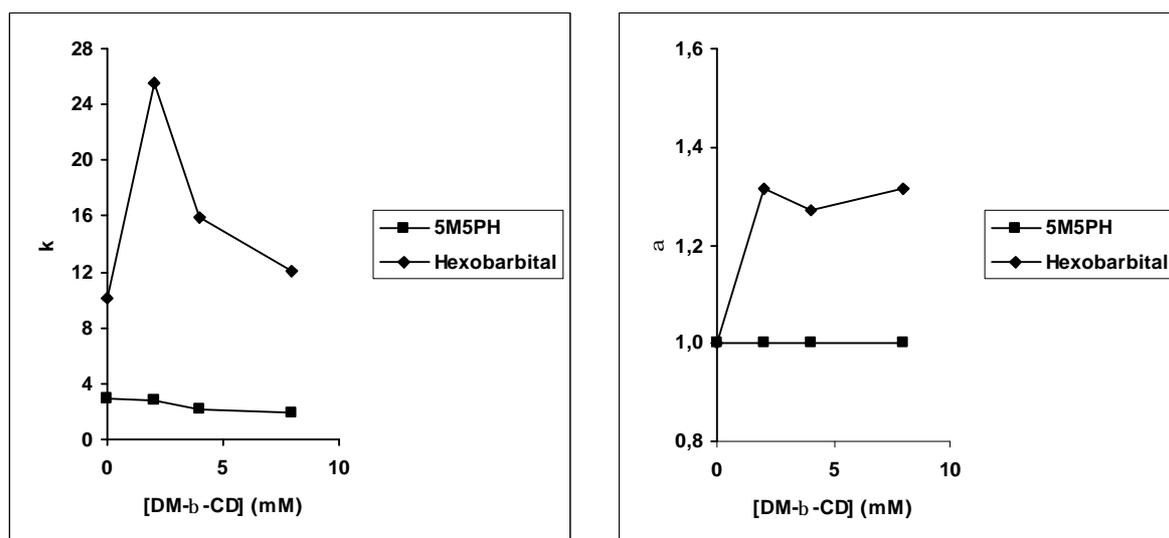


Figure 3.12. Influence de la concentration de DM-b-CD (DS 1,8) dans la phase mobile sur la rétention et l'énantiosélectivité des analytes.

Conditions : colonne Hypercarb (100 x 2,1 mm ; 5 μ m) ; phase mobile H₂O/ACN (80/20) + DM- β -CD (DS 1,8) ; débit : 0,2 mL/min ; température ambiante ; détection UV.

Pour l'hexobarbital, l'ajout de 2 mM DM- β -CD de DS 1,8 dans la phase mobile entraîne tout d'abord une forte augmentation de rétention comme décrit précédemment avec la DM- β -CD de DS 2,1 (figure 3.6). L'ajout de quantité supplémentaire (entre 2 et 8 mM) s'accompagne ensuite d'une diminution de rétention toutefois, avec 8 mM de DM- β -CD de DS 1,8, la rétention du soluté reste supérieure à sa valeur en l'absence de CD dans la phase mobile. Par ailleurs, l'ajout

de DM- β -CD de DS 1,8 offre une énantiosélectivité ($\alpha = 1,3$) qui n'était pas observée en présence de DM- β -CD de DS 2,1 (figure 3.7).

Il est intéressant de constater que c'est lorsque son facteur de rétention augmente que l'hexobarbital voit ses énantiomères bien séparés. C'est aussi ce qui a été observé avec 2 mM de DM- β -CD de DS 2,1 (figure 3.6).

Il est toutefois surprenant qu'avec cette DM- β -CD de DS 1,8, la complexation ait davantage lieu au niveau de la phase stationnaire qu'avec la DM- β -CD de DS 2,1. En effet, cette dernière est plus retenue et la quantité de CDs adsorbée sur la phase stationnaire est supérieure. On peut penser que dans le cas de la DM- β -CD de DS 1,8, les CDs, adsorbées en plus petit nombre sur la phase stationnaire, sont plus accessibles ou leurs cavités moins obstruées.

On peut donc conclure que pour séparer les énantiomères de la 5M5PH, il est préférable d'utiliser la DM- β -CD de DS 2,1 tandis que ceux de l'hexobarbital seront mieux séparés avec la DM- β -CD de DS 1,8.

III.5. Influence de la température de colonne

Dans la plupart des systèmes chromatographiques chiraux, une diminution de la température de la colonne entraîne une augmentation de la rétention et de l'énantiosélectivité. Ceci a été observé lors de séparations chirales d'alcools aminés par chromatographie d'appariements d'ions sur PGC [20, 21] et lors de la séparation de diverses molécules chirales par utilisation de sélecteurs chiraux à base d'acide tartrique liés à des molécules de chrysène ou de pyrène adsorbées sur le PGC [32]. C'est aussi généralement le cas lorsque les CDs sont utilisées comme sélecteurs chiraux dans la phase mobile ou greffées sur la phase stationnaire [1]. L'augmentation de l'énantiosélectivité proviendrait d'une stabilisation des complexes, l'agitation du soluté et de la CD étant réduite à basse température et les interactions faibles entre CDs et solutés ainsi renforcées [3].

L'influence de la température sur la séparation a donc été étudiée en effectuant une même série d'analyses à trois températures de colonne différentes : 25, 10 et 0°C. La figure 3.13 montre les chromatogrammes obtenus avec une phase mobile H₂O/ACN (80/20) contenant 2 mM de DM- β -CD de DS 2,1.

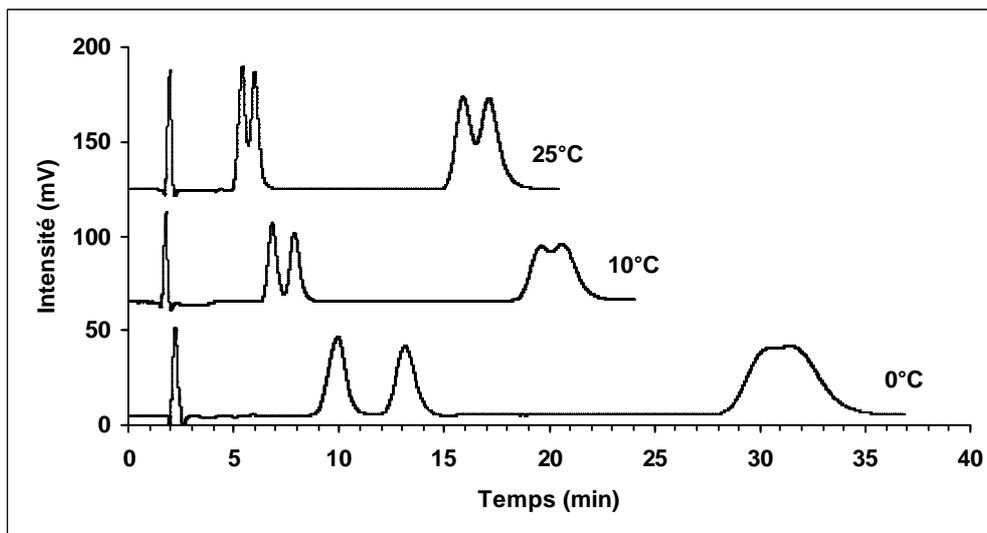


Figure 3.13. Influence de la température de la colonne sur la rétention de la 5M5PH et de l'hexobarbital.

Conditions : colonne Hypercarb (100 x 2,1 mm ; 5 μ m) ; phase mobile H₂O/ACN (80/20) + 2 mM de DM- β -CD de DS 2,1 ; débit : 0,2 mL/min ; détection UV.

On peut constater que la rétention des 2 paires de solutés augmente lorsque la température de la colonne diminue et que l'énantiosélectivité est elle aussi modifiée. Deux effets opposés sont notés lors de la diminution de la température de la colonne : si pour la 5M5PH, une nette amélioration de l'énantiosélectivité est obtenue à basse température, c'est l'inverse pour l'hexobarbital dont les 2 énantiomères ne sont plus séparés à 0°C.

La figure 3.14 montre l'évolution de la rétention des solutés avec la concentration en CDs dans la phase mobile à différentes températures. On peut tout d'abord constater qu'à phase mobile identique, la rétention des deux solutés augmente lorsque la température diminue. Ceci est vérifié qu'il y ait ou non de CDs dans la phase mobile.

L'évolution de la rétention de l'hexobarbital avec la concentration en CDs est la même quelque soit la température, elle augmente jusqu'à 2 mM puis diminue à partir de 4 mM et redevient inférieure à celle observée en l'absence de CDs dans la phase mobile.

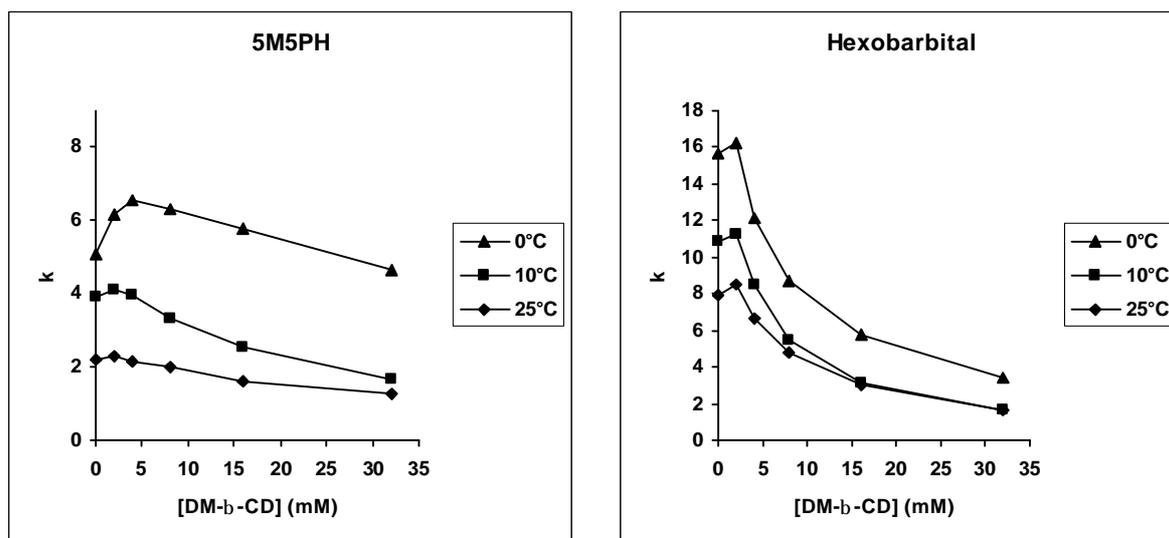


Figure 3.14. Influence de la concentration en DM-b-CD dans la phase mobile sur la rétention de la 5M5PH et de l'hexobarbital à différentes températures.

Conditions : colonne Hypercarb (100 x 2,1 mm ; 5 μ m) ; phase mobile H₂O/ACN (80/20) + DM- β -CD (DS 2,1) ; débit : 0,2 mL/min ; détection UV.

Par contre, la 5M5PH a un comportement différent selon la température. A 25 °C, sa rétention augmente avec 2 mM de CDs puis diminue. A 10°C, sa rétention à 2 et 4 mM de CDs est supérieure à celle observée sans CDs. A 0°C, la rétention reste supérieure jusqu'à 16 mM. Il semble donc qu'à mesure que la température diminue, la 5M5PH soit davantage complexée au niveau de la phase stationnaire.

La figure 3.15 montre l'évolution de l'énantiosélectivité avec la concentration en CDs dans la phase mobile à différentes températures. Notons tout d'abord que pour l'hexobarbital, l'énantiosélectivité est maximale à 25°C et diminue légèrement à 0 et 10°C. Par contre, quelque soit la température, la meilleure sélectivité est observée avec 2 mM de CDs.

Au contraire, pour la 5M5PH, l'énantiosélectivité augmente lorsque la température de la colonne diminue. Mais contrairement à 25°C où elle augmente avec la concentration en CDs jusqu'à 32 mM (figure 3.7), à 0 ou 10 °C, elle connaît un optimum. Ainsi, la meilleure énantiosélectivité est observée avec 32 mM de CDs à 25°C, 16 mM à 10°C et 8 mM à 0°C. Autrement dit, les optima se déplacent vers les faibles concentrations à mesure que la température diminue. Plus la température est basse et moins il est nécessaire de rajouter de CDs pour obtenir la meilleure séparation.

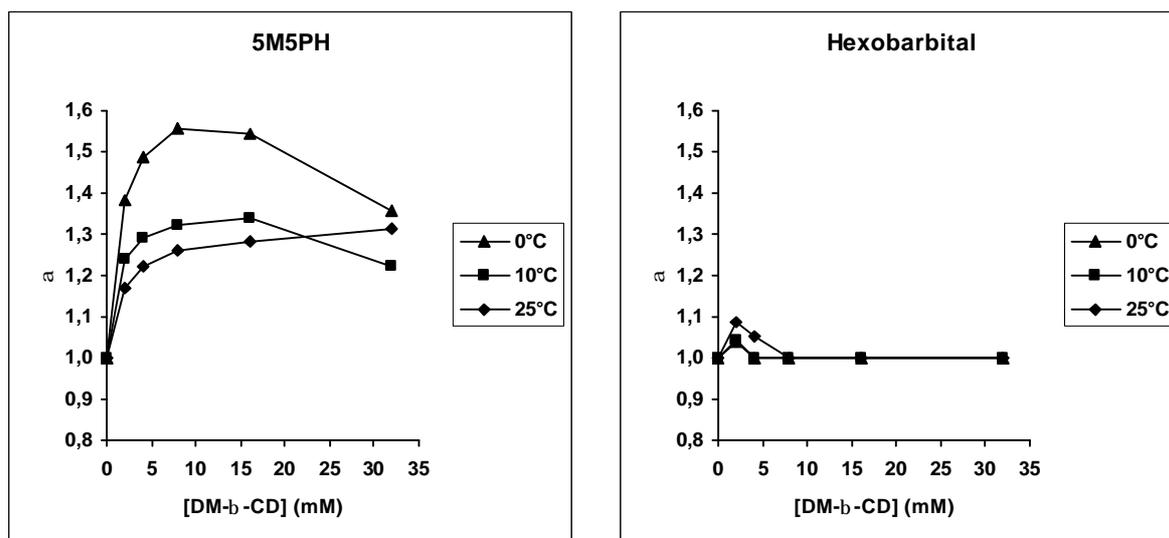


Figure 3.15. Influence de la concentration en DM-b-CD dans la phase mobile sur l'énantiosélectivité de la 5M5PH et de l'hexobarbital à différentes températures.

Conditions : colonne Hypercarb (100 x 2,1 mm ; 5 μ m) ; phase mobile H₂O/ACN (80/20) + DM- β -CD (DS 2,1) ; débit : 0,2 mL/min ; détection UV.

Notons que l'augmentation de l'énantiosélectivité pour la 5M5PH correspond à une augmentation de sa rétention. Comme pour l'hexobarbital avec la DM- β -CD de DS 1,8 (figure 3.12), la séparation des énantiomères est meilleure lorsque les solutés sont complexés par les CDs adsorbées sur le PGC.

III.6. Influence de la phase stationnaire

La nature de la phase stationnaire peut avoir une influence sur les séparations chirales utilisant des CDs dans la phase mobile [3]. Toutefois, cette influence se limite généralement à la modification de la rétention et de l'efficacité, sauf si la complexation n'a pas seulement lieu dans la phase mobile [52] ou que les complexes CD-solutés interagissent avec la phase stationnaire [53].

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le PGC permet généralement d'obtenir, avec un sélecteur chiral donné, de meilleures résolutions qu'avec des colonnes à base de silice [13-15, 28, 29]. Nous avons donc répété certaines analyses en remplaçant la colonne PGC par deux colonnes de silice greffée C18 : la Purospher Star RP 18 EC et la Zorbax C18 Extend, dont les caractéristiques sont rassemblées en annexe III.

La figure 3.16 montre les chromatogrammes obtenus sur les trois colonnes avec une phase mobile H₂O/ACN (80/20) + 2 mM de DM- β -CD de DS 1,8 ou 2,1.

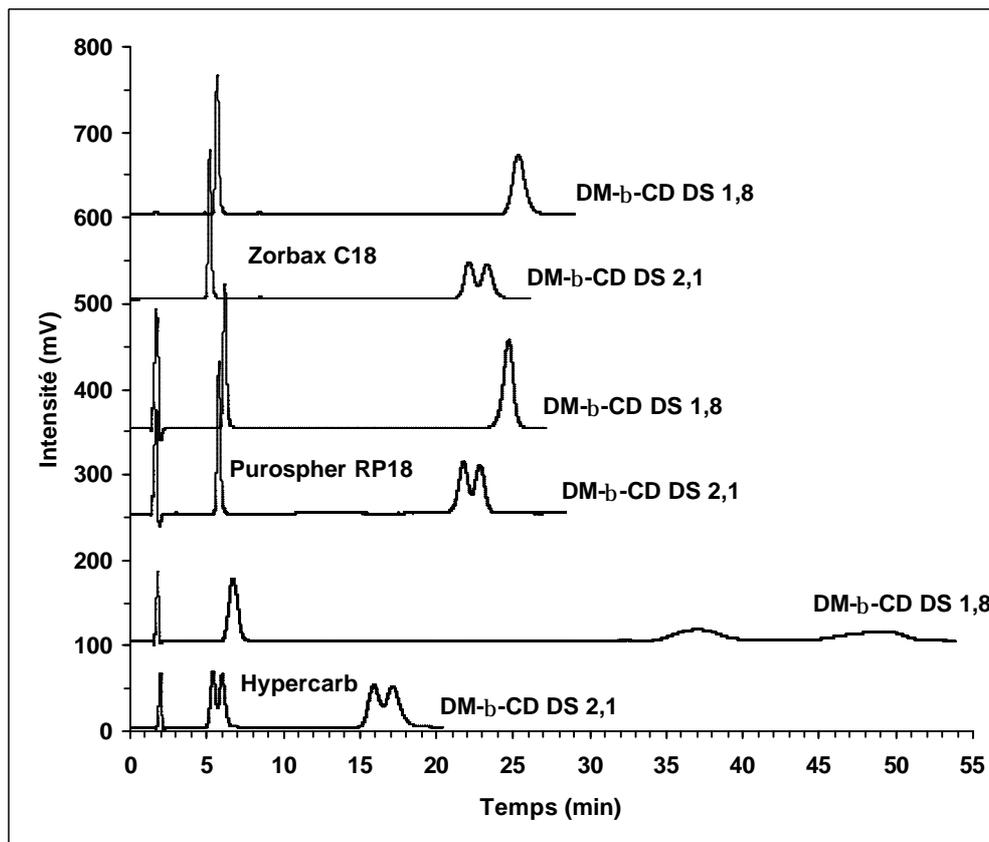


Figure 3.16. Influence de la nature de la phase stationnaire sur la séparation.

Conditions : phase mobile H₂O/ACN (80/20) + 2 mM de DM- β -CD ; débit : 0,2 mL/min ; température ambiante ; détecteur UV.

A composition de phase mobile identique, on constate un comportement singulier du PGC par rapport aux deux colonnes de silice greffée C18.

Les chromatogrammes obtenus sur les deux colonnes C18 sont très proches, rétention des solutés et énantiosélectivité sont presque identiques.

Le PGC se montre supérieur à ces deux colonnes. En effet, avec la DM- β -CD de DS 2,1, le PGC permet la séparation des énantiomères de chacun des solutés alors qu'avec les deux autres colonnes, la 5M5PH n'est pas résolue. De même, avec la DM- β -CD de DS 1,8, les énantiomères de l'hexobarbital sont totalement résolus sur PGC alors qu'ils ne le sont pas avec les colonnes C18.

Afin de mieux comprendre la cause de ces différences, la rétention des deux DM- β -CDs sur chacune des trois colonnes a été déterminée. La figure 3.17 montre les chromatogrammes obtenus en gradient d'élution.

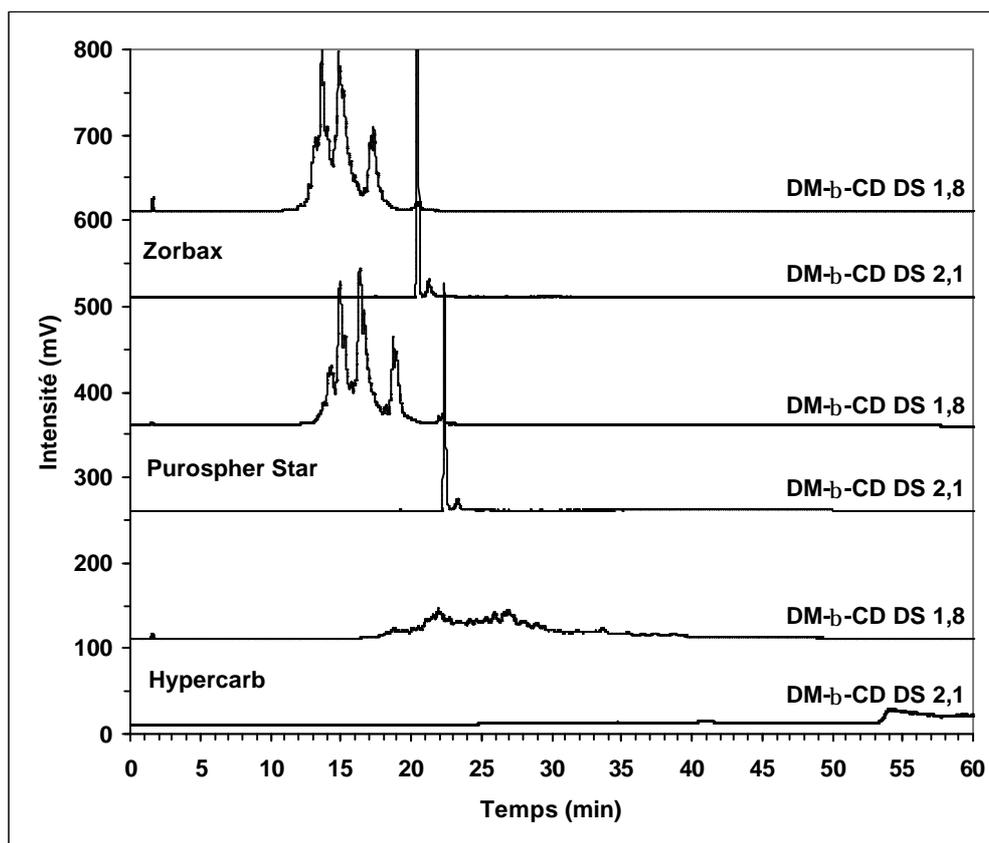


Figure 3.17. Rétention des DM- β -CDs sur les différentes phases stationnaires utilisées.

Conditions : phase mobile H₂O/ACN (85/15) à (0/100) en 42 min puis ACN 100% pendant 20 min ; débit : 0,2 mL/min ; température ambiante ; détection : DEDL.

On peut constater que, dans des conditions d'analyse identiques, les deux DM- β -CDs sont plus retenues sur le PGC que sur les deux autres colonnes C18, qui par ailleurs ont une rétention comparable. La DM- β -CD de DS 2,1, plus méthylée et donc plus apolaire que son homologue de DS 1,8 est la plus retenue des deux et ce, sur les trois colonnes.

Comme avec le PGC, la quantité de CDs adsorbée sur ces deux phases stationnaires a été déterminée avec une phase mobile H₂O/ACN 80/20 + 2 mM de DM- β -CD. Ces expériences ont montré que la quantité adsorbée sur les colonnes C18 est plus grande que sur PGC. En effet, la quantité adsorbée sur le PGC était de 9,3 μ mol pour la DM- β -CD de DS 2,1 et 6,2 μ mol pour la DM- β -CD de DS 1,8. Avec la colonne Purospher, ces quantités sont de 16,6 et 11 μ mol et pour la colonne Zorbax, 16,6 et 7,6 μ mol. Bien qu'elles soient moins retenues, les CDs s'adsorbent donc sur ces phases stationnaires en plus grande quantité que sur le PGC, ce qui

s'explique en partie par la différence de surface spécifique, bien plus grande sur les colonnes C18 que sur PGC (annexe III).

Au final, la quantité de CDs adsorbée sur le PGC est donc inférieure à celle adsorbée sur les colonnes C18. Le temps d'équilibrage du système chromatographique est donc plus court et, comme nous l'avons vu, les séparations obtenues sont meilleures.

Afin de comprendre les mécanismes en jeu sur ces colonnes, l'influence de la concentration en DM- β -CD dans la phase mobile a été étudiée avec la colonne Purospher Star.

La figure 3.18 montre l'évolution de la rétention des solutés avec la concentration de DM- β -CD dans la phase mobile.

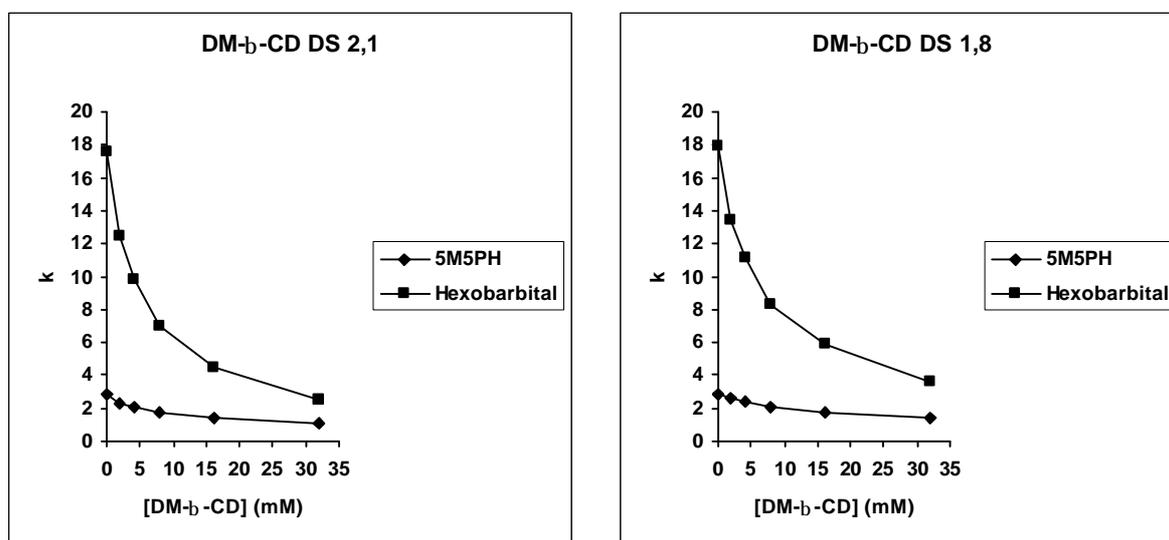


Figure 3.18. Influence de la concentration de DM-b-CD dans la phase mobile sur la rétention du second énantiomère de chacun des solutés.

Conditions : colonne Purospher Star RP 18 EC (125 x 2 mm ; 5 μ m) ; phase mobile H₂O/ACN (80/20) + DM- β -CD ; débit : 0,2 mL/min, température ambiante ; détection UV.

On peut voir que la rétention des deux solutés diminue lorsque la concentration de CDs augmente. Contrairement à ce qui a été observé avec la colonne PGC (figure 3.6 et 3.12), il n'y a pas ici d'augmentation de la rétention aux plus faibles concentrations de CDs dans la phase mobile, ce qui est cohérent avec le fait que les CDs, moins retenues sur ces colonnes, ne permettent pas que la complexation ait lieu au niveau de la phase stationnaire.

A nouveau, la rétention de l'hexobarbital diminue plus fortement que celle de la 5M5PH à mesure que la concentration en CDs augmente, ce qui confirme ce que nous avons conclu précédemment : l'hexobarbital est plus complexé par ces deux CDs que la 5M5PH.

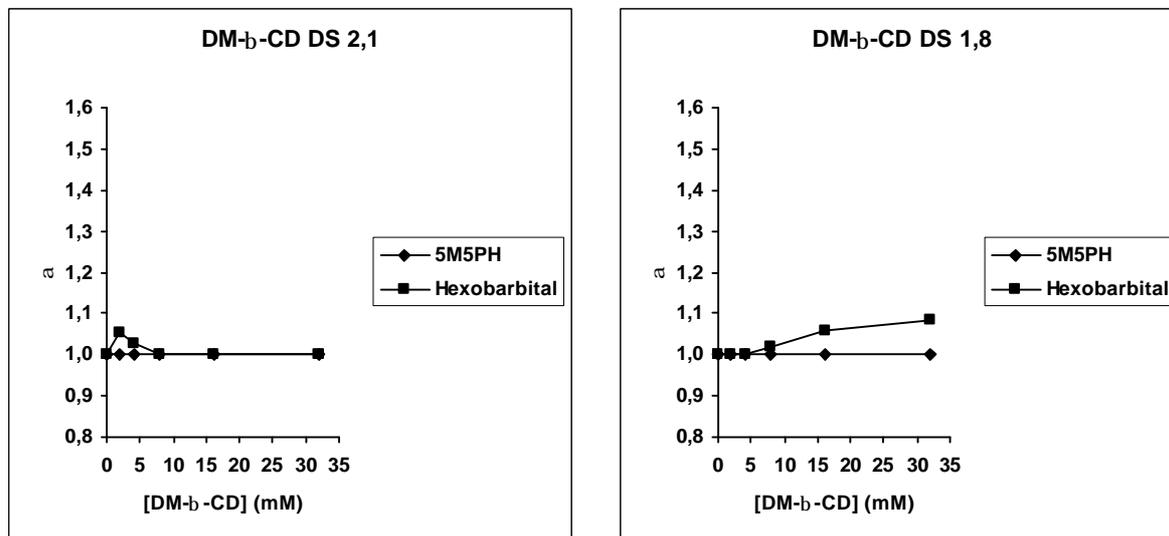


Figure 3.19. Influence de la concentration de DM-b-CD dans la phase mobile sur l'énantiosélectivité des solutés.

Conditions : colonne Purospher Star RP 18 EC (125 x 2 mm ; 5 μ m) ; phase mobile H₂O/ACN (80/20) + DM- β -CD ; débit : 0,2 mL/min, température ambiante ; détection UV.

La figure 3.19 montre que l'énantiosélectivité pour l'hexobarbital avec la DM- β -CD de DS 2,1 évolue de la même façon qu'avec la colonne PGC : elle est maximale à 2 mM puis diminue pour être nulle à 8 mM (figure 3.7). Remarquons toutefois que sur la colonne PGC, cette augmentation de sélectivité correspondait à une augmentation de la rétention, ce qui n'est pas le cas ici. La complexation a donc lieu principalement dans la phase mobile.

Avec la DM- β -CD de DS 1,8, la sélectivité de l'hexobarbital augmente progressivement et atteint 1,08 à 32 mM. A nouveau, il faut noter qu'avec la colonne PGC, la rétention de l'hexobarbital augmentait d'abord à faibles concentrations de CDs.

Pour résumer, la colonne PGC permet une meilleure séparation des énantiomères de chacun des deux solutés. Avec la colonne Puropher, les énantiomères de la 5M5PH ne sont pas séparés et pour l'hexobarbital, l'énantiosélectivité maximale obtenue est de 1,08 avec 32 mM de DM- β -CD de DS 1,8. Avec la colonne PGC, l'énantiosélectivité est de 1,3 avec seulement 2 mM de

CDs dans la phase mobile. Autrement dit, pour les deux solutés choisis, le PGC permet de meilleures séparations que les colonnes C18 et permet en plus d'utiliser une quantité moindre de CDs.

De plus, il faut rajouter que les séparations obtenues sur PGC n'ont pas été optimisées car ce n'était pas le but. Nous aurions pu en effet modifier plusieurs autres paramètres connus pour influencer les séparations chirales tels que pH, tampon, sels pour la symétrie de pic, etc. car il faut rappeler que le PGC, contrairement aux autres colonnes à base de silice, supporte des conditions très dure comme l'ajout de TFA. Même si le but n'était pas d'optimiser la séparation des deux solutés, on peut constater qu'à conditions d'analyse identiques, c'est sur la colonne PGC que l'on a obtenu les meilleures sélectivités et les meilleures séparations.

Puisque le PGC permet d'obtenir de meilleures séparations, on peut penser, comme l'ont avancé Ross et Knox, que la surface plane du graphite participe aux interactions entre les CDs et les solutés complexés [37].

Nous allons donc étudier le mécanisme de reconnaissance chirale ou plus précisément sa localisation : phase mobile et/ou phase stationnaire.

III.7. Etude du mécanisme de reconnaissance chirale

Les résultats obtenus précédemment sur PGC montrent que, selon les conditions chromatographiques utilisées, les solutés peuvent être complexés par les CDs présentes dans la phase mobile ou par celles immobilisées sur la phase stationnaire.

Le fait que la rétention globale des solutés diminue lorsque la concentration en CDs dans la phase mobile augmente laisse penser que la complexation a principalement lieu au sein de la phase mobile, ce qui est la situation la plus souvent rencontrée. Toutefois, nous avons vu que la rétention de l'hexobarbital en présence de CDs est parfois supérieure à celle qui est observée en l'absence de CDs, ce qui laisse penser que la complexation peut avoir lieu au niveau de la phase stationnaire.

Pour tenter d'élucider ces mécanismes, il est nécessaire de rappeler les différents équilibres impliqués lors des séparations effectuées dans ces conditions. Pour cela, on considère qu'un seul soluté est présent en solution et prend part aux processus d'adsorption sur la phase stationnaire et de complexation dans les CDs

(stoechiométrie 1:1). Les différents équilibres sont représentés à la figure 3.20 où S représente le soluté, K_S la constante de stabilité du complexe d'inclusion dans la phase mobile et K_1 , K_2 et K_3 les coefficients de partage du soluté, du complexe CD-S et de la CD entre phase mobile (PM) et phase stationnaire (PS).

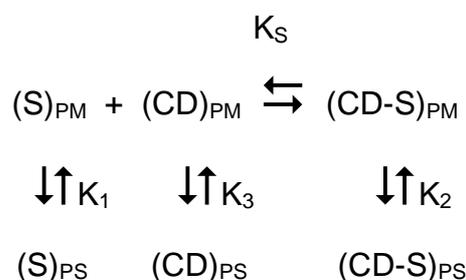


Figure 3.20. Schéma des équilibres des différentes espèces.

Les indices PM et PS désignent les espèces présentes dans la phase mobile et sur la phase stationnaire, respectivement.

En fait, il faudrait rajouter à ce schéma l'équilibre de complexation des solutés par les CDs adsorbées à la surface de la phase stationnaire. De même, en toute rigueur, il faut souligner qu'il existe un équilibre supplémentaire correspondant à la complexation du solvant organique par les CDs [48].

La rétention du soluté dépend donc de plusieurs équilibres :

- Partage du soluté libre entre phase mobile et phase stationnaire
- Complexation du soluté par les CDs dans la phase mobile et partage de ce complexe entre phase mobile et phase stationnaire
- Complexation du soluté avec les CDs adsorbées sur la phase stationnaire

Pour simplifier le raisonnement, on peut tout d'abord commencer en négligeant l'adsorption des CDs et des complexes sur la phase stationnaire (K_3 et K_2 petits) et considérer ainsi que la rétention du soluté n'est due qu'à son adsorption sur la phase stationnaire et sa complexation par les CDs présentes dans la phase mobile. Dans ce cas, le facteur de rétention k d'un soluté est relié à la concentration en CDs dans la phase mobile par [44, 45, 47] :

$$1/k = 1/k_0 + K_S[CD]/k_0 \quad \text{Equation 1}$$

avec k_0 , le facteur de rétention du soluté S en l'absence de CDs dans la phase mobile. Dans ce cas, le tracé de $1/k$ en fonction de la concentration en CDs doit être

une droite dont la pente et l'ordonnée à l'origine permettent d'avoir accès à k_0 et K_S . Dans ce cas, la reconnaissance chirale est due à la différence de constante de stabilité des deux complexes CD-énantiomère dans la phase mobile.

En revanche, si l'adsorption du complexe sur la phase stationnaire n'est pas négligeable, on a [46, 50] :

$$k = (k_0 - k) / (K \cdot [CD]) + k_2 \quad \text{Equation 2}$$

Dans ce cas, le tracé de k en fonction de $(k_0 - k) / ([CD])$ doit être une droite d'ordonnée à l'origine k_2 et de pente $1/K$. La reconnaissance chirale peut alors être le résultat d'une différence de constante de stabilité des deux complexes CD-énantiomère et/ou d'une différence d'adsorption de ces complexes [54].

Chacune de ces équations a été appliquée aux résultats obtenus avec la DM- β -CDs de DS 2,1 et une phase mobile H₂O/ACN (80/20) sur les colonnes Hypercarb et Purospher Star.

La figure 3.21 montre les graphes obtenus avec l'équation 1. On peut constater qu'en première approximation, la relation est presque linéaire pour les deux composés et sur les deux colonnes, ce qui signifierait que l'adsorption des CDs (dont nous savons qu'elle n'est pas négligeable) et des complexes n'a que peu d'influence sur la rétention.

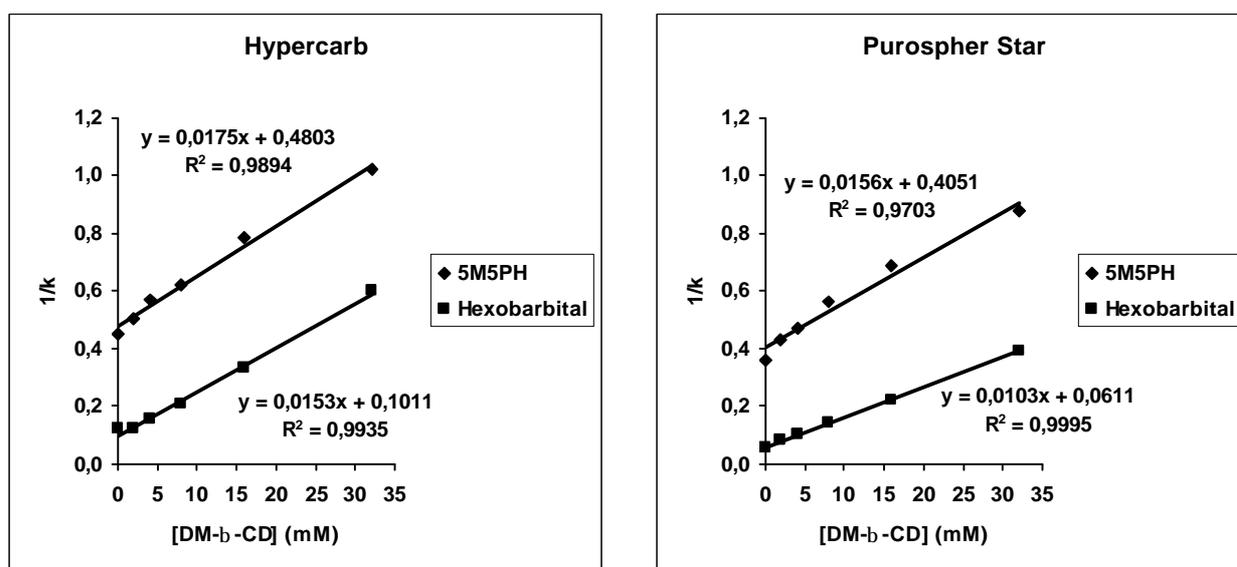


Figure 3.21. Représentation de $1/k$ en fonction de la concentration en DM- β -CDs dans la phase mobile.

Conditions : phase mobile : H₂O/ACN (80/20) + DM- β -CD (DS 2,1) ; débit : 0,2 mL/min ; température ambiante ; détection UV.

Les valeurs des constantes de stabilité des deux solutés ont été calculées pour les deux colonnes à partir des équations des droites. Pour la 5M5PH, la constante K_S vaut 36 M^{-1} sur Hypercarb et 39 M^{-1} sur Purospher. Pour l'hexobarbital, ces valeurs sont 151 et 169 M^{-1} . Notons pour comparaison que la constante de complexation de l'hexobarbital par la β -CD native, déterminée par RPLC avec une phase mobile H₂O/EtOH (80/20) est égale à 151 M^{-1} [54], valeur qui est du même ordre de grandeur que celles que nous avons trouvées.

La linéarité de la relation précédente semble indiquer que la reconnaissance chirale n'est due qu'à la différence de constante de stabilité des complexes CD-énantiomère dans la phase mobile. Mais alors dans ce cas, il est difficile d'expliquer la différence de sélectivité observée entre les colonnes Hypercarb et Purospher lorsqu'elles sont utilisées dans les mêmes conditions. La figure 3.16 montre en effet qu'à composition de phase mobile identique, les énantiomères de la 5M5PH sont séparés sur Hypercarb mais sont coélusés sur Purospher. Il est donc évident que la phase stationnaire doit jouer un rôle dans le mécanisme de reconnaissance chirale.

Nous avons donc appliqué l'équation 2, qui tient compte de l'adsorption du complexe CD-énantiomère sur la phase stationnaire et permet ainsi d'évaluer un éventuel effet de celle-ci sur la séparation. La figure 3.22 montre les courbes obtenues.

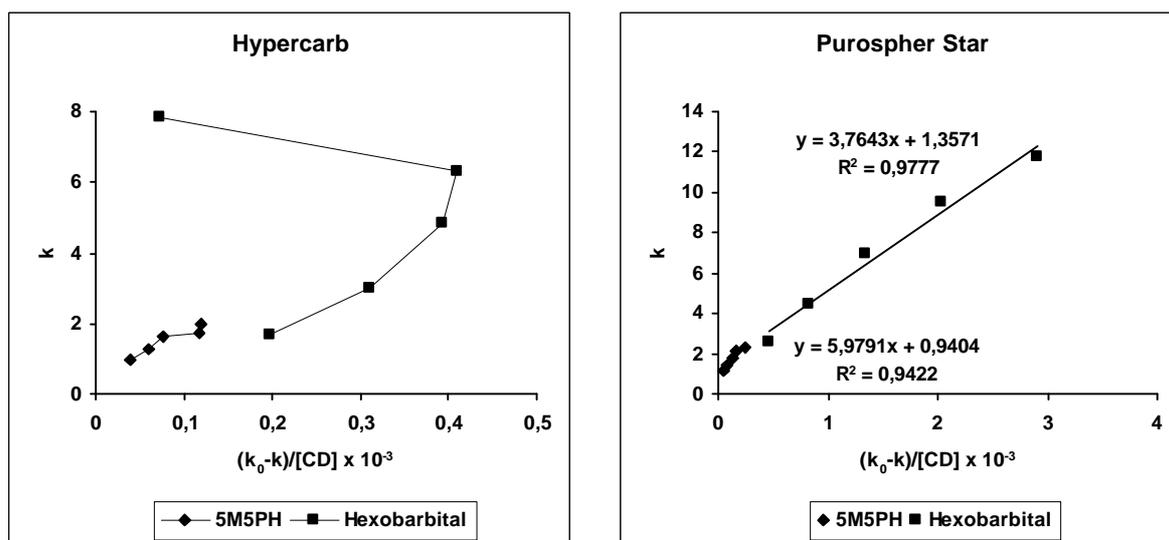


Figure 3.22. Représentation de k en fonction de $(k_0 - k)/[CD]$.

Conditions : phase mobile H₂O/ACN (80/20) + DM- β -CD (DS 2,1) ; débit : 0,2 mL/min ; température ambiante ; détection UV.

Dans ce cas, les deux colonnes montrent des différences significatives. Avec la colonne Purospher, la relation est à nouveau à peu près linéaire pour les deux composés et permet de calculer les facteurs de rétention des complexes : 0,94 pour le complexe de la 5M5PH et 1,37 pour celui de l'hexobarbital, ce qui signifie que les complexes sont peu retenus sur la phase stationnaire. Les constantes de stabilité des complexes sont 167 M^{-1} pour la 5M5PH et 266 M^{-1} pour l'hexobarbital, valeurs très différentes de celles obtenus précédemment.

Par contre avec le PGC, l'allure des courbes obtenues montrent que ce modèle ne convient pas pour expliquer la rétention et cela peut être expliqué par la forte adsorption des CDs sur la phase stationnaire [50], ce qui rend possible la complexation des solutés au niveau de la phase stationnaire.

Pour résumer, on peut dire que ces modèles ne permettent pas de décrire correctement les phénomènes observés. La complexation semble bien avoir principalement lieu dans la phase mobile comme l'indique la diminution de la rétention globale des solutés par ajout de CDs mais d'un autre côté, la seule complexation dans la phase mobile ne permet pas d'expliquer les différences observées entre les différentes colonnes utilisées. Il y a donc bien interactions des complexes avec les phases stationnaires et à plus faibles concentrations, complexation au sein de la phase stationnaire, comme le montre l'augmentation de la rétention des solutés dans certaines conditions par ajout de CDs.

Ceci est en accord avec les résultats obtenus sur colonne C18 avec divers CDs plus ou moins retenues : en solution diluée, la rétention des énantiomères et leur résolution sont principalement gouvernées par la complexation des solutés dans les CDs adsorbées sur la phase stationnaire [44, 50]. Mais à concentrations plus élevées, la complexation a principalement lieu dans la phase mobile [55].

Pour compléter ces travaux, il pourrait être intéressant d'étudier ce système chromatographique à plus faibles concentrations de CDs dans la phase mobile. En effet, pour profiter de la sélectivité du PGC, il est nécessaire de faire intervenir sa surface dans le processus de reconnaissance chirale, ce qui peut avoir lieu lorsque (i) les complexes, formés dans la phase mobile, sont adsorbés sur le PGC et (ii) lorsque la complexation a lieu dans les CDs adsorbées sur le PGC. Or, cela est possible lorsque (i) la surface du PGC est facilement accessible et (ii) lorsque le rapport de la concentration de CDs à la surface du PGC sur celle dans la phase

mobile est grand, ce qui est le cas si on travaille avec une faible concentration de CDs dans la phase mobile. En effet, comme le montre la figure 3.3, la quantité de CDs adsorbées sur le PGC croît moins rapidement que la quantité de CDs restant dans la phase mobile à mesure que l'on rajoute des CDs dans le système chromatographique.

Il serait donc intéressant de travailler à faibles concentrations de CDs pour profiter de la surface du PGC.

IV. CONCLUSIONS

Lors de ces travaux, le PGC a été évalué comme support chromatographique pour effectuer des séparations chirales en utilisant des DM- β -CDs dans la phase mobile.

Cette étude a montré qu'à conditions chromatographiques identiques, le PGC se révèle supérieur aux colonnes C18 traditionnellement utilisées pour ce genre de séparations. Il permet en effet d'obtenir des séparations dans des conditions où les autres colonnes n'y parviennent pas ou en utilisant une plus faible concentration de CDs dans la phase mobile.

Il faut à nouveau rappeler que de nombreux paramètres peuvent être modifiés pour améliorer les séparations sur PGC, celui-ci supportant des conditions chromatographiques impossible à appliquer avec une phase stationnaire du type C18 (pression et température élevées, pH extrêmes).

Afin de mieux comprendre les mécanismes de rétention et le rôle de la surface du PGC, il serait intéressant d'utiliser des Me- β -CDs de différents DS ainsi que d'autres dérivés de CDs.

V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] H. Aboul-Enein, I. Ari, *Chiral separations by liquid chromatography and related technologies*, Ed. Marcel Dekker, New York, 2003.
- [2] S. Han, *Biomed. Chromatogr.* 11 (1997) 259-271.
- [3] F. Bressolle, M. Audran, T.-N. Pham, J.-J. Vallon, *J. Chromatogr. B* 687 (1996) 303-336.
- [4] Z. Juvancz, J. Szejtli, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 379-388.
- [5] L. Healy, J. Murrihy, A. Tan, D. Cocker, M. McEnery, J. Glennon, *J. Chromatogr. A* 924 (2001) 459-464.
- [6] D. Chen, S. Jiang, Y. Chen, Y. Hu, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 239-245.
- [7] R. Herraiez-Hernandez, P. Campins-Falco, *J. Chromatogr. A* 740 (2000) 169-177.
- [8] C. Ravelet, A. Geze, A. Villet, C. Grosset, A. Ravel, D. Wouessidjewe, E. Peyrin, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29 (2002) 425-430.
- [9] B. Claude, P. Morin, M. Lafosse, P. André, *J. Chromatogr. A* 1049 (2004) 37-42.
- [10] A. Fell, T. Noctor, J. Mama, B. Clark, *J. Chromatogr.* 434 (1988) 377-384.
- [11] J. Mama, A. Fell, B. Clark, *Anal. Proc.* 26 (1989) 71-73.
- [12] B. Clark, J. Mama, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 7 (1989) 1883-1888.
- [13] A. Karlsson, C. Pettersson, *J. Chromatogr.* 543 (1991) 287-297.
- [14] E. Heldin, N-H. Huynh, C. Pettersson, *J. Chromatogr.* 585 (1991) 35-44.
- [15] E. Heldin, K-J. Lindner, C. Pettersson, W. Lindner, R. Rao, *Chromatographia* 32 (1991) 407-416.
- [16] A. Karlsson, C. Pettersson, *Chirality* 4 (1992) 323-332.
- [17] C. Pettersson, C. Gioeli, *Chirality*, 5 (1993) 241-245.
- [18] M. Josefsson, B. Carlsson, B. Norlander, *J. Chromatogr. A* 684 (1994) 23-27.
- [19] N-H. Huynh, A. Karlsson, C. Pettersson, *J. Chromatogr. A* 705 (1995) 275-287.
- [20] A. Karlsson, C. Charron, *J. Chromatogr. A* 732 (1996) 245-253.
- [21] A. Karlsson, O. Karlsson, *Chirality* 9 (1997) 650-655.

- [22] A. Sandberg, K. Markides, E. Heldin, *J. Chromatogr. A* 828 (1998) 149-156.
- [23] O. Gyllenhaal, A. Karlsson, *Chromatographia* 52 (2000) 351-355.
- [24] A. Salvador, B. Herbreteau, M. Dreux, *Chromatographia* 53 (2000) 207-209.
- [25] A. Salvador, B. Herbreteau, M. Dreux, A. Karlsson, O. Gyllenhaal, *J. Chromatogr. A* 929 (2001) 101-112.
- [26] J. Knox, Q.-H. Wan, *Chromatographia* 40 (1995) 9-14.
- [27] J. Dutton, J. Knox, X. Radisson, H. Ritchie, R. Ramage, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (1995) 2581-2587.
- [28] S. Wilkins, D. Taylor, R. Smith, *J. Chromatogr. A* 697 (1995) 587-590.
- [29] S. Grieb, S. Matlin, A. Belenguer, H. Ritchie, P. Ross, *J. High Resol. Chromatogr.* 18 (1995) 761-763.
- [30] L. Monser, G. Greenway, *Anal. Commun.* 33 (1996) 65-68.
- [31] L. Monser, G. Greenway, D. Ewing, *Tetrahedron: Asymmetry* 7 (1996) 1189-1198.
- [32] L. Monser, G. Greenway, *Analyst* 122 (1997) 719-726.
- [33] Q-H. Wan, P. Shaw, M. Davies, D. Barrett, *J. Chromatogr. A* 765 (1997) 187-200.
- [34] Q-H. Wan, P. Shaw, M. Davies, D. Barrett, *J. Chromatogr. A* 786 (1997) 249-257.
- [35] E. Kelly, D. Haddleton, D. Crout, P. Ross, J. Dutton, *Chem. Commun.* (1999) 1233-1234.
- [36] J. Oxelbark, S. Claeson, *Tetrahedron: Asymmetry* 13 (2002) 2235-2240.
- [37] P. Ross, J. Knox, *Advances in Chromatography* 37 (1997) 121-161.
- [38] A. Kwaterczak, A. Bielejewska, *Anal. Chim. Acta* 537 (2005) 41-46.
- [39] Interactive PhysProp Database : <http://www.syrres.com/esc/physdemo.htm>.
- [40] Logiciel Pallas, version 1.2, CompuDrug Chemistry Ltd.
- [41] M. Taghvaei, G. Stewart, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1902-1904.
- [42] A. Chatjigakis, C. Donzé, A. Coleman, P. Cardot, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1632-1634.
- [43] J. Jacobson, J. Frenz, C. Horvath, *J. Chromatogr.* 316 (1984) 53-68.

- [44] R. Nowakowski, A. Bielejewska, K. Duszczuk, D. Sybilska, J. Chromatogr. A 782 (1997) 1-11.
- [45] K. Fujimura, T. Ueda, M. Kitagawa, H. Takayanagi, T. Ando, Anal. Chem. 58 (1986) 2668-2674.
- [46] J. Debowski, D. Sybilska, J. Chromatogr. 353 (1986) 409-416.
- [47] M. Seno, M. Lin, K. Iwamoto, J. Chromatogr. 508 (1990) 127-132.
- [48] R. Mohseni, R. Hustubise, J. Chromatogr. 499 (1990) 395-410.
- [49] M. Tanaka, T. Miki, T. Shono, J. Chromatogr. A 330 (1985) 253-261.
- [50] J. Zukowski, D. Sybilska, J. Chromatogr. A 364 (1986) 225-232.
- [51] R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, *Chromatographies en phases liquide et supercritique*, Ed. Masson, Paris, 1991.
- [52] P. Zarzycki, K. Kulhanek, R. Smith, J. Chromatogr. A 955 (2002) 71-78.
- [53] A. Walhagen, L.-E. Edholm, Chromatographia 32 (1991) 215-223.
- [54] D. Sybilska, J. Zukowski, J. Bojarski, J. Liq. Chromatogr. 9 (1986) 591-606.
- [55] J. Zukowski, D. Sybilska, J. Bojarski, J. Szejtli, J. Chromatogr. 436 (1988) 381-390.

CHAPITRE 4

**Etude des complexes de cyclodextrines par
expériences de partage liquide-liquide et par
spectrométrie de masse à ionisation
électrospray**

CHAPITRE 4

Etude des complexes de cyclodextrines par expériences de partage liquide-liquide et par spectrométrie de masse à ionisation électrospray

I. INTRODUCTION

Nous avons vu dans le chapitre 1 que, grâce à leur cavité, les CDs ont la capacité de former des complexes d'inclusion avec un grand nombre de molécules et d'en modifier ainsi les propriétés physicochimiques. C'est la raison pour laquelle les CDs sont utilisées dans divers domaines d'applications tels que les industries pharmaceutique, cosmétique ou agroalimentaire.

L'une des approches les plus utilisées pour évaluer l'effet de complexation par les CDs est l'élaboration de diagrammes de solubilité, qui consiste à déterminer la courbe de solubilité de la molécule invitée en fonction de la concentration de CDs en solution [1]. Par ailleurs, l'étude des complexes (formation, structure, stabilité, etc.) peut être menée avec différentes techniques analytiques telles que la cristallographie aux rayons X, la RMN, la spectroscopie optique (ultraviolet, dichroïsme circulaire, fluorescence), la calorimétrie, la pH-métrie, la CPL, l'EC, etc. [2-4].

Toutefois, ces techniques ont chacune leurs limites. En effet, la stoechiométrie du complexe CD - soluté est souvent supposée (généralement stoechiométrie de type 1:1), ce qui peut conduire à des erreurs lors de la détermination des constantes de stabilité [5]. De plus, certaines d'entre elles ont une sensibilité limitée et/ou ne sont compatibles qu'avec certains solvants. Enfin, elles ne permettent pas de déterminer la contribution individuelle des différents dérivés d'un mélange de CDs à la complexation globale.

Ce sont les raisons pour lesquelles, depuis une dizaine d'années, l'utilisation de la SM pour l'étude des complexes de CDs a fait l'objet d'une certaine attention [5-16]. La plupart de ces travaux font appel à l'électrospray (ESI) qui, grâce à la douceur du processus d'ionisation, permet la survie des complexes non covalents lors de leur passage de la solution vers la phase gazeuse [17]. C'est d'ailleurs pour cette raison que l'ESI-SM est utilisée pour l'étude des associations anticorps-antigène, récepteur-ligand, enzyme-substrat, etc. [17].

Plusieurs équipes ont utilisé l'ESI-SM pour étudier les complexes de CDs avec différentes molécules et ont cherché à déterminer si les résultats obtenus avec cette technique étaient corrélés avec ceux obtenus par des méthodes d'analyse en solution, par exemple pour déterminer la stoechiométrie de différents complexes ou leurs stabilités relatives.

Ainsi, Srinivasan *et al* et Al-nouti *et al* ont étudié divers complexes CDs-barbituriques [10] et CDs-anesthésiques [14], par ESI-SM et EC et ont conclu que les intensités relatives des différents complexes détectés par ESI-SM étaient corrélées avec leurs constantes de stabilité en solution, déterminées par EC.

Dotsikas *et al* ont rapporté la détermination des constantes de stabilité de plusieurs complexes par ESI-SM et les valeurs obtenues par leurs calculs se sont révélées proches de celles obtenues par spectroscopie UV [5].

De leur côté, Guo *et al* ont rapporté eux aussi de bonnes corrélations entre les résultats obtenus en ESI-SM et les constantes de stabilité obtenues à partir de diagramme de solubilité [16]. Ils ont aussi rapporté la possibilité de déterminer la partie complexée de la molécule invitée en observant les espèces obtenues par fragmentation du complexe.

Toutefois, il est nécessaire de rappeler certaines limitations de l'ESI-SM pour l'analyse des complexes de CDs. En effet, Cunniff *et al* ont montré que cette technique peut donner lieu à de faux négatifs et de faux positifs [6]. Ainsi, le spectre ESI-SM d'une solution de complexes β -CD-cyclohexane ou β -CD-toluène ne montre aucun pic aux rapports m/z correspondant aux complexes alors que ceux-ci existent bien en solution, ce que les auteurs expliquent par la disparition, lors du passage en phase gazeuse, des interactions hydrophobes responsables de la complexation. A l'inverse, le spectre de solutions contenant la β -CD et différents acides aminés non aromatiques montre des pics aux rapports m/z correspondant aux complexes alors que ces acides aminés ne forment pas de complexes d'inclusion en solution. Ces complexes non spécifiques ne seraient en fait que des adduits électrostatiques dont la formation est due aux fortes interactions électrostatiques entre la charge positive de l'ammonium terminal des acides aminés et les atomes d'oxygène électronégatifs des groupes hydroxyle de la CD. Les CDs montrent en effet une grande affinité envers les ions NH_4^+ , ce qui est d'ailleurs mis à profit pour améliorer leur détection en ESI-SM, comme nous l'avons vu dans le chapitre 2.

Par ailleurs, Gabelica *et al* ont montré que le signal de complexes de diacides linéaires avec l' α -CD était en partie dû à des complexes non spécifiques, autrement dit à des complexes qui ne sont pas d'inclusion. Ils ont pu mettre en évidence et évaluer cette contribution en remplaçant l' α -CD par son homologue linéaire, le maltohexaose, incapable de former un complexe d'inclusion en solution [15].

A la vue de ces travaux et de leurs conclusions, l'ESI-SM apparaît comme une méthode attractive pour l'étude des complexes de CDs. A notre connaissance, aucune étude comparative n'a été menée sur la complexation de Me- β -CDs de différents DS. Disposant déjà de résultats concernant la complexation de la 5M5PH et de l'hexobarbital par deux DM- β -CDs (chapitre 3), nous nous sommes intéressés à l'ESI-SM et avons cherché à déterminer ce que cette technique pourrait nous apprendre sur les complexes de ces solutés avec des Me- β -CDs de DS allant de 0 (autrement dit, la β -CD native) à 3 (autrement dit, la TM- β -CD).

Cependant, devant la possibilité de rencontrer des faux positifs ou des faux négatifs, il nous a semblé judicieux pour notre étude de disposer d'une méthode indépendante permettant de contrôler les résultats obtenus en ESI-SM. Nous avons donc adapté une méthode de détermination des partages liquide-liquide, initialement utilisée lors de travaux effectués en chromatographie de partage centrifuge (CPC), afin d'évaluer de manière simple le pouvoir complexant des différentes CDs utilisées vis-à-vis des deux solutés test.

Cette étude préalable a été menée, comme les analyses ESI-SM, sur six CDs différentes : la β -CD native, qui possède donc un DS de 0, la Me- β -CD de DS 0,7 caractérisée au chapitre 2, trois DM- β -CDs de DS 1,8, 2,0 et 2,1 et enfin, la TM- β -CD (dont le DS est donc 3).

II. ETUDE DES COMPLEXES PAR EXPERIENCES DE PARTAGE

II.1. Présentation des expériences de partage

II.1.1. Principe des expériences de partage

Le principe de ces expériences est simple : il s'agit de déterminer le partage d'un soluté au sein d'un système biphasique avant et après addition de CDs dans la phase aqueuse. La différence de partage due à l'addition de la CD permet d'évaluer le pouvoir complexant vis-à-vis du soluté étudié.

L'analyse par CPL des deux phases permet de déterminer la proportion de soluté se trouvant dans chacune d'elles avant et après l'ajout de CDs dans la phase aqueuse. Si le soluté est complexé par la CD ajoutée, sa solubilité s'accroît et sa proportion dans la phase aqueuse augmente tandis que sa proportion dans la phase organique diminue. On peut donc traduire le pouvoir de complexation de la CD utilisée par la proportion de soluté déplacé de la phase organique vers la phase aqueuse.

Le protocole des expériences de partage et les calculs des proportions sont regroupés en annexe V.

Notons que cette méthode a déjà été utilisée avec des β -CDs sulfatées pour la mise au point d'une méthode de séparation des énantiomères du 7-des-méthyl-omeloxifène (DMO) par CPC [18]. En effet, c'est avec des expériences de partage comme celles-ci que les auteurs ont pu déterminer, à moindre coût, la composition du système biphasique générant un temps de rétention convenable tout en permettant la complexation du soluté par les CDs présentes dans la phase aqueuse, utilisée comme phase stationnaire. Notons qu'en CPC, la rétention d'un soluté dépend de son coefficient de partage entre les phases mobile et stationnaire. La rétention du DMO en CPC s'est révélée être en parfait accord avec les coefficients de partage déterminés à partir des expériences de partage en tubes.

De notre côté, nous avons pu constater ce bon accord entre coefficient de partage et rétention lors des tentatives que nous avons effectuées pour séparer les énantiomères du métoprolol en CPC en utilisant des SBE- β -CDs en tant que sélecteurs chiraux.

II.1.2. Présentation du système biphasique utilisé

Le système biphasique utilisé dans cette étude a été mis au point par Margraff pour la CPC [19]. Composé d'heptane, d'acétate d'éthyle (AcOEt), de méthanol et d'eau, ce système permet d'ajuster finement le partage d'un soluté en modifiant la composition de chacune des 2 phases de façon indépendante.

Dans les présents travaux, le méthanol a été remplacé par l'acétonitrile afin de se rapprocher des conditions des analyses CPL décrites au chapitre 3 où la séparation des énantiomères de ces mêmes solutés-test a été effectuée avec une phase mobile H₂O/ACN. De plus, les solutions de complexes seront infusées dans des mélanges H₂O/ACN, ce solvant organique s'étant révélé meilleur que le méthanol pour éviter la formation d'espèces dichargées ou de fragments en ESI-SM, comme décrit dans le chapitre 2.

Le tableau 4.1 regroupe certaines des propriétés des solvants utilisés lors de ces expériences de partage.

Tableau 4.1. Propriétés des solvants utilisés pour les expériences de partage. D'après [19, 20].

	Température d'ébullition (°C)	Polarité P' (selon Snyder)	Solubilité (% m/m)		Densité d ²⁰
			Solvant dans l'eau	Eau dans le solvant	
Heptane (H)	98	0,1	0,0003	0,01	0,67
AcOEt (Ae)	77	4,4	8,7	3,3	0,90
Acétonitrile (A)	82	5,8	∞	∞	0,79
Eau (E)	100	10,2	–	–	1

Les propriétés respectives de ces solvants sont telles que la phase aqueuse est la phase inférieure et est essentiellement composée d'eau (E) et d'acétonitrile (A) tandis que la phase organique est la phase supérieure et est essentiellement composée d'heptane (H) et d'AcOEt (Ae). La somme des proportions des deux solvants composant une phase a été arbitrairement fixée à 10 (par exemple, H/Ae/A/E 5/5/2/8). Comme énoncé précédemment, ce système biphasique présente l'avantage de permettre de fixer la composition de l'une des 2 phases et d'ajuster le coefficient de partage d'un soluté en jouant sur la composition de l'autre phase.

II.2. Etude du système biphasique

Avant de pouvoir comparer le pouvoir de complexation des différentes CDs utilisées vis-à-vis des deux solutés, il a été nécessaire d'optimiser au préalable la composition du système biphasique et de rechercher les conditions favorisant la complexation et facilitant sa mise en évidence.

II.2.1 Etude de l'influence de la composition de la phase organique sur le partage

L'influence de la composition de la phase organique heptane/AcOEt sur le partage des solutés a été étudiée avec une phase aqueuse de composition constante et dont la proportion ACN/H₂O a été fixée à 2/8. La composition des systèmes biphasiques sera donc H/Ae/A/E (X/Y/2/8). La DM- β -CD de DS 2,1 a été choisie pour cette étude car elle a été utilisée lors des travaux décrits au chapitre 3 pour séparer les énantiomères des solutés test.

La figure 4.1 montre les proportions de soluté dans la phase aqueuse en fonction de la proportion d'AcOEt dans la phase organique et ce, lorsque la phase aqueuse ne contient pas de CDs (histogrammes blancs) et lorsqu'elle en contient (histogrammes noirs).

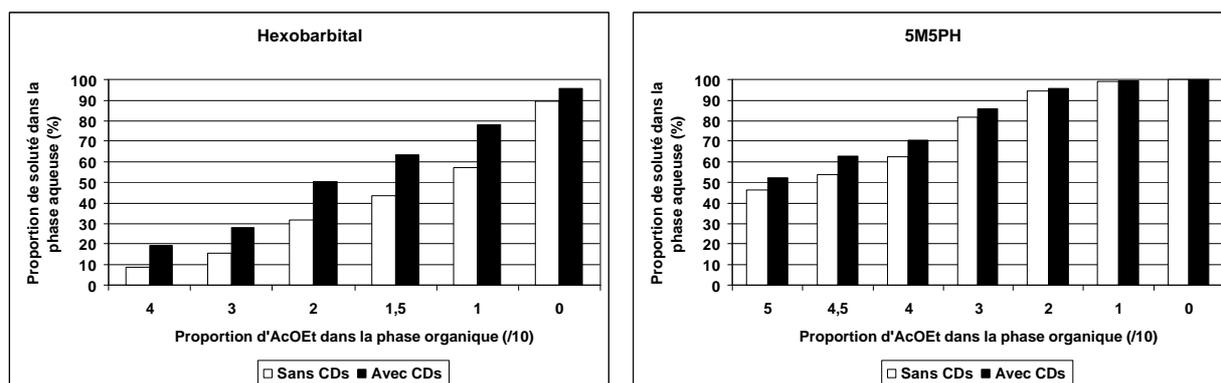


Figure 4.1. Influence de la composition de la phase organique sur le partage. Systèmes H/Ae/A/E (X/Y/2/8), DM- β -CD de DS 2,1.

Ainsi, on peut lire que lorsque la composition du système est H/Ae/A/E 8,5/1,5/2/8, la proportion d'hexobarbital dans la phase aqueuse est de 44% en l'absence de CDs et de 63% en présence de CDs.

On peut constater que lorsque la proportion d'AcOEt dans la phase organique diminue, la proportion de soluté dans la phase aqueuse augmente. Ainsi, lorsque la proportion d'AcOEt dans la phase organique passe de 4/10 à 0/10 (ce qui correspond aux systèmes H/Ae/A/E 6/4/2/8 et 10/0/2/8, respectivement), la proportion d'hexobarbital dans la phase aqueuse passe de 9 à 89% et celle de la 5M5PH passe de 62 à 100%. Cela s'explique par le fait que, pour les deux solutés, l'AcOEt est un bien meilleur solvant que l'heptane et que si sa proportion dans la

phase organique diminue, les solutés, moins solubles dans une phase organique enrichie en heptane, auront tendance à passer dans la phase aqueuse.

On peut voir qu'à systèmes biphasiques identiques, par exemple avec le système H/Ae/A/E 8/2/2/8, 32% de l'hexobarbital se trouve dans la phase aqueuse alors que la 5M5PH s'y trouve à 94%. Ceci est en accord avec le fait que l'hexobarbital est plus hydrophobe que la 5M5PH (tableau 3.1) et qu'il a donc une moins grande affinité pour la phase aqueuse.

On peut constater que, globalement, la proportion de soluté dans la phase aqueuse augmente lorsque l'on y rajoute la CD, ce qui se traduit sur la figure 4.1 par le fait que les histogrammes noirs sont plus grands que les histogrammes blancs. Ainsi, comme nous l'avons vu précédemment, avec le système H/Ae/A/E 8,5/1,5/2/8, la proportion d'hexobarbital dans la phase aqueuse est de 44% en l'absence de CDs et de 63% en présence de CDs. La différence entre ces deux valeurs, dans le cas présent 19%, est donc la proportion de soluté déplacé de la phase organique vers la phase aqueuse suite à l'ajout de CDs dans cette dernière. La complexation du soluté par les CDs augmente en effet sa solubilité dans la phase aqueuse et plus la complexation du soluté est importante, plus la proportion de soluté déplacé de la phase organique vers la phase aqueuse est grande. Cela permet d'évaluer le pouvoir complexant de la CD vis-à-vis du soluté étudié.

La figure 4.2 montre les proportions de soluté déplacé de la phase organique vers la phase aqueuse en fonction de la proportion d'AcOEt dans la phase organique. Ces histogrammes représentent donc la différence entre les histogrammes noirs et blancs de la figure 4.1.

On peut constater que la proportion de soluté déplacé (ou complexé) varie elle aussi avec la proportion d'acétate d'éthyle dans la phase organique. Ceci s'explique par le fait que, toute chose égale par ailleurs, la proportion de soluté complexé dépend de la proportion de soluté présent au sein de la phase aqueuse lorsque celle-ci ne contient pas de CDs. Avec le système H/Ae/A/E (6/4/2/8), moins de 10% d'hexobarbital se trouve initialement dans la phase aqueuse et la proportion de soluté complexé n'est alors que de 11%. Avec le système H/Ae/A/E (9/1/2/8), plus de 55% de l'hexobarbital se trouve initialement dans la phase aqueuse et la proportion de soluté complexé est alors supérieur à 20%.

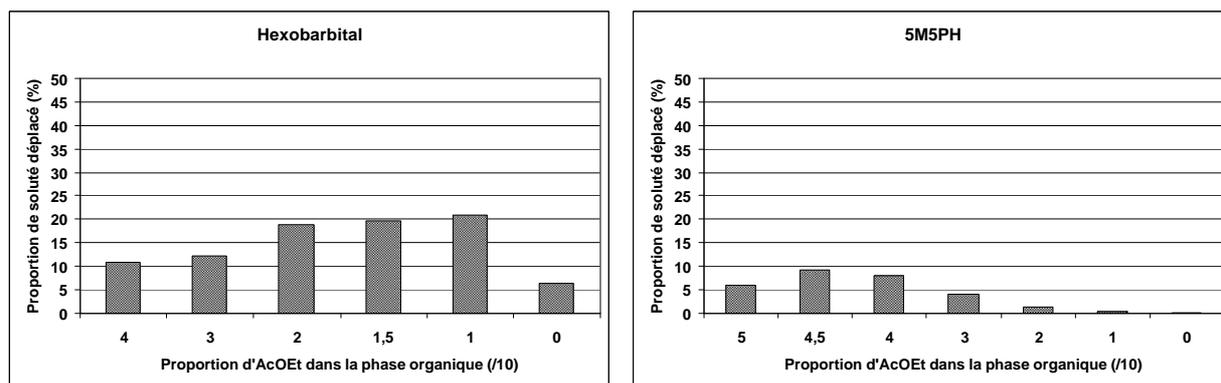


Figure 4.2. Influence de la composition de la phase organique sur la complexation.

Systèmes H/Ae/A/E X/Y/2/8, DM- β -CD de DS 2,1.

En résumé, si l'on veut une complexation importante, il faut qu'une quantité suffisante de soluté soit présent au sein de la phase aqueuse avant même l'ajout de CDs dans le système biphasique.

Mais cette quantité initiale ne doit pas être trop grande car si le soluté présente une trop grande affinité avec la phase aqueuse, sa proportion dans la phase organique sera faible et seule une petite proportion de soluté pourra être déplacée de cette phase vers la phase aqueuse. La complexation est alors impossible à quantifier comme le montre la 5M5PH lorsque la proportion d'acétate d'éthyle dans la phase organique passe de 2/10 à 0/10.

En résumé, on peut dire que même quand la composition de la phase aqueuse et la nature de la CD ajoutée sont constantes, le pourcentage de soluté complexé varie avec la proportion d'AcOEt dans la phase organique car celle-ci détermine la proportion de soluté initialement présent au sein de la phase aqueuse. Il semble préférable que cette dernière soit comprise entre 40 et 60% afin d'obtenir des proportions de soluté complexé suffisamment élevées.

II.2.2 Etude de l'influence de la composition de la phase aqueuse sur le partage

L'influence de la composition de la phase aqueuse sur le partage des solutés a ensuite été étudiée avec une phase organique de composition constante et dont la proportion heptane/acétate d'éthyle a été fixée à 8,5/1,5 pour l'hexobarbital et 5/5 pour la 5M5PH. Ces proportions ont été choisies car avec une phase aqueuse de composition identique (ACN/H₂O 2/8), elles permettent d'avoir une proportion de

soluté dans la phase aqueuse d'environ 45% pour les deux solutés (figure 4.1). Leurs complexations seront donc plus facilement comparables.

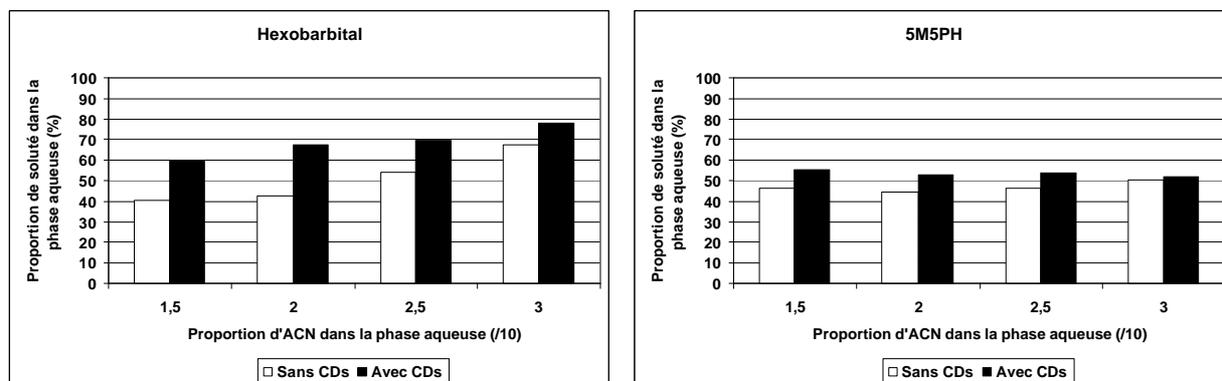


Figure 4.3. Influence de la composition de la phase aqueuse sur le partage. Systèmes H/Ae/A/E 8,5/1,5/X/Y pour l'hexobarbital et 5/5/X/Y pour la 5M5PH, DM- β -CD de DS 2,1.

La figure 4.3 montre que la proportion de soluté initialement présent dans la phase aqueuse (avant ajout de CDs) augmente avec le pourcentage d'ACN. L'ACN est en effet un meilleur solvant pour ces solutés que l'eau. Cette tendance est plus marquée avec l'hexobarbital.

La figure 4.4 montre que, globalement, les proportions de soluté déplacé diminuent lorsque la proportion d'ACN dans la phase aqueuse augmente. Contrairement à ce qui vient d'être décrit précédemment, le fait que la proportion de soluté présent initialement dans la phase aqueuse augmente ne semble pas être bénéfique à la complexation. Ceci s'explique par le fait qu'au sein de la phase aqueuse, l'ACN entre en compétition avec les solutés vis-à-vis de la cavité des CDs. De plus, lorsque la proportion d'ACN augmente, la polarité de la phase aqueuse diminue. La quantité de soluté pouvant être complexée est donc diminuée, situation analogue à l'influence du pourcentage d'ACN sur l'énantiosélectivité en CPL (chapitre 3).

Il est donc nécessaire, pour pouvoir comparer la complexation de différents solutés, de travailler avec des phases aqueuses de même composition.

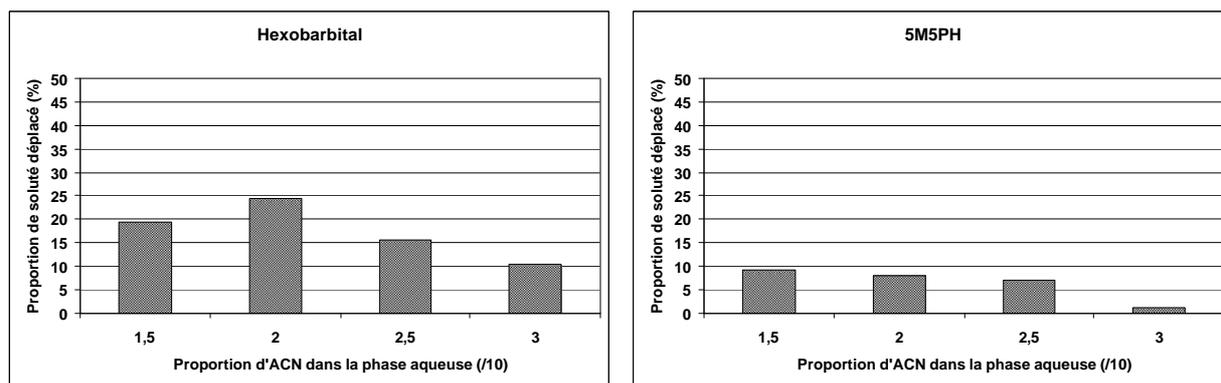


Figure 4.4. Influence de la composition de la phase aqueuse sur la complexation.

Système H/Ae/A/E 8,5/1,5/X/Y pour l'hexobarbital et 5/5/X/Y pour la 5M5PH, DM- β -CD de DS 2,1.

Au terme de cette étude sur l'influence de la composition de chacune des phases du système biphasique, on peut conclure que comparer la complexation de différents solutés peut se faire à deux conditions :

(i) Le partage des solutés avant ajout de CDs doit être comparable, autrement dit, les proportions de solutés initialement présents au sein de la phase aqueuse doivent être similaires et de préférence comprises entre 40 et 60% afin d'amplifier les proportions de solutés complexés.

(ii) Les phases aqueuses doivent avoir la même composition.

Ces 2 conditions permettent de mieux comprendre les avantages du système H/Ae/A/E pour ce genre d'étude. Les compositions des systèmes biphasiques H/Ae/A/E utilisés pour la suite de l'étude seront donc (8,5/1,5/2/8) pour l'hexobarbital et (5/5/2/8) pour la 5M5PH.

II.2.3 Etude de l'influence de la quantité de CDs ajoutée sur le partage

L'influence de la quantité de CDs ajoutée a été étudiée en utilisant les systèmes biphasiques dont la composition a été précédemment définie. La figure 4.5 montre les résultats obtenus et permet d'avoir une première évaluation de la répétabilité des expériences. En effet, le système biphasique étant le même quelque soit la quantité de CDs ajoutée, la proportion de soluté présent dans la phase aqueuse sans CDs doit être la même.

On peut constater sur la figure 4.5 que cette proportion varie peu et qu'elle est bien comprise entre 40 et 50% pour les deux solutés.

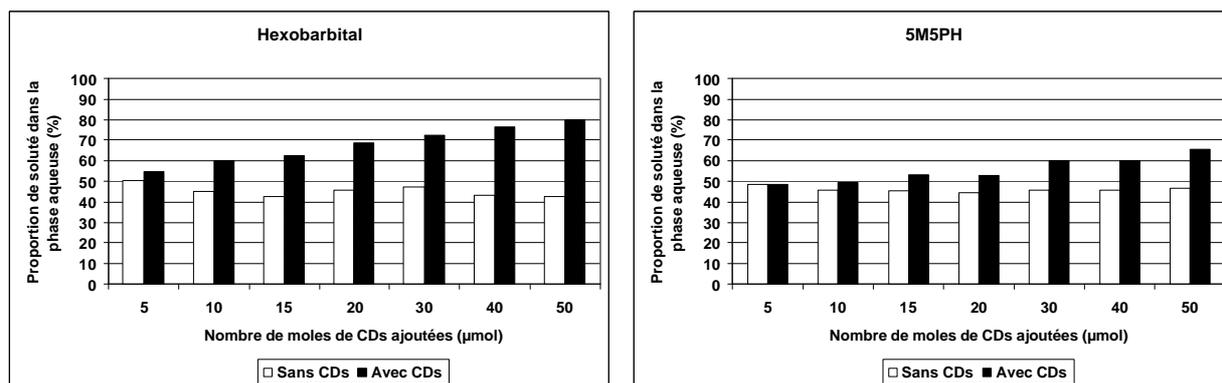


Figure 4.5. Influence de la quantité de CDs ajoutée sur le partage.

Système H/Ae/A/E 8,5/1,5/2/8 pour l'hexobarbital et 5/5/2/8 pour la 5M5PH, DM- β -CD de DS 2,1.

La figure 4.6 montre que la quantité de soluté complexé augmente avec la quantité de CDs ajoutée dans la phase aqueuse. Cette tendance est celle généralement observée lors des études de solubilité d'un composé en présence de CDs. Les irrégularités des courbes peuvent s'expliquer par la difficulté de peser des masses de l'ordre de la dizaine de milligrammes. Une amélioration possible de la méthode consisterait à ajouter les CDs sous forme de solution, avec une pipette de précision, ces solutions devant toutefois être assez concentrées pour ne pas modifier le volume de façon significative.

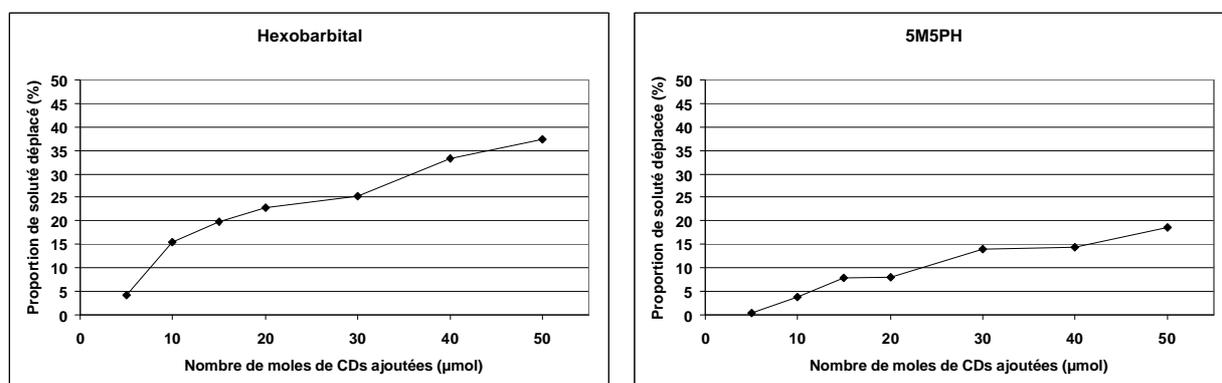


Figure 4.6. Influence de la quantité de CDs ajoutées sur la complexation des solutés.

Système H/Ae/A/E 8,5/1,5/2/8 pour l'hexobarbital et 5/5/2/8 pour la 5M5PH, DM- β -CD de DS 2,1.

Maintenant que nous connaissons les principaux paramètres ayant une influence sur la complexation (composition du système biphasique et quantité de CDs ajoutée), nous pouvons comparer la complexation des deux solutés par différentes Me- β -CDs dans les conditions optimisées pour chacun des solutés.

II.3. Etude de l'influence du degré de substitution (DS) des Me-b-CDs sur la complexation

Après avoir déterminé les différents paramètres pouvant influencer la complexation, l'influence du DS des Me- β -CDs sur la complexation des deux solutés a été étudiée afin d'avoir un moyen de contrôle des expériences effectuées en ESI-SM.

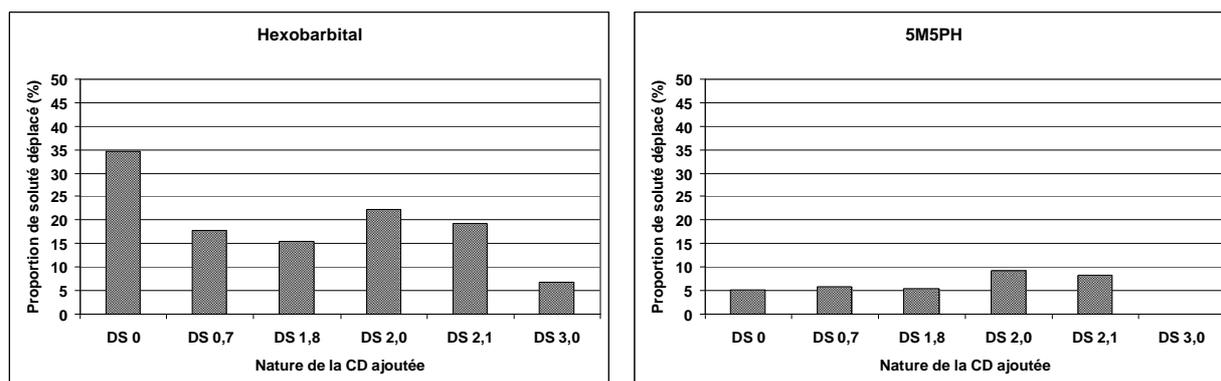


Figure 4.7. Influence du DS des Me-b-CDs sur la complexation.

Système H/Ae/A/E 8,5/1,5/2/8 pour l'hexobarbital et 5/5/2/8 pour la 5M5PH.

La figure 4.7 montre que la complexation varie avec la nature des CDs et qu'elle n'est pas la même pour les 2 solutés. Notons que les expériences effectuées avec la β -CD native (DS 0) sont difficilement exploitables car celle-ci a montré une solubilité non négligeable dans les phases organiques utilisées. On peut constater que pour les deux solutés, la complexation diminue dans l'ordre DS 2,0 > DS 2,1 > DS 0,7 > DS 1,8. Toutefois, il faudrait effectuer un plus grand nombre d'expériences pour confirmer cet ordre. Seule la TM- β -CD (DS 3) se distingue nettement par une complexation plus faible, voire nulle dans le cas de la 5M5PH. Mais quelque soit la CD utilisée, la complexation de l'hexobarbital est toujours supérieure à celle de la 5M5PH.

Afin de confirmer ce résultat, la complexation des 2 solutés a été à nouveau déterminée avec deux DM- β -CDs, celles de DS 1,8 et 2,1, utilisées dans le chapitre 3. Cinq essais ont été effectués pour chacun des solutés avec chacune de ces DM- β -CDs.

La figure 4.8 montre clairement que l'hexobarbital est plus complexé par la DM- β -CD de DS 2,1 que par celle de DS 1,8. En effet, en moyenne, la proportion d'hexobarbital complexé par la première est de 23% tandis qu'avec la deuxième cette proportion est de 14%.

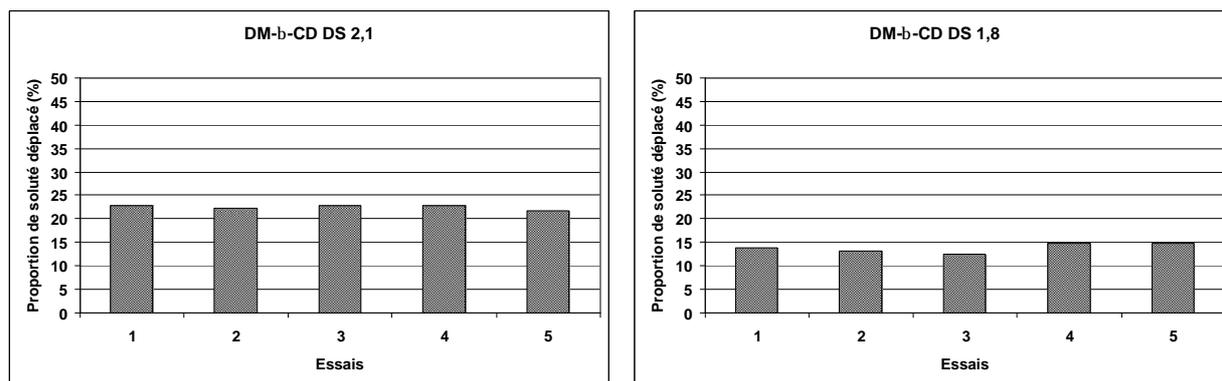


Figure 4.8. Répétabilité de la complexation de l'hexobarbital.

Système H/Ae/A/E 8,5/1,5/2/8, DM-β-CD de DS 2,1 et 1,8.

La figure 4.9 montre que comme l'hexobarbital, la 5M5PH est plus complexée par la DM-β-CD de DS 2,1 que par celle de DS 1,8. En effet, en moyenne, la proportion de 5M5PH complexée par la première est de 8% tandis qu'avec la deuxième cette proportion est de 5%.

Cette dernière valeur est à prendre avec précaution car les différents essais donnent des résultats assez variables, ce qui peut s'expliquer par la faible proportion de soluté complexé.

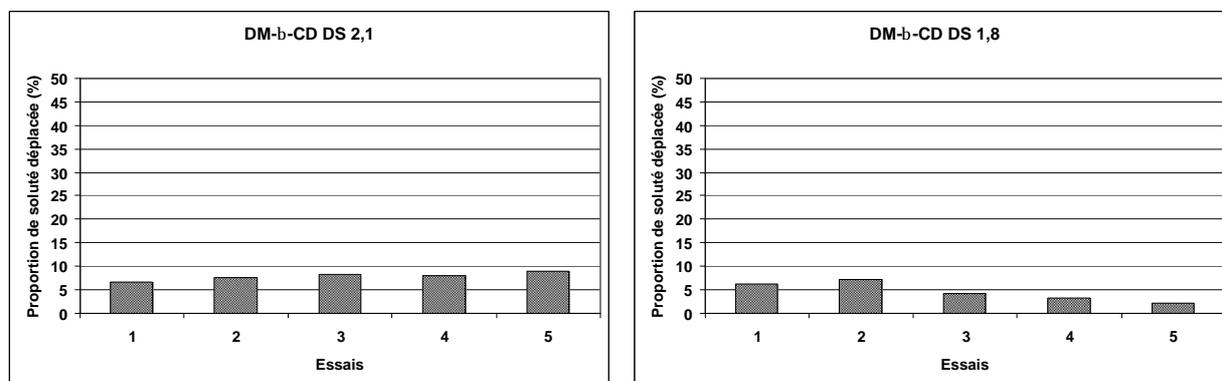


Figure 4.9. Répétabilité de la complexation de la 5M5PH.

Système H/Ae/A/E 5/5/2/8, DM-β-CD de DS 2,1 et 1,8.

II.4. Conclusions

Ces expériences de partage ne peuvent certes pas rivaliser avec l'élaboration d'un diagramme de solubilité pour l'étude quantitative précise de la complexation, toutefois, elles sont suffisantes pour évaluer rapidement, simplement et de façon peu

onéreuse le pouvoir complexant d'une CD vis-à-vis d'un soluté donné avec une précision satisfaisante.

L'étude des paramètres influençant le partage a permis de déterminer des systèmes biphasiques permettant de pouvoir comparer la complexation des deux solutés avec différentes Me- β -CDs.

Il ressort de ces expériences que quelque soit le DS, l'hexobarbital est plus complexé que la 5M5PH, ce qui confirme les résultats obtenus au chapitre 3.

Dotés de ces résultats, nous pouvons maintenant commencer l'étude des complexes par ESI-SM.

III. ETUDE DES COMPLEXES PAR ESI-SM

Avant de commencer l'étude des complexes par ESI-SM et d'infuser des solutions contenant les CDs et les solutés, nous avons préalablement analysé les CDs seules afin de déterminer la nature des ions générés par chacune d'elles.

III.1. Analyse ESI-SM des CDs seules

L'analyse ESI-SM des CDs a été réalisée sur le spectromètre Sciex avec la méthode mise au point lors de la caractérisation de la Me- β -CD de DS 0,7 (chapitre 2). Seuls deux réglages du spectromètre ont été modifiés, le débit a été réduit de 50 à 10 μ L/min afin de limiter une éventuelle pollution du spectromètre et la température de la source a été réduite de 200 à 100°C.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, les groupes hydroxyles des CDs sont difficilement protonables ou déprotonables et il est préférable pour obtenir des signaux intenses en mode d'ionisation positive d'effectuer leur analyse en présence de sels d'ammonium. De plus, lors d'analyses ESI-SM de complexes CDs-acides aminés, il a été montré que l'acétate d'ammonium permettait de limiter la formation de complexes non spécifiques (autrement dit d'adduits électrostatiques) de stoechiométrie 1:2, 2:1 ou 2:3 [9]. L'infusion des solutions de CDs puis celle des solutions de complexes ont donc été menées en présence d'acétate d'ammonium.

Les conditions expérimentales détaillées, produits et matériels utilisés sont regroupés en annexe V. Les rapports m/z des différentes espèces détectées sont regroupés en annexe VI.

III.1.1. Influence du degré de substitution des CDs sur les signaux obtenus

Pour juger de l'influence du DS sur les signaux obtenus, nous avons choisi quatre CDs couvrant toute la gamme de DS : la β -CD native, la Me- β -CD de DS 0,7, la DM- β -CD de DS 1,8 et la TM- β -CD de DS 3. Afin de rester proche des conditions des expériences de partage et des analyses effectuées en CPL (chapitre 3), les solutions infusées ont été préparées dans un mélange H_2O/ACN (80/20). Les différentes CDs étudiées ont été analysées à une concentration de 50 μM dans les mêmes conditions (les réglages de la source ESI étant fixés) afin de voir les espèces générées pour chacune d'elle.

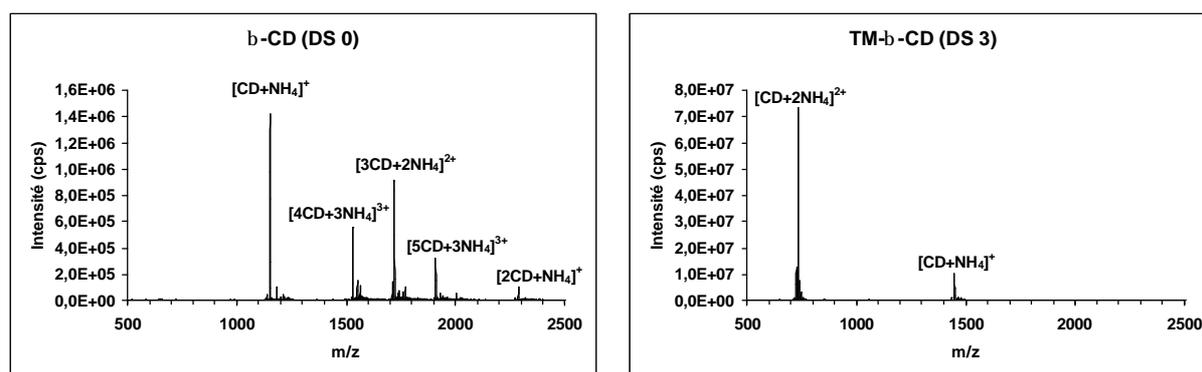


Figure 4.10. Spectres ESI-SM de la β -CD (DS 0) et de la TM- β -CD (DS 3).
Conditions : H_2O/ACN (80/20), $[CD] = 50 \mu M$, $[NH_4CH_3CO_2] = 5 mM$, débit : 10 $\mu L/min$.

La figure 4.10 montre les spectres ESI-SM de la β -CD native (DS 0) et de la TM- β -CD (DS 3). On peut constater que malgré des conditions d'analyse identiques, les spectres obtenus sont très différents, de même que l'intensité des pics.

Le spectre de la β -CD native montre plusieurs pics correspondant à des agrégats de CDs et d'ions ammonium et il n'y a pas de pic correspondant à la CD dichargée $[CD+2NH_4]^{2+}$. Au contraire, sur le spectre de la TM- β -CD, aucun agrégat de CDs n'est détecté mais on note la présence du pic correspondant à la CD dichargée $[CD+2NH_4]^{2+}$, dont l'intensité est supérieure à celui de la CD monochargée $[CD+NH_4]^+$.

Comme précédemment effectué lors de la caractérisation de la Me- β -CD de DS 0,7 (chapitre 2), nous avons effectué le rapport de l'intensité des différents ions détectés sur l'intensité de l'ion correspondant à la CD monochargée. Cela permet de déterminer l'intensité relative des ions gênants par rapport aux ions que l'on souhaite obtenir seuls, ceux correspondant aux CDs monochargées $[\text{CD}+\text{NH}_4]^+$.

La figure 4.11 montre l'évolution de ces intensités relatives en fonction du DS des CDs infusées.

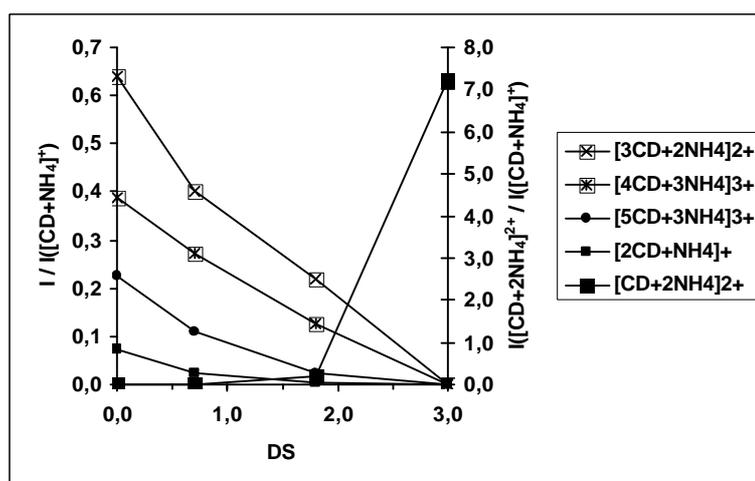


Figure 4.11. Influence du DS des CDs sur les espèces détectées en ESI-SM. Mêmes conditions que la figure 4.10.

La figure 4.11 montre que lorsque le DS des Me- β -CDs augmente, les intensités relatives des différents agrégats de CDs diminuent tandis que celle des CDs dichargées augmente.

On peut penser que la formation des agrégats est due aux liaisons hydrogène intermoléculaires s'établissant entre les groupes hydroxyle des CDs pendant le processus d'ionisation. En effet, lorsque ces groupes sont en grand nombre, comme dans la β -CD native, la formation d'agrégats est favorisée. Puis, lorsque le DS augmente, autrement dit lorsque les groupes hydroxyle sont peu à peu remplacés par des groupes méthyle, la formation de ces agrégats est réduite.

A l'inverse, l'intensité relative des CDs dichargées augmente avec le DS. Cette tendance peut s'expliquer par la différence de basicité des groupes hydroxyle et méthoxy. Ces derniers sont en effet plus basiques [21] et les CDs les plus substituées auront donc une plus grande affinité pour les ions NH_4^+ . C'est aussi ce

qui explique la plus grande intensité des pics détectés avec la TM- β -CD par rapport à la β -CD native (figure 4.10).

Il est donc nécessaire de trouver les conditions d'infusion permettant de former des ions de même nature sinon les spectres des solutions de complexes seront difficiles à interpréter et à comparer.

III.1.2. Influence de la concentration en CD

Nous avons voulu déterminer l'influence de la concentration en CDs sur les intensités relatives des différentes espèces détectées sur les spectres. Pour cela, la β -CD native et de la DM- β -CD de DS 1,8 ont été analysées à différentes concentrations dans les solutions infusées. La figure 4.12 montre l'évolution des intensités relatives en fonction de la concentration en CDs.

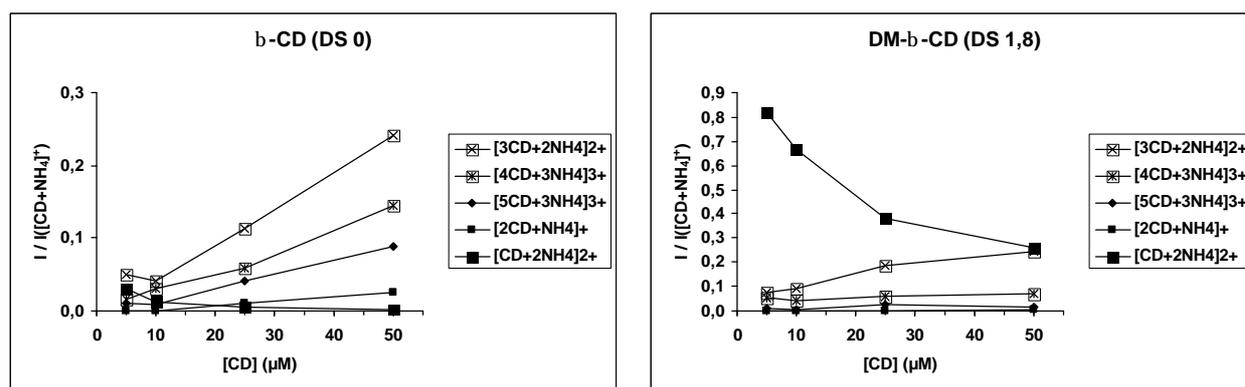


Figure 4.12. Influence de la concentration en CDs sur les espèces détectées en ESI-SM.

Conditions : H_2O/ACN (80/20), $[NH_4CH_3CO_2] = 5$ mM, débit : 10 $\mu L/min$.

Les tendances observées sont les mêmes avec les deux CDs étudiées : lorsque leur concentration diminue de 50 à 5 μM , l'intensité relative des agrégats de CDs diminue, ce que l'on peut expliquer par la plus grande difficulté à établir des liaisons hydrogène lorsque les CDs sont diluées et donc plus éloignées les unes des autres en solution. A l'inverse, l'intensité relative des CDs dichargées augmente lorsque la concentration de CDs diminue.

Devant ces résultats, nous avons décidé, pour la suite de l'étude, de travailler à des concentrations en CDs de 10 μM car cette concentration semble être un bon compromis entre le besoin de limiter la formation des agrégats de CDs et la

nécessité d'obtenir un signal assez intense. Toutefois, avec la DM- β -CD de DS 1,8, cette concentration donne lieu à une importante formation de CDs dichargées. Nous avons donc étudié l'influence du sel sur la formation de ces espèces.

III.1.3. Influence de la concentration en sel

Afin de déterminer l'influence de la concentration en acétate d'ammonium dans la solution infusée, la DM- β -CD de DS 1,8 a été analysée en présence d'une concentration en sel variant de 1 à 10 mM.

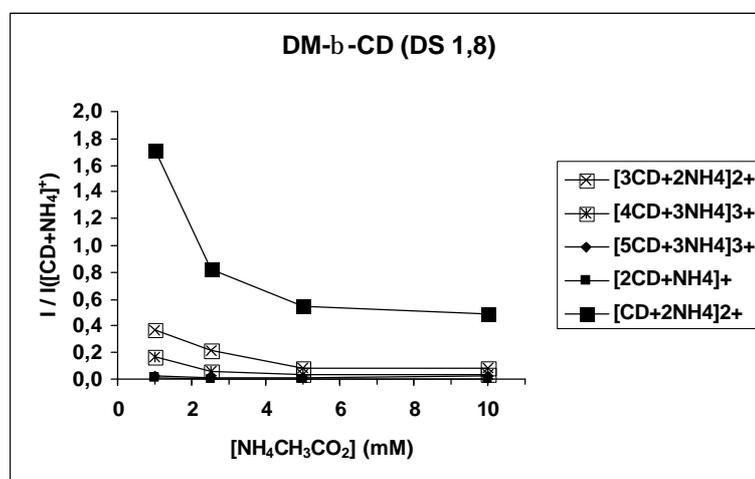


Figure 4.13. Influence de la concentration en acétate d'ammonium sur les espèces formées en SM.

Conditions : H₂O/ACN (80/20), [CD] = 10 μ M, débit : 10 μ L/min.

La figure 4.13 montre que lorsque la concentration en sel augmente, l'intensité relative des CDs dichargées diminue, tout comme celle des agrégats de CDs. Comme énoncé précédemment, l'acétate d'ammonium permet bien de limiter la formation des adduits électrostatiques. Toutefois, entre 5 et 10 mM, la variation est faible. Les concentrations supérieures n'ont donc pas été testées car on sait de plus qu'elles entraînent une diminution de l'intensité des pics d'intérêt (chapitre 2, partie B, paragraphe II.4.3). Ainsi, l'intensité du pic principal de CD monochargée passe de 300000 cps à 230000 cps entre 1 et 10 mM de sel.

L'analyse des solutions de complexes a donc finalement été entreprise avec des solutions H₂O/ACN (80/20) contenant la CD étudiée à une concentration de 10 μ M et une concentration en sel de 10 mM. Dans la suite des travaux, aucun agrégat

de CDs ne sera plus rencontré. Par contre, il subsiste sur les spectres des pics correspondant aux CDs dichargées. La formation de celles-ci aurait pu être limitée en augmentant la proportion d'ACN, comme nous l'avons vu au chapitre 2 (figure 2.15) mais nous avons tenu à rester dans des conditions les plus proches possibles de celles du chapitre 3 et des expériences de partage.

III.2. Analyses ESI-SM des complexes de CDs

Le début de l'étude des complexes de CDs par ESI-SM a été réalisé sur le spectromètre Sciex. Malheureusement, les résultats obtenus se sont montrés peu répétables, sans doute à cause des pollutions générées par l'utilisation du spectromètre pour les analyses de routine. Les travaux ont donc été repris sur le spectromètre Micromass qui s'est avéré plus fiable et plus sensible. Seuls les résultats obtenus sur ce dernier seront présentés.

Notons que lors de cette étude préliminaire sur le spectromètre Sciex, aucun des deux solutés, l'hexobarbital et la 5M5PH, n'a été détecté dans les conditions d'analyse choisies.

Les analyses effectuées sur le spectromètre Micromass ont été entreprises en utilisant la DM- β -CD de DS 2,1. Cette CD a été choisie, d'une part pour son profil de substitution étroit (principalement deux dérivés, portant 14 et 15 groupes méthyle), et d'autre part pour son DS, situé en milieu de gamme. Plusieurs séries d'analyses ont été réalisées en infusant des solutions H₂O/ACN (80/20) contenant 10 mM d'acétate d'ammonium, 10 μ M de DM- β -CD de DS 2,1 et les deux solutés en concentrations égales.

Les conditions expérimentales détaillées, produits et matériels utilisés sont regroupés en annexe V.

III.2.1 Influence de la stoechiométrie des solutions infusées

Afin de déterminer les conditions d'analyse facilitant la détection des complexes, les premières analyses ont consisté à infuser des solutions contenant une concentration fixe de DM- β -CD (10 μ M) et une concentration variable de solutés (les deux solutés ayant chacun une concentration de 5, 10, 25, 50 ou 100 μ M). La

figure 4.14 montre les spectres obtenus pour des concentrations en solutés de 10, 50 et 100 μM , autrement dit des solutions de stoechiométrie CD-M-H 1:1:1, 1:5:5, 1:10:10.

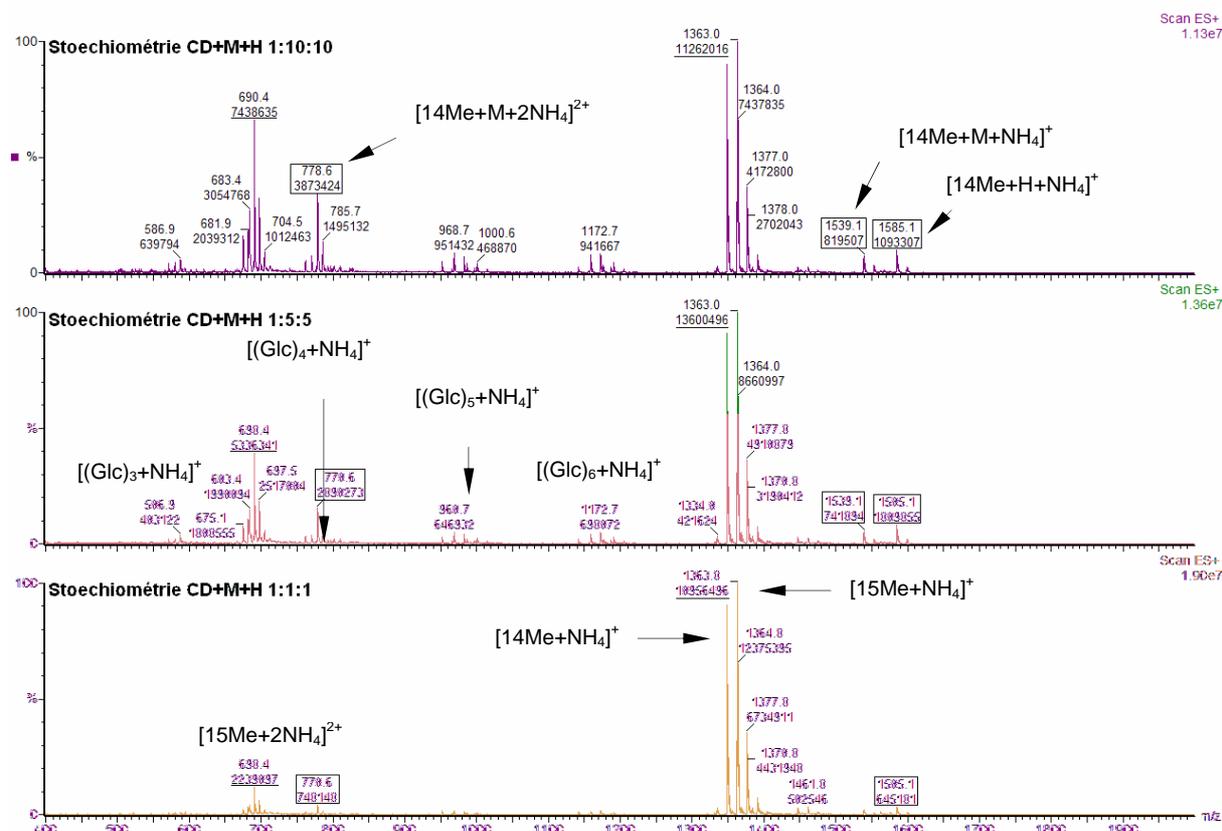


Figure 4.14. Influence de la stoechiométrie des solutions infusées.

Conditions : $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (80/20), $[\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2] = 10 \text{ mM}$, $[\text{DM-}\beta\text{-CD}] = 10 \mu\text{M}$, débit : $20 \mu\text{L}/\text{min}$; tension de cône : 35 V. Les pics sont signalés par leurs rapports m/z et leurs intensités absolues. M : 5M5PH, H : hexobarbital.

Les rapports m/z des différents adduits ammonium détectés sont regroupés en annexe VI. Sur le spectre du bas, on peut observer les pics correspondant aux DM- β -CDs monochargées, dont le dérivé majoritaire est celui portant 15 groupes méthyle ($[15\text{Me}+\text{NH}_4]^+$) à m/z 1363,0 ainsi que les pics correspondant aux DM- β -CDs dichargées dont le plus intense est aussi celui du dérivé portant 15 groupes méthyle ($[15\text{Me}+2\text{NH}_4]^{2+}$) à m/z 690,4.

Sur le spectre du milieu sont désignés les pics correspondant à des fragments de CDs, obtenus par perte séquentielle d'unités glucose ($[(\text{Glc})_n+\text{NH}_4]^+$). Tous ces pics, ou leurs équivalents, ont déjà été observés lors de l'analyse ESI-SM de la Me- β -CD de DS 0,7 (chapitre 2, figure 2.14).

Mais sur les spectres présentés ici, obtenus avec des solutions contenant de la 5M5PH et de l'hexobarbital, on peut observer des pics supplémentaires

correspondant aux complexes CD-solutés (valeurs encadrées). Ainsi, sur le spectre du haut, les pics désignés correspondent au complexe CD-hexobarbital ($[14\text{Me}+\text{H}+\text{NH}_4]^+$), détecté à m/z 1585,1, au complexe CD-5M5PH ($[14\text{Me}+\text{M}+\text{NH}_4]^+$), à m/z 1539,1 et au complexe CD-5M5PH dichargé ($[14\text{Me}+\text{M}+2\text{NH}_4]^{2+}$) à m/z 778,6. Notons que ces complexes, impliquant le dérivé portant 14 groupes méthyle, sont plus intenses que ceux impliquant le dérivé portant 15 groupes méthyle, pourtant majoritaire au sein du mélange de DM- β -CDs.

Précisons tout de suite que nous ne pouvons pas encore déterminer si ces complexes sont bien des complexes d'inclusion (ou complexes spécifiques) ou si ce ne sont que des adduits électrostatiques (complexes non spécifiques). Notons toutefois que malgré une concentration croissante en solutés et jusqu'à dix fois supérieure à celle de la CD, aucun complexe CD-soluté de stoechiométrie 1:2 ou 1:3 n'apparaît, ce qui est pour certains auteurs une indication de la spécificité des complexes détectés [8, 16]. Notons d'ailleurs que l'intensité absolue des complexes varie peu entre les stoechiométries 1:5:5 et 1:10:10.

On peut voir sur la figure 4.14 que lorsque la concentration en solutés augmente, les intensités relatives et absolues des complexes, des fragments et des espèces dichargées augmentent, en particulier celle du complexe CD-5M5PH dichargé. Au contraire, le complexe CD-hexobarbital dichargé ($[14\text{Me}+\text{H}+2\text{NH}_4]^{2+}$), qui devrait se trouver à m/z 801,7, n'apparaît pas. Dans ces conditions, il n'est pas possible de comparer les intensités des complexes monochargés et de déterminer lequel de ces complexes est le plus intense. Notons d'ores et déjà que ces deux complexes n'ont pas la même tendance à former des dichargés.

Pour la suite de l'étude, nous avons donc décidé de garder une stoechiométrie 1:5:5 afin d'obtenir des pics de complexes ayant une intensité assez grande, et de modifier la tension de cône afin de tenter de limiter la formation d'espèces dichargées, en particulier le complexe CD-5M5PH dichargé.

III.2.2 Influence de la tension de cône

L'influence de la tension de cône a été étudiée avec la solution précédemment définie, H₂O/ACN (80/20) contenant 10 mM d'acétate d'ammonium, 10 μM de DM- β -

CD (DS 2,1) et 50 μM de chacun des solutés. La tension de cône a été modifiée de 35 à 135 V par pas de 20 V. La figure 4.15 montre les spectres obtenus avec une tension de cône de 55, 95 et 135 V.

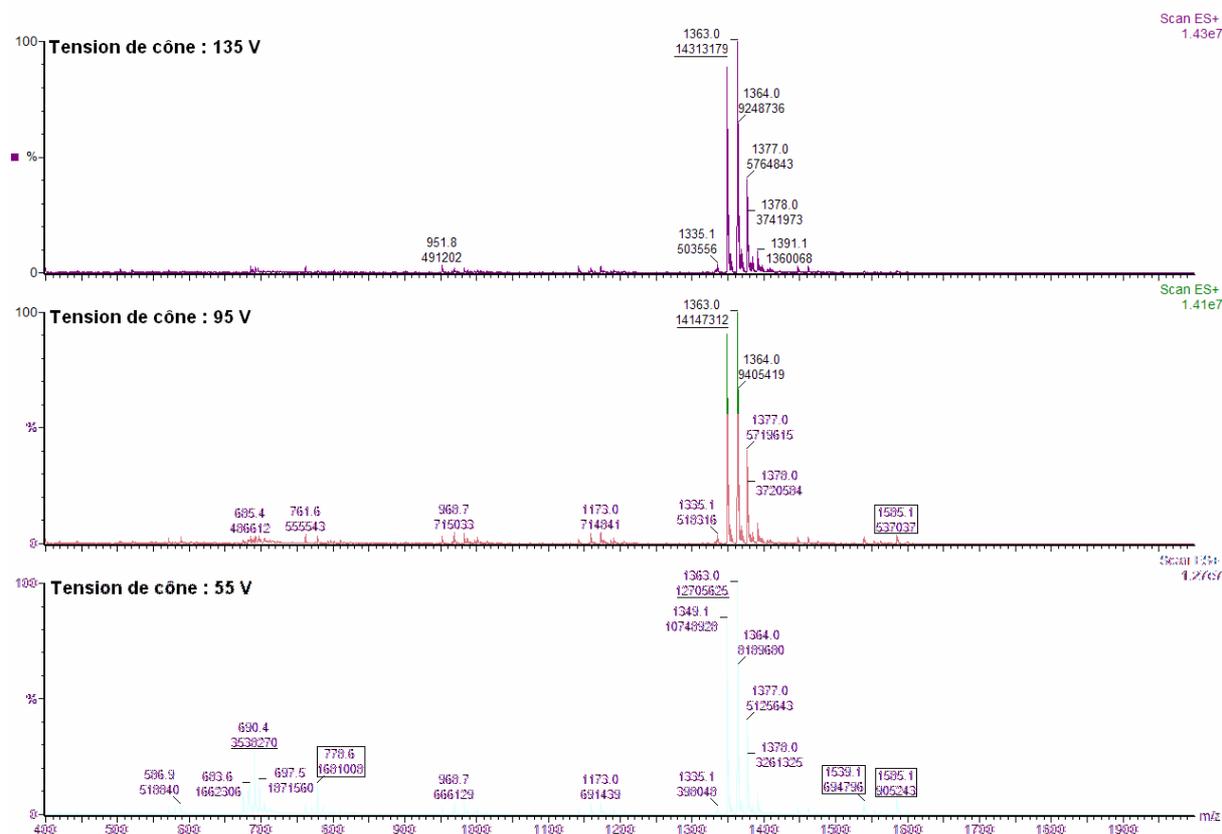


Figure 4.15. Influence de la tension de cône.

Conditions : $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (80/20), $[\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2] = 10 \text{ mM}$, $[\text{DM-}\beta\text{-CD}] = 10 \mu\text{M}$, $[\text{5M5PH}] = [\text{Hexobarbital}] = 50 \mu\text{M}$; débit : 20 $\mu\text{L}/\text{min}$.

La figure 4.15 montre que lorsque la tension de cône augmente, les intensités relatives et absolues des espèces dichargées, dont le complexe CD-5M5PH, diminuent, ce qui devrait permettre une comparaison plus juste des intensités relatives des complexes monochargés. Malheureusement, celles-ci diminuent aussi et à partir de 95 V, le signal des complexes est trop peu intense, ce qui interdit une augmentation trop grande de la tension de cône pour supprimer les espèces dichargées.

Notons que le potentiel d'orifice des interfaces ESI à rideau de gaz, que l'on peut comparer à la tension de cône du spectromètre employé pour cette étude, est utilisée par plusieurs auteurs pour vérifier la spécificité des complexes détectés en détruisant les adduits électrostatiques [7] ou pour comparer les stabilités relatives de plusieurs complexes en suivant leurs dissociations [7, 8]. Cette comparaison n'est

pas possible dans le cas présent à cause, une fois de plus, de la présence du complexe CD-5M5PH dichargé.

Afin de pouvoir observer facilement les pics correspondant aux complexes, la tension de cône a été fixée pour la suite de l'étude à 55 V. L'influence du débit d'infusion a été étudiée afin de voir si ce paramètre pouvait permettre, comme nous l'avons vu au chapitre 2 (figure 2.16), d'augmenter le signal des CDs (et des complexes) tout en diminuant celui de fragments et autres espèces gênantes.

III.2.3. Influence du débit d'infusion

Cette étude a été menée avec la même solution que précédemment. Le débit d'infusion a été fixé à 5, 10, 20 et 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. La figure 4.16 montre les spectres obtenus avec un débit de 10, 20 et 50 $\mu\text{L}/\text{min}$.

On peut constater que lorsque le débit d'infusion augmente, les intensités relatives et absolues des fragments et des espèces dichargées diminuent, comme on a déjà pu le constater au chapitre 2 avec la Me- β -CD de DS 0,7. Au contraire, les intensités des deux complexes monochargés augmentent en particulier celle du complexe CD-5M5PH, ce qui est corrélé avec le fait que son homologue dichargé tend à disparaître. Ceci permet d'envisager une comparaison plus juste des intensités des deux complexes monochargés.

Toutefois, même à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, on peut constater que le complexe CD-5M5PH dichargé est toujours présent. De plus, des débits d'infusion élevés font courir le risque d'une plus grande pollution du spectromètre. Enfin, selon plusieurs auteurs, il est préférable pour éviter la formation de complexes non spécifiques de travailler à faibles débits [15, 16].

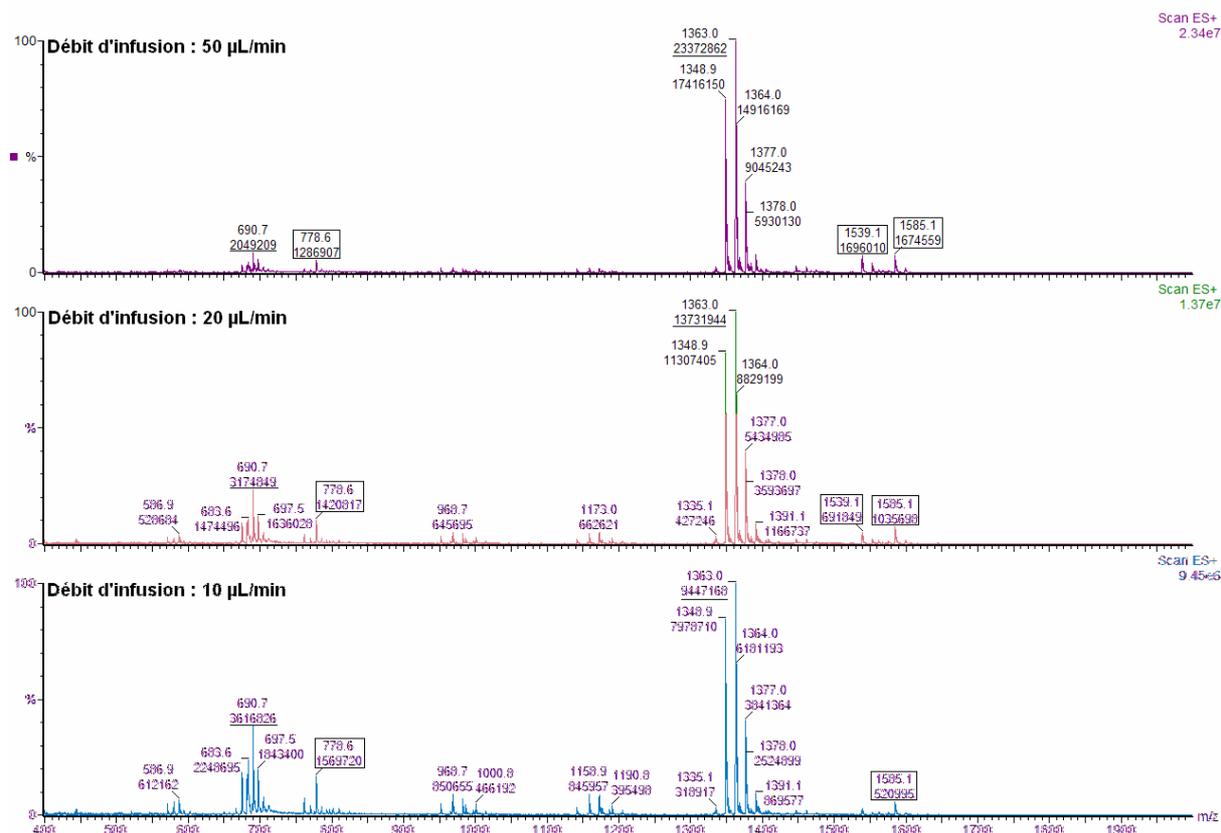


Figure 4.16. Influence du débit d'infusion.

Conditions : H₂O/ACN (80/20), [NH₄CH₃CO₂] = 10 mM, [DM-β-CD] = 10 µM, [5M5PH] = [Hexobarbital] = 50 µM ; tension de cône : 55 V.

Nous avons donc préféré maintenir le débit d'infusion à une valeur de 20 µL/min et avons décidé de modifier le pourcentage d'ACN dans les solutions infusées afin de supprimer les espèces dichargées, en particulier le complexe CD-5M5PH dichargé.

III.2.4. Influence de la proportion d'acétonitrile

Jusqu'à maintenant, la proportion d'ACN dans les solutions infusées a été maintenue à 20% afin d'être dans des conditions proches des expériences de partage et des analyses CPL (chapitre 3). Mais jusque-là, les paramètres étudiés n'ont pas permis de supprimer le complexe CD-5M5PH dichargé. Nous avons donc augmenté la proportion d'ACN car nous avons vu dans le chapitre 2 (figure 2.15) que cela permettait de diminuer la formation d'espèces dichargées. Une série de solutions a donc été préparée avec des proportions d'ACN de 0, 10, 20, 40 et 80%.

La figure 4.17 montre les spectres obtenus avec une proportion d'ACN de 20, 40 et 80%.

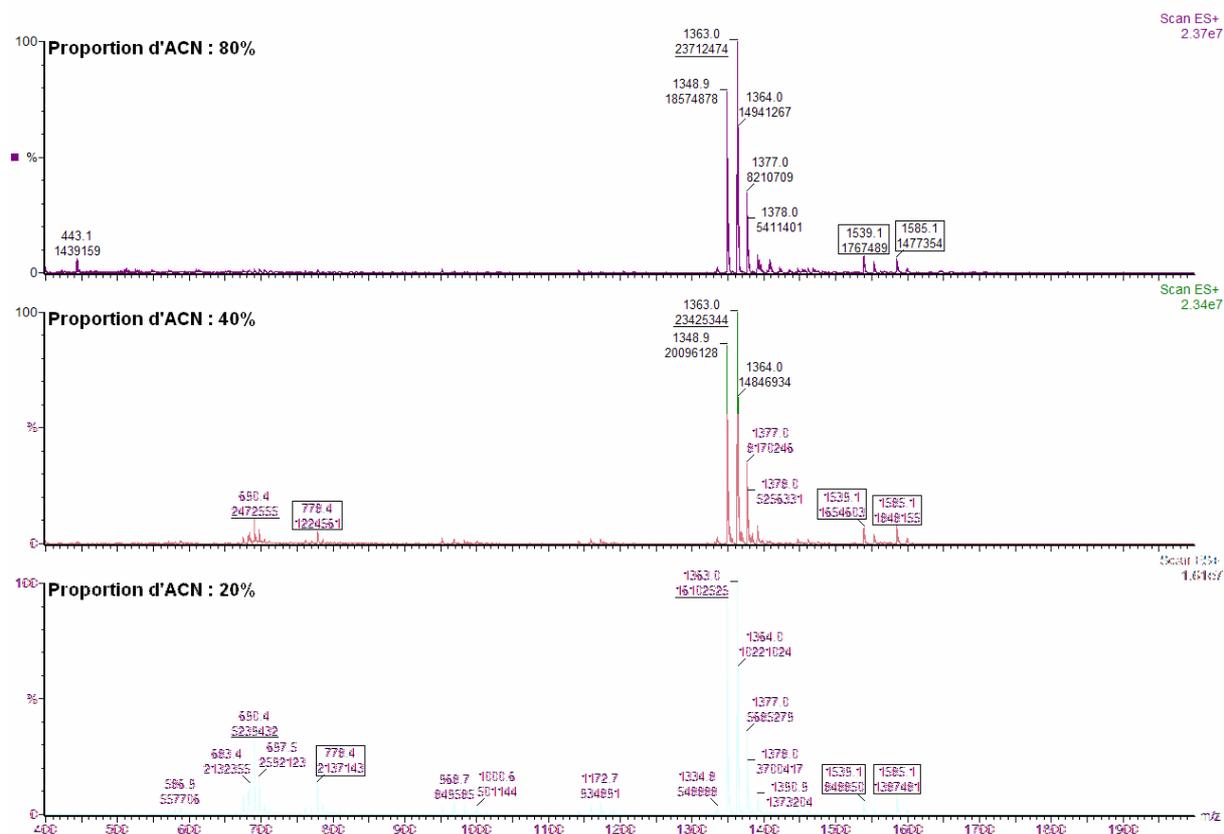


Figure 4.17. Influence de la proportion d'acétonitrile.

Conditions : H₂O/ACN, [NH₄CH₃CO₂] = 10 mM, [DM-β-CD] = 10 μM, [5M5PH] = [Hexobarbital] = 50 μM ; tension de cône : 55 V ; débit : 20 μL/min.

On peut constater que, comme attendu, lorsque la proportion d'ACN dans la solution infusée augmente, les fragments et les espèces dichargées disparaissent du spectre, ce qui est bénéfique pour une comparaison plus juste de l'intensité des complexes monochargés. On peut d'ailleurs constater lorsque cette proportion atteint 80% que pour la première fois, le complexe CD-5M5PH est plus intense que le complexe CD-hexobarbital, ce qu'il n'était pas possible de vérifier en présence du complexe CD-5M5PH dichargé. De plus, l'intensité relative des complexes augmente avec la proportion d'ACN, tout comme leurs intensités absolues.

Etant enfin parvenus à supprimer les espèces gênant la comparaison des intensités des complexes monochargés, nous avons pu analyser les solutions des différentes CDs étudiées en présence des deux solutés.

III.2.5. Etude des différentes CDs

Ces analyses ont été effectuées avec des solutions de composition H₂O/ACN (20/80) contenant 10 mM d'acétate d'ammonium, 10 μM de la CD étudiée et 50 μM de chacun des solutés. Les figures 4.18, 4.19 et 4.20 montrent les spectres obtenus avec les différentes CDs.

Les rapports m/z des différents adduits ammonium détectés sont en annexe VI.

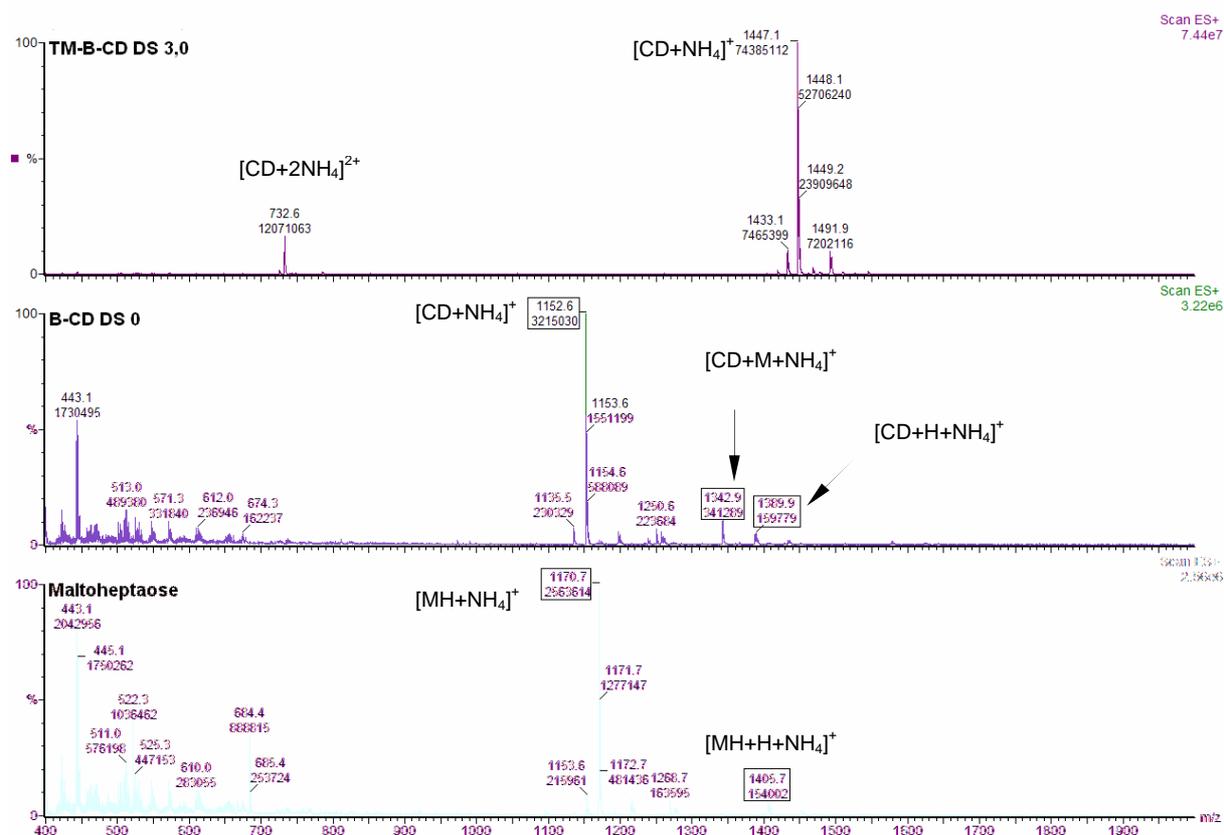


Figure 4.18. Spectres ESI-SM de solutions de complexes.

Conditions : H₂O/ACN (20/80), [NH₄CH₃CO₂] = 10 mM, [CD] = 10 μM, [5M5PH] = [Hexobarbital] = 50 μM ; tension de cône : 55 V ; débit : 20 μL/min.

CHAPITRE 4 – Etude des complexes de cyclodextrines par expériences de partage liquide-liquide et par spectrométrie de masse à ionisation électrospray

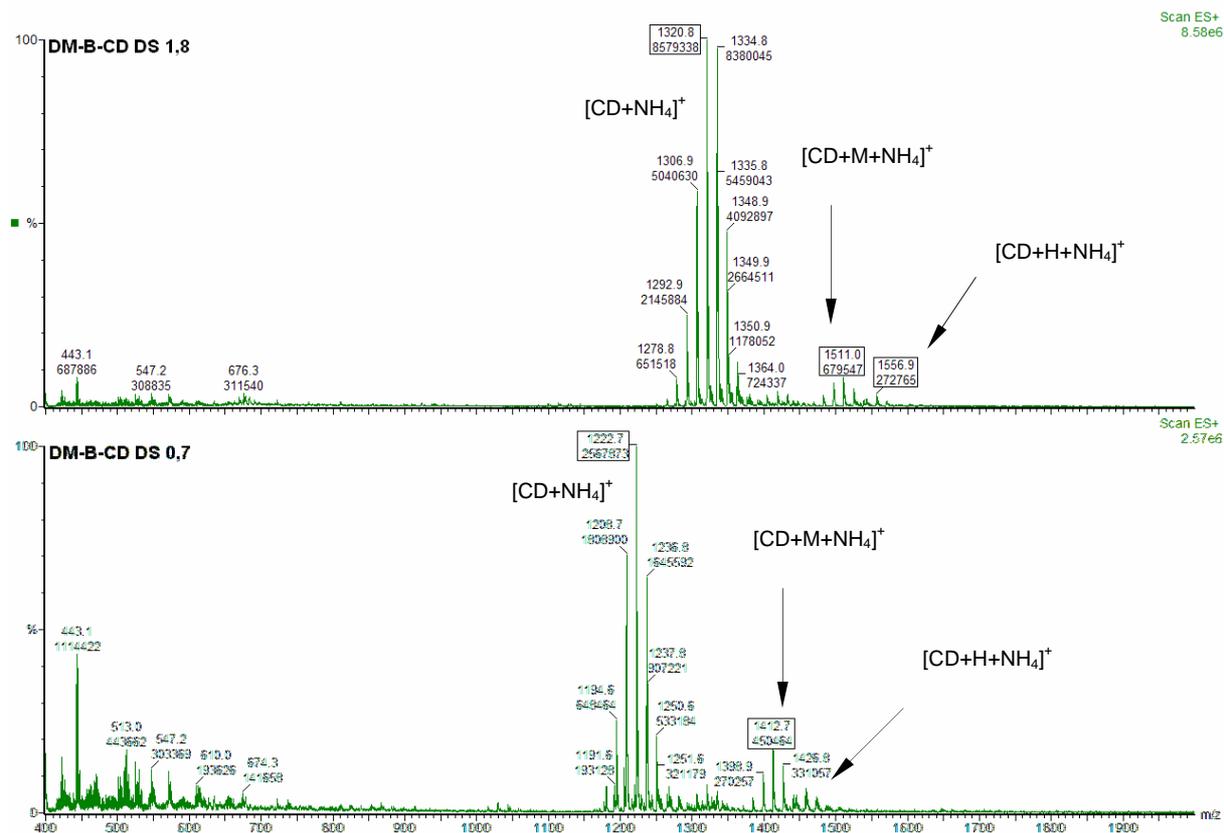


Figure 4.19. Spectres ESI-SM de solutions de complexes.
Conditions identiques à celles de la figure 4.18.

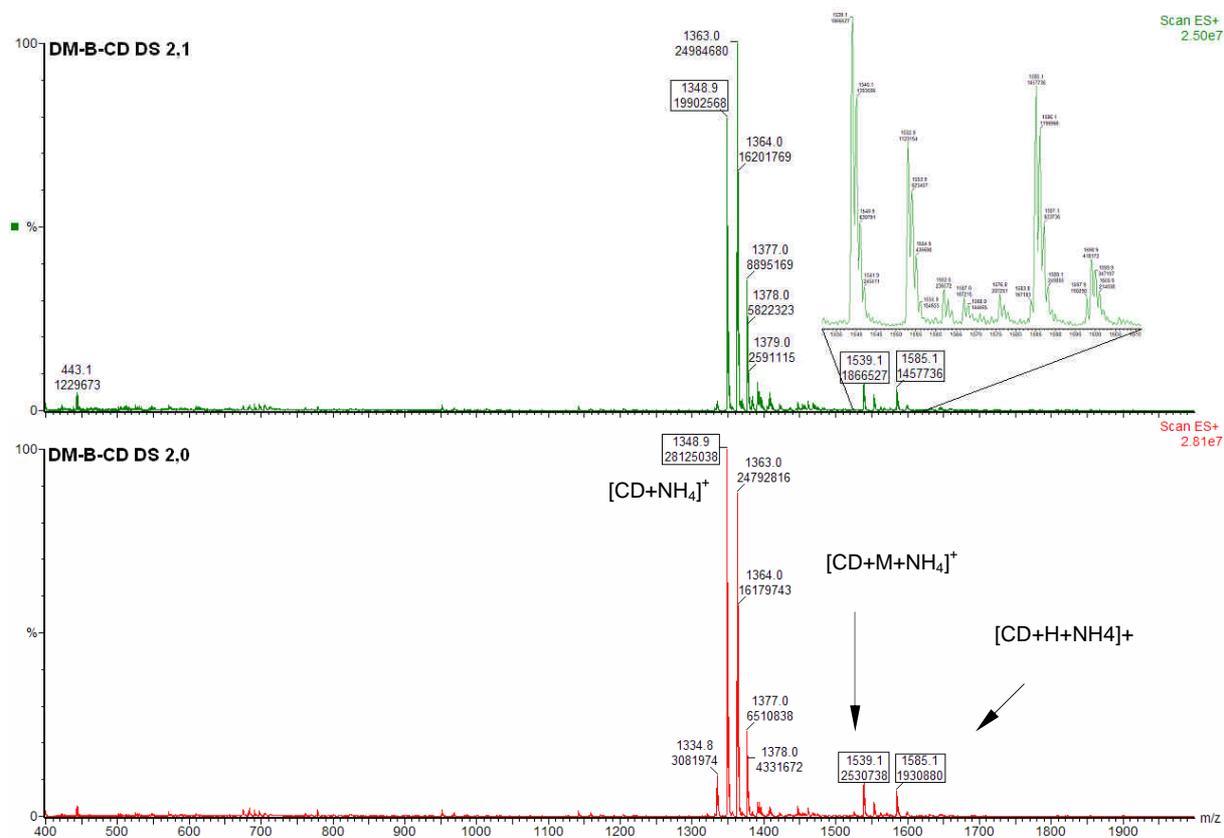


Figure 4.20. Spectres ESI-SM de solutions de complexes.
Conditions identiques à celles de la figure 4.18.

On peut noter que ces spectres ne montrent pas de fragments, ni d'espèces dichargées, à l'exception de la TM- β -CD (DS 3) (figure 4.18) qui, comme nous l'avons vu lors de l'analyse des CDs seules, a une forte affinité pour les ions NH_4^+ à cause de ses nombreux groupes méthyle. Pour les mêmes raisons, l'intensité des pics correspondant aux CDs monochargées augmente avec le DS : le pic de la β -CD est le moins intense, celui de la TM- β -CD est le plus intense et ceux des Me- β -CDs de DS 0,7, 1,8, 2,0 et 2,1 ont des intensités intermédiaires (figures 4.18, 4.19 et 4.20).

Une solution contenant le maltoheptaose (MH) a été analysée dans les mêmes conditions afin de pouvoir comparer le spectre obtenu avec celui de la β -CD native (figure 4.18). Le maltoheptaose est l'homologue linéaire de la β -CD native et peut être utilisé pour tenter d'évaluer la présence et l'importance des interactions non spécifiques [8, 15]. Cette molécule ne possède pas de cavité et est donc incapable de former des complexes d'inclusion mais elle possède autant de groupes hydroxyle que la β -CD ce qui lui permet de former des liaisons hydrogène. La figure 4.18 montre un pic correspondant au complexe du maltoheptaose avec l'hexobarbital. Cela signifie que le complexe β -CD-hexobarbital peut lui aussi être dû en partie à des interactions non spécifiques. Par contre, le complexe du maltoheptaose avec la 5M5PH n'apparaît pas.

Le spectre de la TM- β -CD (DS 3) ne montre aucun complexe, que ce soit avec la 5M5PH ou avec l'hexobarbital.

On peut constater que quelque soit la CD utilisée, les complexes de la 5M5PH sont plus intenses que ceux de l'hexobarbital (figure 4.18, 4.19 et 4.20), ce qui ne reflète pas ce que nous avons observé en solution. En effet, les expériences de partage et les analyses CPL menées au chapitre 3 ont montré que l'hexobarbital est plus complexé par ces CDs que la 5M5PH.

Afin de faciliter l'interprétation des spectres et de comparer plus aisément la complexation des différents dérivés présents au sein de chaque mélange de CDs, nous avons défini le rapport de complexation comme étant égal au rapport de l'intensité d'un complexe sur l'intensité du dérivé correspondant. Ainsi pour un dérivé portant 14 groupes méthyle, le rapport de complexation sera, pour l'hexobarbital :

$$R_c(H) = I([\text{14Me+H+NH}_4^+]) / I([\text{14Me+NH}_4^+])$$

CHAPITRE 4 – Etude des complexes de cyclodextrines par expériences de partage liquide-liquide et par spectrométrie de masse à ionisation électrospray

Les rapports de complexation ont été calculés pour les dérivés présents au sein de chaque mélange de CDs et pour les deux solutés. Chaque solution a été infusée trois fois afin d'obtenir trois spectres. Le rapport de complexation des différents dérivés a été calculé pour chacun de ces spectres et les trois valeurs obtenues ont été moyennées. Les résultats sont représentés à la figure 4.21.

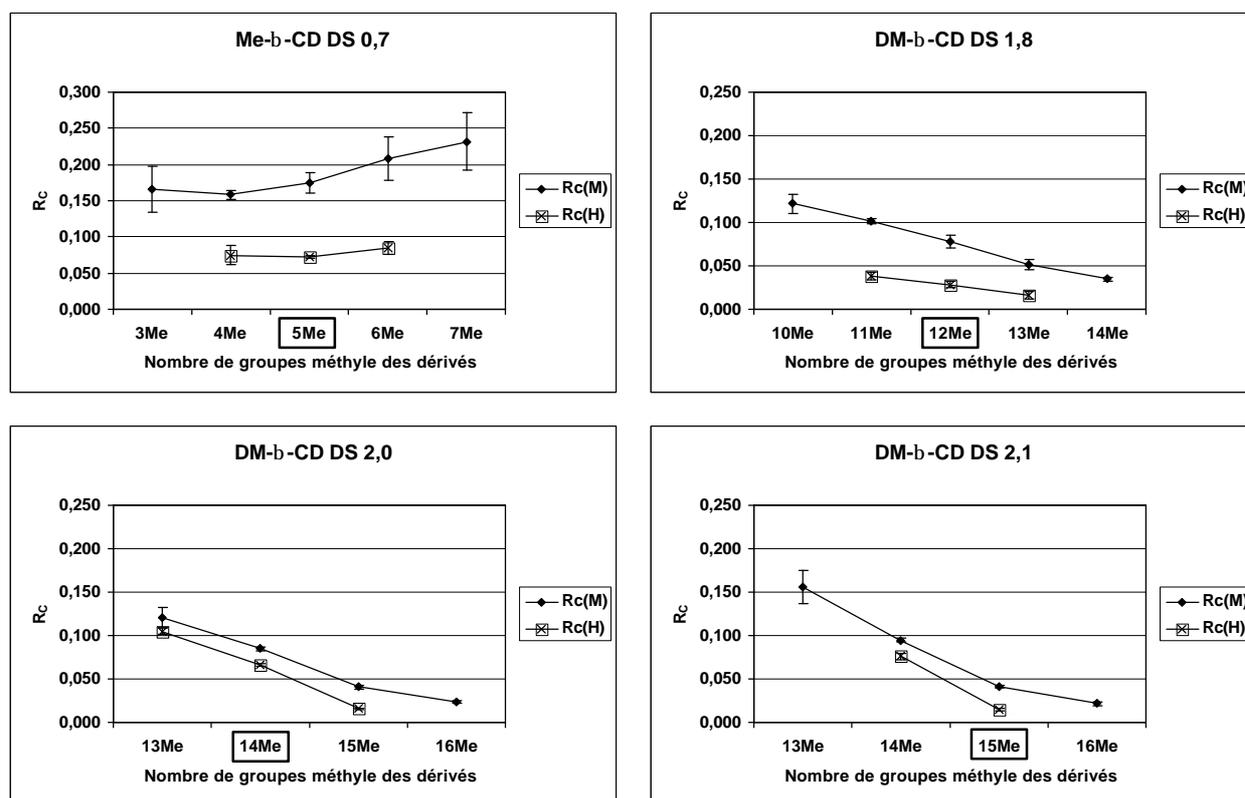


Figure 4.21. Rapports de complexation des différents dérivés présents au sein de chaque mélange.

Conditions identiques à celles de la figure 4.18. M = 5M5PH ; H = hexobarbital. Chaque point est la moyenne des valeurs obtenues lors de trois analyses. Les intervalles de confiance correspondent à un niveau de confiance de 95%. Le dérivé majoritaire de chaque mélange est encadré en noir.

Le rapport de complexation permet ainsi d'évaluer la capacité des différents dérivés d'un même mélange à former des complexes avec les deux solutés [10]. Notons que la nature de ces complexes n'est pas encore définie (complexes d'inclusion ou adduits électrostatiques).

Les rapports de complexation de la β -CD native sont de $0,12 \pm 0,01$ pour la 5M5PH et de $0,04 \pm 0,01$ pour l'hexobarbital. On peut constater que les rapports de complexation des différents dérivés d'un même mélange ont des valeurs significativement différentes. Ainsi, au sein de la Me- β -CD de DS 0,7, la capacité des

dérivés à former des complexes augmente avec le nombre de groupes méthyles. Au contraire, les dérivés contenus dans les DM- β -CDs de DS 1,8, 2,0 et 2,1 forment d'autant moins de complexes qu'ils sont méthylés et ce, quelque soit le dérivé majoritaire dans le mélange. Notons que les études ESI-SM menées jusqu'à maintenant sur des CDs modifiées ont conclu que le degré de substitution des différents dérivés n'influe pas de manière significative sur l'intensité relative des complexes détectés [7, 10, 14].

Il est intéressant de constater que les valeurs des R_c obtenues avec les DM- β -CDs de DS 2,0 et 2,1 sont relativement proches, en particulier pour les dérivés portant 14, 15 ou 16 groupes méthyle. Les valeurs obtenues avec la DM- β -CD de DS 1,8 pour les dérivés portant 13 et 14 groupes méthyle sont très différentes des précédentes. Or on sait que les DM- β -CDs de DS 2,0 et 2,1 ont des compositions très similaires et surtout qu'elles sont sélectivement méthylées en position 2 et 6 [22, 23]. Au contraire, la DM- β -CD de DS 1,8 est méthylée de façon plus aléatoire. Ainsi, l'ESI-SM pourrait être un moyen supplémentaire de comparer la méthylation de mélanges de CDs issus de différentes sources commerciales ou de différents lots et pourrait se révéler complémentaire des empreintes chromatographiques par exemple. Cette remarque est valable quelque soit la nature des complexes détectés (complexes d'inclusion ou adduits électrostatiques).

Afin de vérifier la répétabilité des mesures, les rapports de complexation des dérivés de la DM- β -CD de DS 2,1 ont été déterminés à nouveau deux fois sur deux jours différents de la même façon que précédemment. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 4.2.

Tableau 4.2. Moyenne des rapports de complexation des différents dérivés présents au sein de la DM- β -CD DS 2,1 déterminés sur trois jours différents.

	R_c (Hexobarbital)				R_c (5M5PH)	
	13Me	14Me	15Me	16Me	14Me	15Me
Moyenne	0,16	0,10	0,05	0,03	0,08	0,02
Coefficient de variation (%)	4	5	8	13	3	17
Intervalle de confiance (95%)	$\pm 0,02$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$

On peut constater que les valeurs des rapports de complexation obtenues sur trois jours varient peu, sauf lorsqu'un dérivé ou le complexe qu'il forme ont une faible

intensité, comme par exemple le complexe du dérivé portant 16 groupes méthyles avec l'hexobarbital.

Pour conclure, on peut constater que, dans les conditions d'analyse utilisées au cours de ces travaux, l'intensité relative, en ESI-SM, des complexes formés par les deux solutés n'est pas corrélée avec leur stabilité relative en solution. En effet, en solution, nous avons vu que l'hexobarbital est plus complexé que la 5M5PH et ce, quelque soit la CD utilisée. En ESI-SM, l'intensité relative des complexes détectés montre une tendance opposée.

Ceci peut s'expliquer par la différence de basicité des deux complexes. En effet, nous avons pu observer sur les spectres précédents les pics correspondant aux complexes CDs-5M5PH dichargés alors que les complexes CDs-hexobarbital dichargés n'ont pas été détectés. Les complexes CDs-5M5PH ont donc une affinité plus grande pour les ions ammonium et leurs signaux sont plus intenses. Ce comportement est similaire à celui de la TM- β -CD qui est, comme nous l'avons vu, la plus basique des CDs étudiées. Cela se manifeste sur ses spectres par un pic plus intense que celui des autres CDs et par la présence de CDs dichargées (figure 4.18).

Pour s'affranchir de la différence de réponse des deux complexes et comparer leur stabilité relative en phase gazeuse, il aurait été nécessaire d'effectuer des analyses en SM tandem [15, 16]. Malheureusement, la faible intensité des complexes utilisés lors de ces travaux n'a pas permis une telle étude.

III.2.6. Discussions de la nature des complexes détectés

Jusqu'à présent, nous n'avons pas encore tenté de définir la nature des complexes détectés. On peut en effet se demander si ce sont bien des complexes d'inclusion ou si ce sont des adduits électrostatiques.

Rappelons que la survie d'un complexe en ESI-SM dépend de la force des interactions non covalentes en phase gazeuse et non de la constante de stabilité en solution [6]. On sait en effet que lors du passage entre phase liquide et phase gazeuse, les interactions impliquées dans les complexes sont modifiées : certaines sont amoindries, comme les interactions hydrophobes, d'autres sont renforcées, comme les interactions électrostatiques, parmi lesquelles, les liaisons hydrogène [15].

Nous avons vu dans l'introduction que les complexes d'inclusion β -CD-cyclohexane et β -CD-toluène existent en solution mais ne sont pas détectés en ESI-SM à cause de la disparition des interactions hydrophobes en phase gazeuse [6]. Toutefois, nous avons vu que certaines équipes ont obtenu de bonnes corrélations entre les intensités relatives des complexes en ESI-SM et les constantes de stabilité déterminées en solution [5, 10, 14, 16]. On peut donc penser que même si les interactions hydrophobes disparaissent lors du passage entre les deux phases, les autres forces impliquées dans le complexe d'inclusion peuvent en permettre la survie et assurer sa stabilité en phase gazeuse.

Dans notre cas, étant donné la structure des solutés utilisés (tableau 3.1), les complexes d'inclusion en solution peuvent faire intervenir les interactions hydrophobes mais aussi des interactions électrostatiques (interactions dipôle-dipôle, liaisons hydrogène) ou de van der Waals. Dans ce cas, ces complexes d'inclusion pourraient survivre au processus d'ionisation et avoir des stabilités relatives modifiées. Par exemple, on peut imaginer qu'en phase liquide, la complexation de l'hexobarbital fait intervenir plus d'interactions hydrophobes et/ou moins de liaisons hydrogène que la complexation de la 5M5PH, ce qui expliquerait l'inversion de stabilité relative des complexes lors du passage en phase gazeuse. Toutefois, nous avons vu que la plus grande intensité des complexes CDs-5M5PH par rapport à celles des complexes CDs-hexobarbital était vraisemblablement due à leur plus grande basicité et non à une plus grande stabilité.

Il se peut aussi que les complexes que nous détectons soient des adduits électrostatiques, comme ceux observés par Cunnif *et al* avec des acides aminés ne formant pas de complexes d'inclusion [6].

Notons que nous avons tenté de mener ces analyses ESI-SM dans les conditions préconisées par la littérature pour éliminer les interactions non spécifiques. Ainsi, nous avons travaillé avec de faibles concentrations (10 μ M de CDs et 50 μ M de chaque soluté) [9, 15, 16] et avons utilisé l'acétate d'ammonium [9], lequel a montré qu'il permettait en effet de limiter la formation d'agrégats de CDs (figure 4.13). De plus, nous avons vérifié que lorsque l'on augmente la proportion de solutés, aucun complexes CD-soluté de stoechiométrie de type 1:2 ou 1:3 n'apparaît.

Nous avons toutefois pu observer sur le spectre de la solution contenant le maltoheptaose, qui ne peut pas former de complexe d'inclusion, un complexe avec

l'hexobarbital (figure 4.18). Par contre, avec la 5M5PH, il n'apparaît pas de complexe avec le maltoheptaose alors que l'on peut en observer un avec la β -CD.

Par ailleurs, nous avons vu que comme en solution, aucun complexe TM- β -D-5M5PH n'est détecté, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus en solution.

En résumé, la 5M5PH n'a montré de complexes ni avec le maltoheptaose, alors que celui-ci peut établir des liaisons hydrogène, ni avec la TM- β -CD qui est la plus basique des CDs. Les seuls complexes de 5M5PH qui ont été détectés sont ceux qui existent en solution, ce qui pourrait laisser penser que ceux-ci sont bien spécifiques.

Notons toutefois que sur la figure 4.14, le rapport de l'intensité des complexes sur les CDs correspondantes est plus grand pour les espèces dichargées que pour les monochargées. Autrement dit, l'addition d'un second ion ammonium a pour effet de stabiliser les complexes en apportant des interactions supplémentaires ce qui laisse penser que ces complexes ne sont pas des complexes d'inclusion.

IV. CONCLUSIONS

Deux méthodes ont été développées au cours de cette étude pour étudier les complexes de CDs. Les expériences de partage liquide-liquide ont permis l'étude en solution et l'ESI-SM a été utilisée pour l'étude en phase gazeuse.

Dans les conditions d'analyse que nous avons employées, les résultats obtenus avec ces deux méthodes ne sont pas en accord. En effet, l'intensité relative des complexes détectés en ESI-SM ne correspond pas à la stabilité relative des complexes en solution.

Toutefois, l'ESI-SM a montré des résultats intéressants. En effet, il semble possible de comparer les dérivés d'un degré de substitution donné mais issus de différents mélanges et de déterminer si leur méthylation a été effectuée de la même façon. Ceci pourrait s'avérer être un outil supplémentaire pour la caractérisation de mélanges de CDs modifiées de différentes origines ou de différents lots.

V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] T. Higuchi, K. Connors, *Adv. Anal Chem. Instrum.* 4 (1965) 117-212.
- [2] K. Connors, *Chem. Rev.* 97 (1997) 1325-1357.
- [3] E. Martin del Valle, *Proc. Biochem.* 39 (2004) 1033-1046.
- [4] K. Larsen, W. Zimmermann, *J. Chromatogr. A* 836 (1999) 3-14.
- [5] Y. Dotsikas, Y. Loukas, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14 (2003) 1123-1129.
- [6] J. Cunnif, P. Vouros, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 6 (1995) 437-447.
- [7] P. Cescutti, D. Garozzo, R. Rizzo, *Carbohydr. Res.* 302 (1997) 1-6.
- [8] R. Bakhtiar, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11 (1997) 1478-1481.
- [9] W. Sun, M. Cui, S. Liu, F. Song, Y. Elkin, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12 (1998) 2016-2022.
- [10] K. Srinivasan, M. Bartlett, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14 (2000) 624-632.
- [11] C. Lebrilla, *Acc. Chem. Res.* 34 (2001) 653-661.
- [12] Y. Cheng, D. Hercules, *J. Mass Spectrom.* 36 (2001) 834-836.
- [13] R. Kobetic, B. Jursic, S. Bonnette, J. Tsai, S. Salvatore, *Tet. Lett.* 42 (2001) 6077-6082.
- [14] Y. Al-nouti, M. Bartlett, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13 (2002) 928-935.
- [15] V. Gabelica, N. Galic, E. De Pauw, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13 (2002) 946-953.
- [16] M. Guo, F. Song, Z. Liu, S. Liu, *J. Mass Spectrom.* 39 (2004) 594-599.
- [17] R. Cole, *Electrospray ionization mass spectrometry*, Ed. John Wiley & Sons, New-York, 1997.
- [18] J. Breinholt, S. Lehmann, A. Varming, *Chirality* 11 (1999) 768-771.
- [19] A. Foucault, *Centrifugal partition chromatography*, Ed. Marcel Dekker, New York, 1995.
- [20] R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, *Chromatographies en phases liquide et supercritique*, Ed. Masson, Paris, 1991.
- [21] J. Zaia, *Mass Spectrom. Rev.* 23 (2004) 161-227.

- [22] A. Salvador, *Cyclodextrines méthylées : analyse, caractérisation et utilisation comme sélecteurs chiraux électrophorèse capillaire et chromatographie en phase supercritique*, thèse, décembre 1998.
- [23] I. Caron, *Cyclodextrines méthylées : analyse et caractérisation par chromatographie en phase liquide. Utilisation en électrophorèse capillaire*, thèse, décembre 2002.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Les cyclodextrines ont pris une importance considérable dans de nombreux domaines telles que les industries pharmaceutique, cosmétique, agroalimentaire, etc., ainsi qu'en chimie analytique.

Nos travaux ont touché à différents aspects des CDs : la caractérisation de CDs modifiées, leur utilisation en tant que sélecteurs chiraux et l'étude de leurs complexes.

Les CDs natives possèdent de nombreux groupes hydroxyle et leur modification conduit le plus souvent à des mélanges de plusieurs dérivés et isomères. La première partie des travaux présentés dans ce manuscrit a porté sur l'analyse de CDs méthylées et sulfobutylées, qui sont parmi les CDs modifiées les plus utilisées.

Nous avons ainsi caractérisé une nouvelle β -CD méthylée de faible degré de substitution. L'utilisation de plusieurs techniques analytiques a permis l'obtention d'informations complémentaires conduisant à une meilleure connaissance de la composition du mélange. Nous avons mis en évidence la nécessité d'adapter les méthodes d'analyse utilisées en fonction du degré de substitution moyen des mélanges étudiés, en particulier lors du choix de la colonne chromatographique. La caractérisation des CDs méthylées a maintenant été réalisée sur toute la gamme de degré de substitution.

L'analyse de la sulfobutyléther- β -cyclodextrine monosubstituée a été étudiée sur colonne de carbone graphite poreux. Nous avons montré l'intérêt de travailler à haute température pour améliorer la séparation des trois isomères et en faciliter l'isolement semi-préparatif. L'étude des mécanismes de rétention indique qu'ils sont similaires à ceux observés à température ambiante.

La seconde partie de nos travaux a consisté à évaluer le système chromatographique carbone graphite poreux / cyclodextrines méthylées pour la séparation chirale en chromatographie en phase liquide. Cette combinaison, peu décrite en CPL, a montré des performances supérieures à celles employant des colonnes de silice greffée plus traditionnelles. Les séparations sont meilleures et/ou elles peuvent être réalisées avec une quantité moindre de CDs dans la phase

mobile. La robustesse du PGC permet en outre d'effectuer des séparations dans des conditions qui ne sont pas applicables aux colonnes conventionnelles.

La surface du PGC semble donc avoir un effet bénéfique sur les séparations et de nouvelles études employant d'autres CDs modifiées seront nécessaires pour déterminer précisément la façon dont celle-ci intervient.

Les différents travaux effectués sur le PGC ont ainsi permis d'apporter des éléments supplémentaires à la connaissance de ce support chromatographique atypique.

Enfin, nous avons étudié des complexes de CDs méthylées de différents degrés de substitution en solution et en phase gazeuse. Nous avons pour cela adapté une méthode de partage liquide-liquide afin de comparer le pouvoir complexant de différentes CDs vis-à-vis de deux solutés test en solution. Puis nous avons recherché les conditions ESI-SM permettant la même comparaison en phase gazeuse. Avec nos conditions d'analyse, les résultats obtenus par ces deux méthodes ne sont pas en accord, l'intensité relative des complexes détectés en ESI-SM n'étant pas corrélée avec la stabilité des complexes en solution. Toutefois, l'ESI-SM montre des résultats intéressants pour l'étude des différents dérivés présents dans les mélanges et pourrait être un outil supplémentaire pour la caractérisation des CDs modifiées et de leurs positions de substitution.

L'évaluation de l'ESI-SM pour l'étude des complexes de CDs mérite d'être poursuivie et il serait préférable pour une étude approfondie des phénomènes impliqués d'utiliser des molécules simples et dont les complexes en solution sont très stables (constantes de complexation de l'ordre de 10^5 ou 10^6 M^{-1}) et parfaitement caractérisés.

ANNEXES

ANNEXE I

Conditions expérimentales du chapitre 2 (partie A)

I. PRODUITS

L'acétonitrile (ACN) et le méthanol (MeOH) de qualité HPLC proviennent de J.T. Baker (Noisy-le-sec, France) et l'eau déionisée (18 MO) est produite par un système Elgastat UHQ II (Elga, Antony, France). L'hydrogencarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3) et l'acétate d'ammonium ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$) proviennent de Fisher Chemicals (Fisher Scientific, Loughborough, UK) et le sulfate de sodium de Fluka (Buchs, Suisse). La β -CD provient de Wacker (Lyon, France) et la 1,4-butane sultone de Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

II. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

Le système chromatographique est composé des éléments suivants : une pompe quaternaire Merck-Hitachi (Darmstadt, Allemagne) modèle Lachrom L-7100, une vanne d'injection Rhéodyne (Cotati, CA, USA) modèle 7725 équipée d'une boucle de 20 μL , un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL) Sedere (Alfortville, France) modèle Sedex 55 (température du tube d'évaporation : 50°C ; pression du gaz : 2,2 bars ; photomultiplicateur : 9) et un intégrateur Hitachi (Tokyo, Japon) modèle L-7500. Les séparations sont effectuées sur une colonne Hypercarb (100 x 4,6 mm ; 5 μm) de ThermoQuest, Hypersil (Runcorn, UK) placée dans un four Croco-Cil (Cluzeau, France).

Afin d'éviter tout gradient de température à l'intérieur de la colonne, la phase mobile est préchauffée par l'intermédiaire d'un tube d'inox (2 m x 0,5 mm) placé dans le four après l'injecteur. Le volume mort en résultant est de 0,39 mL.

Toute modification des conditions d'analyse (composition de la phase mobile, température de la colonne) est suivie d'un équilibrage d'au moins 90 min afin d'obtenir des temps de rétention répétables. Chaque injection est effectuée trois fois.

III. ECHANTILLON ANALYSE

Le mélange de SBE- β -CDs analysé a été synthétisé au laboratoire selon une procédure dérivée de celle du brevet d'origine [V. Stella, US Patent, 1992]. Afin de n'obtenir que le dérivé monosubstitué, le nombre d'équivalent de 1,4-butane sultone a été réduit. De plus, le milieu réactionnel était plus dilué et la température plus basse que dans le brevet.

La synthèse a été effectuée dans les conditions suivantes. Dans un ballon de 100 mL, 1 g de β -CD ($8,81 \cdot 10^{-4}$ mol) est dissous dans une solution aqueuse composée de 30 mL d'eau et 10,5 mL de NaOH 1N ($10,5 \cdot 10^{-3}$ mol) à température ambiante. Après dissolution complète, 90 μ L de 1,4-butane sultone (120 mg, $8,81 \cdot 10^{-4}$ mol) sont ajoutés et le milieu réactionnel est laissé à reflux sous agitation pendant 24 h. Le mélange est ensuite neutralisé avec une résine Amberlite IR-120 (Fluka, Buchs, Suisse) sous forme protonée et filtré. La résine est lavée trois fois avec 10 mL d'eau. La solution est ensuite ultrafiltrée à travers une membrane Millipore (Bedford, USA) YM-1 de seuil de coupure 1000 Da sous une pression de 4 bars jusqu'à précipitation. Cette opération est répétée trois fois avec 50 mL d'eau et la solution résultante est lyophilisée.

La concentration de l'échantillon analysé est de 2,5 g/L dans un mélange H₂O/ACN (95/5).

ANNEXE II

Conditions expérimentales du chapitre 2 (partie B)

I. PRODUITS

La β -CD native et la Me- β -CD (Kleptose® Crismeb) ont été gracieusement fournies par Roquette (Lestrem, France). La DM- β -CD DS 2,1 provient de Ikeda Corporation (Tokyo, Japon).

L'eau deutérée (D_2O) provient d'Aldrich (Milwaukee, WI, USA).

L'acétonitrile (ACN), le méthanol (MeOH) et l'éthanol (EtOH), de qualité HPLC, provient de SDS (Peypin, France), le propanol (PrOH) de Carlo Erba (Rodano, Italie), l'isopropanol (iPrOH) de J.T. Baker (Deventer, Pays-Bas) et l'eau déionisée (18 MO) est produite par un système Elgastat UHQ II (Elga, Antony, France).

L'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) et l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) proviennent d'Aldrich (Milwaukee, WI, USA), la 1-hydroxy-isoquinoléine (HIQ) et l'acide 3-hydroxypicolinique (HPA) proviennent de Fluka (Buchs, Suisse) et le chlorure de sodium (NaCl) de Prolabo (Paris, France).

L'acétate d'ammonium ($NH_4CH_3CO_2$), l'hydrogénocarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3) et le formiate d'ammonium (NH_4HCO_2), de qualité HPLC, proviennent de Fluka (Buchs, Suisse).

II. RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

Les expériences de RMN 1H sont conduites à 25°C sur un appareil DPX 250 MHz Advance (Bruker Biospin, Rheinstetten, Allemagne). La calibration est effectuée avec le signal de D_2O .

Les échantillons de β -CD et de Me- β -CD sont préparés dans D_2O à une concentration de 5 mg dans 0,75 mL. Les solutions sont évaporées à sec sous courant d'azote puis reconstituées dans 0,75 mL de D_2O . Cette opération est répétée deux fois afin d'assurer un échange total des protons des fonctions hydroxyle.

III. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

Le système chromatographique est composé des éléments suivants : une pompe quaternaire Merck-Hitachi (Darmstadt, Allemagne) modèle Lachrom L-7100, une vanne d'injection Rhéodyne (Cotati, CA, USA) modèle 7725 équipée d'une boucle de 20 μ L et un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL) Sedere (Alfortville, France) modèle Sedex 55 (température du tube d'évaporation : 50°C ; pression du gaz : 2,2 bars ; photomultiplicateur : 9). Les données sont collectées par le logiciel EZChrom Elite (Merck, Darmstadt, Allemagne) version 2.5.

Les colonnes chromatographiques employées sont les suivantes : Nucléosil 50-5-C8 endcapped (250 x 4 mm ; 5 μ m) et Nucléosil Phényl (150 x 4,6 mm ; 7 μ m) de Macherey-Nagel (Düren, Allemagne), Zorbax Phényl (250 x 4,6 mm ; 7 μ m) de DuPont (Wilmington, DE, USA), Hypercarb (100 x 4,6 mm ; 5 μ m) de ThermoQuest Hypersil (Runcorn, GB) et Purospher Star RP-18 EC (125 x 4 mm ; 5 μ m) de Merck (Darmstadt, Allemagne).

Les séparations de CPL-DEDL sont effectuées à température ambiante en gradient d'élution (H₂O/ACN 95/5 à 55/45 en 40 min) à un débit de 1 mL/min. Les séparations de CPL-ESI-MS sont effectuées dans les mêmes conditions avec 5 mM de NH₄CH₃CO₂ dans la phase mobile.

Les solutions de Me- β -CD sont préparées dans l'eau à une concentration de 2 g/L pour la chromatographie analytique et 10 g/L pour la chromatographie semi-préparative. Avant l'analyse des fractions collectées par chromatographie semi-préparative, celles-ci sont évaporées à sec sous courant d'azote puis reconstituées dans un volume d'eau correspondant à un facteur de concentration de 20 par rapport au volume initial.

IV. SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI-TOF

Les analyses de spectrométrie de masse MALDI-TOF sont effectuées sur un appareil linéaire Omniflex (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne) en mode d'ionisation positive utilisant un laser à l'azote ($\lambda = 337$ nm, durée d'impulsion = 2 ns). La tension d'accélération est de 17,70 kV et le signal provenant du détecteur est acquis à une fréquence de 500 MHz. Les spectres sont enregistrés entre 0 et 5000

Da. La calibration est effectuée avec la β -CD native. La puissance du laser appliquée pour induire la désorption et la formation des ions est la plus faible possible.

Les solutions de matrices sont préparées dans le MeOH à une concentration de 50 mM. Les solutions de Me- β -CD sont préparées dans de l'eau contenant 0,5 mM de NaCl. Le mélange brut est dissous à une concentration de 0,5 mM et les fractions recueillies par chromatographie semi-préparative sont évaporées à sec sous courant d'azote et reconstituées dans un volume correspondant à un facteur de concentration de 100 par rapport au volume initial.

Les échantillons analysés sont préparés de deux façons différentes. Pour la méthode des couches minces, 0,5 μ L de solution de matrice sont déposés sur la cible et évaporés avant le dépôt de 0,5 μ L de solution de Me- β -CD. Pour la méthode de la goutte sèche, 1 μ L d'un mélange de solutions de matrice et de Me- β -CD en volumes égaux est déposé. Les spectres présentés sont obtenus avec la méthode des couches minces, sauf mention contraire.

V. SPECTROMETRIE DE MASSE ELECTROSPRAY (ESI)

Les analyses de spectrométrie de masse ESI sont effectuées sur un appareil API 300 triple quadripôle (Perkin-Elmer Sciex, Forster City, CA, USA) opérant en mode d'ionisation positive avec une source TurbolonSpray chauffée à 200°C. L'azote est utilisé comme gaz de nébulisation et gaz rideau.

Les paramètres du spectromètre de masse sont réglés de la façon suivante : débit du gaz de nébulisation, NEB = 8 (1,2 L/min) ; débit du gaz rideau, CUR = 6 (0,9 L/min) ; tension de spray, IS = 5500 V ; température de la source, TEM = 200°C ; tension de l'orifice, DP = 20 V ; tension de l'anneau, FP = 200 V ; tension du quadripôle Q₀, EP = 10V.

Pour les expériences d'ESI-SM, les spectres de masse sont enregistrés entre 100 et 1500 Th et entre 1120 et 1320 Th par incrément de 0,5 Th. Chaque spectre est le résultat de l'accumulation de 50 balayages. Les solutions sont infusées grâce à une pompe seringue Harvard modèle 22 (Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA, USA).

Pour les expériences de CPL-ESI-SM, le courant ionique total (TIC) est mesuré entre 1120 et 1320 Th par incrément de 0,5 Th. Le suivi sélectif d'ion (SIM) est utilisé pour détecter les ions à 1166,5, 1180,5, 1194,5, 1208,5, 1222,5, 1236,5, 1250,5,

1264,5 et 1278,5 Th avec un temps de résidence sur chaque ions de 100 ms et un temps de pause de 2ms. L'effluent de la colonne chromatographique est réduit à 1/20 afin d'obtenir un débit dans le spectromètre de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$.

ANNEXE III

Caractéristiques des colonnes chromatographiques utilisées dans les chapitres 2 et 3

I. COLONNES UTILISEES DANS LE CHAPITRE 2

	Dimensions (mm)	Taille de particules (µm)	Taille de pores (Å)	Surface spécifique (m ² /g)	Taux de carbone (%)	End capping	Fabricant	Numéro de colonne
Hypercarb	100 x 4,6	5	250	120	100	X	Thermo Electron	3-41025
Nucléosil 50-5-C8 EC	250 x 4	5	50	450	9	OUI	Macherey-Nagel	6081997Q
Nucléosil Phényl	150 x 4,6	7	100	350	8	NON	Macherey-Nagel	N 177
Zorbax Phényl	250 x 4,6	7	70	350	?	NON	Dupont	D1103
Purospher Star RP 18 EC	125 x 4	5	120	330	17	OUI	Merck	311223

II. COLONNES UTILISEES DANS LE CHAPITRE 3

	Dimensions (mm)	Taille de particules (µm)	Taille de pores (Å)	Surface spécifique (m ² /g)	Taux de carbone (%)	End capping	Fabricant	Numéro de colonne
Hypercarb	100 x 2,1	5	250	120	100	X	Thermo Electron	3-21990
Purospher Star RP 18 EC	125 x 2	5	120	330	17	OUI	Merck	40566
Zorbax Extend C18	150 x 2,1	5	80	180	12,5	OUI	Agilent	EE1185

ANNEXE IV

Conditions expérimentales du chapitre 3

I. PRODUITS

L'hexobarbital provient de Sigma (Saint Louis, MO, USA), la 5-méthyl-5-phénylhydantoïne de Acros (Geel, Belgique) et l'acétate d'ammonium ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$) de Fluka (Buchs, Suisse).

La DM- β -CD de DS 1,8 provient de Wacker (Lyon, France) et la DM- β -CD de DS 2,1 d'Ikeda Corporation (Tokyo, Japon).

L'acétonitrile (ACN), le méthanol (MeOH) et l'éthanol (EtOH), de qualité HPLC, provient de SDS (Peypin, France) et le tétrahydrofurane (THF) de J.T. Baker (Deventer, Pays-Bas). L'eau déionisée (18 MO) est produite par un système Elgastat UHQ II (Elga, Antony, France).

II. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

Le système chromatographique est composé des éléments suivants : une pompe quaternaire Merck-Hitachi (Darmstadt, Allemagne) modèle Lachrom L-7100, une vanne d'injection Rhéodyne (Cotati, CA, USA) modèle 7725 équipée d'une boucle de 2 μL (pour les séparations chirales) ou de 20 μL (pour l'analyse des CDs), un détecteur ultra-violet ABI Analytical Kratos division (Eppstein, Allemagne) modèle Spectroflow 783 ($\lambda=220\text{ nm}$; range=0,01) et un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL) Sedere (Alfortville, France) modèle Sedex 55 (température du tube d'évaporation : 50°C ; pression du gaz : 2,2 bars ; photomultiplicateur : 6 ou 9). Ces deux détecteurs sont montés en série. Les données sont collectées par le logiciel EZChrom Elite (Merck, Darmstadt, Allemagne) version 2.5.

Les colonnes chromatographiques employées sont les suivantes : Hypercarb (100 x 2,1 mm ; 5 μm) de ThermoQuest Hypersil (Runcorn, GB), Purospher Star RP 18 EC (125 x 2 mm ; 5 μm) de Merck (Darmstadt, Allemagne) et Zorbax Extend C18 (150 x 2,1 ; 5 μm) de Agilent (Palo Alto, CA USA).

Les séparations chirales sont effectuées à un débit de 0,2 mL/min et à température ambiante, sauf mention contraire. La composition de la phase mobile est ajustée en utilisant trois voies de la pompe chromatographique : une voie pour l'ACN, une autre pour l'eau et la dernière pour les CDs à 40 mM dans l'eau. Les analyses d'une même journée sont effectuées en utilisant la même proportion d'ACN et des concentrations croissantes de CDs dans la phase mobile. Le nettoyage de la colonne, lorsque nécessaire, est effectué avec une phase mobile H₂O/THF 50/50 pompée à 0,2 mL/min pendant 30 min. L'échantillon injecté consiste en une solution d'hexobarbital et de 5M5PH à 100 mg/L chacun dans le MeOH. Chaque injection est effectuée trois fois.

L'analyse des CDs est effectuée avec un gradient H₂O/ACN 85/15 à 5/95 en 40 min à un débit de 0,2 mL/min et à température ambiante. Les CDs sont à une concentration de 2 g/L dans l'eau.

III. SPECTROMETRIE DE MASSE ELECTROSPRAY (ESI)

Les analyses de spectrométrie de masse ESI ont été effectuées sur un appareil API 300 triple quadripôle (Perkin-Elmer Sciex, Forster City, CA, USA) opérant en mode d'ionisation positive avec une source TurbolonSpray chauffée à 200°C. L'azote a été utilisé comme gaz de nébulisation et gaz rideau.

Les paramètres du spectromètre de masse étaient réglés de la façon suivante : débit du gaz de nébulisation, NEB = 8 (1,2 L/min) ; débit du gaz rideau, CUR = 6 (0,9 L/min) ; tension de spray, IS = 5500 V ; température de la source, TEM = 200°C ; tension de l'orifice, DP = 20 V ; tension de l'anneau, FP = 200 V ; tension du quadripôle Q₀, EP = 10V.

Les spectres de masse sont enregistrés entre 1000 et 2000 Th par incrément de 0,5 Th. Chaque spectre est le résultat de l'accumulation de 50 balayages. Les solutions sont infusées à un débit de 50 µL/min grâce à une pompe seringue Harvard modèle 22 (Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA, USA).

Les CDs analysées sont à une concentration de 1 mg/L dans un mélange eau/ACN (50/50) contenant 5 mM de NH₄CH₃CO₂.

ANNEXE V

Conditions expérimentales du chapitre 4

I. PRODUITS

L'hexobarbital et le maltoheptaose proviennent de Sigma (Saint Louis, MO, USA), la 5-méthyl-5-phénylhydantoïne de Acros (Geel, Belgique) et l'acétate d'ammonium ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$) de Fluka (Buchs, Suisse).

La β -CD native et la Me- β -CD de DS 0,7 sont gracieusement fournies par Roquette (Lestrem, France), la DM- β -CD de DS 1,8 provient de Wacker (Lyon, France), la DM- β -CD de DS 2,0 provient de Fluka (Buchs, Suisse), la DM- β -CD de DS 2,1 provient d'Ikeda Corporation (Tokyo, Japon) et la TM- β -CD (DS 3) de Cyclolab (Budapest, Hongrie).

L'acétonitrile, l'acétate d'éthyle et l'heptane, de qualité HPLC, proviennent de SDS (Peypin, France) et l'eau déionisée (18 MO) est produite par un système Elgastat UHQ II (Elga, Antony, France).

II. PROTOCOLE DES EXPERIENCES DE PARTAGE

II.1. Première méthode

II.1.1. Préparation du système biphasique initial

- Préparation effectuée dans un tube de 7 ou de 30 mL, selon le volume désiré.
Afin de limiter l'évaporation de la phase organique (phase supérieure), le volume du tube de préparation ne doit pas être trop grand par rapport à celui du mélange.
- Ajout des solvants (heptane, acétate d'éthyle, acétonitrile et eau) selon les proportions déterminées.
Utilisation de pipettes en verre de 2 mL.
- Vortex de 30 sec puis décantation.

II.1.2. Dépôt du soluté dans le tube-test

- Dépôt de 100 μL d'une solution du soluté à 50 mM dans le méthanol dans un tube de 4 mL.

Pipette à piston de 250 μL .

- Evaporation à sec sous azote.

On obtient ainsi 5 μmol de soluté, étalé sur les parois du tube. Cette méthode permet une dissolution beaucoup plus rapide que lorsque le soluté est ajouté au système biphasique sous forme cristalline.

II.1.3. Partage avant ajout de cyclodextrines

- Ajout de 1 mL de phase aqueuse dans le tube-test.

Pipette en verre de 1 mL.

- Vortex de quelques secondes pour accélérer la dissolution.

- Ajout de 1 mL de phase organique dans le tube-test.

Pipette en verre de 1 mL.

- Vortex de 30 sec puis décantation.

- Prélèvement de 100 μL de phase organique du tube-test et dépôt dans un tube de 2 mL noté A.

Pipette à piston de 250 μL .

- Prélèvement de 100 μL de phase aqueuse du tube-test et dépôt dans un tube de 2 mL noté B.

Pipette à piston de 250 μL .

- Evaporation à sec sous azote.

II.1.4. Partage après ajout de cyclodextrines

- Ajout de 18 μmol de cyclodextrines dans le tube-test.

La concentration en cyclodextrines est donc de 18 μmol dans 900 μL de phase aqueuse soit une concentration de 20 mM.

- Vortex de 30 sec puis décantation.

- Prélèvement de 100 μL de phase organique du tube-test et dépôt dans un tube de 2 mL noté C.

Pipette à piston de 250 μL .

- Evaporation à sec sous azote.

II.1.5. Détermination des coefficients de partage

- Ajout de 500 μL de méthanol dans les tubes A, B et C.

Pipette en verre de 500 μL .

- Analyse CPL des solutions A, B et C.
- Mesure de l'aire du pic du soluté pour chacune des solutions.
- Détermination des coefficients de partage avant (P) et après (P') ajout de cyclodextrines.

Cette première méthode est obligatoirement utilisée lorsque le partage du soluté avant l'ajout de CDs est inconnu, lors de l'étude de l'influence de la composition de chacune des phases par exemple.

II.2. Seconde méthode

Les étapes I.2.1 et I.2.2 sont identiques aux étapes I.1.1 et I.1.2 de la première méthode.

II.2.3. Complexation en phase aqueuse

- Ajout de 1 mL de phase aqueuse dans le tube-test.

Pipette en verre de 1 mL.

- Vortex de quelques secondes pour accélérer la dissolution.
- Ajout de 20 μmol de cyclodextrines dans le tube-test.

La concentration en cyclodextrines est donc de 20 μmol dans 1000 μL de phase aqueuse soit une concentration de 20 mM.

- Vortex de 30 sec puis décantation.

II.2.4. Extraction par la phase organique

- Ajout de 1 mL de phase organique dans le tube-test.

Pipette en verre de 1 mL.

- Vortex de 30 sec puis décantation.
- Prélèvement de 100 µL de phase organique du tube-test et dépôt dans un tube de 2 mL noté C.

Pipette à piston de 250 µL.

- Evaporation à sec sous azote.

II.2.5. Détermination des coefficients de partage

- Ajout de 500 µL de méthanol dans les tubes A, B et C*.

Pipette en verre de 500 µL.

- Analyse HPLC des solutions A, B et C.
- Mesure de l'aire du pic du soluté pour chacune des solutions.
- Détermination des coefficients de partage sans (P) et avec (P') cyclodextrines.

* Les tubes A et B sont issus d'un témoin préparé selon les étapes I.1, I.2 et I.3 de la première méthode.

Cette seconde méthode peut être utilisée lors d'une série d'expériences où la composition du système biphasique est fixée et où le partage du soluté avant l'ajout de CDs est connu, lors de l'étude de l'influence de la nature des CDs par exemple. Seul un témoin est préparé pour obtenir les tubes A et B. Cette méthode permet ainsi d'éviter de nombreux prélèvements.

III. CALCULS

Les coefficients de partage du soluté P (sans CDs) et P' (avec CDs) sont donnés par :

$$P = \frac{C_{aq}}{C_{orga}} = \frac{B}{A}$$

$$P' = \frac{C'_{aq}}{C'_{orga}} = \frac{C_{aq} + C_{orga} - C'_{orga}}{C'_{orga}} = \frac{C_{aq} + C_{orga}}{C'_{orga}} - 1 = \frac{B + A}{C} - 1$$

Avec C_{aq} et C'_{aq} , les concentrations du soluté dans la phase aqueuse sans et avec CDs et C_{orga} et C'_{orga} , les concentrations du soluté dans la phase organique sans et avec CDs. Ces concentrations sont déterminées par CPL comme décrit ci-dessous.

Les proportions de soluté présent au sein de la phase aqueuse n_{aq} (sans CDs) et n'_{aq} (avec CDs) sont données par :

$$n_{aq} = \frac{C_{aq}}{C_{aq} + C_{orga}} \times 100 = \frac{B}{B + A} \times 100$$

$$n'_{aq} = \frac{C'_{aq}}{C'_{aq} + C'_{orga}} \times 100 = \frac{C_{aq} + C_{orga} - C'_{orga}}{C_{aq} + C_{orga}} \times 100 = 1 - \frac{C'_{orga}}{C_{aq} + C_{orga}} \times 100 = 1 - \frac{C}{B + A} \times 100$$

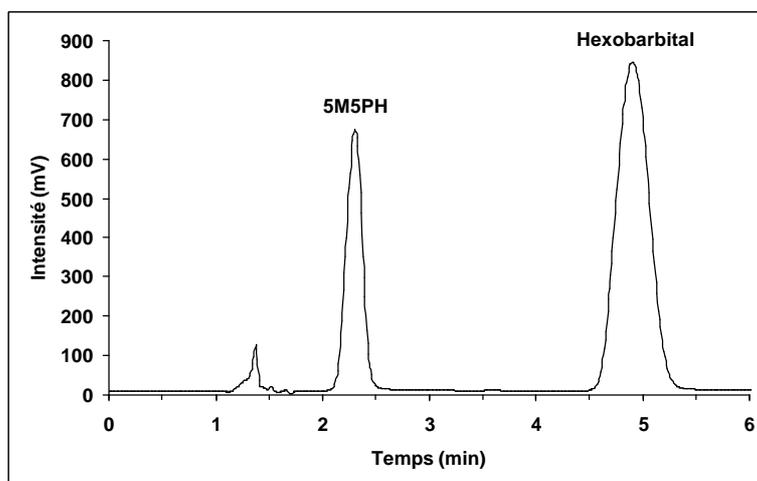
La proportion de soluté complexé n_{comp} est donnée par :

$$n_{comp} = n'_{aq} - n_{aq}$$

IV. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

Le système chromatographique est composé des éléments suivants : une pompe quaternaire Merck-Hitachi (Darmstadt, Allemagne) modèle Lachrom L-7100, une vanne d'injection Rhéodyne (Cotati, CA, USA) modèle 7725 équipée d'une boucle de 20 μ L et un détecteur ultra-violet ABI Analytical Kratos division (Eppstein, Allemagne) modèle Spectroflow 783 ($\lambda=220$ nm ; range=0,002). Les données sont collectées par le logiciel EZChrom Elite (Merck, Darmstadt, Allemagne) version 2.5.

Les analyses des tubes A, B et C sont effectuées à température ambiante sur une colonne Hypercarb (100 x 4,6 mm ; 5 μ m) de ThermoQuest Hypersil (Runcorn, GB) avec une phase mobile H₂O/ACN (65/35) et un débit de 1 mL/min. Le chromatogramme ci-dessous montre la rétention des deux solutés dans ces conditions.



V. SPECTROMETRIE DE MASSE ELECTROSPRAY (ESI)

V.1. Préparation des solutions infusées

Les solutions mères, à partir desquelles sont préparées les solutions infusées, sont les suivantes : solution aqueuse d'acétate d'ammonium à 1 M, solutions aqueuses de chacune des CDs à 1 mM et solutions de chacun des solutés à 1 mM dans le méthanol.

Les solutions infusées sont préparées à partir de ces solutions dans des fioles de 10 mL en ajoutant le volume nécessaire de chaque solution mère à la pipette de précision. Tout d'abord, les solutés sont pipetés et le méthanol est évaporé sous azote. Ensuite, l'acétate d'ammonium, les CDs, l'acétonitrile et l'eau sont ajoutés.

Les analyses effectuées 1 H et 24 H après la préparation des solutions n'ont pas montré de différence.

V.2. Spectromètre de masse Sciex API 300

Les analyses effectuées sur le spectromètre de masse API 300 triple quadripôle (Perkin-Elmer Sciex, Forster City, CA, USA) sont réalisées en mode d'ionisation positive avec une source TurbolonSpray chauffée à 100°C. L'azote a été utilisé comme gaz de nébulisation et gaz rideau.

Les paramètres du spectromètre de masse sont réglés de la façon suivante : débit du gaz de nébulisation, NEB = 8 (1,2 L/min) ; débit du gaz rideau, CUR = 6 (0,9 L/min) ; tension de spray, IS = 5500 V ; température de la source, TEM = 100°C ; tension de l'orifice, DP = 20 V ; tension de l'anneau, FP = 200 V ; tension du quadripôle Q₀, EP = 10V.

Les spectres de masse sont enregistrés entre 100 et 3000 Th par incrément de 1 Th. Chaque spectre est le résultat de l'accumulation de 50 balayages. Les solutions sont infusées à un débit de 10 µL/min grâce à une pompe seringue Harvard modèle 22 (Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA, USA).

V.3. Spectromètre de masse Micromass Quattro Ultima

Les analyses effectuées sur le spectromètre Quattro Ultima triple quadripôle (Micromass UK Limited, Manchester, Angleterre) sont réalisées en mode d'ionisation positive avec une source ZSpray chauffée à 70°C. L'azote est utilisé comme gaz de nébulisation, gaz de désolvatation et gaz de cône.

Les paramètres du spectromètre de masse sont réglés de la façon suivante : débit du gaz de désolvatation : 500 L/h ; température du gaz de désolvatation : 100°C ; tension du capillaire : 4 kV ; température de la source : 70 °C ; tension de cône : 55 V ; débit du gaz de cône : 50 L/h ; RF Lens 1 : 30 ; Aperture : 0 ; RF Lens : 0.

Les spectres de masse sont enregistrés entre 400 et 2000 Th à raison de 4 points/Th et sont l'accumulation de 50 balayages. Les solutions sont infusées à un débit de 20 µL/min grâce à une pompe seringue Harvard modèle 22 (Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA, USA).

ANNEXE VI

Rapports m/z des adduits ammonium de
b-cyclodextrines méthylées et de leurs complexes

Nombre de groupes méthyle par CD	Cyclodextrines					Complexes				
	[CD+2NH ₄] ²⁺	[CD+NH ₄] ⁺	[2CD+NH ₄] ²⁺	[3CD+2NH ₄] ²⁺	[4CD+3NH ₄] ³⁺	[5CD+3NH ₄] ³⁺	CD+M+2NH ₄ ²⁺	CD+H+2NH ₄ ²⁺	[CD+M+NH ₄] ⁺	[CD+H+NH ₄] ⁺
0	585,5	1153,0	2288,0	1720,5	1531,3	1909,7	680,5	703,7	1343,0	1389,3
1	592,5	1167,0	2316,0	1741,5	1550,0	1933,0	687,5	710,7	1357,0	1403,3
2	599,5	1181,0	2344,0	1762,5	1568,7	1956,3	694,5	717,7	1371,0	1417,3
3	606,5	1195,0	2372,0	1783,5	1587,3	1979,7	701,5	724,7	1385,0	1431,3
4	613,5	1209,0	2400,0	1804,5	1606,0	2003,0	708,5	731,7	1399,0	1445,3
5	620,5	1223,0	2428,0	1825,5	1624,7	2026,3	715,5	738,7	1413,0	1459,3
6	627,5	1237,0	2456,0	1846,5	1643,3	2049,7	722,5	745,7	1427,0	1473,3
7	634,5	1251,0	2484,0	1867,5	1662,0	2073,0	729,5	752,7	1441,0	1487,3
8	641,5	1265,0	2512,0	1888,5	1680,7	2096,3	736,5	759,7	1455,0	1501,3
9	648,5	1279,0	2540,0	1909,5	1699,3	2119,7	743,5	766,7	1469,0	1515,3
10	655,5	1293,0	2568,0	1930,5	1718,0	2143,0	750,5	773,7	1483,0	1529,3
11	662,5	1307,0	2596,0	1951,5	1736,7	2166,3	757,5	780,7	1497,0	1543,3
12	669,5	1321,0	2624,0	1972,5	1755,3	2189,7	764,5	787,7	1511,0	1557,3
13	676,5	1335,0	2652,0	1993,5	1774,0	2213,0	771,5	794,7	1525,0	1571,3
14	683,5	1349,0	2680,0	2014,5	1792,7	2236,3	778,5	801,7	1539,0	1585,3
15	690,5	1363,0	2708,0	2035,5	1811,3	2259,7	785,5	808,7	1553,0	1599,3
16	697,5	1377,0	2736,0	2056,5	1830,0	2283,0	792,5	815,7	1567,0	1613,3
17	704,5	1391,0	2764,0	2077,5	1848,7	2306,3	799,5	822,7	1581,0	1627,3
18	711,5	1405,0	2792,0	2098,5	1867,3	2329,7	806,5	829,7	1595,0	1641,3
19	718,5	1419,0	2820,0	2119,5	1886,0	2353,0	813,5	836,7	1609,0	1655,3
20	725,5	1433,0	2848,0	2140,5	1904,7	2376,3	820,5	843,7	1623,0	1669,3
21	732,5	1447,0	2876,0	2161,5	1923,3	2399,7	827,5	850,7	1637,0	1683,3

Pour les complexes, M : 5-méthyl-5-phénylhydantoïne (5M5PH) et H : hexobarbital

ANNEXE VII

Communications

I. PUBLICATIONS

*Characterization of a new methylated **b**-cyclodextrin with a low degree of substitution by electrospray ionization mass spectrometry and liquid chromatography/mass spectrometry.*

R. Jacquet, C. Elfakir, M. Lafosse.

Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2005, 19, 3097-3102.

*Characterization of a new methylated **b**-cyclodextrin with a low degree of substitution by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and liquid chromatography using evaporative light scattering detection.*

R. Jacquet, P. Favetta, C. Elfakir, M. Lafosse.

Journal of Chromatography A, 2005, 1083, 106-112.

*Liquid chromatography analysis of monosubstituted sulfobutylether-**b**-cyclodextrin isomers on porous graphitic carbon.*

R. Jacquet, R. Pennanec, C. Elfakir, M. Lafosse.

Journal of Separation Science, 2004, 27, 1221-1228.

II. COMMUNICATIONS PAR AFFICHES

Evaluation de la spectrométrie de masse à ionisation électrospray pour l'étude du pouvoir complexant des cyclodextrines méthylées.

R. Jacquet, C. Elfakir, M. Lafosse.

23^{ème} Journées Françaises de Spectrométrie de Masse, Nantes, septembre 2006.

Analyse de complexes de cyclodextrines méthylées par spectrométrie de masse.

R. Jacquet, C. Elfakir, M. Lafosse.

Forum Labo - Forum Biotech 2006, Paris, mars 2006.

*Combination of several analytical techniques for the characterization of methylated **b**-cyclodextrins with varying degree of substitution (NMR, MS, LC and LC-MS).*

R. Jacquet, P. Favetta, C. Elfakir, M. Lafosse.

SCBA 2005, 1^{er} Symposium de Chimie et Biologie Analytique, Montpellier, septembre 2005.

Evaluation of centrifugal partition chromatography using cyclodextrins for chiral separation.

R. Jacquet, C. Elfakir, M. Lafosse.

ISC 2004, 25th International Symposium on Chromatography, Paris, octobre 2004.

Chiral separation using centrifugal partition chromatography and cyclodextrins.

R. Jacquet, C. Elfakir, M. Lafosse.

ICS 2004, 12th International Cyclodextrin Symposium, Montpellier, mai 2004.

*Optimisation de la séparation des 3 isomères de la sulfobutylether-**b**-cyclodextrine monosubstituée sur carbone graphitique poreux.*

R. Jacquet, R. Pennanec, C. Elfakir, M. Lafosse.

Forum Labo - Forum Biotech 2004, Paris, mars 2004.

*Intérêt du carbone graphitique poreux pour l'analyse et l'isolement semi-préparatif de sulfobuthyléther-**b**-cyclodextrines. Caractérisation par SM et RMN.*

R. Jacquet, R. Pennanec, C. Elfakir, M. Lafosse, A. Petit, W. Luijten.

SEP 2003, 5^{ème} Congrès Francophone sur les Techniques Séparatives et les Couplages, Lyon, mai 2003.

TITRE : Cyclodextrines hydrophiles : caractérisation et étude de leurs propriétés énantiométriques et complexantes. Utilisation de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse.

RESUME : De par leurs propriétés complexantes et énantiométriques, les cyclodextrines (CDs) sont largement utilisées dans les industries pharmaceutique, cosmétique, agroalimentaire, etc. ainsi qu'en chimie analytique. Les travaux présentés dans ce manuscrit concernent différents domaines d'étude des CDs : leur caractérisation, leur utilisation en tant que sélecteurs chiraux et l'analyse de leurs complexes.

Dans la première partie, une nouvelle CD méthylée faiblement substituée a été caractérisée par différentes techniques analytiques, permettant ainsi l'obtention d'informations complémentaires menant à une meilleure connaissance de la composition du mélange commercial. D'autre part, la séparation par chromatographie en phase liquide (CPL) des trois isomères de la sulfobutyléthér- β -CD monosubstituée a été optimisée sur carbone graphite poreux (PGC) en augmentant la température de la colonne.

La deuxième partie a porté sur l'évaluation du système chromatographique PGC / CDs méthylées pour la séparation chirale en CPL. Outre sa grande résistance physique et chimique, le PGC s'est révélé plus sélectif que les colonnes de silice greffée habituellement employées pour ce type de séparation et a nécessité une quantité moindre de CDs dans la phase mobile.

Enfin, dans la troisième partie, les complexes de différentes CDs méthylées avec des solutés test ont été étudiés par des expériences de partage liquide-liquide et par spectrométrie de masse à ionisation électrospray. La comparaison des résultats obtenus par ces deux méthodes a révélé que les signaux enregistrés en ESI-SM ne reflètent pas les équilibres existant en solution.

MOTS-CLEFS : cyclodextrines, chromatographie en phase liquide, spectrométrie de masse, carbone graphite poreux, séparations chirales, complexes.

TITLE : Hydrophilic cyclodextrins : characterisation and study of their enantioselective and complexing properties. Use of liquid chromatography and mass spectrometry.

ABSTRACT : Thank to their complexing and enantioselective properties, cyclodextrins (CDs) are widely used in pharmaceutical, cosmetic and food industries as well as in analytical chemistry. The present works concern different fields of CDs study : their characterisation, their use as chiral selectors and the analysis of their complexes.

In the first part, a new methylated CD, slightly substituted, has been characterised by different analytical techniques, allowing the acquisition of complementary information leading to a better knowledge of the commercial mixture composition. In addition, the separation by liquid chromatography (LC) of the three isomers of the monosubstituted sulfobutylether- β -CD was optimised on porous graphitic carbon (PGC) by increasing the column temperature.

The second part concerned the evaluation of the chromatographic system PGC / methylated CDs for chiral separation in LC. In addition to its high physical and chemical resistance, the PGC appeared more selective than the grafted silica columns usually used for this type of separation and required smaller quantities of CDs in the mobile phase.

At last, in the third part, complexes of different methylated CDs with test solutes were studied by liquid-liquid partition experiments and by electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS). The comparison of the results obtained by these two methods showed that signals acquired in ESI-SM do not reflect the solution equilibria.

KEY WORDS : cyclodextrins, liquid chromatography, mass spectrometry, porous graphitic carbon, chiral separations, complexes.

DISCIPLINE : Chimie et physicochimie des composés d'intérêt biologique

LABORATOIRE : Institut de chimie organique et analytique (ICOA), UMR CNRS 6005, FR 2708, Université d'Orléans, rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans Cedex 2, France.