



**HAL**  
open science

**Intérêt du détecteur à dichroïsme circulaire en chromatographie liquide et du détecteur conductimétrique à couplage capacitif en électrophorèse capillaire pour l'analyse de molécules chirales. Applications aux composés pharmaceutiques et aux pesticides**

Marie Lecoœur-Lorin

► **To cite this version:**

Marie Lecoœur-Lorin. Intérêt du détecteur à dichroïsme circulaire en chromatographie liquide et du détecteur conductimétrique à couplage capacitif en électrophorèse capillaire pour l'analyse de molécules chirales. Applications aux composés pharmaceutiques et aux pesticides. Autre. Université d'Orléans, 2008. Français. NNT: . tel-00362022

**HAL Id: tel-00362022**

**<https://theses.hal.science/tel-00362022v1>**

Submitted on 17 Feb 2009

**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.



**UNIVERSITÉ D'ORLÉANS**



**ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES**  
**INSTITUT DE CHIMIE ORGANIQUE ET ANALYTIQUE**

**THÈSE** présentée par :

**Marie LECOEUR LORIN**

soutenue le : **3 décembre 2008**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : **Chimie Analytique**

**Intérêt du détecteur à dichroïsme circulaire en chromatographie liquide et du détecteur conductimétrique à couplage capacitif en électrophorèse capillaire pour l'analyse de molécules chirales**

**Applications aux composés pharmaceutiques et aux pesticides**

**THÈSE dirigée par :**

**Philippe MORIN**

Professeur – Université d'Orléans

**RAPPORTEURS :**

**Claude VACCHER**

Professeur – Université de Lille

**Jean-Luc VEUTHEY**

Professeur – Université de Genève

---

**JURY :**

**Claude VACCHER**

Professeur – Université de Lille

**Jean-Luc VEUTHEY**

Professeur – Université de Genève

**Pierre GAREIL**

Professeur – Ecole Nationale de Chimie de Paris

**Jean-Paul RIBET**

Directeur du Département Chimie – Pierre Fabre, Castres

**Michel LAFOSSE**

Professeur – Université d'Orléans

**Philippe MORIN**

Professeur – Université d'Orléans

**Raphaël DELEPEE**

Docteur – Université d'Orléans





UNIVERSITÉ D'ORLÉANS



*ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES*  
INSTITUT DE CHIMIE ORGANIQUE ET ANALYTIQUE

**THÈSE** présentée par :

**Marie LECOEUR LORIN**

soutenue le : **3 décembre 2008**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : **Chimie Analytique**

**Intérêt du détecteur à dichroïsme circulaire en chromatographie liquide et du détecteur conductimétrique à couplage capacitif en électrophorèse capillaire pour l'analyse de molécules chirales**

**Applications aux composés pharmaceutiques et aux pesticides**

**THÈSE dirigée par :**

**Philippe MORIN**

Professeur – Université d'Orléans

**RAPPORTEURS :**

**Claude VACCHER**

Professeur – Université de Lille

**Jean-Luc VEUTHEY**

Professeur – Université de Genève

---

**JURY :**

**Claude VACCHER**

Professeur – Université de Lille

**Jean-Luc VEUTHEY**

Professeur – Université de Genève

**Pierre GAREIL**

Professeur – Ecole Nationale de Chimie de Paris

**Jean-Paul RIBET**

Directeur du Département Chimie – Pierre Fabre, Castres

**Michel LAFOSSE**

Professeur – Université d'Orléans

**Philippe MORIN**

Professeur – Université d'Orléans

**Raphaël DELEPEE**

Docteur – Université d'Orléans



*A mes Parents,  
A mes Grands-Parents,*

*A Alexandre,  
A Thomas*



# Remerciements

*Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés à l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) à Orléans, dans l'équipe du Professeur Michel Lafosse. Je remercie le Professeur Lafosse de m'avoir accueillie dans son laboratoire ainsi que les Professeurs Gérard Guillaumet et Olivier Martin, ancien et actuel Directeurs de l'ICOA pour m'avoir permis de préparer mon doctorat dans leur institut.*

*Cette thèse a été réalisée sous la direction du Professeur Philippe Morin. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour la confiance qu'il m'a toujours accordée, son encadrement scientifique et ses qualités humaines qui m'ont permis de réaliser sereinement cette thèse.*

*Je remercie sincèrement Monsieur le Professeur Claude Vaccher, responsable du Laboratoire d'Analyse du Médicament de la faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille et Monsieur le Professeur Jean Luc Veuthey, Directeur du Laboratoire de Chimie Analytique Pharmaceutique de l'Université de Genève, de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.*

*Je souhaite aussi remercier Monsieur le Professeur Pierre Gareil, responsable de l'équipe de chimie analytique au sein du Laboratoire d'Electrochimie et de Chimie Analytique situé à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris et Monsieur le Professeur Michel Lafosse d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.*

*J'adresse mes plus vifs remerciements à Monsieur Jean-Paul Ribet, responsable du département analytique du Centre de Recherche Pierre Fabre de Castres pour sa gentillesse et sa disponibilité durant notre collaboration.*

*Mes remerciements vont également à Monsieur Raphaël Delépée, Maître de conférences à l'Université d'Orléans pour ses conseils avisés, son soutien quotidien et sa bonne humeur. Ces quelques lignes expriment la reconnaissance d'une certaine « P'tite fille » à son « stagiaire ».*

*Je tiens à remercier les laboratoires et sociétés qui ont contribué à l'avancement de mes travaux :*

- Le Centre de Biophysique Moléculaire, en la personne du Docteur Maurizot, pour m'avoir permis l'enregistrement des spectres de dichroïsme circulaire,*
- La société Bayer CropScience (Docteur Desbordes) pour le don de certains pesticides,*
- Les Laboratoires Pierre Fabre pour leur précieuse collaboration.*

*J'associe à ces remerciements, les enseignants chercheurs du laboratoire, Patrick Chaimbault, Emilie Destandau, Claire Elfakir, Patrick Favetta, Eric Lesellier, Benoit Maunit et Caroline West pour leurs conversations enrichissantes et leur soutien.*

*Karim Keddadouche, tu as toujours répondu présent lors de mes problèmes de « Trouble dark error » ou « Lamp signal Low » et je t'en remercie. Merci également pour le temps que tu m'as consacré pour m'expliquer le principe de fonctionnement des filtres électroniques, des modulateurs piézoélectriques... et tous ces termes électroniques qui te sont si familiers et que je redoute tant. Je n'oublierai pas nos conversations qui opposaient les « Marseillais » aux « Gens de la forêt ».*

*Parmi ces remerciements, je souhaite associer mes collègues et amis, anciens et actuels thésards de l'ICOA, Raluca, Bérengère, Boutayna, Romain, Marie-Elisabeth, Aristote, Claire, Marine, Vincent, Bérengère, Jean Marie, Nathalie, Sandrine, Laëtitia... pour leur soutien et leur écoute. Je me rappellerai des conversations philosophiques sur l'utilisation des produits « bio » ou notre contribution à la pollution de la planète. Malgré tous mes efforts, je crois que je n'arriverai jamais à prononcer « A demain » en Roumain, « Salut » en Polonais et*

*le « Rha » arabe. Boutayna, Raluca et Claire, futures docteurs, je vous souhaite plein de bonnes choses pour achever en toute quiétude votre thèse.*

*Merci à mes petites mains, Alice Vibert et Guillaume Bossard, de passage dans notre laboratoire durant quelques mois, pour avoir participé activement à l'avancement de mes travaux.*

*Une pensée revient à tous les membres de l'équipe « Chtie », Messieurs Bonte et Vaccher, Marie-Pierre, Catherine, Jean-François, Emmanuelle et bien évidemment Cécile pour m'avoir initiée aux séparations chirales. De part leur rigueur et leur enthousiasme, ils ont su me donner le goût à la recherche. Sans cette année passée dans leur laboratoire lillois, je n'aurais certainement pas envisagé la préparation d'un doctorat.*

*Merci à ma petite Pauline pour notre complicité et notre amitié qui se sont construites dans les amphis de la fac. Tes longues conversations téléphoniques, au grand désarroi de nos conjoints, ont toujours su me remonter le moral dans les moments les plus difficiles.*

*Ces remerciements ne pourraient exister sans une pensée affectueuse pour ma famille. Merci Papa, Maman pour votre soutien et l'attention que vous ne cesserez de m'accorder tout au long de ma vie.*

*Enfin, je ne remercierai jamais assez l'homme de ma vie, Alexandre, pour son soutien, son réconfort de chaque instant et pour tous les moments que nous partageons ensemble depuis 9 ans. Durant ces trois années de thèse, notre vie fut riche d'heureux événements : notre mariage et notre plus belle réussite, notre fils Thomas.*



# Sommaire

Liste des abréviations.....	I
Liste des symboles .....	III
Lexique .....	V
Introduction générale.....	1

## Chapitre I

---

### ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES TECHNIQUES UTILISEES POUR LA RESOLUTION D'ENANTIOMERES

---

<b>I. Généralités sur la stéréoisométrie et ses conséquences .....</b>	<b>5</b>
I.1. Rappels historiques.....	5
I.1. Terminologie .....	6
I.1.1. <i>L'énantiométrie</i> .....	6
I.1.2. <i>La diastéréoisométrie</i> .....	12
I.2. Nomenclature des énantiomères.....	13
I.2.1. <i>Les descripteurs d / l</i> .....	13
I.2.2. <i>Le système de Cahn, Ingold et Prelog (CIP)</i> .....	13
I.2.3. <i>La convention de Fischer</i> .....	14
I.3. Propriétés physico-chimiques des stéréoisomères .....	15
I.4. Implication de la stéréoisométrie et ses conséquences .....	15
I.4.1. <i>La chiralité au quotidien</i> .....	15
I.4.2. <i>Incidence de la chiralité dans le domaine thérapeutique</i> .....	16
<b>II. Sélectivité chimique des énantiomères : synthèse et dédoublement .....</b>	<b>20</b>
II.1. La synthèse asymétrique et les réactions de biotransformation.....	20
II.2. La séparation des énantiomères .....	22
II.2.1. <i>Les différentes techniques analytiques</i> .....	22
II.2.2. <i>La résolution des énantiomères en CPL et en EC</i> .....	23
II.3. Classification des sélecteurs chiraux.....	28
II.3.1. <i>Les sélecteurs chiraux conventionnels</i> .....	28
II.3.2. <i>Les sélecteurs chiraux spécifiques d'un énantiomère cible</i> .....	49
II.3.3. <i>Bilan sur le choix des sélecteurs chiraux en CPL</i> .....	51
<b>III. Sélectivité optique des énantiomères : la détection par dichroïsme circulaire .....</b>	<b>53</b>
III.1. Théorie des propriétés chiroptiques .....	53
III.1.1. <i>La théorie de Fresnel</i> .....	53
III.1.2. <i>La rotation optique</i> .....	53
III.1.3. <i>La dispersion rotatoire optique</i> .....	55
III.1.4. <i>Le dichroïsme circulaire</i> .....	56

III.2. Acquisition d'un spectre de dichroïsme circulaire .....	58
III.2.1. Description de l'appareillage .....	58
III.2.2. Interprétation d'un spectre de dichroïsme circulaire .....	60
III.2.3. Influence de l'environnement chimique sur le signal dichroïque ....	62
III.3. Détermination de la pureté énantiomérique par chromatographie liquide couplée à la détection par dichroïsme circulaire .....	65
III.4. Synthèse et bilan des études antérieures concernant la détection par dichroïsme circulaire.....	70
<b>IV. Conclusion .....</b>	<b>71</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>72</b>

## **Chapitre II**

---

### **APPORT DU DETECTEUR A DICHROISME CIRCULAIRE EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE POUR LE CONTROLE QUALITE DE SPECIALITES PHARMACEUTIQUES**

---

<b>I. Introduction .....</b>	<b>77</b>
<b>II. Evaluation du détecteur à dichroïsme circulaire lors de l'analyse chromatographique énantiosélective d'un anti-parkinsonien (l'efaroxan). 78</b>	<b>78</b>
II.1. La maladie de Parkinson et ses traitements .....	78
II.2. Structure et propriétés physico-chimiques de l'efaroxan .....	81
II.3. Etude bibliographique des séparations chirales de l'efaroxan.....	81
II.4. Article 1: Sensitivity Improvement of Circular Dichroism Detection in HPLC by using a Low-Pass Electronic Noise Filter. Application to the Enantiomeric Purity of a Basic Drug.....	85
II.4.1. Introduction.....	86
II.4.2. Experimental .....	88
II.4.3. Results and discussion .....	91
II.4.4. Conclusion.....	101
II.5. Bilan sur les performances du détecteur à dichroïsme circulaire en CPL chirale .....	102

### **III. Détermination de la pureté énantiomérique d'un principe actif pharmaceutique en CPL non énantiosélective en utilisant un détecteur à dichroïsme circulaire..... 103**

III.1. Influence de la température sur la stabilité du signal dichroïque lors de l'analyse d'un anti-dépresseur : le milnacipran.....	103
<i>III.1.1. Les neurotransmetteurs impliqués dans la dépression.....</i>	<i>103</i>
<i>III.1.2. Les traitements de la dépression .....</i>	<i>104</i>
<i>III.1.3. Propriétés physico-chimiques du milnacipran .....</i>	<i>107</i>
<i>III.1.4. Etude bibliographique concernant l'analyse du milnacipran .....</i>	<i>108</i>
<i>III.1.5. Article 2: Chiral analysis of milnacipran by a non-chiral HPLC - circular dichroism: Improvement of the linearity of dichroic response by temperature control.....</i>	<i>110</i>
<i>III.1.6. Conclusion sur l'analyse du milnacipran en CPL achirale – DC/UV .....</i>	<i>122</i>
III.2. Article 3: Validation of a method using an achiral liquid chromatography sorbent and a circular dichroism detector. Analysis of the efaroxyan enantiomers...	123
<i>Introduction .....</i>	<i>124</i>
<i>III.2.1. Experimental .....</i>	<i>125</i>
<i>III.2.2. Results and discussion .....</i>	<i>129</i>
<i>III.2.3. Concluding remarks .....</i>	<i>138</i>
<i>III.2.4. Conclusion sur l'analyse de l'efaroxan en CPL achirale – DC/UV .....</i>	<i>139</i>
III.3. Bilan sur l'intérêt du détecteur à dichroïsme circulaire en CPL non énantiosélective pour la détermination de la pureté énantiomérique de principes actifs .....	139

### **IV. Détermination simultanée de la pureté énantiomérique et de la pureté chimique d'un dérivé benzoxathiépine en CPL non énantiosélective en utilisant un détecteur à dichroïsme circulaire ..... 140**

IV.1. Les maladies coronariennes et leurs traitements .....	140
IV.2. Propriétés physico-chimiques d'un dérivé benzoxathiépine .....	142
IV.3. Etude bibliographique de l'analyse des benzoxathiépines.....	143
IV.4. Article 4: Simultaneous determination of optical and chemical purities of a drug with two chiral centers by liquid chromatography-circular dichroism detection on a non-chiral stationary phase .....	145
<i>IV.4.1. Introduction.....</i>	<i>146</i>
<i>IV.4.2. Theory .....</i>	<i>148</i>
<i>IV.4.3. Experimental .....</i>	<i>150</i>
<i>IV.4.4. Results and discussion .....</i>	<i>152</i>
<i>IV.4.5. Concluding remarks.....</i>	<i>164</i>
IV.5. Conclusion sur l'intérêt du détecteur à dichroïsme circulaire pour la détermination simultanée des puretés énantiomérique et chimique d'une benzoxathiépine.....	165

### **V. Conclusion..... 165**

### **Références bibliographiques..... 167**

## Chapitre III

# ANALYSE CHIRALE DE PRODUITS PHYTOSANITAIRES ET DEVELOPPEMENT DU DETECTEUR CONDUCTIMETRIQUE EN ELECTROPHORESE CAPILLAIRE

<b>I. Introduction .....</b>	<b>173</b>
<b>II. Séparation énantiosélective de pesticides possédant des atomes de phosphore et/ou de soufre comme centres d'asymétrie en EC .....</b>	<b>174</b>
II.1. Présentation générale des produits phytosanitaires .....	174
II.1.1. <i>Les principales familles de pesticides.....</i>	<i>174</i>
II.1.2. <i>Classification des insecticides.....</i>	<i>175</i>
II.1.3. <i>Les insecticides organophosphorés.....</i>	<i>175</i>
II.1.4. <i>Problèmes liés à l'utilisation des pesticides organophosphorés.....</i>	<i>178</i>
II.2. Méthodes d'analyse des pesticides organophosphorés .....	181
II.2.1. <i>La chromatographie en phase gazeuse.....</i>	<i>181</i>
II.2.2. <i>La chromatographie en phase liquide.....</i>	<i>181</i>
II.2.3. <i>L'électrophorèse capillaire.....</i>	<i>183</i>
II.3. Article 5 : Séparation des énantiomères de pesticides possédant des atomes de phosphore et/ou de soufre chiraux par électrophorèse capillaire .....	186
II.3.1. <i>Introduction.....</i>	<i>187</i>
II.3.2. <i>Matériels et méthodes.....</i>	<i>192</i>
II.3.3. <i>Résultats et discussion.....</i>	<i>195</i>
II.3.4. <i>Conclusion.....</i>	<i>203</i>
II.4. Article 6: Simultaneous enantioselective determination of fenamiphos and its two metabolites in soil sample by capillary electrophoresis.....	205
II.4.1. <i>Introduction.....</i>	<i>206</i>
II.4.1. <i>Materials and methods.....</i>	<i>208</i>
II.4.2. <i>Results and discussion.....</i>	<i>211</i>
II.4.3. <i>Concluding remarks.....</i>	<i>223</i>
II.5. Conclusion .....	224
<b>III. Intérêt du détecteur conductimétrique pour l'analyse des énantiomères d'amines dépourvues de groupements chromophores en EC .....</b>	<b>225</b>
III.1. Rappel sur la détection conductimétrique en électrophorèse capillaire .....	227
III.1.1. <i>Généralités.....</i>	<i>227</i>
III.1.2. <i>Appareillage.....</i>	<i>231</i>
III.1.3. <i>Critères de sélection du tampon.....</i>	<i>236</i>
III.1.4. <i>Principales utilisations du C<sup>4</sup>D en EC.....</i>	<i>237</i>
III.2. Article 7: Sensitivity improvement by using contactless conductivity rather than indirect UV detection for the determination of enantiomeric purity of amines by capillary electrophoresis .....	241
III.2.1. <i>Introduction.....</i>	<i>242</i>
III.2.2. <i>Materials and methods.....</i>	<i>244</i>
III.2.3. <i>Results and discussion.....</i>	<i>248</i>
III.2.4. <i>Concluding remarks.....</i>	<i>265</i>
III.3. Bilan sur l'intérêt du C <sup>4</sup> D en électrophorèse capillaire.....	266

<b>IV. Conclusion .....</b>	<b>267</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>269</b>
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>275</b>



## Liste des abréviations

<b>ACN</b>	Acétronitrile
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>C<sup>4</sup>D</b>	Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detector – Détecteur conductimétrique sans contact à couplage capacitif
<b>CCM</b>	Chromatographie sur Couche Mince
<b>CD</b>	Cyclodextrine
<b>CEC</b>	Capillary Electrokinetic Chromatography- Electrochromatographie
<b>18C<sub>6</sub>H<sub>4</sub></b>	Acide 2,3,11,12-18-couronne-6 tétracarboxylique
<b>CM-b-CD</b>	Carboxyméthyl-β-cyclodextrine
<b>CPG</b>	Chromatographie en Phase Gazeuse
<b>CPL</b>	Chromatographie en Phase Liquide
<b>CPS</b>	Chromatographie en Phase Supercritique
<b>CZE</b>	Capillary Zone Electrophoresis – Electrophorèse capillaire de zone
<b>DAD</b>	Diode Array Detector – Détecteur à barrette de diodes
<b>DC</b>	Dichroïsme circulaire
<b>DEA</b>	Diéthylamine
<b>DM-b-CD</b>	Diméthyl-β-cyclodextrine
<b>EC</b>	Electrophorèse Capillaire
<b>e.e.</b>	Excès Enantiomérique
<b>EKC</b>	ElectroKinetic Chromatography – Chromatographie électrocinétique
<b>EMEA</b>	European Medicines Agency – Agence Européenne du Médicament
<b>FEO</b>	Flux électroosmotique
<b>FID</b>	Flame Ionisation Detector – Détecteur à ionisation de flamme
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>HP-b-CD</b>	Hydroxypropyl-β-cyclodextrine
<b>HS-b-CD</b>	Highly Sulphated-β-cyclodextrine - β-cyclodextrine hautement sulfatée
<b>I</b>	Force ionique
<b>iBuOH</b>	Isobutanol
<b>ICH</b>	International Conference on Harmonization
<b>iPrOH</b>	Isopropanol
<b>LOD</b>	Limit of Detection – Limite de détection

<b>LOQ</b>	Limit of Quantification – Limite de quantification
<b>MEKC</b>	Micellar ElectroKinetic Chromatography - Electrophorèse micellaire
<b>MeOH</b>	Méthanol
<b>NACE</b>	Non Aqueous Capillary Electrophoresis – Electrophorèse capillaire en mode non aqueux
<b>nm</b>	Nanomètre
<b>n-hept</b>	n-heptane
<b>n-hex</b>	n-hexane
<b>OP</b>	Organophosphorus Pesticide – Pesticide organophosphoré
<b>p.e.</b>	Pureté Enantiomérique
<b>PGC</b>	Porous Graphitic Carbon – Carbone graphite poreux
<b>pH</b>	Potentiel Hydrogène
<b>p.o.</b>	Pureté Optique
<b>PSC</b>	Phase Stationnaire Chirale
<b>Rs</b>	Résolution
<b>SDS</b>	Sodium Dodecyl Sulfate – Dodécylsulfate de sodium
<b>SM</b>	Spectrométrie de masse
<b>t<sub>M</sub></b>	Temps de migration
<b>TM-b-CD</b>	Triméthyl-β-cyclodextrin
<b>t<sub>R</sub></b>	Temps de rétention
<b>UV</b>	Ultra-violet

## Liste des symboles

<b>a</b>	Pouvoir rotatoire (deg)
<b>B</b>	Champ magnétique (Tesla)
<b>C</b>	Capacité (Farad)
<b>De</b>	Différence entre les coefficients d'extinction molaire gauche et droit ( $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ )
<b>E</b>	Champ électrique ( $\text{V.m}^{-1}$ )
<b>e</b>	Coefficient d'absorption molaire ( $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ )
<b>G</b>	Conductance (S)
<b><math>\kappa</math></b>	Conductivité ( $\text{S.m}^{-1}$ )
<b>k</b>	Facteur de rétention
<b>l</b>	Longueur d'onde (nm)
<b>N</b>	Efficacité
<b>n</b>	Indice de réfraction
<b>Y</b>	Ellipticité ( $\text{rad.cm}^{-1}$ )
<b>R</b>	Résistance (Ohm)
<b>T</b>	Température (K)



## Lexique

Biréfringence circulaire : se dit d'un faisceau lumineux polarisé dont les vitesses de propagation de ses champs électriques gauche et droit sont différentes.

Chiralité : terme qui qualifie tout objet existant sous deux formes non superposables images l'une de l'autre dans un miroir.

Dextrogyre : se dit d'un stéréoisomère capable de faire tourner la lumière polarisée dans le sens des aiguilles d'une montre.

Diastéréoisomères : stéréoisomères qui ne sont ni superposables, ni images l'un de l'autre dans un miroir.

Distomère : énantiomère biologiquement peu actif voire inactif ou d'activité non recherchée.

Énantiomère (isomère optique) : molécule présente sous la forme de deux entités non superposables et images l'une de l'autre dans un miroir. Un objet chiral donne naissance à deux énantiomères.

Epimérisation : inversion d'un unique centre chiral sur une molécule en possédant plusieurs.

Eutomère : énantiomère possédant la majorité de l'activité biologique recherchée.

Excès énantiomérique : ce terme exprime l'excès de l'un des énantiomères par rapport à l'autre.

Isomères : molécules qui possèdent la même structure moléculaire mais qui diffèrent par l'enchaînement de leurs atomes.

Levogyre : se dit d'un stéréoisomère capable de faire tourner la lumière polarisée dans le sens inverse des aiguilles d'une montre.

Mélange racémique (racémate) : mélange équimolaire de deux énantiomères.

Pureté énantiomérique : elle représente le pourcentage de l'énantiomère présent majoritairement dans le mélange d'énantiomères.

Pureté optique : elle est déterminée par polarimétrie et se définit comme le rapport du pouvoir rotatoire de l'échantillon sur celui de l'énantiomère pur.

Stéréoisomères (isomères de configuration) : molécules possédant la même formule moléculaire mais qui diffèrent par l'arrangement spatial des atomes.



# *INTRODUCTION GENERALE*

---



---

## Introduction générale

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

Du fait de l'existence d'une chiralité naturelle chez de nombreux organismes vivants, les interactions ligand – récepteur sont sensibles à la configuration des énantiomères d'un xénobiotique. Ainsi, l'activité biologique d'un principe actif pharmaceutique chiral peut être différente d'un énantiomère à l'autre. L'administration d'un médicament sous sa forme racémique peut donc avoir des conséquences désastreuses si l'un des énantiomères est toxique. Tel a été le cas de la thalidomide, un sédatif, proposé aux femmes enceintes dans les années 1960 afin de soulager leurs nausées. Si l'énantiomère (*S*) a donné l'effet attendu, l'énantiomère (*R*) a provoqué la malformation irréversible de nombreux enfants. Dès lors, les autorités sanitaires et réglementaires ont exigé, lors du dépôt des droits d'exploitation d'un brevet, une documentation complète d'essais pharmacologiques, pharmacocinétiques et toxicologiques, tant sur le mélange racémique que sur chaque énantiomère pur. Ainsi, lorsque le principe actif d'un médicament est commercialisé sous une forme énantiomériquement pure, des méthodes analytiques doivent être développées afin de contrôler la présence éventuelle de traces de l'autre énantiomère inactif dans le lot de fabrication.

Ce travail de thèse a été consacré au développement de nouvelles méthodologies pour l'analyse énantiosélective de produits pharmaceutiques et phytosanitaires en chromatographie liquide (CPL) et en électrophorèse capillaire (EC).

Le premier chapitre bibliographique rappellera les notions de chiralité, puis son implication dans le monde du vivant, et enfin des différentes techniques de résolution des énantiomères. L'accent sera porté sur le choix du sélecteur chiral et de la technique

---

analytique selon la nature chimique des énantiomères analysés. Ce premier chapitre se terminera par la description d'un mode de détection moins usité, la détection chiroptique, pour l'analyse d'énantiomères en chromatographie en phase liquide.

Le deuxième chapitre sera dédié au développement du détecteur à dichroïsme circulaire pour l'analyse énantiosélective de molécules pharmaceutiques. Le principe de détection est basé sur la différence d'absorbance des lumières polarisées circulairement droite et gauche pour les deux énantiomères. Ce détecteur enregistre simultanément les signaux de dichroïsme circulaire et d'absorbance UV, et calcule leur rapport (facteur d'anisotropie). Ce facteur est proportionnel à l'excès énantiomérique tout en demeurant indépendant de la concentration totale en composé optiquement actif. Ce détecteur offre un gain de temps lors de la mise au point analytique en s'affranchissant de la séparation des énantiomères sur une colonne chromatographique chirale. Il semble donc particulièrement adapté pour répondre aux besoins analytiques des laboratoires pharmaceutiques.

Ainsi, il nous a paru judicieux d'évaluer les potentialités du détecteur à dichroïsme circulaire pour quantifier simultanément les impuretés optiques et chimiques de principes actifs de médicaments. Le choix de la longueur d'onde de détection, du milieu de solubilisation des analytes et l'utilisation d'un filtre électronique seront discutés afin d'améliorer la sensibilité de ce détecteur.

Le troisième chapitre sera tout d'abord consacré à l'analyse chirale de pesticides organophosphorés (OP) en électrophorèse capillaire. Ainsi, l'aptitude de l'EC sera évaluée pour résoudre des énantiomères possédant des atomes de phosphore ou de soufre comme centres d'asymétrie. L'analyse énantiosélective d'un pesticide, le fenamiphos, et de ses métabolites chiraux sera développée, pré-validée puis appliquée à des échantillons de sols contaminés.

Par la suite, les potentialités du détecteur conductimétrique sans contact à couplage capacitif ( $C^4D$ ) seront évaluées lors de l'analyse chirale d'amines dénuées de groupements chromophores en EC. Cette méthode sera validée et ses performances en terme de sensibilité seront comparées à celle de la détection UV indirecte.

# *CHAPITRE 1*

---

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES TECHNIQUES UTILISEES POUR LA RESOLUTION D'ENANTIOMERES**



## Chapitre 1

---

# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES TECHNIQUES UTILISEES POUR LA RESOLUTION D'ENANTIOMERES

## I. Généralités sur la stéréoisométrie et ses conséquences

### I.1. Rappels historiques

Les prémices de la chiralité sont dues aux travaux de Bartholin qui a découvert, dès 1669, le phénomène de double réfraction dans un cristal de calcite. Ce dédoublement des images transmises par ce cristal a permis à Huygens d'étayer sa théorie ondulatoire de la lumière.

En 1808, Malus a complété ces observations en découvrant que la lumière réfléchiée par une surface vitreuse possédait une polarisation.

Une année plus tard, l'abbé Haüy [1] a observé, lors du clivage d'un « spath calcaire » un rhomboèdre dont les troncatures n'étaient pas des « plans géométriques » mais étaient disposées « comme les degrés d'un escalier ». Des travaux complémentaires réalisés en 1811 par Arago ont mentionné que des lames de quartz convenablement taillées et disposées sur le parcours d'un rayon de lumière polarisée par réflexion ont provoqué une rotation du plan de polarisation par rapport à son orientation initiale. Arago en a déduit que les cristaux de quartz possédaient un pouvoir rotatoire.

En 1825, Biot a montré que certaines formes de quartz puis des solutions pures de substances naturelles (acide tartrique, essence de térébenthine, glucose) déviaient la lumière polarisée à gauche ou à droite alors que le mélange racémique était inactif [2].

Quelques années plus tard, en 1848, Pasteur a décrit la digestion privilégiée du (*L*)-tartrate d'ammonium par les moisissures *Penicillium glaucum* [3]. Il a fallu attendre 1874 et la théorie de Le Bel [4] et Van't Hoff [5] sur le carbone tétravalent pour concevoir une structure tridimensionnelle aux molécules et de ce fait expliquer la chiralité.

Enfin, en 1884, Lord Kelvin [2] a introduit pour la première fois le terme **chiralité**, mot dérivé du grec « *kheir* » signifiant « main » et qui qualifie « toute figure géométrique ou tout ensemble de points qui n'est pas superposable à son image dans un miroir ».

## **I.1. Terminologie**

Les **isomères** sont des molécules qui possèdent la même formule moléculaire mais qui diffèrent par l'enchaînement de leurs atomes (isomérisation de constitution), la position des groupements fonctionnels dans le squelette moléculaire (isomérisation de position) et l'arrangement spatial des atomes (isomérisation de configuration). Les isomères de configuration, appelés **stéréoisomères** regroupent les énantiomères et les diastéréoisomères.

### **I.1.1. L'énantiomérisation**

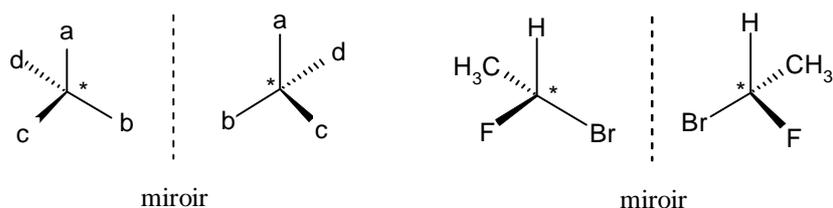
Les **énantiomères** ou **isomères optiques** sont deux entités non superposables, qui sont images l'une de l'autre dans un miroir. Le caractère chiral d'une substance est intimement lié à l'arrangement spatial des atomes qui la constituent. Ainsi, l'existence d'éléments structuraux stéréogènes tels qu'un centre, un axe ou un plan dans une molécule est responsable de sa chiralité [6]. La condition géométrique nécessaire et suffisante pour que deux entités ne soient pas superposables est l'absence de centres d'inversion (i) et de plans de symétrie ( $\sigma$ ) dans la structure moléculaire [7].

#### *a) Enantiomérisation introduite par un centre d'asymétrie*

Les molécules dont la chiralité est introduite par un centre d'asymétrie ne possèdent aucun élément de symétrie (centre d'inversion, axe de rotation, plan de symétrie) mis à part l'identité (E). Seuls les complexes métalliques de structure cristalline octaédrique dérogent à cette règle.

### a) Le carbone asymétrique

Au niveau moléculaire, l'asymétrie est principalement introduite par un atome de carbone tétravalent hybridé  $sp^3$  substitué par quatre groupements différents. Un des exemples les plus simples est le bromofluoroéthane (*Figure I.1*).

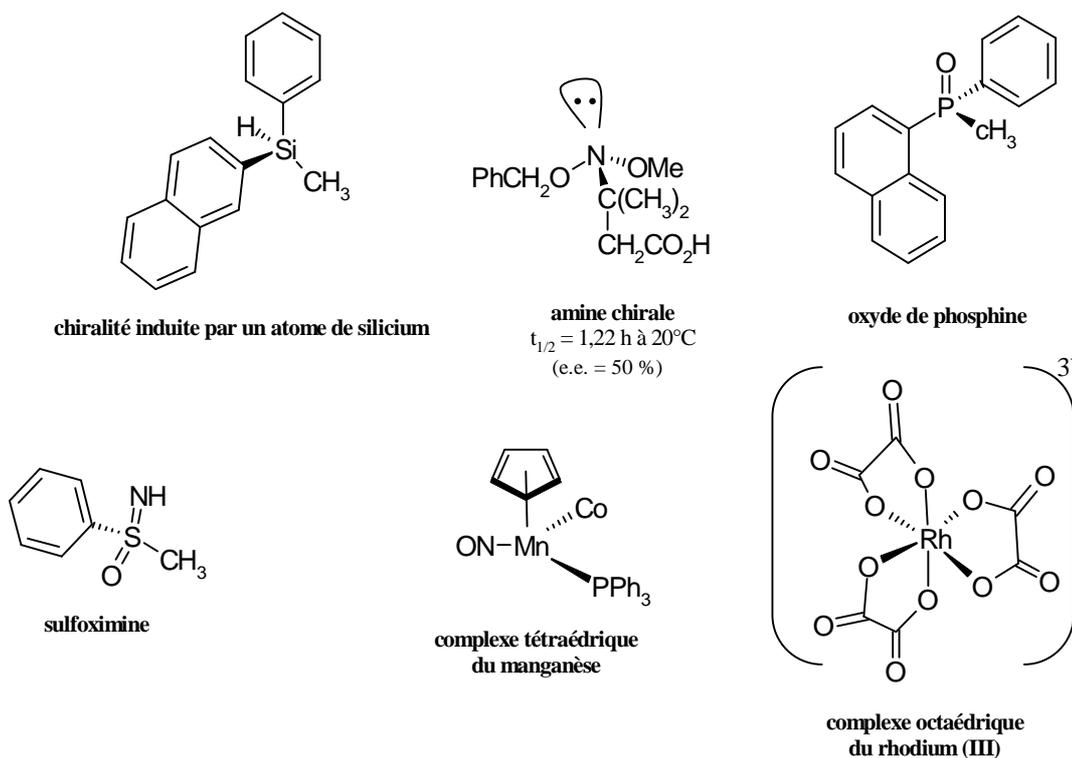


**Figure I.1:** Schéma représentatif de deux énantiomères.

a, b, c, d sont 4 substituants différents positionnés aux sommets d'un tétraèdre et \* représente l'atome de carbone asymétrique.

### b) Les atomes asymétriques tétraédriques hétéroatomiques

Parmi ces composés, on distingue tous les éléments appartenant à la quatorzième colonne de la classification périodique comme le silicium, le germanium, l'étain ou encore le plomb (*Figure I.2*).



**Figure I.2 :** Exemples de molécules possédant un centre stéréogène hétéroatomique.

Les amines tertiaires, avec trois substituants différents, ont une structure tétraédrique chirale. La présence du doublet non liant permet l'inversion des deux formes énantiomériques. Cette inversion est cependant trop rapide à température ambiante pour permettre la séparation des énantiomères. Toutefois, il est possible de séparer certaines amines à basse température ou lorsque l'azote porte des substituants encombrants.

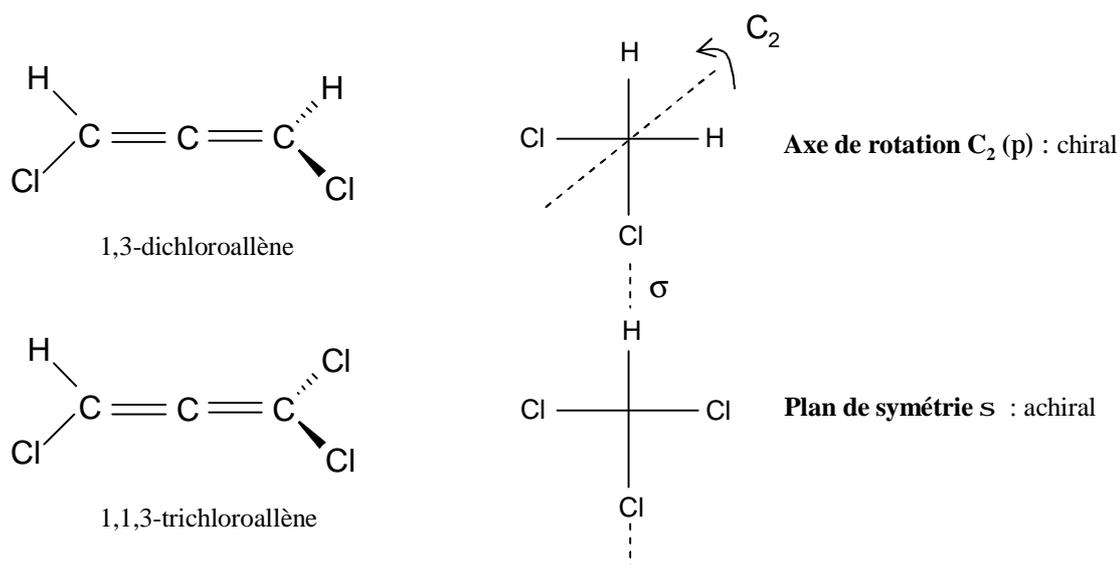
Les phosphines et les arsines s'inversent beaucoup plus lentement que les amines. Elles sont plus stables chimiquement et peuvent être chirales. Il en est de même pour les sulfoxydes, les sels de sulfonium et les sulfoximines.

Les métaux de transition présentant une coordination  $T_4$  sont également chiraux s'ils possèdent quatre ligands différents. Toutefois, ce sont les complexes octaédriques constitués d'un métal de transition, comme le rhodium, qui sont les plus rencontrés.

*b) Enantiométrie introduite par un axe de chiralité*

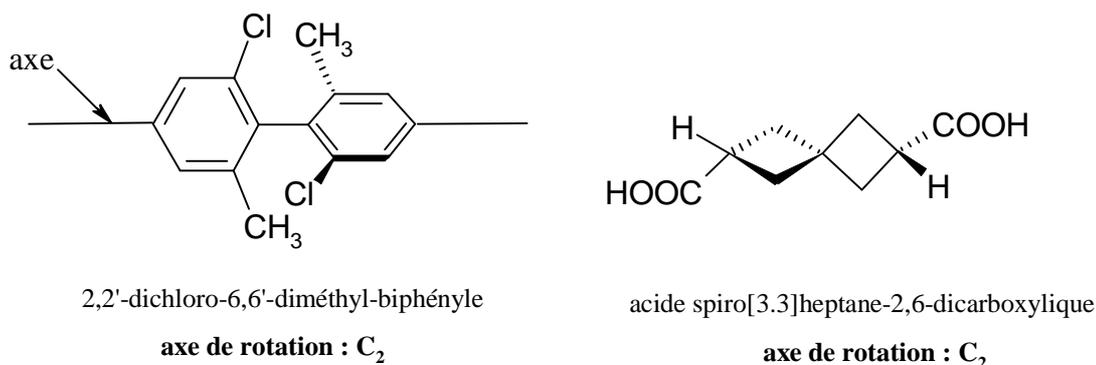
Outre la chiralité bâtie autour des atomes asymétriques, des molécules dépourvues de centres chiraux peuvent également présenter le phénomène de chiralité.

L'arrangement dans l'espace et en dehors du plan de quatre substituants autour d'un axe induit la chiralité. Les allènes, molécules linéaires, peuvent présenter une symétrie axiale selon l'axe des liaisons  $C=C=C$ . Cependant, tous les allènes ne sont pas chiraux, cela dépend de leur substitution (*Figure I.3*).



**Figure I.3** : Exemples d'allènes chiral et achiral.

L'atropisomérisation est une isomérisation conformationnelle dans laquelle les conformères peuvent être isolés. L'atropisomérisation la plus connue est de type  $sp^2-sp^2$  et regroupe les composés biphenyles portant des substituants en position *ortho* (Figure I.4).



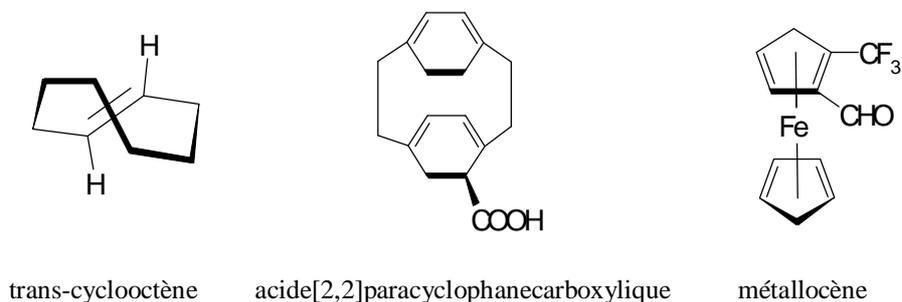
**Figure I.4** : Autres exemples de chiralité axiale : l'atropisomérisation et un spirane.

L'encombrement stérique des substituants limite la rotation de la liaison simple C-C. A température ambiante, la vitesse d'interconversion des deux formes énantiomériques est suffisamment faible pour que l'on puisse les séparer. Ainsi, la chiralité des biphenyles tétra-*ortho*-substitués dépend aussi de la nature et de la position des substituants, comme les allènes.

Certains spiranes et alkylidèncyclanes appartiennent aussi à la classe des molécules à chiralité axiale (Figure I.4).

### c) Enantiomérisation induite par un plan de chiralité

L'arrangement dans l'espace et en dehors du plan de substituants ou de groupements d'atomes par rapport à un plan de référence induit également la chiralité. Ce plan de référence se nomme **plan de chiralité**. Le plan chiral est celui qui contient le maximum d'atomes. Les classes principales de molécules présentant une chiralité planaire sont les alcènes cycliques E, les cyclophanes et les métallocènes. Dans le cas du *trans*-cyclooctène, la chiralité est induite par le plan de chiralité de la double liaison alors que pour l'acide [2,2]paracyclophanecarboxylique, elle est induite par le groupement phényle contenant la fonction acide carboxylique (Figure I.5).

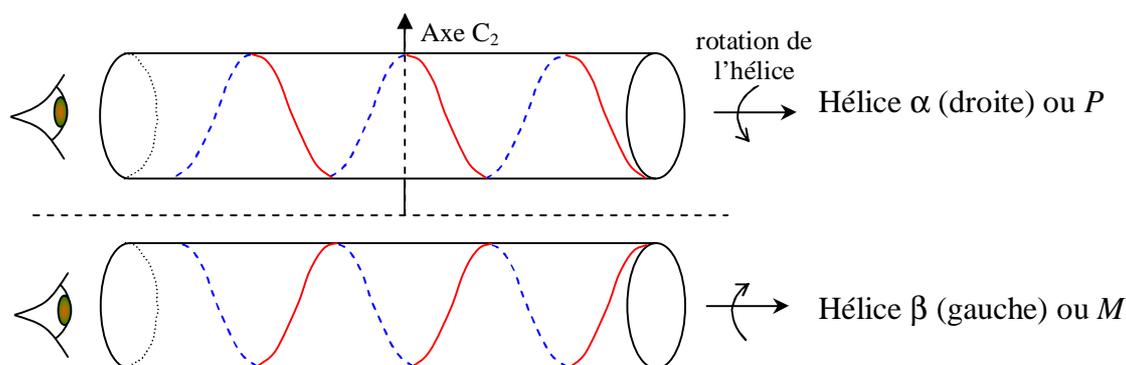


**Figure I.5 :** Molécules à chiralité planaire.

Les métalloènes, comme le ferrocène, sont chiraux lorsqu'ils portent au moins deux substituants différents sur le même cycle cyclopentadiényle.

*d) Chiralité liée à l'hélicité*

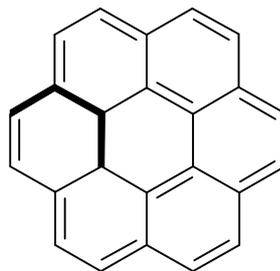
Une hélice est une courbe de courbure et de torsions constantes qui s'appuie sur un cylindre (le pas de vis) ou par extension sur une surface déformée (hélice d'escargot). Une hélice est chirale en raison de la présence d'un axe de symétrie positionné orthogonalement à la longueur du cylindre. Les deux énantiomères (*P* ou *M*) correspondent aux deux sens d'enroulement de l'hélice (Figure I.6).



**Figure I.6 :** Chiralité liée à l'hélicité.

La chiralité liée à l'hélicité est un phénomène que l'on retrouve dans certaines macromolécules telles que les protéines, les acides nucléiques ou l'ADN. De plus, un [n]-hélicène, molécule formée de n cycles benzéniques accolés en position ortho, peut exister

sous deux formes énantiomériques. En effet, à partir de  $n = 5$ , la molécule n'est plus plane et possède une structure tridimensionnelle hélicoïdale (*Figure I.7*).



**Figure I.7** : Molécule de *M-(-)-[6]-helicène*.

e) Mélanges racémiques, non racémiques et énantiopurs

Un mélange équimolaire de deux énantiomères s'appelle un **mélange racémique**. Lorsque la proportion des deux énantiomères est différente, il est courant d'exprimer la teneur d'un énantiomère par rapport à l'autre. Différents termes rendent compte de la pureté énantiomérique d'un échantillon. Afin d'éviter toute confusion, voici un bref rappel terminologique.

Ø La pureté optique

Ce terme est tout à fait approprié lorsque la pureté est évaluée à l'aide d'un polarimètre. Il est alors aisé de différencier deux isomères optiques par les signes (+) et (-) ou les lettres *d* (*dextrogyre*) et *l* (*levogyre*) relatifs au sens de rotation de la lumière polarisée. Un énantiomère est dit « *dextrogyre* » s'il fait tourner la lumière polarisée dans le sens positif (+), c'est-à-dire dans le sens horaire. La pureté optique est définie par la loi de Biot, comme le rapport du pouvoir rotatoire de l'échantillon sur celui de l'énantiomère pur.

$$p.o. = \frac{a_{éch}}{a_{ref}} \quad (I.1)$$

avec  $\alpha = [\alpha]_{T,\lambda} l C$  où  $[\alpha]_{T,\lambda}$  est le pouvoir rotatoire spécifique de la substance chirale à température et longueur d'onde données ( $\text{deg.dm}^{-1}.\text{g}^{-1}.\text{L}$ ),  $l$  le trajet optique (dm) et  $C$  la concentration de l'analyte ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

Les valeurs de pureté optique varient entre -1 et +1 selon la composition de l'échantillon. Une valeur nulle correspond à un mélange racémique.

### Ø La pureté énantiomérique

Elle représente le pourcentage de l'énantiomère majoritaire dans un mélange d'énantiomères. Elle s'exprime par la relation suivante :

$$p.e.(R) (\%) = \frac{[R]}{[R]+[S]} \times 100 \quad (1.2)$$

où [R] et [S] sont les concentrations respectives des deux énantiomères. Les nomenclatures R et S sont définies dans le paragraphe suivant.

### Ø L'excès énantiomérique

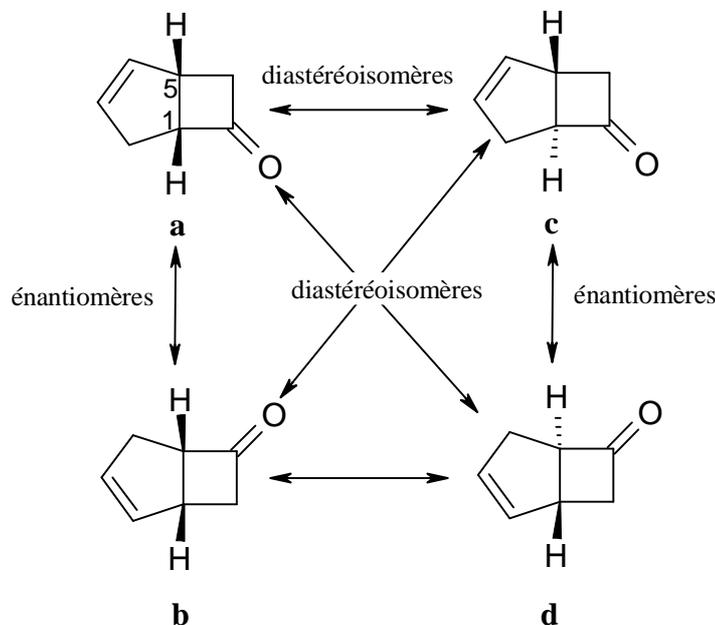
Ce terme exprime l'excès de l'un des énantiomères par rapport à l'autre et est défini de la manière suivante :

$$e.e.(R) (\%) = \frac{[R]-[S]}{[R]+[S]} \times 100 \quad (1.3)$$

## **I.1.2. La diastéréoisométrie**

Une molécule possédant n centres d'asymétrie donne naissance à  $2^n$  stéréoisomères et  $2^{n-1}$  couples d'énantiomères. Les **diastéréoisomères** sont des stéréoisomères qui ne sont pas images l'un de l'autre dans un miroir.

La molécule bicyclique présentée sur la *figure 1.8* possède deux centres de chiralité, C(1) et C(5). Ainsi, il existe au total quatre stéréoisomères, qui constituent deux paires d'énantiomères (a / b) et (c / d). La jonction des deux cycles peut être *cis* (les deux atomes d'hydrogène se situent dans le même plan comme dans les molécules a et b) ou *trans* (les atomes d'hydrogène se répartissent de part et d'autre du plan de la molécule (c et d)).



**Figure I.8 :** Molécules possédant deux centres d'asymétrie donnant naissance à quatre stéréoisomères.

L'inversion d'un unique centre chiral sur une molécule en possédant plusieurs s'appelle une **épimérisation**.

## **I.2. Nomenclature des énantiomères**

### **I.2.1. Les descripteurs *d/l***

Les énantiomères ont été différenciés initialement par les signes (+) et (-) ou *d* (*dextrogyre*) et *l* (*lévogyre*) selon le sens de déviation de la **lumière polarisée**. Ainsi, un énantiomère sera indexé respectivement des signes (+) ou (-) s'il a la propriété de dévier la lumière polarisée à droite (*dextrogyre*) ou à gauche (*lévogyre*). Toutefois, cette nomenclature ne présume en rien du nombre de centres d'asymétrie ni de l'arrangement spatial de leurs substituants.

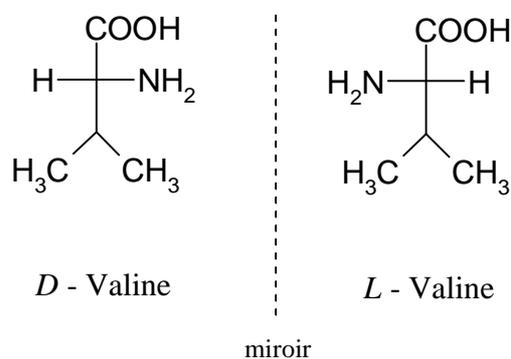
### **I.2.2. Le système de Cahn, Ingold et Prelog (CIP)**

Afin de désigner la configuration des énantiomères de façon univoque, Cahn, Ingold et Prelog [8] ont proposé une nomenclature liée à la répartition spatiale des atomes adjacents au centre d'asymétrie : les atomes reliés au centre d'asymétrie sont classés par ordre décroissant de leur numéro atomique, considérant l'atome voisin en cas

d'indétermination. D'après la *Figure I.1*, supposons l'ordre de priorité suivant :  $a > b > c > d$ , si l'œil d'un examinateur se positionne dans l'axe du carbone asymétrique vers le substituant  $d$ , deux situations peuvent alors se présenter : si les substituants défilent par priorité décroissante dans le sens des aiguilles d'une montre, la **configuration absolue** est *R* (*rectus*), alors que si l'ordre des substituants évolue dans le sens opposé, la configuration est dite *S* (*sinister*).

### I.2.3. La convention de Fischer

La **nomenclature D/L** s'applique pour les sucres et les acides aminés. Dans la représentation de Fischer, la chaîne carbonée la plus longue de la molécule est positionnée verticalement et le groupement le plus oxydé de la molécule vers le haut. Si la fonction hydroxyle (pour un sucre) ou la fonction amine (cas des acides aminés) se trouve à droite de l'axe, le composé est *D*. Dans le cas contraire, l'énantiomère est dit *L* (*Figure I.9*).



**Figure I.9** : Représentation de Fisher des énantiomères *D* et *L* de la valine.

Il n'existe aucune corrélation entre le pouvoir rotatoire (*d/l*), la nomenclature *D/L* et la configuration absolue (*R/S*) des énantiomères. Cette dernière ne peut être déterminée que lors d'une analyse cristallographique par diffraction aux rayons X.

### **I.3. Propriétés physico-chimiques des stéréoisomères**

Les énantiomères ont des propriétés identiques vis-à-vis de phénomènes physiques symétriques (températures d'ébullition ou de fusion, solubilité dans un solvant achiral, densité...). En revanche, leur comportement diffère dans un environnement dissymétrique ; ainsi leurs pouvoirs rotatoires spécifiques et leurs réponses dichroïques sont de signe opposé mais de même valeur absolue.

Contrairement aux énantiomères, les diastéréoisomères ont des propriétés physico-chimiques différentes et peuvent être séparés par des méthodes d'analyse classiques.

### **I.4. Implication de la stéréoisométrie et ses conséquences**

#### **I.4.1. La chiralité au quotidien**

L'influence de la chiralité dans la nature est indéniable. Que ce soit parmi la faune ou la flore, un grand nombre de structures asymétriques peuvent être citées. C'est le cas notamment des structures hélicoïdales des coquilles d'escargot.

Au niveau moléculaire, les acides aminés, les sucres et de ce fait les peptides, les protéines et les polysaccharides sont de configuration et de conformation très particulières. En effet, à quelques exceptions près, les acides aminés constitutifs des protéines sont tous de configuration *L*. Du fait de l'existence d'une chiralité naturelle, le métabolisme, les processus de régulation, ou encore les réactions enzymatiques et les interactions ligand-récepteur sont sensibles à la stéréochimie. Dans ce contexte, des études menées sur des phéromones sexuelles d'abeilles du Japon ont montré que la présence de 0,5 % du **distomère** (énantiomère inactif) parmi l'**eutomère** (énantiomère actif) conduit à une perte d'information de 33 % par rapport à la forme énantiomériquement pure [9].

En agrochimie, l'analyse chirale trouve également de nombreuses applications. En effet, maintes quantités de produits phytosanitaires sont chiraux ; leur activité (insecticide, fongicide ou herbicide), toxicité ou métabolisation peuvent différer en fonction de leur énantiométrie. Tel est le cas du metalaxyl où l'activité fongicide réside principalement dans l'énantiomère (*R*) [10]. La commercialisation d'énantiomères purs permet de prévenir

certains risques environnementaux dans le cas où l'épandage de stéréoisomères inactifs contribue seulement à augmenter le niveau de pollution [11].

Dans le domaine agroalimentaire, les saveurs ou les odeurs peuvent être dissemblables d'un énantiomère à l'autre. Les récepteurs olfactifs sont ainsi capables de distinguer les énantiomères de la carvone (odeurs de menthe ou de fenouil) et ceux du limonène (odeurs de citron ou d'orange). Il en va de même pour les papilles gustatives, capables de différencier les diastéréoisomères de l'aspartame. En effet, ce dipeptide constitué d'acide aspartique et de phénylalanine donne naissance à quatre diastéréoisomères dont seul l'isomère L,L présente un goût sucré tandis que les trois autres stéréoisomères ont un goût amer.

De nombreux autres domaines tels que la recherche clinique ou médico-légale sont sensibles aux problèmes liés à la chiralité. Ainsi, dans le cadre du contrôle anti-dopage, la mise en évidence, lors d'une analyse urinaire, des énantiomères du salbutamol dans des proportions particulières, est la preuve de la prise illicite de ce broncho-dilatateur puissant [12].

Au quotidien, les problèmes liés à la chiralité touchent essentiellement les sciences du médicament. En effet, du fait de l'existence d'une chiralité naturelle dans le domaine du vivant, et plus particulièrement chez l'homme, l'activité pharmacologique d'une molécule peut varier d'un énantiomère à l'autre.

#### **I.4.2. Incidence de la chiralité dans le domaine thérapeutique**

##### *a) Activités biologiques des énantiomères*

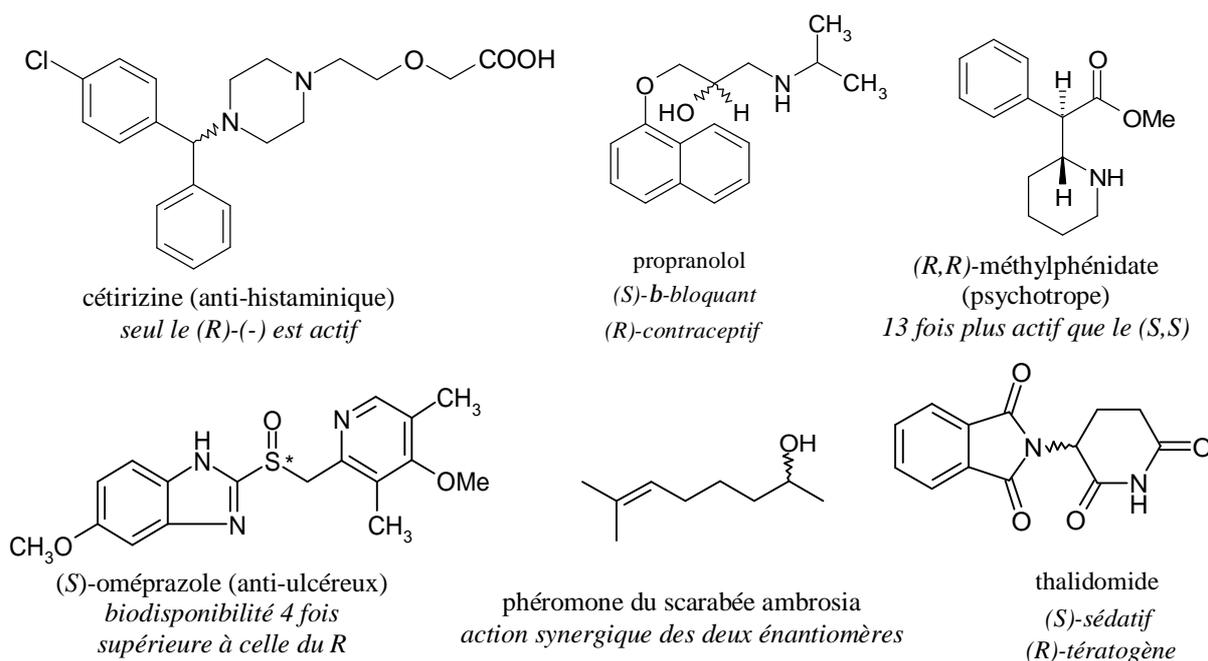
Il est possible de classer les principes actifs chiraux en six catégories selon l'activité biologique des deux énantiomères :

**Ø Les énantiomères possèdent qualitativement et quantitativement la même activité :**

C'est le cas, notamment, de la phéromone d'agrégation du scarabée ambrosia (*Figure I.10*) dont le mélange racémique est plus actif que chacun des deux énantiomères purs. Cette situation exceptionnelle rend compte d'une synergie d'action des deux énantiomères.

**Ø Les énantiomères possèdent la même activité mais ont une cinétique différente :**

L'oméprazole (*Figure I.10*) est un principe actif pharmaceutique dont les deux énantiomères (*R*) et (*S*) sont reconnus pour leur propriété anti-ulcéreuse. La biotransformation plus rapide de l'énantiomère (*R*) entraîne des taux plasmatiques plus élevés de l'énantiomère (*S*). Ainsi, la biodisponibilité de l'énantiomère (*S*) est environ 1,5 fois plus importante que celle du racémate et 3 à 4 fois supérieure à celle de l'énantiomère (*R*).



**Figure I.10 :** Quelques exemples d'énantiomères possédant des propriétés biologiques différentes.

**Ø Les énantiomères possèdent qualitativement la même activité mais d'efficacité différente :**

Citons le cas du *threo*-méthylphénidate (Ritalin®) (*Figure I.10*) qui est commercialisé pour le traitement des troubles de l'attention et de l'hyperactivité sous la forme de deux énantiomères (*R,R*) et (*S,S*). Toutefois, l'énantiomère (*R,R*) est 13 fois plus efficace que l'énantiomère (*S,S*) [13].

**Ø Seul un énantiomère est actif, l'autre est inactif :**

La cétirizine (*Figure I.10*) est commercialisée sous forme d'un mélange racémique. Toutefois, seul le composé levogyre est biologiquement actif contre les crises d'allergie [14].

Ø Les énantiomères possèdent des activités biologiques différentes :

Le (*S*)-propranolol (*Figure I.10*) est un  $\beta$ -bloquant tandis que le (*R*)-propranolol présente des propriétés contraceptives [15].

Ø Un énantiomère est actif, l'autre est toxique :

La (*S*)-thalidomide a des vertus sédatives tandis que l'énantiomère (*R*) est tératogène et provoqua la malformation de nombreux enfants dans les années 1970 [16]. Toutefois, l'énantiomère (*S*) de la thalidomide n'aurait jamais pu être administré aux femmes enceintes en raison d'une racémisation avérée *in vivo*. A ce jour, la thalidomide est toujours commercialisée pour le traitement de la lèpre.

*b) Implication dans le domaine réglementaire*

Le fait que l'activité thérapeutique d'une molécule puisse varier avec sa configuration absolue n'a réellement été pris en compte que depuis la tragique méprise de la thalidomide. Dès lors, les autorités sanitaires et réglementaires, telles la Food and Drug Administration (FDA) [17] ou l'European Medicines Agency (EMA) [18] exigent une documentation complète d'essais pharmacologiques, pharmacocinétiques et toxicologiques lors du dépôt des droits d'exploitation d'un brevet, tant sur le mélange racémique que sur les énantiomères purs. L'inversion potentielle d'une forme énantiomérique à une autre doit également être évaluée *in vitro* et *in vivo*.

Par ailleurs, lorsqu'un principe actif de médicament est commercialisé sous une forme énantiomériquement pure, des méthodes analytiques doivent être développées afin de contrôler la présence éventuelle de traces de diastomère parmi l'énantiomère actif dans le lot de fabrication [19,20].

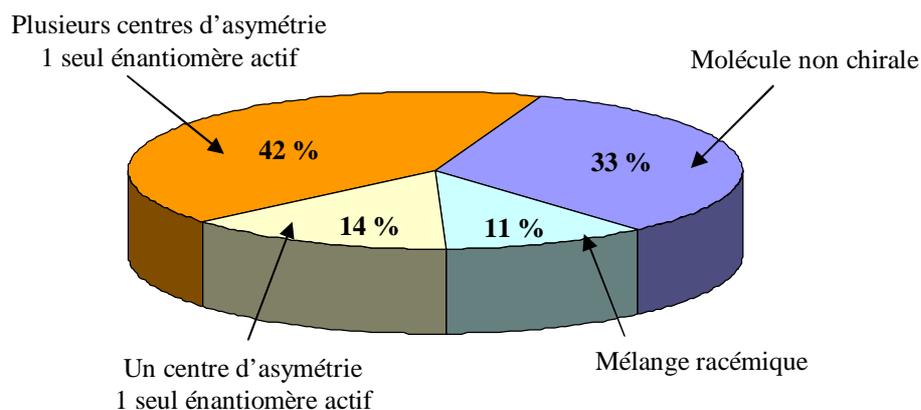
*c) Impacts économiques*

L'industrie pharmaceutique s'intéresse de plus en plus aux spécialités énantiopures. En effet, la commercialisation d'un principe actif sous une forme énantiomériquement pure présente, sur le plan pharmacologique, quatre avantages majeurs :

- la dose totale administrée est réduite,
- l'étude des relations dose-réponse est simplifiée,
- les sources de variabilité de la réponse inter-malade sont minimisées,

- la toxicité éventuelle due à la présence du distomère est supprimée.

La *figure I.11* présente la répartition des molécules mises sur le marché américain en fonction de leur composition stéréoisomérique.



**Figure I.11** : Répartition des molécules mises sur le marché américain en 2006 [21].

Cette étude montre que 67 % de molécules commercialisées à usage pharmaceutique sont chirales. 83 % d'entre elles ne sont disponibles que sous leur forme énantiopure. Cette proportion devrait encore augmenter dans les années à venir. En effet, l'échéance de protection par des brevets de nombreux médicaments racémiques incite la plupart des laboratoires pharmaceutiques à breveter le même principe actif sous sa forme énantiopure.

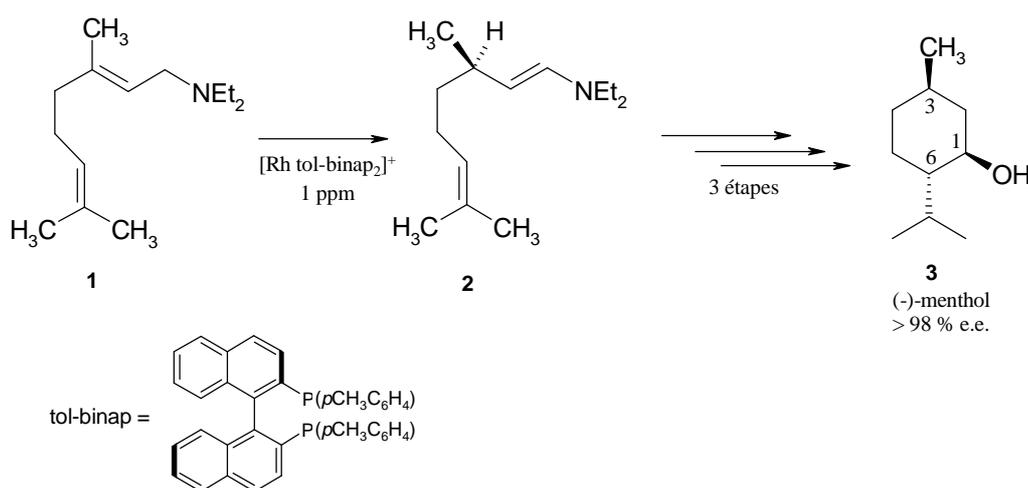
La chiralité revêt donc une importance capitale dans différents domaines, et tout particulièrement celui de la pharmacie, tant aux points de vue thérapeutique, réglementaire qu'économique. La demande accrue en composés énantiomériquement purs de la part de l'industrie pharmaceutique a conduit au développement de méthodologies de synthèse et d'analyse de plus en plus performantes qui seront présentées dans les paragraphes suivants.

## II. Sélectivité chimique des énantiomères : synthèse et dédoublement

La production de composés énantiomériquement purs a pris son essor depuis la mise au point de nouvelles méthodologies de synthèse asymétrique et le développement de techniques séparatives performantes à l'échelle analytique ou préparative.

### II.1. La synthèse asymétrique et les réactions de biotransformation

La **synthèse asymétrique** ou stéréosélective consiste à préparer un énantiomère pur en partant d'un précurseur achiral. Cette transformation est réalisée en présence d'un auxiliaire chiral qui se lie temporairement au substrat. Lorsque l'auxiliaire chiral est introduit en petite quantité, on parle de **catalyse asymétrique**. Cette situation est la plus avantageuse car le produit fini est généralement obtenu avec un bon rendement et la consommation en catalyseur est minime. Ainsi, la production industrielle du (-)-menthol par le procédé de synthèse asymétrique décrit par Takasego est évaluée à 1500 tonnes par an [22]. Le catalyseur chiral est un dérivé binaphtyl hautement énantiomériquement sélectif qui conduit à la formation du (-)-menthol avec un excès énantiomérique supérieur à 98 % (Figure I.12).



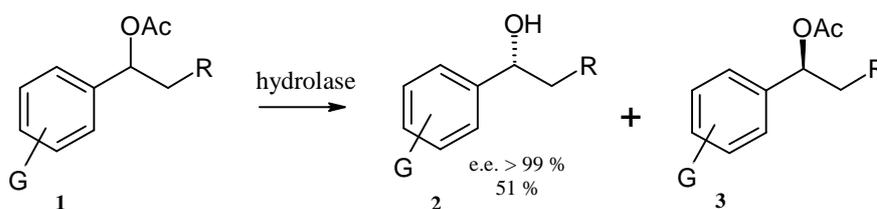
**Figure I.12** : Synthèse asymétrique du (-)-menthol en présence d'un catalyseur chiral.

L'étape déterminante de cette synthèse consiste à créer le carbone asymétrique C(3), lequel sera à l'origine de la configuration absolue des atomes de carbone asymétrique

C(1) et C(6). Pour cela, le catalyseur intervient lors de l'état de transition afin de disposer les réactifs et les produits dans une géométrie préférentielle à la formation du composé 2.

Cependant, la pureté optique des produits obtenus selon ce mode de synthèse n'est pas toujours aussi satisfaisante (e.e. < 95 % [23]).

Les **réactions de biotransformation** représentent un cas particulier de la synthèse asymétrique. Ces techniques mettent en œuvre les propriétés catalytiques hautement énantiosélectives des enzymes pour un substrat. Par exemple, les hydrolases constituent une classe d'enzymes qui catalysent les réactions d'hydrolyse d'esters (*Figure I.13*).



**Figure I.13** : Hydrolyse énantiosélective d'un ester catalysée par une hydrolase [24].

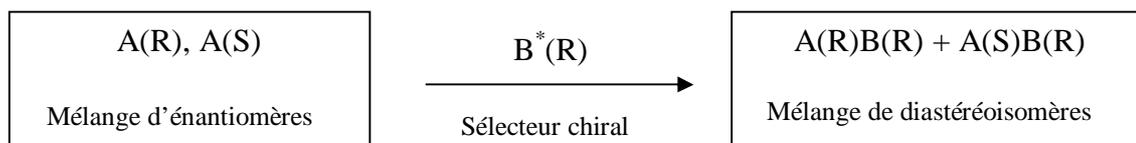
Ainsi, le produit désacétylé (2) est obtenu avec un excès énantiomérique supérieur à 99 % en utilisant une hydrolase issue d'un foie de chat. Le milieu réactionnel est majoritairement aqueux (pH 8) dans lequel est ajouté un cosolvant (dioxane). La réaction est réalisée à température ambiante (25°C) durant 50 h.

Les réactions enzymatiques présentent de nombreux avantages par rapport à la synthèse catalytique. La spécificité d'action des enzymes évite l'apparition fortuite de produits secondaires ce qui réduit la nécessité d'opérations ultérieures de purification. De plus, les enzymes agissant à basse température (< 40°C), leur utilisation se traduit par des économies d'énergie thermique. L'absence ou la faible proportion de solvant dans le milieu réactionnel constitue un atout certain. Cependant, la spécificité remarquable des enzymes représente autant d'avantages que d'inconvénients. En effet, il n'est pas toujours aisé de trouver l'enzyme la plus appropriée à un substrat. En outre, le succès d'une technologie enzymatique demeure lié à divers facteurs environnementaux. Le pH et le taux d'oxygène dissous sont les principaux facteurs susceptibles d'inhiber ou d'intensifier un mécanisme enzymatique. Ainsi, dans l'exemple présenté ci-dessus, l'utilisation d'une hydrolase d'un foie de cochon à pH 6 conduit à la formation du produit (2) avec un excès

énantiomérique de 40 %. Ces inconvénients constituent souvent un obstacle à l'essor des opérations enzymatiques, notamment à l'échelle industrielle.

## II.2. La séparation des énantiomères

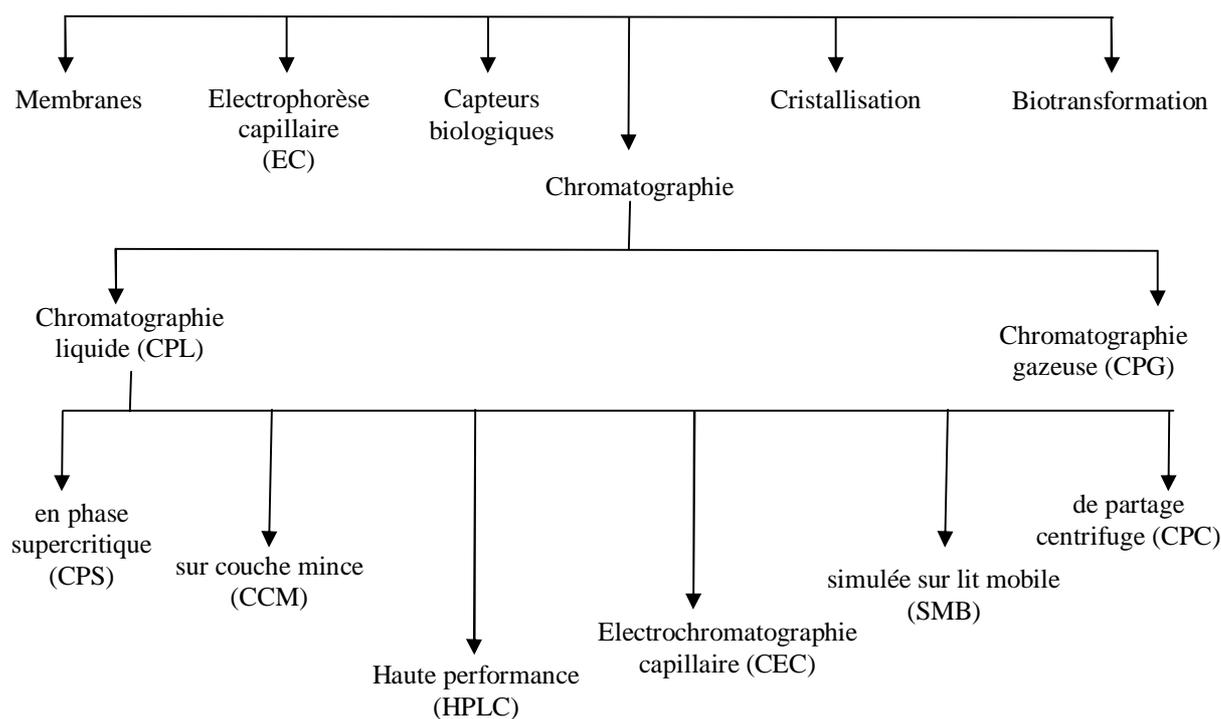
Le principe de séparation des énantiomères repose sur la formation de diastéréoisomères dans un environnement chiral (*Figure I.14*).



**Figure I.14** : Principe de résolution chirale d'un mélange d'énantiomères.

### II.2.1. Les différentes techniques analytiques

Différentes techniques ont été développées pour séparer des énantiomères au stade **analytique** et/ou **préparatif** (*Figure I.15*).



**Figure I.15** : Les différentes techniques utilisées pour résoudre des énantiomères.

Parmi l'ensemble des procédés présentés dans la *figure I.15*, notre attention se portera plus particulièrement sur les techniques chromatographiques et électrophorétiques.

## **II.2.2. La résolution des énantiomères en CPL et en EC**

### *a) Avantages de chacune des techniques*

De part leur simplicité, sensibilité et robustesse, la **chromatographie** et l'**électrophorèse capillaire** sont deux techniques qui remportent le plus de succès dans le domaine de la séparation chirale [25]. Elles ont notamment prouvé leur efficacité lors de la résolution des énantiomères de produits pharmaceutiques, phytosanitaires et agroalimentaires [26-28].

Parmi les techniques chromatographiques, la **chromatographie en phase liquide** est de loin la plus appréciée. En effet, les constructeurs lui dédient un large panel de colonnes chromatographiques chirales adaptées à la séparation de structures chimiques variées. Cependant, depuis ces dernières années, la **chromatographie en phase supercritique** (CPS) recueille un regain d'intérêt en raison de la rapidité des analyses et des sélectivités remarquables observées [29]. De plus, la CPS trouve un intérêt majeur en mode préparatif dû à la simple détente de la phase mobile (CO<sub>2</sub>) qui permet une collecte rapide des solutés purifiés sans risque de dégradation ou de racémisation lors d'une éventuelle étape d'évaporation de solvant [30]. La chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie en phase gazeuse (CPG) ont montré leurs potentialités, respectivement pour l'analyse d'acides aminés [31,32], de pesticides [33,34] ou de composés volatils [35,36], mais leur utilisation reste plus anecdotique. En effet, de nombreux composés chiraux sont thermosensibles ce qui ne permet pas leur analyse en CPG.

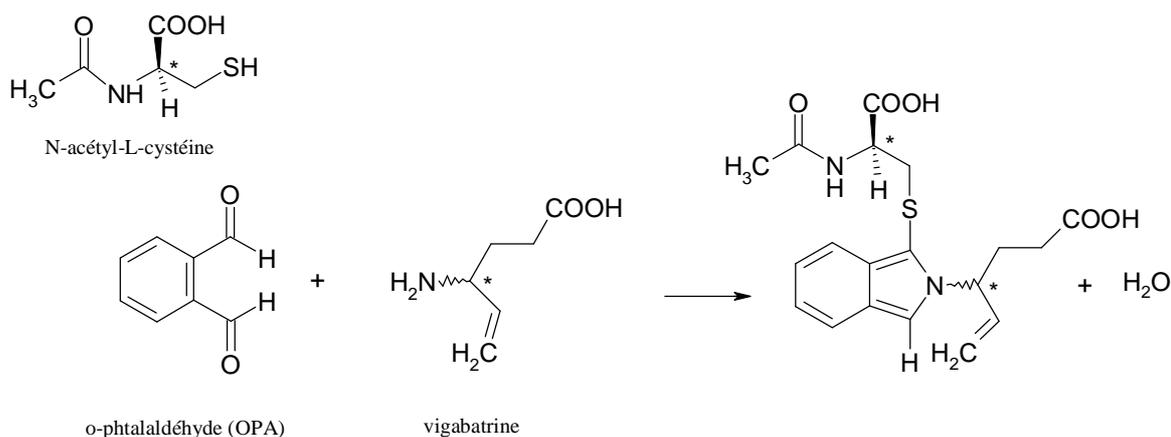
Dans les années 1990, les techniques électrophorétiques modernes ont connu un véritable essor pour la séparation des énantiomères [26,27]. L'électrophorèse capillaire de zone (CZE), l'électrophorèse capillaire micellaire (MEKC) et l'isotachophorèse sont devenus les outils les plus performants. Ceci tient à la fois à la versatilité de la technique qui permet de changer facilement de mode d'analyse et à la faible consommation d'électrolyte rendant possible l'utilisation de sélecteurs chiraux onéreux.

b) Méthodologie

Deux approches différentes permettent le dédoublement des énantiomères par la formation de diastéréoisomères.

a) Approche indirecte par formation de diastéréoisomères covalents

L'approche indirecte consiste à dériver les énantiomères avant leur analyse en faisant réagir un réactif chiral de grande pureté optique. La réaction conduit à la formation de diastéréoisomères covalents qui possèdent des propriétés physico-chimiques différentes. Puis, ceux-ci sont séparés de façon classique dans un environnement achiral par CPL, CPG ou EC. Néanmoins, cette approche ne s'applique uniquement qu'aux solutés possédant des groupements réactifs (amines, acides, alcools,...) [27] et nécessite l'utilisation d'un réactif chiral de grande pureté. Par ailleurs, la réaction de dérivation doit être rapide et quantitative. Les méthodes indirectes de résolution énantiomérique sont plus difficiles à mettre au point mais elles demeurent très intéressantes dans quelques cas particuliers. La vigabatrine est ainsi dérivée par un agent fluorescent (*o*-phthalaldéhyde) et la N-acétyl-L-cystéine puis analysée en CPL avec une détection fluorimétrique [37]. La réaction de dérivation est représentée sur la *figure I.16*.



**Figure I.16 :** Réaction de dérivation de la vigabatrine par l'*o*-phthalaldéhyde et la N-acétyl-L-cystéine.

Les deux diastéréoisomères issus de la réaction de dérivation sont séparés sur une colonne de silice greffée C<sub>18</sub> et les limites de quantification des énantiomères de la vigabatrine dans le plasma sont comprises entre 140 et 200 ppb.

### b) Approche directe par formation de diastéréoisomères labiles

Depuis quelques années, l'analyse directe des énantiomères sans dérivation préalable est de plus en plus répandue. Cette méthodologie consiste en la formation de diastéréoisomères labiles entre les énantiomères et le sélecteur chiral. Deux possibilités s'offrent alors à l'analyste :

#### Ø La formation de diastéréoisomères en solution

L'additif chiral est introduit dans la phase mobile en chromatographie liquide ou dans le tampon de migration en EC. Cette approche est peu utilisée en chromatographie en raison des quantités importantes de sélecteurs chiraux consommées. Les paramètres chromatographiques, tels que la température, la teneur en additif chiral dans la phase mobile, doivent être minutieusement contrôlés afin d'assurer des séparations reproductibles. En outre, aucune application n'est possible à l'échelle préparative puisque les énantiomères sont collectés en présence du sélecteur chiral.

En revanche, cette méthode est privilégiée en EC car elle est peu consommatrice en sélecteurs chiraux hydrosolubles.

#### Ø La formation de diastéréoisomères à la surface de la phase stationnaire

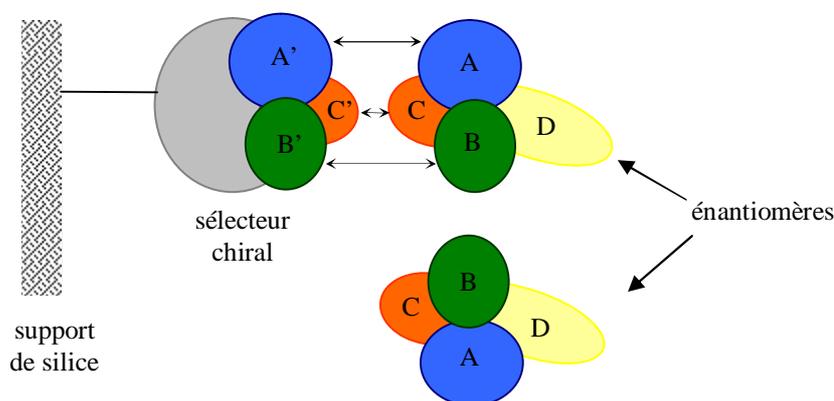
La deuxième voie de séparation des énantiomères repose sur la formation de diastéréoisomères labiles à la surface de la phase stationnaire chirale (PSC). Dans la plupart des cas, le sélecteur chiral est greffé ou déposé sur un support de silice. Cette méthodologie est la plus utilisée tant à l'échelle analytique que préparative. Il existe un nombre important de PSC commercialement disponibles. Cependant, aucune d'entre elles n'est universelle et la nature du sélecteur chiral sélectionné doit être adaptée à la structure de l'analyte. Ainsi, l'analyste doit tenir compte des interactions énantiosélectives susceptibles d'être générées entre l'analyte et la PSC.

De nombreux composés optiquement actifs (naturels, semi-synthétiques ou synthétiques) ont été développés en tant que sélecteur chiral pour la séparation

stéréosélective d'énantiomères. Le sélecteur chiral doit répondre à certains critères [25,27] :

- sa structure moléculaire et conformationnelle doit posséder suffisamment de centres d'asymétrie, de cavités chirales afin de pouvoir interagir de façon stéréosélective avec des énantiomères à séparer,
- il doit être facilement synthétisable ou commercialement disponible. Toutes les étapes de fabrication doivent être sévèrement contrôlées afin d'obtenir des lots identiques (taux de greffage, pureté optique...). Ces points sont essentiels pour obtenir des séparations stéréosélectives reproductibles,
- il doit être stable chimiquement dans les conditions d'analyse (température, pH, solvant...),
- son prix est un critère important qui conditionnera le choix de la technique analytique,
- il ne doit pas interférer avec le système de détection.

La stéréosélectivité provient de la différence de stabilité des complexes formés entre le sélecteur chiral et chaque énantiomère. La règle des trois points d'interaction (dite règle de Dalglish) mentionne que deux énantiomères seront séparés s'ils se forment trois interactions simultanées (AA', BB', CC') entre le sélecteur chiral et l'énantiomère et dont l'une d'entre elles est stéréosélective (*Figure I.17*). Cette règle est assez restrictive puisqu'elle ne s'applique que pour des interactions bimoléculaires et ne tient pas compte des changements de conformation des deux entités en fonction de la nature du milieu de solubilisation.



**Figure I.17 : Modèle des trois points d'interaction de Dalglish.**

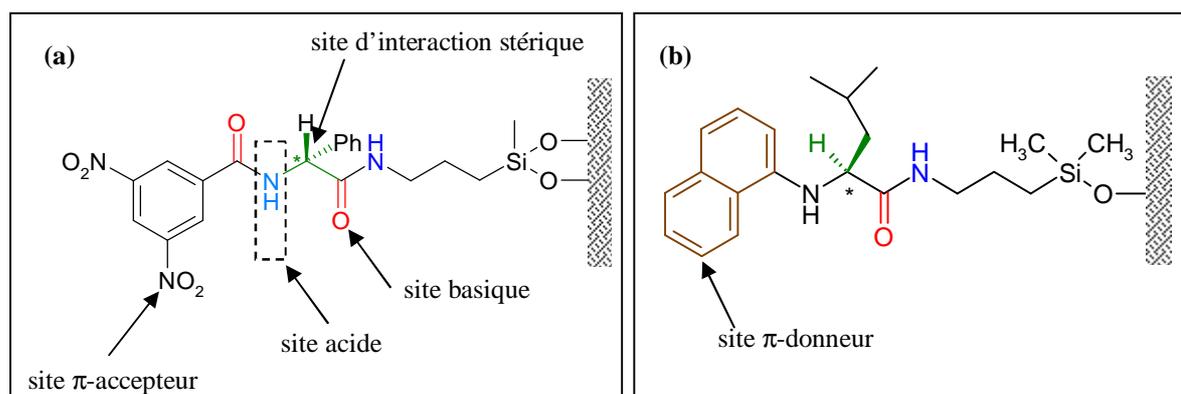
## II.3. Classification des sélecteurs chiraux

### II.3.1. Les sélecteurs chiraux conventionnels

Il est possible de classer les sélecteurs chiraux en différentes familles distinctes selon la nature du sélecteur chiral et des interactions mises en œuvre lors du processus de reconnaissance stéréosélective.

#### a) Les sélecteurs de type Pirkle

Utilisées en chromatographie, ces PSC sont constituées d'un sélecteur chiral greffé par l'intermédiaire d'un bras espaceur sur un gel de silice. Chaque greffon est composé d'un acide aminé (leucine, valine...) dérivé, soit par un noyau aromatique à caractère accepteur d'électrons  $\pi$  (dinitro-3,5 benzoyle) ou par un composé aromatique donneur d'électrons  $\pi$  (noyau naphtyle) (Figure I.18). La formation d'un complexe diastéréoisomérique mixte chiral s'effectue grâce à des interactions acide, basique ou stérique entre le soluté et le sélecteur. Des interactions supplémentaires de transfert de charge entre le noyau aromatique et le soluté lui-même accepteur ou donneur d'électrons favorisent la reconnaissance chirale [38].



**Figure I.18 :** Phases stationnaires de type Pirkle.

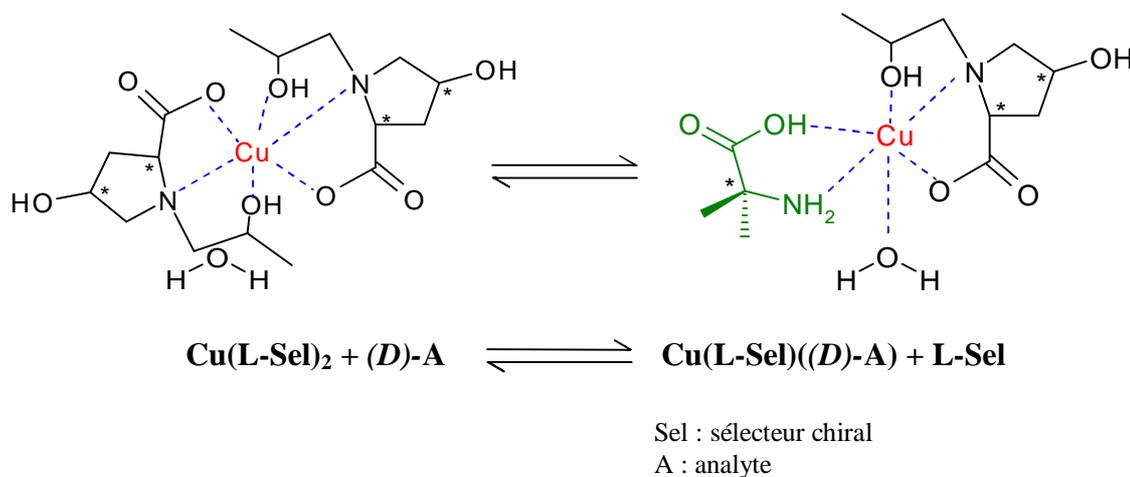
(a) : (*R*)-dinitrobenzoylphényl-glycine, (b) : (*S*)-*N*-naphtyl-2-valine.

Ces phases stationnaires sont généralement utilisées en polarité de phase normale afin de favoriser les interactions de type  $\pi$ - $\pi$  entre l'analyte et le greffon chiral. Cependant,

quelques applications ont été aussi développées en phase inverse lors de l'analyse de composés polaires ou ioniques [38].

*b) Les échangeurs de ligands*

Le mécanisme de séparation est fondé sur la formation d'un complexe diastéréoisomérique ternaire entre un analyte (donneur d'électrons), un métal de transition présentant des orbitales vacantes et un agent chélateur chiral (*Figure I.19*). Ce ligand est généralement un acide aminé capable, lui aussi, de former un complexe avec un ion métallique tel que  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ . Afin de former un complexe de coordination avec le métal de transition, l'analyte doit posséder au moins deux groupements polaires de type  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$ . Ainsi, les acides aminés, leurs dérivés, les hydantoïnes et les amino alcools sont d'excellents candidats à la chromatographie énantiosélective à échange de ligands. La présence d'un groupement chromophore sur l'analyte n'est pas indispensable puisque le complexe cuivré absorbe dans la région spectrale UV.

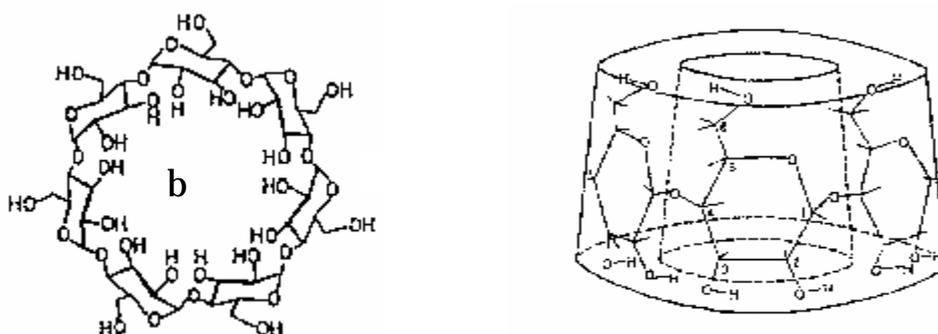


**Figure I.19** : Mécanisme d'échange de ligand en EC entre le N-(2-hydroxypropyl)-L-4-hydroxyproline et un acide aminé [39].

Cette technique s'applique en électrophorèse capillaire de zone [40] ou micellaire [41], en électrochromatographie [41], en CPL [41]. Dans le dernier cas, le ligand peut être immobilisé sur un support de silice ou additionné comme sélecteur chiral dans la phase mobile aqueuse contenant l'ion nécessaire à la formation du complexe. Le plus souvent, une solution de  $\text{CuSO}_4$  (0,25 mM) est utilisée.

c) Les macrocyclesa) Les cyclodextrines- Structure, propriétés et reconnaissance chirale

Les cyclodextrines (CD) sont des oligosaccharides cycliques constitués d'unités répétitives de glycopyranose, reliées entre elles par des liaisons glycosidiques  $\alpha$ -1,4. Elles résultent de la dégradation enzymatique de l'amylose. L'enzyme impliquée, la cyclodextrine glycosyl transférase est produite à partir de bactéries telles que *Bacillus macerans* et *Alcaliphilic bacilli* [42]. Les principales CD obtenues sont l' $\alpha$ -CD, la  $\beta$ -CD et la  $\gamma$ -CD, constituées respectivement de 6, 7 et 8 unités glucose. Chaque unité glycopyranose adopte une conformation chaise. Cet arrangement est à l'origine de la forme de la CD, celle d'un cône tronqué, possédant une cavité centrale hydrophobe dont l'ouverture est bordée de fonctions hydroxyles (*Figure I.20*). Ces nombreux groupements hydroxyles, situés sur les atomes de carbone C2, C3 et C6, procurent à l'extérieur de la CD un caractère hydrophile [43].



**Figure I.20** : Structure de la b-cyclodextrine.

Toutes ces caractéristiques structurales sont à l'origine des propriétés complexantes des CD. Elles peuvent ainsi former des complexes d'inclusion avec un grand nombre de molécules. Ce phénomène repose sur l'encapsulation totale ou partielle du soluté dans la cavité hydrophobe de la CD via la formation de liaisons de Van der Waals. Cette compatibilité stérique ne suffit pas pour expliquer le phénomène de complexation. Les liaisons hydrogène et les interactions électrostatiques faisant intervenir les fonctions hydroxyles ou leurs substituants jouent un rôle important, notamment, dans l'orientation relative des deux molécules, hôte et invité [44].

Les CD sont capables de différencier des molécules de structure chimique proche, telles que les isomères et plus particulièrement les énantiomères. En effet, les CD possèdent 5 centres chiraux par groupements glucose, soit 35 centres stéréogènes pour la  $\beta$ -CD.

Selon Wainer et Drayer [45], quelques critères doivent être respectés afin de faciliter la reconnaissance chirale :

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

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

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

#### - Applications dans les sciences séparatives

Plusieurs revues rapportent l'utilisation des CD en chromatographies en phases liquide [38,45-47], gazeuse [46] et supercritique [30,38,46,48].

En chromatographie en phase liquide, les CD sont utilisées en tant que phase stationnaire (par greffage sur un support comme la silice) ou en tant qu'additif dans la phase mobile [45].

L'un des avantages des phases stationnaires cyclodextrines est la possibilité de les utiliser dans différents modes chromatographiques : polarité de phase normale, polarité de phase inversée et mode polaire organique [45].

En EC, les CD sont principalement utilisées lors de la résolution d'isomères optiques en milieu aqueux [49] ou organique [50,51]. La diversité des sélecteurs dérivés

des CD et les quantités minimales nécessaires à la conduite des analyses constituent autant d'avantages pour cette méthodologie. Plus des deux tiers des séparations chirales sont effectuées en EC avec ce type de sélecteurs chiraux [52].

En raison de son prix, de sa disponibilité et de la forte adéquation entre la taille de sa cavité et un grand nombre de structures chimiques, la  $\beta$ -CD représente 95% de la production des CD [45]. Cependant, sa faible solubilité dans l'eau (1,85 g.L<sup>-1</sup>) limite son utilisation. Pour palier à ce problème, 21 groupements hydroxyles de la  $\beta$ -CD peuvent être substitués par une grande variété de dérivés (alkyle, hydroxyalkyle, amino, sulfate...). Outre l'amélioration de la solubilité de la CD, cette opération permet d'augmenter la profondeur apparente de sa cavité hydrophobe et de modifier les interactions CD / analyte. Parmi toutes les CD dérivées décrites dans la littérature, une cinquantaine d'entre elles, neutres ou ioniques, est disponible commercialement [53]. Ce vaste choix, mis à la disposition des expérimentateurs, rend le développement d'une séparation chirale en électrophorèse capillaire long et fastidieux. En effet, malgré une littérature déjà riche de 400 publications en 2003 [40] sur ce sujet, l'optimisation analytique est souvent empirique [54].

Malgré la synthèse de nouvelles CD neutres, 2-O-acétonyl-2-O-hydroxypropyl- $\beta$ -CD (2-AHP- $\beta$ -CD), 2-O-(2-hydroxybutyl)cyclomaltoheptaose- $\beta$ -CD (2-HB- $\beta$ -CD) [55,56], les dérivés méthylés et hydroxypropylés comme la 2,6-diméthyl- $\beta$ -CD (DM- $\beta$ -CD) ou l'hydroxypropyl- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD) restent les plus couramment utilisés. Celles-ci ont permis l'analyse d'une large gamme de composés parmi lesquels des herbicides, des principes actifs pharmaceutiques, des acides aminés et des composés polyaromatiques [49]. Ainsi, Koppenhoefer *et al.* [57] reportent la résolution de 86 principes actifs de médicaments à l'aide de l'heptakis(2,3,6-tri-O-méthyl)- $\beta$ -cyclodextrine (TM- $\beta$ -CD ou  $\beta$ -CD perméthylée). Ils concluent au pouvoir résolutif accru de la  $\beta$ -CD perméthylée par rapport à son homologue sous sa forme native.

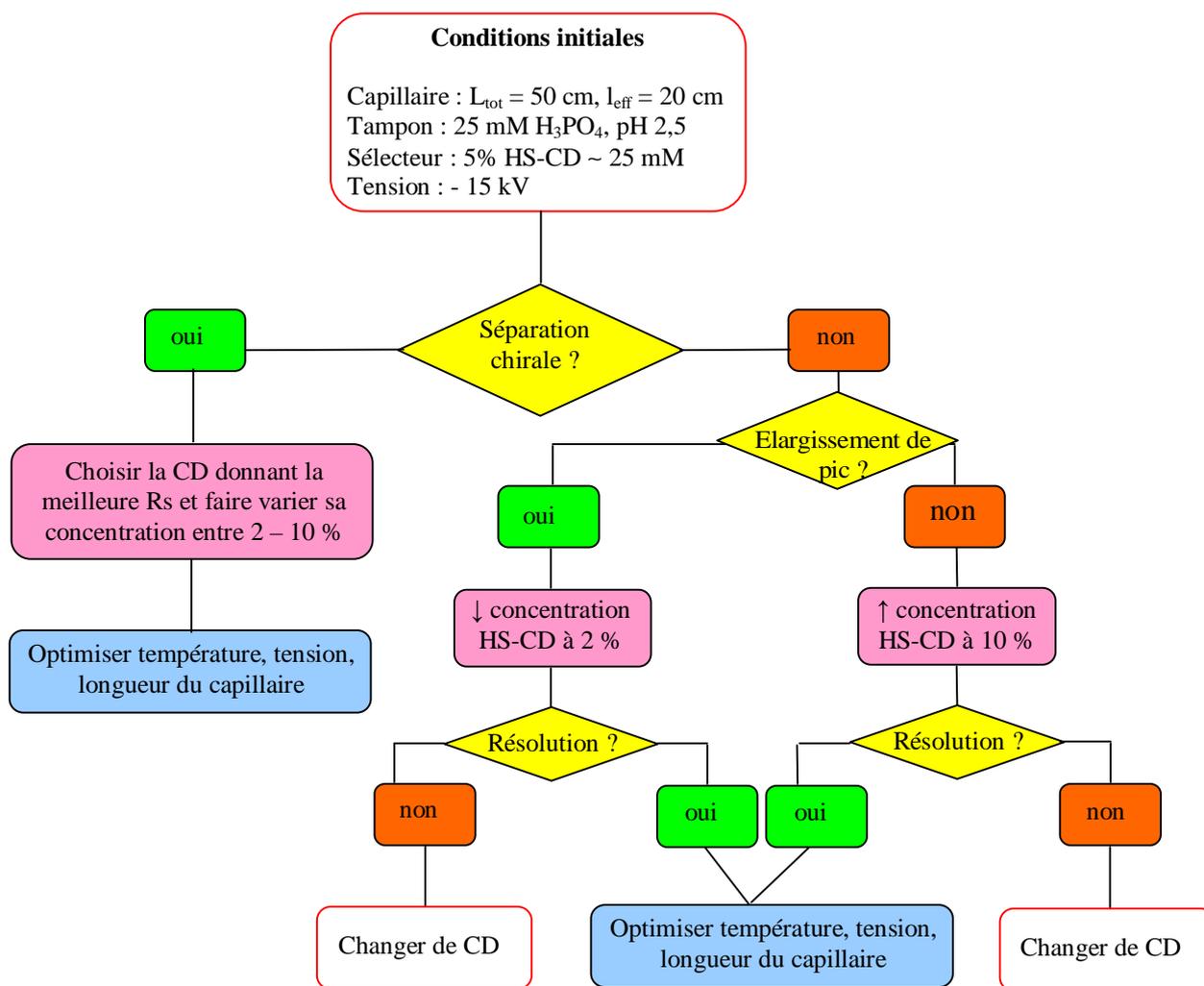
Si les CD neutres permettent la résolution chirale de composés sous leurs formes anionique ou cationique, les CD anioniques se révèlent appropriées lors de l'analyse de composés neutres. Ainsi, la séparation énantiomérique de pesticides organophosphorés a été réalisée en présence de carboxyméthyl- $\beta$ -CD (CM- $\beta$ -CD) par l'équipe de Marina [58]. A pH 7, la CD est totalement ionisée et migre dans la direction opposée au flux

électroosmotique. De ce fait, la progression de l'analyte vers le système de détection est ralentie lors de sa complexation avec la cyclodextrine. La CM- $\beta$ -CD étant un acide faible, sa charge, et donc sa mobilité électrophorétique, peut être modulée par le choix approprié du tampon (notamment le pH).

D'autres CD anioniques (sulfatées, sulfobutylées, phosphatées) ont été utilisées avec succès lors de l'analyse de composés pharmaceutiques [53]. En effet, ces derniers étant pour la plupart des bases faibles, l'énantiosélectivité est améliorée grâce aux interactions électrostatiques supplémentaires entre la CD anionique et le soluté cationique. Ainsi, les CD anioniques ont une capacité résolutive plus importante que leurs homologues neutres vis-à-vis des composés basiques. Cependant, la qualité insuffisante des produits commerciaux (mélange d'isomères, variabilités des degrés de substitution d'un lot de fabrication à un autre) compromet la reproductibilité des résultats [59].

Afin de pallier ce problème, la société Beckman Coulter a développé trois cyclodextrines ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) sous leur forme hautement sulfatée (HS-CD). Les analyses conduites en ESI/MS sur chacune des trois HS-CD montrent un profil de substitution étroit et confirment leur degré de substitution moyen, respectivement de 11, 12 et 13 [60]. Ces dernières sont commercialisées en solution acide (tampon phosphate : I = 25 mM, pH 2,5) à une concentration massique de 200 g.L<sup>-1</sup>. La réaction de sulfatation étant contrôlée en position C6 (100%) et C2 (70%) exclusivement, la reproductibilité de synthèse est assurée d'un lot à l'autre. Ainsi, la fidélité intermédiaire des temps de migration est inférieure à 1% quel que soit le lot de CD utilisées lors de l'analyse [61].

Chapman *et al.* [61] et Perrin *et al.* [54] ont mis au point un arbre de décision (*Figure I.21*) afin de faciliter la mise au point d'une séparation chirale. Quelle que soit la nature du soluté (acide, base, neutre, amphotère), le développement débute en testant chacune des HS-CD à une concentration de 5 % (m/v). Cette méthodologie conduit à la résolution énantiomérique partielle ou totale de 156 produits sur 160 testés.



**Figure I.21** : Arbre de décision pour la mise au point d'une séparation chirale en EC avec les HS-CD [61].

De même, l'équipe de Vigh a développé dès 1997 une nouvelle famille de CD ionisables [62,63]. A ce jour, onze CD trisubstituées par des groupements neutres et anioniques sont commercialisées. Ainsi, l'heptakis(2-méthyl-3-acétyl-6-sulfato- $\beta$ -CD) portent trois substituants différents sur les atomes de carbone C2, C3 et C6. Par ailleurs, l'heptakis(2,3-di-acétyl)- $\beta$ -CD (HDAS) et l'heptakis(2,3-di-méthyl-6-sulfato)- $\beta$ -CD (HDMS) sont devenues les CD principalement utilisées en EC en mode non aqueux (NACE) pour résoudre des solutés hydrophobes [64]. Outre une excellente reproductibilité d'un lot de synthèse à un autre, la présence de groupements neutres sur ces CD anioniques améliore leur solubilité dans les solvants organiques [53].

L'incorporation simultanée de deux sélecteurs chiraux dans l'électrolyte permet parfois d'accroître la sélectivité des séparations lorsque l'addition d'une seule CD ne permet que la résolution partielle des énantiomères. Ainsi, la présence conjointe de CD neutre et anionique s'avère intéressante lors de la séparation de composés non ionisables. Il a été démontré que la CD anionique permet le déplacement de l'analyte vers le système de détection par électromigration tandis que la CD neutre assure la reconnaissance chirale des énantiomères [65]. Il existe, à ce jour, un nombre important de combinaisons CD neutre/CD ionique et parfois même de deux CD neutres [66]. Malgré le développement de quelques stratégies rationnelles visant à faciliter la mise au point de méthodes en mode dual [67,68], la majorité des applications décrites se basent sur une optimisation des séparations au cas par cas, sans qu'aucune logique stricte ne se dégage lors du choix des couples de sélecteurs.

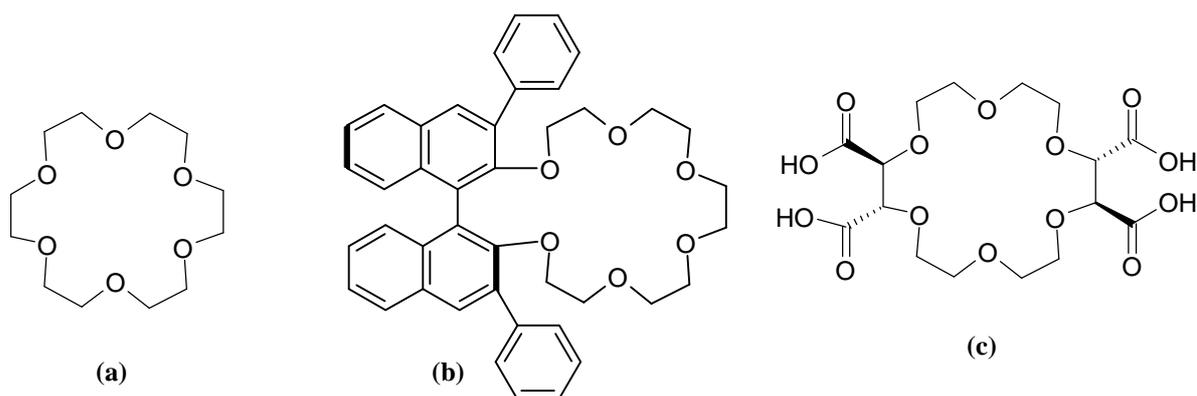
### b) **Les éthers couronnes chiraux**

#### - Structure, propriétés et reconnaissance chirale

Les éthers couronnes sont des polyéthers macrocycliques découverts en 1967 par Pederson [69]. L'unité de répétition essentielle est la fonction éthylèneoxy (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O) qui se répète 4, 5 et 6 fois, respectivement dans le 12-couronne-4 (12C4), le 15-couronne-5 (15C5) et le 18-couronne-6 (18C6) (*Figure 1.22-a*). Les atomes d'oxygène du cycle sont orientés vers le centre de la cavité, et définissent un plan dans lequel les composés alcalins, alcalino-terreux et les cations possédant des fonctions amines primaires peuvent être complexés. En effet, l'arrangement spatial singulier des groupements donneurs de l'éther couronne crée un environnement à forte densité électronique qui lui confère des propriétés nucléophiles. Les interactions primaires mises en jeu sont de type ion-dipôle entre le soluté cationique et les atomes d'oxygène électro-donneurs du cycle polyéthéré.

- Applications dans les sciences séparatives

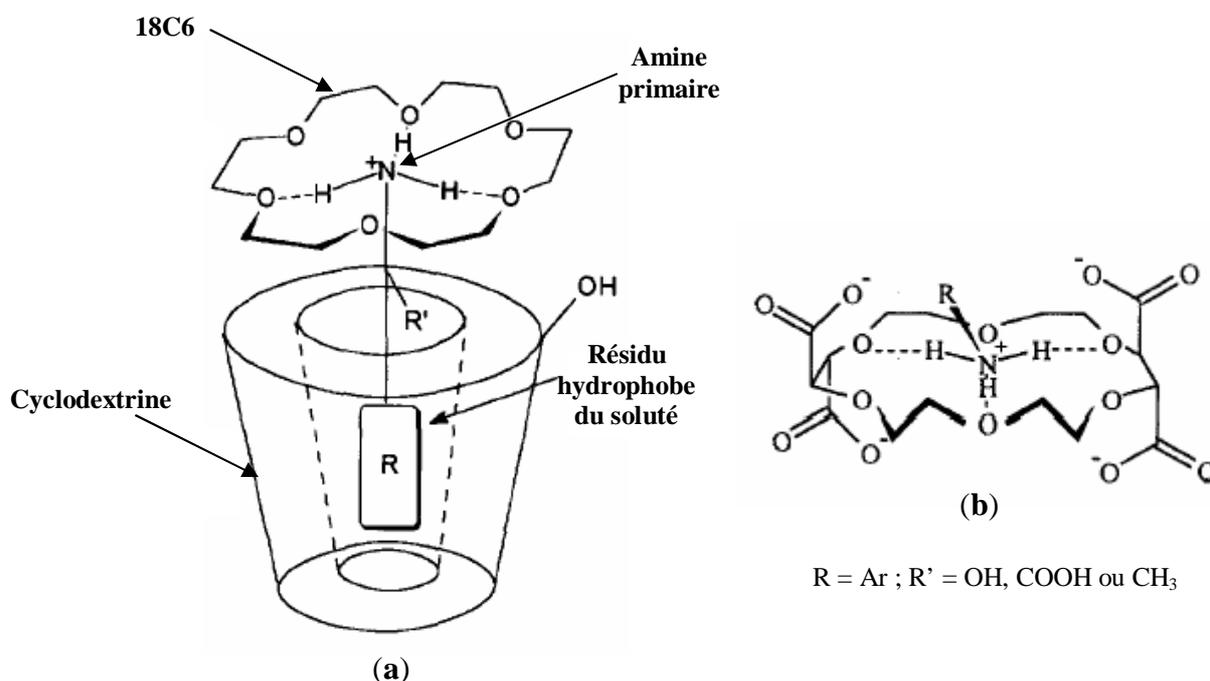
Si les polyéthers cycliques de petite taille montrent des sélectivités marquées pour des cations particuliers, le passage à des cavités de taille supérieure se fait au détriment de la spécificité des complexations. Ainsi, parmi les trois éthers couronnes cités ci-dessus, le 18C6 est de loin le plus utilisé notamment en électrophorèse capillaire lors de l'analyse de cations minéraux dans des eaux environnementales [70]. Son fort pouvoir complexant permet la séparation difficile des ions ammonium et potassium.



**Figure I.22 : Structures de quelques éthers couronnes chiraux.**

(a) : 18-couronne-6 (18C6); (b) : Crownpak CR (+); (c) : l'acide (-)-2,3,11,12-18-couronne-6 tétracarboxylique ((-)-18C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>).

Cependant, l'absence de centres d'asymétrie sur sa structure ne lui permet pas de résoudre des mélanges racémiques. En revanche, son action conjointe avec des cyclodextrines permet d'améliorer la séparation d'amines aromatiques [71]. Dans ce système en mode combiné, le trinôme cyclodextrine, soluté, éther couronne forme un complexe de type « sandwich » (Figure I.23-a). La fonction amine des énantiomères interagit avec l'éther couronne, tandis que le substituant hydrophobe de l'analyte s'incorpore dans la cavité de la cyclodextrine.



**Figure I.23 :** Représentations schématiques du mécanisme de reconnaissance chirale à l'aide d'un éther couronne.

(a) : complexe « sandwich » entre le 18C6, l'analyte et la cyclodextrine [71] ; (b) : entre une amine protonée et le (+)-18C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> [72].

Des modifications du squelette de l'éther couronne 18C6 parmi lesquelles le nombre et la nature des hétéroatomes ou l'introduction stéréosélective de substituants permettent de moduler la sélectivité. Ainsi, le dérivé binaphtyle du 18C6 (*Figure I.22-b*) a été greffé sur gel de silice pour résoudre avec succès des  $\beta$ -bloquants possédant des fonctions amines secondaires [73].

L'éther couronne chirale (+) acide-2,3,11,12-18-couronne-6 tétracarboxylique ((+)-18C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>) (*Figure I.22-c*) synthétisé par Lehn et *al.* [74] a été utilisé pour la première fois en électrophorèse capillaire par l'équipe de Häusler [75] pour résoudre des énantiomères de molécules d'intérêt biologique. Les acides aminés, les peptides peuvent également être séparés à l'aide de ce sélecteur chirale [75,76].

Le 18C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> possède 4 fonctions acide carboxylique ( $pK_a = 2,13 ; 2,84 ; 4,29 \text{ et } 4,88$  [26]) qui facilitent sa solubilité dans l'eau. A pH 2, l'éther couronne est peu ionisé et son utilisation est compatible avec la détection conductimétrique [77,78].

Comme nous l'avons évoqué précédemment, des interactions primaires sont responsables de l'inclusion de l'amine protonée dans la cavité hydrophile de l'éther couronne. Cependant, trois points d'interaction étant indispensables pour permettre le phénomène de reconnaissance chirale, des interactions secondaires entre les énantiomères et les substituants de l'éther couronne sont nécessaires. Compte tenu de la structure du 18C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, Kuhn [75] propose deux mécanismes possibles :

- les 4 fonctions acide carboxylique du 18C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, positionnées orthogonalement par rapport au cycle, agissent comme une barrière stérique chirale et divisent l'espace en deux cavités de part et d'autre du cycle polyéthéré (*Figure I.23-b*). En outre, la liaison C\*-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> de l'analyte complexé se positionne également dans le plan du cycle de l'éther couronne. Les trois autres substituants adjacents au centre de chiralité se distribuent dans l'une ou l'autre cavité.

- des interactions électrostatiques latérales (ionique ou liaison hydrogène) se créent entre l'hôte et l'invité. Ainsi, des forces de répulsion entre les groupements carboxylates du 18C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> et un dérivé aminé zwitterion peuvent avoir une influence sur la formation du complexe et sur l'énantiosélectivité.

La structure chimique des énantiomères influence fortement la qualité de la séparation à l'aide d'un éther couronne [40] :

- l'analyte doit être fonctionnalisé avec une amine primaire,
- la fonction amine doit préférentiellement être située en position  $\alpha$  par rapport au centre d'asymétrie,
- la présence d'un substituant volumineux sur le centre d'asymétrie permet une meilleure énantiosélectivité,
- la gêne stérique occasionnée par la présence de trois substituants encombrants diminue les interactions énantiosélectives avec l'éther couronne.

Ce sélecteur chiral est également disponible en chromatographie liquide. Il est alors greffé sur un support de silice [79] mais les performances de ce système sont limitées par de faibles efficacités et une forte asymétrie des pics chromatographiques [80].

A ce jour, seul le 18C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> est commercialement disponible sous ses formes *lévogyre* et *dextrogyre* pour des applications en électrophorèse capillaire. Ce sélecteur fait partie des

nouvelles phases stationnaires mises sur le marché (ChiroSilR RCA(+) & SCA(-)) et rejoint la phase stationnaire Crownpak<sup>®</sup> commercialisée par Chiral Technologies.

### c) **Les antibiotiques macrocycliques**

#### - Structure, propriétés et reconnaissance chirale

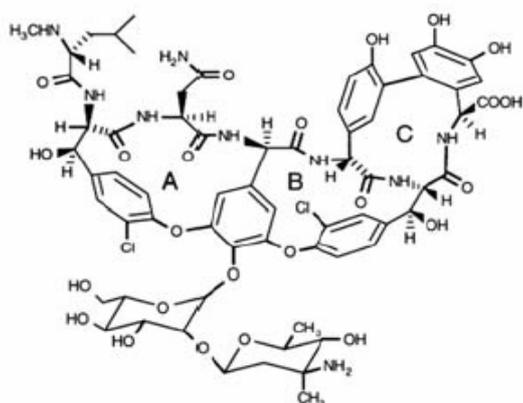
L'utilisation d'antibiotiques macrocycliques comme phase stationnaire a été introduite pour la première fois par Armstrong *et al.* en 1994 [81]. La multiplicité des centres chiraux et des groupements fonctionnels (noyau aromatique, cavité hydrophobe, fonction ionisable...) permet à ces sélecteurs chiraux d'interagir avec un grand nombre de molécules. Face à la complexité structurale de telles entités, le mécanisme de reconnaissance chirale n'a pu être clairement établi. Il semble que des interactions hydrophobe, dipôle-dipôle, liaison hydrogène, électrostatique et de type  $\pi$ - $\pi$  soient à l'origine de la résolution énantiomérique [82]. Par ailleurs, ces molécules possèdent de nombreux groupements hydrophiles et/ou ionisables qui leur confèrent une bonne solubilité en milieu aqueux.

Les antibiotiques macrocycliques les plus répandus sont les glycopeptides [83]. Leur structure comporte trois ou quatre cavités d'inclusion liées par des acides aminés substitués par des groupements phénoliques. Certains groupements phénols portent un mono ou un disaccharide. Les ansamycines diffèrent des glycopeptides par la présence d'un groupement chromophore incorporé dans la chaîne hydrocarbonée.

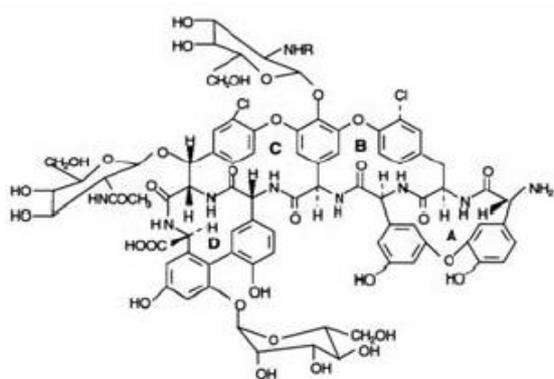
#### - Applications dans les sciences séparatives

Les antibiotiques macrocycliques se révèlent être des sélecteurs chiraux intéressants lors de la résolution de composés chiraux portant des fonctions acide carboxylique ou amine en position  $\alpha$  de leur centre d'asymétrie. En chromatographie en phase liquide ou supercritique, les trois phases stationnaires chromatographiques les plus répandues sont la vancomycine, la teicoplanine et la teicoplanine aglycone (*Figure I.24*) commercialisées par la société Astec, respectivement sous les dénominations Chirobiotic<sup>®</sup> V, Chirobiotic<sup>®</sup> T et Chirobiotic<sup>®</sup> TAG. La teicoplanine diffère des autres glycopeptides par la présence d'une

chaîne hydrophobe acylée sur l'un de ses groupements glucopyranosyles. Cette caractéristique lui confère des propriétés de surfactant.



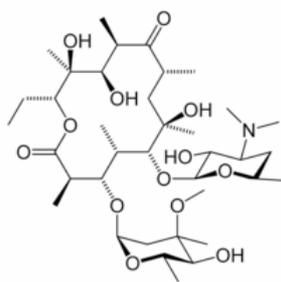
Vancomycine



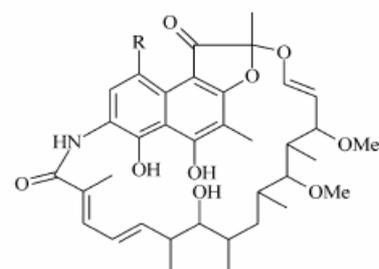
Teicoplanine



Teicoplanine aglycone



Erythromycine



Rifamycine A (R = OCH<sub>2</sub>COOH)  
Rifamycine SV (R = OH)

**Figure I.24 :** Structures de quelques glycopeptides (vancomycine et teicoplanine, teicoplanine aglycone), d'un macrolide (érythromycine) et d'ansamycines (rifamycines A et SV).

Ainsi, les énantiomères d'acides aminés ou de peptides ont été résolus en CPL sur les phases stationnaires teicoplanine ou teicoplanine TAG avec une phase mobile constituée d'un mélange méthanol / eau [84] ou acétonitrile / eau [85]. Ces phases stationnaires robustes et multi-modes ne trouvent pas d'équivalent en CPL pour la séparation chirale directe des acides aminés. Par ailleurs, les phases glycopeptidiques présentent des sélectivités complémentaires : une séparation amorcée sur une colonne est généralement complète sur une autre [86].

D'autre part, deux glycopeptides (la balhimycine et la bromobalhimycine) offrent une sélectivité 31 fois supérieure à la vancomycine lors de l'analyse de 16 racémates acides en EC [87].

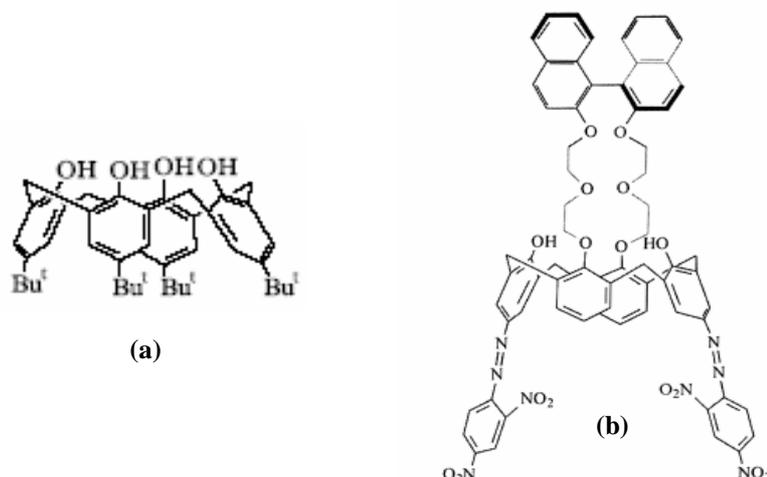
Récemment, un autre groupe d'antibiotiques macrocycliques, les macrolides, a été évalué en électrophorèse capillaire. Ainsi, l'ajout d'érythromycine dans un tampon phosphate (pH 6) a permis de séparer les énantiomères de dérivés biphényldiméthylester avec des résolutions comprises entre 4 et 10. La reconnaissance chirale est favorisée par la présence des noyaux aromatiques et de groupements acides carboxyliques sur les énantiomères [88].

Largement utilisés comme sélecteurs chiraux en électrophorèse capillaire, les antibiotiques macrocycliques sont aujourd'hui portés en désuétude en raison de leur forte absorption dans le domaine UV ( $< 250$  nm), leur instabilité thermique ( $< 35^{\circ}\text{C}$ ) et chimique ( $4 < \text{pH} < 8$ ) et leur coût. De plus, leur adsorption sur la paroi du capillaire compromet la reproductibilité des analyses [40].

#### d) **Les calixarènes**

Les calixarènes sont des oligomères cycliques issus de la substitution électrophile aromatique d'un phénol et d'un aldéhyde. Ils possèdent une cavité hydrophobe capable d'accueillir des molécules invitées. Leur forme tridimensionnelle ressemble à celle d'une cyclodextrine à savoir celle d'un cône tronqué caractérisé par un bord supérieur large avec des groupements hydroxyles et un bord inférieur étroit composé par les groupements phénoliques.

La nomenclature est simple et rend compte du nombre d'unités phénoliques constitutives du calixarène. Ainsi, le calix[4]arène possède quatre groupements phénols (*Figure I.25-a*). Celui-ci est présent sous différentes conformations en raison de la libre rotation de chaque phénol autour du pont méthylène. Cependant, les quatre substituants hydroxyles interagissent par liaison hydrogène pour stabiliser la conformation conique du calixarène.

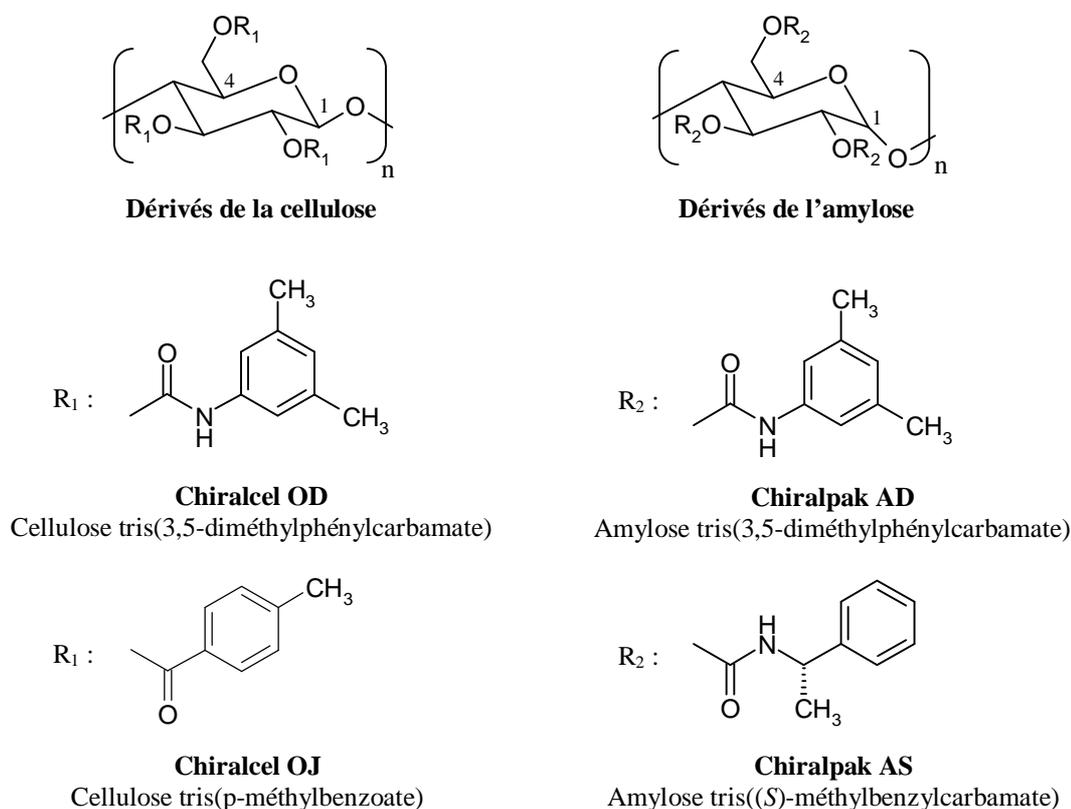


**Figure I.25 : Exemples de calixarènes (a) non chiral, (b) chiral [89].**

Les calixarènes chiraux sont principalement utilisés dans les capteurs énantiosélectifs lors de synthèses asymétriques afin de contrôler la pureté énantiomérique du produit final. Seul un des deux énantiomères de la molécule cible doit se complexer spécifiquement avec le calixarène. Pour ce faire, le capteur moléculaire est constitué d'un squelette calix[4]arène substitué par des groupements chromophores 2,4-dinitrophenylazo sur son bord supérieur (*Figure I.25-b*). L'asymétrie du capteur est apportée par le greffage d'un éther couronne substitué par un groupement binaphtyle [89]. Dès lors, le principe de détection repose sur un changement de couleur ou de fluorescence prononcé qui a lieu lors du phénomène de complexation. L'addition du (*R*)-phenylglycinol sur son capteur énantiosélectif spécifique conduit à un changement brutal de coloration de la solution qui passe du violet à bleu [25]. Au contraire, l'addition de l'énantiomère (*S*) sur le capteur n'induit aucune modification de couleur.

d) Les dérivés polysaccharidiques

La cellulose et l'amylose sont les biopolymères optiquement actifs les plus abondants qui possèdent un fort potentiel d'applications en séparation chirale. Ces polysaccharides ont une structure hélicoïdale asymétrique composée d'unités répétitives de (*D*)-(+)-glucose reliées par des ponts éthers en position  $\beta$  (1-4) pour la cellulose et  $\alpha$  (1-4) pour l'amylose. Afin d'améliorer l'énantiosélectivité de ces polymères naturels, la cellulose et l'amylose ont été dérivées par divers substituants au niveau des groupements hydroxyles des fonctions glucoses. Développés par Okamoto *et al.* [90], plus d'une dizaine de dérivés de l'amylose (Chiralpak®) et de la cellulose (Chiralcel®) sont commercialisés par la Société Daicel. Parmi l'ensemble de ces dérivés, quatre phases stationnaires ont révélé des performances incomparables. Les colonnes Chiralpak AD, AS et Chiralcel OJ, OD (*Figure I.26*) sont les supports chromatographiques les plus couramment utilisés.



**Figure I.26 :** Structures chimiques des dérivés de la cellulose et de l'amylose.

Les mécanismes de reconnaissance des phases polysaccharidiques sont multiples et complexes en raison des différentes conformations qu'adoptent les polysaccharides en fonction de la nature et de la teneur en modificateur organique dans la phase mobile. On admet que le processus se décompose en deux étapes [91] :

- la formation de complexes diastéréoisomériques par liaisons hydrogène ou interactions  $\pi$ - $\pi$  entre le soluté et le motif polysaccharidique,
- l'inclusion de la partie aromatique ou hydrophobe du soluté dans les cavités chirales du réseau polymérique.

Bien que les phases stationnaires chirales (PSC) OD et AD possèdent le même type de greffage à savoir un motif tris(3,5-diméthylphénylcarbamate), les sélectivités observées lors de l'analyse de nombreux composés sont totalement différentes. Ces modifications de comportement peuvent être attribuées à la différence de conformation qu'adopte ces deux PSC, à savoir une conformation chaise hélicoïdale gauche de type 4/1 pour la PSC AD et 3/2 pour la PSC OD [91].

Ces phases stationnaires sont utilisées avec succès en chromatographie liquide en polarité en mode normal [54], phase inverse [92] ou polaire organique [67]. L'analyse de composés pharmaceutiques de structures et de propriétés physico-chimiques très variées a également été réalisée en chromatographie par fluide supercritique [29]. De plus, elles sont très intéressantes en chromatographie liquide à l'échelle préparative en raison de leur nombre élevé de cavités chirales qui induit une forte capacité de charge. Ces quatre PSC possèdent un haut pouvoir énantiosélectif envers une multitude de composés ce qui leur permet de résoudre 90 % des racémates [38].

Jusqu'à ce jour, le principal défaut de ces PSC était lié au fait que la phase stationnaire était déposée sur un gel de silice. Les solvants compatibles étaient limités aux alcools, alcanes et à l'acétonitrile. L'utilisation de solvants de polarité intermédiaire tels que le méthyl *t*-butyl éther, l'acétate d'éthyle, le tétrahydrofurane, l'acétone et les solvants chlorés était interdite car elle pouvait partiellement ou totalement dissoudre le réseau polymérique chiral. Ce problème est désormais résolu depuis la commercialisation d'une nouvelle gamme de colonnes (IA : amylose tris-(3,5-diméthylphénylcarbamate), IB : cellulose tris-(3,5-diméthylphénylcarbamate) et IC : cellulose tris-(3,5-dichlorophénylcarbamate)) dont la phase stationnaire est immobilisée sur la silice [93].

Celles-ci montrent une meilleure robustesse vis-à-vis d'un large panel de solvants (dichlorométhane, acétate d'éthyle, acétone...) et ouvrent de nouvelles possibilités quant au choix de la composition de la phase mobile pour la résolution d'énantiomères.

Bien que les colonnes Chiralpak<sup>®</sup> IA et AD possèdent le même type de greffage, les sélectivités peuvent être très différentes d'une colonne à l'autre en raison de l'altération structurale du polysaccharide causée lors du processus d'immobilisation. Ainsi, une séparation mise au point sur AD peut être difficilement transposable sur IA et réciproquement [38].

En EC, des polysaccharides linéaires ont été utilisés tels que les dextrans, les dextrans et l'héparine. Malgré un fort pouvoir résolutif vis-à-vis de certaines classes chimiques (par exemple, les sucres pour les maltodextrines), leur utilisation est très limitée [40].

#### *e) Les protéines*

Quatre protéines principales représentent cette classe de sélecteurs chiraux. Il s'agit des albumines de sérum humain (HSA) ou de sérum bovin (BSA), de l'acide  $\alpha_1$  glycoprotéine (AGP) et de l'ovomucoïde. Elles diffèrent de part la nature et le nombre d'acides aminés qui les constituent, ce qui leur confère des propriétés complexantes très différentes. Par exemple, la présence d'acide sialique sur la structure de la protéine AGP lui permet de fixer de nombreux composés basiques. De plus, l'AGP est la seule protéine constituée de 5 motifs carbohydate.

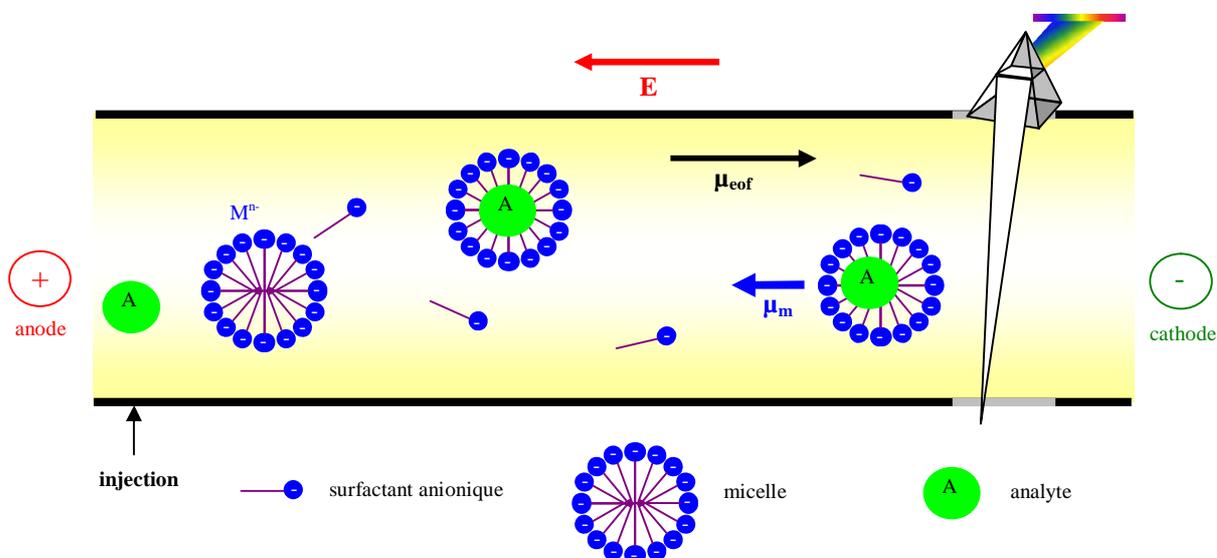
Les sélecteurs protéiques sont caractérisés par la présence de nombreux sites chiraux dans lesquels des interactions hydrophobes, électrostatiques et de type liaison hydrogène sont responsables de la reconnaissance chirale. L'importance de ces mécanismes dépend de la structure tridimensionnelle de la protéine qui varie en fonction de la nature et de la teneur en solvant organique de la phase mobile [27]. En règle générale, la reconnaissance chirale exige la présence d'au moins deux fonctions polaires dans la structure du soluté. La présence d'un substituant encombrant ou rigide à proximité du centre d'asymétrie favorise la reconnaissance chirale au niveau des sites d'interaction de la protéine.

En raison des interactions entre les médicaments et les protéines dans les milieux biologiques, les protéines sont sélectives vis-à-vis d'un grand nombre de principes actifs.

Cependant, depuis quelques années, l'utilisation de ce type de sélecteurs chiraux en CPL est en déclin en raison de leur manque de robustesse et de leur coût [38]. Les principaux inconvénients liés à l'utilisation des protéines en EC sont la faible sensibilité, due à l'absorbance UV de ces dernières, et le manque de reproductibilité, dû à leur adsorption sur la paroi interne du capillaire.

#### *f) Les surfactants*

Les surfactants sont des composés amphiphiles constitués d'une tête polaire hydrophile et d'une chaîne carbonée hydrophobe. Les surfactants ont été utilisés essentiellement en électrophorèse capillaire micellaire (MEKC) pour résoudre des composés neutres ou ioniques. Ces additifs, pour la plupart anioniques, sont ajoutés à l'électrolyte. Lorsque leur concentration en solution est supérieure à la concentration micellaire critique, l'hydrophobie des chaînes carbonées contraint le regroupement de ces molécules pour former un agrégat sphérique appelé micelle. L'orientation tête – queue des molécules au sein de la micelle dépend de la polarité du solvant de solubilisation. La séparation des composés est basée sur leur partage entre la micelle qui joue le rôle de pseudo phase stationnaire et le tampon de migration [53]. Le pH du tampon est un paramètre déterminant puisqu'il conditionne l'ionisation du surfactant et la vitesse du flux électroosmotique. Les séparations sont réalisées de telle sorte que la vitesse du flux électroosmotique soit supérieure à la vitesse électrophorétique des micelles. Le principe de séparation des analytes en électrophorèse capillaire micellaire est représenté sur la *figure 1.27*.

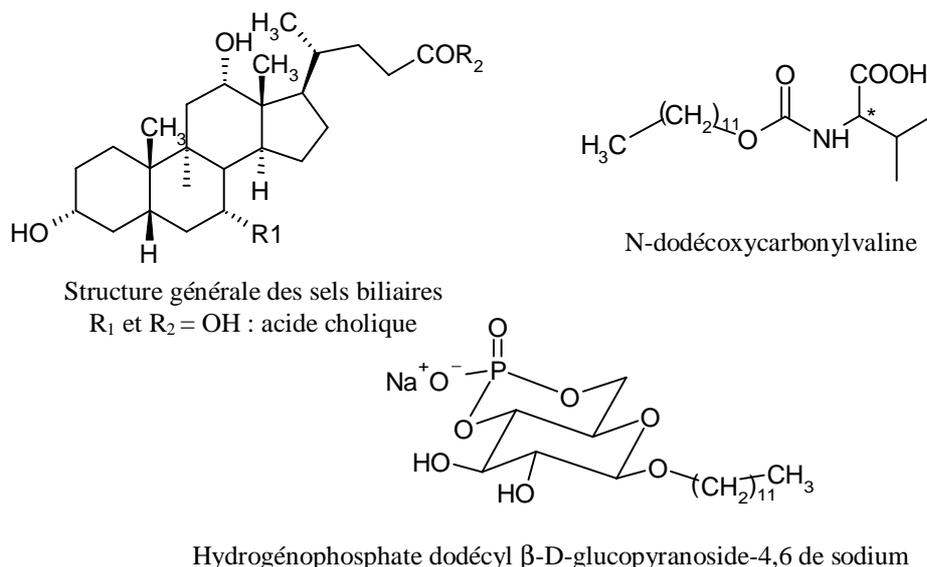


**Figure I.27 :** Principe de séparation en électrophorèse micellaire.

Deux approches distinctes permettent de séparer les énantiomères en MEKC.

### a) Les surfactants chiraux

La première fait appel aux surfactants chiraux qui peuvent être issus de produits naturels comme les sels biliaires (acide cholique), les saponines ou leurs dérivés organiques [27]. Cette dernière classe de composés regroupe les dérivés aminés à longue chaîne, les glycosides stéroïdiens et certains dérivés de l'acide tartrique [94]. Quelques uns de ces composés sont présentés sur la *figure I.28*.



**Figure I.28 :** Structures de quelques surfactants chiraux naturels et synthétiques.

Les sels biliaires, synthétisés par le foie, sont les surfactants chiraux naturels les plus utilisés. Leur structure stéroïdienne diffère drastiquement des surfactants alkyles à longue chaîne comme les surfactants polymériques synthétiques ce qui leur confère des propriétés particulières. Les groupements hydroxyles sont orientés du même côté et de façon orthogonale par rapport au squelette stéroïdien [95]. Ainsi, les sels biliaires présentent une face hydrophile et une face hydrophobe capables de discriminer les énantiomères de composés rigides tels que les hydrocarbures polyaromatiques planaires. Ainsi, les énantiomères de composés polychlorobiphényles (polluants chimiques persistants) ont été partiellement séparés en MEKC en ajoutant 100 mM de cholate de sodium dans un tampon CHES (acide 2-(cyclohexylamino)éthanesulfonique) contenant 2M d'urée [95]. Bien que ces résultats n'aient pas été entièrement satisfaisants, les sels biliaires peuvent être potentiellement intéressants pour résoudre des analytes hydrophobes.

L'utilisation de surfactants synthétiques offre de nombreux avantages par rapport aux surfactants naturels. Ainsi, un transfert de masse plus rapide du soluté entre la micelle et le tampon conduit à une amélioration des efficacités de pics et de la résolution [96]. De plus, les surfactants synthétiques sont plus stables dans des conditions de pH extrêmes et présentent une meilleure tolérance aux solvants organiques (50 - 60 %). Ainsi, les surfactants polymériques se révèlent appropriés pour la résolution énantiomérique de produits pharmaceutiques en synergie ou non avec des cyclodextrines [96].

### **b) Les surfactants achiraux**

La seconde méthode utilise un surfactant achiral auquel est ajouté un sélecteur chiral. La majorité des applications décrivent l'addition conjointe d'une cyclodextrine neutre avec le sodium dodécyl sulfate (SDS) [53]. Cette approche est particulièrement bien adaptée pour la séparation énantiomérique de composés hydrophobes. En effet, en MEKC classique, les composés hydrophobes montrent trop d'affinité envers la micelle et ne se partagent pas suffisamment entre les phases micellaire et aqueuse. Les cyclodextrines qui sont des molécules chirales hydrosolubles modifient ce partage par complexation des énantiomères dans leur cavité hydrophobe. Chaque énantiomère, complexé préférentiellement, soit par la micelle, soit par la CD, possède des mobilités électrophorétiques différentes, ce qui explique leur séparation.

De part la complexité de ce système, la mise au point d'une séparation électrophorétique chirale peut s'avérer longue, notamment lors du choix du couple sélecteur chiral - surfactant.

### **II.3.2. Les sélecteurs chiraux spécifiques d'un énantiomère cible**

#### *a) Les anticorps*

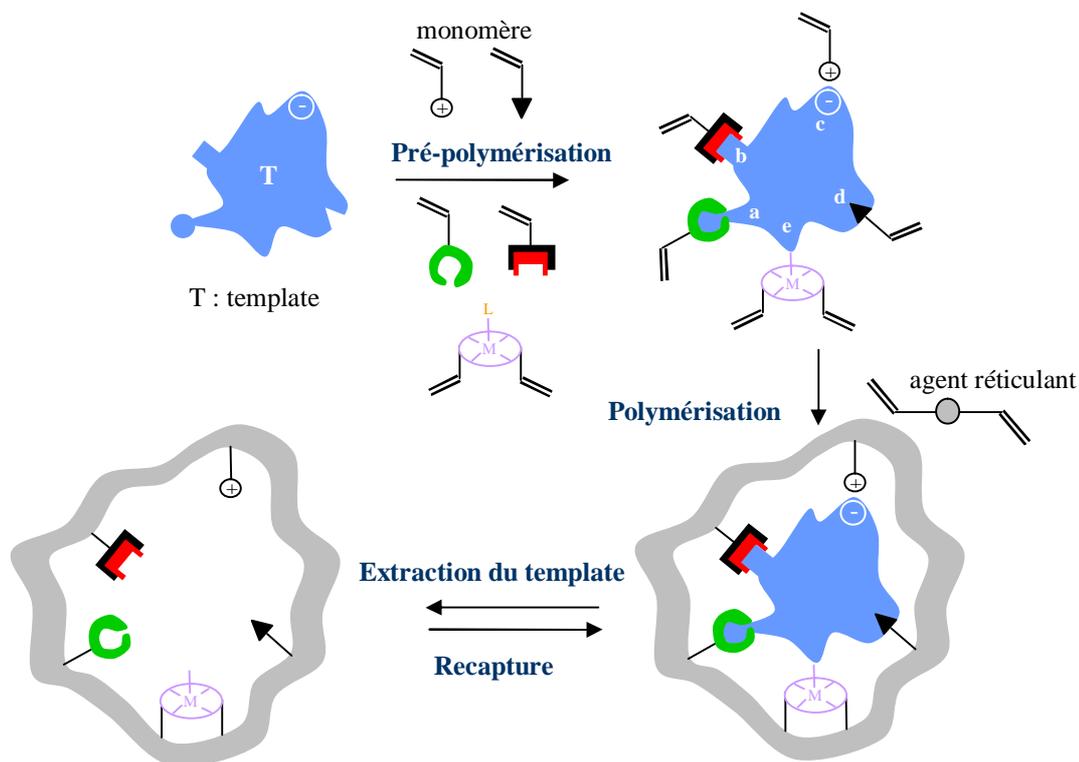
Afin de rendre les analyses plus énantiosélectives, de nouveaux supports basés sur la reconnaissance anticorps-antigène ont été créés. Les anticorps sont des glycoprotéines produites par le système immunitaire des organismes vertébrés en réponse à l'intrusion d'un élément biologique étranger dans l'organisme. L'immunisation d'un animal consiste à injecter de façon contrôlée un antigène donné afin de stimuler sa réponse immunitaire. Les anticorps sont par la suite extraits de la rate de l'animal, puis purifiés. Les anticorps monoclonaux interagissent de façon homogène et hautement sélective vis-à-vis de leurs antigènes.

En chromatographie liquide, les anticorps énantiosélectifs sont greffés sur des billes d'agarose ou immobilisés à la surface de la silice pour constituer la phase stationnaire. La plupart des applications chromatographiques relatives à l'utilisation d'anticorps comme sélecteurs chiraux ont permis la séparation de principes actifs pharmaceutiques [97]. La sélectivité est prédictible avec une rétention plus forte de l'énantiomère antigène. Toutefois, la durée de vie des colonnes reste limitée en raison des conditions d'élution extrêmes nécessaires pour rompre les interactions fortes entre l'anticorps et l'antigène. De plus, la longueur des cycles d'élution des analytes et de régénération de la phase stationnaire rend cette méthode inutilisable en laboratoire de contrôle qualité.

#### *b) Les polymères à empreinte moléculaire*

Un polymère à empreinte moléculaire (MIP pour Molecular Imprinted Polymer) se définit comme un matériau possédant des cavités spécifiques d'une molécule ciblée. L'impression polymérique consiste à « mouler » une molécule empreinte dans un réseau polymérique. Les empreintes ainsi formées sont spécifiques de la molécule. L'élimination de la molécule empreinte lors de la dernière étape de synthèse laisse des sites capables de

recapter spécifiquement la molécule empreinte par des liaisons fortes (covalentes) ou faibles (liaisons ionique, hydrogène ou chélation) (Figure I.29).



**Figure I.29 : Principe de formation d'un polymère à empreinte moléculaire.**

Sites d'interaction du template avec le polymère par (a) et (b) : liaisons covalentes ; (c) : liaison ionique ; (d) : liaison hydrogène ; (e) : chélation avec un métal.

En chromatographie liquide, les phases stationnaires à base de MIP chiraux présentent plusieurs caractéristiques intéressantes [25] :

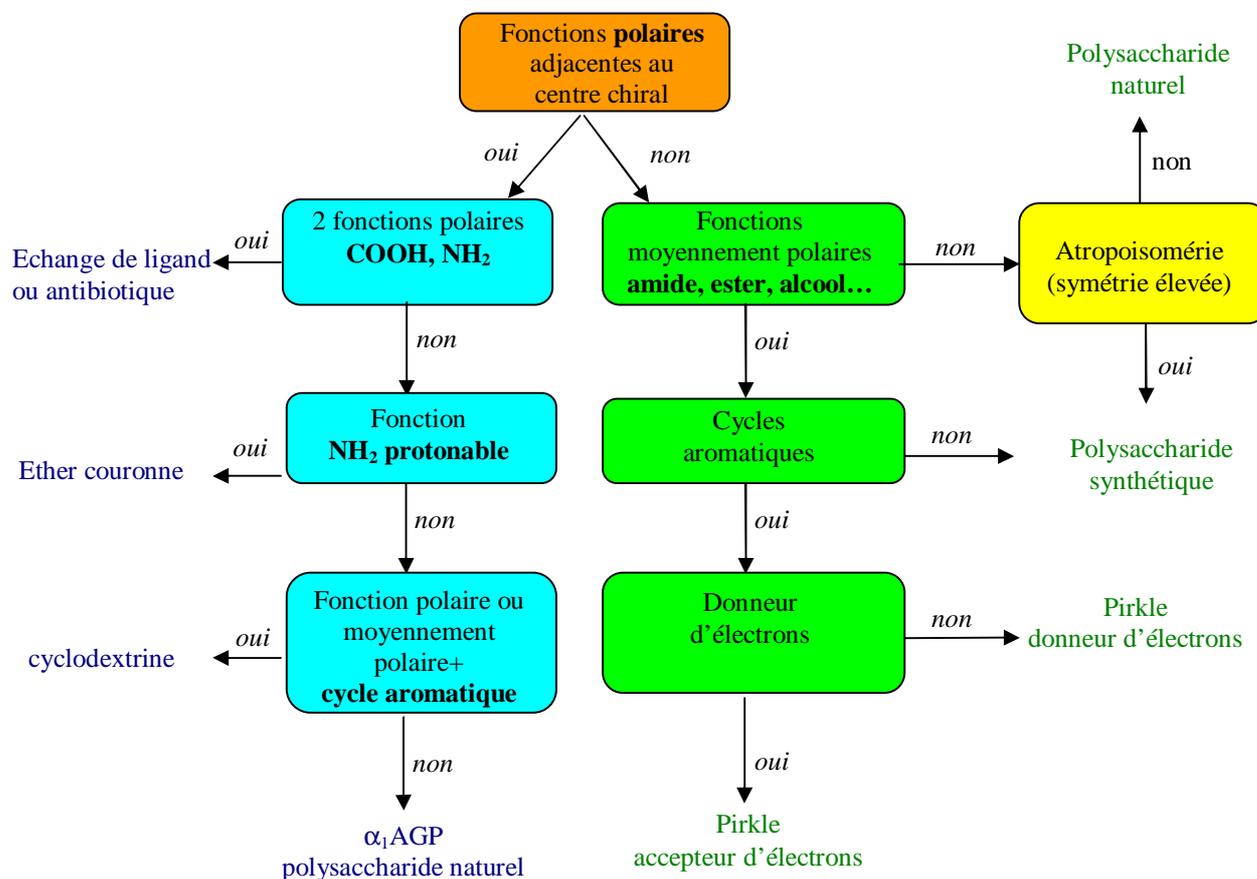
- l'ordre d'éluion des énantiomères est prédéfini ; l'énantiomère utilisé lors de la synthèse du MIP sera le plus retenu,
- de part les propriétés intrinsèques des MIP, les sites d'interactions énantiosélectives sont facilement identifiables,
- les composés nécessaires à la synthèse de la phase stationnaire sont commercialement disponibles et peu onéreux,
- le matériau présente une remarquable stabilité mécanique et chimique. Il ne nécessite aucune précaution particulière lors de son utilisation.

Cependant, quelques inconvénients liés à l'utilisation de ce type de support existent. La capacité de charge est relativement limitée environ (1 à 40  $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ) [98], surtout lorsque les empreintes sont formées par des liaisons faibles. En effet, il est

couramment admis que seul 1 à 2 % des empreintes théoriquement formées sont capables d'accueillir la molécule empreinte. Le polymère imprimé souffre également d'une hétérogénéité des sites d'interaction se traduisant par une faible efficacité et une forte asymétrie des pics chromatographiques [25]. De plus, la synthèse du MIP nécessite une grande quantité de molécules empreintes ce qui est un facteur limitant lorsque l'analyte n'est disponible qu'en faible quantité. En outre, le coût de recherche peut être multiplié si la molécule empreinte est un composé à forte valeur ajoutée.

### **II.3.3. Bilan sur le choix des sélecteurs chiraux en CPL**

La multiplicité des sélecteurs chiraux commercialement disponibles et la complexité des mécanismes de reconnaissance chirale rendent le choix d'un système analytique difficile lorsqu'on est confronté à une séparation énantiomérique. En effet, il n'existe aucune règle stricte de choix du sélecteur chiral. On peut cependant proposer un arbre de décision en se basant sur la structure du soluté à séparer et des interactions énantiosélectives qu'il pourrait induire avec le sélecteur chiral (*Figure I.30*). La prise en compte de divers paramètres tels que la sélectivité, l'efficacité, la reproductibilité ou encore le coût et le temps d'analyse sont des facteurs déterminants lors du choix du sélecteur chiral.



**Figure I.30** : Arbre de décision du choix du sélecteur chiral en CPL [99].

Comme nous l'avons illustré dans ce chapitre, la chromatographie liquide et l'électrophorèse capillaire sont deux techniques couramment utilisées pour résoudre des énantiomères. Toutefois, chacune d'entre elles présente des inconvénients intrinsèquement liés à leur technologie. Par exemple, en EC, la qualité des séparations peut fluctuer d'un lot de sélecteur chiral à un autre (notamment pour les cyclodextrines) ou après un changement de capillaire. La résolution des énantiomères en chromatographie peut, quant à elle, s'effiler, voire disparaître, avec le vieillissement de la colonne. De plus, aucun sélecteur chiral n'étant universel, l'acquisition de plusieurs colonnes différemment greffées est souvent nécessaire pour résoudre des énantiomères. Ceci induit un coût supplémentaire tant pour la mise au point de la séparation chirale que pour l'investissement en matériel.

Cependant, la robustesse de la chromatographie liquide étant unanimement reconnue, la détermination de la pureté énantiomérique en analyse de routine est essentiellement basée sur les méthodes chromatographiques en phase liquide avec une détection spectrométrique UV. Depuis la récente mise sur le marché d'un détecteur à dichroïsme circulaire, l'analyse chromatographique couplée à la détection chiroptique semble être une méthode alternative pour remédier aux problèmes évoqués précédemment.

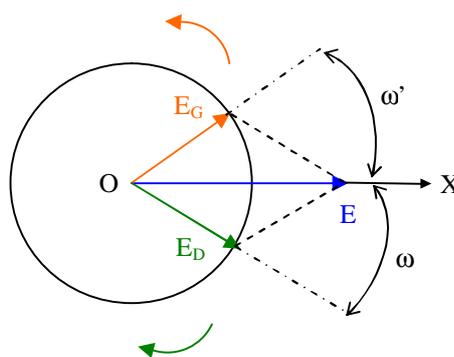
### III. Sélectivité optique des énantiomères : la détection par dichroïsme circulaire

#### III.1. Théorie des propriétés chiroptiques

Toute onde lumineuse est associée à un champ électrique  $E$  et à un champ magnétique  $B$  qui se propagent orthogonalement à la direction du faisceau. L'interaction de cette onde avec un matériau chiral produit différents phénomènes (activité optique, dichroïsme circulaire).

##### III.1.1. La théorie de Fresnel

Dans un **milieu transparent** (dépourvu d'asymétrie), la composante électrique d'une onde lumineuse rectiligne incidente ( $OE$ ) peut être considérée comme la résultante de deux vibrations circulaires de sens opposé ( $E_G$  et  $E_D$ ), de même période que la vibration rectiligne mais d'amplitude deux fois moindre. Si  $E_D$  tourne dans le sens des aiguilles d'une montre et  $E_G$  en sens inverse avec la même fréquence, les deux vecteurs font des angles égaux en valeur absolue ( $\omega = \omega'$ ) et leur résultante  $E$  traduit le mouvement de l'onde polarisée le long de l'axe de vibration  $X$  (Figure I.31).



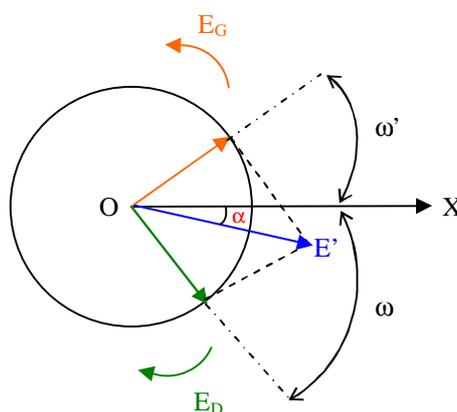
**Figure I.31** : Le champ électrique  $E$  résultant de deux vecteurs équidistants  $E_G$  et  $E_D$ .

##### III.1.2. La rotation optique

Un **milieu actif** ne peut propager sans déformation que deux vibrations circulaires privilégiées, l'une droite ( $E_D$ ), l'autre gauche ( $E_G$ ) dont les vitesses de propagation dans le milieu sont différentes. En passant à travers le milieu optiquement actif, les deux ondes

effectuent un nombre différent de rotations et les angles deviennent inégaux ( $\omega \neq \omega'$ ). Ainsi, le faisceau lumineux polarisé présente la **biréfringence circulaire** c'est-à-dire une différence de vitesse entre les constituants  $E_G$  et  $E_D$  due à un écart entre les indices de réfraction  $n_G$  et  $n_D$ .

Par suite de l'existence de ce déphasage introduit par la traversée du milieu optiquement actif, les deux vibrations circulaires émergentes se recomposent en donnant la vibration rectiligne  $OE'$  dont le plan de polarisation fait l'angle  $\alpha$  avec l'axe de vibration initial  $X$  (Figure I.32). Le sens de la rotation produit par le milieu actif est celui de la vibration la plus rapide.



**Figure I.32 : Activité optique  $\alpha$  résultant de la biréfringence circulaire.**

Dans l'exemple décrit ci-dessus où  $E_D > E_G$ , le milieu est *dextrogyre*. Inversement, le milieu est *levogyre* lorsque l'onde polarisée dans un plan fait un angle négatif avec le plan  $X$  ( $E_G > E_D$ ). L'activité optique exprime la différence entre les indices de réfraction pour les lumières polarisées gauche et droite, comme l'indique l'équation I.4.

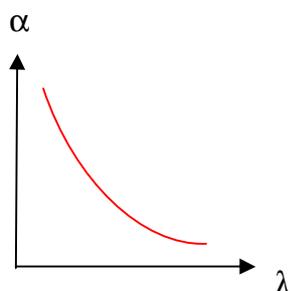
$$a = \frac{P}{l} (n_G - n_D) \tag{I.4}$$

où  $\alpha$  s'exprime en  $\text{rad.cm}^{-1}$ ,  $\lambda$  représente la longueur d'onde de la lumière incidente (nm),  $n_D$  et  $n_G$  respectivement les indices de réfraction du milieu pour les lumières polarisées circulairement à droite et à gauche.

### III.1.3. La dispersion rotatoire optique

#### a) Cas d'une substance dénuée de groupements chromophores

La variation de l'activité optique  $\alpha$  avec la longueur d'onde  $\lambda$  donne une courbe de dispersion rotatoire. Lorsqu'une substance optiquement active est dénuée de groupements chromophores, la dispersion rotatoire est dite « normale » [100] et décrit une variation monotone de  $\alpha$  en fonction de la longueur d'onde (*Figure I.33*).



**Figure I.33** : Courbe de dispersion rotatoire normale d'une substance optiquement active dénuée de groupement chromophore.

En pratique, la mesure du pouvoir rotatoire ou de l'angle de rotation du plan de polarisation d'une substance chirale s'effectue à l'aide d'un polarimètre. La loi de Biot, s'applique aux substances actives dissoutes dans un solvant inactif comme l'eau. Elle s'exprime par la relation suivante :

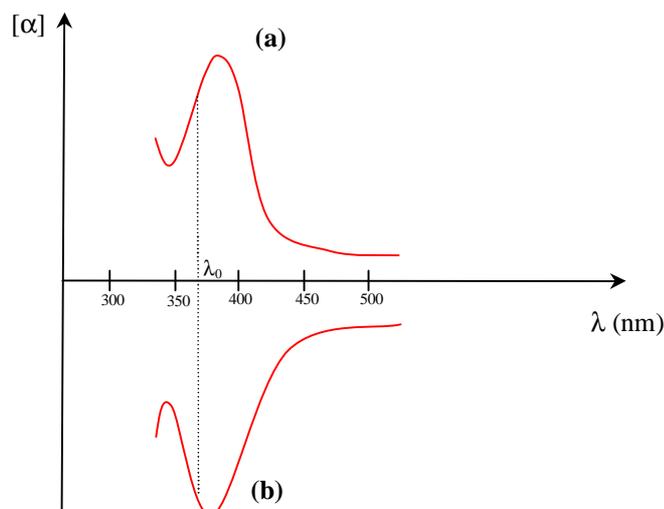
$$a = [\alpha]_{\lambda,T} l C \quad (I.5)$$

où  $\alpha$  est le pouvoir rotatoire (deg),  $l$  l'épaisseur de substance active traversée (dm),  $C$  la concentration de la substance dissoute ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) et  $[\alpha]_{\lambda,T}$  le pouvoir rotatoire spécifique ( $\text{deg}\cdot\text{dm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^3$ ) à une longueur d'onde ( $\lambda = 589,3$  nm, raie du sodium) et à une température données.

#### b) Cas d'une substance constituée d'au moins un groupement chromophore

En revanche, pour un composé qui présente une ou plusieurs bandes d'absorption optiquement actives dans la région spectrale examinée, la courbe de dispersion optique

rotatoire est dite « anormale » et présente un ou plusieurs extrema (maximum ou minimum) dans la région où les chromophores absorbent la lumière (*Figure I.34*) [100].



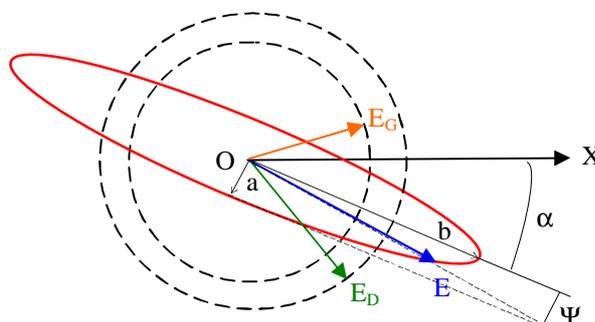
**Figure I.34** : Courbes de dispersion rotatoire anormale à effets Cotton (a) positif et (b) négatif.

La présence d'un point d'inflexion sur ces courbes traduit ce que l'on nomme l'**effet Cotton**. Deux énantiomères donnent des courbes opposées, respectivement à effets Cotton positif et négatif.

Dans les années 1950, l'analyse des courbes de dispersion optique rotatoire a permis de résoudre des problèmes stéréochimiques. Il est en effet possible de relier le signe de l'effet Cotton avec la stéréochimie des substituants pour les composés carbonylés. Grâce à la règle des octants, l'étude des spectres de dispersion rotatoire optique a permis l'élucidation de la structure de nombreux stéroïdes [101].

### **III.1.4. Le dichroïsme circulaire**

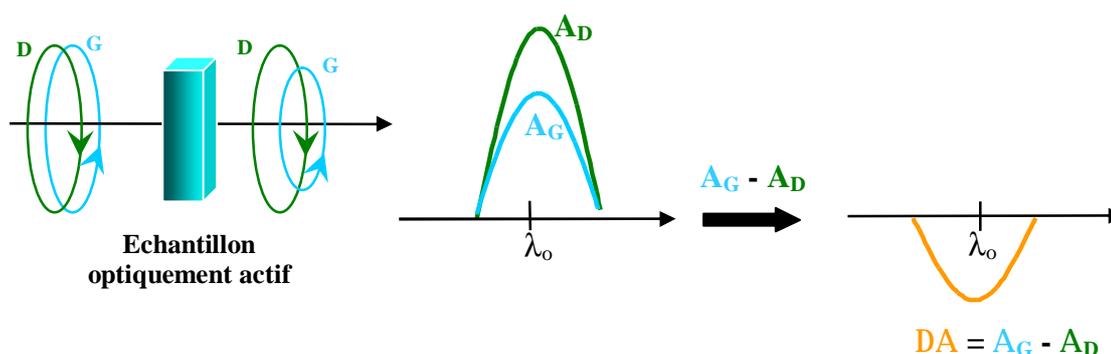
Dans le cas de la dispersion anormale (molécule possédant un chromophore), les deux vibrations circulaires ( $E_G$  et  $E_D$ ) subissent, non seulement la **biréfringence circulaire**, mais parallèlement une **différence d'absorption de la lumière polarisée**. Par conséquent, la longueur du vecteur  $E_D$  ne correspond plus à celle de  $E_G$ , et ces deux vibrations circulaires d'amplitude inégale n'ont plus pour résultante un cercle, mais une vibration elliptique comme indiqué par la *figure I.35*.



**Figure I.35 :** Activité optique (a) et ellipticité (Y) de la lumière polarisée dans un plan, émergeant d'un milieu optiquement actif, dans la région des longueurs d'onde d'une bande d'absorption.

Lorsqu'un milieu optiquement actif est traversé par une lumière monochromatique polarisée circulairement, non seulement le plan de polarisation tourne d'un angle  $\alpha$ , mais la lumière émergente est polarisée de façon elliptique. Le milieu présente alors le phénomène de **dichroïsme circulaire** [101].

La spectroscopie de dichroïsme circulaire mesure la différence d'absorption pour un composé chiral de la lumière polarisée circulairement gauche et de la lumière polarisée circulairement droite et ceci, en fonction de la longueur d'onde (Figure I.36).



**Figure I.36 :** Principe optique du dichroïsme circulaire.

Différence d'absorbance ( $\Delta A$ ) entre les lumières polarisées circulairement gauche ( $A_G$ ) et droite ( $A_D$ ).

On peut également caractériser ce phénomène par la mesure de l'angle d'ellipticité qui est proportionnel à la différence entre les coefficients d'absorption pour les rayons polarisés circulaires gauche et droit ( $k_G - k_D$ ) et se calcule comme suit :

$$y = \frac{P}{l} (k_G - k_D) \tag{I.6}$$

où  $\psi$  est mesuré en  $\text{rad.cm}^{-1}$  et  $\lambda$  est la longueur d'onde de la lumière incidente en nm.

L'ellipticité ( $\psi$ ) est également donnée par le rapport entre les rayons des petit (a) et grand (b) axes de l'ellipse [102].

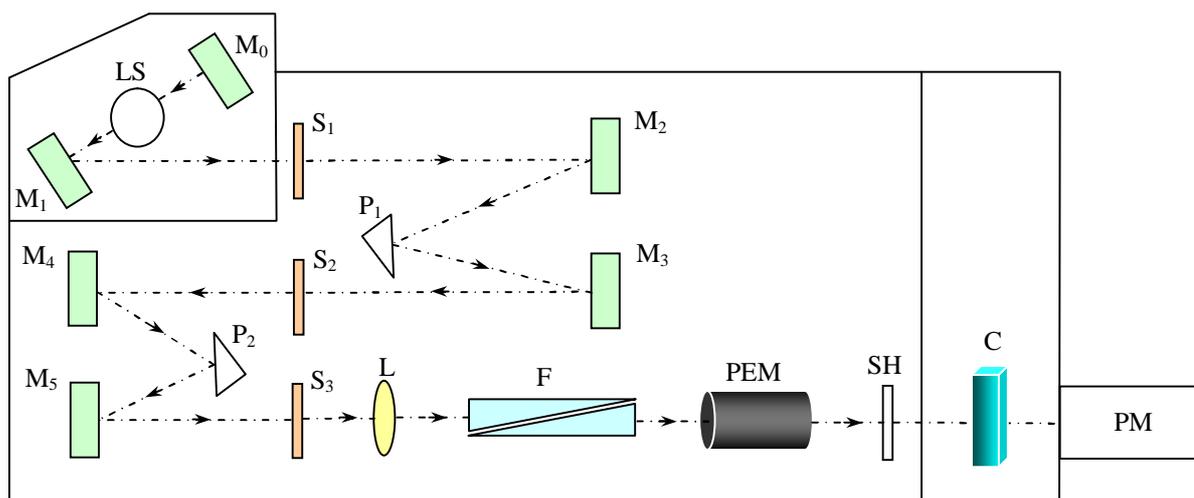
$$\tan \psi = \frac{a}{b} \quad (I.7)$$

On désigne sous le nom d'**effet Cotton**, les trois effets distincts observés lors du passage d'une lumière polarisée à travers une substance optiquement active : le dichroïsme circulaire, l'ellipticité et la dispersion rotatoire optique. Dans la suite du manuscrit, par souci de simplification le terme « effet Cotton » désignera le ou les signaux (positifs ou négatifs) observés sur le spectre de dichroïsme circulaire.

## III.2. Acquisition d'un spectre de dichroïsme circulaire

### III.2.1. Description de l'appareillage

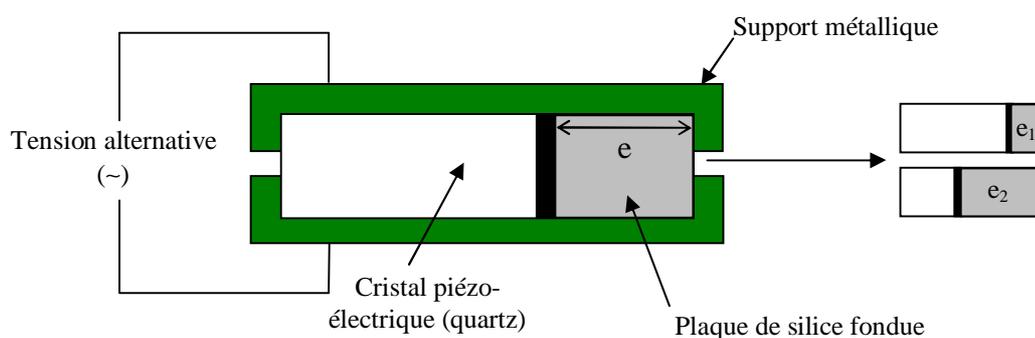
L'enregistrement des spectres de dichroïsme circulaire est effectué sur un dichrographe. La méthode de mesure du dichroïsme est basée sur l'obtention d'une lumière alternativement polarisée à droite et à gauche. Pour cela, le spectromètre est constitué d'un modulateur photo-élastique (*Figure I.37*).



**Figure I.37** : Schéma optique d'un spectromètre à dichroïsme circulaire. D'après documentation Jasco.

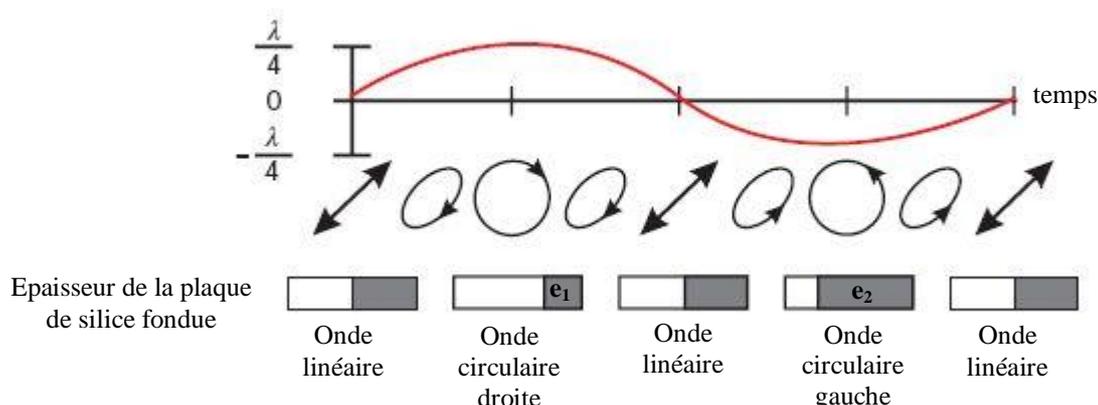
LS : lampe au xénon - mercure ;  $M_0, \dots, M_5$  : miroirs ;  $S_1, S_2, S_3$  : fentes ;  $P_1, P_2, P_3$  : prismes ; L : lentille ; F : filtre de polarisation ; PEM : modulateur photo-élastique ; SH : obturateur ; C : cellule d'analyse ; PM : photo-multiplicateur.

Une lumière polychromatique, émise à partir d'une lampe au xénon - mercure, est dispersée par un prisme en une lumière monochromatique. L'onde lumineuse est, par la suite, polarisée rectilignement à l'aide d'un polariseur puis modulée alternativement en lumière polarisée circulairement droite et gauche grâce à un modulateur photo-élastique. La pièce principale de ce modulateur est une lame quart d'onde (*Figure I.38*). Celle-ci est constituée d'un cristal de quartz (élément piézo-électrique) fixé sur une plaque rectangulaire de silice fondue.



**Figure I.38 :** Représentation schématique d'une lame quart d'onde.

Sous l'influence d'un champ électrique alternatif, le capteur piézoélectrique vibre à la fréquence de 50 kHz [103]. Ainsi, la plaque de silice fondue vibre à son tour. Ce matériau initialement isotrope devient alors biréfringent [104] et oscille entre deux épaisseurs ( $e_1$  et  $e_2$ ) : l'une donne naissance à la lumière polarisée circulairement droite, l'autre permet d'obtenir celle polarisée circulairement gauche (*Figure I.39*).



**Figure I.39 :** Obtention d'une lumière polarisée circulairement à l'aide d'une lame quart d'onde.

Le faisceau lumineux passe ensuite à travers la cellule d'analyse où l'échantillon optiquement actif va absorber préférentiellement l'une des deux ondes polarisées

circulairement. Le photomultiplicateur amplifie le signal reçu qui correspond à la mesure de différence d'absorbance ( $\Delta A \sim \Delta \epsilon$ ) entre la lumière polarisée circulairement gauche ( $\epsilon_G$ ) et celle polarisée circulairement droite ( $\epsilon_D$ ).

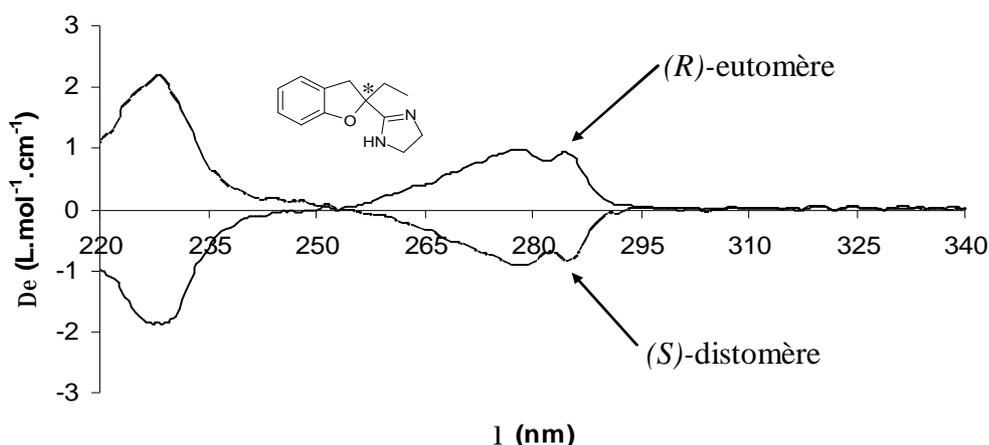
### III.2.2. Interprétation d'un spectre de dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire sont obtenus en portant la différence des coefficients d'extinction molaire gauche et droit ( $\Delta \epsilon$ ) (ou l'ellipticité moléculaire  $[\theta]$ ) en fonction des longueurs d'onde (nm).  $\Delta \epsilon$  et  $[\theta]$  sont reliés entre eux par la relation :

$$[\theta] = 3300 \Delta \epsilon \quad (I.8)$$

où  $[\theta]$  s'exprime en  $^\circ \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$  et  $\Delta \epsilon$  en  $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Le facteur 3300 provient de la simplification de l'équation exprimant  $[\theta]$  en fonction de la différence d'absorbance entre les lumières polarisées circulairement à droite et à gauche ( $[\theta] = 23,03/4 \times (A_G - A_D) \times 180/\pi$ ).

La *figure I.40* illustre les spectres de dichroïsme circulaire des énantiomères de l'efaroxan. Comme attendu, les spectres de dichroïsme circulaire des deux énantiomères sont symétriques entre eux, par rapport à l'axe des abscisses.



**Figure I.40 :** Spectres dichroïques des eutomère (*R*) et distomère (*S*) de l'efaroxan.

Dichrographe : J-810 (Jasco) ; gamme de longueur d'onde : 220-340 nm ; solvant : hexane/EtOH/DEA (90/10/0,05 v/v/v) ; température : 25°C ; concentration :  $0,79 \cdot 10^{-3} \text{M}$ .

La nature et la position des substituants du noyau aromatique jouent un rôle déterminant dans la réponse dichroïque [101]. L'effet Cotton extrêmement faible, associé aux molécules caractérisées par une faible dissymétrie moléculaire, est dû à la géométrie défavorable des moments électrique et magnétique de ces molécules [105]. Par ailleurs, la présence de fonctions plus rigides conduit à une activité optique plus marquée.

Sur le spectre de l'efaroxan, les valeurs maximales d'ellipticité se situent à 228, 278 et 285 nm. Selon le principe du dichroïsme circulaire, chaque bande du spectre dichroïque est due à une transition électronique « permise ». Le cycle benzénique est un chromophore optiquement inactif. Toutefois, si ce chromophore est situé dans un environnement dissymétrique, introduit par un centre stéréogène (ici le carbone), la transition électronique  $\pi-\pi^*$ , relative aux atomes de carbone hybridés  $sp^2$  du cycle aromatique, devient optiquement active [101]. Trois transitions principales se situent alors entre 180 et 300 nm. Deux bandes d'absorption intenses se situent vers 180-190 et 200-220 nm, respectivement nommées  $B_a$  et  $L_a$ , tandis qu'une bande faible apparaît aux environs de 260-280 nm ( $L_b$ ).

L'interprétation du spectre de dichroïsme circulaire devient plus difficile lorsque plusieurs chromophores sont présents au sein du composé. C'est le cas dans la molécule d'efaroxan où la bande à 228 nm est le chevauchement de la transition électronique  $L_a$  du noyau aromatique et de la transition  $n-\pi^*$  du groupement imidazoline.

L'acquisition d'un spectre de dichroïsme circulaire s'avère indispensable avant toute analyse quantitative afin de sélectionner la longueur d'onde la plus favorable en termes de sensibilité et de précision. Dans le cas de l'efaroxan, trois longueurs d'onde de travail (228, 278 et 285 nm) peuvent être sélectionnées.

### **III.2.3. Influence de l'environnement chimique sur le signal dichroïque**

#### *a) Effet du solvant*

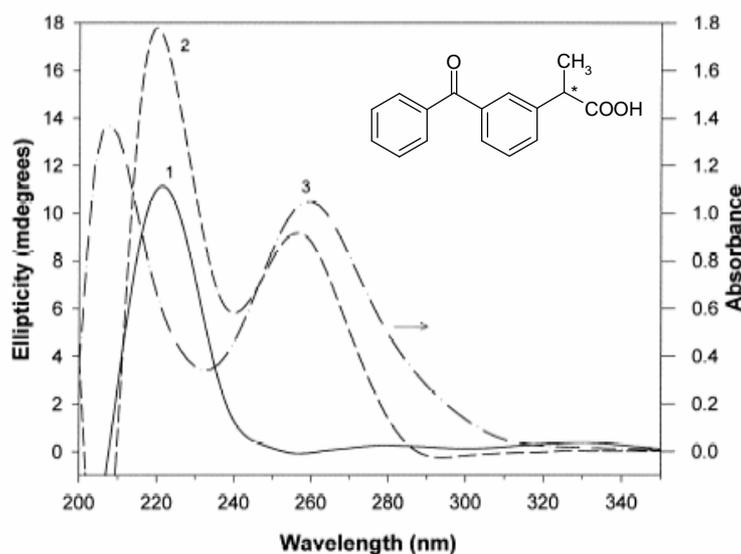
La nature du solvant de solubilisation de la molécule chirale joue un rôle déterminant sur son signal dichroïque. En effet, son pouvoir de solvation et sa constante diélectrique perturbent la répartition électronique sur les divers atomes du soluté, ce qui modifie le spectre dichroïque [6]. Lorsque certains conformères d'une molécule ont des prédispositions spatiales pour former des liaisons hydrogène intramoléculaires, une compétition entre un solvant protique et le groupement donneur de proton de la molécule est possible pour former une liaison hydrogène. Ainsi, les spectres dichroïques du (*L*)-méthyl-3-phényllactate diffèrent selon la nature du solvant d'analyse [106]. Les spectres dichroïques enregistrés dans l'eau ou le méthanol sont caractérisés par une bande d'absorption positive ( $\Delta\epsilon = 1,00 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  ou  $0,76 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), en revanche, un effet Cotton négatif ( $\Delta\epsilon = -2,10 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) est observé dans l'hexane. Cette inversion du signe de la bande d'absorption dichroïque suggère une modification de la conformation de la molécule d'un solvant protique polaire ( $\text{H}_2\text{O}$  ou  $\text{MeOH}$ ) à un solvant aprotique apolaire comme l'hexane. La différence d'absorbance dichroïque est dépendante de la nature du soluté et du solvant et sont difficilement prédictibles.

#### *b) Influence du pH du milieu de solubilisation*

Le spectre de dichroïsme circulaire d'une molécule ionisable est sensible au pH du milieu de solubilisation. L'équipe de Nishino [107] a enregistré les spectres d'absorption UV et de dichroïsme circulaire des acides aminés essentiels à pH 1, 3, 7 et 11. Les résultats montrent que le signal dichroïque de la (*L*)-valine dépend du pH. Elle est maximale lorsque le pH est très acide. En effet, à pH 1, l'effet Cotton ( $\Delta\epsilon = 1,53 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) résulte de la transition permise ( $n-\pi^*$ ) de la fonction acide carboxylique qui se trouve sous sa forme totalement protonée. A partir de pH 7, cet acide aminé forme un zwitterion. La conformation spatiale de cette molécule se modifie afin de former une liaison hydrogène entre les fonctions carboxylate et ammonium ; il en résulte une diminution du signal dichroïque ( $\Delta\epsilon = 0,82 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). A pH 11, ce composé est sous sa forme anionique et le signal dichroïque ( $\Delta\epsilon = 0,71 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) dépend uniquement de la transition  $n-\sigma^*$  de la fonction amine.

*c) Influence de l'ajout d'un agent complexant*

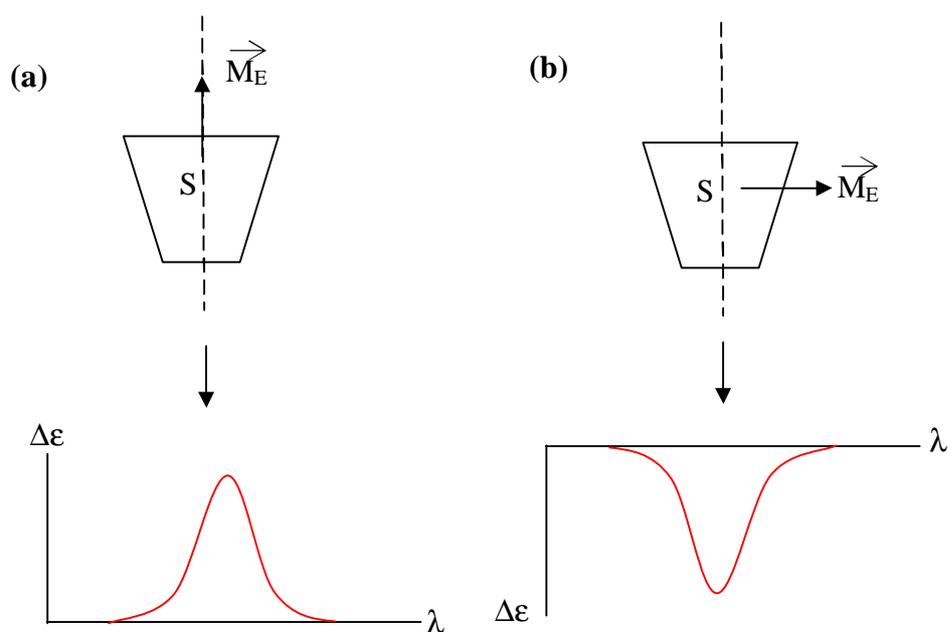
La formation d'un complexe d'inclusion entre une molécule invitée et une cyclodextrine introduit des modifications majeures du spectre de dichroïsme circulaire. Par exemple, une bande d'absorption à effet Cotton positif (260 nm) apparaît sur le spectre dichroïque du (*S*)-kétoprofène après addition de 10 mM de  $\beta$ -CD dans le milieu de solubilisation (*Figure I.41*) [108]. Cette bande d'absorption du noyau phénolique résulte de l'inclusion partielle du soluté dans la cavité hydrophobe de la cyclodextrine. Par ailleurs, l'effet Cotton plus marqué à 220 nm peut être attribué à la superposition de la bande de la fonction phényle et de la transition  $n-\pi^*$  du groupement carbonyle lors du phénomène de complexation avec la cyclodextrine.



**Figure I.41 :** Spectres UV et de dichroïsme circulaire du kétoprofène [108].

(1) spectre dichroïque dans HCl ; (2) spectre UV ; (3) spectre dichroïque dans 10 mM  $\beta$ -CD. [(*S*)-kétoprofène] =  $7,2 \cdot 10^{-5}$  M ; [HCl] = 0,1 M.

Cette approche a suscité un vif intérêt dans les années 1970 afin d'élucider le phénomène de complexation entre un composé aromatique et une cyclodextrine [100]. Les mécanismes de couplage dipôle-dipôle, responsables de l'activité optique, ont montré que l'inclusion coaxiale du moment électrique dipolaire du groupement chromophore dans la cyclodextrine provoquait une bande d'absorbance positive en dichroïsme circulaire [109]. A l'opposé, si l'alignement du chromophore était perpendiculaire à l'axe de la cavité, l'effet Cotton était négatif (*Figure I.42*).



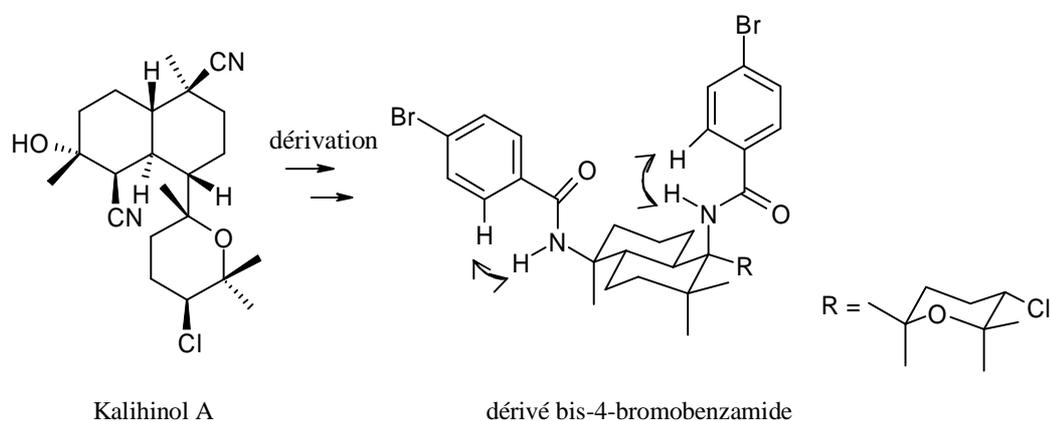
**Figure I.42 :** Influence de l'orientation du moment dipolaire ( $\vec{M}_E$ ) d'une molécule hôte (S) dans la cavité d'une cyclodextrine.

(a) : inclusion coaxiale ; (b) : inclusion orthogonale.

#### d) Le couplage excitonique

Lorsque plusieurs chromophores se trouvent dans une proximité suffisante, le modèle excitonique décrit l'interaction résonnante entre les états électroniques excités. Le couplage excitonique résulte de l'interaction entre les dipôles formés sur chacun des chromophores [110]. Il peut se manifester au sein d'une molécule dichromophore, par complexation entre un substrat et la molécule optiquement active (interaction ligand-récepteur) ou par formation de dimères [111].

Les deux chromophores peuvent être identiques ou différents ; dans le second cas, le couplage excitonique n'est possible que si les deux groupements chromophores possèdent la même énergie d'excitation. Cette démarche a été utilisée pour déterminer la configuration absolue d'une molécule chirale, le kalihinol A par Shimomura en 1999 [112].



**Figure I.43 :** Réaction de dérivation du Kalihinol A [112].

La molécule de kalihinol A (*Figure I.43*) ne possède aucun groupement chromophore dans sa structure. Toutefois, après dérivation de cette molécule par l'addition de deux groupements 4-bromobenzoyles, le spectre présente des bandes intenses à 252 nm ( $\Delta\epsilon = -27,6 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) et 229 nm ( $\Delta\epsilon = +9,4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). L'intensité de la bande d'absorption  $\pi-\pi^*$  du groupement chromophore 4-bromobenzamide permet de conclure à une configuration *5R,3S* des atomes de carbone substitués par les groupements cyano du kalihinol A.

D'autres applications du couplage excitonique incluent les études d'interactions ligand – protéine, l'intercalation de substrats dans l'ADN [101] ou l'incorporation de petites molécules dans des micelles chirales.

### **III.3. Détermination de la pureté énantiomérique par chromatographie liquide couplée à la détection par dichroïsme circulaire**

Le couplage de la détection par dichroïsme circulaire avec la chromatographie liquide a été initié par Bertucci [113] afin de déterminer la pureté énantiomérique de principes actifs pharmaceutiques sans séparation des énantiomères.

Dans ce concept, les énantiomères d'intérêt sont analysés en chromatographie en phase liquide sur un support non énantiosélectif. Les phases stationnaires non chirales présentent les avantages d'être moins onéreuses et chimiquement plus stables que les phases stationnaires chirales. De plus, leur large domaine d'applications et le

développement chromatographique plus simple permettent un gain de temps lors de la mise au point analytique. La détection est réalisée à l'aide d'un détecteur à dichroïsme circulaire CD-1095 commercialisé par la Société Jasco. Outre la mesure du signal dichroïque ( $\Delta\epsilon$ ), ce détecteur détermine simultanément l'absorbance UV de l'analyte et le **facteur d'anisotropie**, plus communément appelé **facteur g**. Ce paramètre sans dimension correspond au rapport des signaux dichroïque et d'absorbance UV (*Equation I.9*).

$$\text{facteur } g = \frac{\Delta A_{G-D}}{A} = \frac{\Delta e_{G-D}lc}{e lc} = \frac{\Delta e_{G-D}}{e} \quad (\text{I.9})$$

Considérant l'équation I.9, il est possible d'exprimer le facteur g de chacun des énantiomères (R) (*Equation I.10*) et (S) (*Equation I.11*).

$$g(R) = \frac{\Delta e_{G-D}(R)}{e} \quad (\text{I.10})$$

$$g(S) = \frac{\Delta e_{G-D}(S)}{e} \quad (\text{I.11})$$

Sachant que  $g(R) = -g(S)$ , le facteur g correspondant à un mélange des deux énantiomères peut s'exprimer de la façon suivante :

$$g(R+S) = \frac{\Delta e_{G-D}(R)}{e} \left( \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} \right) = \frac{\Delta e_{G-D}(R)}{e} e.e.(R) \quad (\text{I.12})$$

Cette expression montre que le facteur g est linéairement proportionnel à l'excès énantiomérique [114]. De plus ce paramètre est indépendant de la concentration totale du composé optiquement actif analysé [115]. Le signe et la valeur du facteur g rendent compte de la composition stéréochimique d'un mélange d'énantiomères dans des conditions expérimentales fixées (température, solvant, longueur d'onde).

Le *tableau I.1* présente les travaux rapportés dans la littérature pour déterminer la pureté énantiomérique de quelques principes actifs pharmaceutiques chiraux.

Trois modes de détermination du facteur g sont possibles :

- le rapport des aires des pics chromatographiques  $A_{CD}/A_{UV}$ ,
- le rapport des hauteurs des pics chromatographiques  $H_{CD}/H_{UV}$ ,
- le facteur g indiqué directement par le détecteur à dichroïsme circulaire.

La comparaison des modes de détermination du facteur g a été réalisée lors de l'analyse d'un dérivé chromane [114]. Pour les deux premières méthodes de calcul du facteur g, le coefficient de régression linéaire du facteur g en fonction de l'excès énantiomérique est supérieur à 0,9999 et la détermination de la pureté énantiomérique est concordante à 99,3 %. Les résultats issus du troisième mode de calcul du facteur g sont obtenus rapidement par lecture directe des valeurs du facteur g sur le système d'acquisition. La réponse du facteur g est linéaire sur toute la gamme d'excès énantiomérique que ce soit lors de la vérification de la pureté énantiomérique d'un produit issu d'une synthèse asymétrique catalysée ( $r^2 = 0,997$ ) [116] ou celle d'un alcaloïde ( $r^2 = 0,998$ ) [117].

Cependant, les limites de quantification en terme d'impureté énantiomérique sont assez élevées (0,1 – 3 %). Ces valeurs reflètent le manque de sensibilité du détecteur dichroïque et sont fortement dépendantes de la nature des groupements chromophores constitutifs de l'analyte. Il est ainsi difficile de prévoir les limites de quantification pouvant être atteintes, et qui peuvent varier d'un facteur 30 d'un analyte à l'autre [113].

**Tableau I.1 : Détermination de la pureté énantiomérique en CPL énantiosélective / détection par dichroïsme circulaire.**

Analyte	Conditions chromatographiques	LOD (e.p. %)	LOQ (e.p. %)	Longueur d'onde (nm)	Ref.
phénylglycine	colonne: RP8 (150 x 4,6 mm d.i., 5 µm)	0.33	1.1	261	[118]
	phase mobile: Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (I = 50 mM, pH 3) 1 mL.min <sup>-1</sup> ; 20°C				
Chlorphéniramine	colonne: Supelcosil ABZ-plus (250 x 4,6 mm d.i. 5 µm)	0.18	0.5	264	[118]
	phase mobile: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (I = 25 mM, pH 7)/ACN - 60:40 (v/v) 1 mL.min <sup>-1</sup>				
SB-220453	colonne: Novapak C18 (150 x 3,9 mm d.i., 4 µm)	0.3	0.9	275	[114]
	phase mobile: MeOH/ACN / 0,1% TFA dans H <sub>2</sub> O 33:22:45 (v/v/v) 0,8 mL.min <sup>-1</sup> , 40°C				
SB-270924	colonne: symmetry C18 (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm)	0.3	1.1	330	[114]
	phase mobile: ACN/0,1 % TFA dans H <sub>2</sub> O 18:82 (v/v) 2 mL.min <sup>-1</sup> , 40°C				
SB-214857	colonne: symmetry C18 (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm)	0.9	3.0	280	[114]
	phase mobile: MeOH/ACN/ 50 mM HCOOH dans H <sub>2</sub> O (pH 4.2) 12:3:85 (v/v)				
DPC 961	colonne: symmetry C18 (150 x 3,9 mm d.i., 5 µm)	-	-	240	[119]
	phase mobile: ACN/ 0,05 % TFA dans H <sub>2</sub> O en gradient d'élution 1,5 mL.min <sup>-1</sup> , 35°C				
hyoscyamine	colonne: CrestPak C8 (150 x 3,9 mm d.i., 5 µm)	-	-	230	[117]
	phase mobile: ACN/0,15 % 1-octane sulfonate dans 0,1 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 20:80 (v/v) 1 mL.min <sup>-1</sup> , 40°C				
3-méthylcyclopentanone pulegone warfarine	colonne: Hypersil CN (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm)	-	0.1	300	[113]
	phase mobile: hexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 90:10 (v/v)	-	0.3	326	
	1 mL.min <sup>-1</sup>	-	3.0	300	

**Tableau I.1 : Détermination de la pureté énantiomérique en CPL non énantiosélective / détection par dichroïsme circulaire (suite).**

oxazepam	colonne: Hypersil CN (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm) phase mobile: hexane/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> COOH 90:10:0,5 (v/v/v) 1,2 mL.min <sup>-1</sup>	-	1.0	265	[113]
Dérivé fluoro-phényle	colonne: Zorbax phényle (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm) phase mobile: ACN/ 0,1 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> dans H <sub>2</sub> O en gradient d'éluéon 1 mL.min <sup>-1</sup>	-	0.7	262	[116]
fenchone 3-méthyl-desméthylidiazepam	colonne: Nucleosil-OH (250 x 4,6 mm d.i., 7 µm) phase mobile: hexane/2-PrOH 90:10 (v/v) 1 mL.min <sup>-1</sup>	-	-	300 254	[120]
acide malique	colonne: Capcell Pak C18 (250 x 4,6 mm d.i.) phase mobile: 7 mM CuCH <sub>3</sub> COOH + 3,5 mM acide 2-hydroxy-3-methylbutyrique 1 mL.min <sup>-1</sup> ; 40°C	-	-	752	[121]
glucose	colonne: Venusil XBP-C18 (200 x 4,6 mm d.i., 5 µm) phase mobile: MeOH/H <sub>2</sub> O 96:4 (v/v) 1 mL.min <sup>-1</sup>	-	-	254	[122]
1-phényléthanol	colonne : Nucleosil 100-5-C18 (125 x 4,5 mm d.i., 5 µm) phase mobile : MeOH/H <sub>2</sub> O 35 :65 (v/v) 0,8 mL.min <sup>-1</sup>	-	-	260	[115]

### **III.4. Synthèse et bilan des études antérieures concernant la détection par dichroïsme circulaire.**

Actuellement, un seul détecteur à dichroïsme circulaire (CD-2095, Jasco) est commercialisé. Il peut être couplé à la chromatographie en phases liquide et supercritique.

Les travaux présentés précédemment montrent que de nombreux paramètres doivent être pris en considération lors du développement d'une méthode basée sur la détection par dichroïsme circulaire.

#### **Ø Nature des analytes**

Il est indispensable que le soluté chiral possède un ou plusieurs groupements chromophores responsables de l'absorption dichroïque. En effet, par analogie avec l'absorbance UV, le signal dichroïque est directement relié à une transition électronique. La réponse dichroïque sera d'autant plus intense que le groupement chromophore se situe en position adjacente au centre d'asymétrie de l'analyte.

#### **Ø La rapidité du développement analytique**

Dans la majorité des articles étudiés (*Tableau I.1*), le paramètre le plus valorisé est incontestablement la facilité de mise en œuvre de la technique CPL / dichroïsme circulaire - UV. L'analyse chromatographique est généralement réalisée sur un support non énantiosélectif de type silice greffée C<sub>8</sub> ou C<sub>18</sub> en mode d'élution isocratique. Les phases mobiles sélectionnées sont relativement simples et constituées pour la plupart d'un mélange hydro-organique (MeOH /H<sub>2</sub>O ou ACN/ H<sub>2</sub>O), éventuellement tamponnée. La mise au point de l'analyse chromatographique nécessite peu d'investissements matériels (absence de colonne chirale) et permet un gain de temps important. De plus, la détermination des puretés optique et chimique peut être réalisée simultanément : une seule méthode chromatographique est alors développée.

#### **Ø Le choix de la phase mobile**

Le choix de la phase mobile revêt une importance capitale puisqu'elle influe sur la conformation de l'analyte et ainsi sur sa réponse dichroïque. Le pH de la phase mobile est également un paramètre déterminant puisqu'il fixe l'état d'ionisation du composé chiral.

Bien que la sensibilité de ce détecteur soit 10 à 100 fois supérieure à celle du détecteur à dispersion rotatoire [123], il demeure environ 10 - 20 fois moins sensible que la

détection par spectrométrie UV [114]. Cependant, aucune validation complète de ces méthodes n'a permis de confirmer ces résultats.

#### **IV. Conclusion**

Les différences de propriétés pharmacologique, biologique et toxicologique, pouvant exister entre les deux énantiomères d'un principe actif, ont conduit au développement de nombreuses techniques permettant l'obtention de formes énantiomériquement pures.

Ainsi, la résolution stéréosélective est devenue une étape incontournable lors du développement de nouvelles molécules chirales afin d'évaluer l'activité biologique de chacun des énantiomères. La vérification de la pureté optique d'un lot de fabrication nécessite aussi des outils analytiques rapides, sensibles et robustes.

Dans ce chapitre, nous avons montré que l'électrophorèse capillaire et la chromatographie liquide sont deux techniques couramment utilisées pour l'analyse de produits chiraux. Un large panel de sélecteurs chiraux est proposé aux analystes, dont certains sont spécialement dédiés à l'une ou l'autre des techniques évoquées précédemment ; ainsi, les cyclodextrines sont les sélecteurs chiraux de choix en EC tandis que les phases stationnaires polysaccharidiques sont unanimement reconnues en CPL. Cependant, aucun additif chiral n'étant universel et devant la complexité des mécanismes de reconnaissance chirale, il est difficile de choisir le sélecteur chiral le plus adapté à la résolution des énantiomères d'une molécule donnée.

Les potentialités du détecteur à dichroïsme en CPL pour la détermination des puretés optique et chimique de plusieurs principes actifs pharmaceutiques seront évaluées dans le deuxième chapitre (collaboration avec les Laboratoires Pierre Fabre).

Le troisième chapitre portera sur l'aptitude de l'électrophorèse capillaire à la reconnaissance chirale de molécules possédant d'autres centres d'asymétrie que le carbone à savoir le phosphore ou le soufre chiral. Enfin, dans ce même chapitre, un nouveau détecteur conductimétrique sera évalué pour la détection d'énantiomères de molécules dénuées de tout groupement chromophore.

## Références bibliographiques

- [1] R.J. Haüy, Tableaux comparatifs des résultats de la cristallographie et de l'analyse chimique relativement à la classification des minéraux, Paris, 1809.
- [2] H.P. Husson, *Ann. Pharm. Fr.* 55 (1997) 14.
- [3] L. Pasteur, *C. R. Acad. Sci.* 26 (1848) 535.
- [4] L. Bel, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 22 (1874) 337.
- [5] J.H. Van't Hoff, *Arch. Neerl. Sci. Exactes Nat.* 9 (1874) 445.
- [6] C. Rabiller, *Stéréochimie et chiralité en chimie organique*, De Boeck, Nantes, 1999, pp 179-184.
- [7] A. Collet, J. Crassous, J.-P. Dutasta, L. Guy, *Molécules chirales : stéréochimie et propriétés*, CNRS éditions, Paris, 2006, pp 1-70.
- [8] R.S. Cahn, C. Ingold, V. Prelog, *Angew. Chem. Int. Ed.* 6 (1966) 385.
- [9] K. Mori, *Chem. Commun.* 13 (1997) 1153.
- [10] D.J. Fischer, A.L. Hayes, *Pestic. Sci.* 13 (1982) 330.
- [11] W. Liu, K. Lin, J. Gan, *Chirality* 18 (2006) 713.
- [12] R. Berges, J. Segura, X. De La torre, R. Ventura, *J. Chromatogr. B* 723 (1999) 173.
- [13] B.E. Leonard, D. McCartan, J. White, D.J. King, *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* 19 (2004) 151.
- [14] G. Nancy, in, *World Patent* 9406429, 1994.
- [15] B.K. Pchelka, A. Loupy, J. Plenkiewicz, L. Blanco, *Tetrahedron: Asymmetry* 11 (2000) 2719.
- [16] M.E. Bosch, A.J.R. Sánchez, F.S. Rojas, C.B. Ojeda, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 9.
- [17] F.D.A. Food and Drug Administration, FDA's policy statement for the development of new stereoisomeric drugs (may 1992).
- [18] E.M.E.A. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Investigation of chiral active substances directive 75/318/EEC ( avril 1994).
- [19] I.C.H. International Conference of Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, in Q3B(R2): Impurities in new drug products, Genève, Suisse, juin 2006.
- [20] I.C.H. International Conference of Harmonisation, in Q6A: Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances, Genève, Suisse, octobre 1999.
- [21] <http://www.fda.gov/Cder/rdmt/default.htm>.
- [22] H. Kagan, *L'actualité chimique* novembre-décembre (2003) 10.
- [23] E. Arceo, J.M. Odriozola, J.M. Garcia, P. Gil, *Tetrahedron: Asymmetry* 14 (2003) 1617.
- [24] A. Solís, S. García, H.I. Pérez, N. Manjarrez, H. Luna, *Tetrahedron: Asymmetry* 19 (2008) 549.
- [25] N.M. Maier, P. Franco, W. Lindner, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 3.
- [26] K. Verleysen, J. Vandijck, M. Schelfaut, P. Sandra, *J. High Resol. Chromatogr.* 21 (1998) 323.
- [27] G. Gübitz, M.G. Schmid, *Biopharm. Drug Dispos.* 22 (2001) 291.
- [28] J. Szymura-Oleksiak, J. Bojarski, H.Y. Aboul-Ebein, *Chirality* 14 (2002) 417.
- [29] M. Maftouh, C. Granier-Loyaux, E. Chavana, J. Marini, A. Pradines, Y. Vander Heyden, C. Picard, *J. Chromatogr. A* 1088 (2005) 67.
- [30] G. Terfloth, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 301.
- [31] Y. Nagata, T. Iida, M. Saka, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 12 (2001) 105.

- [32] R. Bhushan, J. Martens, G. Thuku Thiongo, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (2000) 1143.
- [33] N. Fidalgo-Used, E. Blanco-Gonzalez, A. Sanz-Medel, *Talanta* 70 (2006) 1057.
- [34] W. Vetter, U. Klobes, B. Luckas, G. Hottinger, *J. Chromatogr. A* 846 (1999) 375.
- [35] L.R. Bordajandi, L. Ramos, M.J. Gonzales, *J. Chromatogr. A* 1125 (2006) 220.
- [36] N. Yassaa, J. Williams, *Atmos. Environ.* 39 (2005) 4875.
- [37] T.A.C. Vermeij, P.M. Edelbroek, *J. Chromatogr. B* 716 (1998) 233.
- [38] Y. Zhang, D.-R. Wu, D.B. Wang-Iverson, A.A. Tymiak, *Drug Discovery Today* 10 (2005) 571.
- [39] N. Grobuschek, M.G. Schmid, C. Tuscher, M. Ivanova, G. Gübitz, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 599.
- [40] M. Blanco, I. Valverde, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 428439.
- [41] V.A. Davankov, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 891.
- [42] J. Szejtli, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1743.
- [43] S. Li, W. Purdy, *J. Chromatogr. A* 625 (1992) 109.
- [44] L. Liu, Q.-X. Guo, *J. Incl. Phenom.* 42 (2002) 1.
- [45] F. Bressolle, M. Audran, T.-N. Pham, J.-J. Vallon, *J. Chromatogr. B* 687 (1996) 303.
- [46] E. Schneiderman, A.M. Stalcup, *J. Chromatogr. B* 745 (2000) 83.
- [47] B.-A. Persson, S. Andersson, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 195.
- [48] K.L. Williams, L.C. Sander, *J. Chromatogr. A* 785 (1997) 149.
- [49] S. Fanali, *J. Chromatogr. A* 875 (2000) 89.
- [50] F. Wang, M.G. Khaledi, *J. Chromatogr. B* 731 (1999) 187.
- [51] Z. Bikadi, R. Kurdi, S. Balogh, Szeman, J, E. Hazai, *Electrophoresis* 27 (2006) 3435.
- [52] Z. Juvancz, J. Szejtli, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 379.
- [53] P.T.T. Ha, J. Hoogmartens, A. Van Schepdael, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1.
- [54] C. Perrin, Y. Vander Heyden, M. Maftouh, D. Luc Massart, *Electrophoresis* 22 (2001) 3203.
- [55] X.L. Lin, C.F. Zhu, A.Y. Hao, *J. Chromatogr. A* 1059 (2004) 181.
- [56] M.G. Zhao, A.Y. Hao, J. Lie, Y.H. Wei, P. Guo, *Carbohydr. Res.* 340 (2005) 1563.
- [57] B. Koppenhoefer, X. Zhu, A. Jakob, S. Wuerthner, *J. Chromatogr. A* 875 (2000) 135.
- [58] C. Garcia-Ruiz, G. Alvarez-Llamas, A. Puerta, E. Blanco, A. Sanz-Medel, L. Marina, *Anal. Chim. Acta* 543 (2005) 77.
- [59] M. Oehme, A. Jaus, *J. Chromatogr. A* 905 (2001) 59.
- [60] F.-T.A. Chen, G. Shen, R.A. Evangelista, *J. Chromatogr. A* 924 (2001) 523.
- [61] J. Chapman, H. Whatley, F.-T.A. Chen, Beckman Coulter, *Note technique* (2001).
- [62] H. Cai, G. Vigh, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18 (1998) 615.
- [63] J.B. Vincent, G. Vigh, *J. Chromatogr. A* 816 (1998) 233.
- [64] L. Geiser, J.-L. Veuthey, *Electrophoresis* 28 (2007) 45.
- [65] M. Fillet, P. Hubert, J. Crommen, *J. Chromatogr. A* 875 (2000) 123.
- [66] S. Wei, H. Guo, J.-M. Lin, *J. Chromatogr. B* 832 (2006) 90.
- [67] N. Matthijs, S. Van Hemelryck, M. Maftouh, D. Luc Massart, *Anal. Chim. Acta* 525 (2004) 247.
- [68] B. Chankvetadze, G. Blaschke, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 309.
- [69] S. Fanali, *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 227.
- [70] T. Hiissa, H. Sirén, T. Kotiaho, M. Snellman, A. Hautojärvi, *J. Chromatogr. A* 853 (1999) 403.

- [71] W.X. Huang, H. Xu, S.D. Fazio, R.V. Vivilecchia, *J. Chromatogr. B* 695 (1997) 157.
- [72] K. Verleysen, P. Sandra, *Electrophoresis* 19 (1998) 2798.
- [73] R.J. Steffek, Y. Zelechok, K.H. Gahm, *J. Chromatogr. A* 947 (2002) 301.
- [74] J.P. Berh, J.M. Girodeau, R.C. Hayward, J.M. Lehn, J.P. Sauvage, *Helv. Chim. Acta* 63 (1980) 2096.
- [75] R. Kuhn, F. Erni, T. Bereuter, J. Häusler, *Anal. Chem.* 64 (1992) 2815.
- [76] H. Nishi, K. Nakamura, H. Nakai, T. Sato, *J. Chromatogr. A* 757 (1997) 225.
- [77] X.Y. Gong, P.C. Hauser, *Electrophoresis* 27 (2006) 4375.
- [78] X.Y. Gong, P.C. Hauser, *J. Chromatogr. A* 1094 (2005) 196.
- [79] M.H. Hyun, G. Tan, J.Y. Xue, *J. Chromatogr. A* 1097 (2005) 188.
- [80] V. Farkas, T. Tóth, G. Orosz, P. Huszthy, M. Hollósi, *Tetrahedron: Asymmetry* 17 (2006) 1883.
- [81] D.W. Armstrong, Y. Tang, S. Chen, C. Bagwill, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1473.
- [82] T.J. Ward, A.B. Farris III, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 73.
- [83] D.W. Armstrong, U.B. Nair, *Electrophoresis* 18 (1997) 2331.
- [84] A. Berthod, Y. Liu, C. Bagwill, D.W. Armstrong, *J. Chromatogr. A* 731 (1996) 123.
- [85] K. Petritis, A. Valleix, C. Elfakir, M. Dreux, *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 331.
- [86] Y. Liu, A. Berthod, C.R. Mitchell, T.L. Xiao, B. Zhang, D.W. Armstrong, *J. Chromatogr. A* 978 (2002) 185.
- [87] Z.G. Jiang, J.W. Kang, D. Bischoff, B. Bister, R.D. Sussmuth, V. Schurig, *Electrophoresis* 25 (2004) 2687.
- [88] J.G. Hou, T.X. He, X.Q. Han, X.Z. Du, X.F. Mao, H.L. Deng, J.Z. Gao, *Chin. Chem. Lett.* 14 (2003) 280.
- [89] M. Kubinyi, K. Pal, P. Baranyai, A. Grofcsik, I. Bitter, A. Grün, *Chirality* 16 (2004) 174.
- [90] Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Hatada, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 5357.
- [91] E. Yashima, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 105.
- [92] K. Tachibana, A. Ohnishi, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 127.
- [93] P. Franco, A. Senso, L. Oliveros, C. Minguillón, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 155.
- [94] K. Otsuka, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 875 (2000) 163.
- [95] A.L. Crego, M.J. Gonzalez, M.L. Marina, *Electrophoresis* 19 (1998) 2113.
- [96] H.H. Yarabe, E. Billiot, I.M. Warner, *J. Chromatogr. A* 875 (2000) 179.
- [97] H. Hofstetter, O. Hofstetter, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 869.
- [98] F. Chapuis, V. Pichon, F. Lanza, B. Sellergren, M.-C. Hennion, *J. Chromatogr. B* 804 (2004) 93.
- [99] M. Caude, R. Rosset, A. Jardy, *Chromatographies en phase liquide et supercritique*, Masson, Paris, 1991.
- [100] P. Crabbé, *Applications de la dispersion rotatoire optique et du dichroïsme circulaire optique en chimie organique*, Gauthier-Villars, Paris, 1968.
- [101] F. Ciardelli, P. Savadori, *Fundamental Aspects and recent Developments in Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism*, Heyden & Son LTD, London, 1973.
- [102] J.-C. Maurizot, *Etude de la Conformation et de la Stabilité Conformationnelle des Oligoribonucléotides et des Oligodésoxyribonucléotides par Dichroïsme Circulaire*, chapitre 2, mai 1970.
- [103] <http://www.hindsinstruments.com/media/PEM100%20Brochure.pdf>.
- [104] Durand, *Etude par Dichroïsme Circulaire des Interactions entre des Résidus Aromatiques de Protéines et des Acides Nucléiques*, thèse, chapitre 1, mai 1976.
- [105] O. McConnell, Y. He, L. Nogle, A. Sarkahian, *Chirality* 19 (2007) 716.

- [106] H.E. Smith, in N. Berova, K. Nakanishi, R.W. Woody (Editors), *Circular dichroism - Principles and applications*, 2ème éd., Wiley, New York, 2000, chap 14, p. 418.
- [107] H. Nishino, A. Kosaka, G.A. Hembury, K. Matsushima, Y. Inoue, *J. Chem. Soc. 2* (2002) 582.
- [108] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch, C. Perez-Maseda, *Anal. Chim. Acta* 407 (2000) 233.
- [109] K. Harata, *Bioorg. Chem.* 10 (1981) 255.
- [110] J. Gawronski, P. Skowronek, *Curr. Org. Chem.* 8 (2004) 65.
- [111] T. Mori, Y. Inoue, *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (2005) 2582.
- [112] M. Shimomura, H. Miyaoka, Y. Yamada, *Tetrahedron Lett.* 40 (1999) 8015.
- [113] C. Bertucci, V. Andrisano, V. Cavrini, E. Castiglioni, *Chirality* 12 (2000) 84.
- [114] M.R. Hadley, G.D. Jonas, *Enantiomer* 5 (1999) 357.
- [115] M.T. Reetz, K.M. Kühling, H. Hinrichs, A. Deege, *Chirality* 12 (2000) 479.
- [116] M.T. Miller, Z. Ge, B. Mao, *Chirality* 14 (2002) 659.
- [117] K. Kudo, K. Iwaya, C. Yomota, S. Morris, M. Saito, *Enantiomer* 5 (2000) 369.
- [118] E. Bossu, V. Cotichini, G. Gostoli, A. Farina, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26 (2001) 837.
- [119] R.C. Williams, J.F. Edwards, A.S. Joshi, A.-F. Aubry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 501.
- [120] C. Bertucci, P. Salvadori, L.F. Lopes Guimaraes, *J. Chromatogr. A* 666 (1994) 535.
- [121] A. Yamamoto, N. Akiba, S. Kodama, A. Matsunaga, K. Kato, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. A* 928 (2001) 139.
- [122] S. Song, L. Sun, L. Yuan, T. Sun, Y. Zhao, W. Zuo, Y. Cong, X. Li, J. Wang, *Journal of Chromatography A* 1179 (2008) 125.
- [123] L. Kott, W. Brian Holzheuer, M.M. Wong, G.K. Webster, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 57.

## *CHAPITRE 2*

---

**APPORT DU DETECTEUR A DICHROISME CIRCULAIRE EN  
CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE POUR LE CONTROLE  
QUALITE DE SPECIALITES PHARMACEUTIQUES**



---

## Chapitre 2

---

# APPORT DU DETECTEUR A DICHROISME CIRCULAIRE EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE POUR LE CONTROLE QUALITE DE SPECIALITES PHARMACEUTIQUES

## I. Introduction

Comme évoqué dans le premier chapitre, l'activité biologique des molécules chirales possédant un/ou plusieurs centre(s) d'asymétrie ne peut résider que dans un seul stéréoisomère. Les autres isomères optiques inactifs voire toxiques sont alors considérés comme des impuretés.

Les autorités réglementaires (ICH, FDA, EMEA) exigent de pouvoir quantifier, de façon juste et précise, chacune des impuretés susceptibles d'être présentes dans une formulation pharmaceutique. Des outils analytiques performants sont donc nécessaires pour répondre aux spécificités évoquées précédemment.

Ainsi, la détermination de la pureté énantiomérique est généralement réalisée en chromatographie liquide sur un support chiral avec une détection UV. Toutefois, les informations qualitatives et quantitatives fournies par cette méthode sont dépendantes de la qualité de la séparation qui peut s'effiler voire disparaître avec l'usure de la colonne. De plus, le temps de développement est souvent important tant pour le choix du support chiral que celui de la phase mobile. Par ailleurs, aucun sélecteur chiral n'étant universel, l'acquisition de plusieurs colonnes (souvent onéreuses) est nécessaire avant de parvenir à la séparation des énantiomères.

D'autre part, les analyses de pureté chimique nécessitent la mise au point d'une seconde méthode chromatographique. Les impuretés chimiques sont alors analysées en CPL en phase inverse sur une colonne C<sub>18</sub> avec une détection UV ou par spectrométrie de masse afin d'améliorer les limites de quantification.

Deux méthodes complémentaires sont donc nécessaires pour quantifier la teneur totale en impuretés d'une substance chirale.

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser au développement d'une méthode chromatographique alternative qui met en œuvre le détecteur à dichroïsme circulaire. Les avantages et les inconvénients de ce mode de détection seront discutés lors de l'analyse de diverses substances pharmaceutiques.

## **II. Evaluation du détecteur à dichroïsme circulaire lors de l'analyse chromatographique énantiosélective d'un anti-parkinsonien (l'efaroxan)**

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative qui survient en moyenne dès 55 ans et affecte 1% de la population de plus de 60 ans [1]. Grâce à l'hygiène et aux traitements médicamenteux, la longévité de l'espèce humaine s'accroît d'une manière spectaculaire et le nombre d'individus atteints par des maladies neurodégénératives ne cesse d'augmenter ; ainsi 650 millions de personnes sont atteintes par la maladie de Parkinson dans le monde dont 150 000 personnes en France [2]. A ce jour, aucun traitement curatif n'est actuellement mis sur le marché.

### **II.1. La maladie de Parkinson et ses traitements**

La maladie de Parkinson résulte d'une dégénérescence neuronale spécifique de la substance noire (un des noyaux du système nerveux cérébral) via la formation d'agrégats géants [3]. Normalement, ce noyau facilite le flux d'informations qui circulent du cortex cérébral vers le thalamus puis rejoint le cortex. La dopamine qui est le neurotransmetteur synthétisé par la substance noire facilite ainsi la réalisation séquentielle des mouvements. Dans la maladie de Parkinson, le déficit en dopamine est caractérisé par l'association de trois symptômes décrits pour la première fois par James Parkinson en 1817 [4] : une réduction des gestes spontanés (akinésie), une augmentation de la raideur musculaire (rigidité) et un tremblement de repos.

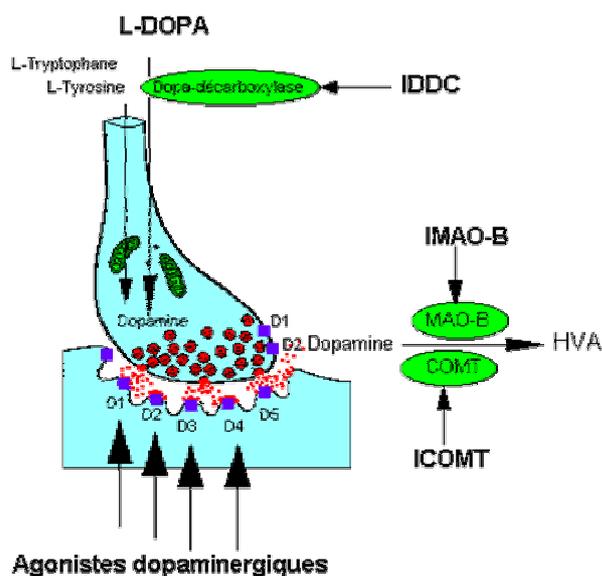
La maladie de Parkinson est une affection chronique neurodégénérative et irréversible qui cause la destruction progressive des neurones de la substance noire du corps cérébral. Bien qu'aucun traitement curatif ne soit disponible, différentes approches chirurgicales ou pharmacologiques permettent d'améliorer la qualité de vie des malades.

Un traitement chirurgical symptomatique par implantation d'électrodes de stimulation est disponible depuis 1998 en Europe. Une électrode est implantée dans le cerveau et un neuro-stimulateur y envoie des impulsions électriques qui semblent rétablir le fonctionnement normal du système moteur. Ce dernier réduit notablement les trois symptômes moteurs de la maladie. Cependant, cette intervention chirurgicale est très peu répandue en France.

Le traitement de la maladie de Parkinson reste principalement pharmacologique et fait appel à différents médicaments destinés à accroître le taux de dopamine présente dans le cerveau ou à réduire l'hyperactivité cholinergique. Les principales classes de médicaments anti-parkinsoniens sont les suivantes :

- la L-dopa,
- les agonistes dopaminergiques,
- les agents anticholinergiques,
- les inhibiteurs enzymatiques.

Leurs sites d'action sont représentés sur la *Figure II.1*.



**Figure II.1 :** Les sites d'action des principaux médicaments antiparkinsoniens au niveau d'une synapse.

IDDC = inhibiteur de la DOPA-décarboxylase, IMAO-B = inhibiteurs de la monoamine oxydase B, ICOMT = inhibiteurs de la catéchol-O-méthyl transférase, HVA = acide homovanillique.

Parmi ces différentes classes de médicaments, la Levo-DOPA (précurseur de la dopamine) reste le traitement symptomatique le plus utilisé pour compenser le déficit

dopaminergique. En effet, la dopamine ne peut être administrée directement puisqu'elle ne peut traverser la barrière hémato-encéphalique. Sous l'action de la DOPA décarboxylase, la L-DOPA est transformée en dopamine qui peut se libérer dans l'ensemble du corps. La L-DOPA est généralement co-administrée avec un inhibiteur de décarboxylase afin de diminuer les effets indésirables qui lui sont associées (nausées, vomissements, hypotension...) mais aussi d'augmenter sa biodisponibilité au niveau central par un facteur 10 - 20.

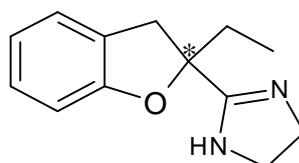
Ce traitement donne de bons résultats, mais perd de son efficacité au cours du temps après 3 à 6 années de traitement. De plus, la libération de la dopamine n'étant pas réalisée spécifiquement au niveau du système nerveux central, les effets secondaires perturbent la vie des malades. D'autre part, le temps de demi-vie plasmatique de la L-dopa est court (1h30 à 3h), ce qui occasionne des prises régulières et nombreuses au cours de la journée. L'organisme devient de moins en moins sensible au traitement et les symptômes réapparaissent [5].

D'autres classes de médicaments ont ainsi été développées ces dernières années et visent à éviter ces effets indésirables de la dopathérapie. Les malades, atteints de la maladie de Parkinson, souffrent aussi d'un déficit en acétylcholine [6]. Cette nouvelle approche thérapeutique consiste en l'utilisation de médicaments anticholinergiques permettant de traiter la rigidité et le tremblement en réduisant l'hyperactivité cholinergique.

Une perspective d'avenir dans les traitements pharmacologiques de la maladie de Parkinson consisterait à inhiber les récepteurs  $\alpha$ -2 adrénergiques, responsables du déficit en acétylcholine dans le système nerveux central [7]. Les études menées par Cuadra *et al.* [8] ont montré que certains dérivés imidazoline prolongeaient l'inhibition de l'acétylcholinestérase au niveau extra-cellulaire dans le cortex de rat tout en activant la libération dopaminergique.

## II.2. Structure et propriétés physico-chimiques de l'efaroxan

L'efaroxan, (2-[2-ethyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-2-yl]-4,5-dihydro-1*H*-imidazole hydrochloride, *Figure II.2*) est un puissant  $\alpha_2$ -adréno-récepteur antagoniste potentiel qui est actuellement développé par les Laboratoires Pierre Fabre. Cette molécule a montré des propriétés intéressantes pour le traitement de la maladie de Parkinson. Des études cliniques [9] ont montré que l'administration de l'efaroxan ( $10 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) augmentait le taux de dopamine disponible au niveau du système nerveux central de 250 %.



**Figure II.2 :** Structure de l'efaroxan.

L'efaroxan possède un centre d'asymétrie en position adjacente de la fonction imidazoline. Parmi les deux énantiomères, seule la forme (*R*) est responsable de l'activité biologique. Ainsi, la séparation des énantiomères de l'efaroxan et le contrôle de la pureté énantiomérique doivent être réalisés.

Les propriétés physico-chimiques de l'efaroxan sont présentées dans le *Tableau II.1*.

**Tableau II.1 :** Propriétés physico-chimiques de l'efaroxan.

D'après document interne des Laboratoires Pierre Fabre.

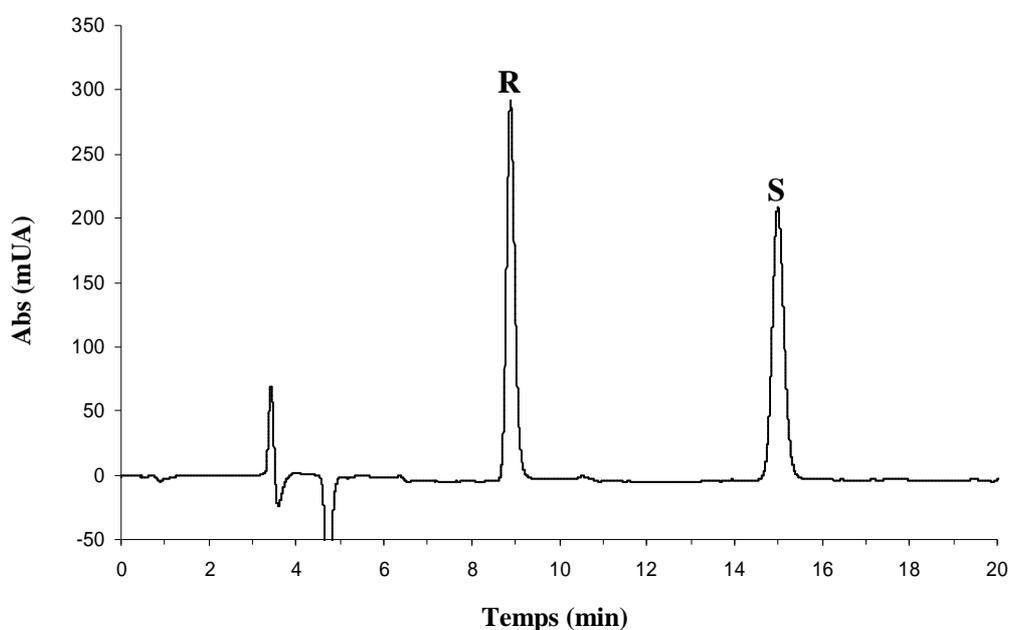
Formule moléculaire	$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$ , HCl
Masse molaire ( $\text{g.mol}^{-1}$ )	252,74
Aspect	poudre blanche
Solubilité dans l'eau ( $\text{mg.mL}^{-1}$ )	100
Température de fusion ( $^{\circ}\text{C}$ )	246
pKa	9,48
Pouvoir rotatoire	$101,61 \pm 0,81$

## II.3. Etude bibliographique des séparations chirales de l'efaroxan

La séparation des deux énantiomères de l'efaroxan a été réalisée par électrophorèse capillaire, il y a quelques années dans notre laboratoire [10]. L'addition simultanée de deux

cyclodextrines, l'une anionique ( $S$ - $\beta$ -CD), l'autre neutre (HP- $\gamma$ -CD) au tampon formiate d'ammonium (force ionique = 50 mM, pH 4) a permis une résolution satisfaisante des énantiomères ( $R_s > 1,5$ ) en moins de 10 min. Cependant, aucune étude quantitative n'a été menée pour la détermination de la pureté optique de l'eutomère (énantiomère  $R$ ).

La méthode analytique développée par les Laboratoires Pierre Fabre consiste à séparer les énantiomères en chromatographie en phase liquide sur une colonne chirale de type amylose Chiralpak AD-H (Daicel, 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m d.i.). La phase mobile est un mélange hexane/éthanol (95:5 v/v) contenant 0,01 % de diéthylamine. Les énantiomères sont élués en 15 min et détectés par spectrométrie UV à 220 nm (*Figure II.3*). La limite de quantification de l'impureté énantiomérique (énantiomère  $S$ ) obtenue avec cette méthode est de 0,05 %.



**Figure II.3 :** Séparation des deux énantiomères de l'efaroxan par CPL sur une colonne chirale.

Colonne : amylose AD-H (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m d.i.) ; phase mobile : hexane / EtOH / DEA (95/5/0,01 v/v/v); débit : 1 mL.min<sup>-1</sup>; injection : 20  $\mu$ L; détection UV : 220 nm ; [efaroxan] : 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>.

La sensibilité de cette méthode répond aux exigences imposées par les directives de l'*International Conference of Harmonisation* (ICH Guidelines) mais nécessite l'utilisation d'une colonne chirale onéreuse (AD-H). D'autre part, l'utilisation d'une pré-colonne chirale et le traitement de l'échantillon sont préconisés afin d'augmenter la durée de vie du support.

Depuis quelques années, le détecteur à dichroïsme circulaire (DC) a été utilisé en chromatographie liquide, afin de vérifier facilement l'ordre d'éluion des énantiomères d'un composé optiquement actif, après leur séparation sur une colonne chirale [11]. L'acquisition des signaux UV et dichroïque est simultanée. De plus, ce détecteur est universel pour tout composé possédant un groupement chromophore et un centre d'asymétrie. Après la séparation des énantiomères en CPL énantiosélective, le détecteur dichroïque fournit un signal chromatographique positif (ou négatif) selon l'énantiomère. Par ailleurs, ce détecteur est quantitatif puisque les réponses UV et DC sont directement proportionnelles à la concentration en analyte. Toutefois, les limites de quantification de l'impureté énantiomérique obtenues avec le détecteur DC sont supérieures à celles de la détection par spectrométrie UV, comme évoqué dans le premier chapitre.

Pour pallier cette difficulté, l'utilisation d'un filtre électronique passe-bas a été testée afin d'améliorer le rapport signal sur bruit du signal dichroïque. D'une manière générale, le rapport signal sur bruit est dépendant de l'amplitude et de la fréquence du bruit de fond. Ce dernier correspond à tout signal indésirable limitant la lecture d'un signal. Les sources de bruit peuvent être classés en deux catégories :

- les bruits externes : la source de bruit est localisée à l'extérieur du système et provient de perturbations artificielles générées par des équipements électriques,
- les bruits internes : les causes de perturbations sont internes au système et sont engendrées par des commutations de courants au sein des différents composants électroniques du système.

Ces perturbations externes ou internes peuvent être fortement éliminées par le blindage des câbles électriques pour le premier groupe et par le filtrage électronique pour le second [12]. En pratique, des filtres analogiques sont réalisés à l'aide de composants électroniques notamment résistances, capacités, self-inductances et amplificateurs opérationnels. Parmi les nombreux systèmes de filtres développés, on distingue, plus particulièrement, le filtre haute fréquence plus communément dénommé filtre passe-bas.

La sélection de la fréquence de coupure permet d'éliminer toutes les hautes fréquences (supérieures ou égales à celle de coupure) responsables du bruit de fond à court terme [13]. La sensibilité du détecteur pourrait être améliorée. Haddad *et al.* [14] ont comparé les performances de deux filtres électroniques pour réduire l'amplitude du bruit

de fond généré par un détecteur ampérométrique. Les limites de quantification ont ainsi été améliorées d'un facteur 10 [15].

Par ailleurs, cette première étude aura aussi pour objectif d'évaluer l'aptitude du détecteur DC-UV à répondre aux normes de l'ICH (spécificité, justesse, précision) en vigueur dans l'industrie pharmaceutique, et ce en séparant au préalable les énantiomères sur un support chromatographique chiral. L'ensemble de ces travaux est présenté dans le paragraphe suivant.

## **II.4. Article 1: Sensitivity Improvement of Circular Dichroism Detection in HPLC by using a Low-Pass Electronic Noise Filter. Application to the Enantiomeric Purity of a Basic Drug**

**Chirality 19 (2007) 106-113**

Marie Lorin<sup>a</sup>, Raphaël Delépée<sup>a</sup>, Jean-Claude Maurizot<sup>b</sup>, Jean-Paul Ribet<sup>c</sup>, Philippe Morin<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), CNRS FR 2708, UMR 6005, Université d'Orléans, Orléans, France*

<sup>b</sup> *Centre de Biophysique Moléculaire (CBM), CNRS UPR 4301, Orléans, France*

<sup>c</sup> *Institut de Recherche Pierre Fabre, Département de Chimie, Castres, France*

### **Abstract**

The quality control of chiral drugs requires the determination of their enantiomeric purity. Nowadays, circular dichroism (CD) spectroscopy is gaining increasing importance in pharmaceutical analysis due to the commercially available CD detector in liquid chromatography. The separation of the two enantiomers of a basic drug (efaroxan) was achieved by high performance liquid chromatography using an amylose-derivated column with both UV and circular dichroism detections. A baseline-resolved separation (resolution: 5) was obtained after optimization of the mobile phase composition with hexane-ethanol-diethylamine (90:10:0.05; v/v/v).

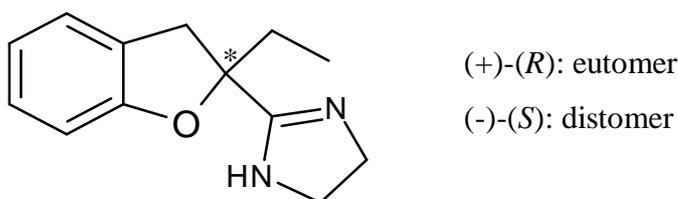
The use of a commercial low-pass electronic noise filter of the CD signal has improved the signal-to-noise ratio by a factor twelve and allowed the quantitation of each enantiomer in the 1.25-300  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  concentration range. The CD linear calibration curve, expressed in terms of stereoisomer height ratio versus concentration ratio, was plotted over the 0.4–6% range. A correlation coefficient greater than 0.999 was obtained by least-squares regression and the limit of detection (LOD) for the diastomer/eutomer ratio was estimated at 0.14%. Although the method validation showed good repeatability on the retention times (R.S.D < 0.9%), on the peak height ratios (R.S.D < 8.7%) of each enantiomer only up to 99.2% enantiomeric purity was achieved.

**Keywords:** Circular Dichroism; HPLC; Low-Pass Electronic Noise Filter; enantiomeric purity; Polysaccharide Stationary Phase; efaroxan; 2-adrenoreceptor antagonist; quantitation.

#### **II.4.1. Introduction**

For several years, the number of chiral pharmaceuticals has significantly increased. It is well known, however, that considerable differences exist between two enantiomers in terms of pharmacokinetics, activity or toxicity. The active form is usually called eutomer whereas the undesirable enantiomer is the distomer. As the latter is considered as an impurity, the quantitation of each enantiomer is a pharmacopeial necessity. The limit is fixed by the ICH guideline at 0.1% level when the maximum daily dose does not exceed 1 mg [16].

Efaroxan (2-[2-ethyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-2-yl]-4,5-dihydro-1*H*-imidazole hydrochloride, *Figure II.4*) is a potent and highly selective 2-adrenoreceptor antagonist which is currently under investigation for the treatment of neurodegenerative diseases, particularly Parkinson's and Alzheimer's diseases [17]. The biological activity exhibited by (*R*)-(+)-efaroxan (eutomer) is clearly related to the absolute configuration of the stereogenic centre.



pKa = 9.48

**Figure II.4: Chemical structure of efaroxan.**

The (+) and (-) signs refer to the dextrogyre and levogyre forms and were determined by optical rotation.

Four techniques *i.e* chiral HPLC, capillary electrophoresis, optical rotation detection (ORD) and circular dichroism (CD) have been accredited by the European Pharmacopoeia to determine the enantiomeric purity of chiral compounds. In capillary electrophoresis, the resolution of efaroxan enantiomers has already been achieved using cyclodextrins as chiral

selectors but no quantitative study has so far been reported [10]. In HPLC, among the wide variety of chiral stationary phases (CSPs), polysaccharide derivated CSPs showed good efficiency for the chiral recognition of a large number of basic drugs [18-20].

More recently, detectors exploiting the chiroptical properties of chiral molecules have been developed: among them, circular dichroism records the difference of absorbance between left and right circularly polarized lights for each enantiomer [21,22]. This phenomenon is related to an electronic transition of the molecule and thus the CD detector is often more sensitive than the polarimetric one, but it depends on the wavelength used [23]. For a compound without chromophore, the polarimeter is more sensitive. The efficiency and the precision of CD detection have often been proved. Nowadays, CD spectroscopy is gaining increasing importance in pharmaceutical analysis due to the commercially available CD detector in liquid chromatography. Miller *et al.* [24] and Reetz *et al.* [25] showed that CD can be suitable as detection mode to follow the asymmetric synthesis of chiral catalysts. Likewise, several studies reported that chiroptical detection was useful for the analysis of pharmacologically active compounds such as pure compounds [26,27], in pharmaceutical forms [28], in biological fluids [29-31] or for food safety and quality control [32-34]. Unlike UV detection, the selectivity of the CD detector towards chiral compounds makes it very suitable for the study of the inversion of elution order of enantiomers on CSPs [11,35].

In a different and innovative approach, Bertucci *et al.* [36] showed for the first time that it was possible to determine the enantiomeric purity of the eutomer at 99% level on C<sub>18</sub> silica HPLC stationary phase with CD detection. Enantiomers were easily quantitated in spite of an unfavourable CD constant ( $<10^{-3}$  mdeg) [37,38]. Enantiomeric purity values were calculated by the anisotropy factor (g factor) which is the ratio of the CD signal on the UV one. This g factor was found to be proportional to the enantiomeric excess but independent of drug concentration.

Otherwise, Williams *et al.* [39] have shown that the CD on-line detector lacked linearity and sensitivity compared to the UV detector. So, the accurate quantitation of enantiomers with a high concentration ratio (1/100-1/1000) is a real analytical challenge.

To overcome the sensitivity lack, chemical derivatization can be performed by applying a chromophore reactant on the solute to form a stable product with higher CD

ellipticity [40]. However, in most cases, the derivatization reaction is not quantitative and secondary products may be generated. Another easy way to improve sensitivity and detection limits is to apply low-pass electronic noise filtering of the CD signal. These filters have previously proved their efficiency especially for the development of chromatographic methods with an electrochemical detector [15,41,42].

In this paper, we report the development of a new method for the separation of efaroxan enantiomers on a polysaccharide stationary phase and detection by circular dichroism. In order to improve sensitivity, the selection of the appropriate wavelength has been discussed and the low-pass electronic noise filtering of the CD signal has been tested. The linearity of the CD signal was evaluated with and without the use of the commercial filter. The aim of this work was to determine the enantiomeric purity of efaroxan at extreme values close to the ICH recommendations.

## **II.4.2. Experimental**

### *a) Instrumentation*

The enantioselective experiments were carried out on an Agilent HP 1100 chromatographic system (Waldbronn, Germany) equipped with a binary pump, a variable volume autosampler fitted with a 20  $\mu\text{L}$  loop, a column oven and a PDA detector. Simultaneous UV and CD detections were achieved on a Jasco CD-2095 circular dichroism detector (Tokyo, Japan). The CD detector is composed of an Hg-Xe lamp (150 W), a 44  $\mu\text{L}$  flow cell with a 25 mm path-length. Data were collected and analyzed using EZchrom Elite<sup>TM</sup> software version 2.5 (Scientific Software, Pleasanton, CA). The raw CD signal was treated by a fourth order low-pass electronic noise filter (LINK, Antec Leyden, Leiden, NL).

CD spectra of the two enantiomers were acquired at 25°C in the 220 - 340 nm range with a Jasco J-810 spectropolarimeter (dichrograph) using a 10 mm path-length quartz cell. Pure enantiomers were dissolved in hexane/ethanol/diethylamine (90:10:0.05 v/v/v) to obtain the two working solutions (50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  or 0.20 mM). Each spectrum was collected with a scanning speed of 50  $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$  and the bandwidth was 2 nm. Four scans

were averaged and blank-subtracted to give the spectrum. The molar coefficient of dichroic absorption ( $\Delta\epsilon$ ) was expressed in  $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

Likewise, CD spectra of the two enantiomers were recorded with Jasco CD-2095 circular dichroism detector in the 220 – 420 nm range. Spectra were measured at the peak top of the chromatogram with the pump flow stopped by injecting 100  $\mu\text{L}$  of each enantiomer ( $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in the same medium described above.

UV spectrum was acquired from 220 to 340 nm with a double beam Cary 100 spectrometer (Varian, les Ulis, France). Spectrum was recorded at room temperature in 10 mm path-length quartz cell. The spectrum was obtained at a scanning speed of 600  $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$  after blank subtraction. Racemic mixture was dissolved in the same medium described previously to give working solution at  $9\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $35.6\ \mu\text{M}$ ).

#### *b) Chromatographic conditions*

The chiral separations were achieved under isocratic conditions using Chiralpak<sup>®</sup> AD-H (amylose tris 3,5-dimethylphenylcarbamate) or Chiralcel<sup>®</sup> OJ-H (cellulose tris 4-methylbenzoate) columns (250 mm x 4.6 mm i.d., particle size 5  $\mu\text{m}$ ), preceded by a guard column (10 mm x 4 mm i.d., same CSP as column) purchased from Daicel (Illkirch, France). The mobile phase, delivered at a flow rate of 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , was a mixture of alcohol modifier (ethanol or 2-propanol) in n-hexane, with the addition of 0.05% of diethylamine (DEA).

After optimization of the method, the final conditions were as follows: Chiralpak<sup>®</sup> AD-H column, mobile phase: hexane/ethanol/DEA (90:10:0.05 v/v/v), temperature: 30°C, flow rate: 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , injection volume: 20  $\mu\text{L}$ , UV and CD wavelength: 278 nm, cut-off frequency of the low-pass electronic noise filter: 20 mHz.

#### *c) Chemicals*

All solvents were of analytical grade. Hexane and ethanol were purchased from SDS (Peypin, France). 2-propanol was obtained from J.T. Baker (Saint-Georges les Baillargeaux, France). Diethylamine was purchased from Fluka (Saint-Quentin-Fallavier, France). The two (-)-(*S*)- and (+)-(*R*)-enantiomers and the racemic mixture of efaro-xan

(pKa = 9.48) were synthesized and purified at the Centre de Recherche Pierre Fabre (Castres, France). The (+) and (-) signs distinguished the dextrogyrous and levogyrous forms and was determined by optical rotation.

*d) Standard and sample solutions*

Stock solutions of pure enantiomers and racemic mixture (2 mg.mL<sup>-1</sup>) were prepared in ethanol. All stock solutions were filtered on a 0.22 µm pore-size membrane filter (Alltech, Templemars, France). A series of working solutions was prepared by diluting the appropriate amount of racemic mixture in the mobile phase. Likewise, working solutions with different enantiomeric purity levels were prepared by mixing stock solutions of (*R*)-enantiomer (2 mg.mL<sup>-1</sup>) and (*S*)-enantiomer (100 µg.mL<sup>-1</sup>) at appropriate concentration ratios.

*e) Analytical curve*

To investigate the linearity of the detector, calibration curves were plotted as peak height versus concentration of each enantiomer. The tested concentrations ranged from 1.25 to 300 µg.mL<sup>-1</sup>. The limit of quantitation (LOQ) was calculated by extrapolation of the signal-to-noise ratio as a function of the concentration. The criterion used to determine the LOD and LOQ was based on the signal-to-noise ratio (S/N) of 3 and 10, respectively [43]. The CD peak height ratio (distomer/eutomer) versus concentration ratio was plotted over the 0.4 to 6% range.

*f) Repeatability*

The intra-day repeatability of the method was assessed by making ten injections of three solutions with different distomer levels (0.4, 0.8 and 2%). The relative standard deviation (R.S.D.) was calculated.

*g) Calculations*

The chromatographic parameters were calculated according to the United States Pharmacopeia (USP) method via EZchrom Elite™ software version 2.5.

$$\text{Retention factor: } k = \frac{(t_R - t_o)}{t_o} \quad (\text{II.1})$$

$$\text{Enantioselectivity: } a = \frac{k_2}{k_1} \quad (\text{II.2})$$

$$\text{Resolution: } R_S = 2 \left( \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_2 + w_1} \right) \quad (\text{II.3})$$

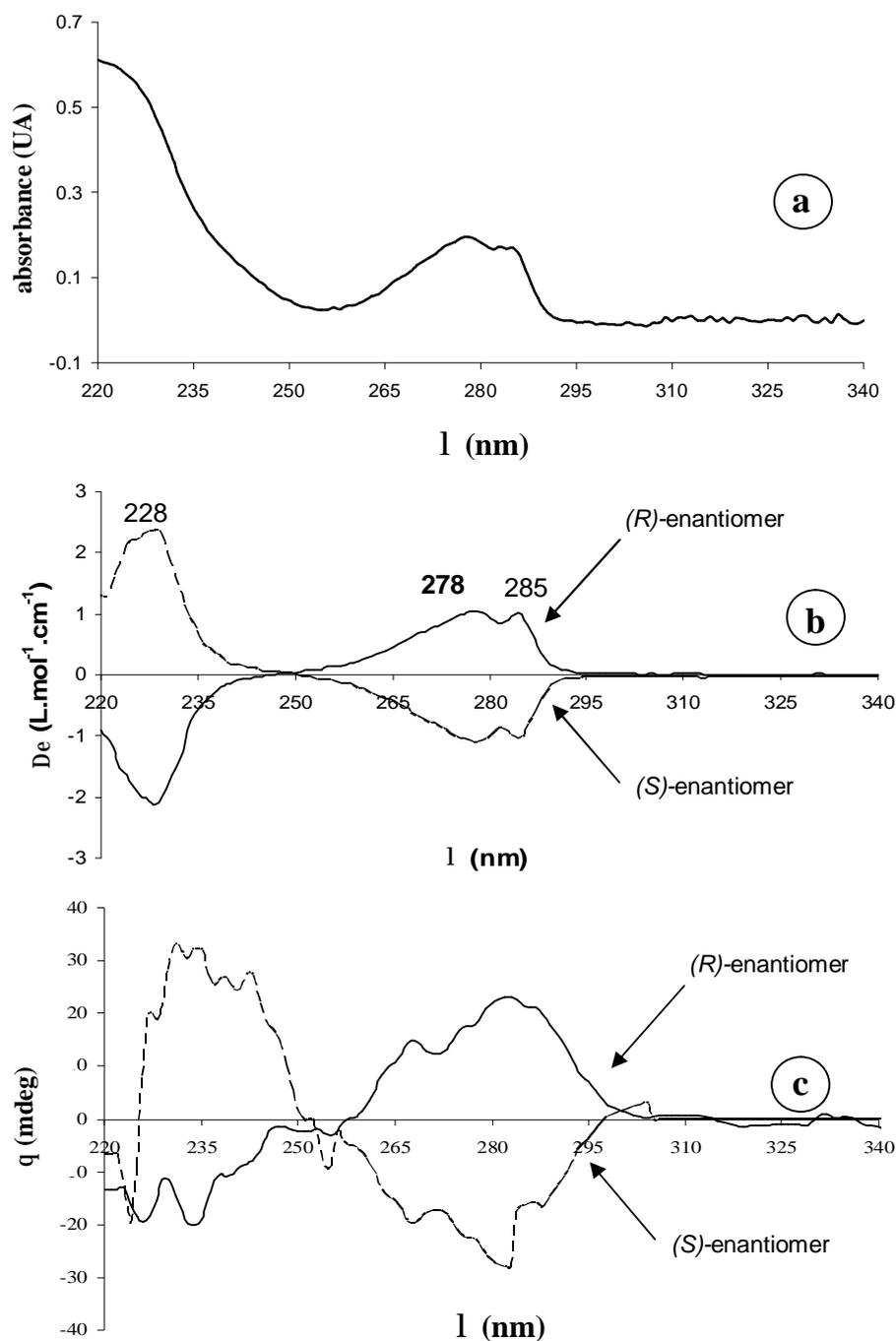
where  $t_{R1}$ ,  $t_{R2}$  are the retention times,  $w_1$ ,  $w_2$  the peak widths at baseline of the first and the second eluting enantiomer and  $w_h$  the peak width at half height. The unretained peak time ( $t_o$ ) of the system is the mean value of two injections of hexane which has a lower elution power than the hexane/ethanol mixture.

### **II.4.3. Results and discussion**

The aim of this study was to develop and pre-validate a sensitive HPLC method based on the enantioseparation of efroxan on polysaccharide stationary phase by using a circular dichroism detector.

*a) Optimization of enantioseparation conditions*

The first step of our work was to test the enantioselectivity of two polysaccharide derivated CSPs: Chiralcel® OJ and Chiralpak® AD, respectively cellulose- and amylose-based columns. A 100 µg.mL<sup>-1</sup> solution of racemic mixture prepared in the mobile phase was used for the method development. CD and UV detections were carried out at 228 nm because the difference of ellipticity between the enantiomers was maximum at this wavelength (*Figure II.5*).



**Figure II.5:** UV spectrum of racemic efaroxxan and CD spectra of their two enantiomers.

Sample concentration: 0.79 mM in hexane/ethanol/diethylamine (90:10:0.05 v/v/v). Conditions: see experimental section.

a) UV spectrum (optical pathlength 10 mm; bandwidth: 10 nm);

b) CD spectra recorded on Jasco J-810 spectropolarimeter (optical pathlength 10 mm; bandwidth: 2 nm);

c) CD spectra recorded on Jasco CD-2095 circular dichroism detector (optical pathlength 25 mm; bandwidth: 20 nm).

The mobile phase was a mixture of n-hexane, alcohol and diethylamine. The influence of the nature and content of the alcoholic modifier in the mobile phase was tested

on the retention factors ( $k$ ), the enantioselectivity factor ( $\alpha$ ) and the resolution ( $R_s$ ) (Table II.2).

**Table II.2: Effect of alcoholic modifier content on the chromatographic parameters for the separation of efaroan enantiomers on Chiralcel<sup>®</sup> OJ and Chiralpak<sup>®</sup> AD columns.**

Mobile phase content (v/v)	OJ				AD			
	k'(S)	k'(R)	R <sub>s</sub>	a	k'(R)	k'(S)	R <sub>s</sub>	a
80 / 20	0.25	0.25	0	1.00	0.32	0.63	3.97	1.97
<b>Hexane / EtOH</b>								
90 / 10	0.59	0.59	0	1.00	0.69	1.36	5.07	1.97
98 / 2	2.68	2.68	0	1.00	3.82	8.77	19.38	2.29
<b>Hexane / 2-PrOH</b>								
80 / 20	0.57	0.73	1.57	1.28	0.32	0.61	3.66	1.90
90 / 10	1.14	1.45	2.31	1.27	0.73	1.37	6.62	1.88
98 / 2	3.72	4.31	2.60	1.58	3.67	8.10	20.22	2.21

Mobile phase: hexane/organic modifier (v/v) + 0.05% DEA; temperature: 30°C; flow rate: 1 mL.min<sup>-1</sup>; injection volume: 20 µL; UV and CD wavelength: 228 nm; [racemic mixture] = 100 µg.mL<sup>-1</sup>.  
t<sub>0</sub>: 3.35 min for Chiralcel<sup>®</sup> OJ and 3.26 min for Chiralpak<sup>®</sup> AD were determined by injection of hexane.

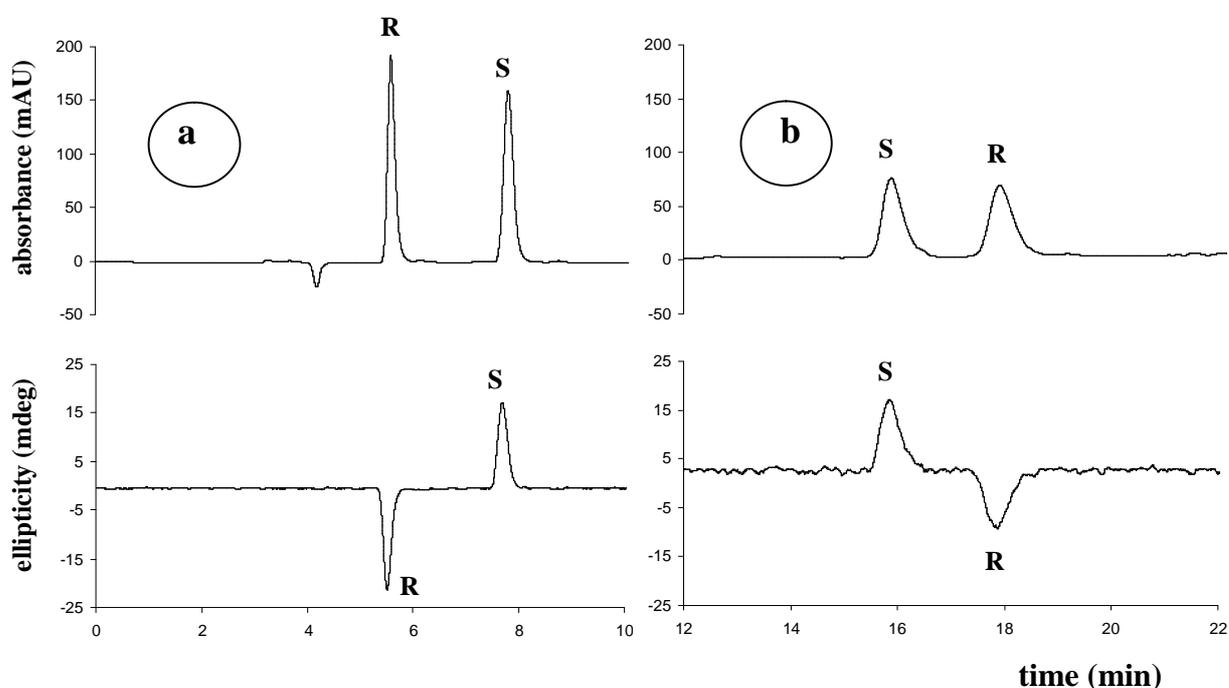
An increase in the polar modifier percentage (from 2 to 20%) in the mobile phase decreased the retention factor of each enantiomer both on AD-H and OJ-H stationary phases. Resolution was better with a low concentration of alcohol. For example, when the ethanol volume fraction decreased from 20 to 2%, the resolution on AD-H was improved by a factor of 5 although the selectivity  $\alpha$  increased slightly from 1.97 to 2.29.

A low percentage (0.05%) of DEA in the mobile phase had no effect on the selectivity but enhanced the efficiency and improved the symmetry of chromatographic peaks [44].

Whatever the elution mode, Chiralpak<sup>®</sup> AD-H exhibited better enantioselectivity than Chiralcel<sup>®</sup> OJ-H. No separation occurred on the OJ-H column with a mobile phase composed of n-hexane/ethanol/DEA (90:10:0.05 v/v/v) whereas the resolution reached 5.0 on the AD-H column. However, on the OJ-H column, the enantiomers were successfully resolved ( $\alpha > 1.5$ ,  $R_s = 2.60$ ) employing a mobile phase consisting of n-hexane/2-PrOH/DEA (98:2:0.05 v/v/v). In these conditions, the elution order between the

enantiomers was reversed compared to that obtained on the AD-H column as shown by the positive and negative CD signals (*Figure II.6*). The difference in enantiomer behaviour with respect to AD-H and OJ-H columns is likely due to the difference in substitution between these two derivatized polysaccharides. [45].

Concerning the AD-H column, the following chromatographic parameters (resolution, efficiency, analysis time) were similar with ethanol or 2-PrOH in the mobile phase. However, mixtures composed of n-hexane/2-PrOH have a higher viscosity than those with linear alcohol; therefore they induced higher pressures in the column. The best separation was a compromise between short analysis time and good chromatographic parameters and was obtained with n-hexane/ethanol/DEA (90:10:0.05 v/v/v).



**Figure II.6:** Separation of efaroxan enantiomers by HPLC with CD and UV detections.

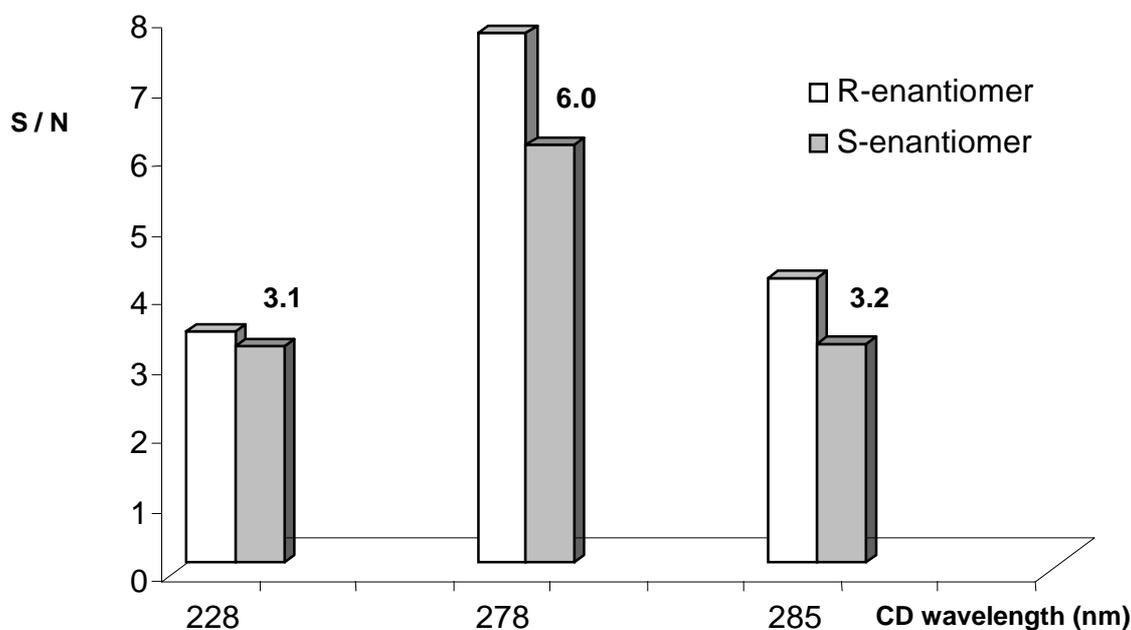
Conditions: (a) Chiralpak<sup>®</sup> AD column; mobile phase: n-hexane/ethanol/DEA (90:10:0.05 v/v/v). (b) Chiralcel<sup>®</sup> OJ column; eluent: n-hexane/2-PrOH/DEA (98:2:0.05 v/v/v); UV and CD wavelength: 228 nm; temperature: 30°C; flow rate: 1 mL.min<sup>-1</sup>; injection volume: 20µL [racemic mixture] = 100 µg.mL<sup>-1</sup>.

*b) Sensitivity improvement*

The linearity of the CD signal (peak height versus concentration) was evaluated for each enantiomer on the 10-300  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  concentration range. Good linearity was observed with a correlation coefficient equal to 0.9947 (calculated by the least-squares regression). Peak height was selected rather than peak area due to a better linear correlation. Nevertheless, depending on the linearity range, the determination of enantiomeric impurity smaller than 3.3% cannot be achieved. We have therefore tried to optimize the sensitivity of the CD detector by both CD wavelength selection and then CD signal filtering.

**Circular dichroism spectra.** In order to select the wavelength which offers the maximum sensitivity, precision and accuracy, UV and CD spectra of drug enantiomers were first recorded (Fig. 2). CD spectra were performed with a bench-top unit and with the detector in order to compare their performances. As expected, whatever the apparatus used, for two enantiomers, CD signals were mirror images of each other compared to the wavelength axis. Three maxima were clearly found at 228, 278 and 285 nm with the spectrometer whereas the CD detector lacked of accuracy and precision due to the stopped flow method used to record the spectra and the relatively wide spectral bandwidth (20 nm) compared with those of the spectropolarimeter (2 nm). Nevertheless, this detector enabled to find the optimum wavelength for the compound being monitored. For accuracy and precision, it is preferable to use a spectropolarimeter.

The selection of the wavelength with the highest ellipticity value is often recommended to develop an achiral HPLC-CD method [24,36]. In this study, the criterion was based on the CD wavelength inducing the best signal-to-noise ratio. Although there is a maximum of ellipticity between the enantiomers at 228 nm, UV and CD signals have been recorded further at 278 nm. Indeed, the signal-to-noise ratio is two times greater at 278 nm than at 228 nm due to weaker noise (*Figure II.7*). Working at 278 nm allowed the quantitation of 2.65% of the enantiomeric impurity. However, this result was not satisfactory.



**Figure II.7:** Influence of the CD detection wavelength on the signal-to-noise ratio of efaroxan enantiomers.

Chromatographic conditions: Chiralpak<sup>®</sup> AD column, hexane/ethanol/DEA (90:10:0.05 v/v/v); temperature: 30°C; flow rate: 1 mL.min<sup>-1</sup>; injection volume: 20 µL; [racemic mixture] = 100 µg.mL<sup>-1</sup>.

**Low-pass electronic noise filter.** The sensitivity of the method is directly proportional to the signal-to-noise ratio of the detector. In order to improve this ratio, one approach was to reduce the noise. Noise is caused by the superposition of three components which are classified, depending on the oscillation frequency of the signal in long term noise, short term noise and drift.

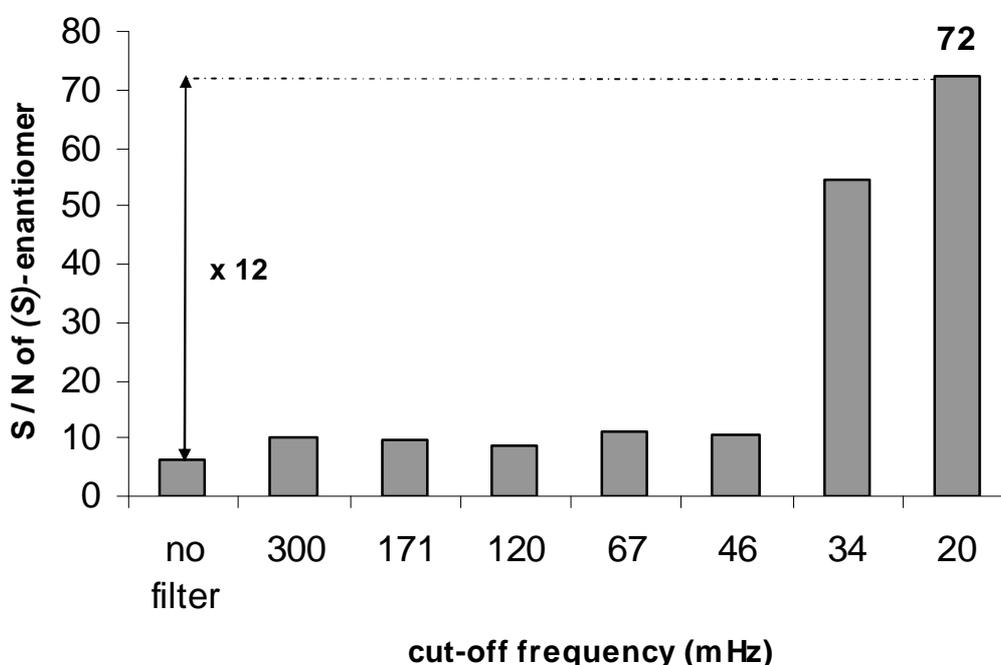
Short term noise results from baseline perturbations that have frequencies significantly higher than those of an eluted peak. Short term noise can be removed without significantly affecting the profiles of the peaks by applying low-pass filtering.

The LINK apparatus is an active and fourth order noise filter. It can be considered as a number of first order RC (resistor, capacitor) filters in series. It has been developed as a stand-alone unit and is suitable for every detector that supplies an analogous signal. The electronic noise filter is connected between the signal outlet of the CD detector and the acquisition system [46].

The selection of the cut-off frequency, which corresponds to the frequency beyond which the frequency of the signal is removed, is essential. Eleven cut-off frequencies can be selected on the LINK. The filtering action should be carefully optimized in order to

maintain the chromatographic resolution; in this work, the case is ideal since separation is high enough.

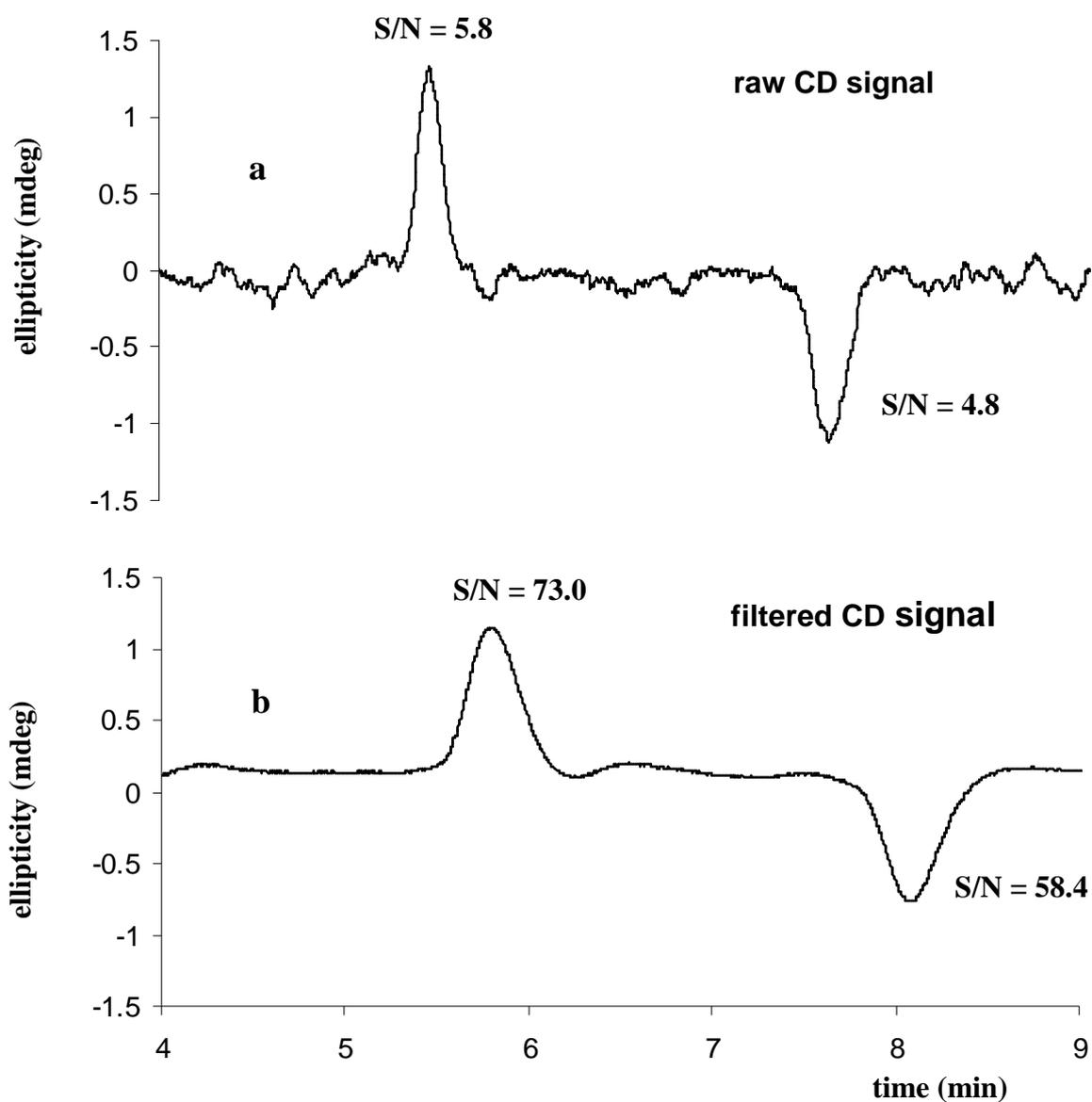
Figure II.8 reports the influence of the cut-off frequency on the S/N ratio. When the cut-off frequency decreased from 300 mHz down to 46 mHz, there was no significant improvement in sensitivity of the CD signal ( $S/N = 10$ ). This means that CD noise frequency was lower than 46 mHz and the noise was not eliminated. In the 34-20 mHz frequency range, the signal-to-noise ratio increased significantly to reach the value of 72 at 20 mHz. At 20 mHz, half of the CD signal was lost whereas the noise was reduced by 96%.



**Figure II.8:** Influence of the cut-off frequency on the signal-to-noise ratio of (S)-efaroxan.

Chromatographic conditions: as in Fig. II.7, except the detection wavelength (278 nm).

Consequently, the use of a low-pass electronic noise filtering of the CD signal enabled a gain in sensitivity by a factor 12 (Figure II.9) and the quantitation of each enantiomer was achieved over the 1.25-300  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  concentration range (calibration curves not shown). After signal filtering, a small shift of retention time was observed.



**Figure II.9:** Decrease in the short-term noise of the CD signal by the use of a low-pass electronic noise filter.

Chromatographic conditions: as in Fig. II.7 except: detection wavelength (278 nm) and [racemic mixture] =  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . a) raw signal; b) filtered CD signal (cut-off frequency: 20 mHz).

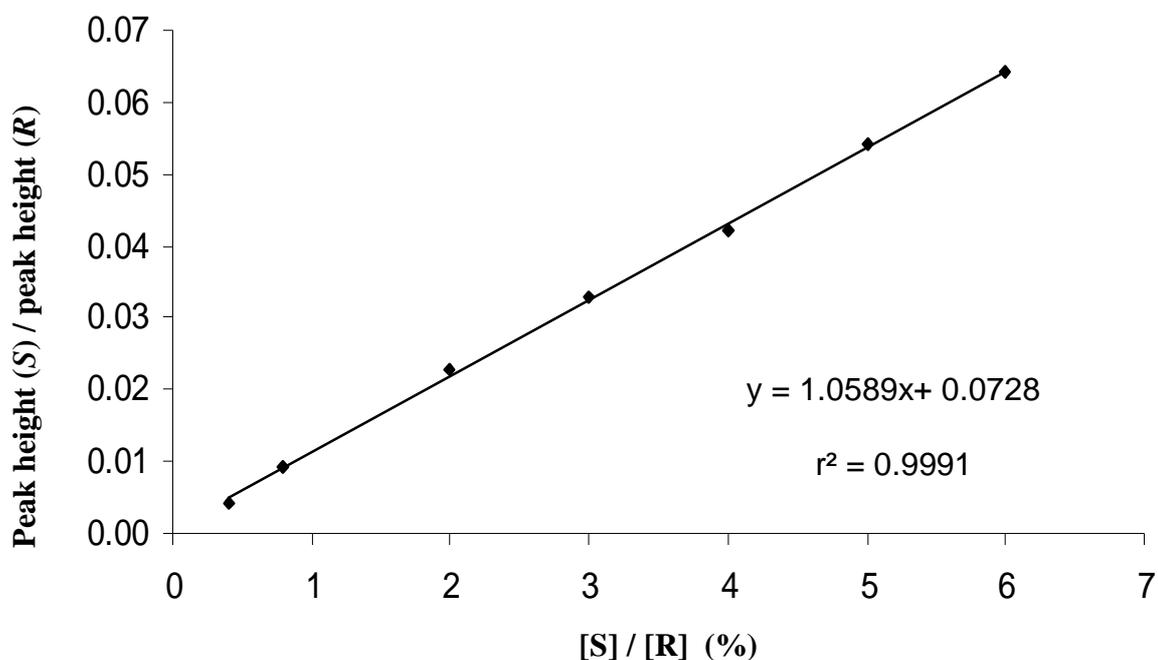
c) *Method pre-validation*

A pre-validation study was performed to assess the linearity and the precision of the CD signal. The results are summarized in *Table II.3*.

**Table II.3: Linearity, repeatability. Conditions see Fig. II.7.**

Parameters	Results
<b>Linearity (enantiomeric impurity)</b>	
- calibration range (% distomer)	0.4 – 6.0
- calibration points	7
- correlation coefficient	0.9991
- slope	1.0589
R.S.D (%)	0.63
- intercept	0.0728
R.S.D (%)	3.80
<b>Repeatability at 0.8 % (n=10, % R.S.D)</b>	
- retention time of eutomer	0.14
- retention time of distomer	0.18
- peak height (distomer) / peak height (eutomer)	8.64
<b>Repeatability at 2 % (n=10, % R.S.D)</b>	
- retention time of eutomer	0.42
- retention time of distomer	0.89
- peak height (distomer) / peak height (eutomer)	5.08

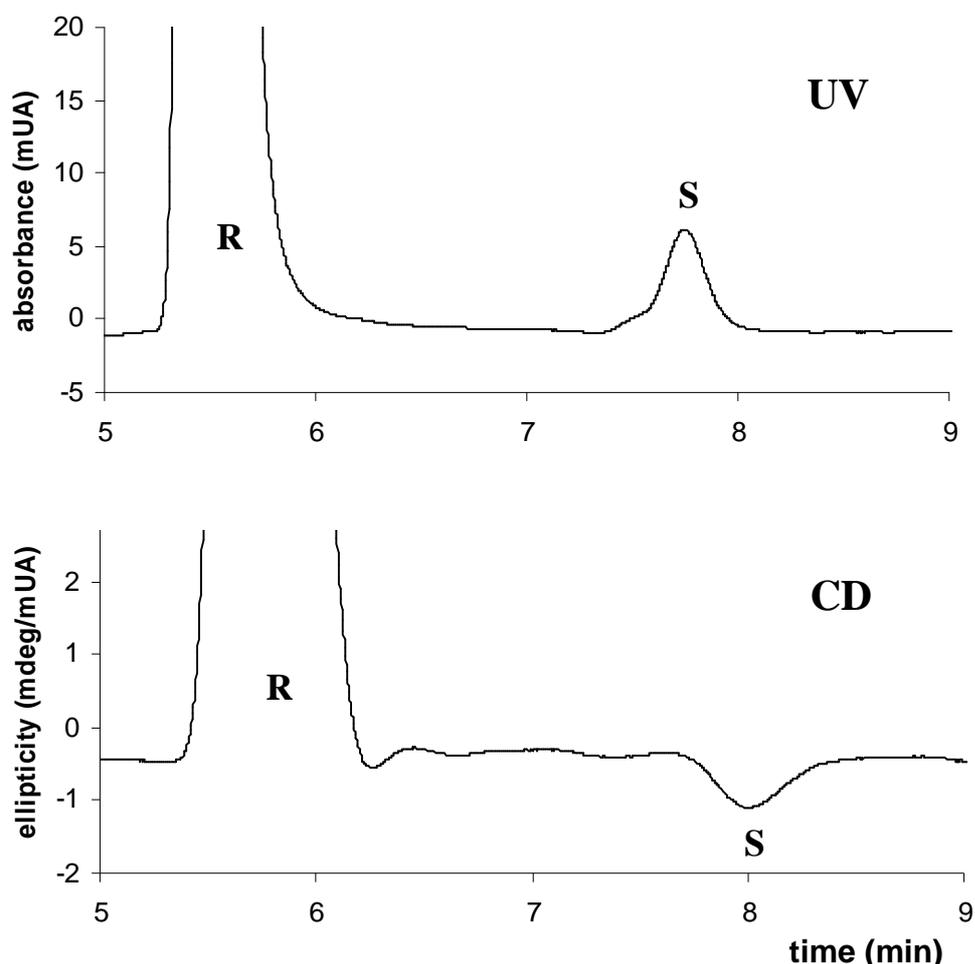
**Linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ).** The plot of CD peak height ratio (S / R) versus the distomer percentage was generated by injecting in triplicate seven solutions with different distomer levels in the 0.4-6% range (*Figure II.10*). Least squares regression yielded a good correlation coefficient (0.9991) with a linear regression equation  $y = 1.0589x + 0.0728$ . Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) in term of distomer percentage were estimated at 0.14 and 0.46%, respectively.



**Figure II.10: Relative calibration curve of efaroan enantiomers.**

Chromatographic conditions: Chiralpak AD column, hexane/ethanol/DEA (90;10;0.05 v/v/v); temperature: 30°C; flow rate: 1 mL.min<sup>-1</sup>; injection volume: 20 µL; CD and UV wavelength: 278 nm; (*R*)-enantiomer concentration: 300 (µg.mL<sup>-1</sup>); (*S*)-enantiomer concentration: 1.25 - 18 µg.mL<sup>-1</sup>.

**Repeatability.** Three samples with different diastomer purity values (0.4, 0.8 and 2%) were injected ten times to evaluate the intra-day precision. The relative standard deviation (R.S.D) was better than 0.4% for the retention time of two enantiomers. The RSD calculated from the peak height ratio were satisfactory, 5% at an enantiomeric impurity of 2% (8.7% at 0.8%, respectively). However, at lower enantiomeric impurity (0.4%), the intra-day repeatability was too high (RSD = 35%) to assess the quantitation of (*S*)- and (*R*)-enantiomers with precision. Finally, the HPLC-UV and HPLC-CD chromatograms of (*R*)-efaroan spiked with 1% (*S*)-enantiomer are shown in *Figure II.11*.



**Figure II.11:** Separation of efaroan enantiomers by HPLC-CD ( $[S]/[R] = 1\%$ ).

Experimental section as in Figure II.10 except for enantiomer concentrations ( $[R] = 300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $[S] = 3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

#### **II.4.4. Conclusion**

The efaroan enantiomers have been successfully resolved by enantioselective HPLC using a circular dichroism detector. The sensitivity of the CD detection has been increased by selection of the appropriate CD wavelength (improvement in sensitivity by a factor of 2) and by the use of a commercial low-pass electronic filter (improvement in sensitivity by a factor of 12). The CD linearity range was also extended up to  $1.25\text{-}300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  instead of  $10\text{-}300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Finally, the enantiomeric purity of (*R*)-efaroan can be quantified up to 99.2% with precision. Nevertheless, the method remains above the 0.1 % required by the Pharmacopea and further improvements in the CD instrument sensitivity are required in the near future.

Several modifications of the CD detector (microflow-cell, optics design, lamp) are under study in order to detect smaller amounts of distomer (0.1% level) in the active enantiomeric form.

## **II.5. Bilan sur les performances du détecteur à dichroïsme circulaire en CPL chirale**

Les performances du détecteur à dichroïsme circulaire (DC-UV) ont été évaluées lors de l'analyse chromatographique énantiosélective de l'efaroxan sur une colonne amylose AD. Cette étude a montré que la sensibilité de détection dépend de la longueur d'onde de détection ; celle-ci doit être sélectionnée afin d'avoir le maximum de différence d'ellipticité entre les deux formes énantiomériques. De plus, il est préférable de travailler à des longueurs d'onde élevées en raison d'un moindre bruit de fond. L'utilisation du filtre électronique passe-bas (LINK) a permis d'améliorer les limites de quantification d'un facteur 10 et de déterminer la teneur en impureté énantiomérique de l'efaroxan jusqu'à un seuil minimal de 0,8 %. Par ailleurs, la détection par dichroïsme circulaire apporte une information qualitative supplémentaire par rapport à la spectrométrie UV puisqu'elle permet de prévoir l'ordre de rétention des énantiomères.

Cependant, cette méthode a nécessité l'utilisation de deux discriminants chiraux qui sont : la colonne chromatographique et le détecteur dichroïque. En CPL, la séparation des énantiomères provient des différences d'interaction entre le sélecteur chiral et chaque énantiomère. Ce mécanisme est étroitement lié à la configuration spatiale des substituants portés par le centre d'asymétrie des énantiomères.

La discrimination stéréosélective effectuée par le détecteur à dichroïsme circulaire est basée sur les propriétés optiques des énantiomères et ne nécessite pas leur séparation préalable.

Dans le but de s'affranchir de l'utilisation d'une colonne chirale, nous avons développé une méthode d'analyse chromatographique non énantiosélective couplée au détecteur à dichroïsme circulaire. La linéarité du facteur d'anisotropie ( $\Delta\epsilon/\epsilon$ ) en fonction de l'excès énantiomérique devrait permettre de déterminer la pureté optique de principes actifs pharmaceutiques.

### **III. Détermination de la pureté énantiomérique d'un principe actif pharmaceutique en CPL non énantiosélective en utilisant un détecteur à dichroïsme circulaire**

#### **III.1. Influence de la température sur la stabilité du signal dichroïque lors de l'analyse d'un anti-dépresseur : le milnacipran**

La dépression est un "état psychique pathologique associant une modification de l'humeur et un ralentissement de l'activité intellectuelle et motrice" [47].

Les principaux symptômes permettant de diagnostiquer une dépression chez une personne sont les suivants :

- humeur dépressive,
- diminution marquée de l'intérêt ou du plaisir,
- troubles de l'alimentation et du sommeil,
- fatigue ou perte d'énergie,
- autodévalorisation ou sentiment de culpabilité excessive,
- problème de concentration ou difficultés à prendre une décision,
- pensées morbides ou suicidaires.

##### **III.1.1. Les neurotransmetteurs impliqués dans la dépression**

Une première hypothèse explicative de cet état psychique a été formulée durant les années 1960 et ciblait la noradrénaline comme étant le neurotransmetteur principal impliqué dans la dépression. L'état dépressif était dû à une déficience en noradrénaline dans certains circuits cérébraux. Bien que reconnue, cette hypothèse n'explique pas tout, et en particulier les fluctuations du taux de noradrénaline n'affectent pas l'humeur de certaines personnes.

Durant les années 1970, l'origine d'une dépression a été interprétée par un faible taux de sérotonine dans certaines synapses. Par conséquent, même si l'on reconnaissait toujours un rôle important à la noradrénaline dans la dépression, on pouvait maintenant agir sur la sérotonine pour tenter de soulager les symptômes de la maladie. Cette nouvelle

voie thérapeutique s'est matérialisée par la commercialisation du Prozac dans les années 1980 et d'autres inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS).

### **III.1.2. Les traitements de la dépression**

Il existe quatre grandes familles de composés pharmaceutiques, regroupées selon leur structure moléculaire et leur mode d'action, qui permettent le traitement de la dépression :

- les antidépresseurs tricycliques ou tétracycliques,
- les inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO),
- les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS),
- les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine – noradrénaline (IRS-NA).

La mise au point des différentes classes d'antidépresseurs a suivi l'évolution des hypothèses biochimiques de la dépression.

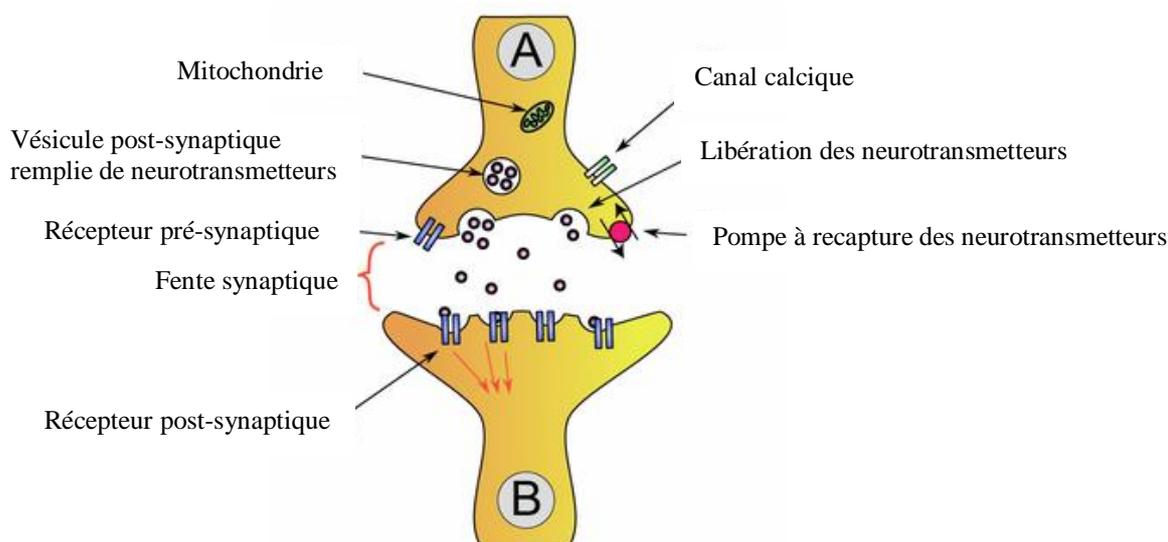
Les composés tricycliques furent les premiers antidépresseurs développés et tiennent leur nom des trois anneaux de leur structure chimique. Ces composés agissent principalement en bloquant les pompes à recapture des synapses sérotoninergiques et noradrénergiques, augmentant ainsi le taux de sérotonine ou de noradrénaline disponible dans la fente synaptique.

Les inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO) font partie de la deuxième famille chimique d'antidépresseurs. Comme leur nom l'indique, les IMAO vont bloquer la monoamine oxydase, permettant ainsi une plus grande biodisponibilité de sérotonine et de noradrénaline dans la synapse.

Les effets indésirables de ces deux classes d'antidépresseurs, en particulier la cardiotoxicité des composés tricycliques (surtout en cas de surdosage) et les crises hypertensives des IMAO (interactions avec certains aliments et d'autres médicaments) ont poussé la recherche vers de nouvelles molécules d'efficacité thérapeutique identique mais de meilleure acceptabilité.

Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) correspondent à une classe bien connue des antidépresseurs dont l'un des plus célèbres représentants est la

fluoxétine commercialisée sous le nom de Prozac®. Les ISRS diminuent la recapture de la sérotonine dans le neurone pré-synaptique (*Figure II.12*). La quantité de neurotransmetteur présent dans la fente synaptique augmente, ce qui permet de compenser le faible taux de sérotonine chez certaines personnes déprimées.



**Figure II.12 : Libération de la sérotonine et de la noradrénaline au niveau d'une synapse et inhibition de la pompe à recapture de ces neurotransmetteurs.**

A : neurone pré-synaptique ; B : neurone post-synaptique.

Les ISRS sont les antidépresseurs les plus utilisés à ce jour. En raison de leur mode d'action plus restreint, ils génèrent peu d'effets secondaires (nausées, maux de tête, tremblements) qui disparaissent après le premier mois d'utilisation.

Les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (ISR-NA) sont les derniers nés des antidépresseurs. L'effet thérapeutique résulte d'une action simultanée sur ces deux neurotransmetteurs. La plupart des ISR-NA ont une affinité pour les récepteurs adrénergiques post-synaptiques et engendrent de nombreux effets secondaires. Néanmoins, cette classe thérapeutique présente un vif intérêt pour le traitement de la dépression et de nombreux analogues sont en voie de développement.

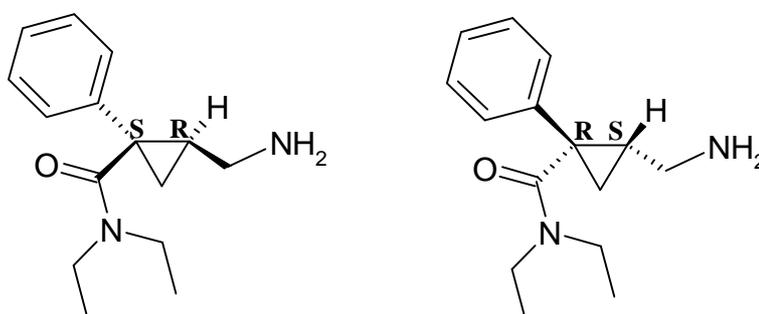
Le *tableau II.4* regroupe les sites d'action, les principaux représentants et les effets secondaires des différentes classes thérapeutiques des antidépresseurs.

**Tableau II.4 : Site d'action, principaux représentants et effets secondaires des différentes classes thérapeutiques des antidépresseurs.**

Classe thérapeutique	Site d'action	Principaux représentants	Effets secondaires
<b>Antidépresseurs imiprominiques</b> (tricycliques)	bloque les pompes à recapture des synapses sérotoninergiques et noradrénergiques	imipramine (Tofranil®) trimipramine (Surmontil®) amitriptyline (Elavil®, Laroxyl Roche®) clomipramine (Anafranil®) miansérine (Athylimil®) amoxapine (Defanyl®)	bouche sèche vision brouillée sueurs gain de poids
<b>IMAO</b> (Inhibiteur de la Monoamine Oxydase)	bloque l'action de l'enzyme monoamine oxydase	iproniazide (Marsilid®) moclobémide (Moclamine®)	hypertension artérielle incompatibilité médicamenteuse vertiges maux de tête constipation hépatites
<b>ISRS</b> (Inhibiteur Spécifique de Recapture de la Sérotonine)	diminue la recapture de la sérotonine dans le neurone pré-synaptique	fluoxétine (Prozac®) fluvoxamine (Luvox®, Floxyfral®) sertraline (Zoloft®) paroxétine (Deroxal®, Divarius®)	nausées diarrhées céphalées baisse de libido tremblements
<b>SNRI</b> (Inhibiteurs de la Recapture de la Sérotonine – Noradrénaline)	diminue la recapture de la sérotonine et la noradrénaline dans le neurone pré-synaptique	milnacipran (Ixel®) venlafaxine (Effexor®)	nausées vomissements sécheresse buccale rétention urinaire effets sédatifs

### III.1.3. Propriétés physico-chimiques du milnacipran

Le milnacipran, (Z-(+/-)-(2-(aminométhyl)-N,N-diéthyl-1-phényl-cyclopropane-1-carboxamide hydrochlorhydrate, *Figure II.13*) est un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline qui est actuellement commercialisé par les Laboratoires Pierre Fabre. La molécule de milnacipran est constituée de deux centres d'asymétrie qui donne naissance à quatre stéréoisomères à savoir deux formes cis et deux formes trans. Cette molécule est intégrée sous la forme racémique des isomères cis dans la formulation Ixel<sup>®</sup> pour le traitement de la dépression [48,49]. Son mécanisme d'action n'implique aucun effet sur les récepteurs post-synaptiques ce qui lui confère une remarquable tolérance [50] et peu d'effets secondaires.



**Figure II.13 :** Structure des deux énantiomères « cis » du milnacipran.

Les propriétés physico-chimiques des deux énantiomères du milnacipran sont regroupées dans le *Tableau II.5*.

**Tableau II.5 :** Propriétés physico-chimiques du milnacipran.

Selon un document interne des Laboratoires Pierre Fabre.

Formule chimique	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O, HCl
Masse molaire (g.mol <sup>-1</sup> )	282,8
Aspect	poudre blanche
Solubilité dans l'eau (mg.mL <sup>-1</sup> )	1250
Masse volumique (g.cm <sup>-3</sup> )	0,35
Point de fusion (°C)	179-181
pKa	9,65

Bien que l'essentiel de l'activité INSR-NA du milnacipran ne réside dans l'énantiomère (1S, 2R), le milnacipran est commercialisé sous la forme d'un mélange

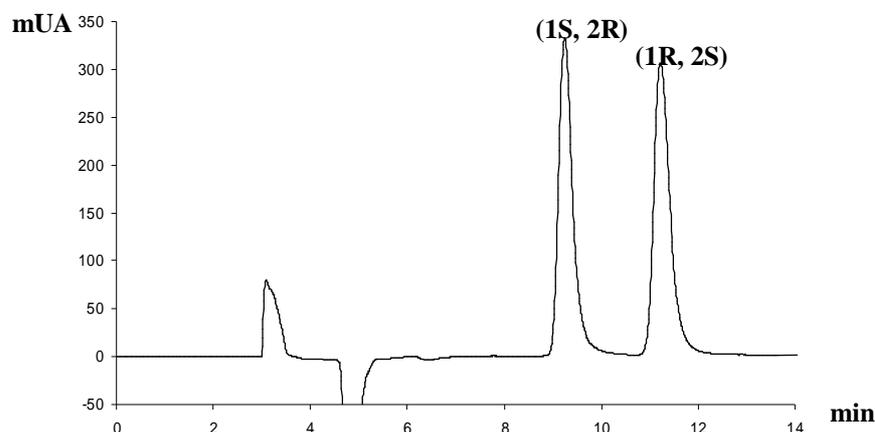
racémique. En effet, les études pharmacologiques ont révélé l'absence de racémisation *in vivo* des deux formes optiques [51] et aucune toxicité du distomère (1R, 2S).

Lorsqu'un principe actif chiral est commercialisé sous sa forme racémique, les autorités réglementaires exigent que le rapport énantiomérique des deux stéréoisomères soit vérifié. Pour ce faire, des techniques d'analyse sont développées afin de séparer les deux énantiomères.

### **III.1.4. Etude bibliographique concernant l'analyse du milnacipran**

Plusieurs travaux ont porté sur l'analyse non énantiosélective du milnacipran en chromatographie liquide sur un support C<sub>18</sub> [52] ou en électrophorèse capillaire micellaire [53]. D'autre part, la pureté optique du milnacipran a été indirectement déterminée à partir de son précurseur, une lactone, lors de sa synthèse asymétrique [54].

A ce jour, les énantiomères du milnacipran ont pu être séparés en EC, par addition de cyclodextrines dans le tampon électrophorétique [10], ou en CPL, sur une phase stationnaire polysaccharidique de type cellulose [55]. Toutefois, aucune étude quantitative n'a été décrite. Dans une méthodologie mise au point par les Laboratoires Pierre Fabre, les énantiomères du milnacipran sont analysés en CPL sur une colonne amylose (Chiralpak AD) avec une phase mobile constituée d'hexane/éthanol/butylamine (90:10:0,1 v/v/v) avec une phase mobile constituée d'hexane/éthanol/butylamine (90:10:0,1 v/v/v) (Figure II.14).



**Figure II.14 : Séparation des deux énantiomères du milnacipran par CPL sur une colonne amylose.**

Colonne : amylose AD-H (250 x 4,6 mm, 5 µm d.i.) ; phase mobile: hexane / EtOH / n-butylamine (90:10:0,1 v/v/v); débit: 1 mL.min<sup>-1</sup>; injection: 20 µL; détection UV : 220 nm ; [milnacipran] : 100 µg.mL<sup>-1</sup>.

Comme indiqué précédemment, le milnacipran est commercialisé sous sa forme racémique et les analyses de routine consistent à vérifier le rapport énantiomérique (50/50) des deux formes « cis ».

Dans ce paragraphe, les énantiomères du milnacipran seront analysés par CPL sur une phase stationnaire achirale. Le détecteur à dichroïsme circulaire fournira à la fois le signal d'absorption UV et le signal dichroïque. Le rapport de ces deux signaux est le facteur d'anisotropie ( $g = \Delta\epsilon/\epsilon$ ). Pour chaque pic chromatographique, le rapport énantiomérique (ou l'excès énantiomérique) du principe actif sera déterminé grâce au facteur  $g$  tandis que la concentration sera liée au signal d'absorbance UV. Dans les travaux ultérieurs, l'influence notoire de la température sur la linéarité du signal dichroïque sera démontrée.

**III.1.5. Article 2: Chiral analysis of milnacipran by a non-chiral HPLC - circular dichroism: Improvement of the linearity of dichroic response by temperature control**

**Journal of Separation Science 31 (2008) 3009-3014**

Marie Lecoœur-Lorin<sup>1</sup>, Raphaël Delépée<sup>1</sup>, Jean-Paul Ribet<sup>2</sup>, Philippe Morin<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> *Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), CNRS FR 2708, UMR 6005, Université d'Orléans, B.P. 6759, 45067 Orléans cedex 2, France*

<sup>2</sup> *Département de Chimie Analytique, Institut de Recherche Pierre Fabre, 17 avenue Jean Moulin, 81106 Castres, France*

**Running title:** Chiral analysis of milnacipran by non-chiral HPLC – circular dichroism

**Abstract**

The determination of the enantiomeric excess of a basic drug has been investigated in liquid chromatography using a non chiral stationary phase and a circular dichroism detector (CD) in order to avoid expensive chiral columns. The CD detector records both dichroic ( $\Delta\epsilon$ ) and UV ( $\epsilon$ ) signals at the same wavelength and calculates the anisotropy factor ( $g = \Delta\epsilon/\epsilon$ ), which is linearly related to the enantiomeric excess. The enantiomeric and chemical composition of a chiral drug can be simultaneously determined on a non chiral HPLC support.

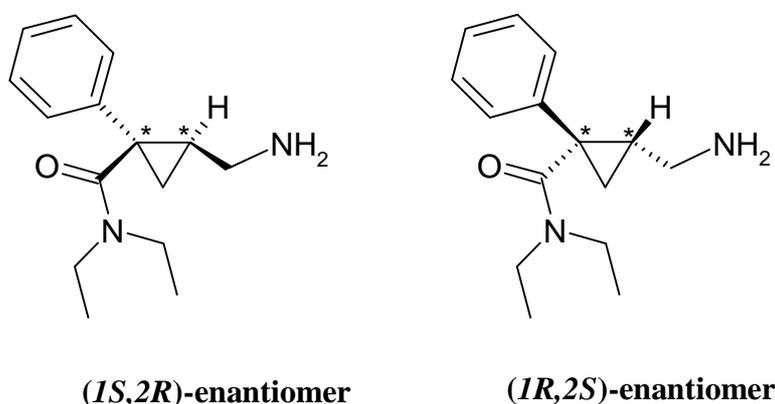
However, the  $g$  factor from the CD signal is temperature dependent. Indeed, the temperature has an influence on the stability of CD signal and the linear regression between  $g$  factor and the enantiomeric excess of (*1R,2S*)-enantiomer. So, a decrease of temperature gives rise to an improvement of the above-mentioned linearity correlation.

After optimization of chromatographic parameters (porous graphitic carbon-based column, methanol/ phosphate buffer as mobile phase) and selection of CD wavelength, a linear regression of  $g$  factor versus enantiomeric excess of (*1R,2S*)-enantiomer was obtained at temperature-controlled CD detection and a limit of quantitation of 94% was found. The enantiomeric composition of milnacipran was determined with good accuracy.

**Keywords:** Circular dichroism (CD); Anisotropy factor (g factor); Enantiomeric excess (e.e.); milnacipran; non chiral HPLC.

*a) Introduction*

The chiral basic drug, milnacipran (Z-(+/-)-(2-(aminomethyl)-N,N-diethyl-1-phenyl-cyclopropane-1-carboxamide hydrochlorhydrate) is a selective serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor [48,51], (Figure II.15). The chiral composition of this drug must be verified in quality control laboratory. The determination of milnacipran has been investigated in human plasma using liquid chromatography with spectrofluorimetric detection [56]. Besides, the separation of milnacipran enantiomers has been previously achieved by capillary electrophoresis [10,57].



**Figure II.15:** Chemical structures of milnacipran.

Circular dichroism (CD) is of particular interest for compounds exhibiting chiroptical properties. Furthermore, CD has a high selectivity because the CD signal can be observed in the UV region where an electronic transition occurs, giving rise to the phenomenon of UV absorption. The principle is based on absorption differences between left and right circularly polarized light. Nowadays, CD spectroscopy is gaining increasing importance in pharmaceutical analysis due to the commercially available CD detector in liquid chromatography.

An interesting HPLC-CD application concerns the simultaneous determination of enantiomeric excess and chemical purity of a chiral drug on a non chiral HPLC support

[21]. The CD detector records both dichroic ( $\Delta\epsilon$ ) and UV ( $\epsilon$ ) signals at the same wavelength and calculates the anisotropy factor  $g$  ( $g = \Delta\epsilon/\epsilon$ ) [36]. This dimensionless parameter is independent of the analyte concentration but is linearly related to the enantiomeric excess. Indeed, the CD signal depends only on the enantiomeric composition of the chiral molecule whereas UV absorption is related to the analyte concentration [38].

Before being applied to routine quality control, a method must be validated in terms of accuracy, precision, trueness and robustness. To satisfy these criteria, both chromatographic and detection systems must be stable with slight fluctuations of different external parameters (temperature, wetness, vibration). In our study, an HPLC column oven has been used in order to thermostat the stationary and mobile phases, thus enabling better retention time reproducibility. In addition, several parameters (lamp pre-heating time, room temperature) may influence the sensitivity and stability of the CD detector. In a previous study, Bossu *et al.* [37] have shown that seven hours of lamp pre-heating were required to ensure the stability of both CD and  $g$  factor signals.

In this work, we have focused specifically on the stability of the CD and  $g$ -factor signals versus any fluctuation of temperature. Milnacipran was selected as test molecule to evaluate the CD detector performances.

## *b) Experimental*

### **a) Equipment**

Experiments were carried out on an Agilent HP 1100 series chromatographic system (Waldbronn, Germany) equipped with a binary pump, a variable volume autosampler programmed to inject 20  $\mu\text{L}$  volume and a column oven. Simultaneous UV and CD detections were achieved on a Jasco CD-2095 circular dichroism detector (Tokyo, Japan) composed of a 44  $\mu\text{L}$  flow cell with a 25 mm path-length. The chromatographic system was controlled with Chemstation software version A.08.03 (Agilent). Data were collected and analyzed using EZchrom Elite<sup>TM</sup> software version 2.5 (Scientific Software, Pleasanton, CA, USA). The anisotropy factor ( $g$ ) was calculated as the ratio of CD / UV peak areas. The raw CD signal was treated by a fourth order low-pass electronic noise filter (LINK, Antec Leyden, Leiden, NL) and the cut-off frequency selected was 20 mHz [58].

CD spectra of the two enantiomers were acquired at 25°C in the 200-340 nm range with a Jasco J-810 dichroism spectrometer using a 1 mm path-length quartz cell. Pure enantiomers were dissolved in potassium hydrogenophosphate - potassium hydroxide buffer (pH 5.5, ionic strength: 59 mM) or in phosphoric acid-sodium hydroxide buffer (pH 11.8, ionic strength: 20 mM) to obtain four working solutions (100 µg mL<sup>-1</sup> *i.e.* 0.35 mM). Each spectrum was collected with a scanning speed of 50 nm min<sup>-1</sup>. Four scans were averaged and blank-subtracted to obtain the CD spectrum.

### **b) Chromatographic conditions**

Two different HPLC systems were used for the analysis of milnacipran enantiomers:

- *C<sub>18</sub> chromatographic support*

The chromatographic analyses were performed using a Zorbax Extend C<sub>18</sub> column (150 mm x 2.1 mm I.D., particle size 5 µm) purchased from Agilent. The mobile phase was a mixture of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-KOH buffer (pH 5.5, ionic strength: 59 mM) and methanol (60:40, v/v). The eluent was delivered at a flow rate of 0.2 mL min<sup>-1</sup> and the column temperature was set at 30°C. Finally, UV and CD detections were performed at 222 nm.

- *Porous graphitic carbon (PGC) support*

In the second chromatographic system, analytes were injected on a porous graphitic carbon PGC column (30 mm x 2.1 mm I.D., particle size 5µm) purchased from Thermo Fischer Scientific (Courtaboeuf, France) and the mobile phase was a mixture of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH buffer (pH 11.8, ionic strength: 20 mM) and methanol (50:50, v/v). The eluent was delivered at a flow rate of 0.2 mL min<sup>-1</sup> and the column temperature was set at 30°C. UV and CD detections were performed at the same wavelength (230 nm).

### **c) Chemicals**

Methanol was of analytical grade and purchased from SDS (Peypin, France). Phosphoric acid (85% w/v) and potassium phosphate monobasic (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) were obtained from Fluka (Saint-Quentin-Fallavier, France) and sodium hydroxide (30% w/v) from Fisher Scientific (Overpelt, Belgium). For the preparation of buffer, ultra pure water

(resistance < 18 M $\Omega$ ) was provided by an Elgastat UHQ II apparatus (Elga, Antony, France). Different buffers were prepared at fixed pH and ionic strength with the help of Phoebus software (Analis, Namur, Belgium). The (*1S,2R*)- and (*1R,2S*)-enantiomers of milnacipran were synthesised and purified at the Centre de Recherche Pierre Fabre. The chemical purities of two enantiomers were determined by HPLC on a C<sub>18</sub> silica column. Their enantiomeric excess (e.e. > 99.8%) was checked by Pierre Fabre Research Center. The chiral separation was investigated by HPLC-UV (220 nm) on a chiral stationary phase using an internal method.

#### **d) Standards and working solutions**

Stock solutions of each enantiomer were prepared in methanol (5 mg mL<sup>-1</sup>). Standard working solutions were then obtained by appropriate dilution in the mobile phase. The linearities of CD and UV signals versus enantiomer concentration were assessed in the 25 - 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  concentration range on C<sub>18</sub> chromatographic support and 12.38 – 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  on PGC sorbent, respectively.

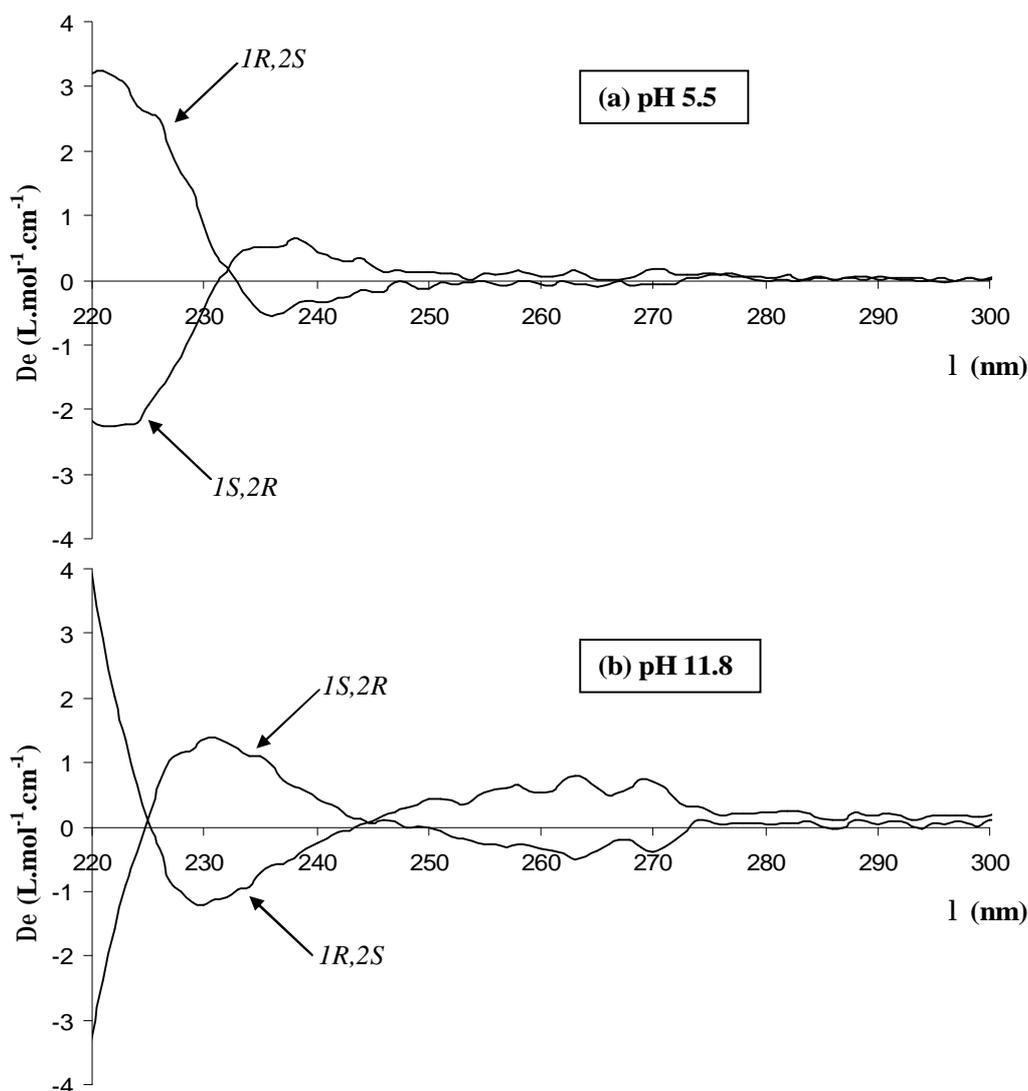
In order to evaluate the linearity of the g factor versus enantiomeric excess, eleven working solutions at different e.e. levels were prepared by mixing stock solutions of (*1S,2R*)- and (*1R,2S*)-enantiomers. Besides, enantiomer concentrations were adjusted in order to maintain the total concentration of analyte equal to 200 mg.L<sup>-1</sup> (C<sub>18</sub> support) or 400 mg.L<sup>-1</sup> (PGC support), respectively. When the calibration curve of the g factor was generated on a more restricted e.e. range, the concentration of the main enantiomer was fixed at 200 or 400 mg.L<sup>-1</sup> depending on the method selected.

#### **c) Results and discussion**

##### **a) Selection of CD wavelength detection**

Milnacipran is a basic drug (pK<sub>a</sub> = 9.65) and its dichroic signal depends on the ionization degree of the molecule [59-61]. Hence, the influence of pH on the dichroic response of milnacipran enantiomers has been investigated. CD spectra have been recorded at two pH values (*Figure II.16*); the first one (pH 5.5 < pK<sub>a</sub>-2) allowed the total ionization of the analyte whereas the second one (pH 11.8 > pK<sub>a</sub>+2) led to its unionized form. For the (*1S,2R*)-enantiomer, under acidic conditions (pH 5.5), the dichroic response was optimum

at 222 nm ( $\Delta\epsilon = -2.25 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) whereas in alkaline conditions (pH 11.8), the best response was obtained at 230 nm ( $\Delta\epsilon = 1.39 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).



**Figure II.16:** Influence of pH on CD spectra of the two milnacipran enantiomers recorded with a J-810 spectropolarimeter.

(a) acidic medium:  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-KOH}$  (pH 5.5, ionic strength: 59 mM)

(b) alkaline medium:  $\text{H}_3\text{PO}_4\text{-NaOH}$  (pH 11.8, ionic strength: 20 mM)

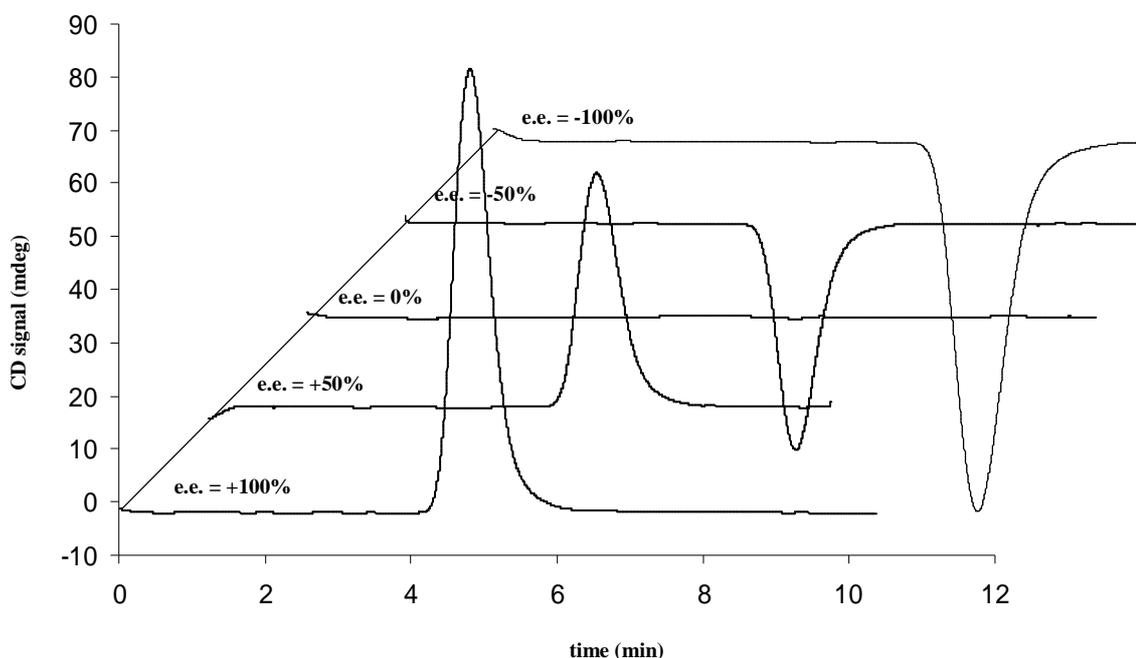
Stereoisomer concentration :  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Consequently, two chromatographic methods have been developed.

In the first one, milnacipran enantiomers have been analyzed on a Zorbax Extend  $\text{C}_{18}$  silica column with a mobile phase composed of  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-KOH}$  buffer (pH 5.5, ionic

strength: 59 mM)/MeOH (60:40, v/v). UV and CD detections were performed at 222 nm. The retention times of two enantiomers were identical (8.06 min).

In the second chromatographic system, all injections were done on a PGC (porous graphitic carbon) column and the mobile phase was the  $\text{H}_3\text{PO}_4$ -NaOH buffer (pH 11.8, ionic strength: 20 mM) / MeOH (50:50, v/v) mixture. PGC support was selected due to its robustness at extreme alkaline conditions of mobile phase. UV and CD detections were performed at 230 nm. In these conditions, the enantiomers were eluted in a shorter run time (4.76 min), as shown in *figure II.17*.



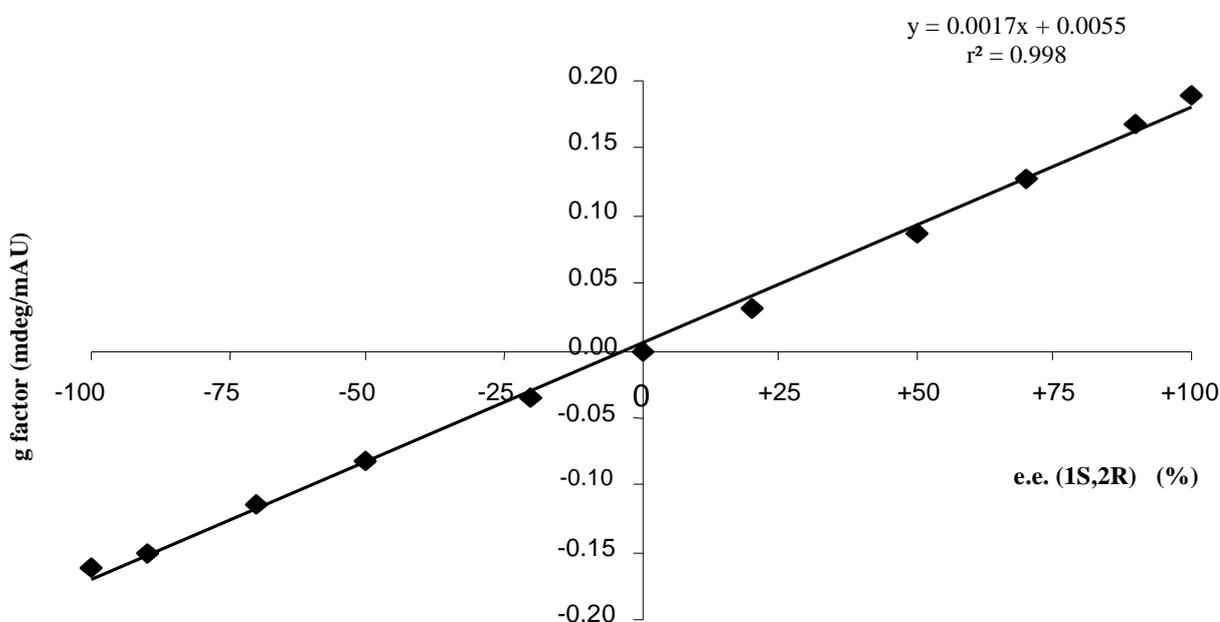
**Figure II.17:** CD chromatograms of milnacipran on porous graphitic carbon-based column at different enantiomeric excess values of the (1*S*,2*R*)-enantiomer.

Column: PGC (30 x 2.1 mm; 5 $\mu$ m); mobile phase: MeOH /  $\text{H}_3\text{PO}_4$ -NaOH (pH 11.8, ionic strength: 20 mM) 50 / 50 (v/v); column temperature: 30°C; injection volume: 5  $\mu$ L; flow rate: 0.2 mL.min<sup>-1</sup>; UV and CD detections: 230 nm; LINK on CD signal, cut-off frequency: 20 mHz; [milnacipran] = 400 mg.L<sup>-1</sup>.

### b) Influence of temperature on g factor calibration curve

As reported previously [58], working at a high wavelength value induces weaker noise on the CD detection. The influence of any fluctuation of temperature on g factor linearity was investigated on PGC support at pH 11.8. In these conditions, enantiomers were eluted in 5 min. Experimentally, the CD detector was heated during the night in order to remove any problem of lamp-preheating [37].

As expected, CD signal was proportional to the enantiomeric excess and no peak was recorded if a racemic sample was injected (*Figure II.17*). The linearity of g-factor versus enantiomeric excess was assessed in the  $-100 - +100\%$  (*Figure II.18*) then  $+68 - +100\%$  (*1S,2R*)-enantiomer e.e. range.

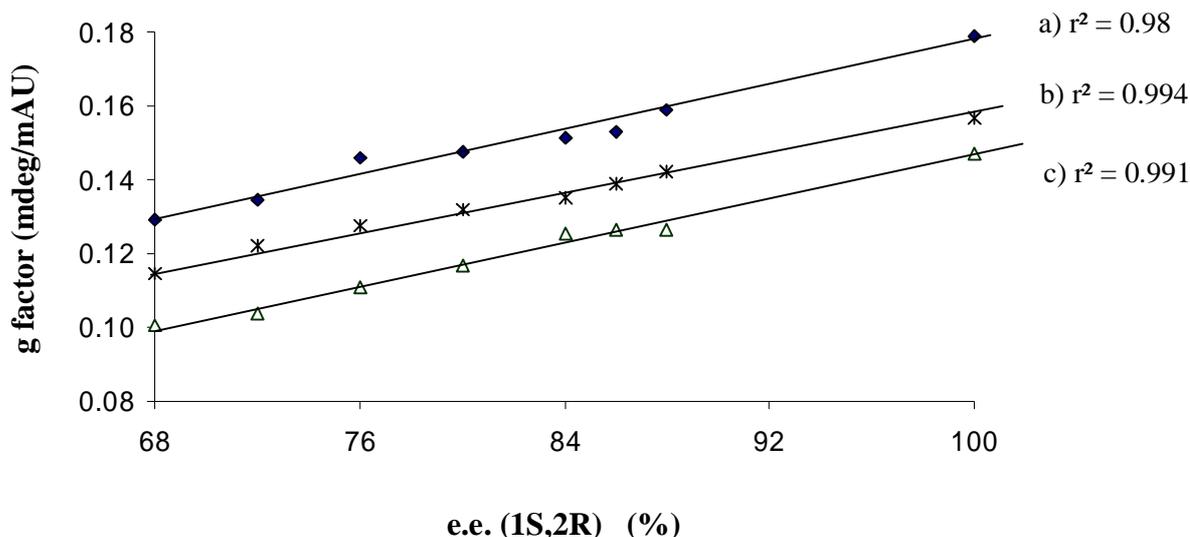


**Figure II.18:** Linearity of the anisotropy factor versus the enantiomeric excess of the (*1S,2R*)-milnacipran.

Experimental conditions: same as Fig. II.17.

Experiments were performed at several ambient uncontrolled temperatures (22, 24 and 27°C). The experimental values of g factor were determined and the linear trend of the calibration curves are reported in *Figure II.19*. A slight increase in temperature induces a decrease in the absolute value of CD signal ( $\Delta\epsilon$ ) and g factor (0.1792 at 22°C and 0.1468 at

27°C). However, experimental calibration curves were not linear due to a non-uniform temperature during the whole day required for these experiments.



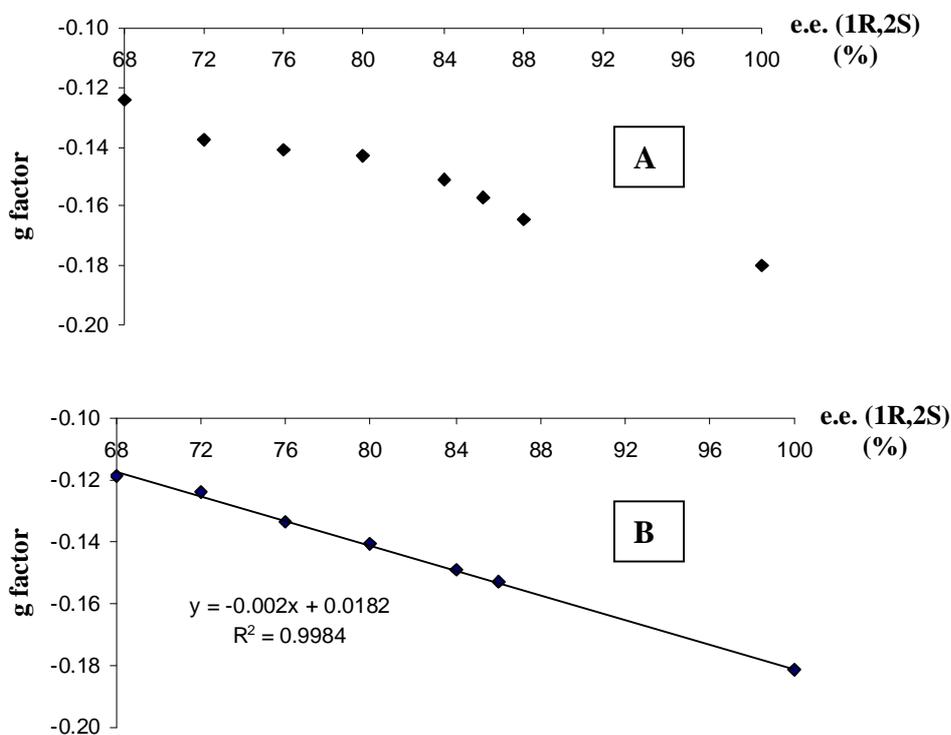
**Figure II.19:** Temperature-dependence of g factor responses versus enantiomeric excess of the (1S,2R)-milnacipran .

Column: PGC (30 x 2.1 mm; 5 $\mu$ m); mobile phase: MeOH / H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH (pH 11.8, ionic strength: 20 mM) 50 / 50 (v/v); column temperature: 30°C; injection volume: 5 $\mu$ L; flow rate: 0.2 mL.min<sup>-1</sup>; UV and CD detections: 230 nm; LINK on CD signal, cut-off frequency: 20 mHz. Mean temperature: a) 22°C; b) 24°C; c) 27°C.

Figure II.20 compares the shapes of g factor versus (1R,2S)-enantiomer e.e. calibration curves obtained with or without temperature regulation. When the CD instrument was maintained at a constant temperature (22°C) during the analysis (air-conditioning laboratory), the calibration curve was linear throughout the studied e.e. range with a good coefficient of determination ( $r^2 = 0.998$ ). The experimental plot equation was:  $y = -0.002x + 0.018$ , where y represents g factor and x (1R,2S)-enantiomer e.e.

The same study was carried out for (1S,2R)-enantiomer in the 68 – 100 % e.e. range. Least square regression also yielded a good correlation coefficient (0.991) with the following linear regression equation  $y = 0.002x - 0.011$ .

As expected, much more precise and reliable data are obtained at controlled temperature. The temperature can easily be controlled in an air-conditioning laboratory or a lab-made temperature controlled box around the detector.



**Figure II.20:** Influence of temperature control on the linearity of g-factor curve versus the enantiomeric excess of the (1R,2S)-enantiomer.

A: uncontrolled temperature (mean temperature: 22°C).

B: controlled-temperature (22°C).

Chromatographic conditions: see Fig. II.19.

To assess the repeatability of g factor, five samples of (1R,2S)- and (2R,1S)-enantiomers of different enantiomeric excess (+100; +90; 0; -90; -100%) were injected six times and R.S.D. % values were calculated. Data of repeatability and confidence interval given in *table II.6* show that each couple of calibration points (+90, +100; -90, -100 % e.e.) were statistically different. Nevertheless, it appears difficult to differentiate and quantify with sufficient accuracy enantiomeric excess values ranging between +90 and +100 % e.e. with the CD detector. The repeatability of g-factor corresponding to a racemic sample is worst than the other e.e. values due to the disturbance caused by the noise.

**Table II.6: Repeatability of g factor at five enantiomeric excess levels of the (1S, 2R) enantiomer.**

(1S,2R) e.e. (%)	g factor	C.V.(%)	confidence interval
+ 100	-0.0966	4.5	[-0.1008; -0.0924]
+ 90	-0.0798	9.4	[-0.0875; -0.0721]
0	0.0002	12.2	[-0.0022; 0.0026]
- 90	+0.0709	8.5	[ 0.0649; 0.0769]
- 100	+0.1004	6.3	[ 0.0941; 0.1067]

Confidence intervals were determined at a level of confidence of 95% (Student t-test = 2.447).

### c) Comparison of two methods developed on C<sub>18</sub> and PGC chromatographic supports

Porous graphitic carbon (PGC) consists of a robust homogeneous surface that has fewer chromatographic active sites and is convenient for chromatography of related and basic compounds [62]. It has the advantage of extreme pH [63] and high temperature [64] stability. Hence, PGC support was suitable to test the ability of CD detector to analyze milnacipran in alkaline pH conditions described in the experimental section.

The performances of two HPLC methods developed respectively on a C<sub>18</sub> support in acidic medium conditions and on a porous graphitic carbon-based sorbent in alkaline conditions have been compared in terms of linearity range, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ). As shown in a previous study [58], the raw CD signal was treated by a fourth order low-pass electronic noise filter and the cut-off frequency was set at 20 mHz in order to improve the sensitivity detection. Experimental results (*Table II.7*) obtained by using PGC sorbent were better than those obtained with C<sub>18</sub> silica column. The linearity range of the CD signal was wider (12.38 – 400 mg.L<sup>-1</sup> instead of 25-250 mg.L<sup>-1</sup>). According to circular dichroism spectra recorded at pH 11.8, the maximum of sensitivity was obtained at 230 nm. Although the difference of ellipticity is lower at pH 11.8 (230 nm) compared to pH 5.5 (222 nm), the sensitivity was better at pH 11.8 due to a better signal-to-noise ratio. Moreover, the retention time of milnacipran was shorter on PGC (4.76 min instead of 8.06 min) as a result peak shape was improved. The limit of quantification, related to the (1S,2R)- enantiomeric excess (e.e), was better (88% instead of 82 %). Finally, the enantiomeric purity (e.p) of milnacipran can be determined by non-chiral HPLC-CD on a porous graphitic column (*Table II.7*).

**Table II.7: Comparison of quantitative performances of investigated HPLC/CD-UV methods.**

Column	Mobile phase composition	LINK*	pH	t <sub>r</sub> (min)	l (nm)	Linearity range of CD signal (mg.L <sup>-1</sup> )	LOD <sup>1</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	LOQ <sup>1</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	LOQ (% e.e. <sup>2</sup> )	LOQ (% e.p. <sup>2</sup> )
Zorbax Extend C <sub>18</sub>	MeOH / KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -KOH 40 / 60	no	5.5	8.06	222	50.24 - 250	15.07	50.24	66	83
Zorbax Extend C <sub>18</sub>	MeOH / KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -KOH 40 / 60	yes	5.5	8.06	222	25.01 - 250	5.77	19.23	82	91
PGC Hypercarb	MeOH / (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /NaOH) 50 / 50	yes	11.8	4.76	230	12.38 - 400	3.71	12.38	88	94

\* LINK: low-pass electronic noise filter on CD signal (cut-off frequency: 20 mHz).

<sup>1</sup> expressed for each enantiomer.

<sup>2</sup> of the (1S,2R) enantiomer .

#### *d) Concluding remarks*

The chemical purity and the enantiomeric composition of a drug can be simultaneously determined with the help of the unique UV-circular dichroism detector in HPLC. However, the circular dichroism detector is sensitive to any temperature fluctuation and a temperature-controlled CD detector is required to generate a linear calibration curve of g factor versus enantiomeric excess. In this study, the weak CD response of milnacipran gave a limit of quantification of 94% (in terms of enantiomeric purity) by using a porous graphitic carbon-based HPLC column and a circular dichroism detector. This result is however inferior to that obtained by HPLC-UV with a chiral column (99.9%). This non-chiral HPLC method with circular dichroism is useful to control the enantiomeric composition of a racemic sample, but further improvements concerning the stability and sensitivity of the CD signal need to be undertaken in the near future to transfer the determination of enantiomeric purity of pharmaceutical drugs from chiral HPLC-UV to non chiral HPLC-CD.

#### **Acknowledgments**

The authors thank J.C. Maurizot (Centre de Biophysique Moléculaire, Orléans, France) for his valuable assistance in the circular dichroism technique.

### **III.1.6. Conclusion sur l'analyse du milnacipran en CPL achirale – DC/UV**

La détermination du rapport énantiomérique du milnacipran a été effectuée en CPL non énantiosélective couplée à un détecteur à dichroïsme circulaire (DC-UV). Les énantiomères du milnacipran ont été analysés sur deux supports chromatographiques en silice greffée C<sub>18</sub> ou en carbone graphite poreux. Les résultats les plus intéressants ont été obtenus sur ce dernier support en utilisant une phase mobile constituée d'un mélange MeOH / tampon H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH (pH 11,8) (50 : 50 v/v). Les énantiomères sont alors élués en moins de 5 min.

Cette étude a révélé que le pH du milieu de solubilisation du milnacipran modifie l'allure des spectres dichroïques de ses énantiomères. Cette méthode a permis aussi de vérifier la linéarité ( $r^2 = 0,998$ ) entre le facteur d'anisotropie et l'excès énantiomérique. Enfin, la température de la cellule du détecteur a dû être contrôlée afin d'obtenir des résultats quantitatifs et reproductibles. Toutefois, malgré le contrôle pointilleux de ces paramètres, ce mode de détection souffre d'un problème de sensibilité, puisque la limite de quantification de l'impureté énantiomérique de l'efaroxan est seulement de 6 %.

Afin d'évaluer l'influence de la nature des groupements chromophores de l'analyte chiral sur la sensibilité de la réponse dichroïque, nous avons décidé d'appliquer la même stratégie d'analyse sur la molécule d'efaroxan. Celle-ci est constituée de deux groupements chromophores : un noyau benzénique et une fonction imidazoline. Les expérimentations seront réalisées en contrôlant la température de la cellule de détection afin d'obtenir des résultats justes et précis. La maîtrise de ce paramètre devrait permettre de valider cette méthode basée sur l'analyse d'une molécule chirale en chromatographie liquide non énantiosélective et la double détection par spectrométrie UV et par dichroïsme circulaire.

**III.2. Article 3: Validation of a method using an achiral liquid chromatography sorbent and a circular dichroism detector. Analysis of the efaroxan enantiomers**

**Journal of Chromatography A 1141 (2007) 244-251**

Marie Lorin<sup>a</sup>, Raphaël Delépée<sup>a</sup>, Jean-Paul Ribet<sup>b</sup>, Philippe Morin<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), CNRS FR 2708, UMR 6005, Université d'Orléans, B.P. 6759, 45067 Orléans cedex 2, France*

<sup>b</sup> *Département de Chimie Analytique, Institut de Recherche Pierre Fabre, 17 avenue Jean Moulin, 81106 Castres, France*

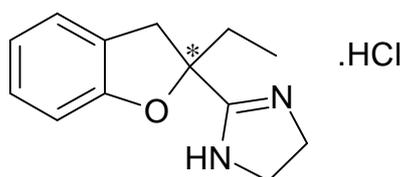
**Abstract**

The known HPLC method using an achiral C<sub>8</sub> silica sorbent and a circular dichroism (CD) detector for the determination of efaroxan enantiomeric excess has been validated. After optimization of the mobile phase, the enantiomers were detected at 278 nm offering maximum ellipticity between two optically active forms. The calibration curve of the anisotropy factor (g) versus the enantiomeric excess was linear with a correlation coefficient (r<sup>2</sup>) of 0.9985. The accuracy of the method was assessed by comparing the enantiomeric excess obtained by measuring the g factor (C<sub>8</sub> column, CD and UV detections) with those determined by enantioselective HPLC (Chiralpak AD-H column, UV detection). Statistical tests (level of confidence of 95%) were assessed to compare the two orthogonal methods. The straight line gave a correlation coefficient of 0.9995, an intercept not significantly different from zero (0.0549) and a slope of 1.026. The precision evaluated on retention time (RSD < 0.6%), g factor (RSD < 8.3%) and CD peak area (RSD < 7.5%) was suitable both in term of intra- and inter-day precisions. The proposed method has the advantages of being fast and precise without using expensive chiral column. Non enantioselective HPLC-CD was suitable for the simultaneous determination of the optical and chemical purity of efaroxan.

**Keywords:** Circular dichroism (CD); Anisotropy factor (g factor); Enantiomeric excess (e.e.); HPLC; C<sub>8</sub> silica column; efaroxan; non enantioselective HPLC-CD.

### III.2.1. Introduction

Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder affecting 1% of the population above the age of 65 years [65]. It is characterized by a loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra. The main treatment for Parkinson's disease is the administration of levodopa or dopamine agonists. However, the chronic administration of such molecules induces serious side effects such as nausea, vomiting and postural hypotension [66]. In a few cases, psychiatric disturbances have even been observed [67]. The many side effects with long-term levodopa therapy have led to a search for new antiparkinsonian drugs. To this end, a novel and highly potent selective  $\alpha_2$ -adrenoreceptor antagonist, efaroxan, or 2-[2-ethyl-2,3-dihydro-benzofuran-2-yl]-4,5-dihydro-1*H*-imidazole hydrochloride (*Figure II.21*), has been developed at the Centre de Recherche Pierre Fabre (Castres, France) [17,68,69]. This molecule is a chiral drug and only the (*R*)-(+)-form is active. As the (*S*)-(-)-enantiomer is considered as an impurity, the determination of enantiomeric excess (e.e.) is required at extreme values (98-99.8%).



pKa = 9.48

**Figure II.21:** Chemical structure and pKa value of efaroxan.

Generally, the determination of enantiomeric excess (e.e.) of chiral compounds is performed by liquid chromatography on chiral stationary phase such as cellulose [70], amylose [71], protein [72], Pirkle-type [73] or cyclodextrin derivatives [74] using common UV detection. However, such columns are expensive, and samples require a pre-treatment before the HPLC run in order to eliminate sample matrix (biofluids, foods). In capillary electrophoresis, the resolution of efaroxan enantiomers has already been achieved using cyclodextrins as chiral selectors but no quantitative study has so far been reported [10].

An alternative approach consists in the use of an achiral stationary phase coupled with a circular dichroism detector. This detector is specific for optically active compounds. The principle is based on the difference of absorbance between left and right circularly

polarized lights for two enantiomers [21,22]. The CD detector records simultaneously both dichroic signal ( $\Delta\epsilon$ ) and absorbance ( $\epsilon$ ), and also, measures the ratio of these two signals to calculate the anisotropy factor (g factor =  $\Delta\epsilon/\epsilon$ ). The g factor was found to be proportional to the enantiomeric excess but independent of concentration [25]. Bertucci [36] and some other authors [37,38,75] have already proved that this detector, coupled with an achiral stationary phase was suitable to determine 99.8-98% enantiomeric excess (e.e.) values (0.1-2% enantiomeric purity). Nevertheless, no method has yet been fully validated.

In this article, we report the development of the HPLC determination of efaroxan enantiomeric excess by using a C<sub>8</sub> silica column and a circular dichroism detector. The method was fully validated according to the ICH recommendations namely linearity, limits of detection and quantification, precision and accuracy.

### **III.2.2. Experimental**

#### *a) Equipment*

Experiments were carried out on an Agilent HP 1100 series chromatographic system (Waldbronn, Germany) equipped with a binary pump, a variable volume autosampler programmed to inject 20  $\mu$ L, a column oven and a diode-array detector. Simultaneous UV and CD detections were achieved on a Jasco CD-2095 circular dichroism detector (Tokyo, Japan). The CD detector is composed of an Hg-Xe lamp and a 44  $\mu$ L flow cell with a 25 mm path-length. The chromatographic system was controlled with Chemstation software version A.08.03 (Agilent). Data were collected and analyzed using EZchrom Elite<sup>TM</sup> software version 2.5 (Scientific Software, Pleasanton, CA, USA).

UV spectra were acquired from 220 to 340 nm with a double beam Cary 100 spectrometer (Varian, les Ulis, France). Spectra were recorded at room temperature in a 10 mm path-length quartz cell. The spectrum was obtained at a scanning speed of 600 nm.min<sup>-1</sup> after blank subtraction. Racemic mixtures were dissolved in potassium hydrogenophosphate-potassium hydroxide buffer (pH 5.5, ionic strength: 64 mM) / acetonitrile (75:25 v/v) or in phosphoric acid-sodium hydroxide buffer (pH 11.5, ionic

strength: 20 mM) / MeOH (25:75 v/v) to give two working solutions at  $9 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $35.6 \mu\text{M}$ ).

CD spectra of the two enantiomers were acquired at  $25^\circ\text{C}$  in the 200 - 340 nm range with a Jasco J-810 dichroism spectrometer using a 1 mm path-length quartz cell. Pure enantiomers were dissolved in the same medium as described previously to obtain four working solutions ( $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  *i.e.* 0.79 mM). Each spectrum was collected with a scanning speed of  $50 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ . Four scans were averaged and blank-subtracted to obtain the CD spectrum.

### *b) Chromatographic conditions*

#### • *Enantioselective HPLC*

Following the method previously developed by the Centre de Recherche Pierre Fabre, efaroxan enantiomers were separated under isocratic conditions on Chiralpak AD-H (amylose tris 3,5-dimethylphenylcarbamate) stationary phase (250 mm x 4.6 mm I.D., particle size  $5 \mu\text{m}$ ), preceded by a guard column (10 mm x 4 mm I.D., same chiral stationary phase as column) purchased from Daicel (Illkirch, France). The mobile phase, composed of n-hexane/ethanol/diethylamine (90:10:0.05 v/v/v), was delivered at a flow rate of  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . The analyses were performed at  $30^\circ\text{C}$ ; the UV signal was detected on an Agilent diode array detection (DAD) 1100 system at 228 nm. The unretained peak time ( $t_0$ ) of the system was estimated by injection of n-hexane. The enantioseparation of efaroxan enantiomers on Chiralpak AD-H column has been previously achieved by Lorin et al in our laboratory [58].

#### • *Non enantioselective HPLC*

In this alternative method, the analyses were performed using a Zorbax Eclipse XDB C<sub>8</sub> column (150 mm x 4.6 mm I.D., particle size  $5 \mu\text{m}$ ) purchased from Agilent. The mobile phase was a mixture of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -KOH buffer (pH 5.5, ionic strength: 64 mM)/acetonitrile (75:25, v/v), delivered at a flow rate of  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . The column temperature was set at  $30^\circ\text{C}$ . UV and CD detections were performed at 278 nm on a Jasco CD-2095 detector. The  $t_0$  of the system is the mean value of three successive injections of  $\text{NaNO}_3$  ( $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

### *c) Chemicals*

All solvents were of analytical grade. n-hexane, acetonitrile (ACN), ethanol and methanol were purchased from SDS (Peypin, France). Diethylamine, phosphoric acid (density of 1.71, 85% w/v) and potassium hydrogenophosphate were obtained from Fluka (Saint-Quentin-Fallavier, France), sodium hydroxide (density of 1.33, 30% w/v) from Fisher Scientific Labosi (Overpelt, Belgium). For the preparation of buffer, ultrapure water (resistance < 18 M $\Omega$ ) was provided by an Elgastat UHQ II apparatus (Elga, Antony, France). Several years ago, the two enantiomers (e.e. > 99.8%) and the racemic mixture of efaroxan were synthesised and purified at the Centre de Recherche Pierre Fabre for physicochemical and pharmacological studies and have been used in this work [17,68,69]. The (*R*)-(+)-enantiomer is the active form. For each enantiomer, the sign of optical rotation was determined by polarimetry. Phosphoric acid-sodium hydroxide buffer was prepared at pH 11.5 and fixed ionic strength (20 mM) with the help of Phoebus software (Analis, Namur, Belgium).

#### *d) Standards and working solutions*

Stock solutions of pure enantiomers were prepared in methanol (2 mg mL<sup>-1</sup>) and diluted to give two solutions at 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. To assess the linearity of ellipticity versus the enantiomer concentration, standard working solutions were then obtained by appropriate dilution in the mobile phase to give the following concentration range: 5 - 500  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. In order to evaluate the linearity of the *g* factor versus the enantiomeric excess, eleven working solutions with different e.e. levels were prepared by mixing stock solutions of (*R*)- and (*S*)-enantiomers at appropriate concentration ratios. Likewise, the same procedure was followed to prepare standard solutions analyzed on chiral column except for the dilution solvent (n-hexane/ethanol 90:10 v/v).

#### *e) Validation procedure*

- *Linearity*

To investigate the linearity of the CD detector, calibration curves were plotted as peak area versus concentration of each enantiomer. The tested concentrations were 5, 100, 200, 300, 400 and 500  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Linearity of the calibration curves was estimated by plotting the *g* factor versus the enantiomeric excess in the -100% - +100% e.e. range.

Eutomer and distomer concentrations were adjusted in order to keep the concentration of efaroxan constant at  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ . The linearity was assessed with a series of eleven e.e. levels: +100, +99, +80, +50, +25, 0, -25, -50, -80, -99, -100%. Three independent series were carried out over three consecutive days. The correlation coefficient ( $r^2$ ) was calculated in order to prove the linearity of the calibration curves. Statistical tests were performed at a level of confidence of 95% ( $p=0.05$ ). The  $F_1$  Fischer's test [76] was carried out to compare the three independent calibration curves, to check the linearity regression model and the significant slope. The  $F_2$  Fischer's test [76] was performed to compare adjustment errors and experimental errors. The Cochran test was used to test the statistically significant differences between each calibration point.

- *Limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ)*

The LOD and LOQ were considered to be the concentrations that produced a signal-to-noise ratio of 3 and 10, respectively. They were determined from the linear regression (CD peak area versus the enantiomeric concentration) by extrapolation of the signal-to-noise ratio as a function of the concentration.

- *Precision*

To evaluate the intra-day precision, four quality control samples at medium (+80% and -80%) and high (+98% and -98%) enantiomeric excess values were injected six times in the same day. The inter-day precision was determined by analyzing the same control samples in triplicate in three consecutive days. The relative standard deviation (% RSD) was calculated.

- *Accuracy*

The accuracy of the method was determined by comparing e.e. values obtained thanks to the measure of the  $g$  factor by the alternative method (achiral stationary phase, CD detection) with those obtained by the classical method (enantioselective stationary phase, UV detection). To evaluate these two methods, statistical tests were performed at a confidence level of 95% ( $p = 0.05$ ). The Student's t-test [76] was applied to prove that the slope was not significantly different from unity and the intercept not different from zero.

*f) Calculations and definitions*

The retention factor ( $k = \frac{(tr - to)}{to}$ ) and the number of theoretical plates ( $N = 16 \left( \frac{tr}{w} \right)^2$ ) were calculated according to the United States Pharmacopeia (USP) method via EZchrom Elite™ software (version 2.5), where  $t_r$  is the retention time,  $t_o$  the unretained peak time and  $w$  the peak width at baseline of eluting solute.

The enantiomeric excess (e.e.) is related to the excess of one enantiomer compared to the other and is determined as follows [77]:

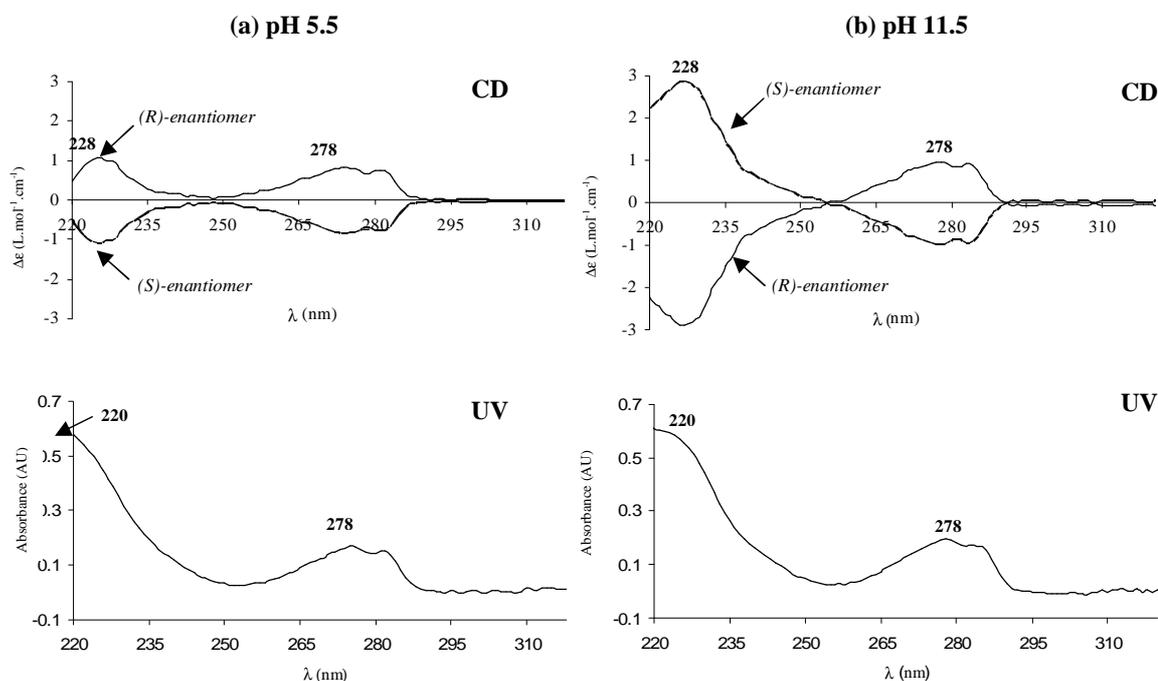
$$e.e._R(\%) = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} \times 100 \quad (\text{II.4})$$

where [R] and [S] are the concentrations of the (*S*)- and (*R*)-enantiomers, respectively.

### **III.2.3. Results and discussion**

*a) Selection of CD monitoring wavelength*

Efaroxan is a basic drug with a pKa value of 9.48. The molar absorption coefficient ( $\epsilon$ ) and the molar coefficient of dichroic absorption ( $\Delta\epsilon$ ) were determined at two pH values (5.5 and 11.5) in order to know the  $g$  factor values for the neutral and positively charged forms of the molecule. CD and UV spectra of the enantiomers are shown in *Figure II.22*. As expected, the two enantiomers have identical UV spectra whatever the pH. At the opposite, CD spectra of two efaroxan enantiomers have the same magnitude but with opposite sign.



**Figure II.22:** CD and UV spectra of efroxan enantiomers (**R**: eutomer; **S**: distomer).

(a) acidic medium: ACN /  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -KOH (pH 5.5, ionic strength: 64 mM) - 25:75 (v/v).

(b) alkaline medium: MeOH/  $\text{H}_3\text{PO}_4$ -NaOH (pH 11.5, ionic strength: 20 mM) - 75:25 (v/v).

At pH 5.5, the CD spectrum of each enantiomer featured two intense bands at 228 nm ( $\Delta\epsilon = 1.06 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) and 278 nm ( $\Delta\epsilon = 0.83 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). As UV absorbance of efroxan was higher at 228 nm than at 278 nm, g factor was highest at 278 nm (for *R*-form,  $g = 9.9 \times 10^{-5}$  at 228 nm and  $19.7 \times 10^{-5}$  at 278 nm).

At pH 11.5, the 228 nm CD-band was reversed but of higher intensity. Indeed, the CD spectrum of an optically active compound is pH-dependent when the chiral center bears an ionizable chromophore group [59,60]. In alkaline medium, the imidazoline group was under neutral form and the  $n \rightarrow \pi^*$  electronic transition gave a more intense absorption band. At 228 nm and 278 nm, CD and UV signals increased with the same intensity inducing no improvement of the g factor value between pH 11.5 and pH 5.5 (Table II.8).

**Table II.8: pH-dependence of UV and CD spectra of efarofoxan.**

Efaroxan	Solvent	pH	$\lambda$ (nm)	UV spectrum	CD spectrum	g ( $\times 10^5$ )
				e ( $\lambda$ ) * (L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )	De ( $\lambda$ ) ** (L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )	
(R)- enantiomer	A	5.5	228	10704	1.06	+9.9
			278	4216	0.83	19.7
	B	12	228	14345	-2.88	-20.1
			278	5498	0.94	+7.1
(S)- enantiomer	A	5.5	228	10704	-1.06	-9.9
			278	4216	-0.84	-19.9
	B	12	228	14345	2.86	+19.9
			278	5498	-0.96	-17.5

A: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-KOH (pH 5.5, 64 mM) / ACN (75:25 v/v)

B: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH (20 mM, pH 11.5) / MeOH (25:75 v/v)

\* efarofoxan concentration: 9  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

\*\* efarofoxan concentration of each enantiomer: 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

An alkaline medium is well-known to be more aggressive for HPLC column than an acidic one. Acetonitrile with KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-KOH buffer (pH 5.5, ionic strength: 64 mM) was therefore selected as the most suitable medium for the enantiomeric excess determination of efarofoxan by the alternative method. In this case, UV and CD signals were monitored at 278 nm.

#### *b) Optimization of chromatographic conditions*

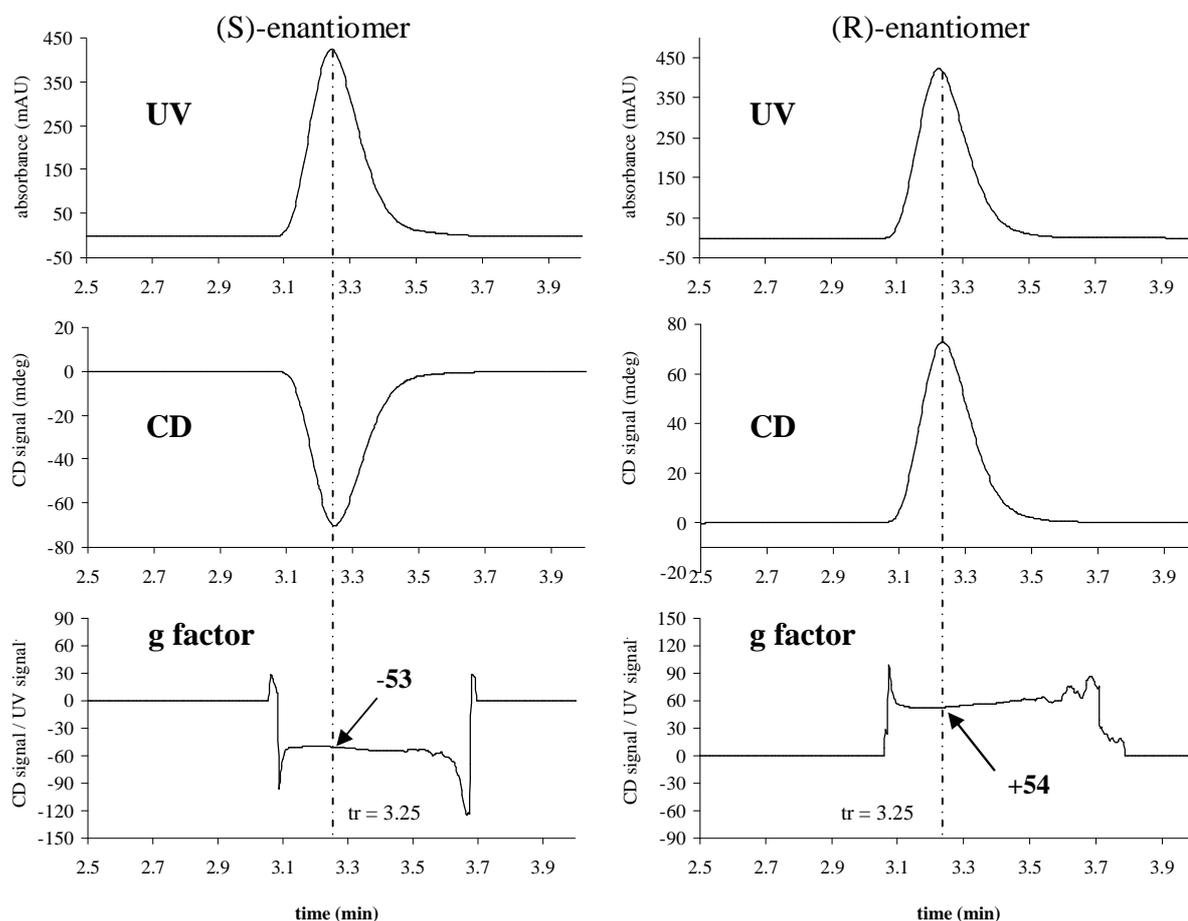
As expected on this hydrophobic support, an increase in organic modifier (ACN) content in the mobile phase induces shorter retention times and a better peak efficiency (Table II.9).

**Table II.9:** Effect of organic modifier content of mobile phase on the chromatographic parameters (retention factor:  $k'$ ; peak efficiency:  $N$ ) for the analysis of efaroxan on  $C_8$  silica column.

phosphate buffer / ACN (v/v)	$k'$	$N$
60 / 40	0.48	1326
70 / 30	0.96	1876
75 / 25	1.55	2510
80 / 20	2.87	3633

Column: Zorbax Eclipse XDB  $C_8$ ; mobile phase:  $KH_2PO_4$ -KOH (pH 5.5, 64 mM) / ACN (v/v); temperature: 30°C; flow rate: 1 mL min<sup>-1</sup>; injection volume: 20  $\mu$ L; UV and CD wavelengths: 278 nm; efaroxan concentration = 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>.  $t_0$ : 1.29 min was determined by injection of  $KNO_3$  at 220 nm.

The mobile phase composed of  $KH_2PO_4$ -KOH buffer (pH 5.5, 64 mM) / ACN (75:25 v/v) was selected for its good chromatographic performances (peak efficiency of 2510 theoretical plates, short run time: 4 min) and because no coelution occurred between the drug and its chemical impurities. *Figure II.23* shows UV- and CD-chromatograms and the  $g$ -curve when either (*R*)- or (*S*)-enantiomer was injected on the non enantioselective column. The  $g$  factor was determined at retention time of the analyte.



**Figure II.23:** UV, CD and g factor chromatograms obtained after injection of each efavoxan enantiomer.

Column: Zorbax Eclipse XDB C<sub>8</sub> (150 mm x 4.6 mm I.D., particle size 5  $\mu\text{m}$ ); mobile phase: ACN/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-KOH (pH 5.5, ionic strength: 64 mM) - 25:75 (v/v); detector wavelength : 278 nm; flow rate: 1 mL min<sup>-1</sup>; injection volume: 20  $\mu\text{L}$ ; temperature: 30°C; enantiomer concentration: 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

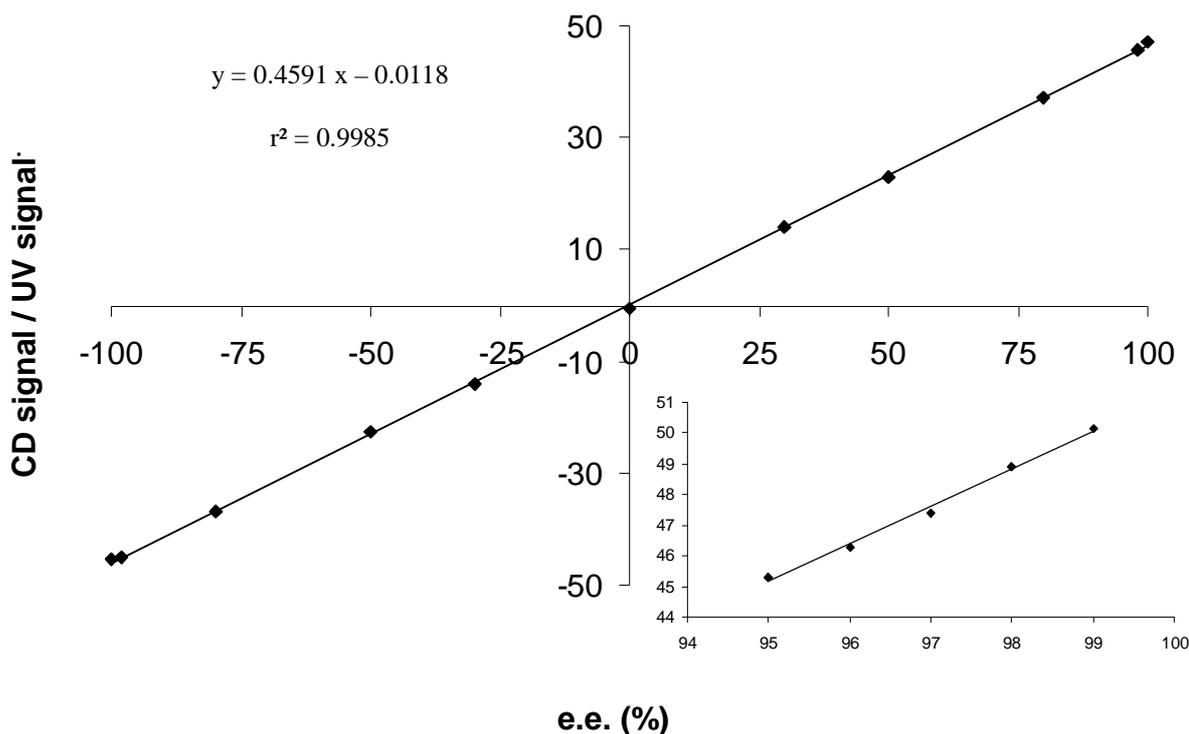
The CD signal/UV signal ratio was given by the software and must be multiplied by the numerical constant (330 000) to obtain the anisotropy factor.

### c) *Validation of the method*

A validation procedure was performed in order to check the performance of this alternative method (C<sub>8</sub> column HPLC-CD). Precision, accuracy, linearity, LOD and LOQ were determined according to the ICH criteria [78].

• *Linearity, LOD and LOQ*

The linearity of the g factor versus e.e. was determined from triplicate injections at different e.e. levels (11) distributed uniformly over the range from -100 up to +100% over three consecutive days (Figure II.24).



**Figure II.24:** Linearity of the anisotropy factor versus the enantiomeric excess of the (*R*)-efaroxan.

Experimental conditions: same as Figure II.16.

The regression was found to be linear all over the e.e. range. The experimental equation was:  $y = (0.459 \pm 0.003) x - (0.012 \pm 0.235)$ , where  $y$  is the g factor and  $x$  is the eutomer e.e.. Linearity was assessed by least squares regression and yielded good correlation coefficient ( $r^2 = 0.9985$ ). The experimental value of  $F_1$  Fisher's test (20,382) was higher than the theoretical value ( $F_{1th} = 5.57$ ), indicating that the slope of the regression line was significant. Since the obtained experimental value of  $F_2$  Fisher's test (1.53) was lower than the theoretical value ( $F_{2th} = 2.76$ ), method errors were not significant. The result of Cochran's test ( $C_{exp} = 0.18 < C_{th} = 0.42$ ) showed the homogeneity of variances all over the calibration range. The linear model was finally validated.

The LOQ of the method using the g factor depends on LOQs of UV and CD signals [24]. As CD detection is less sensitive than UV detection [39], the LOQ of the g factor

depends mainly on the LOQ of the CD signal. The CD signal was found to be linear in the 5-500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  concentration range and its LOQ was equal to 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Thus, the LOQ expressed in term of e.e. was equal to 98.0% (equivalent to an enantiomeric purity of 99%). All these results are reported in *Table II.10*.

**Table II.10: Results of linearity study.**

Validation parameters	Results
<b>Linearity (g factor)</b>	
Calibration range (%)	-100 / +100
Calibration points	11
Correlation coefficient	0.9985
Slope	0.4591
Intercept	-0.0118
<b>Statistical tests</b>	
Fisher test: $F_{1\text{exp}} = 20382$	Significant
Fisher test: $F_{2\text{exp}} = 1.53$	Not significant
Cochran test: $C_{\text{exp}} = 0.18$	Not significant

All statistical tests were performed at a level of confidence of 95% ( $p = 0.05\%$ ).

$F_{1\text{th}}(0.05; 1; 31) = 4.17$ ;  $F_{2\text{th}}(0.05; 9; 24) = 2.78$ ;  $C_{\text{th}} = 0.42$ .  $F_1$ -test and  $F_2$ -test were realized at  $N-2$  and  $N-k$  degrees of freedom, respectively, with  $N$ : number of experiments (33);  $k$ : number of calibration points (11).

LOQ values obtained with CD detection were higher than those obtained with UV one but they seemed to be in agreement with those presented in the literature. For example, LOQs (% e.e.) of  $\alpha$ -phenylglycine and benzoxathiepin derivatives reached only 98.36% [37] and 98.0% [27], respectively. Indeed, these two compounds have poor chiroptical properties (as those of efaroxan), unlike 3-methylcyclopentanone for which it was possible to determine enantiomeric excess up to 99.8 % by this achiral HPLC method [36].

• *Precision*

The intra-day and inter-day precisions of this method were evaluated at four e.e. levels (+98, +80, -80 and -98 %). Data are given in *Table II.11*.

**Table II.11: Results of (a) intra-day precision and (b) inter-day precision.**

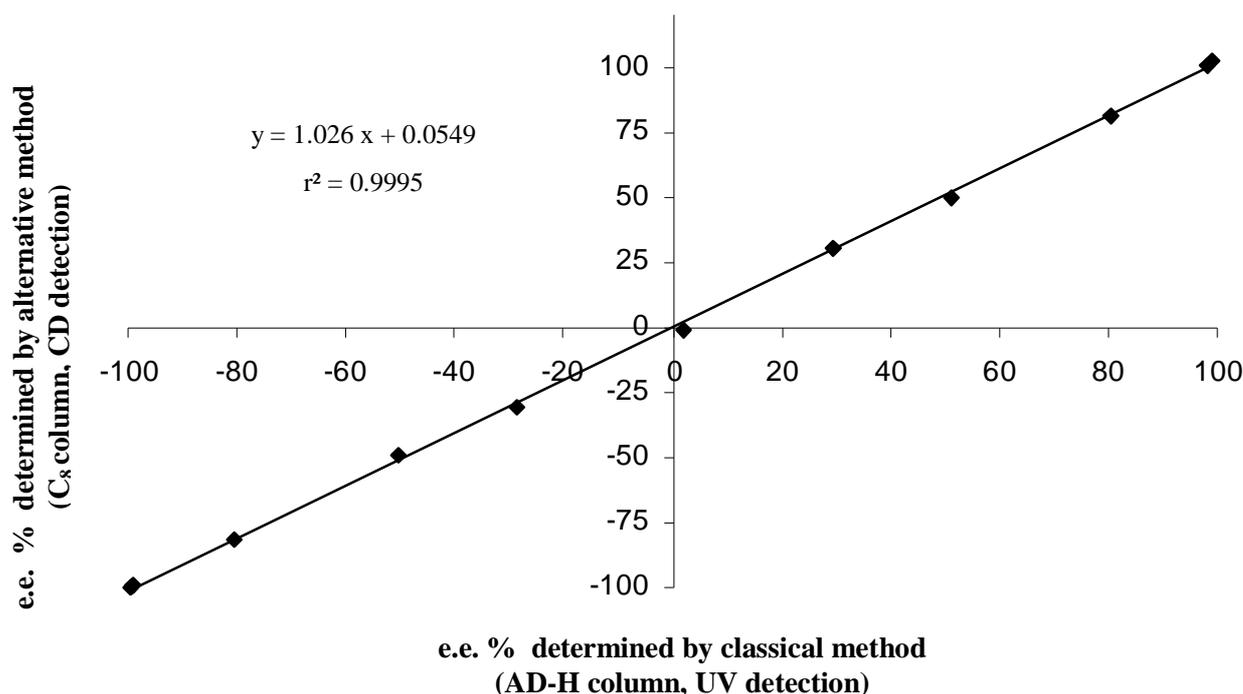
Eutomer e.e. (%)	RSD on retention time (%)	RSD on CD peak area (%)	RSD on UV peak area (%)	RSD on g factor (%)
(a) Intra-day precision				
+98	0.08	0.36	0.16	1.05
+80	0.11	0.56	0.31	0.91
- 80	0.14	-0.80	0.25	-0.49
- 98	0.07	-0.86	0.27	-1.00
(b) Inter-day precision				
+98	0.59	3.16	0.89	1.88
+80	0.42	5.00	0.42	1.70
- 80	0.24	-7.22	1.39	-3.38
- 98	0.21	-5.74	0.97	-3.51

Intra-day precisions were better than 0.15% for retention time, 1.10% for the g factor, 0.90% and 0.35% for CD and UV peak areas, respectively. These results are in agreement with the ICH guidelines in which the RSD values must be within  $\pm 4\%$  for the median point and  $\pm 15\%$  at the LOQ value.

For the inter-day precision, the RSD values of quality control samples were lower than 5.8% at +98% and -98% e.e. levels. Except for the RSD values on the CD peak area (7%), all other RSD values on the UV peak area and the g factor were within  $\pm 4\%$ . Whatever the e.e. values, the precision on the UV peak area is better than the CD one due to the greater sensitivity and smaller noise on the UV signal. However, the precision on the g factor was high enough to quantify samples with a low enantiomeric impurity concentration.

• *Accuracy*

The comparison of experimental e.e. values determined by orthogonal methods (chiral HPLC-UV and achiral HPLC-CD) correlated nicely (linear slope: 1.026, intercept: 0.0549) as shown in *Figure II.25*.



**Figure II.25:** Comparison of enantiomeric excess of (*R*)-efaroxan determined by classical enantioselective HPLC method and by alternative achiral HPLC method.

Least squares regression yielded a good correlation coefficient (0.9995). Student's test was applied and did not reveal any significant differences between experimental values obtained by the classical and the alternative methods. The experimental t-value ( $t_{\text{exp}} = 0.12$ ) was found to be less than the theoretical t-value ( $t_{\text{th}} = 2.04$ ) at a 95% level of confidence (*Table II.12*). It can be concluded that the use of a C<sub>8</sub> silica support with CD detection was suitable to estimate the e.e. of efaroxan with accuracy.

**Table II.12: Statistical parameters for accuracy study.**

Test	Theoretical value	Experimental value	Comment
Fisher test ( $F_1$ )	4.17	9797.43	Significant
Fisher test ( $F_2$ )	2.78	2.27	Not significant
Cochran test (C)	0.42	0.08	Not significant
Student's t-test			
- slope	2.04	0.12	Not significant
- intercept	2.04	0.21	Not significant

All statistical tests were performed at a level of confidence of 95% ( $p = 0.05\%$ ).

### **III.2.4. Concluding remarks**

The HPLC determination of efaroxan enantiomeric excess has been successfully performed by using a  $C_8$  silica column and a circular dichroism detector. This alternative method presents the advantages of being fast and precise and does not require the use of an expensive chiral column. Moreover, thanks to UV and CD detections, it was possible to simultaneously determine the optical and chemical purities of drugs. This last feature could be applied to study racemization and metabolization of the eutomer in biological fluids.

For the first time, this HPLC method - with achiral support and CD detection- has been fully validated according to the ICH criteria and can replace the classical HPLC approach – chiral support and UV detection.

Nevertheless, the LOQ in terms of e.e. was for the moment too high (98%) compared with results generally obtained with UV detection. Some technical improvements concerning the sensitivity and the linearity of the CD detector are required in the near future to achieve quantification of e.e. up to 99.8% level.

### **Acknowledgments**

The authors wish to thank Mr. Maurizot (Centre de Biophysique Moléculaire, Orléans, France) for the recording of circular dichroism spectra.

### **III.2.5. Conclusion sur l'analyse de l'efaroxan en CPL achirale – DC/UV**

L'analyse des énantiomères de l'efaroxan a été réalisée en CPL/DC-UV sur une colonne de silice greffée C<sub>8</sub> en mode isocratique. Les énantiomères sont élués en 3,3 min avec une phase mobile constituée d'un mélange ACN/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-KOH (pH 5,5, I : 64 mM) - 25:75 (v/v). La méthode a été validée avec une précision inférieure à 4 % sur les valeurs du facteur g. Puis, la justesse de la méthode a été évaluée lors d'une validation croisée. La bonne corrélation (pente = 1,026 ; ordonnée à l'origine = 0,0549 ; r<sup>2</sup> = 0,9995) entre les excès énantiomériques obtenus par la méthode alternative (CPL achirale – DC/UV) et la méthode de référence (CPL chirale – UV) a démontré la justesse de la méthode. La limite de quantification du distomère est de 1% en terme d'impureté énantiomérique.

### **III.3. Bilan sur l'intérêt du détecteur à dichroïsme circulaire en CPL non énantiosélective pour la détermination de la pureté énantiomérique de principes actifs**

Une méthode chromatographique non énantiosélective (C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub> ou PGC) couplée à la détection par dichroïsme circulaire / UV a été développée pour déterminer la pureté optique de deux principes actifs pharmaceutiques (efaroxan et milnacipran). L'optimisation de cette méthode a révélé que la composition de la phase mobile et la longueur d'onde d'analyse sont deux paramètres qui influent sur la sensibilité de détection. De plus, la régulation de la température de la cellule du détecteur UV/DC est un facteur clé pour l'obtention de résultats justes et précis.

Malgré un manque de sensibilité de ce mode de détection (LOQ = 1 – 6 % en terme de quantification de l'impureté énantiomérique et selon la molécule étudiée), cette méthode présente l'avantage essentiel de s'affranchir de l'utilisation d'une colonne chirale. Ainsi, le développement analytique est plus facile et rapide, et les conditions chromatographiques sont plus simples.

## **IV. Détermination simultanée de la pureté énantiomérique et de la pureté chimique d'un dérivé benzoxathiépine en CPL non énantiosélective en utilisant un détecteur à dichroïsme circulaire**

### **IV.1. Les maladies coronariennes et leurs traitements**

L'insuffisance coronarienne qui englobe différentes pathologies (*i.e* angor, infarctus du myocarde...) se manifeste par un manque d'oxygénation du cœur. Avec l'âge, l'accumulation lipidique (plaques d'athérome) sur la paroi interne des artères rétrécit progressivement leur calibre. Lorsque la consommation en oxygène augmente, notamment lors d'un effort physique, le débit sanguin n'est pas suffisamment élevé pour alimenter le cœur. Dès lors, l'angor se caractérise par une douleur thoracique de brève durée et qui disparaît dès l'arrêt de l'effort qui l'a déclenchée. Une douleur de même nature que l'angor mais plus intense, plus diffuse et d'une durée supérieure à 15 minutes laisse présager un infarctus du myocarde. Dans les pays industrialisés où la population est de plus en plus sédentarisée et/ou en surpoids, les maladies cardiovasculaires constituent l'une des principales causes de mortalité [79].

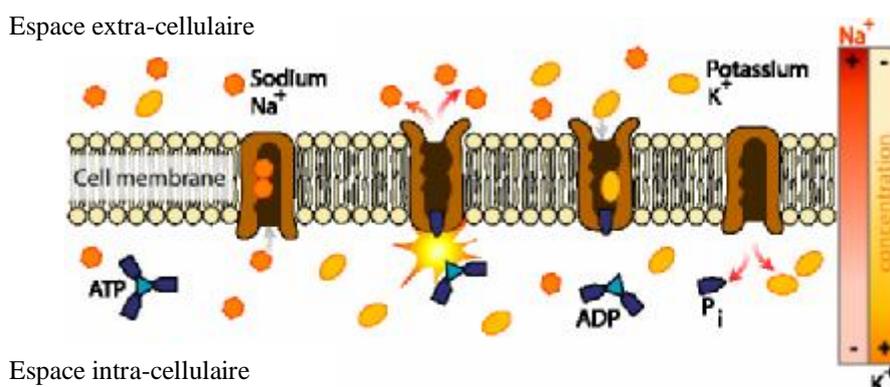
Une action préventive sur l'hygiène de vie visant à éliminer les facteurs de risques (tabagisme, diabète, sédentarité...) permet de ralentir ce processus dynamique. Cependant, lorsque le stade de la maladie est trop avancé, un traitement médicamenteux s'avère indispensable. Celui-ci repose sur les vasodilatateurs et sur les substances capables de diminuer le travail du cœur et donc, ses besoins en oxygène. La prise en charge médicale de cette maladie comprend quatre classes thérapeutiques [80] :

- les  $\beta$ -bloquants qui ralentissent le rythme cardiaque et diminuent la pression artérielle,
- les dérivés nitrés qui contrôlent l'angor par dilatation des vaisseaux sanguins, améliorant ainsi le flux sanguin,
- les inhibiteurs calciques qui relâchent les muscles de la paroi des artères coronaires ouvrant les vaisseaux et augmentant ainsi le flux sanguin autour du cœur,
- les activateurs des canaux potassiques.

Les dérivés nitrés constituent la classe médicamenteuse prescrite en première intention dans le traitement de l'angor. Ces derniers sont utilisés dans le cas de crises aiguës et sont généralement bien tolérés. Néanmoins, l'administration chronique de ces dérivés nitrés induit leur tolérance avec perte de l'effet anti-angineux.

Ainsi, la famille thérapeutique des  $\beta$ -bloquants constitue une alternative aux dérivés nitrés et permet, entre autres, de diminuer le risque d'évolution vers l'infarctus du myocarde [81]. Cependant, ils présentent de nombreux effets indésirables (fatigue, extrémités froides, insuffisance cardiaque).

Les mécanismes impliqués dans l'insuffisance coronarienne sont multiples et complexes. Il est admis que l'insuffisance cardiaque perturbe, notamment, le fonctionnement des canaux sodiques et la pompe à sodium de la membrane cellulaire cardiaque (Figure II.26). Lorsque ce système est défaillant, l'accumulation intracellulaire d'ions sodium induit une surcharge calcique intramoléculaire qui peut entraîner une altération de la fonction cardiaque.



**Figure II.26 :** Représentation schématique des mécanismes d'ouverture et de fermeture des canaux ioniques potentiels dépendants au niveau d'une cellule cardiaque.

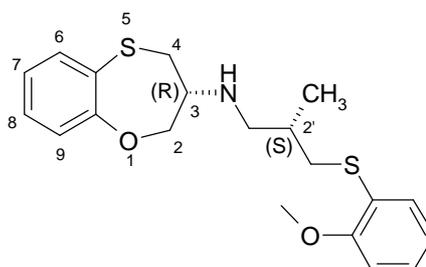
Actuellement, plusieurs voies différentes d'entrée des ions sodium dans la cellule font l'objet de tentatives d'interventions thérapeutiques. Cependant, seuls les bloqueurs des canaux sodiques potentiels dépendants ont fait l'objet d'une recherche intensive [82]. A ce titre, des recherches ont montré que les dérivés de la 3-arylthio-propyl-amino-3, 4-dihydro-2H-1, 5-benzoxathiépine peuvent s'opposer spécifiquement à la surcharge sodique induite par l'angor en agissant directement et sélectivement au niveau du canal sodique potentiel

dépendant [82]. Ces cardioprotecteurs sont utiles pour le traitement de l'insuffisance coronarienne.

#### **IV.2. Propriétés physico-chimiques d'un dérivé benzoxathiépine**

Le dérivé benzoxathiépine, N-[(3R)-3,4-dihydro-2H-1,5-benzoxathiepin-3-yl]-N-{(2S)-3-[(2-méthoxyphényl)thio]-2-méthylpropyl}amine, (*Figure II.27*) est un cytoprotecteur cardiaque actuellement en phase 1 de développement par les Laboratoires Pierre Fabre. Cette molécule est constituée de deux centres d'asymétrie (C3 et C2') donnant naissance à deux couples d'énantiomères soit quatre stéréoisomères.

Parmi ces quatre formes, le stéréoisomère, dont les atomes de carbone asymétrique C3 et C2' sont respectivement de configuration absolue (*R*) et (*S*), est le plus actif. Les trois autres stéréoisomères sont considérés comme des impuretés de synthèse. Par ailleurs, ce composé est issu de la synthèse organique à partir d'une molécule I1 (structure chimique confidentielle) et peut se décomposer pour former le composé I2 (structure chimique confidentielle). Ce dernier se présente comme un mélange de deux diastéréoisomères (I2-A et I2-B) dans les proportions (61,3/38,7). Les teneurs résiduelles des impuretés du composé (*R,S*) doivent répondre aux spécifications de l'ICH [78].



**Figure II.27** : Structure du stéréoisomère (*R,S*) de la benzoxathiépine.

Les propriétés physico-chimiques de ce composé sont reportées dans le *tableau II.13*.

**Tableau II.13 : Propriétés physico-chimiques de la benzoxathiépine.**

D'après un document interne des Laboratoires Pierre Fabre.

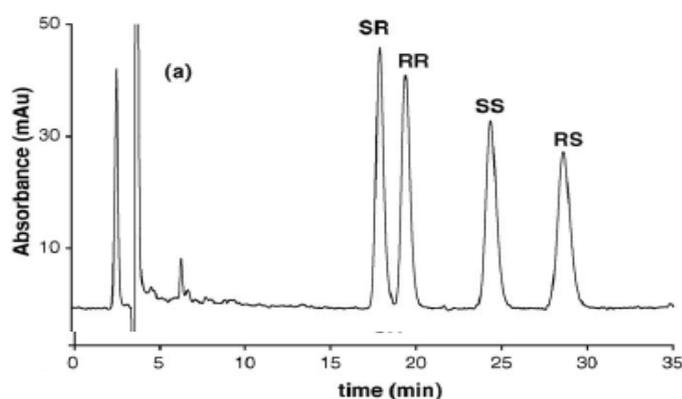
Formule moléculaire	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>2</sub> S <sub>2</sub> , HBr
Masse molaire du sel (g.mol <sup>-1</sup> )	456,5
Masse molaire libre (g.mol <sup>-1</sup> )	375,7
Aspect	poudre blanche
Solubilité dans l'eau (mg.mL <sup>-1</sup> )	5,5
Température de fusion	128
pKa	7,4

### IV.3. Etude bibliographique de l'analyse des benzoxathiépines

La littérature relate deux articles sur l'analyse stéréosélective de la benzoxathiépine par EC [83] et par CPL [27].

En EC, les stéréoisomères ont été résolus rapidement (15 min) en utilisant deux types de cyclodextrines (CM-β-CD et HP-γ-CD) comme sélecteurs chiraux en mode combiné. Les droites de calibration, tracées sur la gamme de concentrations 1 – 100 µg.mL<sup>-1</sup>, ont montré que la teneur relative de chaque diastomère par rapport au composé (R,S) pouvait être déterminée à un seuil minimal de 1 %.

En CPL, la pureté optique de la benzoxathiépine a été déterminée par dichroïsme circulaire / UV [27] après séparation des stéréoisomères sur une phase stationnaire Chiralcel OJ-H (*Figure II.28*). Les limites de quantification étaient similaires à celles obtenues par la méthode électrophorétique. Cette étude ne concernait que l'analyse des stéréoisomères de cette molécule sans inclure les impuretés de synthèse.



**Figure II.28 : Séparation chirale des quatre stéréoisomères de la benzoxathiépine [27].**

Colonne : Chiralcel OJ-H (250 mm x 4,6 mm ; 50 µm d.i.) ; phase mobile : MeOH/EtOH/DEA (25 : 75 : 0,1 v/v/v) ; débit : 1 mL.min<sup>-1</sup> ; température : 35°C ; volume d'injection : 20 µL ; détection : 262 nm ; concentration : 25 µg.mL<sup>-1</sup>.

L'analyse des impuretés chimiques de cette molécule, notées (I1, I2-A et I2-B), est réalisée au sein de les Laboratoires Pierre Fabre par CPL en utilisant une colonne de silice greffée C<sub>8</sub> (Symmetry ; Waters) en mode gradient d'élution (résultats non présentés). Le temps d'analyse est de 58 min.

Ainsi, la quantification de toutes les impuretés de la (*R,S*)-benzoxathiépine (optiques et chimiques) nécessite, à ce jour, la mise en oeuvre de deux méthodes chromatographiques complémentaires dont le temps d'analyse total est d'environ 1h30.

Afin de simplifier ce protocole, une nouvelle méthode chromatographique en phase liquide a été développée avec une colonne non chirale et une détection par dichroïsme circulaire - UV. La méthodologie sera décrite en détail dans le paragraphe suivant.

**IV.4. Article 4: Simultaneous determination of optical and chemical purities of a drug with two chiral centers by liquid chromatography-circular dichroism detection on a non-chiral stationary phase**

**Journal of Chromatography A 1206 (2008) 123-130**

Marie Lecoœur-Lorin<sup>a</sup>, Raphaël Delépée<sup>a</sup>, Michèle Adamczyk<sup>b</sup>, Philippe Morin<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), CNRS FR 2708, UMR 6005, Université d'Orléans, B.P. 6759, 45067 Orléans Cedex 2, France*

<sup>b</sup> *Centre de Développement, Institut de Recherche Pierre Fabre, 31319 Labège, France*

**Abstract**

The need of rapid and cheap chromatographic technique for the simultaneous determination of diastereoisomeric and chemical purities of a drug has led to develop a non-enantioselective HPLC method on a porous graphitic carbon (PGC) sorbent and by using a circular dichroism detector. Among lot of non-chiral chromatographic support tested, PGC was the only one column allowing the separation of all benzoxathiepin diastereoisomers. After optimization of chromatographic conditions, a mobile phase composed of chloroform, acetonitrile and methanol was suitable to elute the diastereoisomers with their related chemical impurities in less than 20 minutes by gradient mode. The circular dichroism (CD) detector was found to be compatible with elution gradient and both the UV, CD and g anisotropy factor signals were recorded without disturbance. The determination of chemical purity was achieved with UV detection (254 nm) whereas the diastereoisomeric purity was determined using CD detection (258 nm) by plotting the anisotropy factors (*R,S-S,R* and *R,R-S,S*) versus the enantiomeric excess of each couple of enantiomers. A mathematic model was developed in order to express the diastereoisomeric excess versus the enantiomeric excess of each couple of enantiomers. Hence, HPLC-UV/CD method was convenient to give access simultaneously to the optical and chemical purities of a chiral drug.

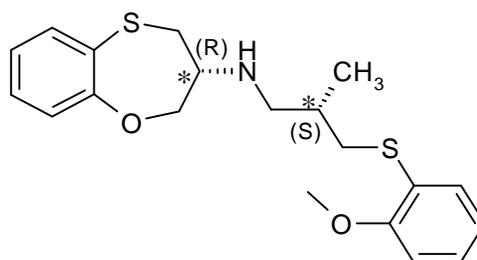
Keywords: Circular dichroism (CD); Anisotropy factor (g factor); HPLC; porous graphitic carbon (PGC); benzoxathiepins; diastereoisomeric excess (d.e.); enantiomeric excess (e.e.).

#### IV.4.1. Introduction

Many pharmaceutical or biological compounds have optical activity due to the presence of chiral elements (atom, axis, plan). A rapid and accurate determination of the enantiomeric composition of chiral bioactive molecules is necessary due to the large differences in terms of therapeutic or adverse effects that may exist between optical isomers.

A number of benzoxathiepin derivatives have been found to exhibit useful medicinal properties such as anticancer [84], antiplatelet aggregation [85] and anti-microbial [86] activities. Several benzoxathiepins have shown an antagonistic activity towards serotonergic receptors [87,88] and pharmacological issues for the glaucoma treatment [89].

A novel active agent [82] of this chemical family (*Figure II.29*) possesses two chiral centers that leads to the formation of four stereoisomers, respectively (*R,S*), (*S,R*), (*R,R*) and (*S,S*). As most chiral bioactive compounds, only one stereoisomer (*R,S*) shows an interesting pharmacological activity and is currently undergoing drug development. During the synthesis, (*R,S*)-stereoisomer was obtained from an intermediate I1 and its degradation leads to the formation of a product I2 which is a mixture of two diastereoisomer pairs (I2-A and I2-B in 61.3/38.7 ratio).



**Figure II.29:** Chemical structures of benzoxathiepin with two chiral centers (pKa = 7.4).

Nowadays, the pharmaceutical industry requires developing new quality control methods to assess the optical and chemical purities of this drug. The determination of diastereoisomeric excess was performed after separation of the stereoisomers on a chiral stationary phase by HPLC-UV in 32 min [27]. In this method, no chemical impurities were added to the stereoisomer mixture. The quantification of chemical impurities is carried out

on bonded silica (C<sub>8</sub>) column with the same detector by Pierre Fabre Research Center (runtime = 58 min). Hence, two methods must be developed to give access to chemical and optical purities of the drug.

This time-consuming analytical process (total runtime of 1.5h) can be replaced by the introduction of a circular dichroism (CD) detector for liquid chromatography. The principle is based on the difference of absorbance between left and right circularly polarized lights for two enantiomers [21,22]. The detector records simultaneously both dichroic signal ( $\Delta\epsilon$ ) and absorbance ( $\epsilon$ ), and also, measures the ratio of these two signals to calculate the anisotropy factor ( $g = \Delta\epsilon/\epsilon$ ). The  $g$  anisotropy factor is independent of the concentration of analyte [25], but is proportional to the enantiomeric excess (e.e). Several authors, among them firstly Bertucci *et al.* [36], Hadley and Jonas [38] and recently Lorin *et al.* [61] have demonstrated that the CD online detector, coupled with a non-chiral stationary phase column in LC, was suitable to determine 98-99.8% enantiomeric excess (e.e.) values of mixture (99-99.9% enantiomeric purity). Moreover, Miller *et al.* [24] have shown that non-chiral liquid chromatography coupled with CD detection can determine simultaneously chemical and enantiomeric purities of synthesis product during catalyzed reaction. In the literature, this method has been applied to pharmaceutical molecules having only one chiral center [36,37,39,75].

In this paper, we investigated first, the separation of benzoxathiepin diastereoisomers with their chemical impurities. Chromatographic analysis was especially focusing using different stationary and mobile phases. In a second part of this work, a mathematic model was built in order to determine the diastereoisomeric purity of benzoxathiepin derivatives with the help of the  $g$  anisotropy factor data. The aim of this work was to determine simultaneously the chemical and optical purities in a single analysis.

#### IV.4.2. Theory

The benzoxathiepin molecule has two chiral centers, which lead to the formation of four stereoisomers with two pairs of enantiomers  $R,S/S,R$  and  $R,R/S,S$ . Thus, two enantiomeric excess (e.e.), have been defined as follows in Eqs. II.5 and II.6:

$$\text{Enantiomeric excess of } (R,S) \text{ versus } (S,R): \quad e.e._{(R,S)} = \frac{[R,S] - [S,R]}{[R,S] + [S,R]} \quad (\text{II.5})$$

$$\text{Enantiomeric excess of } (R,R) \text{ versus } (S,S): \quad e.e._{(R,R)} = \frac{[R,R] - [S,S]}{[R,R] + [S,S]} \quad (\text{II.6})$$

where  $[S,R]$ ,  $[R,S]$ ,  $[S,S]$  and  $[R,R]$  are the concentrations of the  $(S,R)$ -,  $(R,S)$ -,  $(S,S)$ - and  $(R,R)$ -stereoisomers, respectively.

By analogy, the diastereoisomeric excess (d.e.) of a stereoisomer has been defined as follows:

$$\text{Diastereoisomeric excess of } (R,S): \quad d.e._{(R,S)} = \frac{[R,S] - [S,R] - [R,R] - [S,S]}{[R,S] + [S,R] + [R,R] + [S,S]} \quad (\text{II.7})$$

In order to express the diastereoisomeric excess ( $d.e._{(R,S)}$ ) of the  $(R,S)$ -stereoisomer as a function of the enantiomeric excess ( $e.e._{(R,S)}$ ), a new parameter, named “a factor”, has been introduced as follows:

$$a = \frac{[R,R] + [S,S]}{[S,R] + [R,S]} \quad (\text{II.8})$$

The a factor is a dimensionless parameter which characterizes the proportion of each pair of enantiomers in the mixture.

As expected, the two pairs of diastereoisomers,  $(R,R);(S,S)$  and  $(R,S);(S,R)$  can be resolved on a non-chiral stationary phase, and the sums  $[R,R]+[S,S]$  and  $[S,R]+[R,S]$  have been determined by plotting UV peak area versus the concentration of each stereoisomer.

Eq. II.7 has been simplified by expressing the following concentrations  $[S,R]$ ,  $[R,S]$  and  $[S,S]$  as a function of  $[R,R]$ .

Finally, Eq. II.6 has been rearranged to give a direct relationship between  $[S,S]$ ,  $[R,R]$  and  $e.e._{(R,R)}$  as follows:

$$[S, S] = [R, R] \left( \frac{1 - e.e._{(R,R)}}{1 + e.e._{(R,R)}} \right) \quad (\text{II.9})$$

Likewise,  $[R,S]$  and  $[S,R]$  can be expressed from Eq. 1 as function of  $e.e._{(R,S)}$ :

$$[S, R] = [R, S] \left( \frac{1 - e.e._{(R,S)}}{1 + e.e._{(R,S)}} \right) \quad (\text{II.10})$$

By combining Eqs. II.9 and II.10 into the Eq. II.8, the concentration of  $R,S$ - stereoisomer,  $[S,R]$ , can be expressed as a function of  $[R,R]$ , a factor and  $e.e._{(R,S)}$  and  $e.e._{(R,R)}$ , as shown in Eq. II.11:

$$[S, R] = \frac{[R, R]}{a} \left( \frac{1 - e.e._{(R,S)}}{1 + e.e._{(R,R)}} \right) \quad (\text{II.11})$$

Likewise, the combination of Eqs. II.10 and II.11 led to the following equation:

$$[R, S] = \frac{[R, R]}{a} \left( \frac{1 + e.e._{(R,S)}}{1 + e.e._{(R,R)}} \right) \quad (\text{II.12})$$

Finally, Eq. II.7 can be simplified by substituting  $[S,S]$ ,  $[S,R]$  and  $[R,S]$ , respectively by the expression defined in Eqs. II.10, II.11 and II.12. Hence, diastereoisomeric excess of each stereoisomer can be calculated versus  $e.e._{(R,S)}$ ,  $e.e._{(R,R)}$  and "a factor":

$$d.e._{(R,S)} = \frac{e.e._{(R,S)} - a}{a + 1} \quad (\text{II.13})$$

$$d.e._{(S,R)} = \frac{-e.e._{(R,S)} - a}{a + 1} \quad (\text{II.14})$$

$$d.e._{(R,R)} = \frac{ae.e._{(R,R)} - 1}{a + 1} \quad (\text{II.15})$$

$$d.e._{(S,S)} = \frac{-ae.e._{(R,R)} - 1}{a + 1} \quad (\text{II.16})$$

### **IV.4.3. Experimental**

#### *a) Chromatographic equipment*

##### **a) Apparatus**

Experiments were carried out on an Agilent HP 1100 series chromatographic system (Waldbronn, Germany) equipped with a binary pump, a variable volume auto sampler programmed to inject 5, 10 or 20  $\mu\text{L}$ , according to the internal diameter of the column (2.1, 3 or 4.6 mm I.D., respectively), a column oven and a diode-array detector (DAD). CD detection was achieved on a Jasco CD-2095 circular dichroism detector (Tokyo, Japan). The CD detector is composed of a Hg-Xe lamp and a 44  $\mu\text{L}$  flow cell with a 25 mm path-length. The raw CD signal was treated by a fourth order low-pass electronic noise filter (LINK, Antec Leyden, Leiden, The Netherlands) and a cut-off frequency of 20 MHz was set to get an optimum signal-to-noise ratio [58]. The Agilent chromatographic system was controlled with Chemstation software version A.08.03. Data were collected and analyzed by using EZchrom Elite software version 2.5 (Scientific Software, Pleasanton, CA, USA).

##### **b) Columns**

Several silica-based columns have been used: Zorbax Eclipse XDB C<sub>8</sub> (150 mm x 4.6 mm I.D., 5  $\mu\text{m}$ ) and Zorbax Extend C<sub>18</sub> (150 mm x 2.1 mm I.D., 5  $\mu\text{m}$ ) from Agilent; Supelcosil ABZ + plus C<sub>18</sub> (150 mm x 4.6 mm I.D., 5  $\mu\text{m}$ ) from Supelco (St. Quentin Fallavier, France); Adsorbosphere UHS C<sub>18</sub> (150 mm x 4.6 mm I.D., 5  $\mu\text{m}$ ) and Alltima C<sub>18</sub> 5U (250 mm x 4.6 mm I.D., 5  $\mu\text{m}$ ) from Alltech (Templemars, France); XTerra MS (150 mm x 2.1 mm I.D., 5  $\mu\text{m}$ ) from Waters (Guyancourt, France); Nucleodur C<sub>18</sub> Isis (150 mm x 2 mm I.D., 3  $\mu\text{m}$ ) from Macherey-Nagel (Hoerd, France); Lichrospher NH<sub>2</sub> (150 mm x 4.6 mm I.D., 5  $\mu\text{m}$ ) and Lichrospher CN (150 mm x 4.6 mm I.D., 5  $\mu\text{m}$ ) from Merck (Nogent sur Marne, France); and Hypersil Phenyl (150 mm x 4.6 mm I.D., 3  $\mu\text{m}$ ) from Thermo electron Corp. (Les Ulis, France). Finally, two porous graphitic carbon (PGC)-based columns (Hypercarb, Thermo Fisher Scientific) having different dimensions (150 mm x 3 mm I.D., 5  $\mu\text{m}$  or 150 mm x 2.1 mm I.D., 3  $\mu\text{m}$ ) were tested.

*b) Spectroscopic equipment*

UV spectra were acquired using a double beam Cary 100 spectrometer (Varian, les Ulis, France). UV spectra of solutes were recorded from 220 to 340 nm at a scanning speed of 600 nm min<sup>-1</sup> in a 10 mm path-length quartz cell. (*R,S*)-stereoisomer, I1 and I2 impurities were individually dissolved in MeOH/CHCl<sub>3</sub>/ACN 40:30:30 (v/v/v) to give working solutions (final concentration 10 µg mL<sup>-1</sup>).

CD spectra of (*R,R*)-, (*S,S*)-, (*R,S*)- and (*S,R*)-stereoisomers were acquired using a Jasco J-810 dichroism spectrometer (1 mm path-length quartz cell, 220 - 340 nm range, room temperature). Pure stereoisomers and impurities (I1, I2) were individually dissolved in the same medium as described previously to obtain six working solutions (200 µg mL<sup>-1</sup>). Each spectrum was collected with a scanning speed of 50 nm min<sup>-1</sup>. Four scans were averaged and blank-subtracted to obtain the CD spectrum.

*c) Chemicals*

The (*R,S*)-eutomer of benzoxathiepin, the three stereoisomeric impurities, i.e. (*S,R*)-, (*R,R*)-, (*S,S*)-stereoisomers, and the two chemical impurities (I1, I2) were kindly provided by Pierre Fabre Research Center (Castres, France). I1 is a reagent used during the synthesis of (*R,S*)-benzoxathiepin while I2 is a degradation product that is a mixture of two diastereoisomers pairs (called I2-A and I2-B) in the ratio of 61.3/38.7, respectively.

All solvents were of analytical grade. Acetonitrile (ACN), methanol (MeOH), n-heptane and methylene chloride (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) were purchased from SDS (Peypin, France). Chloroform (CHCl<sub>3</sub>), tetrahydrofuran (THF) and methyl *tert*-butyl ether (MTBE) were purchased from J.T. Baker (Noisy le Sec, France). Diethylamine (DEA), formic acid, ammonium hydroxide solution (28%) and potassium hydrogenophosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) were obtained from Fluka (St. Quentin-Fallavier, France). Trifluoroacetic acid was provided by Aldrich (Steinheim, Germany) and potassium hydroxide by Fisher Scientific (Illkirch, France). Ultra pure water (18 MΩ) was provided by an Elgastat UHQ II apparatus (Elga, Antony, France) for the preparation of mobile phases and standard solutions.

*d) Standards and working solutions*

Stock solutions of each pure stereoisomer and of each chemical impurity (I1, I2) were prepared in methanol (2 mg mL<sup>-1</sup>). Standard working solutions (10-1000 µg mL<sup>-1</sup>) were daily prepared by appropriate dilution of stock solution in the mobile phase (MeOH/ACN/CHCl<sub>3</sub> 40:30:30, v/v/v) to assess the linearity of ellipticity and UV absorbance versus the stereoisomer concentration. Linearity of UV signal versus chemical impurity concentration was assessed in the 5-25 µg mL<sup>-1</sup> and 12.5-50 µg mL<sup>-1</sup> concentration ranges for I1 and I2, respectively. Final result was calculated as the mean of two consecutive determinations. Linearity of g anisotropy factors versus the enantiomeric excesses was investigated independently in the -100 - +100% e.e. range. The linearity was assessed with a series of nine e.e. levels: +100, +70, +50, +25, 0, -25, -50, -70, -100% for each couple of enantiomers.

Working solutions of (*R,S-S,R*) or (*R,R-S,S*) stereoisomers were prepared in order to obtain a total concentration of each couple of enantiomers of 1000 µg.mL<sup>-1</sup>. At extreme e.e. range (60-100% or 90-100%), concentration of (*R,S*)-enantiomer was constant (1000 µg.mL<sup>-1</sup>) and concentration of (*S,R*)-enantiomer was adjusted to give the following standards: 60 ; 70 ; 80 ; 90 ; 100 % e.e. and 90 ; 92 ; 94 ; 96 ; 98 ; 100 % e.e..

#### **IV.4.4. Results and discussion**

*a) Development of the chromatographic separation*

The objective of the first part of this work was to separate diastereoisomers and chemical impurities of benzoxathiepin on a non chiral stationary phase column by HPLC.

**a) Selection of stationary phase for the simultaneous separation of diastereoisomers and their two chemical impurities**

Different bonded silica (C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>, NH<sub>2</sub>, CN, phenyl) columns have been tested under reversed or normal-phase chromatography in order to achieve the separation of diastereoisomers and chemical impurities of studied benzoxathiepin.

C<sub>18</sub> silica stationary phase has ever proven its efficiency to resolve regioisomers and diastereoisomers of isoprostane [90]. In our study, several alkylsiloxane-bonded silica

stationary phases differing by the nature of bonding, end-capping and carbon percentage were selected. Each support was tested with a mobile phase composed of an organic modifier (ACN or MeOH) and an aqueous phase (water or  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  / KOH buffer, pH 5.5, ionic strength 59 mM). The composition of the mobile phase was fixed to have the best separation in less than one hour. Better peak shapes and efficiencies have been obtained when the hydro-organic eluent contained phosphate buffer rather than pure water. Nevertheless, no separation occurred between benzoxathiepin diastereoisomers whatever alkylsiloxane-bonded silica column (*Figure II.30-a*). Besides, the separation between I2 diastereoisomers was lost by using  $\text{C}_{18}$ -bonded silica Adsorbosphere column.

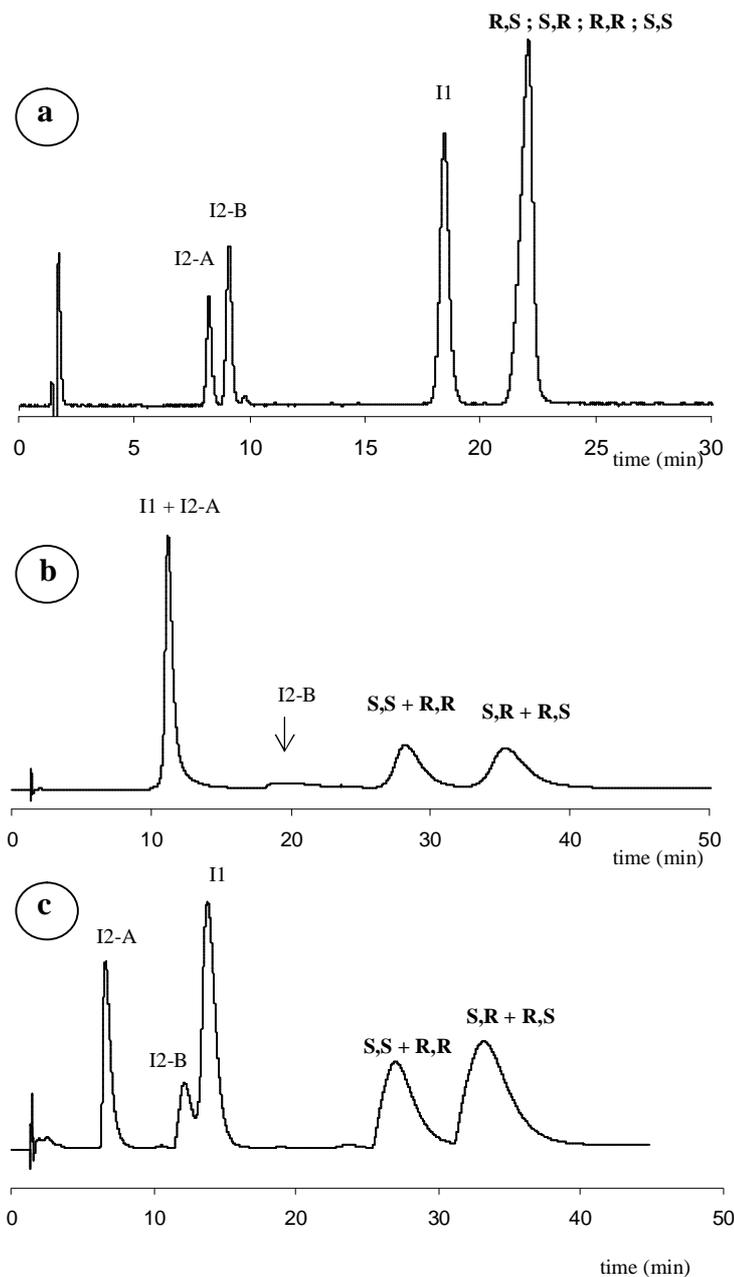
Therefore, a second type of bonded silica stationary phase (phenyl column) was evaluated. The electronic structure of benzoxathiepin molecule favoured  $\pi$ - $\pi$  interactions between phenyl groups in the molecule and in the stationary phase. Yang *et al.* [91] reported the separation of a diastereoisomeric pharmaceutical drug and its two related impurities on this support. Nevertheless, no interesting results were obtained with benzoxathiepin diastereoisomers.

Then, amino- and cyano-bonded silica stationary phases were tested under normal phase with binary or ternary mixtures of  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , n-heptane, THF and MTBE. As expected, elution order of each solute was reversed compared to those obtained on  $\text{C}_{18}$  support but no diastereoisomeric resolution was observed.

Finally, the use of porous graphitic carbon (PGC) was tested. This material is an interesting alternative to reversed-phase, normal-phase and anion-exchange stationary phases. The retention mechanism is based upon no selective van der Waals interactions between the solute and the carbon surface and the retention also depends on the geometry of the analytes [92]. PGC was ideal to solve difficult separations. Hence, related geometrical solutes such as tetracyclines [62] and diastereoisomers [93,94] have been previously separated on this support.

In a first attempt, the separation of benzoxathiepin diastereoisomers and of their chemical impurities was investigated using similar hydro-organic eluents (ACN or MeOH- $\text{H}_2\text{O}$ ) as those used on silica-bonded column, but at a higher organic solvent content. No elution of analytes happened in 1 h. If the addition of 1-10  $\mu\text{mol}$  of one acidic modifier (formic or trifluoroacetic acid) into the mobile phase allowed the elution of the analytes in a few minutes, no separation between diastereoisomers occurred. Otherwise, the addition of a basic modifier (DEA or ammonia) had no influence on the retention. Finally, chloroform-acetonitrile mobile phase was tested and underwent a good selectivity between

two diastereoisomers (*Figure II.30-b*). Unfortunately, the separation between I1 and I2 impurities was lost. Therefore, the second step of this work was to optimize the chromatographic conditions.

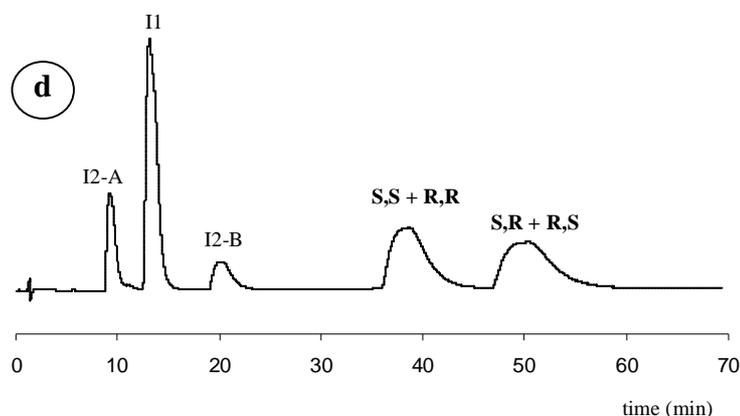


**Figure II.30:** Chromatographic analysis of benzoxathiepin derivatives on silica bonded and PGC supports.

(a): Column: Zorbax Eclipse XDB C<sub>8</sub> (150 mm x 4.6 mm I.D., 5 μm particle size); mobile phase: ACN/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-KOH (pH 5.5, ionic strength: 59 mM) 40:60 (v/v); flow rate: 1 mL min<sup>-1</sup>; injection volume: 20 μL; temperature: 30°C; UV detection 254 nm.

(b) Column: Hypercarb (100 mm x 3 mm I.D., 5 μm particle size); mobile phase: CHCl<sub>3</sub>/ACN 45:55 (v/v); UV detection: 254 nm; flow rate: 0.4 mL min<sup>-1</sup>; injection volume: 10 μL; temperature: 30°C.

(c) Column: Hypercarb (100 mm x 3 mm I.D., 5 μm particle size); mobile phase: CHCl<sub>3</sub>/MeOH 50:50 (v/v); UV detection: 254 nm; flow rate: 0.4 mL min<sup>-1</sup>; injection volume: 10 μL; temperature: 30°C.



**Figure II.30 (suite): Chromatographic analysis of benzoxathiepin derivatives on silica bonded and PGC supports.**

(d) Column: Hypercarb (100 mm x 3 mm I.D., 5  $\mu\text{m}$  particle size); mobile phase: MeOH/CHCl<sub>3</sub>/ACN 40:30:30 (v/v/v); UV detection: 254 nm; flow rate: 0.4 mL min<sup>-1</sup>; injection volume: 10  $\mu\text{L}$ ; temperature: 30°C.

(R,S; S,R; R,R and S,S)-Stereoisomers and chemical impurities concentrations: 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### **b) Optimization of chromatographic conditions on porous graphitic carbon stationary phase**

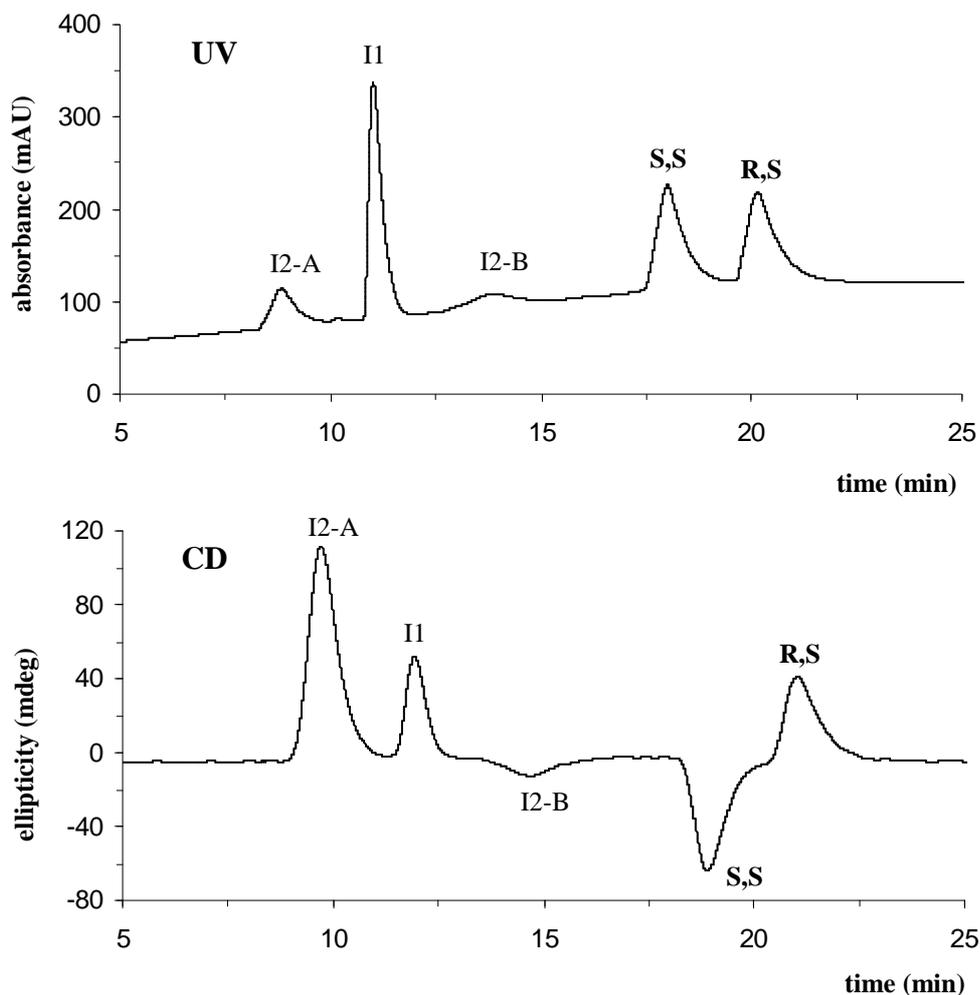
The resolution of benzoxathiepin on PGC column was studied by varying the composition of several mobile phases (ACN/CHCl<sub>3</sub>, ACN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH/CHCl<sub>3</sub> and MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and CHCl<sub>3</sub> were selected as mobile phase modifiers in order to promote dipole–dipole and H-bonding interactions, respectively. The dipolar properties of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> did not allow the elution of analytes in less than 60 min. On the contrary, a mixture of CHCl<sub>3</sub>/ACN seemed to be suitable to elute rapidly the analytes due to the acidic property of CHCl<sub>3</sub>. The substitution of ACN with MeOH modified the selectivity between I1 and I2 compounds and the elution order was reversed (*Figure II.30-c*). Further, the separation of I1 and I2 on PGC support was investigated by using a ternary mobile phase (MeOH, ACN and CHCl<sub>3</sub>). Different compositions of mobile phase were evaluated and a baseline separation of the five compounds was finally achieved in less than 60 minutes by using a mixture of MeOH/ACN/CHCl<sub>3</sub> 40:30:30 (v/v/v) as mobile phase (*Figure II.30-d*).

The second step of the optimization concerned the influence of temperature on the chromatographic separation of benzoxathiepin on PGC. The influence of temperature on this support has previously been studied [64,95] for the analysis of lipids and

cyclodextrins; so, an increase of temperature induces shorter retention times and lower column back pressure [96].

Thus, these five compounds were analyzed in the mobile phase selected previously, varying temperature from 30 to 70°C. During this experiment, the mobile phase was pre-heated by using a 2 m length stainless steel tubing introduced in the oven. The flow rate was adjusted at 0.60, 0.68, 0.78, 0.87 and 0.95 mL min<sup>-1</sup>, respectively in order to maintain constant the eluent reduced speed and to reach the maximum peak efficiency. For each analyte, both capacity factor and selectivity decreased with an increase of temperature. Thus, increasing temperature from 30 to 70 °C induced a shorter analysis time (10.8 instead of 50.3 min) but an excessive lost of resolution ( $R_s < 0.5$  between diastereoisomers). Further study has been performed at 30°C.

Finally, an elution gradient has been developed in order to reduce runtime. As shown in *figure II.30-d*, the ternary mobile phase MeOH/ACN/CHCl<sub>3</sub> 40:30:30 (v/v/v) has allowed the separation of diastereoisomers and impurities on PGC support with a satisfactory resolution but at the expense of a long run time (60 min). A gradient elution has been developed with the same solvents in order to reduce run time. Solvent A was a mixture of MeOH and ACN (70:30, v/v) and solvent B a mixture of CHCl<sub>3</sub> and ACN (70:30, v/v). The gradient conditions used on the PGC column were as follows: the percentage of solvent B was raised linearly from 43 to 86% over 15 min, then stayed to 86% over 15 min. Then, the mobile phase was returned to its original composition over 1 min and the column was equilibrated for 15 min (46 min run-to-run). No disturbance on CD signal was observed which confirms the reliability of CD detector even in HPLC under gradient mode. Finally, a narrow bore column (100 mm x 2.1 mm I.D., 3µm particle size) was used to improve peak efficiencies (*Figure II.31*). Since the mobile phase was a mixture of MeOH/ACN/CHCl<sub>3</sub> with low viscosity, the flow rate of the eluent initially set at 0.2 µL min<sup>-1</sup> was increased until 0.3 µL min<sup>-1</sup> to reduce the analysis time (23 min) without lost of separation. The total run time was of 39 min.

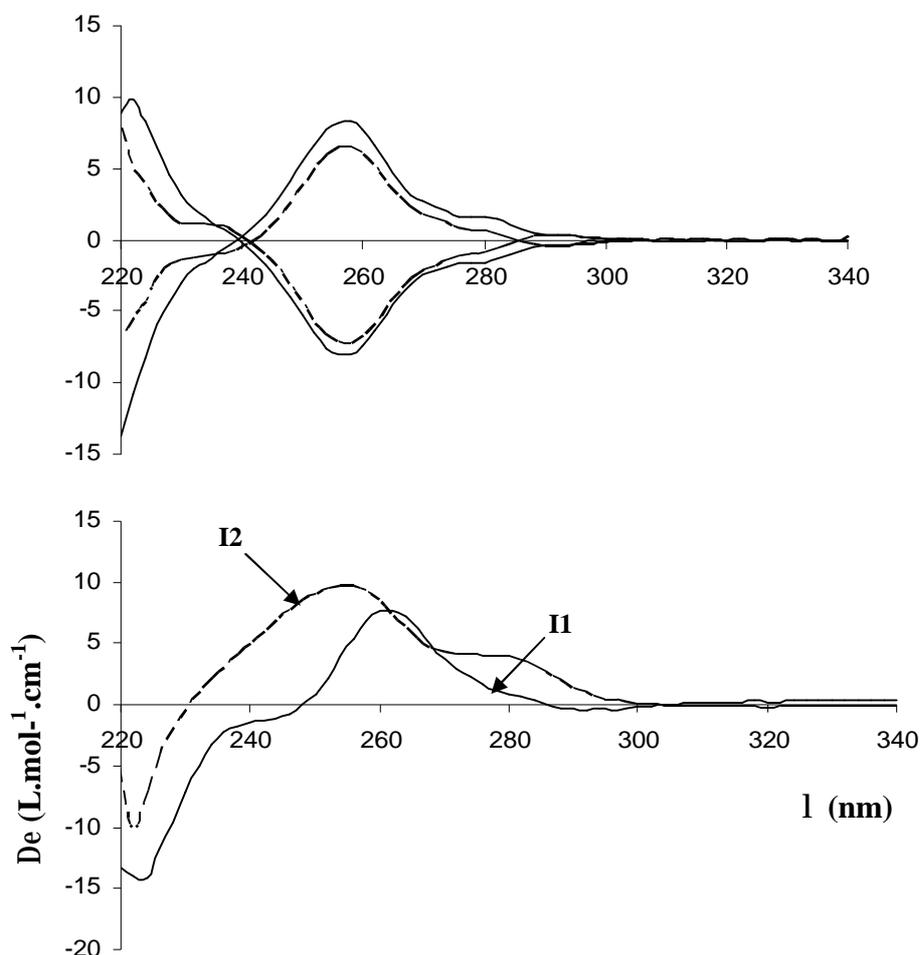


**Figure II.31:** Final LC-UV/CD separation of benzoxathiepin derivatives under gradient mode.

Column: Hypercarb (100 mm x 2.1 mm I.D., 3  $\mu\text{m}$  particle size); mobile phase MeOH/ACN 70:30 (v/v) (A)–CHCl<sub>3</sub>/ACN 70:30 (v/v) (B), gradient elution from 43 to 86% (B) for 15 min then with 86% (B) for 15 min; flow rate: 0.3 mL min<sup>-1</sup>; injection volume: 5  $\mu\text{L}$ ; temperature: 30°C; UV detection: Agilent DAD detector (254 nm); CD detection: Jasco CD detector (258 nm); back pressure: 89 bar; (R,S and S,S); stereoisomers and chemical impurities concentration: 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### *b) Selection of CD and UV monitoring wavelengths*

The sensitivity of CD detection depends on the selection of the CD wavelength. As previously reported [58], the selected CD wavelength must be as far as possible from the UV absorption area of solvent (220 nm) to reduced the noise of circular dichroism detector. The CD spectra of (R,S)-, (S,R)-, (R,R)- and (S,S)-stereoisomers are shown in figure II.32.



**Figure II.32:** CD spectra of (*R,S*)-eutomer, three diastereoisomer impurities (*R,R*; *S,S*; *S,R*) and two chemical impurities (**I1**, **I2**) of benzoxathiepin.

Conditions: see Section IV.4.3. Mobile phase: MeOH/CHCl<sub>3</sub>/ACN 40:30:30 (v/v/v).

Since dichroic response depends on the medium in which the analyte is dissolved [60], all dichroic spectra were recorded in CHCl<sub>3</sub>/MeOH/ACN 40:30:30 (v/v/v). The CD detector has been set up at 258 nm for a higher ellipticity difference between the two pairs of enantiomers. The cut-off frequency of the low-pass electronic noise filter was fixed at 20 mHz to get an optimum signal-to-noise ratio. Thus, the determination of *g* anisotropy factor was more sensitive.

The Jasco CD-2095 detector was less sensitive than DAD detector (Agilent) for the UV absorbance signal, so the quantification of chemical impurities (**I1**, **I2**) has been determined by using this DAD detector (254 nm). Likewise, *g* anisotropy factor was expressed as the peak area ratio of CD signal at 258 nm (provided by the Jasco CD-2095

circular dichroism detector) by the UV signal at 254 nm (provided by the Agilent diode-array detector). The use of two in series detectors to determine the g anisotropy factor can be a financial drawback in the method.

c) Determination of the diastereoisomeric purity

The protocol for the determination of the diastereoisomeric purity of benzoxathiepin includes three parts and was illustrated through the case of a drug (benzoxathiepin) with two chiral centers. Two synthetic samples (1 and 2) with different stereoisomer compositions were prepared and the first one was used to explain the calculation described in the Section IV.4.2.

a) Determination of the enantiomeric purity

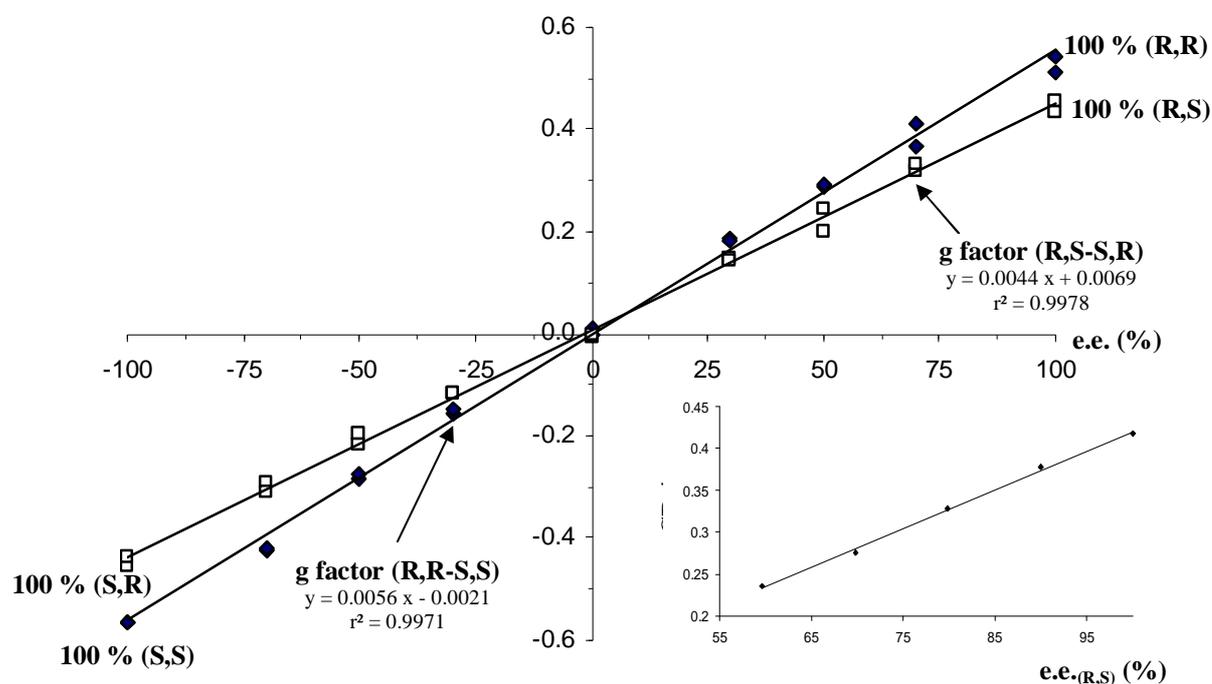
The first step consisted in the determination of e.e. for each couple of enantiomers. First, the linearity of UV and CD signals versus the concentration was assessed for each benzoxathiepin stereoisomer in the 10–1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  concentration range. All results are reported in *table II.14*. Limits of quantification obtained by CD detection ( $\text{LOQ} = 11\text{--}22 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) were around 3-4 times higher than those recorded by UV one ( $2.3\text{--}4.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). So, the narrow dynamic linearity range of CD detector precludes the determination of e.e. values higher than 95.6– 98.8 %.

**Table II.14: Quantitative parameters (LOD, LOQ, linearity) of CD and UV signals for each stereoisomer of benzoxathiepin derivative.**

Stereoisomer	$t_r$ (min)	CD signal		UV signal		CD calibration curve		UV calibration curve	
		LOD <sup>a</sup>	LOQ <sup>a</sup>	LOD <sup>a</sup>	LOQ <sup>a</sup>	Slope	Intercept	Slope	Intercept
R,S	20.11	5.4	17.9	0.8	2.8	10.87	118.75	23.94	-445.49
S,R	20.11	6.7	22.3	0.9	3.1	-11.88	-47.42	24.16	-390.85
R,R	17.96	3.4	11.4	1.3	4.3	13.44	487.54	25.62	-213.07
S,S	17.96	3.6	12.1	0.7	2.3	-12.56	-131.36	24.46	-206.31

<sup>a</sup> LOD and LOQ were expressed in  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

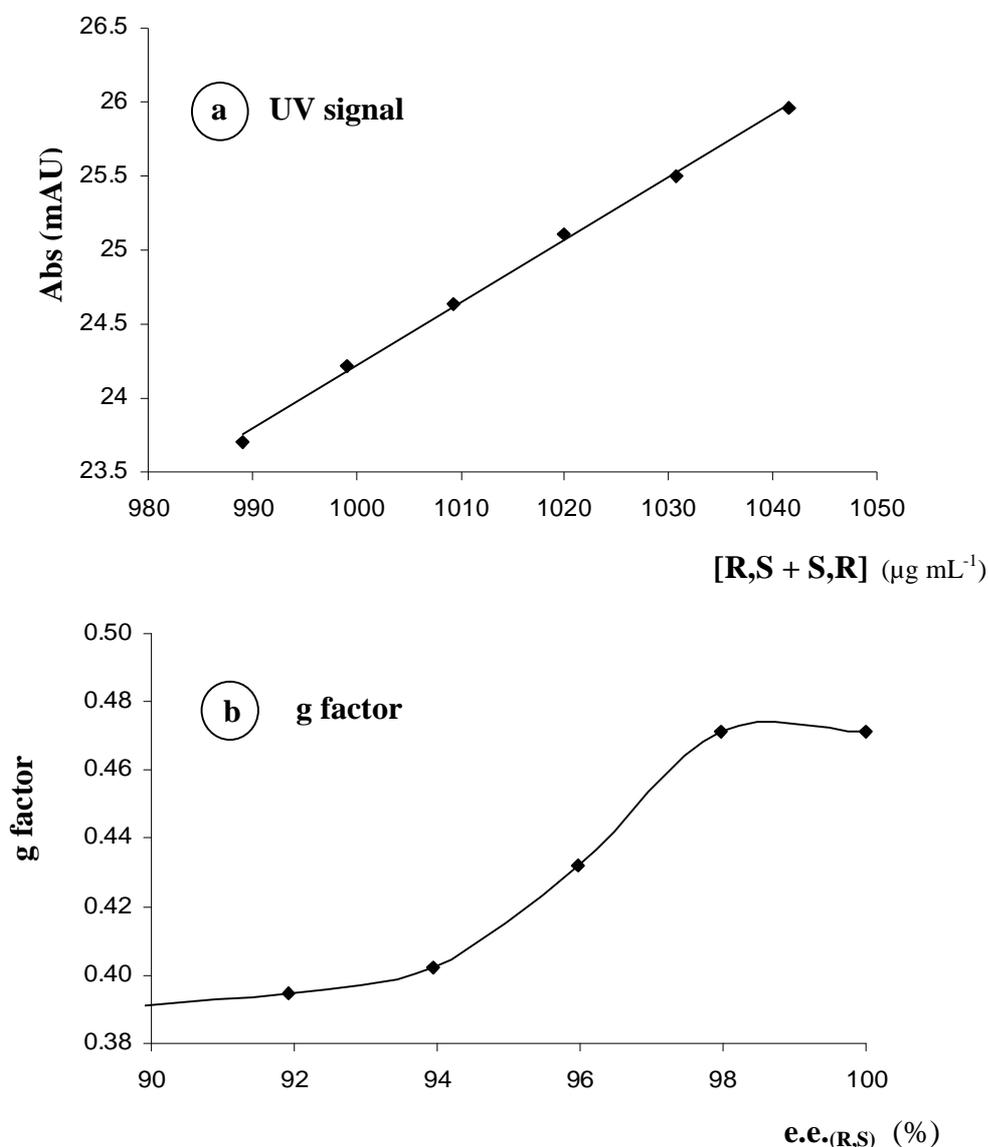
The variations of  $g$  factor ( $R,S-S,R$ ) versus  $e.e._{(R,S)}$ , and also of  $g$  factor ( $R,R-S,S$ ) versus  $e.e._{(R,R)}$ , were determined from triplicate injections at nine  $e.e.$  levels distributed uniformly over the -100 up to +100%  $e.e.$  range (Figure II.33). Linearity was assessed all over the  $e.e.$  range by least squares regression and yielded good correlation coefficient ( $r^2 = 0.9978$  and  $0.9971$ , respectively). Experimental equations were:  $y = 0.0044 x + 0.0069$  and  $y = 0.0056 x - 0.0021$ , where  $y$  are the  $g$  factors ( $R,S-S,R$ ) and ( $R,R-S,S$ ), respectively, and  $x$  is the  $e.e.$



**Figure II.33:** Linearity of ( $R,S-S,R$ ) and ( $R,R-S,S$ )  $g$  anisotropy factors versus the enantiomeric excess.

Conditions: see Fig.II.31.

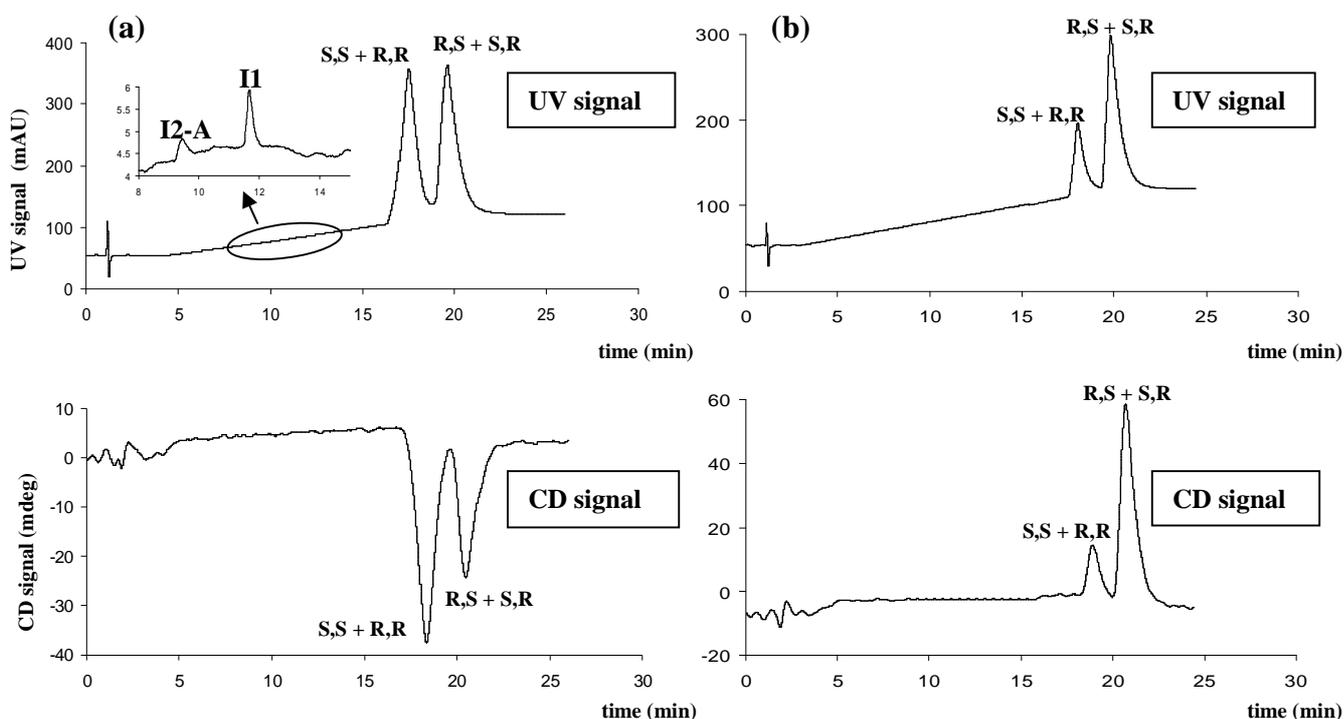
Then, the linearity of the  $g$  anisotropy factor ( $R,S-S,R$ ) was also studied in the extreme  $e.e.$  range (90-100%). Figure II.34 shows the linearity of UV signal versus the total concentration of ( $R,S$ )- and ( $S,R$ )-enantiomers and the variation of  $g$  anisotropy factor versus the enantiomeric excess of ( $R,S$ )-stereoisomer. The linearity of UV signal versus the sum of ( $R,S$ )- and ( $S,R$ )-enantiomer concentrations confirmed a non-erroneous preparation of standard solutions. The weak precision of CD detector explained the non-linearity of  $g$  factor versus  $e.e.$  curve. The limit of quantification of ( $R,S$ )-stereoisomer  $e.e.$  was close to 90 %.



**Figure II.34:** Assessment of linearity range of CD and UV detectors for each benzoxathiepin.

- (a) Linearity of UV signal versus the total concentration of (R,S)– and (S,R)–enantiomers.  
(b) Variation of g anisotropy factor versus the enantiomeric excess of (R,S)–stereoisomer.  
Same chromatographic conditions as in Fig. II.31, except for [RS]:  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Two synthetic mixtures of four stereoisomers and three chemical impurities of benzoxathiepin was resolved in HPLC on PGC support (*Figure II.35*). The following anisotropy factors,  $g(R,S-S,R)$  and  $g(R,R-S,S)$ , were determined from CD and UV peak areas (*Table II.15*) and then  $e.e.(R,S)$  and  $e.e.(R,R)$ , were deduced from the linear calibration curves reported in *figure II.33*.



**Figure II.35:** Simultaneous determination of chemical and diastereoisomeric purities of benzoxathiepin (*R,S*)-stereoisomer.

Same chromatographic conditions as in Fig. II.31.

(a) [*S,S*] = 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; [*R,R*] = 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; [*R,S*] = 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; [*S,R*] = 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

(b) [*S,S*] = 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; [*R,R*] = 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; [*R,S*] = 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; [*S,R*] = 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

**Table II.15:** Quantitative analysis of a reconstituted sample composed of four stereoisomers.

Sample	Compound	$A_{CD}$	$A_{UV}$	g factor	e.e. (%) <sup>a</sup>	Concentration introduced <sup>b</sup> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentration calculated <sup>b</sup> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Bias (%)
1	<i>R,R</i> / <i>S,S</i>	-2763	14810	-0.1866	-27.25	600	616	2.7
	<i>R,S</i> / <i>S,R</i>	-1723	15245	-0.1130	-36.89	600	599	-0.2
2	<i>R,R</i> / <i>S,S</i>	1001	3200	0.3125	62.92	150	136	9.3
	<i>R,S</i> / <i>S,R</i>	3494	9041	0.3865	86.26	350	358	2.3

<sup>a</sup> e.e. expressed for (*R,S*)- and (*R,R*)-stereoisomers.

<sup>b</sup> Total concentration of each couple of enantiomers.

### b) Determination of “a factor”

The a-factor (previously defined in Eq.II.8) was determined from UV calibration curves. Since each pair of enantiomers (*R,S* and *S,R*, for example) has the same absorbance spectrum and was eluted at the same retention time on a non-chiral support, only one

calibration curve was required for (*R,S*)- and (*S,R*)-enantiomers. This finding has been experimentally checked. Thus, a Student's test was made in order to compare the slopes and the y-intercepts of these calibration curves. For (*R,S*)- and (*S,R*)-enantiomers, the experimental values of t-test for the slope and the y-intercept ( $t_c = 1.064$  and  $1.669$ , respectively) were lower than the theoretical value ( $t_{(0.95; 18)} = 2.101$ ) indicating that both slopes and y-intercepts were not significantly different. The same conclusion was made for (*S,S*)- and (*R,R*)-enantiomers for the comparison of slopes and y-intercepts ( $t_c = 1.499$  and  $0.815$ , respectively).

Finally, two average linear regressions were generated for (*R,S*)- and (*S,R*)-enantiomers ( $y = 24.05 x - 418.17$ ) and for (*S,S*)- and (*R,R*)-enantiomers ( $y = 25.04 x - 209.69$ ).

From UV peak area values of the reconstituted sample, the sums of concentrations ( $[R,R] + [S,S]$  and  $[R,S] + [S,R]$ ) were calculated at  $599$  and  $616 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; then, a factor was equal to  $0.973$  (Table II.15).

### c) Determination of the diastereoisomeric purity

The diastereoisomeric purity of each stereoisomer has been determined by reporting values of a factor,  $e.e._{(R,S)}$  and  $e.e._{(R,R)}$  in Eqs. II.13-II.16. All results are reported in table II.16. Experimental values were close to the theoretical one and the bias ranged from 1.4 to 7.5%.

**Table II.16: Results of experimental and calculated values of diastereoisomeric excess for benzoxathiepins.**

Sample	Compound	Experimental d.e.(%)	Calculated d.e. (%)	Bias (%)
1	R,S	-0.680	-0.660	3.0
	S,R	-0.355	-0.330	7.4
	R,R	-0.689	-0.660	4.4
	S,S	-0.325	-0.330	-1.4
2	R,S	0.181	0.200	-9.6
	S,R	-0.900	-0.800	12.5
	R,R	-0.552	-0.600	-8.1
	S,S	-0.898	-0.800	12.2

*d) Determination of the chemical purity*

The chemical purity of benzoxathiepin sample was assessed with the help of the UV calibration curves of impurities; LOQ values ranged from 1.7 to 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Table II.17).

**Table II.17: Quantitative parameters (LOD, LOQ and linearity) of chemical impurities of benzoxathiepins.**

Solute	$t_R$ (min)	LOD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	UV calibration curves	
				Slope	Intercept
I1	10.92	0.50	1.68	24.91	-19.32
I2-A	8.70	1.29	4.30	11.65	-23.04
I2-B	13.77	1.50	4.99	10.23	-11.96

**IV.4.5. Concluding remarks**

The porous graphitic carbon-based support (PGC) appeared to be a valuable chromatographic support for the difficult separation of two pairs of benzoxathiepin diastereoisomers, which failed on conventional bonded silica phases ( $\text{C}_{18}$ ,  $\text{NH}_2$ , CN, phenyl). Hence, benzoxathiepins and related chemical impurities have been successfully separated in less than 25 minutes by using a gradient elution mode. Likewise, circular dichroism detection was found to be fully compatible with an elution gradient mode since no disturbance was recorded on the CD signal.

For a chiral solute having two asymmetric centers, a mathematical model was developed to calculate the diastereoisomeric excess (d.e.<sub>(R,S)</sub>) for (*R,S*)-stereoisomer, for example) versus the enantiomeric excess (e.e.<sub>(R,S)</sub> and e.e.<sub>(R,R)</sub>) and a dimensionless parameter (a factor). Experimental d.e. were close to the theoretical values with an acceptable bias (< 7.5%).

**Acknowledgements**

The authors thank J.C. Maurizot (Centre de Biophysique Moléculaire, Orléans, France) for his valuable help for recording CD spectra.

#### **IV.5. Conclusion sur l'intérêt du détecteur à dichroïsme circulaire pour la détermination simultanée des puretés énantiomérique et chimique d'une benzoxathiépine**

Les impuretés chimiques et les diastéréoisomères de la (*R,S*)-benzoxathiépine ont été séparées sur une colonne en carbone graphite poreux (PGC). Les composés sont élués en mode gradient d'éluion en 25 min par un mélange ternaire constitué de CHCl<sub>3</sub>/MeOH/ACN. Les régressions linéaires des facteurs  $g$ , en fonction de l'excès énantiomérique de chaque couple d'énantiomères, ont pu être tracées. Un modèle mathématique a été développé afin de déterminer l'excès diastéréoisomérique de la (*R,S*)-benzoxathiépine en fonction des excès énantiomériques de chaque couple d'énantiomères (e.e.<sub>(*R,S*)</sub>, e.e.<sub>(*R,R*)</sub>) et du facteur  $a$ . Cette méthode a permis de déterminer simultanément les puretés chimique (LOQ = 1,5 – 5 µg.mL<sup>-1</sup>) et diastéréoisomérique (LOQ<sub>p.e.</sub> = 5 %) d'un principe actif pharmaceutique.

Toutefois, le manque d'efficacité et la forte asymétrie des pics dus aux multiples interactions entre les stéréoisomères de la benzoxathiépine et le support PGC constituent les points faibles de cette méthode chromatographique. De plus, la limite de quantification de l'impureté énantiomérique du (*R,S*)-benzoxathiépine est au-delà de la valeur de 0,1 % imposée par la réglementation.

#### **V. Conclusion**

La détection par dichroïsme circulaire, basée sur la différence d'absorption entre les lumières polarisées circulairement droite et gauche pour un couple d'énantiomères, a été couplée à la chromatographie en phase liquide lors de l'analyse de principes actifs pharmaceutiques.

En chromatographie liquide énantiosélective (support chiral), le détecteur à dichroïsme circulaire présente l'avantage par rapport à la spectrométrie UV de prévoir l'ordre de rétention des énantiomères.

Le fait que la détermination de la pureté énantiomérique d'un composé chiral puisse être réalisée en CPL non énantiosélective (support non chiral) constitue le principal attrait de ce détecteur. Ainsi, l'impureté énantiomérique de l'efaroxan a pu être déterminée

à un seuil minimal de 1% lors de son analyse chromatographique sur une colonne de silice greffée C<sub>8</sub>.

Ce concept s'est avéré intéressant lors de la détermination simultanée de la pureté énantiomérique et de la pureté chimique d'une benzoxathiépine possédant deux centres chiraux. Après la séparation des diastéréoisomères et des trois impuretés chimiques sur une phase stationnaire en carbone graphite poreux, en mode gradient d'élution, ce détecteur a permis la quantification de l'impureté énantiomérique présente à hauteur de 5% parmi la forme active.

Par ailleurs, ces études ont démontré que la sensibilité de ce détecteur est fortement dépendante de la structure chimique de l'analyte (nature du groupement chromophore) et de la composition de la phase mobile. De plus, la longueur d'onde de détection est un paramètre clé lors de l'optimisation de la méthode.

Néanmoins, le détecteur DC/UV révèle quelques limitations : un bruit de fond excessif et un domaine de linéarité dynamique restreint sont à l'origine de la faible sensibilité de la technique. Un filtre électronique passe-bas (LINK) est un outil efficace pour diminuer le bruit de fond à court terme d'un facteur 70. Toutefois, les limites de détection atteintes restent trop élevées (un facteur 10) par rapport aux recommandations exigées par l'ICH. De plus, il est indispensable de thermostatier la cellule de détection afin d'obtenir des résultats justes et précis.

Ce mode de détection n'aura un avenir dans l'industrie pharmaceutique, que si des efforts importants sont faits par le constructeur pour améliorer la sensibilité du signal dichroïque afin de pouvoir atteindre des LOQ de 0,1%. Les chemins potentiels d'amélioration de la sensibilité passent, sans doute, par l'utilisation d'un laser et d'un traitement amélioré du signal.

Toutefois, les performances de ce détecteur sont adaptées pour suivre la dégradation d'un principe actif pharmaceutique chiral dans un milieu biologique, ou lors du contrôle de la pureté d'un produit issu de la synthèse énantiosélective. Des puretés énantiomériques comprises entre 50 à 99 % peuvent être déterminées avec une bonne exactitude.

## Références bibliographiques

- [1] H.M. Hoehn, M.D. Yahr, *Neurology* 17 (1967) 437.
- [2] <http://www.franceparkinson.fr>.
- [3] R. Hassler, *J. Psychol. Neurol.* 48 (1938) 387.
- [4] J. Parkinson, *An assay on the shaking palsy* Nelly and Jones, London, 1817.
- [5] S. Fahn, *Adverse effects of levodopa. The scientific basis for the treatment of Parkinson's disease*, Carforth 1992.
- [6] P. Calabresi, B. Picconi, L. Parnetti, M. Di Filippo, *The Lancet Neurology* 5 (2006) 974.
- [7] S. Tellez, F. Colpaert, M. Marien, *Neuroscience* 89 (1999) 1041.
- [8] G. Cuadra, E. Giacobini, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 273 (1995) 230.
- [9] F. Colpaert, M. Briley, T. Imbert, in *Worldwide Patent WO9500145*, 2000.
- [10] S. Grard, P. Morin, M. Dreux, J.-P. Ribet, *Electrophoresis* 21 (2000) 3028.
- [11] F. Mancini, C. Bertucci, V. Cavrini, M. Bragieri, M.C. Zanotti, A. Liverani, V. Borzatta, V. Andrisano, *J. Chromatogr. A* 1046 (2004) 67.
- [12] F. Cottet, *Traitement du signal*, Dunod, Paris, 2000, pp 100-101.
- [13] M. Bellanger, *Traitement numérique du signal*, 7ème éd., Dunod, Paris, 2002, pp 330-331.
- [14] P.R. Haddad, G.K.C. Low, A.L. Heckenberg, *Chromatographia* 18 (1984) 417.
- [15] D.A. Durden, B.A. Bailey, *J. Chromatogr. A* 368 (1986) 49.
- [16] E.M.E.A. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, in *International Conference of Harmonisation (ICH), Topic, Q3B (R)*, Genève, Suisse, February 2003.
- [17] S. Tellez, F. Colpaert, M. Marien, *European Journal of Pharmacology* 277 (1995) 113.
- [18] R. Ferretti, B. Gallinella, F. La Torre, L. Turchetto, *J. Chromatogr. A* 769 (1997) 231.
- [19] Z.D. Zhai, Y.P. Shi, W. Wang, *Anal. Chim. Acta* 550 (2005) 123.
- [20] R. Cirilli, R. Costi, R. Di Santo, R. Ferretti, F. La Torre, L. Angiolella, M. Micocci, *J. Chromatogr. A* 942 (2002) 107.
- [21] D.R. Bobbitt, S.W. Linder, *Trend. Anal. Chem.* 20 (2001) 111.
- [22] T. Taniguchi, N. Miura, S.-I. Nishimura, *K. Monde, Mol. Nutr. Food Res.* 48 (2004) 246.
- [23] C. Roussel, N. Vanthyune, M. Serradeil-Albalat, J.-C. Vallejos, *J. Chromatogr. A* 995 (2003) 79.
- [24] M.T. Miller, Z. Ge, B. Mao, *Chirality* 14 (2002) 659.
- [25] M.T. Reetz, K.M. Kühling, H. Hinrichs, A. Deege, *Chirality* 12 (2000) 479.
- [26] C. Slijkhuis, K.D. Hartog, C. Van Alphen, L. Blok-Tip, P.M.J.M. Jongen, D. De Kaste, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 905.
- [27] M. Beaufour, P. Morin, J.-P. Ribet, J.-C. Maurizot, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 544.
- [28] A.L. Jenkins, W.A. Hedgepeth, *Chirality* 17 (2005) 24.
- [29] H. Kanazawa, Y. Kunito, K. Matsushima, S. Okubo, F. Mashige, *J. Chromatogr. A* 871 (2000) 181.
- [30] H. Kanazawa, A. Tsubayashi, Y. Nagat, Y. Matsushima, C. Morin, J. Kizu, M. Higaki, *J. Chromatogr. A* 948 (2002) 303.
- [31] H. Takahashi, T. Kashima, S. Kimura, N. Muramoto, H. Nakahata, S. Kubo, Y. Shimoyama, M. Kajiwara, H. Echizen, *J. Chromatogr. B* 701 (1997) 71.

- [32] G. Bringmann, K. Messer, M. Wohlfarth, J. Kraus, K. Dumbuya, M. Rückert, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2678.
- [33] G. Bringmann, S. Tasler, H. Endress, J. Kraus, K. Messer, M. Wohlfarth, W. Lobin, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 2703.
- [34] S. Caccamese, C. Caruso, N. Parrinello, A. Savarino, *J. Chromatogr. A* 1076 (2005) 155.
- [35] R. Cirilli, R. Ferretti, B. Gallinella, L. Zanitti, F. La Torre, *J. Chromatogr. A* 1061 (2004) 27.
- [36] C. Bertucci, V. Andrisano, V. Cavrini, E. Castiglioni, *Chirality* 12 (2000) 84.
- [37] E. Bossu, V. Cotichini, G. Gostoli, A. Farina, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26 (2001) 837.
- [38] M.R. Hadley, G.D. Jonas, *Enantiomer* 5 (1999) 357.
- [39] R.C. Williams, J.F. Edwards, A.S. Joshi, A.-F. Aubry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 501.
- [40] H. Hegedus, A. Gergely, T. Veress, P. Horvath, *Analisis* 27 (1999) 458.
- [41] G. Horvai, J. Fekete, Z. Niegreis, K. Toth, E. Pungor, *J. Chromatogr. A* 385 (1987) 25.
- [42] J. Hartleb, Y. Damm, R. Arndt, E. Christophers, E. Stockfleth, *J. Chromatogr. B* 727 (1999) 31.
- [43] F.D.A. US Food and Drug Administration Federal Register, in, Rockville, Maryland, November 1996.
- [44] N. Matthijs, C. Perrin, M. Maftouh, D.L. Massart, Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. A* 1041 (2004) 119.
- [45] E. Yashima, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 105.
- [46] L.I.N.K. Instruction manual of Low Pass In-Line Noise Killer, The Netherlands, 2005.
- [47] S. Kernbaum, J.-P. Grünfeld, *Dictionnaire de médecine Flammarion*, 7è éd. Flammarion, Paris, 2001.
- [48] G. Mouzin, H. Cousse, B. Bonnaud, M. Morre, A. Stenger, in French Patent FR 2508035, 1982.
- [49] M. Briley, J.-F. Prost, in Worldwide Patent WO036744, 1998.
- [50] J.-F. Prost, A. Tournoux, in French Patent FR 2759290, 1998.
- [51] J. Deregnaucourt, R. Grosse, US Patent (2004) 2.508.035.
- [52] G. Tournel, N. Houdret, V. Hédouin, M. Deveaux, D. Gosset, M. Lhermitte, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 761 (2001) 147.
- [53] L. Labat, M. Deveaux, P. Dallet, J.P. Dubost, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 773 (2002) 17.
- [54] M.P. Doyle, W. Hu, *Adv. Synth. Catal.* 343 (2001) 299.
- [55] A. patti, S. Pedotti, C. Sanfilippo, *Chirality* 20 (2008) 63.
- [56] C. Puozzo, C. Filaquier, *J. Chromatogr. B* 806 (2004) 221.
- [57] R. Mandriolo, M.A. Raggi, *Electrophoresis* 27 (2006) 213.
- [58] M. Lorin, R. Delépée, J.-P. Ribet, J.-C. Maurizot, P. Morin, *Chirality* 19 (2007) 106.
- [59] H. Nishino, A. Kosaka, G.A. Hembury, K. Matsushima, Y. Inoue, *J. Chem. Soc.* 2 (2002) 582.
- [60] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH, C. Perez-Maseda, *Anal. Chim. Acta* 407 (2000) 233.
- [61] M. Lorin, R. Delépée, J.-P. Ribet, P. Morin, *J. Chromatogr. A* 1141 (2007) 244.
- [62] L. Monser, F. Darghouth, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000) 353.

- [63] N. Helali, L. Monser, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 276.
- [64] A. Hazotte, D. Libong, P. Chaminade, *J. Chromatogr. A* 1140 (2007) 131.
- [65] P.Z. Anastasiadis, H. Jiang, L. Bezin, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 9050.
- [66] M.J. Hurley, P. Jenner, *Pharmacol. Therapeut.* 116 (2006) 715.
- [67] A. Schrag, *J. Neurol.* 251 (2004) 795.
- [68] G.D.P. Silveira, F. Coelho, *Tetrahedron Lett.* 46 (2005) 6477.
- [69] R. Pena, J.-P. Ribet, J.L. Maurel, L. Valat, F. Lacoulonche, A. Chauvet, *Thermochim. Acta* 408 (2003) 85.
- [70] E. Lipka-Belloli, V. Glaçon, G. Mackenzie, D. Ewing, C. Len, C. Vaccher, J.-P. Bonter, *J. Chromatogr. A* 972 (2002) 211.
- [71] H.Y. Aboul-Enein, I. Ali, G. Gûbitz, C. Simons, P.J. Nicholls, *Chirality* 12 (2000) 727.
- [72] A. Péter, A. Arki, E. Forro, F. Fülöp, D.W. Armstrong, *Chirality* 17 (2005) 193.
- [73] C.J. Welch, M.H. Kress, M. Beconi, D.J. Mathre, *Chirality* 143 (2003).
- [74] S. Rudaz, J.-L. Veuthey, *Chirality* 11 (1999) 319.
- [75] K. Kudo, K. Iwaya, C. Yomota, S. Morris, M. Saito, *Enantiomer* 5 (2000) 369.
- [76] J. Caporal-Gauthier, J.M. Nivet, P. Algranti, M. Guilloteau, M. Histe, J.J. N'Guyen-Huu, R. Russotto, *STP Pharma Pratiques* 2 (1992) 205.
- [77] E.L. Eliel, *Chirality* 9 (1997) 428.
- [78] I.C.H. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, in Q2B: Validation of analytical procedures: methodology, Genève, Suisse, May 1997.
- [79] A.D. Lopez, C.J.L. Murray, *Nature Medicine* 4 (1998) 1241.
- [80] B. Swynghedauw, P. Beaufils, *Le coeur: fonctionnement, dysfonctionnement et traitement*, éd. INSERM, Nathan, Paris, pp 61-64, 1995.
- [81] P. Godeau, *La cardiologie du praticien*, éd. Frison-Roche, Paris, 2005, p 59.
- [82] B. Vacher, F. Castant-Cuisiat, G. John, B. Legrand, in *WIPO Patent WO/2002/081464A1*, 2002.
- [83] M. Beaufour, P. Morin, J.-P. Ribet, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 529.
- [84] M.C. Nunez, F. Rodriguez-Serrano, J.A. Marchal, O. Caba, A. Aranega, M.A. Gallo, A. Espinosa, J.M. Campos, *Tetrahedron* 63 (2007) 183.
- [85] W.E. Blondinell, J.F. Callahan, W.F. Huffman, R.M. Keenan, T.W.-F. Ku, K.A. Newlander, in *World Patent 93/00095*, 1993.
- [86] L. Bonsignore, G. Loy, D. Secci, A. Delogu, G. Palmieri, *Il Pharmaco* 45 (1990) 1245.
- [87] M. Kori, K. Kamiya, E. Kurihara, H. Sugihara, *Chem. Bull. Pharm.* 39 (1991) 922.
- [88] H. Sugihara, H. Mabuchi, M. Hirata, T. Imamoto, Y. Yawamatsu, *Chem. Bull. Pharm.* 39 (1987) 922.
- [89] T. Ogawa, T. Deguchi, in *Eur. Pat. EP0667156*, 1995.
- [90] H. Yin, N.A. Porter, J.D. Morrow, *J. Chromatogr. B* 827 (2005) 157.
- [91] M. Yang, S. Fazio, D. Munch, P. Drumm, *J. Chromatogr. A* 1097 (2005) 124.
- [92] L.A. Riddle, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1137 (2006) 173.
- [93] B.J. Bassler, R.A. Hartwick, *J. Chromatogr. Sci.* 27 (1989) 162.
- [94] A. Salvador, B. Herbreteau, P. Breton, D. Roy, P. Brigand, N. Bru, M. Dreux, *Anal. Chim. Acta* 359 (1998) 57.
- [95] A. Kwaterczak, A. Bielejewska, *Anal. Chim. Acta* 537 (2005) 41.
- [96] A.M. Edge, S. Shillingford, C. Smith, R. Payne, I.D. Wilson, *J. Chromatogr. A* 1132 (2006) 206.

## *CHAPITRE 3*

---

**ANALYSE CHIRALE DE PRODUITS PHYTOSANITAIRES ET  
DEVELOPPEMENT DU DETECTEUR CONDUCTIMETRIQUE EN  
ELECTROPHORESE CAPILLAIRE**



## Chapitre 3

---

# ANALYSE CHIRALE DE PRODUITS PHYTOSANITAIRES ET DEVELOPPEMENT DU DETECTEUR CONDUCTIMETRIQUE EN ELECTROPHORESE CAPILLAIRE

## **I. Introduction**

L'électrophorèse capillaire est une technique séparative qui offre de nombreux atouts : le coût des colonnes et la consommation en solvant sont minimisés, les temps de séparation sont courts, et le volume d'injection de quelques nanolitres permet l'analyse d'échantillons de taille réduite (fluides biologiques).

L'un des principaux champs d'applications de l'EC concerne l'analyse chirale de principes actifs pharmaceutiques, de pesticides, de catalyseurs chiraux [1]. La majorité des exemples décrits dans la littérature rapportent la séparation de composés chiraux dont l'asymétrie moléculaire est introduite par la présence d'un atome de carbone asymétrique [2]. En revanche, peu de travaux relatent la séparation en EC de composés possédant des hétéroatomes asymétriques [3-7].

Dans la première partie de ce chapitre, nous évaluerons l'aptitude de l'électrophorèse capillaire pour séparer des énantiomères de produits phytosanitaires possédant des atomes de soufre ou de phosphore asymétriques. Le choix des sélecteurs chiraux et de la composition du tampon électrophorétique seront discutés et adaptés en fonction des propriétés physico-chimiques des pesticides analysés. Puis, nous optimiserons la séparation énantiosélective et simultanée des stéréoisomères d'un pesticide organophosphoré (le fenamiphos) et de ses deux métabolites chiraux. Cette méthode sera, par la suite, adaptée à l'analyse de ces composés dans des échantillons de sol.

La deuxième partie de ce chapitre présentera les potentialités du détecteur conductimétrique sans contact à couplage capacitif (C<sup>4</sup>D) pour la quantification de la pureté énantiomérique d'amines dépourvues de groupements chromophores. Les performances de ce mode de détection seront comparées à celles de la détection UV en mode indirect.

## II. Séparation énantiosélective de pesticides possédant des atomes de phosphore et/ou de soufre comme centres d'asymétrie en EC

### II.1. Présentation générale des produits phytosanitaires

#### II.1.1. Les principales familles de pesticides

Les composés phytosanitaires, plus communément appelés pesticides (OP), constituent une famille très hétérogène de substances dont les propriétés physiques, chimiques et biologiques, permettent de détruire ou de limiter le développement et la croissance d'organismes vivants [8].

Ces substances ont des domaines d'utilisation très variés et ont pour buts [9] :

- de protéger les cultures et les récoltes contre leurs ennemis,
- d'assainir les locaux, matériels utilisés pour l'élevage des animaux domestiques,
- d'exercer une action physiologique sur la croissance des végétaux,
- de protéger l'homme contre les insectes.

En agriculture, les produits phytosanitaires se classent selon la nature de l'organisme vivant que l'on veut contrôler. Traditionnellement, trois classes principales de pesticides se distinguent :

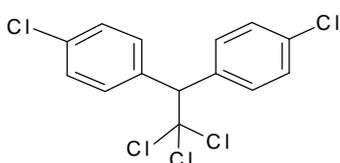
- les **herbicides**, comprennent les groupes des amides, acides aryloxyalkanoïques, diphényléthers, urées, sulfonilurées, triazines, carbamates,
- les **fongicides**, comptent les azoles, pyrimidines, imides cycliques et certains carbamates, thiocarbamates et amines,
- les **insecticides**, représentés essentiellement par les pyréthrinoïdes, les organochlorés, les organophosphorés et les carbamates.

Les autres pesticides, tels que les bactéricides, molluscides (contre les limaces), nématocides (contre les vers), rodenticides (contre les taupes et les rongeurs) et corvicides (contre les oiseaux ravageurs), ne représentent qu'une faible part du marché des produits phytosanitaires.

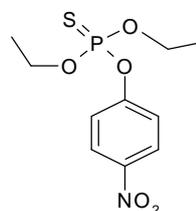
### **II.1.2. Classification des insecticides**

Les insecticides dévoilent une extraordinaire diversité de structures chimiques (*Figure III.1*). Certains d'entre eux, utilisés depuis l'antiquité, sont issus de produits naturels comme le fluor, l'arsenic ou la nicotine. Le dioxyde de soufre était également utilisé par fumigation pour le traitement des fruits. L'ère des insecticides de synthèse débute dans les années 1930 avec le développement de techniques modernes de synthèse organique. A ce jour, il existe plusieurs classes de composés parmi lesquelles les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates et les pyréthriinoïdes.

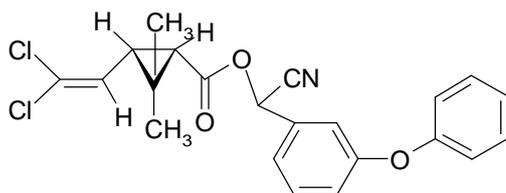
#### **Insecticides issus de la chimie moderne**



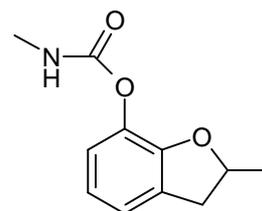
**DDT (1873)**  
*organochloré*



**Parathion**  
*organophosphoré*



**Cyperméthrine**  
*pyréthriinoïde*



**Décarbofuranne**  
*carbamate*

**Figure III.1 :** Quelques exemples d'insecticides naturels ou issus de la chimie moderne.

Dans ce chapitre, seront abordés plus particulièrement les insecticides organophosphorés.

### **II.1.3. Les insecticides organophosphorés**

Les premiers composés organophosphorés ont été développés en Allemagne comme gaz de combat durant la seconde guerre mondiale. Tous les pesticides organophosphorés utilisés en agriculture sont des descendants directs de ces agents de

guerre. Depuis ces dernières années, les organophosphorés constituent la classe des produits insecticides la plus répandue. On dénombre 150 différentes structures dont 62 d'entre elles représentent plus de la moitié des ventes en insecticide avec un marché mondial de 8 milliards de dollars [10]. Bien qu'ils soient plus toxiques que les organochlorés, ils présentent l'avantage d'être dégradés par hydrolyse en des métabolites peu toxiques, qui ne s'accumulent ni dans la chaîne alimentaire, ni dans l'environnement.

D'un point de vue structurale, la majorité des composés organophosphorés possèdent un atome de phosphore pentavalent avec une liaison P=O ou P=S et trois substituants (généralement deux groupements alkyles ou alkoxy et une fonction hydrolysable (NH<sub>2</sub>, OH)) (*Figure III.2*).



**Figure III.2 : Structure générale des composés organophosphorés : formule de Schrader [9].**

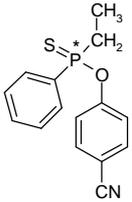
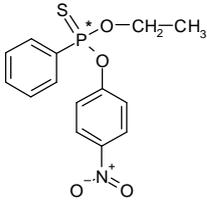
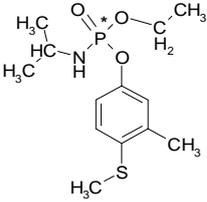
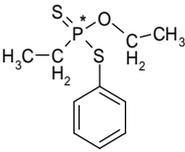
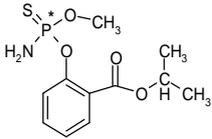
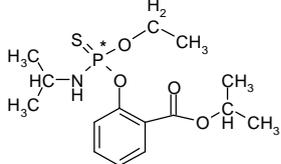
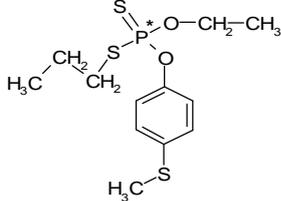
où R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> sont des radicaux alkoxy ou amino et X est un groupement hydrolysable.

Lorsque les trois substituants (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> et X) sont différents, l'atome de phosphore devient asymétrique et la molécule chirale possède deux énantiomères.

A ce jour, 37 pesticides organophosphorés commercialisés sont chiraux : 70% d'entre eux possèdent un phosphore asymétrique, dans 24 % un carbone asymétrique et 6 % un soufre asymétrique via une fonction sulfoxyde.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons, plus particulièrement, à la séparation par EC des énantiomères de quelques pesticides organophosphorés possédant un atome asymétrique de phosphore (*Tableau III.1*).

**Tableau III.1 : Structures et propriétés physico-chimiques de quelques pesticides organophosphorés étudiés.**

Nom	Structure	Masse molaire (g.mol <sup>-1</sup> )	S <sub>w</sub> * (mg.L <sup>-1</sup> à 25°C) [11]	log P [12] / [11]
Cyanofenphos		303,32	0,6	4,29 / 2,81
EPN		323,31	3,11	4,78 / 4,51
Fenamiphos		230,33	329,0	3,23 / 3,36
Fonophos		246,33	15,7	3,94 / 4,26
Isocarbophos		289,29	70,1	2,70 / 3,27
Isofenphos		345,43	22,1	4,12 / 5,25
Sulprophos		322,43	0,31	5,48 / 5,54

\*S<sub>w</sub> : solubilité dans l'eau.

Bien que de structure chimique voisine, les insecticides organophosphorés étudiés ont des propriétés physico-chimiques très différentes. Par exemple, leurs valeurs de solubilité dans l'eau très hétérogènes, comprises entre 0,31 et 329 mg.L<sup>-1</sup>, permettent de les classer en trois familles :

- solubilité faible ( $0,31 < S_w < 5,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) comme les sulprofos, cyanofenphos, EPN,
- solubilité moyenne ( $15,7 < S_w < 22,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) comme les fonophos et isofenphos,
- solubilité forte ( $70,1 < S_w < 329 \text{ mg.L}^{-1}$ ) comme l'isocarbophos et le fenamiphos.

Pour la plupart des OP étudiés, les valeurs de logP sont fortement corrélées avec leur solubilité dans l'eau et sont comprises entre 2,70 et 5,48. Ainsi, toutes ces molécules ont une nature hydrophobe qui sera mise à profit lors de l'inclusion dans une cyclodextrine.

#### **II.1.4. Problèmes liés à l'utilisation des pesticides organophosphorés**

##### *a) Ecotoxicité*

Les produits phytosanitaires sont largement utilisés dans l'agriculture (74 500 tonnes en 2003 en France [13]). Suivant les conditions météorologiques et les protocoles de traitement, on estime que 25 à 75 % des produits phytosanitaires n'atteignent pas les cultures, dérivent et se déposent sur une zone géographique plus ou moins éloignée. Par ailleurs, aucun pesticide n'étant totalement spécifique d'un nuisible, toutes ces substances sont donc écotoxiques, et présentent une disparité des effets potentiels en fonction des cibles et des modes d'action particuliers. La pollution des milieux terrestres résulte d'une accumulation des pesticides dans les végétaux et dans les eaux de ruissellement, et qui peut avoir une incidence sur la chaîne alimentaire.

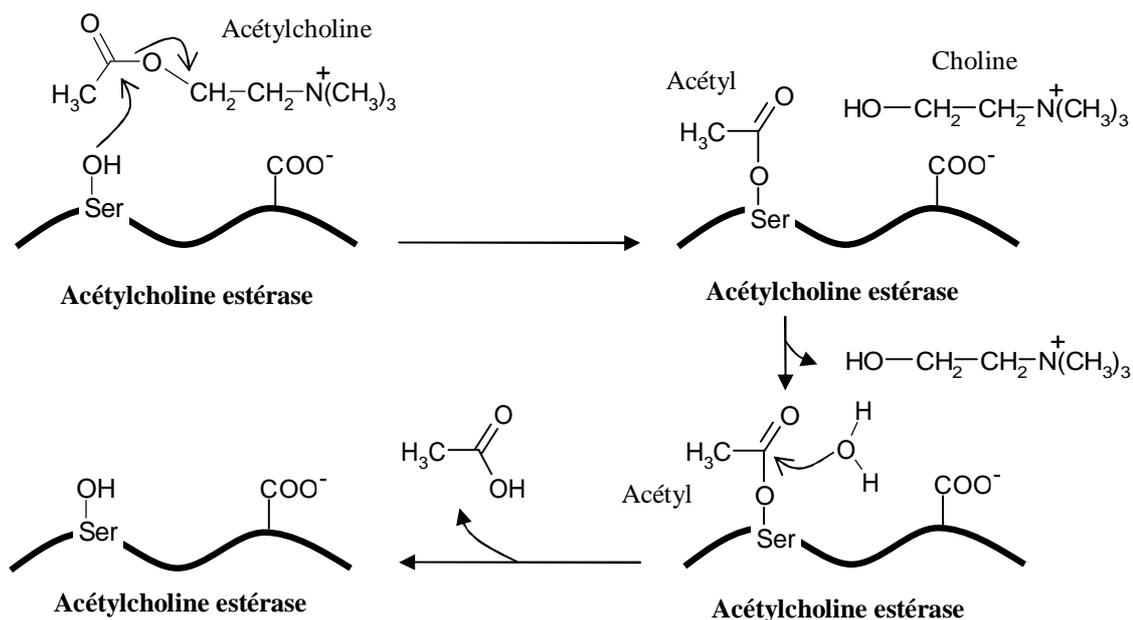
L'épandage massif des produits phytosanitaires n'a réellement eu lieu que depuis le développement d'engins agricoles performants dans les années 1940. Ainsi, l'utilisation intensive des pesticides est effective depuis 60 ans et les répercussions biologiques à long terme ne sont pas connues.

*b) Effets sur la santé humaine*

Les effets les plus néfastes des OP pour l'homme sont liés à des intoxications aiguës ou chroniques par inhalation ou contact cutané. Les agriculteurs sont les principales victimes.

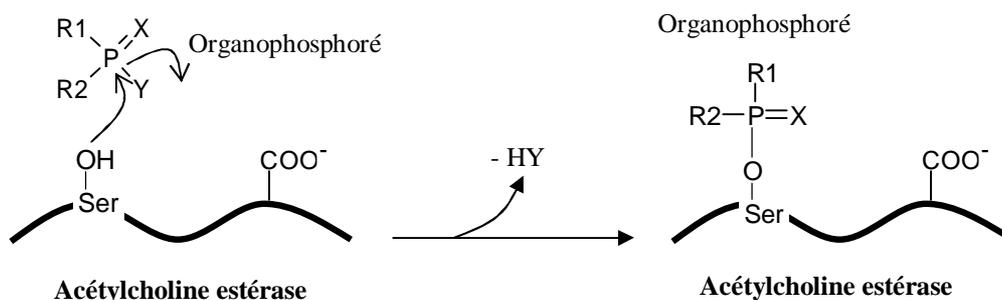
Les pesticides organophosphorés sont des neurotoxines s'attaquant au système nerveux et notamment, au niveau de synapses cholinergiques. L'acétylcholine est un neurotransmetteur qui intervient dans de nombreux processus physiologiques tels que la mémoire, la pression artérielle, la contraction des bronches et de l'estomac [14]. Cependant afin d'éviter l'excitation continue du neurone post-synaptique et pour permettre la transmission d'un autre influx nerveux, l'acétylcholine doit être rapidement détruite. Le processus de dégradation du neurotransmetteur est assuré par une enzyme appelée acétylcholine estérase et comprend quatre étapes (*Figure III.3*) :

- l'acétylcholine se fixe sur le site actif de l'enzyme (sérine),
- la choline est ainsi libérée,
- le groupe acétyl est ensuite hydrolysé.
- la fonction acétyl et la choline libérées sont recyclées pour redonner une molécule d'acétylcholine.



**Figure III.3 :** Processus de dégradation de l'acétylcholine [15].

Les effets insecticide et toxique des organophosphorés résultent de l'inhibition de l'acétylcholine estérase, laquelle devient inactive par phosphorylation du résidu sérine du site actif (Figure III.4). L'acétylcholine ne se dégrade pas et son temps de demi-vie est de quelques dizaines de jours. Les symptômes d'une exposition prolongée aux organophosphorés sont des vertiges, vomissements, attaques cardiaques, paralysies, pertes des fonctions mentales et, éventuellement, la mort [16].



**Figure III.4 :** Inhibition du site actif de l'acétylcholine estérase par un pesticide organophosphoré.

### c) Activité insecticide et chiralité

Un quart des composés organophosphorés, issus de l'industrie agrochimique, possèdent un ou plusieurs centres d'asymétrie. La plupart d'entre eux, sont commercialisés sous leur forme racémique [17]. Cependant, l'activité biologique de certains d'entre eux réside principalement dans un seul des deux énantiomères.

Ainsi, les énantiomères de configuration (*R*) du cyanofenphos [18], de l'isofenphos [19], de l'acéphate et du metamidophos [20] sont plus actifs que les énantiomères de configuration (*S*). Par ailleurs, l'énantiomère *dextrogyre* du fenamiphos est vingt fois plus toxique que l'isomère *levogyre* [21], pour une activité inhibitrice de l'acétylcholine estérase seulement quatre fois plus grande. Dans les deux cas, l'utilisation privilégiée de l'un des deux énantiomères permet de diminuer les quantités épandues afin de limiter la pollution des sols et des milieux aquatiques.

Le développement de méthodes d'analyses rapides et précises des énantiomères d'OP de synthèse devient donc de première nécessité, afin de contrôler la production dans les industries agroalimentaires, mais également, de suivre la dégradation de ces pesticides dans l'environnement.

## **II.2. Méthodes d'analyse des pesticides organophosphorés**

### **II.2.1. La chromatographie en phase gazeuse**

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique de choix pour l'analyse de composés volatils. Son développement est dû à sa sensibilité, sa polyvalence et à la rapidité de mise au point de nouvelles analyses. De plus, le choix judicieux du détecteur (universel ou spécifique) permet d'atteindre des seuils de quantification faibles.

Seuls les OP aliphatiques (masse molaire peu élevée,  $T_{éb} < 160^{\circ}\text{C}$ ) sont des composés volatils, analysables par CPG. Les travaux de Fidalgo-Used *et al.* [22] ont montré la séparation de douze OP dont la chiralité était induite par la présence d'atomes de phosphore ou de carbone asymétriques. Ces composés ont été séparés sur une colonne capillaire de silice fondue greffée heptakis (2,3,6-tri-O-méthyl)- $\beta$ -cyclodextrine puis, détectés par un détecteur à ionisation de flamme. La présence d'atomes de brome ou de chlore sur les pesticides trichlorfon, naled, chloretoxyphos et ruélène a permis l'utilisation d'un détecteur à capture d'électrons avec des seuils de détection faibles (1,5 – 11,5 ng.mL<sup>-1</sup>). Des résultats similaires ont été obtenus sur une colonne capillaire greffée 2,3-di-O-méthyl- $\beta$ -cyclodextrine [23]. La séparation des énantiomères d'OP aromatiques a été également possible en CPG, mais avec des temps d'analyse longs (50 – 200 min) [22,24].

### **II.2.2. La chromatographie en phase liquide**

La chromatographie en phase liquide est l'une des techniques les plus utilisées pour la résolution des énantiomères. Sa popularité est due au vaste panel de phases stationnaires commercialement disponibles. De part leur diversité, les greffons chiraux ont un avantage indéniable puisqu'ils permettent de résoudre la plupart des énantiomères. En revanche, la mise au point d'une séparation peut être longue et fastidieuse, si les colonnes testées ne sont pas adaptées à la structure des analytes à séparer.

La littérature décrit principalement l'utilisation de deux familles de supports chiraux pour résoudre les énantiomères d'OP : les phases stationnaires de type Pirkle et les supports polysaccharidiques. Les OP aromatiques, tels que le fenamiphos [21] ou des

dérivés de synthèse [25-27], ont ainsi été résolus en polarité normale sur des PSC de type Pirkle.

La sélectivité et l'efficacité des phases stationnaires polysaccharidiques offrent un vaste potentiel d'investigation. Les résultats présentés dans le *tableau III.2* confirment le choix de tels supports pour la résolution des OP.

**Tableau III.2 : Analyse chirale de composés organophosphorés en chromatographie en phase liquide avec une détection UV.**

Analyte	Matrice	Conditions chromatographiques	l (nm)	Réf.
fenamiphos	standard	- colonne : <b>(S,S)-Whelk-O1</b> <b>(R,R)-Whelk-O1</b> (Regis Technologies, USA) - phase mobile: n-hexane / 2-PrOH - 95:5 (v/v) $\alpha$ : 1,7 - 1,8    Rs : 2,2 - 2,7 durée : <b>16 min</b>	210	[21]
5 phosphoramido-tioates	standard	- colonne : <b>Sumichiral OA-4700 (Chirex(S)-LEU et (R)-NEA)</b> (S)- tert-leucine-(R)-[1-(1-naphtyl)éthyl]urée 250 x 4,6 mm, 10 $\mu$ m (Pirkle, Phenomenex, Japon) - phase mobile : n-hexane / éther diéthylique / 1,2-dichloroéthane $\alpha$ : 1,13 - 1,22 durée : <b>5 - 10 min</b>	230	[26]
14 phosphoramido-tioates	standard	- colonne : <b>Sumichiral OA-4700 (Chirex(S)-LEU et (R)-NEA)</b> 250 x 4,6 mm, 10 $\mu$ m (Pirkle, Phenomenex, Japon) - phase mobile : n-hexane / 2-PrOH n-hexane / CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> n-hexane / CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / EtOH ou i-PrOH ou THF $\alpha$ : 1,06 - 1,31 durée : <b>5 - 10 min</b>	254	[28]

**Tableau III.2 : Analyse chirale de composés organophosphorés en chromatographie en phase liquide avec une détection UV (suite).**

crotoxyphos dialifor fensulothion malathion crufomate trichloronate prothiophos fonophos fenamiphos isofenphos dethamidophos profenofos	standard	- colonnes <b>polysaccharidiques</b> (250 x 4,6 mm, 10 µm) ( <i>Daicel, Japon</i> ) <b>OJ</b> : cellulose tris(4-méthyl benzoate) <b>OD</b> : cellulose tris(3,5-diméthylphényl carbamate) <b>OG</b> : cellulose tris(4-méthylphényl carbamate) <b>AD</b> : amylose tris(3,5-diméthylphényl carbamate) <b>AS</b> : amylose tris((S)-1- phényléthyl carbamate) - phase mobile : n-heptane / EtOH  $\alpha$ : 1,10 - 1,80 $R_s$ : 0,90 - 5,64 durée : <b>8 - 50 min</b>	200 - 220	[29]
profenofos malathion methamidophos acephate	standard	- colonne : <b>CDMPC</b> : cellulose tris(3,5-diméthylphénylcarbamate) (250 x 4,6 mm) ( <i>développée par les auteurs</i> ) - phase mobile : n-hexane / iPrOH n-hexane / iBuOH  $\alpha$ : 1,10 - 1,30 $R_s$ : 1,35 - 1,54 durée : <b>12 - 40 min</b>	220 - 225	[25]
trichloronate	standard	- colonne : <b>OJ</b> ( <i>Daicel, Japon</i> ) (250 x 4,6 mm, 5µm) - phase mobile : n-hexane / n-heptane / EtOH - 90:5:5 (v/v/v)  $\alpha$ : 1,40 $R_s$ : 4,03 durée : <b>18 min</b>	300	[30]

### II.2.3. L'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire est une technique reconnue pour la séparation d'énantiomères de molécules pharmaceutiques. La littérature indique quelques études relatives à la séparation d'OP chiraux par EC. Ainsi, les énantiomères du malathion, du ruélène et du dialifos ont été séparés en MEKC avec un électrolyte constitué d'un tampon borate de sodium (20 mM, pH 9) en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) (100 mM) et d'hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine (60 mM) [31]. La séparation a été réalisée avec une tension positive et la détection UV a eu lieu à 200 nm. Les solutés neutres s'insèrent dans le cœur hydrophobe de la micelle et migrent dans le sens opposé au FEO. L'addition de molécules de cyclodextrine dans le tampon déplace la distribution du soluté de la micelle vers la phase aqueuse contenant les cyclodextrines hydrosolubles, et favorise la

résolution énantiomérique. Un résultat similaire est obtenu par l'ajout de modificateur organique (20 % MeOH) dans le tampon en favorisant la solubilisation des analytes. Ainsi, les énantiomères du dialifos ont été totalement résolus ( $R_s > 1,5$ ) en 7 min, alors qu'une séparation partielle est obtenue pour le malathion et le ruélène. Quelles que soient les conditions expérimentales envisagées (nature et teneur en CD), les énantiomères du fenamiphos et de l'isofenphos n'ont pu être résolus.

Une approche similaire a été envisagée par Jarman *et al.* [32] lors d'une étude de dégradation du fonofos dans des échantillons de sol. Toutefois, malgré l'ajout de  $\gamma$ -CD (40 mM), de SDS (100 mM) et de 15% d'ACN au tampon borate de sodium (30 mM, pH 8,5), seule la résolution partielle des énantiomères du fonofos ( $R_s = 0,8$ ) a été obtenue en un temps d'analyse relativement long (34 min).

Anigbogu *et al.* [33] ont développé une étude beaucoup plus complexe pour résoudre les énantiomères d'organophosphoramidates peu hydrosolubles. Ces composés ont été analysés en EC dans un tampon constitué de CD neutre et anionique, en présence d'un surfactant. Ces conditions combinent les avantages liés à l'électrophorèse micellaire (MECK) et à l'addition conjointe de CD en mode dual. Ainsi, les énantiomères du malathion et du fensulfothion ont été séparés, avec succès, dans un électrolyte constitué du tampon borate (20 mM, pH 8,6), des micelles de SDS (10 – 70 mM) et des sélecteurs chiraux hydroxypropyl- $\beta$ -CD (40 – 45 mM) et carboxyméthyl- $\beta$ -CD (10 mM). Cependant, le nombre important de paramètres contrôlant la qualité de la séparation nécessite une mise au point longue et fastidieuse.

L'électrophorèse capillaire de zone (CZE) en présence de cyclodextrines anioniques est une méthode d'analyse, plus conventionnelle et plus simple, à mettre en œuvre. Les énantiomères de huit insecticides organophosphorés dont, le fenamiphos, le phenthoate, le malathion et l'isomalathion ont ainsi été analysés en milieu aqueux (tampon TRIS 25 mM, pH 7) en présence de 20 mM de carboxyméthyl- $\beta$ -CD [4]. Cependant, la résolution énantiomérique partielle obtenue, pour chacun des pesticides étudiés, n'a pas permis leur étude quantitative. Tous les paramètres électrophorétiques n'ayant pas été optimisés, cette méthode laisse un large champ d'investigations afin d'obtenir la séparation totale des OP présentés dans le *tableau III.2*.

Dans ce chapitre, notre intention a été d'évaluer l'aptitude de l'électrophorèse capillaire à séparer des énantiomères de plusieurs produits phytosanitaires, possédant des atomes de phosphore ou de soufre comme centres d'asymétrie. Le choix des sélecteurs chiraux et la composition de l'électrolyte de séparation seront discutés et adaptés en fonction des propriétés physico-chimiques des pesticides analysés. Puis, nous optimiserons la séparation simultanée des stéréoisomères du fenamiphos et de ses deux métabolites chiraux. Cette méthode sera pré-validée et pourra par la suite être adaptée à l'analyse de ces pesticides dans des échantillons de sol.

### **II.3. Article 5 : Séparation des énantiomères de pesticides possédant des atomes de phosphore et/ou de soufre chiraux par électrophorèse capillaire**

#### **Spectra Analyse 261 (2008) 19-27**

Marie Lecoœur-Lorin<sup>1</sup>, Raphaël Delépée<sup>1</sup>, Philippe Morin<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>*Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA)-UMR CNRS 6005, Université d'Orléans – 45067 Orléans – E-Mail : [philippe.morin@univ-orleans.fr](mailto:philippe.morin@univ-orleans.fr) – Tél. : 02 38 49 45 90*

#### **Résumé**

Les pesticides organophosphorés sont des composés largement utilisés dans l'agriculture en tant qu'insecticide, fongicide, herbicide, nématicide et acaricide. Une partie de ces pesticides est chirale avec des atomes de carbone, phosphore et soufre comme centre d'asymétrie. La séparation des énantiomères des pesticides organophosphorés est essentielle dans les études d'activité biologique et de dégradation dans l'environnement.

L'électrophorèse capillaire est une technique analytique bien adaptée à la séparation des énantiomères de ces pesticides chiraux. Les cyclodextrines hautement sulfatées sont souvent utilisées comme agent de reconnaissance chirale.

Toutefois, la séparation simultanée de tous les stéréoisomères d'un pesticide et de ses métabolites chiraux n'a été réussie que grâce à l'utilisation d'un système à deux cyclodextrines, l'une anionique qui joue le rôle de vecteur de migration, et l'autre neutre qui crée la reconnaissance chirale. Les paramètres à optimiser sont principalement les concentrations des deux agents chiraux.

Le protocole d'analyse mis au point permet le suivi quantitatif de la biodégradation de ce pesticide en ses métabolites dans un échantillon de sol.

*Mots-clés* : Électrophorèse capillaire, pesticide chirale, fenamiphos, triticonazole, triadimenol, énantiomère, phosphore chirale, soufre chirale, cyclodextrine.

## Summary

Organophosphorus pesticides are widely used in agriculture as insecticide, fungicide, herbicide, nematicide and acaricide. Some of them are chiral and possess one or several atoms (carbon, phosphorus or sulphur) as stereogenic chiral centers. The separation of enantiomers of organophosphorus pesticides is essential in bioactivity and biodegradation studies in the environment.

Capillary electrophoresis is an analytical technique well suited to the enantioseparation of chiral pesticides. Highly sulfated cyclodextrins are often used as chiral recognition agents.

However, the simultaneous separation of all stereoisomers of a pesticide and its chiral metabolites has been successfully achieved because of the use of a dual cyclodextrin system (one anionic cyclodextrin for the electromigration of neutral organophosphorus pesticides, and one neutral cyclodextrin for the chiral recognition). The main optimization parameters are concentrations of two cyclodextrins.

*Keywords:* Capillary electrophoresis, chiral pesticide, fenamiphos, triticonazole, triadimenol, enantiomeric separation, chiral phosphorus atom, chiral sulfur atom, cyclodextrin

### **II.3.1. Introduction**

Les pesticides organophosphorés (OP) sont largement utilisés dans l'agriculture et l'on dénombre environ 75 de ces composés utilisés en tant qu'insecticide (acephate, chlorfenvinphos, diazinon, dichlorvos, fenitrothion, fenthion, malathion, mevinphos, naled, parathion), nématocide (cadusaphos, fenamiphos, fosthiazate), acaricide (quinalphos, phosmet), fongicide (edifenphos, fosetyl, iprobenfos, pyrazophos) et herbicide (bensulide, bilanofos, butamifos, glyphosate, glufosinate) [34]. Les matières actives organophosphorés représentent environ un cinquième du marché des insecticides, avec pour les plus rencontrés le chlopyriphos, l'acephate, le profenophos, le methamidophos, le dimethoate, le malathion, le glufosinate et bien sûr, le glyphosate lequel s'impose comme l'herbicide le plus vendu dans le monde.

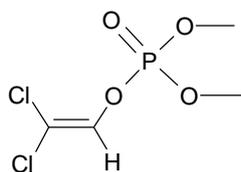
Une partie d'entre eux, environ 20 %, sont chiraux [35] et possèdent un ou plusieurs centre(s) d'asymétrie (phosphore, carbone), comme indiqué dans la *Figure III.5*. Les 12 OP représentent une large gamme de fonctionnalités possibles du phosphore pentavalent : phosphate (dichlorvos), phosphoroamidate (fenamiphos), phosphoroamidothioate (methamidophos), phosphorothioate (profenophos) et phosphorodithioate (prothiophos). De plus, la chaîne latérale de ces pesticides organophosphorés contient souvent un groupement sulfure dont l'atome de soufre peut devenir un centre d'asymétrie dans leur métabolite sulfoxyde.

D'un point de vue structurale, les pesticides organophosphorés possèdent souvent un phosphore pentavalent avec une liaison P=O (ou P=S) et trois groupements substituants (*Figure III.5*). Lorsque les trois substituants ( $R_1$ ,  $R_2$  et  $R_3$ ) sont différents, l'atome de phosphore devient chiral et donne naissance à deux énantiomères. Leur activité biologique peut dépendre de la configuration absolue de leur centre d'asymétrie et l'une des formes peut être plus active que l'autre. Ainsi, la forme R a une plus grande activité que la forme S pour les OP suivants : cyanofenfos, isofenphos, methamidophos et acéphate [36]. D'autre part, leur toxicité peut différer selon l'énantiomère comme pour le fenamiphos [21].

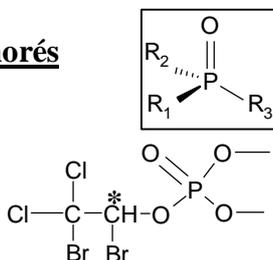
La séparation des énantiomères des OP est donc essentielle dans l'étude de leur bioactivité et dans la compréhension de leur biodégradation dans l'environnement. A ce jour, de nombreuses séparations ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse sur support greffé par des cyclodextrines [23,24] et des acides aminés dérivés [22] ou en chromatographie en phase liquide en utilisant des phases stationnaires chirales à base de cellulose, d'amylose [25,29] ou de type Pirkle [21].

L'électrophorèse capillaire (EC) est une méthode de référence pour la séparation d'énantiomères de molécules pharmaceutiques, de drogues chirales et aussi de pesticides. Le principe de l'électrophorèse capillaire repose sur la séparation de molécules chargées électriquement sous l'influence d'un champ électrique intense, dans un tube capillaire en silice fondue (50  $\mu\text{m}$  d.i.) rempli d'un électrolyte.

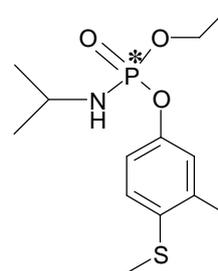
**Pesticides organophosphorés**



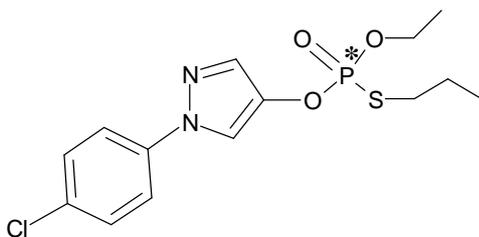
**Dichlorvos (I, A)**



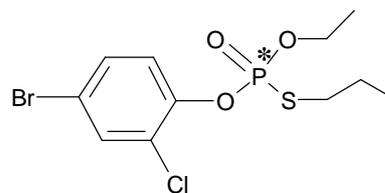
**Naled (I, A)**



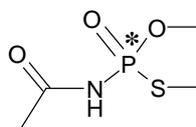
**Fenamiphos (N)**



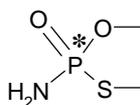
**Pyraclofos (I)**



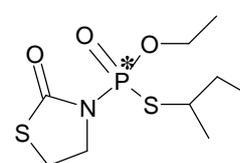
**Profenophos (I,A)**



**Acephate (I)**

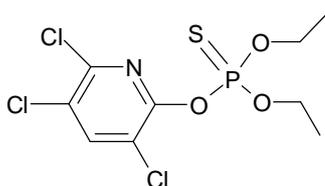


**Methamidophos (I,A)**

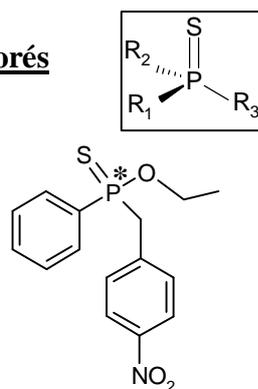


**Fosthiazate (N, I)**

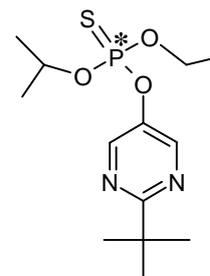
**Pesticides organothiophosphorés**



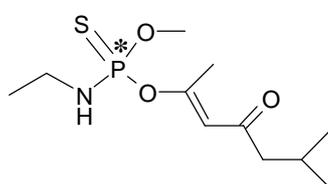
**Chlorpyrifos (I)**



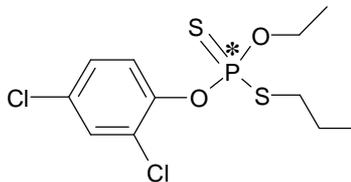
**EPN (I, A)**



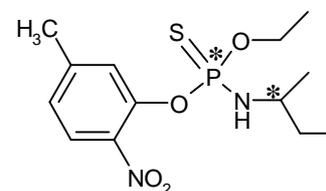
**Tebupirimphos (I)**



**Propetamphos (I, A)**



**Prothiofos (I)**



**Butamifos (H)**

**Figure III.5 : Formules de quelques pesticides organophosphorés ou organothiophosphorés.**

A : acaricide ; F : fongicide ; H : herbicide ; I : insecticide ; N : nématicide.

Les sélecteurs chiraux les plus utilisés en EC sont les cyclodextrines (CD). Ce sont des oligosaccharides cycliques constitués de 6, 7 ou 8 unités glucose respectivement pour l' $\alpha$ -CD, la  $\beta$ -CD et la  $\gamma$ -CD. Ces molécules-cages possèdent une partie extérieure hydrophile et une cavité hydrophobe, et forment des complexes d'inclusion réversibles avec le soluté. Elles sont stables dans la gamme usuelle de pH 2 à 13. Le mécanisme de reconnaissance chirale fait intervenir plusieurs types d'interactions intermoléculaires entre les énantiomères de l'analyte et la CD, telles que, les interactions hydrophobes (lors de l'inclusion partielle ou totale du soluté dans la cavité chirale), les liaisons hydrogène entre les substituants proches du centre asymétrique du soluté inclus dans la CD et les hydrogènes secondaires de la CD, et des interactions stériques.

En milieu non complexant (concentration nulle ou faible en CD), les énantiomères d'un soluté sont majoritairement sous leur forme libre et migrent à la même vitesse électrophorétique. En milieu complexant (concentration moyenne ou forte en CD), les énantiomères sont plus ou moins inclus dans la cavité de la cyclodextrine selon la valeur de la constante de complexation et migrent à des vitesses électrophorétiques différentes.

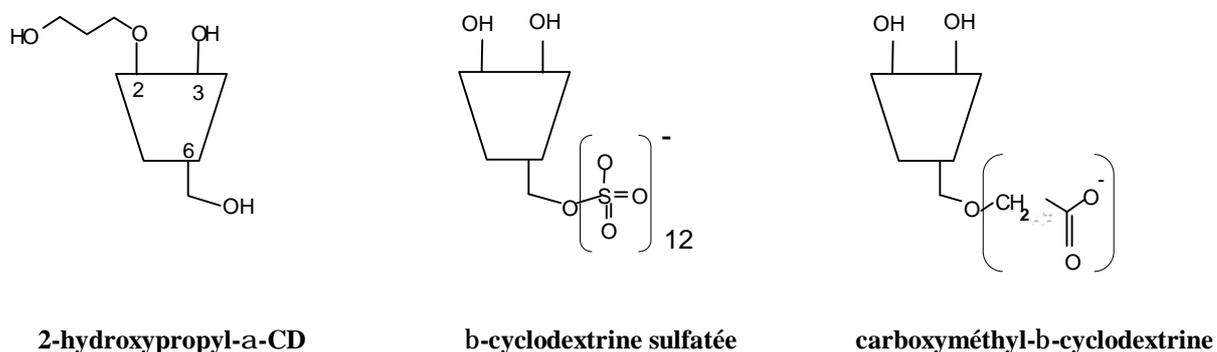
Les séparations sont simples (la CD est ajoutée au tampon électrophorétique), économiques (utilisation d'une colonne constituée par un simple capillaire de silice fondue, consommation réduite en sélecteur chiral) et souples (possibilité d'inverser l'ordre de migration des énantiomères).

L'amélioration de la séparation des énantiomères repose sur le choix judicieux des paramètres chimiques (nature et concentration du sélecteur chiral, pH et force ionique de l'électrolyte) et physiques (température, tension de séparation).

Les cyclodextrines neutres sont adaptées à la séparation d'énantiomères de solutés ionisables. Les CD neutres les plus utilisées en EC sont sous leur forme native ( $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD), méthylée (diméthyl- $\beta$ -CD, triméthyl- $\beta$ -CD) ou hydroxypropylée (HP- $\alpha$ -CD, HP- $\beta$ -CD, HP- $\gamma$ -CD) en raison de la dimension de leur cavité, de leur coût, de leur disponibilité commerciale et de leur adéquation stérique avec un grand nombre de molécules chirales (*Figure III.6*). La nature et le nombre des différents substituants de la cyclodextrine influent sur la taille de la cavité, la nature des interactions analyte-CD et donc sur l'énantiosélectivité.

Les cyclodextrines ioniques sont nécessaires pour la séparation des énantiomères d'un soluté neutre afin que l'analyte acquiert une mobilité électrophorétique non nulle par

complexation. Ces dernières années, l'intérêt s'est porté principalement sur les cyclodextrines anioniques, comme la carboxyméthyl- $\beta$ -cyclodextrine (CM- $\beta$ -CD, utilisable à pH > 4), la  $\beta$ - ou  $\gamma$ -cyclodextrine sulfatée (S- $\beta$ -CD, S- $\gamma$ -CD) ou la sulfobutyléther- $\beta$ -cyclodextrine (SBE- $\beta$ -CD), utilisables pour ces dernières, dans tout le domaine de pH. La présence de plusieurs substituants anioniques sur la cyclodextrine induit des interactions supplémentaires avec les énantiomères des solutés cationiques ; l'énantiorésolution est alors améliorée car les formes libre et complexée de chaque énantiomère ont des charges apparentes de signe contraire et migrent dans des directions opposées.



**Figure III.6 :** Formules de quelques cyclodextrines (neutre, anionique) utilisées comme sélecteurs chiraux en électrophorèse capillaire.

En ce qui concerne les OP, peu de méthodes d'analyse de leurs énantiomères ont été décrites en EC [4,31-33]. Trois approches sont possibles pour séparer les énantiomères des OP neutres :

- soit en utilisant un électrolyte contenant des micelles de SDS négatives et une CD neutre [31,32] ;
- soit en utilisant un électrolyte contenant des micelles de dodécylsulfate de sodium (SDS) négatives et deux CD (l'une neutre et l'autre anionique) [33];
- ou plus simplement, en utilisant un électrolyte contenant une CD anionique jouant à la fois le rôle de vecteur de migration et de sélecteur chiral [4].

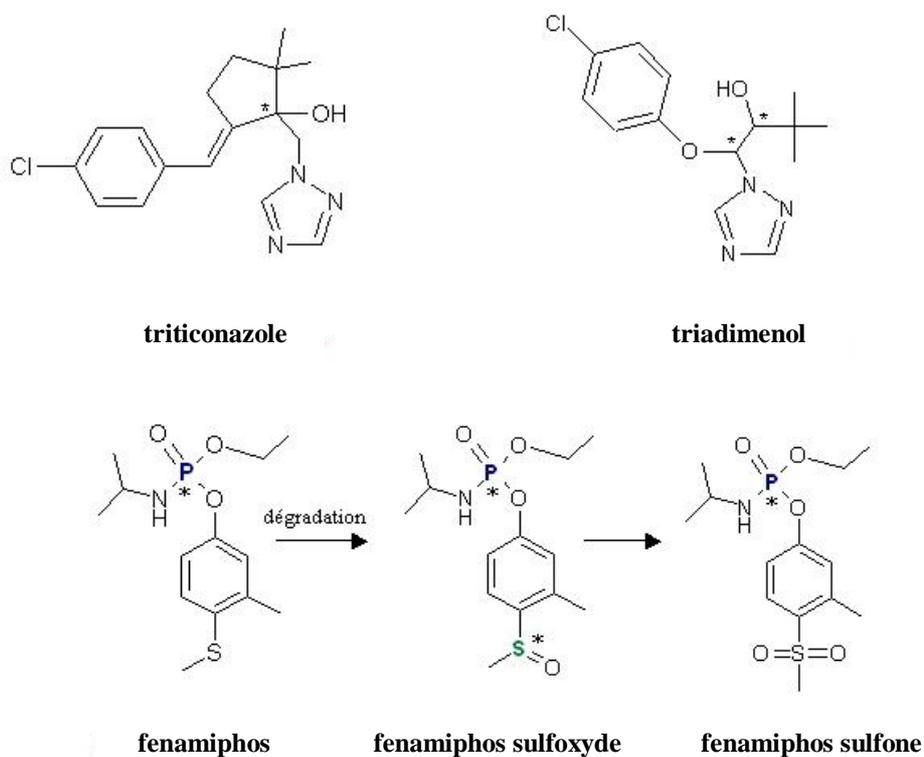
Toutefois, aucune méthode n'a été développée, à ce jour, pour l'analyse simultanée des stéréoisomères d'un pesticide organophosphoré et de ses métabolites chiraux.

### II.3.2. Matériels et méthodes

#### a) Réactifs et échantillons

L'acide formique (98 %), l'acide phosphorique (85 %), la soude 1M et la triéthanolamine ont été fournis par Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). L'ammoniaque (28 %) et le méthanol de qualité HPLC ont été achetés chez Acros Organics (Noisy-le-Grand, France). Tous les tampons ont été préparés avec de l'eau ultra-pure 18 MΩ délivrée par un appareil Elgasat (Elga, Villeurbanne, France).

Les échantillons de triadimenol et triticonazole ont été gracieusement fournis par Bayer CropScience (Lyon, France). Le fenamiphos et ses métabolites, fenamiphos sulfoxyde et fenamiphos sulfone, provenaient de chez Sigma-Aldrich (Figure III.7).



**Figure III.7 :** Formule des pesticides chiraux étudiés et de leurs métabolites.

Les cyclodextrines suivantes, carboxyméthyl- $\beta$ -cyclodextrine (CM- $\beta$ -CD, DS = 3, Cyclolab, Budapest, Hungary), 2-hydroxypropyl- $\alpha$ -cyclodextrine (HP- $\alpha$ -CD, DS = 4,8, Cyclolab),  $\alpha$ -cyclodextrine hautement sulfatée (HS- $\alpha$ -CD, DS = 11, Beckman Coulter),  $\beta$ -

cyclodextrine hautement sulfatée (HS- $\beta$ -CD, DS = 12, Beckman Coulter),  $\gamma$ -cyclodextrine hautement sulfatée (HS- $\gamma$ -CD, DS = 13, Beckman Coulter), ont été utilisées comme sélecteur chiral lors des séparations en EC.

L'optimisation de la séparation électrophorétique des énantiomères dépend du choix et de la concentration du sélecteur chiral ainsi que du choix du tampon. Le mode de travail sélectionné a permis d'imposer le pH et la force ionique de la solution électrolytique. Les tampons électrophorétiques ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ -triéthanolamine et  $\text{CH}_3\text{COOH-NH}_3$ ) ont été préparés grâce au logiciel Phoebus (Analis, Namur, Belgique) qui est une aide à la conception et à la préparation d'un électrolyte en électrophorèse capillaire. Le tampon  $\text{CH}_3\text{COOH-NH}_3$ , de pH 5 et de force ionique 50 mM, a été préparé à partir des concentrations suivantes :  $\text{CH}_3\text{COOH}$  73,1 mM,  $\text{NH}_3$  50 mM ; il possède un fort pouvoir tampon (37 mM/unité pH). Le tampon  $\text{H}_3\text{PO}_4$ -triéthanolamine, de pH 2,5 et de force ionique 18,3 mM, a été préparé à partir des concentrations suivantes :  $\text{H}_3\text{PO}_4$  25 mM, triéthanolamine 14,66 mM ; il possède également un bon pouvoir tampon (19,5 mM/unité pH).

Le pH de chaque tampon a été vérifié grâce à un pH-mètre Beckman Coulter, modèle  $\Phi 200$ . Les tampons sont stockés durant une semaine à 4°C sans modification du pH. Les solutions contenant les sélecteurs chiraux sont préparées quotidiennement en dissolvant la quantité requise de cyclodextrine dans l'électrolyte.

### *b) Appareillages*

Les séparations des énantiomères du triticonazole et du triadimenol ont été réalisées sur un appareil d'électrophorèse capillaire Agilent 3D-CE (Waldbronn, Allemagne) en utilisant un tube capillaire de silice fondue (50,2 cm x 50  $\mu\text{m}$  d.i., longueur effective 41,5 cm) acheté chez Polymicro (Phoenix, USA Etats-Unis). Les données électrophorétiques ont été enregistrées et analysées grâce au logiciel Agilent 3D-CE Chemstation (version A 08.03). Toutes les injections hydrodynamiques ont été faites du côté cathodique (5 s, 50 mbars). La température du capillaire a été fixée à 25°C. La tension de séparation était négative (-15 kV). L'électrolyte support était constitué par le tampon  $\text{H}_3\text{PO}_4$ -triéthanolamine (pH 2,5 ; force ionique 18,3 mM) auquel une cyclodextrine anionique (HS-CD) a été ajoutée à un pourcentage massique de 5 %. Le capillaire a été initialement conditionné avec NaOH 0,1 M (30 min),  $\text{H}_2\text{O}$  (30 min) et enfin l'électrolyte support (30

min) à 950 mbars. Entre deux analyses, le capillaire a été lavé successivement avec NaOH 0,1 M (2 min), H<sub>2</sub>O (2 min) puis le tampon (3 min) pour améliorer la répétabilité des analyses.

Les séparations des énantiomères du fenamiphos et de ses métabolites ont été réalisées sur un appareil d'électrophorèse capillaire Beckman-Coulter P/ACE MDQ (Fullerton, Californie, USA, Etats-Unis) en utilisant une colonne capillaire de silice fondue (60 cm x 50 µm d.i., longueur effective 50 cm). Les données électrophorétiques ont été enregistrées et analysées grâce au logiciel Beckman-Coulter P/ACE MDQ version 2.3. La détection UV a été faite à 214 nm (bande passante 20 nm, constante de temps 0,2 s). La température de la colonne a été fixée à 25°C. L'électrolyte support était constitué par le tampon CH<sub>3</sub>COOH – NH<sub>3</sub> (pH 5, force ionique 50 mM) + 5 % CH<sub>3</sub>OH + 25 mM CM-β-CD + 10 mM HP-α-CD. Les séparations ont été effectuées à une tension positive (+25 kV) et les analytes ont été injectés en mode hydrodynamique du côté anodique (5 s, 0,5 psi). Le conditionnement initial du capillaire ainsi que celui réalisé entre deux analyses sont identiques à ceux décrits précédemment.

### *c) Protocole d'extraction des pesticides du sol*

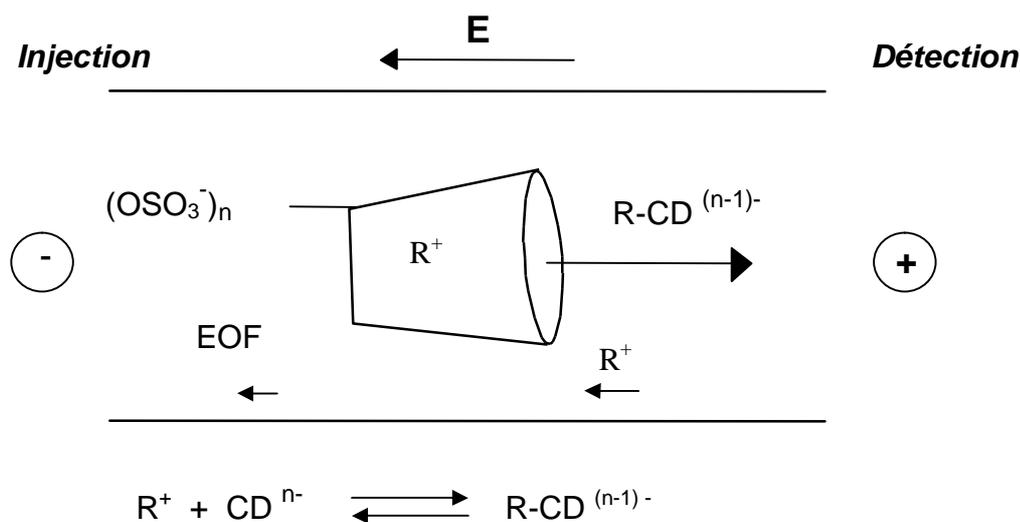
L'extraction des pesticides d'un sol a été réalisée sur des échantillons de sol préalablement séchés à température ambiante pendant 4 jours puis, broyés et tamisés à 2 mm. L'humidité résiduelle a été mesurée après séchage à l'étuve (105 °C) durant 12 h. Une quantité de 2 g de terre a été dopée par 200 µL d'un mélange de fenamiphos, fenamiphos sulfoxyde et fenamiphos sulfone, à une concentration individuelle de 100 µg.g<sup>-1</sup>. L'échantillon a été déposé sur un agitateur à rouleaux (CAT RM5, M.Zipperer GmbH, Staufen, Allemagne) pendant 30 min puis, laissé au repos durant 30 min. Les pesticides ont été extraits deux fois successivement par du méthanol (2 x 4 mL), sous agitation rotative (15 min), suivie d'une centrifugation à 4000 g durant 10 min (Jouan BR4i, Thermo Electron Corporation, Château-Gontier, France). Les surnageants ont été regroupés et évaporés à sec sous flux d'azote, à température ambiante. Le résidu a été repris avec 200 µL de tampon électrophorétique dilué 10 fois dans l'eau puis, filtré et injecté en électrophorèse capillaire.

### II.3.3. Résultats et discussion

Les séparations de plusieurs pesticides, dont le centre d'asymétrie est soit un atome de carbone, de phosphore ou de soufre, ont été développées en électrophorèse capillaire.

#### a) Séparation d'un fongicide ayant un carbone asymétrique

Le triticonazole est un fongicide de la famille des triazoles utilisé dans les traitements avec un inhibiteur de la biosynthèse des stérols ; sa formule est indiquée dans la *figure III.7*. Il est homologué pour la suppression de certaines maladies fongiques du blé, de l'avoine ou de l'orge. Cette molécule est relativement hydrophobe ( $\log K_{ow} = 3,29$  à  $20^{\circ}\text{C}$ ) et est protonée ( $pK_a = 2,3$ ) en milieu acide. Le sélecteur chiral est une cyclodextrine chargée négativement qui joue à la fois, le rôle de vecteur de migration, et de sélecteur chiral. La tension de séparation est négative (*Figure III.8*).

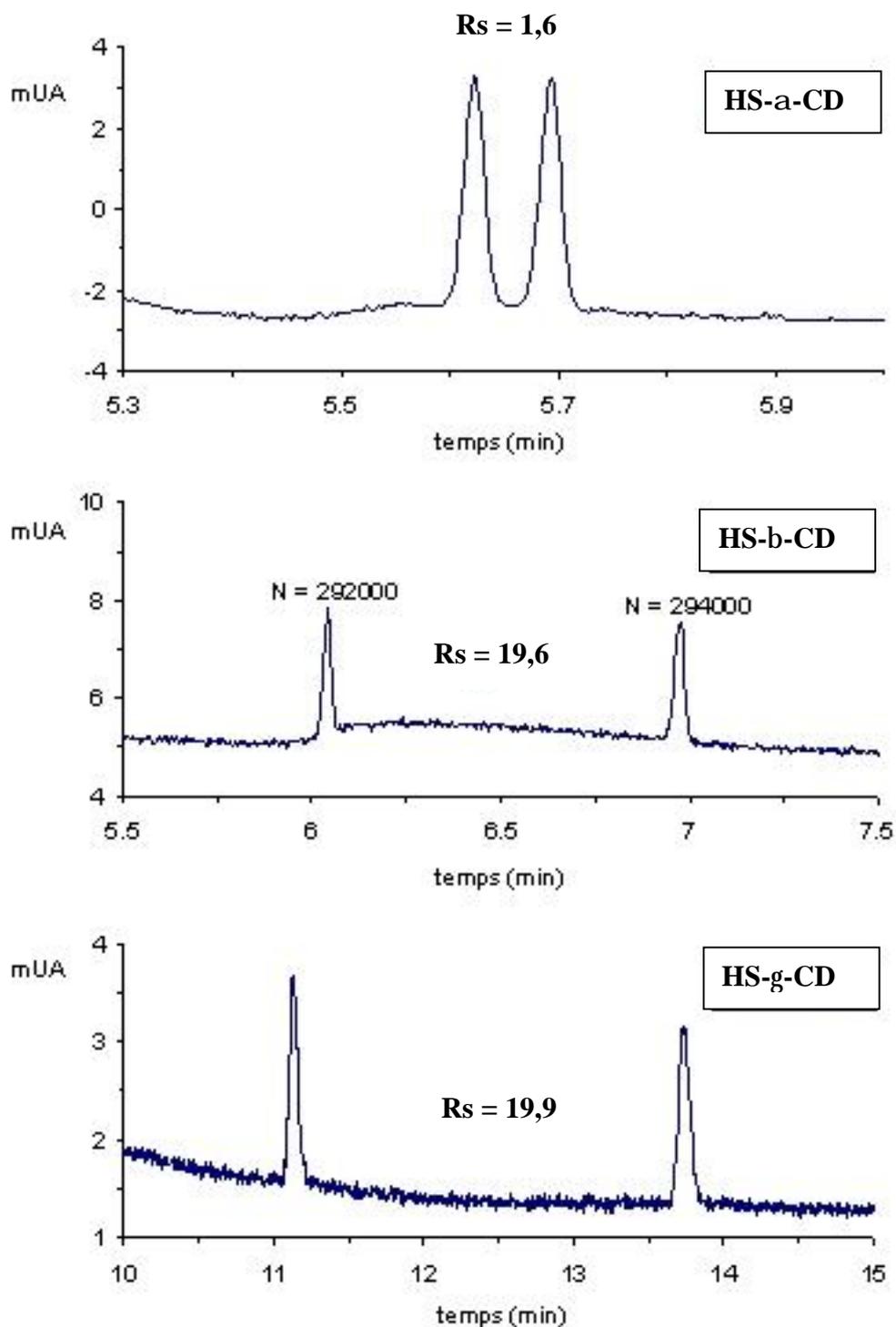


**Figure III.8 :** Représentation du mode de migration en EC des énantiomères R et S d'un soluté cationique  $R^+$  dans un électrolyte contenant une cyclodextrine anionique (tension de séparation négative).

Dans le cas du triticonazole, plusieurs cyclodextrines anioniques ont été testées telles que la  $\alpha$ -cyclodextrine hautement sulfatée (HS- $\alpha$ -CD), la  $\beta$ -cyclodextrine hautement sulfatée (HS- $\beta$ -CD) ou la  $\gamma$ -cyclodextrine hautement sulfatée (HS- $\gamma$ -CD). Ces cyclodextrines polychargées ont des degrés de substitution respectifs de 11,12 et 13.

Le tampon électrophorétique choisi est  $\text{H}_3\text{PO}_4$  - triéthanolamine (pH 2,5, force ionique 18,3 mM). Le cation triéthanolammonium de l'électrolyte a une influence sur les séparations. A pH 2,5, la triéthanolamine (base faible,  $\text{pK}_a = 7,8$ ) est sous forme cationique (mobilité électrophorétique :  $+4,9 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V.s}$ ) et s'adsorbe sur la paroi du capillaire. Le flux électroosmotique (FEO) est alors fortement diminué. D'autre part, la force ionique relativement élevée du tampon (18,3 mM) favorise la reconnaissance chirale en facilitant l'inclusion de la partie hydrophobe de chaque énantiomère dans la cavité de la CD.

Quelle que soit la cyclodextrine sulfatée choisie à la concentration de 5% (m/m), la séparation des deux énantiomères du triticonazole est toujours excellente avec des résolutions respectivement égales à 1,6, 19,6 et 19,9 pour HS- $\alpha$ -,  $\beta$ -, et  $\gamma$ -CD (*Figure III.9*). Le tampon utilisé permet d'obtenir un bon facteur d'asymétrie, des efficacités élevées ainsi que des temps de migration reproductibles. Ainsi, pour la séparation des énantiomères du triticonazole avec la HS- $\beta$ -CD, les efficacités de pics obtenues sont proches de 300000 plateaux théoriques et les pics sont symétriques (le facteur d'asymétrie est inférieur à 1,1) malgré le fort courant (140  $\mu\text{A}$ ) dû à la nature polychargée de la HS- $\beta$ -CD. Les temps d'analyse sont courts (6-14 min) quelle que soit la cyclodextrine utilisée. Toutefois, la HS- $\beta$ -CD semble préférable pour la détermination de la pureté optique du triticonazole, en raison d'une bonne adéquation entre la taille de la cavité de la CD et l'encombrement stérique du noyau benzénique du pesticide (résolution élevée et temps d'analyse court).

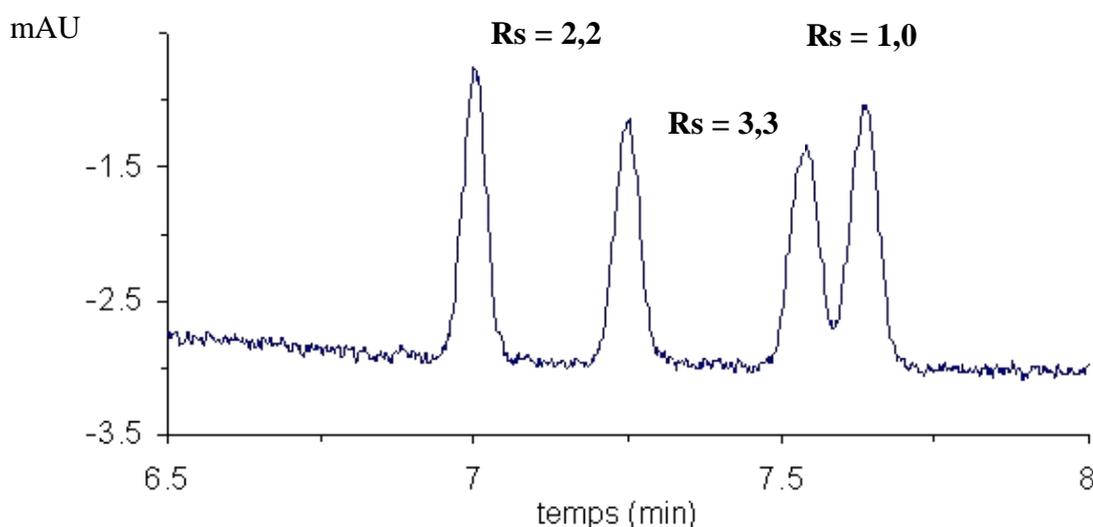


**Figure III.9 :** Séparation des deux énantiomères du triticonazole possédant un carbone asymétrique.

Conditions électrophorétiques : appareil Agilent 3D-CE ; capillaire de silice fondue 50,2 cm x 50  $\mu\text{m}$  (longueur jusqu'au détecteur 41,5 cm) ; électrolyte : tampon  $\text{H}_3\text{PO}_4$  / triéthanolamine (pH 2,5 ; force ionique 18,3 mM) + 5% HS-CD ; tension : -15 kV ; courant : 140  $\mu\text{A}$  ; température : 25°C ; détection : 214 nm ; concentration : 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .  $R_s$  est la résolution entre deux pics électrophorétiques consécutifs.

*b) Séparation d'un fongicide ayant deux carbones asymétriques*

L'EC permet aussi de séparer les stéréoisomères de composés ayant plusieurs carbones asymétriques [37,38]. Le triadimenol (*Figure III.7*) est un fongicide systémique, du groupe des triazoles, utilisé sur diverses cultures (coton, ananas) ou pour traiter des semences (orge, maïs, coton, avoine, seigle, blé). Les deux centres d'asymétrie de cette molécule neutre donnent naissance à quatre stéréoisomères, lesquels sont séparés à l'aide d'une cyclodextrine anionique. Ainsi, la séparation des quatre stéréoisomères du triadimenol a été réalisée en utilisant le même tampon électrophorétique  $H_3PO_4$ -triéthanolamine (pH 2,5, force ionique 18,3 mM) auquel a été ajouté 5 % (m/m) de la cyclodextrine HS- $\alpha$ -CD (*Figure III.10*).



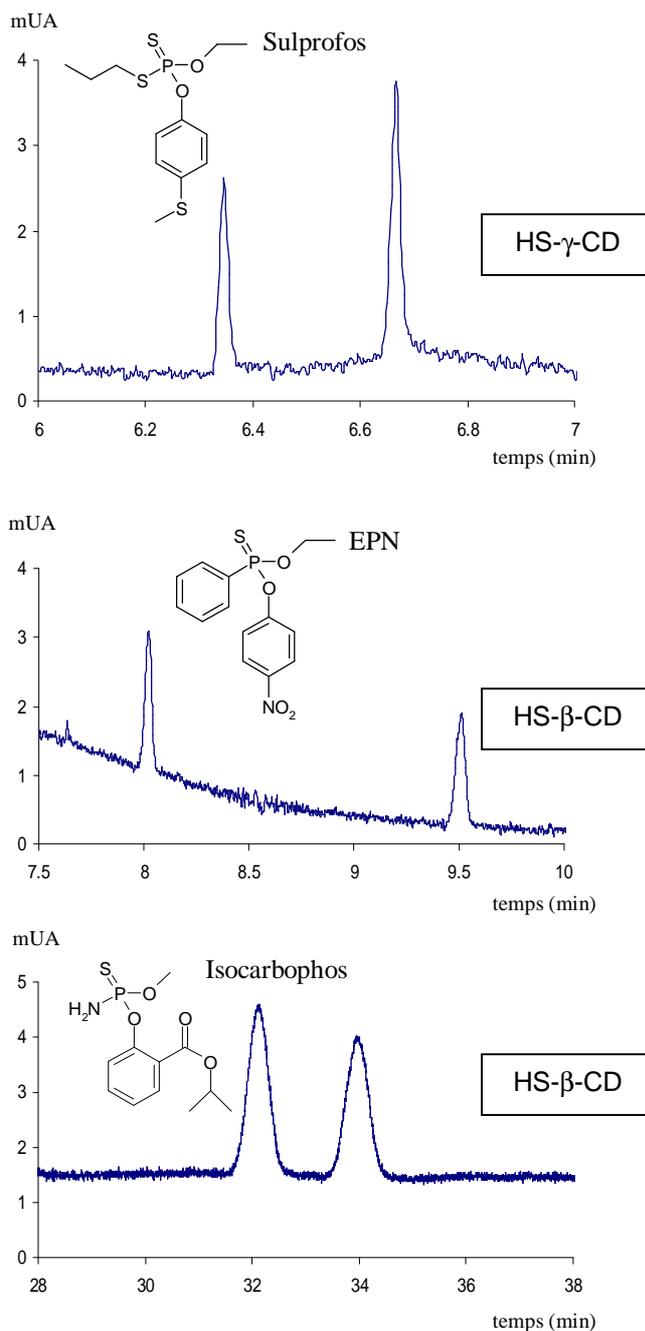
**Figure III.10 :** Séparation des quatre stéréoisomères du triadimenol possédant 2 carbones asymétriques.

Conditions électrophorétiques : appareil Agilent 3D-CE ; capillaire de silice fondue 50,2 cm x 50  $\mu$ m (longueur jusqu'au détecteur 41,5 cm) ; électrolyte : tampon  $H_3PO_4$  / triéthanolamine (pH 2,5 ; force ionique 18,3 mM) + 5% HS- $\alpha$ -CD ; tension: -15 kV ; courant: 140  $\mu$ A ; température : 25°C ; détection : 214 nm ; concentration : 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>.

*c) Séparation d'un pesticide ayant des atomes de phosphore et de soufre asymétriques*

Les énantiomères de pesticides ayant des atomes de phosphore ou de soufre chiraux peuvent être aussi séparés par EC. La *figure III.11* montre la séparation en EC des énantiomères de trois insecticides organothiophosphorés, en utilisant le tampon électrophorétique  $H_3PO_4$ -triéthanolamine (pH 2,5, force ionique 18,3 mM) auquel a été

ajouté 5 % (m/m) d'une cyclodextrine sulfatée, soit la cyclodextrine HS- $\beta$ -CD dans le cas de l'EPN et de l'isocarbophos, ou la cyclodextrine HS- $\gamma$ -CD dans le cas du sulprofos. Les sélectivités obtenues sont excellentes ( $1,05 < \alpha < 1,29$ ) et aboutissent à des résolutions élevées ( $8,8 < R_s < 19,5$ ).



**Figure III.11** : Séparation des énantiomères de quelques pesticides organophosphorés possédant un atome de phosphore asymétrique.

Conditions électrophorétiques: capillaire de silice fondue 50,2 cm X 50  $\mu$ m (longueur jusqu'au détecteur 41,5 cm) ; électrolyte : tampon  $H_3PO_4$  / triéthanolamine (pH 2,5 ; force ionique 18,3 mM) + 2 M d'urée + 5% HS-CD ; tension : -15 kV ; température : 25°C ; détection : 214 nm ; concentration : 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>.

L'exemple suivant traite du suivi de la biodégradation d'un insecticide et de ses métabolites dans un échantillon de sol. Le fenamiphos est un insecticide systémique largement utilisé depuis de nombreuses années pour traiter les cultures fruitières. Ce pesticide organosphoré a une structure phosphoramidate et possède deux énantiomères dû à son atome de phosphore pentavalent différemment substitué.

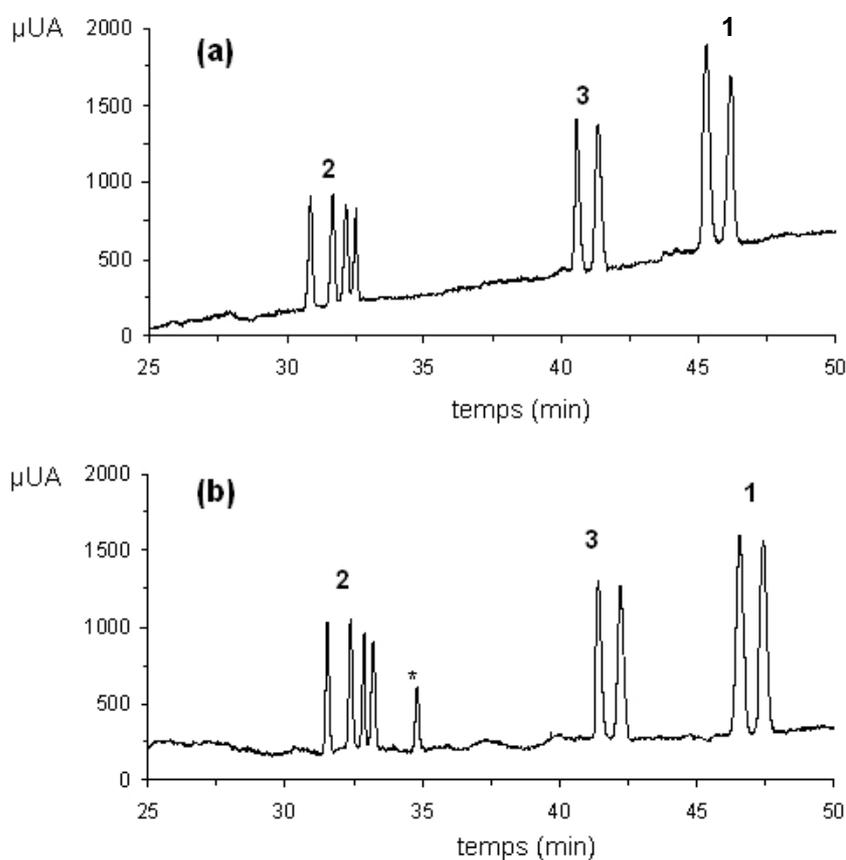
Le fenamiphos est dégradé dans les sols en deux métabolites principaux, le fenamiphos sulfoxyde et la fenamiphos sulfone [39,40] dont les formules sont indiquées dans la *figure III.7*. Le premier métabolite possède deux centres d'asymétrie (l'atome de soufre trivalent et l'atome de phosphore pentavalent) donnant naissance à quatre isomères optiques, tandis que la fenamiphos sulfone ne possède, comme le fenamiphos, que deux énantiomères. Afin d'évaluer l'impact des produits de dégradation du fenamiphos sur l'environnement, une méthode d'analyse des stéréoisomères de ce pesticide et de ses métabolites dans les sols a été mise au point en électrophorèse capillaire.

L'utilisation de cyclodextrines anioniques est indispensable en EC pour résoudre les énantiomères du fenamiphos et de ses deux métabolites, qui sont tous neutres. La séparation simultanée des huit stéréoisomères de ces composés organophosphorés a été étudiée avec différentes cyclodextrines anioniques.

Les résultats préliminaires montrent que si la HS- $\beta$ -CD permet de résoudre les énantiomères du fenamiphos (échec avec HS- $\alpha$ -CD et HS- $\gamma$ -CD), seule la CM- $\beta$ -CD montre une certaine reconnaissance chirale vis-à-vis des 3 composés. Toutefois, la résolution est insuffisante, en particulier pour les quatre stéréoisomères du fenamiphos sulfoxyde.

Un système combiné (ou dual) de CD, qui associe une cyclodextrine chargée (CM- $\beta$ -CD) et une cyclodextrine neutre (HP- $\alpha$ -CD), a été essayé afin de bénéficier de la combinaison de leurs propriétés complexantes. Dans ce système, les charges négatives de la CM- $\beta$ -CD confèrent une mobilité électrophorétique négative aux énantiomères du fenamiphos neutre, et la HP- $\alpha$ -CD permet d'améliorer l'énantiosélectivité. La résolution dépend fortement de la concentration de chaque CD mais de nombreux autres paramètres physico-chimiques ont été optimisés. Le pH du tampon CH<sub>3</sub>COOH-NH<sub>3</sub> (force ionique 50 mM) a été fixé à 5 afin d'avoir un flux électroosmotique (FEO) suffisant et de permettre l'ionisation de la CM- $\beta$ -CD. La solubilité des pesticides dans l'électrolyte a été améliorée par ajout de méthanol (5% v/v). La longueur du capillaire a été augmentée à 60 cm afin

d'améliorer la résolution entre les quatre stéréoisomères du fenamiphos sulfoxyde. La tension (+25 kV) offre un temps d'analyse satisfaisant tout en modérant l'échauffement de l'électrolyte par effet Joule. Une pression modérée (0,2 psi) d'azote a été appliquée du côté injection afin de diminuer le temps d'analyse tout en augmentant les efficacités de pics. Après optimisation des concentrations des cyclodextrines (CM- $\beta$ -CD 25 mM, HP- $\alpha$ -CD 10 mM), le mélange standard des 8 stéréoisomères du fenamiphos, fenamiphos sulfoxyde et fenamiphos sulfone, a été séparé avec une bonne résolution (1,6 - 3,1) entre les couples d'énantiomères et de bonnes efficacités de pics (140000 - 212000 plateaux théoriques), comme illustré dans la *figure III.12-a*.



**Figure III.12 :** Séparation simultanée des énantiomères du fenamiphos (possédant un phosphore asymétrique), de son métabolite sulfoxyde (possédant un phosphore et un soufre asymétriques) et de son métabolite sulfone (possédant un phosphore asymétrique).

Conditions électrophorétiques : appareil Beckman-Coulter P/ACE MDQ ; capillaire de silice fondue 60 cm x 50  $\mu\text{m}$  (longueur jusqu'au détecteur : 50 cm) ; électrolyte : tampon  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{NH}_3$  (pH 5, force ionique 50 mM) + 5% MeOH + 25 mM CM- $\beta$ -CD + 10 mM HP- $\alpha$ -CD ; tension : + 25 kV ; courant : 80  $\mu\text{A}$  ; température : 25°C ; détection : 214 nm ; pression assistée : 0,2 psi à 30 min.

Analyte : 1. fenamiphos ; 2. fenamiphos sulfoxyde ; 3. fenamiphos sulfone ; \* : constituant non identifié de la matrice. a) solution standard de pesticides (100  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) ; b) extrait de sol dopé par une solution de pesticides (concentration 100  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) après extraction.

Les paramètres de séparation (résolution, efficacité et facteur d'asymétrie des pics) sont reportés dans le *tableau III.3*.

**Tableau III.3 : Paramètres de séparation (temps de migration, efficacité, résolution, facteur d'asymétrie) pour chaque stéréoisomère du fenamiphos, fenamiphos sulfoxyde et fenamiphos sulfone dans les conditions électrophorétiques optimisées.**

Analyte	$t_M$ (min)	Efficacité	Résolution	Facteur d'asymétrie
Fenamiphos	46,14	143 000	-	1,0
	46,97	14 0000	1,7	1,1
Fenamiphos sulfoxyde	29,81	212 000	-	0,9
	30,44	211 000	3,1	0,9
	30,76	191 000	1,6	0,9
	31,08	208 000	1,6	1,0
Fenamiphos sulfone	38,18	157 000	-	1,1
	38,96	159 000	1,8	1,1

Conditions électrophorétiques : appareil Beckman-Coulter P/ACE MDQ ; capillaire de silice fondue 60 cm x 50  $\mu\text{m}$  (longueur jusqu'au détecteur : 50 cm) ; électrolyte : tampon  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{NH}_3$  (pH 5, force ionique 50 mM) + 5% MeOH + 25 mM CM- $\beta$ -CD + 10 mM HP- $\alpha$ -CD ; tension : + 25 kV ; température : 25°C ; détection : 214 nm ; pression assistée : 0,2 psi à 30 min.

Plusieurs échantillons de sol ont été dopés par des solutions standards de ces 3 pesticides dans la gamme de concentration 20-200  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , puis soumis au protocole d'extraction décrit dans la partie II-3. Les rendements d'extraction sont supérieurs à 80 % quel que soit l'analyte (*Tableau III.4*).

**Tableau III.4 : Rendements d'extraction moyens du fenamiphos, fenamiphos sulfone et fenamiphos sulfoxyde dans le sol (n = 3, concentration 100  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ).**

Analyte	Recouvrement (%)	Précision (%)
Fenamiphos	80	5,4
	87	9,7
Fenamiphos sulfoxyde	92	4,3
	98	3,9
	95	3,2
	94	3,3
	93	5,9
Fenamiphos sulfone	96	5,4

La résolution et l'efficacité des pics sont conservées et aucune interférence avec les constituants de la matrice n'est observée (*Figure III.12-b*). Le *tableau III.5* indique les paramètres de quantification obtenus après régression linéaire de la courbe d'étalonnage; les coefficients de corrélation ( $r^2$ ) sont tous proches de 1.

**Tableau III.5** : Paramètres des courbes d'étalonnage du fenamiphos, fenamiphos sulfone et fenamiphos sulfoxyde (concentrations des diastéréoisomères du fenamiphos sulfoxyde : 25 – 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , concentrations des énantiomères du fenamiphos et de sa sulfone : 25 – 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Analyte	$t_M$ (min)	Equation de la droite	$r^2$	LOD ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
Fenamiphos	46,14	$y = 5,91x - 68,33$	0,997	4,1	13,7
	46,97	$y = 5,49x - 86,74$	0,996	4,7	15,7
Fenamiphos sulfoxyde	29,81	$y = 4,96x + 21,89$	0,991	5,0	16,6
	30,44	$y = 5,13x - 3,02$	0,992	5,3	17,7
	30,76	$y = 4,32x + 6,64$	0,998	5,8	19,2
	31,08	$y = 4,46x - 9,70$	0,990	5,9	19,5
Fenamiphos sulfone	38,18	$y = 3,62x + 10,13$	0,993	4,2	13,8
	38,96	$y = 3,64x + 25,76$	0,995	4,5	15,0

Une étude est en cours au laboratoire sur la quantification du distomère (énantiomère inactif voire toxique) d'un pesticide par rapport à l'eutomère (énantiomère d'intérêt) en EC ; de telles études ont été déjà réalisées sur des molécules pharmaceutiques et ont permis d'atteindre des limites de quantification du rapport distomère/eutomère inférieures à 0,1 % [41].

### II.3.4. Conclusion

La séparation des énantiomères de pesticides possédant soit un (triticonazole) ou deux (triadimenol) atomes de carbone ou des atomes de phosphore (fenamiphos, fenamiphos sulfone) et/ou de soufre (fenamiphos sulfoxyde) chiraux est réalisable de façon simple, fiable et rapide par électrophorèse capillaire en utilisant des cyclodextrines hautement sulfatées (HS- $\alpha$ -CD ou HS- $\beta$ -CD) comme sélecteurs chiraux.

L'analyse simultanée des huit stéréoisomères de ce pesticide et de ses deux métabolites chiraux (fenamiphos sulfoxyde et fenamiphos sulfone) nécessite une sélectivité

supplémentaire qui est obtenue en utilisant un système combiné de deux cyclodextrines, l'une anionique (CM- $\beta$ -CD) et l'autre neutre (HP- $\alpha$ -CD).

Cette méthode d'analyse chirale a été appliquée à des échantillons de sol dopés par le fenamiphos et ses deux métabolites. Les rendements d'extractions obtenus sont élevés (80 %) et les seuils de quantification sont inférieurs à 20  $\mu\text{g/mL}$  pour chaque énantiomère.

*Remerciements : Les auteurs de cet article remercient M. DESBORDES, Bayer CropScience (Lyon), pour les échantillons de triticonazole et de triadimenol et le soutien apporté à la réalisation de ce travail.*

Au cours des travaux présentés ci-dessus, les énantiomères de pesticides organophosphorés possédant des atomes de phosphore comme centre d'asymétrie ont été séparés en EC en utilisant des CD hautement sulfatées comme sélecteurs chiraux.

Dans une seconde partie, nous allons aborder la séparation simultanée des énantiomères du fenamiphos et de ses métabolites chiraux en EC. Cette méthode sera appliquée à des échantillons de sol.

#### **II.4. Article 6: Simultaneous enantioselective determination of fenamiphos and its two metabolites in soil by capillary electrophoresis**

Marie Lecoœur-Lorin, Raphaël Delépée, Philippe Morin \*

*Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), CNRS FR 2708, UMR 6005, Université d'Orléans, BP 6759, 45067 Orléans cedex 2, France*

\* Corresponding author: Tel: +33 2 38 49 45 90; fax: +33 2 38 41 72 81. E-mail: [philippe.morin@univ-orleans.fr](mailto:philippe.morin@univ-orleans.fr).

#### **Publication soumise dans Electrophoresis**

#### **Abstract**

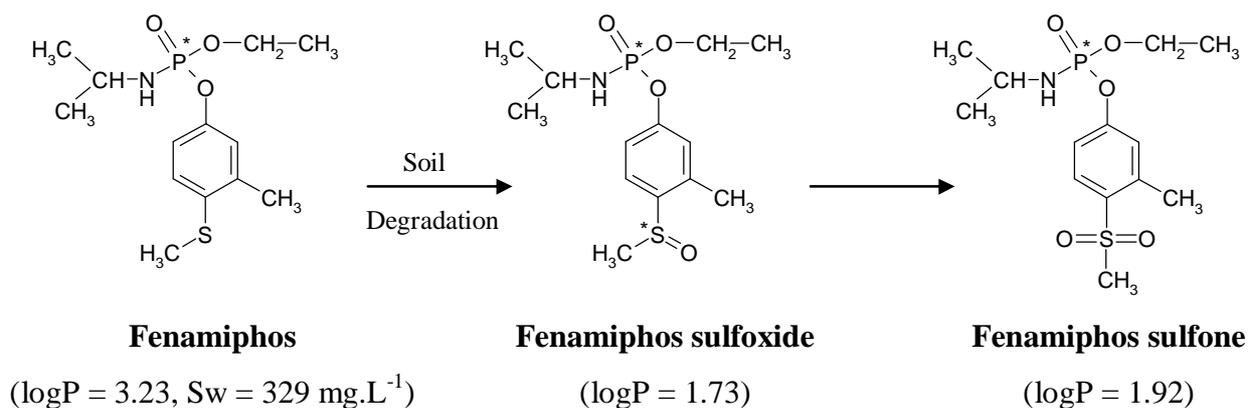
The enantioseparation of fenamiphos and its two main metabolites (fenamiphos sulfoxide and fenamiphos sulfone) were simultaneously achieved by capillary electrophoresis (CE) by using a dual cyclodextrin (CD) system. A mixture of 25 mM CM- $\beta$ -CD and 10 mM HP- $\alpha$ -CD was added to the acetic acid / ammonia (I = 50 mM, pH 5) buffer and was suitable for the baseline resolution of all stereoisomers of analytes. A further addition of 5% methanol to the background electrolyte increased significantly the resolution between the stereoisomers of fenamiphos sulfoxide. An overimposed pressure (0.2 psi) was applied during the analysis in order to have better peak efficiencies and small run time. The composition of the sample solvent was found to be a crucial parameter. An amount of 15% MeOH added to the sample was a good alternative to ensure the total solubility of fenamiphos and the baseline separation of fenamiphos sulfoxide enantiomers. The extraction of pesticides from soil samples was also investigated. A methanolic extraction allowed recovering 50-75% of pesticides which were detected by CE at the ppm concentration level (50- 460 mg.kg<sup>-1</sup>) with a good precision (5.1-13.2% R.S.D.). This method was applied to soil samples and was found to be suitable to monitor the enantiomeric degradation of fenamiphos in environmental samples.

**Keywords:** Capillary Electrophoresis, Cyclodextrin, Fenamiphos, Organophosphorus Pesticide, Soil.

### II.4.1. Introduction

Organophosphorus pesticides (OPs) are widely used in agriculture due to their universal application field. OPs are principally known for their insecticide, nematicide and fungicide activities since they are a neurotoxic inhibitor of acetylcholinesterase [36]. The accumulation of acetylcholine in the body interferes with the muscular response and can lead to the death. Hence, the legislation concerning the spreading of pesticides is very controlled to avoid any pollution and safety problems. A numerous of OPs are chiral and their enzyme inhibition activity, toxicity, and biodegradability depend on the absolute configuration of their phosphorus, carbon or sulphur chiral atoms. (*R*)-isomer has greater activity than (*S*)-form as reported for cyanofenphos [18], isofenphos [19] metamidophos and acephate [20]. Anyway, in a few cases, such as for fenamiphos [21], one enantiomer is much more toxic than the other one as a consequence it would be desirable to use single enantiomer in the commercial formulation.

Fenamiphos is a well-known systemic insecticide against soil nematodes [42]. This pesticide is applied on a wide variety of plants including tobaccos, turfs, bananas, pineapples, citrus, some and vegetables. Under environmental conditions (moisture, soil pH, organic matter contents...), fenamiphos is successively oxidised to fenamiphos sulfoxide and then fenamiphos sulfone [39] (*Figure III.13*).



**Figure III.13:** Chemical structures, hydrophobicity (logP) and water solubility (S<sub>w</sub>) of fenamiphos and its two metabolites: fenamiphos sulfoxide and fenamiphos sulfone.

According to their chemical structures, fenamiphos and fenamiphos sulfone possess one chiral center (phosphorus atom) whereas fenamiphos sulfoxide has two chiral centers (phosphorus and sulphur atoms) that leads to four diastereoisomers. In order to monitor the biodegradability of this pesticide and its chiral discrimination in environmental medium, analytical method allowing the enantioselective separation of fenamiphos and their degradation products must be developed.

The literature reports the enantioselective analysis of OPs by gas chromatography [23,24,43], high performance liquid chromatography (HPLC) [25,29] or capillary electrophoresis (CE). In CE, two main methods were described. The micellar electrokinetic chromatography allowed the enantioseparation of neutral pesticides in the presence of negatively charged micelles and cyclodextrin (CD) [31-33,44]. Nevertheless, this CE mode failed to resolve fenamiphos enantiomers [31]. The second approach has involved the complexing properties of charged CD to resolve mixtures of neutral enantiomeric pesticides. Anionic CDs are more used than cationic CDs because cationic CDs may interact with the capillary wall [45] which induced a reversal EOF [46]. Hence, fenamiphos was partially enantioresolved by adding carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin (CM- $\beta$ -CD) to the electrophoretic buffer [4]. Generally, all publications reported the enantioseparation of different OPs, but no enantioselective method was developed to analyze an OP and its degradation products in environmental.

The aim of this study was double:

- first, selecting the experimental CE conditions for the simultaneous enantioselective separation of fenamiphos and its two metabolites (fenamiphos sulfoxide and fenamiphos sulfone). The selection of chiral selectors system was discussed and secondary electrophoretic parameters (buffer composition, assisted pressure...) were optimized.
- secondly, investigating the determination of fenamiphos and its metabolites in soil samples. Therefore, two extraction methods (pressure fluid extraction and solid-liquid extraction) were employed. The objective was to quantify each compound with trueness and precision.

## **II.4.2. Materials and methods**

### *a) Apparatus*

All experiments were carried out on a Beckman P/ACE MDQ capillary electrophoresis system (Beckman Coulter, Villepinte, France) equipped with a UV detector. Detection was performed at 214 nm. Data were recorded and analyzed with the Beckman P/ACE system MDQ software (version 2.2).

CE separations were performed using an uncoated silica fused capillary (60 cm x 50  $\mu\text{m}$  i.d., effective length 50 cm) obtained by Polymicro (Phoenix, USA). All hydrodynamic injections were done at the anodic side by applying a pressure of 0.5 psi for 5 s. The sample tray temperature was set at 25°C and the applied voltage was +25 kV. Prior to use, each new capillary was conditioned with 0.1N NaOH (30 min), H<sub>2</sub>O (30 min) and then with the running buffer (30 min) at 20 psi. Between two runs, the capillary was washed sequentially with 0.1N NaOH (2 min), H<sub>2</sub>O (2 min) and the buffer (3 min) at 20 psi. When not in use, the capillary was rinsed with 0.1N NaOH (10 min), H<sub>2</sub>O (10 min) and then dry stored.

An ultrasound bath model 3510 from Branson (Rungis, France), a rotavapor (Büchi model R114, Labortechnik, Flavil, Switzerland) and a centrifugal (Jouan BR4i, Thermo Electron Corporation, Château-Gonthier, France) were used for sample preparation.

### *b) Chemicals*

All reagents were of analytical grade. Fenamiphos and its degradation products were of Pestanal grade and were purchased from Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). Formic acid (98%) and ammonia were purchased from Fluka (St-Quentin-Fallavier, France). Acetic acid was supplied by VWR (Merck Eurolab, Fontenay sous Bois, France). Methanol, ethanol, isopropanol and acetonitrile were obtained from SDS (Pepin, France). All buffers were prepared with ultra-pure water ( $R > 18\text{M}\Omega$ ) delivered from an Elgasat apparatus (Elga, Villeurbanne, France).

Chiral separations were investigated using  $\gamma$ -cyclodextrin ( $\gamma$ -CD), hydroxypropyl- $\alpha$ -cyclodextrin (HP- $\alpha$ -CD, DS = 3.6 per CD), hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD, DS = 6.3 per CD), hydroxypropyl- $\gamma$ -cyclodextrin (HP- $\gamma$ -CD, DS = 4.8 per CD), dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin (DM- $\beta$ -CD, DS = 12.6 per CD) purchased from Wacker (Munich,

Germany) and trimethyl- $\beta$ -cyclodextrin (TM- $\beta$ -CD), carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin (CM- $\beta$ -CD, DS = 3 per CD) supplied from Cyclolab (Budapest, Hungary), highly sulphated cyclodextrins (HS- $\alpha$ -CD, DS = 11 per CD, HS- $\beta$ -CD, DS = 12 per CD, HS- $\gamma$ -CD, DS = 13 per CD) purchased from Beckman Coulter and sulphated- $\beta$ -cyclodextrin (S- $\beta$ -CD, DS = 7-11 per CD) supplied from Aldrich as chiral selectors.

Soil samples used for this experiment were collected from Mézières-lez-Cléry in France (45). This soil was never exposed to fenamiphos before. The pH and the moisture of air-dried and sieved (2 mm) soil samples were determined by following french NF-ISO-10390 [47] and NF-ISO-11465 [48] norms: the pH of soil was 7.05 and its residual moisture content was 1.31% after oven drying at 105°C for 24h.

### c) Calculations

The separation parameters in CE were calculated as follows:

$$\text{Enantioselectivity: } a = \frac{t_{M2}}{t_{M1}} \quad (\text{III.1})$$

$$\text{Resolution: } R_s = 1.18 \left( \frac{t_{M2} - t_{M1}}{w_{1/2}(1) + w_{1/2}(2)} \right) \quad (\text{III.2})$$

$$\text{Theoretical plates: } N = 5.54 \left( \frac{t_M}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (\text{III.3})$$

where  $t_{M1}$  and  $t_{M2}$  are the migration times of both enantiomers and  $w_{1/2}(1)$ ,  $w_{1/2}(2)$  the peak widths at half height of the first and the second migrating enantiomer.

### d) Background electrolyte (BGE) and sample preparation

#### a) Background electrolyte

After optimization of the separation buffer, the best running electrolyte was the acetic acid/ ammonia buffer (ionic strength: 50 mM, pH 5) mixture to which was added a dual cyclodextrin system composed of 25 mM CM- $\beta$ -CD and 10 mM HP- $\alpha$ -CD. At last, 5% MeOH was added to the BGE. The pH value was measured with a Beckman pH-meter ( $\Phi$ 200 model) and adjusted if necessary. Buffers were stored up to 5 days at +4°C over the course of the experiments without any pH value modification. Solutions containing chiral

selectors were daily prepared by dissolving the corresponding amount of cyclodextrin in the BGE. Buffers were filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  polyvinylidenedifluoride membrane filter (Millipore, Molsheim, France) and degassed for 5 min before use.

#### **b) Sample used for method development**

For each pesticide, a stock solution (5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) was prepared in methanol. Then a working solution, composed of fenamiphos and its two metabolites, was prepared by dilution of stock solutions in acetic acid/ammonia (ionic strength 2.5 mM) buffer; this working solution was considered as a reference solution containing each pesticide at a concentration of 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . This working solution was stable for more than 5 days at 4°C.

#### **c) Soil sample preparation**

Soil samples were air-dried at room temperature, ground, sieved to a 10-mesh sieve (particle size 2 mm) after removing stones and residual roots and then stored at room temperature prior to analysis. For the optimization of the extraction parameters, 10 g of soil were spiked with 1 mL of a methanolic solution containing fenamiphos and its metabolites (100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  each). The calibration curves of pesticides were obtained by fortifying a 20 g amount of soil by appropriate volumes of pesticide stock solutions; the concentrations of pesticides were 0.3, 0.5, 0.75, 1.5, 3  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  for fenamiphos sulfoxide and fenamiphos sulfone and 1.5, 3, 5, 7.5, 10  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  for fenamiphos. Then, the mixture was shaken for 30 min and let to stand for 30 min prior extraction.

#### **e) Extraction procedures**

The accelerated solvent extraction was carried out on a Dionex ASE 100 (Voisins le Bretonneux, France). A mass of 10 g of anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  was added to the spiked soil sample (10 g) in order to dry it and then the mixture was extracted in a 34 mL stainless steel cell. Extraction solvent consisted in ethanol, ethyl acetate or heptane used alone or as a mixture. The extraction was performed at a temperature of 100°C by applying a pressure of 1500 psi for a 5 min heating followed by a 5 min static extraction. Only one cycle was performed.

Solid liquid extraction (SLE) of pesticides was also investigated after following the same spiking procedure described previously. The soil samples (10 g) were extracted with

MeOH (25 mL) in a 50 mL conical tube. After shaking for 15 min, the soil was centrifuged (4000 g, 20°C, 5 min).

The supernatant (SLE) or the extract (Pressure Fluid Extraction) were collected and concentrated to approximately 1 mL in a rotary evaporator at 40°C under vacuum. The residue was transferred into a 4 mL vial, dried under gentle stream of nitrogen and dissolved in 200  $\mu$ L or 1 mL of CH<sub>3</sub>COOH-NH<sub>3</sub> (I = 5 mM, pH 5) buffer containing 15% of MeOH, sonicated and passed through a 0.2  $\mu$ m cellulose acetate membrane (Asahi Techno Glass, Ibaraki, Japan). An aliquot (200  $\mu$ L) of this solution was placed in a Beckman CE vial insert for further analysis. The procedure was performed twice for each sample. Samples were analyzed by CE. Recoveries were determined by comparing peak areas of each pesticide extraction fraction with those obtained from a similar injection of a standard solution (100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> each).

### **II.4.3. Results and discussion**

A thorough study of the different steps involved in the proposed method was carried out in order to determine the best conditions for both treatment of soil samples and chiral analysis of fenamiphos and its two metabolites.

#### *a) Enantioseparation of fenamiphos and its metabolites: selection of the experimental conditions*

##### **a) Selection of cyclodextrin type and concentration**

Since phosphoramidate compounds are neutral molecules, the use of charged CD is necessary to achieve their chiral analysis. Indeed, charged CDs are complexing agents which allow the electromigration of pesticides through the capillary. All compounds were analyzed with different anionic CDs (HS- $\alpha$ -CD, HS- $\beta$ -CD, HS- $\gamma$ -CD, S- $\beta$ -CD, CM- $\beta$ -CD) added to the running buffer. Since HS- $\alpha$ -CD, HS- $\beta$ -CD, HS- $\gamma$ -CD were marketed in 20% w/v solution in a 50 mM phosphate buffer at pH 2.5, CE analysis with HS-CD and S-CD were performed especially in this running buffer. The optimized procedure is similar to that developed by Matthijs *et al.* [49]. The compounds were tested with 5% (25 mM) HS-CD ( $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -) or 20 mM S- $\beta$ -CD added to the BGE under negative polarity (-20 kV). The three compounds showed no affinity with HS- $\alpha$ -CD and HS- $\gamma$ -CD probably due to a

bad fitting between the solute configuration and the hydrophobic cavity size of the CDs. Indeed, no peaks were obtained within 45 min. Same results were obtained with S- $\beta$ -CD. Only, compound fenamiphos enantiomers was partially resolved ( $R_s = 1.30$ ) with 5% HS- $\beta$ -CD in 28 min whereas fenamiphos sulfoxide and sulfone had no affinity with this CD. This result proved that enantioseparation mechanism of fenamiphos with HS- $\beta$ -CD was mainly due to the inclusion of aromatic ring into the cavity of CD. The modification of the hydrophobic character of the sulphur group in sulfoxide or sulfone derivatives led to a worst inclusion of the solute into the hydrophobic cavity of the CD.

CM- $\beta$ -CD was then investigated. It is composed of carboxylic acid substituents which ionization depends on the pH value of the electrolytic support. Hence, the experiments, made with 20 mM CM- $\beta$ -CD as chiral selector, were performed in acetic acid (25 mM) and ammonia (37 mM) buffer adjusted to pH 5.5. The voltage was set at +20 kV. Phosphoric buffer was not tested since at pH 5 the ionic strength was not high enough to ensure good stability of BGE along the analysis.

CM- $\beta$ -CD showed an interesting affinity versus these compounds since all compounds were partially resolved with any observed co-migration. The influence of CM- $\beta$ -CD concentration on the enantioselectivity of each pesticide was also investigated (*Table III.6*) in the 12.5 - 30 mM range.

**Table III.6:** Effect of CM-b-CD concentration in single CD system on electrophoretic parameters (migration time ( $t_M$ ) and resolution ( $R_s$ )) of each compound.

[CM-b-CD] mM	Fenamiphos			Fenamiphos sulfoxide						Fenamiphos sulfone			
	$t_{M1}$	$t_{M2}$	$R_{s1,2}$	$t_{M1}$	$t_{M2}$	$t_{M3}$	$t_{M4}$	$R_{s1,2}$	$R_{s2,3}$	$R_{s3,4}$	$t_{M1}$	$t_{M2}$	$R_{s1,2}$
12.5	19.6	-	0	7.5	7.6	-	-	0.49	0	0	10.0	10.1	0.66
15	23.0	23.7	1.02	8.2	8.3	-	-	0.58	0	0	11.7	11.8	0.98
20*	45.2	45.5	1.27	14.8	15.4	15.7	15.9	1.40	0.51	0.21	26.9	27.8	1.46
25*	63.8	64.3	1.38	16.9	17.5	17.4	18.2	1.85	1.02	0.39	30.6	31.8	1.65
30	-	-	-	21.4	22.1	22.4	22.8	2.40	1.05	1.10	-	-	-

Conditions: fused-silica capillary: 50 cm total length (40 cm effective length) x 50  $\mu$ m i.d.; electrolyte: CH<sub>3</sub>COOH-NH<sub>3</sub> (ionic strength: 25 mM, pH 5.5) + CM- $\beta$ -CD; voltage: +20 kV. Other conditions: see experimental section.  
 $t_M$  is expressed in min ; \* applied pressure (0.5 psi) at 42 min.

The best result was obtained by adding 25 mM CM- $\beta$ -CD to the BGE. Nevertheless, the run time was too long (65 minutes) even if an overimposed pressure (0.5

psi) was applied at the anodic side at 42 min without baseline resolution. So, a dual cyclodextrin system was tested in order to improve the enantioseparation.

Several works [1,50-52] have demonstrated the usefulness of dual cyclodextrin systems (mixture of neutral and ionic CDs) to improve chiral separation. Different neutral CDs ( $\gamma$ -CD, DM- $\beta$ -CD, TM- $\beta$ -CD, HP- $\alpha$ -CD, HP- $\beta$ -CD, HP- $\gamma$ -CD) were successfully tested in addition to 25 mM CM- $\beta$ -CD. For each of them, the concentration of the neutral CD was fixed at 5 mM. An overimposed pressure (0.5 psi) was simultaneously applied with a 20 kV voltage at 35 minutes to reduce analysis time. Data of migration time, efficiency, selectivity or resolution were gathered in *table III.7*. Different behaviours of compounds were observed depending on the nature of neutral CD added to the BGE. Generally, the addition of neutral CD to the BGE decreased the migration time of each solute. This trend was due to the interaction of the analyte with neutral CD which migrated with the EOF. In such conditions (25 mM CM- $\beta$ -CD, 5 mM neutral CD, pH 5.5), dual CD system containing  $\gamma$ -CD, DM- $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD or HP- $\gamma$ -CD did not improve the enantioseparation and in some cases induced a decrease of resolution. These results suggested that these CDs present greatest interactions with the analytes than the anionic ones. The addition of TM- $\beta$ -CD improved the enantioresolution of only fenamiphos and fenamiphos sulfoxide ( $R_s = 1.73$  and  $2.23$ , respectively) whereas the enantioseparation of all compounds were also enhanced by adding HP- $\alpha$ -CD ( $R_s = 2.11$  and  $2.03$ , respectively) in the BGE. Hence, HP- $\alpha$ -CD was selected as the most suitable neutral CD to resolve each compound (*Table III.7*). In our experiments, CM- $\beta$ -CD provided an apparent electrophoretic mobility to the analyte while the HP- $\alpha$ -CD led to the enantiomeric separation. This phenomenon has already been described by Anigbogu *et al.* [53]. Finally, the concentration of HP- $\alpha$ -CD in the buffer was further adjusted to 10 mM as an optimum value.

**Table III.7: Influence of the nature of the neutral CD in dual CD system on electrophoretic parameters (migration time ( $t_M$ ) and resolution ( $R_s$ )) of each compound.**

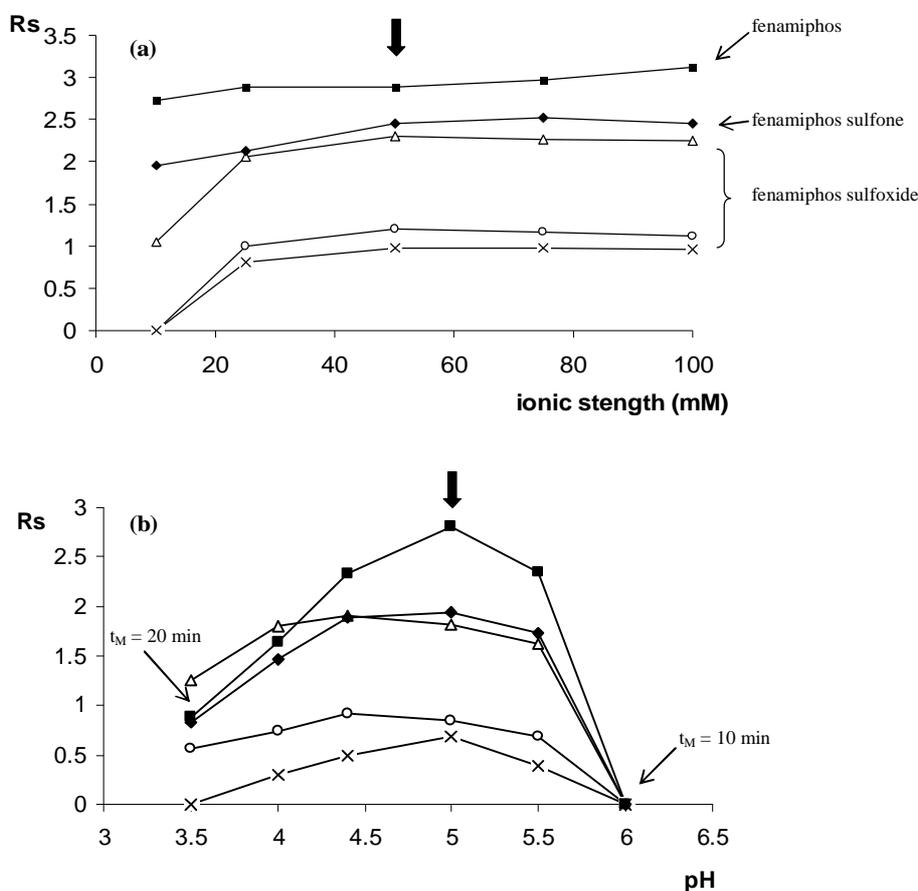
Neutral CD	Fenamiphos			Fenamiphos sulfoxide						Fenamiphos sulfone						
	$t_{M2}$	$N_2$	$R_{S1,2}$	$a_{1,2}$	$t_{M4}$	$N_4$	$R_{S1,2}$	$R_{S2,3}$	$R_{S3,4}$	$a_{1,2}$	$a_{2,3}$	$a_{3,4}$	$t_{M2}$	$N_2$	$R_{S1,2}$	$a_{1,2}$
None	36.5	49 670	0.75	1.00	18.2	19 500	1.85	1.02	0.39	1.03	1.00	1.04	31.8	47 700	1.65	1.02
$\gamma$ -CD	29.3	45 700	0.88	0.00	16.3	33 600	1.69	1.31	0.46	1.03	1.02	1.01	21.4	66 070	1.21	1.02
DM- $\beta$ -CD	21.0	71 360	0.55	1.01	16.8	800	1.46	0.67	0.11	1.03	1.02	1.01	19.8	58 800	0.78	1.02
TM- $\beta$ -CD	31.7	76 200	1.73	1.02	17.8	42 700	<b>2.23</b>	<b>1.33</b>	<b>0.62</b>	1.04	1.02	1.01	24.4	63 400	1.46	1.02
HP- $\alpha$ -CD	32.2	110 300	<b>2.11</b>	1.03	18.00	26 600	2.03	1.02	0.53	1.04	1.02	1.01	25.3	62 300	<b>1.70</b>	1.03
HP- $\beta$ -CD	21.7	-	0.00	-	15.9	29 800	1.49	0.76	0.00	1.03	1.02	0.00	19.2	82 087	0.82	1.01
HP- $\gamma$ -CD	29.3	41 400	0.59	1.01	16.7	21 900	2.00	1.30	0.38	1.03	1.03	1.01	21.9	68 300	1.24	1.02

Conditions: fused-silica capillary: 50 cm total length (40 cm effective length) x 50  $\mu$ m i.d.; electrolyte: CH<sub>3</sub>COOH/NH<sub>3</sub> (ionic strength: 25 mM, pH 5.5) + 25 mM CM- $\beta$ -CD + 5 mM neutral CD; voltage: +20 kV. Other conditions: see experimental section.  
 $t_M$  is expressed in min.

## b) Optimization of run buffer composition

### - Effect of ionic strength

The influence of the BGE ionic strength on the enantioseparation of fenamiphos, fenamiphos sulfoxide and fenamiphos sulfone was evaluated by varying the ionic strength of CH<sub>3</sub>COOH/NH<sub>3</sub> (pH 5.5) buffer in the 10 - 100 mM range added to 25 mM CM-β-CD and 10 mM HP-α-CD. An increase in buffer ionic strength induced an increase in the migration time of all the analytes ( $t_M = 35$  to 41 min for fenamiphos), since the electroosmotic flow and the electrophoretic mobility are inversely proportional to the buffer concentration. Likewise, slight changes in resolution were also observed (*Figure III.14-a*).



**Figure 2:** Effect of ionic strength (a) and pH (b) of an ammonium acetate buffer on the enantioresolution of fenamiphos and its two metabolites.

Conditions: fused-silica capillary: 50 cm total length (40 cm effective length) x 50 μm i.d. (a) electrolyte: CH<sub>3</sub>COOH/NH<sub>3</sub> (pH 5.5) + 25 mM CM-β-CD + 10 mM HP-α-CD. (b) electrolyte: CH<sub>3</sub>COOH/NH<sub>3</sub> (ionic strength: 50 mM) + 25 mM CM-β-CD + 10 mM HP-α-CD; voltage: +20 kV. Other conditions: see experimental section.

(n) fenamiphos; (ê) first and second eluted enantiomers of fenamiphos sulfoxide; (j) second and third eluted enantiomers of fenamiphos sulfoxide; (x) third and fourth eluted enantiomers of fenamiphos sulfoxide. (w) fenamiphos sulfone.

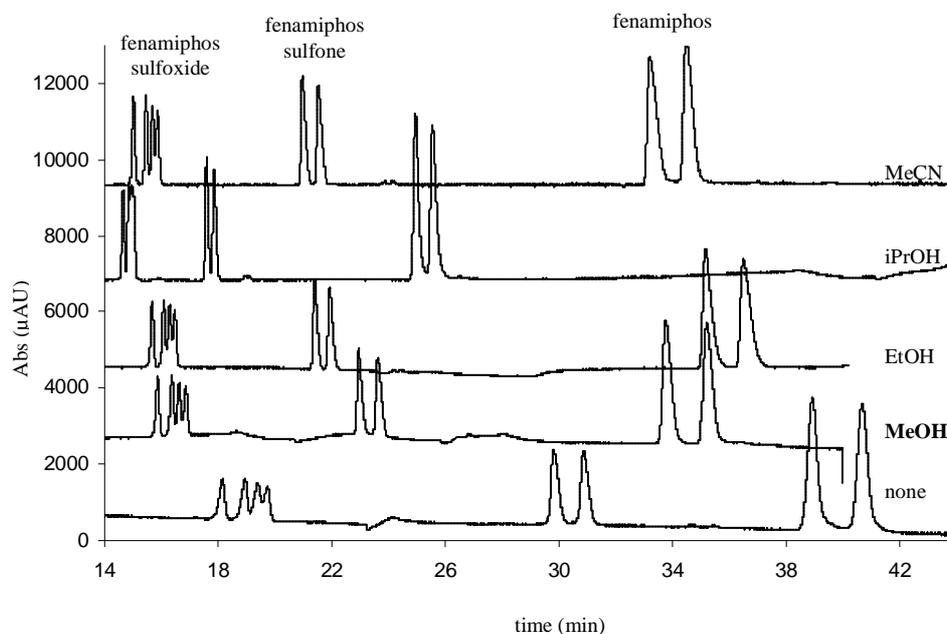
Increasing ionic strength from 10 mM to 100 mM led to an increase in resolution for all compounds due to an enhancement of complexation with CD and a decrease in peak tailing. Otherwise, in the 50 - 100 mM ionic strength range, the enantioresolution was quite similar whatever the analyte. Since ideal conditions must be a compromise between stable ionic strength and minimal Joule heating, a buffer ionic strength of 50 mM was selected as the optimum value.

- *Effect of pH*

The buffer pH is a key parameter because it directly affects the velocity of the EOF [54] and also the ionisation degree of the CM- $\beta$ -CD [55]. The influence of buffer pH on the enantioresolution of each solute was carried out in the 3.5-6 pH range (*Figure III.14-b*). The resolution of each pair of enantiomers increased between pH 3.5 and 5. At pH 6, the EOF ( $\mu = 21.2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$ ) governed the migration of the analyte resulting in a short run time (10 min) with a loss of enantioselectivity. At pH 3.5, EOF is very slow and the migration of the analyte mainly depended on the mobility of the anionic CD. At this pH, CM- $\beta$ -CD was not totally ionised consequently a loss of resolution was observed. The best pH of the buffer was 5.0 because it represents a compromise between the EOF velocity and the ionisation of the anionic CD.

- *Addition of organic modifier*

It is well-known that the addition of organic modifier can either improve or deteriorate the chiral separation because organic modifiers can affect not only binding constants of the enantiomer-CD inclusion complexes but also the EOF via influencing viscosity, dielectric constant, and conductivity of buffer. Likewise, the addition of organic modifier can favour the solubility of compounds. The last case is the most important since most of organophosphorous pesticides (fenamiphos for example) are slightly water soluble compared to its metabolites. So, some protic solvent (MeOH, EtOH, iPrOH) and an aprotic one (MeCN) were added as modifiers (5% v/v) to the buffer solution ( $\text{CH}_3\text{COOH-NH}_3$  ionic strength = 50 mM, pH 5 + 25 mM CM- $\beta$ -CD + 10 mM HP- $\alpha$ -CD). *Figure III.15* reports the influence of the nature of organic modifier on the separation of these analytes.



**Figure III.15:** Effect of the nature of organic modifier on the enantioresolution of pesticides.

Conditions: fused-silica capillary: 50 cm total length (40 cm effective length) x 50  $\mu\text{m}$  i.d.; electrolyte:  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{NH}_3$  (ionic strength: 50 mM, pH 5) + 25 mM CM- $\beta$ -CD + 10 mM HP- $\alpha$ -CD + organic modifier; voltage: +20 kV; temperature: 25°C. Other conditions: see experimental section.

In all cases, run time was slightly decreased and a substantial separation loss was observed by adding iPrOH or EtOH. The presence of MeOH or MeCN significantly improved peak efficiency (83,000 instead of 22,000) of fenamiphos sulfoxide diastereoisomers but the enantioresolution was not high enough to allow the quantification of each stereoisomer. Hence, secondary parameters such as capillary length, separation voltage or assisted pressure need to be optimized.

### c) Optimization of secondary parameters

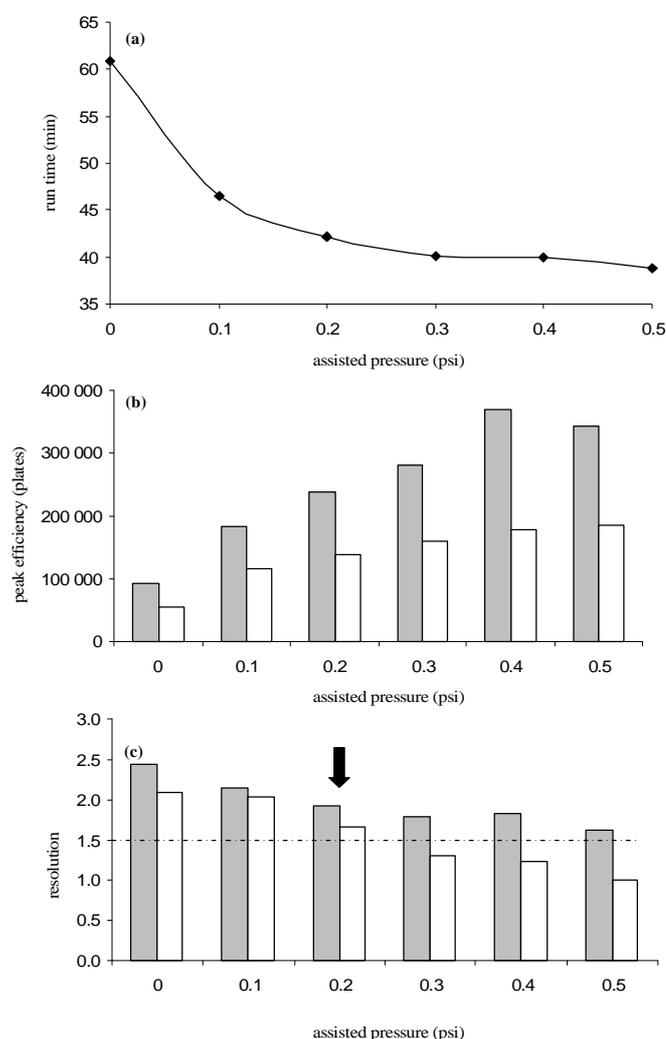
#### - Length of capillary and voltage

The resolution between two solutes was improved by increasing the capillary length. Hence, the total capillary length was increased from 50 to 60 cm to improve the resolution between the four diastereoisomers of fenamiphos sulfoxide; the resolution between each stereoisomer of fenamiphos sulfoxide was enhanced by a factor 1.5 at the expense of an increase of the run time (67 min rather than 40 min). The influence of separation voltage was investigated in the 20-30 kV range. A voltage of 25 kV yielded the best compromise in terms of run time and peak shape, therefore, this value was selected as

optimum. Indeed, a crucial loss of separation was observed for fenamiphos at a separation voltage of 30 kV.

- *Assisted pressure*

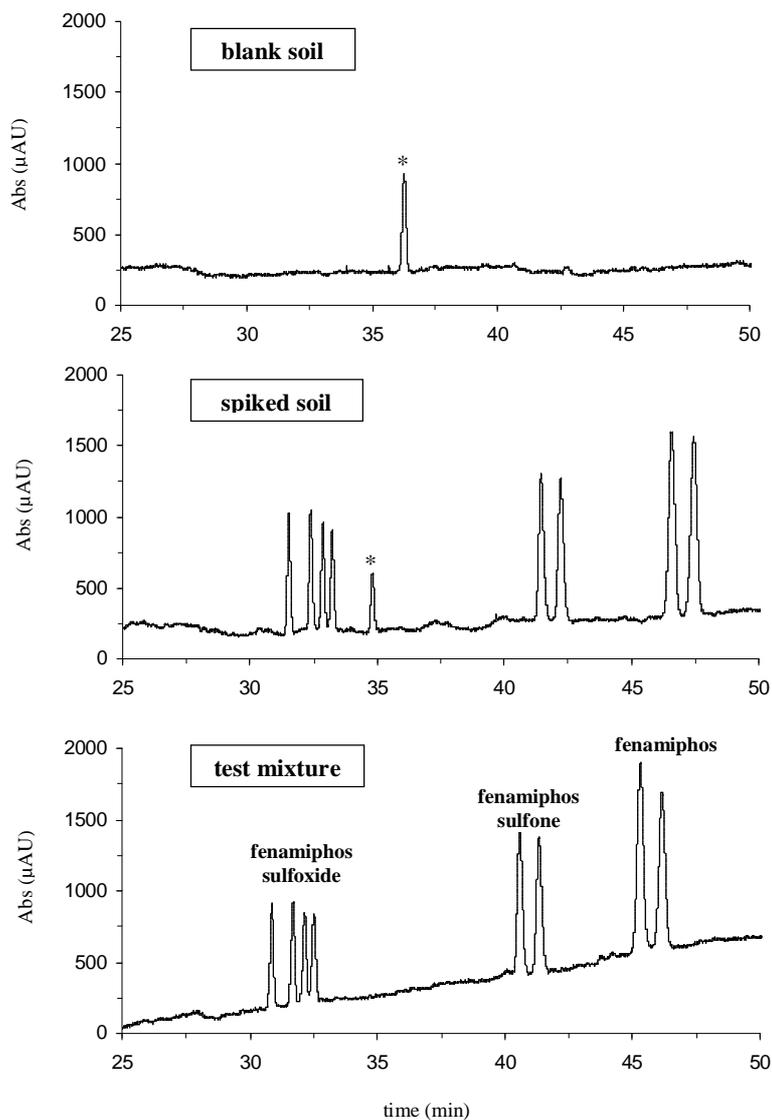
An assisted-pressure was applied at the inlet vial during the CE separation in order to shorten the analysis time. The pressure was varied from 0 – 0.5 psi and applied just after the migration of fenamiphos sulfoxide (35 min), in order to preserve the difficult separation of its four stereoisomers. The influence of the assisted pressure on run time, peak efficiency and enantioresolution was reported in *Figure III.16* for fenamiphos and fenamiphos sulfone.



**Figure III.16: Influence of assisted pressure on (a) run time, (b) peak efficiencies and (c) resolution of fenamiphos and fenamiphos sulfone enantiomers.**

Conditions: fused-silica capillary: 60 cm total length (50 cm effective length) x 50  $\mu\text{m}$  i.d.; electrolyte:  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{NH}_3$  (ionic strength: 50 mM, pH 5) + 25 mM CM- $\beta$ -CD + 10 mM HP- $\alpha$ -CD + 5% MeOH; voltage: +25 kV; temperature: 25°C; assisted pressure at 35 min; hydrodynamic injection: 5 s at 0.5 psi; detection: 214 nm; solute concentration: 200  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , grey bar: fenamiphos sulfone; white bar: fenamiphos.

Increasing assisted pressure from 0 to 0.5 psi induced an important decrease of run time (- 33 %) appears and an enhancement of peak efficiency. Consequently, the signal-to-noise of fenamiphos peak was improved (+ 25 %) as already proven in previous work [56]. Finally, the increase of assisted pressure affects the resolution (2.5 at 0 psi, 1.5 at 0.5 psi) and a medium applied pressure of 0.2 psi ( $R_s = 1.9$ ) was selected. The typical electropherogram of chiral separation of fenamiphos and its two metabolites under optimized conditions was given in *Figure III.17*.



**Figure III.17:** Typical electropherograms obtained by injecting (a) blank soil; (b) soil spiked with fenamiphos, fenamiphos sulfoxide and fenamiphos sulfone ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ ); (c) standard mixture of fenamiphos, fenamiphos sulfoxide and fenamiphos sulfone at  $100 \text{ µg.L}^{-1}$ .

Conditions: fused-silica capillary: 60 cm total length (50 cm effective length) x  $50 \text{ µm}$  i.d.; electrolyte:  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{NH}_3$  (ionic strength: 50 mM, pH 5) + 25 mM CM- $\beta$ -CD + 10 mM HP- $\alpha$ -CD + 5% MeOH; voltage: +25 kV; temperature:  $25^\circ\text{C}$ ; assisted pressure: 0.2 psi at 35 min; hydrodynamic injection: 5 s at 0.5 psi; detection: 214 nm.

- *Stock solution composition*

Since fenamiphos and its two metabolites have different physico-chemical properties (hydrophobicity and water solubility, *Figure III.13*), the composition of solvent sample is a crucial parameter. Indeed, when no methanol was added to the sample, the peak of fenamiphos has a signal-to-noise ratio divided by four and may sometimes disappear from the electropherogram depending on the fenamiphos concentration in the sample. Besides, a white precipitate appeared at the outlet of the capillary demonstrating a solubility problem. On the contrary, an organic solvent content higher than 20% induced a significant decrease in efficiency and therefore a loss of resolution between different fenamiphos sulfoxide stereoisomers. Hence, a content of 15% MeOH was added to the sample.

b) *Pesticide extraction from soil*

Solid liquid Extraction (SLE) and Pressure Fluid Extraction (PFE) have been evaluated for the extraction of fenamiphos and its metabolites from soil samples. The experiments were performed on 10 g of soil spiked with 1 mL of a mixture of three compounds ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  each). After extraction, the residue was dissolved in 1 mL of buffer ( $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{NH}_3$  I = 5 mM, pH 5) containing 15% MeOH. Different solvents (methanol, ethanol, heptane, ethyl acetate, dichloromethane and acetone) were tested in order to take into account the wide polarity range of studied pesticides. The literature reported that recovery values from 36 to 115% have been obtained for the PFE of organophosphorus pesticides by using ethyl acetate / acetone (50:50 v/v) [57] or cyclohexane / acetone (50:50 v/v) mixtures [58]. Nevertheless, these solvents were not polar enough to extract fenamiphos metabolites. After some preliminary experiments, EtOH was found to be the most convenient solvent to extract all compounds (recoveries of 50 – 80%) by PFE. Nevertheless, the size of the extraction cell (34 mL) did not allow extracting an amount of soil higher than 10 g.

SLE was also investigated on soil sample (10 g). Ethanol was replaced by methanol which enabled the extraction with higher recoveries (60 - 76%). The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), respectively calculated as the concentration corresponding to a signal-to-noise ratio equal to 3 and 10, were equal to  $6.25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  and  $21 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  for each stereoisomer of fenamiphos sulfoxide. In order to increase the sensitivity of this method and apply it for the determination of fenamiphos in real soil

samples, a higher amount of soil was extracted. The SLE was similar except for the solvent volumes which were twice higher.

Finally, the residue was dissolved in 200  $\mu\text{L}$  of acetate buffer. As a consequence, lower LOQ (1.72 – 2.06  $\text{mg.kg}^{-1}$ ) values were obtained for fenamiphos sulfoxide stereoisomers and fenamiphos sulfone enantiomers (2.70 – 2.96  $\text{mg.kg}^{-1}$ ). The quantitation of fenamiphos in soils by CE is less sensitive (LOQ = 15  $\text{mg.kg}^{-1}$ ) probably for reasons of extraction yield or solubility (Table III.8).

**Table III.8:** Linear ranges, calibration parameters, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of each compound.

Compound		Linear dynamic range ( $\text{mg.kg}^{-1}$ )	Calibration equation	$r^2$	LOD ( $\text{mg.kg}^{-1}$ )	LOQ ( $\text{mg.kg}^{-1}$ )
Fenamiphos enantiomers	1	15 – 100	$y = 4.17x + 55.27$	0.997	4.64	15.48
	2	15 – 100	$y = 4.46x + 36.12$	0.997	4.66	15.56
Fenamiphos sulfoxide stereoisomers	1	3 – 30	$y = 100.38x - 10.31$	0.9990	0.62	2.06
	2	3 – 30	$y = 99.14x + 7.70$	0.9997	0.51	1.72
	3	3 – 30	$y = 101.64x - 43.52$	0.9990	0.55	1.85
	4	3 – 30	$y = 98.87x - 69.96$	0.996	0.61	2.05
Fenamiphos sulfone	1	3 – 30	$y = 57.15x - 79.97$	0.9990	0.89	2.96
	2	3 – 30	$y = 56.11x - 84.33$	0.9990	0.81	2.70

$r^2$ : correlation coefficient.

y: corrected area of electrophoretic peak.

x: concentration of the analyte in the soil sample ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ).

Experimental conditions as in Fig. III.17.

### c) Assay of method pre-validation

#### a) Specificity

As the selected sample extraction procedure (SLE) was not selective, interfering matrix components from soil may co-migrate with the analytes and alter the separation. The method specificity was assessed by comparison of different electropherograms obtained by injection of blank soil, soil spiked with fenamiphos, fenamiphos sulfoxide and fenamiphos sulfone (100  $\text{mg.kg}^{-1}$  each) and a standard aqueous solution composed of fenamiphos, fenamiphos sulfoxide and fenamiphos sulfone (100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). As shown in figure III.17, only one endogenous compound in soil organic matter was extracted but it did not co-migrate with any analytes studied.

**b) Response function**

Response function of each stereoisomer was investigated by plotting corrected area versus the concentration in the 3 and 30 mg.kg<sup>-1</sup> concentration range for fenamiphos sulfoxide stereoisomers and fenamiphos sulfone enantiomers, and in the 15 - 100 mg.kg<sup>-1</sup> range for fenamiphos enantiomers. Methods were linear over the concentration range with correlation coefficients higher than 0.997 (*Table III.8*).

**c) Trueness and precision**

Results for trueness were expressed in terms of relative bias (%) and assessed for each level of the calibration curves. Whatever the compound and the stereoisomer, bias never exceeded the acceptable value of ±20%. As example, bias of each compound analyzed at the medium concentration value (5 or 50 mg.kg<sup>-1</sup>) of the calibration curve was reported in *table III.9*.

**Table III.9:** Trueness and precision data for the pre-validation assay for the determination of fenamiphos and its metabolites in soil sample.

Compound	Spiked concentration (mg.kg <sup>-1</sup> )	Bias (%)	Repeatability R.S.D. <sup>1</sup> (%)	Intermediate precision R.S.D. <sup>1</sup> (%)
Fenamiphos	50	4.3	1.0	11.6
	50	-0.8	1.1	13.2
Fenamiphos sulfoxide	5	5.0	0.7	5.1
	5	5.0	0.7	6.0
	5	4.7	0.7	2.9
	5	4.9	0.7	5.3
Fenamiphos sulfone	5	4.9	1.5	11.0
	5	3.3	1.4	8.2

<sup>1</sup> relative standard deviation (n = 6 for repeatability and n = 9 for intermediate precision).

The CE-UV method provided also a good precision. Indeed, the R.S.D. values calculated on corrected area were acceptable for the field of agricultural studies and were in the range of 0.5–1.5% for repeatability, and 2.9–13.2% for intermediate precision (*Table III.9*).

#### **II.4.4. Concluding remarks**

CE-UV method appears to be an efficient technique for the concurrent enantioselective analysis of fenamiphos and its two main metabolites (fenamiphos sulfoxide and fenamiphos sulfone) extracted from soil. A dual cyclodextrin system composed of CM- $\beta$ -CD and HP- $\alpha$ -CD allowed the chiral separation of height stereoisomers in a single analysis. The interest of an overimposed pressure applied during the CE analysis was proven since it reduced run time and improved peak efficiency and signal-to-noise ratio. According to the pre-validation data, quantitative chiral analysis of fenamiphos and its metabolite can be reliably performed by CE. Nevertheless, experiments on real samples are still needed to assess the influence of different types of soil. However, sensitivity has still to be improved regarding to the very low concentration of pesticides present in soil.

## **II.5. Conclusion**

Cette étude a été consacrée à l'analyse énantiosélective de différents pesticides organophosphorés par électrophorèse capillaire en utilisant des cyclodextrines comme sélecteurs chiraux. Les résultats ont confirmé l'aptitude de l'électrophorèse capillaire à résoudre les stéréoisomères de plusieurs OP possédant des atomes de phosphore ou de soufre comme centres d'asymétrie. Les sélecteurs chiraux sont les mêmes que ceux utilisés classiquement pour la séparation de molécules chirales dont l'asymétrie est introduite par un carbone tétravalent. Ainsi, les énantiomères d'un OP, le fénamiphos, ont été partiellement résolus en présence de cyclodextrines hautement sulfatées (5% m/v HS- $\beta$ -CD) dans un tampon  $H_3PO_4$ /triéthanolamine (pH 2,5). Enfin, l'addition d'urée (2 M) dans le tampon a permis de résoudre les problèmes de solubilité en milieu aqueux d'OP hydrophobes (sulprofos, EPN, isocarbophos) puis de séparer leurs énantiomères avec ces cyclodextrines anioniques.

Par ailleurs, la séparation énantiomérique et simultanée du fenamiphos et de ses métabolites a été réalisée en EC avec un système combiné de deux cyclodextrines, l'une anionique (25 mM CM- $\beta$ -CD) et l'autre neutre (10 mM HP- $\alpha$ -CD), dans un tampon acétate d'ammonium (I = 50 mM, pH 5) contenant 10 % de méthanol. L'application d'une pression assistée (0,2 psi) simultanément à la tension de séparation a permis de diminuer le temps d'analyse, d'améliorer l'efficacité des pics et d'accroître la sensibilité. Ainsi, les huit stéréoisomères de ce pesticide et de ses deux métabolites ont été résolus de façon satisfaisante en 48 min. Cette méthode a été pré-validée et appliquée à la quantification de ce composé dans des extraits de sol. Toutefois, des études complémentaires doivent être menées afin d'améliorer les limites de quantification (LOQ = 1,2 – 15 mg.kg<sup>-1</sup>).

### **III. Intérêt du détecteur conductimétrique pour l'analyse des énantiomères d'amines dépourvues de groupements chromophores en EC**

La plupart des appareils d'électrophorèse capillaire sont commercialisés avec un détecteur d'absorption UV, à barrette de diodes (DAD) ou de fluorescence (LIF). Bien que ces modes de détection aient prouvés leurs qualités (sensibilité, linéarité, limite de détection) lors de l'analyse de composés absorbants UV ou fluorescents, ils sont incapables de détecter des molécules dépourvues de groupements chromophores comme les acides aminés, les sucres... Différentes familles de composés peuvent être dérivées à l'aide, par exemples, de l'o-phthalaldéhyde (OPA), la fluorescamine, le naphthalène-2,3-dicarboxaldéhyde (NDA). Ainsi, les limites de détection des catécholamines sont excellentes ( $10^{-8}$  mol.L<sup>-1</sup>) après dérivaison avec l'OPA [59]. Cependant, ces réactions ne sont pas universelles. En effet, pour la plupart des réactifs fluorescents, l'analyte doit posséder une fonction amine primaire pour que la réaction de dérivaison puisse avoir lieu. De plus, les réactions de dérivaison conduisent généralement à la formation de produits secondaires qui peuvent interférer avec le composé d'intérêt lors de sa détection, en outre, si de faibles concentrations doivent être quantifiées. Enfin, les réactions de dérivaison, faisant appel à la NDA ne sont pas instantanées, et augmentent considérablement le temps d'analyse [60].

Pour les composés non absorbants UV, la détection UV indirecte est une approche possible et l'analyte est détecté par diminution de l'absorbance. Le tampon doit alors posséder un co-ion chromophore. Par analogie, l'addition d'un composé fluorophore dans le tampon permet la détection de composés non fluorescents par fluorescence indirecte. Toutefois, la détection indirecte conduit à certaines limitations : manque de sensibilité [61], bruit de fond excessif [62], instabilité de la ligne de base [62] et élargissements de pics dus à une trop grande différence de mobilité électrophorétique entre l'analyte et le co-ion.

Les techniques alternatives telles que l'ampérométrie, la potentiométrie et la conductimétrie sont très sensibles [63] et les technologies développées sont intrinsèquement plus simples puisqu'aucun élément optique (lampe, monochromateur,

lentille) n'est nécessaire à leur fonctionnement. Etant donné que la réponse du détecteur dérive directement d'un paramètre électrique de la solution (un courant en ampérométrie, une tension en potentiométrie et une résistance en conductimétrie), l'addition potentielle de bruit de fond et d'imprécision de mesure est fortement réduite [64]. En chromatographie liquide, seules 5 % des analyses utilisent l'ampérométrie pour la détection [65]. Elle est basée sur la mesure d'un courant généré lors de l'oxydation ou la réduction des analytes après élution de la colonne. La détection conductimétrique, quant à elle, est universelle pour toute espèce ionique et trouve de réelles applications en chromatographie ionique [66].

Durant ces dernières décennies, de nombreux travaux ont visé à intégrer les méthodes électrochimiques à l'électrophorèse capillaire [64,67-70]. Cependant, le développement du détecteur conductimétrique en EC a été plus lent qu'en HPLC en raison des nombreuses contraintes associées à cette technique. En effet, la cellule de détecteur doit avoir un volume compatible avec les faibles diamètres internes (75  $\mu\text{m}$  ou moins) des capillaires. De plus, l'application d'un champ électrique intense (300  $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) durant l'analyse ne doit pas interférer avec le signal électrique généré lors du passage de l'analyte dans le système de détection. A ce jour, tous ces problèmes techniques sont résolus et deux appareils robustes sont commercialisés.

Après un rappel bibliographique sur la détection conductimétrique en EC, nous montrerons l'intérêt de ce détecteur lors de l'analyse chirale de dérivés aminés dénués de tout groupement chromophore. Le choix des constituants de l'électrolyte support (co-ion, contre ion, sélecteur chiral) sera discuté. La sensibilité de ce mode de détection sera ensuite comparée à celle de la détection UV indirecte. Finalement, l'analyse chirale en EC-détection conductimétrique sera validée.

### **III.1. Rappel sur la détection conductimétrique en électrophorèse capillaire**

#### **III.1.1. Généralités**

Depuis quelques années, la détection conductimétrique trouve un véritable essor en électrophorèse capillaire, notamment lors de l'analyse des ions minéraux ou organiques [67]. Ce mode de détection universel pour les espèces ioniques est basé sur la conductivité des ions en solution aqueuse. Son principe repose sur la différence de conductivité entre les zones de migration de l'analyte et de l'électrolyte.

##### *a) Considérations physiques*

La conductivité est liée à la nature et la concentration des ions qui la composent. La conductivité ( $\kappa$ ) d'une solution aqueuse, exprimée en  $S.m^{-1}$ , a pour expression :

$$k = \sum_i C_i |z_i| \lambda_i \quad (III.4)$$

où  $C_i$  est la concentration molaire de l'espèce ionique  $i$  en solution ( $mol.L^{-1}$ ),  $Z_i$  sa charge et  $\lambda_i$  sa conductivité équivalente ionique ( $S.m^2.mol^{-1}$ ).

La conductivité est généralement déduite de la mesure de la résistance d'une cellule de conductivité, constituée de deux électrodes métalliques de même nature, immergées dans une solution électrolytique. La conductance  $G$  du volume d'électrolyte compris entre deux électrodes planes identiques et parallèles, séparées d'une distance  $L$ , a pour expression :

$$G = k \frac{S}{L} \quad (III.5)$$

où  $G$  la conductance ( $S$ ),  $\kappa$  la conductivité de la solution ( $S.m$ ). Le rapport  $L/S$  ( $m^{-1}$ ) ou  $S/L$  ( $m$ ), selon les fabricants, est appelé constante de cellule et peut être noté  $k_{cel}$ .

*b) Formules théoriques du signal conductimétrique en EC*

Lors d'une séparation électrophorétique, tout élément de volume doit satisfaire à la fonction de régulation de Kohlrausch, qui peut s'écrire sous sa forme simple comme suit :

$$w = \sum_i \frac{C_i}{m_i^0} \quad (\text{III.6})$$

où  $C_i$  et  $m_i^0$  représentent les concentrations ioniques et les valeurs absolues des mobilités absolues de tous les constituants ioniques monovalents pour lesquelles une seule forme chargée existe en solution. La valeur numérique de cette fonction  $w$  est invariable en fonction du temps.

Soit un élément de volume du capillaire, contenant initialement un électrolyte AB de concentration  $C_A$ , constitué d'un co-ion A (de même signe que le soluté i) et d'un contre-ion B. Au cours de la migration, cet élément de volume sera constitué d'un mélange du soluté i et de l'électrolyte AB. Du fait de la constance de la fonction de régulation de Kohlrausch dans cet élément de volume, nous pouvons écrire :

$$\frac{C_A^E}{m_A^0} + \frac{C_B^E}{m_B^0} = \frac{C_A^S}{m_A^0} + \frac{C_B^S}{m_B^0} + \frac{C_i^S}{m_i^0} \quad (\text{III.7})$$

où les exposants E et S désignent respectivement les zones électrolyte et soluté, supposées de force ionique identique et faible.

La concentration du contre-ion B est déterminée à partir des équations d'électroneutralité :

- dans la zone électrolyte :  $C_A^E = C_B^E$

- dans la zone soluté :  $C_A^S + C_i^S = C_B^S$

Par conséquent, l'équation s'écrit :

$$\left( \frac{1}{m_A^0} + \frac{1}{m_B^0} \right) C_A^E = \left( \frac{1}{m_A^0} + \frac{1}{m_B^0} \right) C_A^S + \left( \frac{1}{m_B^0} + \frac{1}{m_i^0} \right) C_i^S \quad (\text{III.8})$$

Soit, par réarrangement de l'expression précédente:

$$C_A^E = C_A^S + k_i C_i^S \quad (\text{III.9})$$

où  $k_i$  est le rapport de transfert égal à :

$$k_i = \frac{m_A^0}{m_i^0} \cdot \frac{m_B^0 + m_i^0}{m_A^0 + m_B^0} \quad (\text{III.10})$$

La conductivité spécifique  $\kappa^E$  de la zone électrolyte s'exprime par la relation :

$$k^E = F(C_A^E m_A^0 + C_B^E m_B^0) \quad (\text{III.11})$$

et la conductivité spécifique  $\kappa_i^S$  de la zone soluté :

$$k_i^S = F(C_A^S m_A^0 + C_B^S m_B^0 + C_i^S m_i^0) \quad (\text{III.12})$$

En tenant compte de l'équation d'électroneutralité et en remplaçant  $C_A^E$  et  $C_B^S$  par leur expression en fonction  $\kappa^E$ , la conductivité spécifique de la zone soluté s'écrit alors:

$$k_i^S = k^E + b_i C_i \quad (\text{III.13})$$

avec le coefficient  $b_i$  égal à

$$b_i = F(m_i^0 + m_B^0) \left( 1 - \frac{m_A^0}{m_i^0} \right) \quad (\text{III.14})$$

La différence de conductivité spécifique  $\Delta k_i$  entre les deux zones

$$\Delta k_i = k_i^S - k^E = b_i C_i \quad \text{est égale à :}$$

$$(\text{III.15})$$

Soit de façon plus explicite :

$$\Delta k_i = F(m_i^0 + m_B^0) \left( 1 - \frac{m_A^0}{m_i^0} \right) \cdot C_i \quad (\text{III.16})$$

où  $F$  est la constante de Faraday et  $m_A^0$ ,  $m_B^0$  et  $m_i^0$  sont les valeurs absolues des mobilités absolues du co-ion A, du contre-ion B de l'électrolyte et de l'ion i.

Or, la mobilité absolue est liée à la conductivité équivalente limite par la relation :

$$I_i^0 = Fm_i^0 \quad (\text{III.17})$$

Ainsi, le coefficient de réponse peut aussi s'exprimer en fonction des conductivités équivalentes limites de chaque espèce ionique :

$$b_i = (I_i^0 + I_B^0) \left( 1 - \frac{I_A^0}{I_i^0} \right) \quad (\text{III.18})$$

Le coefficient de réponse  $b_i$ , dépend des conductivités équivalentes limites (donc des mobilités électrophorétiques) du co-ion A, du contre-ion B de l'électrolyte et de celle de chaque soluté i. Le signe de  $b_i$  varie en fonction de la mobilité du soluté i par rapport à celle du co-ion A. Trois cas peuvent se présenter :

- la mobilité absolue de l'ion soluté i est supérieure à celle du co-ion A ( $b_i > 0$ ), le signal  $\Delta\kappa_i$  est positif,
- la mobilité absolue de l'ion soluté i est inférieure à celle du co-ion A ( $b_i < 0$ ), le signal  $\Delta\kappa_i$  est négatif,
- la mobilité absolue de l'ion soluté i est égale à celle du co-ion A ( $b_i = 0$ ) et le signal conductimétrique est nul.

La conductance (G) d'une zone est reliée à sa conductivité ( $\kappa$ ) et à la constante de cellule  $k_{\text{cel}}$  par la relation suivante :  $G = \kappa / k_{\text{cel}}$

La différence de conductance ( $\Delta G_i$ ) entre la zone soluté et la zone électrolyte s'écrit :

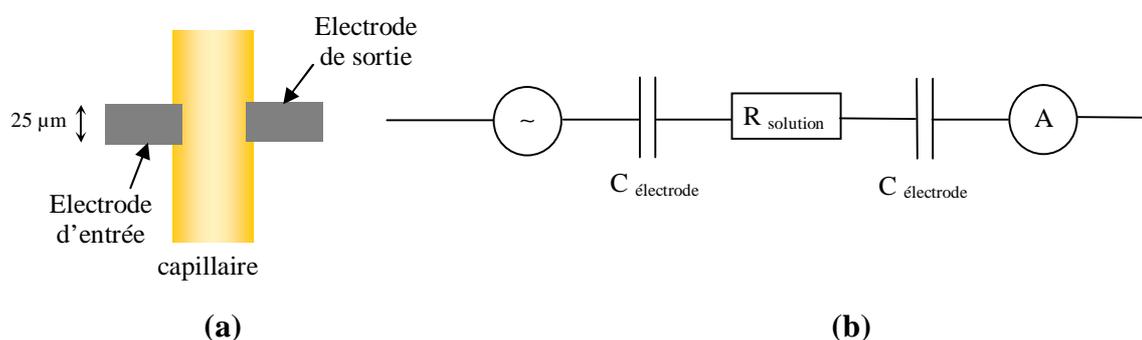
$$\Delta G_i = (m_i^0 + m_B^0) \left( 1 - \frac{m_A^0}{m_i^0} \right) \frac{F}{10^{-3} K} \cdot C_i \quad (\text{III.19})$$

Ainsi, la sensibilité de la détection conductimétrique en EC est proportionnelle à la différence des mobilités électrophorétiques de l'analyte et du co-ion.

### III.1.2. Appareillage

#### a) La détection conductimétrique avec contact

L'équipe de Zare [71] a décrit, pour la première fois en 1987, le mode de détection conductimétrique « on column ». La cellule conductimétrique était construite à partir de deux électrodes de platine de forme cylindrique ( $25\ \mu\text{m}$  de diamètre) insérées de façon diamétralement opposée dans des orifices de  $40\ \mu\text{m}$  percés dans le capillaire (Figure III.18). Ce système a été appliqué à la détermination d'acides carboxyliques de faible masse moléculaire [72] et à la quantification du lithium dans le sérum [73].



**Figure III.18** : Détection conductimétrique avec contact [65].

(a) : Les électrodes en métal sont insérées à l'intérieur du capillaire. Durant la mesure, un signal électrique alternatif est appliqué au niveau de l'électrode d'entrée et le courant résiduel est collecté, via l'électrode de sortie.

(b) : Schéma électrique relatif au modèle de détection conductimétrique sans contact. Le détecteur peut être représenté par un circuit électrique comprenant deux condensateurs ( $C_{\text{électrode}}$ ) et une résistance de la solution électrolytique ( $R_{\text{solution}}$ ).

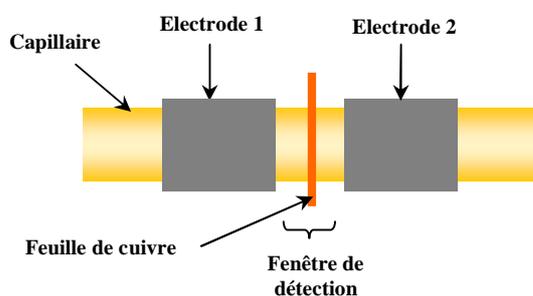
Par la suite, la géométrie de ce détecteur a été améliorée en positionnant les électrodes à quelques centimètres de l'une des extrémités du capillaire. Dans ce système nommé « end-column », les deux électrodes plongent directement dans la solution électrolytique [74]. Durant plusieurs années, la géométrie de ce détecteur n'a cessé d'évoluer afin d'améliorer ses performances (notamment pour l'élimination des interférences [75]) conduisant à la construction du détecteur Crystal 1000 par la société Unicam dans les années 1990 [76].

Afin d'augmenter la sensibilité du détecteur, deux équipes [77,78] ont développé un suppresseur ionique compatible avec la détection conductimétrique avec contact. Cependant, devant les difficultés d'assemblage du capillaire, du suppresseur et de la cellule conductimétrique, associées à la miniaturisation du système, le détecteur conductimétrique avec contact n'a jamais réellement été adopté et sa commercialisation a été abandonnée.

*b) La détection conductimétrique sans contact à couplage capacitif*

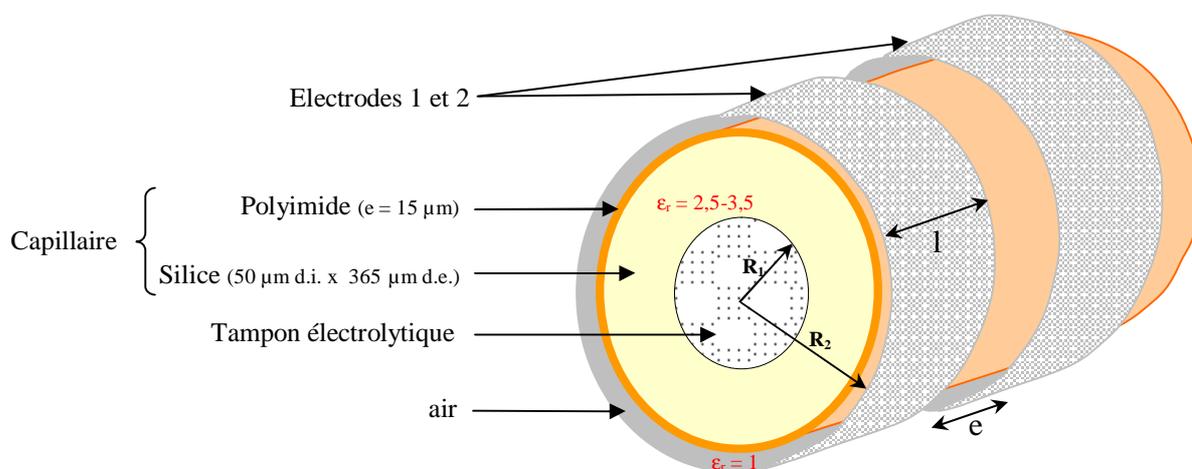
**a) Principe et appareillage**

Les électrodes d'un détecteur conductimétrique sans contact à couplage capacitif ( $C^4D$ ) sont positionnées à l'extérieur du capillaire sans contact direct avec la solution électrolytique. Ce détecteur est constitué de deux électrodes cylindriques (0,2 - 2 cm de longueur, 0,4 mm de diamètre interne) en acier inoxydable [79] ou en argent verni [80]. Elles sont positionnées de façon axiale et en série autour du capillaire de silice fondue recouvert de sa gaine de polyimide. Ces électrodes sont espacées, l'une de l'autre, d'une distance de 1,5 à 5 mm pour former la fenêtre de détection [81]. La cellule de détection correspond à la longueur du la fenêtre de détection et à la section géométrique des électrodes (*Figure III.19*).



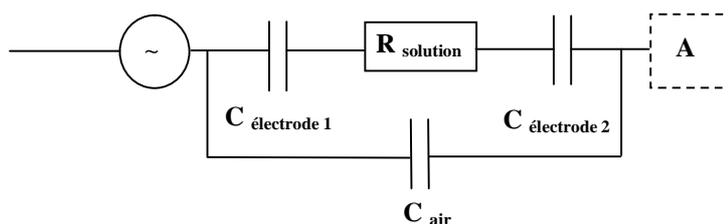
**Figure III.19** : Représentation schématique d'un détecteur conductimétrique sans contact à couplage capacitif [79,81].

Chaque électrode tubulaire et l'électrolyte forment un condensateur dans lequel les constituants du capillaire (silice, polyimide) et la couche d'air, qui sépare le capillaire de l'électrode, jouent le rôle de diélectriques isolants (*Figure III.20*).



**Figure III.20** : Représentation des deux condensateurs cylindriques du C<sup>4</sup>D.

Le schéma électrique simplifié de ce système (*Figure III.21*) est celui d'un montage en série de deux condensateurs ( $C_{\text{électrode}}$ ) séparés par la résistance ( $R_{\text{solution}}$ ) de la solution électrolytique contenue dans le capillaire.



**Figure III.21** : Schéma électrique simplifié équivalent de la cellule du C<sup>4</sup>D [82].

La capacité de chaque électrode ( $C_{\text{électrode}}$ ) peut être définie par la relation suivante :

$$C_{\text{électrode}} = 2pe_o e_r \frac{l}{\ln\left(\frac{R_2}{R_1}\right)} \quad (\text{III.20})$$

où  $\epsilon_o$  et  $\epsilon_r$  sont respectivement la permittivité du vide et du diélectrique isolant (silice + polyimide + air),  $R_1$  le rayon de l'armature intérieure,  $R_2$  le rayon de l'armature extérieure et  $l$  la longueur du condensateur (*Figure III.20*).

Le terme  $C_{air}$  correspond à la capacité du condensateur plan constitué par les armatures métalliques extérieures des électrodes 1 et 2 ; l'air ambiant constitue le diélectrique isolant (Equation III.21).

$$C_{air} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r S}{e} \quad (III.21)$$

où  $\epsilon_r$  est la permittivité de l'air, S la surface des armatures du condensateur plan et e l'épaisseur du diélectrique (la longueur de la fenêtre de détection).

L'impédance du circuit électrique décrit sur la figure III.21 peut être calculée selon la formule suivante :

$$\frac{1}{Z} = \frac{1}{Z_{air}} + \frac{1}{R_{solution} + 2Z_{électrode}} \quad (III.22)$$

Lorsque chacun de ces éléments électriques est traversé par un courant alternatif de fréquence donnée, l'impédance du circuit électrique peut être définie comme suit :

$$Z = \frac{\frac{1}{j\omega C_{électrode}} + R_{solution}}{R_{solution} + \frac{1}{j\omega C_{air}} + 1} \quad (III.23)$$

Afin d'éviter tout couplage capacitif entre les deux électrodes par l'air ambiant, une fine feuille de cuivre peut être positionnée perpendiculairement entre ces électrodes et mise à la terre. Elle constitue ainsi, un écran de Faraday [81], intéressant pour réduire le bruit de fond.

L'équation III.23 se simplifie alors ( $C_{air} = 0$ ) pour aboutir à la relation suivante :

$$Z = R_{solution} + \frac{1}{j\omega C_{électrode}} \quad (III.24)$$

Une tension sinusoïdale alternative variable (1 - 100 volts) est appliquée à la première électrode. Le signal est couplé de façon capacitive à travers les parois du tube de silice et l'électrolyte jusqu'à la seconde électrode. Lorsqu'un soluté ionique passe dans la fenêtre de détection, la conductivité de la solution augmente. Le courant est collecté aux

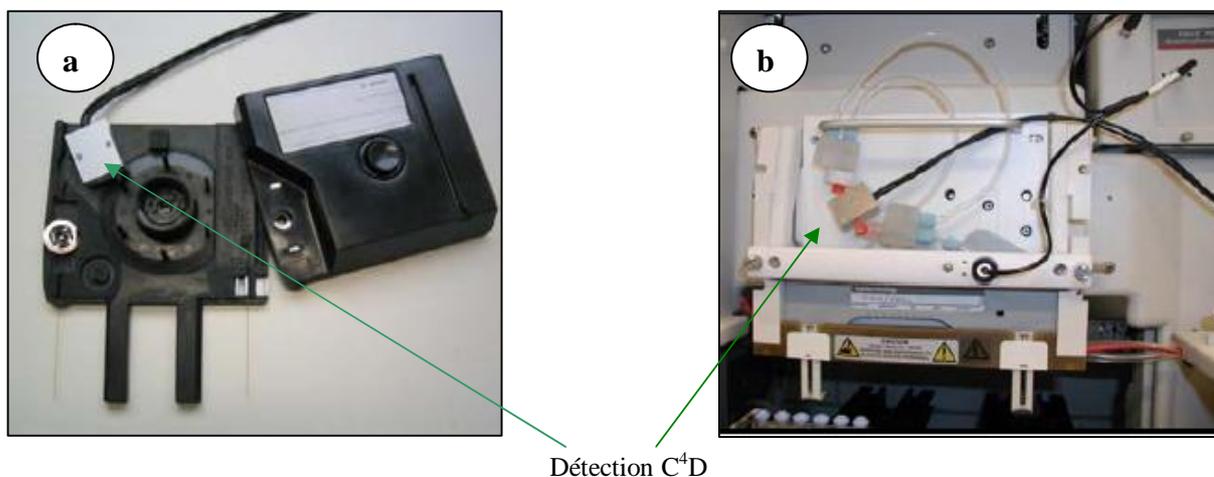
bornes de la seconde électrode avant d'être transformé en une tension alternative grâce à un amplificateur opérationnel [83]. La sensibilité de la détection est d'autant meilleure que la différence de conductivité entre l'analyte et l'électrolyte support est élevée.

Depuis ces dix dernières années, de nombreuses équipes ont optimisé la géométrie de ce détecteur (nature et longueur des électrodes [65], la longueur de la fenêtre de détection [65]), la tension [67,84,85] et la fréquence d'excitation [86,87], afin d'en améliorer les performances en termes de sensibilité et d'efficacité de pic [83]. A ce jour, deux détecteurs sont commercialisés : l'appareil TraceDec (Istech : Innovative Sensor Technologies) et le détecteur C<sup>4</sup>D PowerChrom (eDAQ).

### b) Avantages de la détection conductimétrique sans contact en

#### EC

La géométrie de ce détecteur présente de nombreux avantages par rapport à la détection conductimétrique avec contact. Le capillaire s'insérant directement dans la sonde de détection, l'expérimentateur peut fixer, lui-même, le détecteur à l'endroit désiré le long du capillaire (*Figure III.22*).



**Figure III.22 :** Positionnement de la cellule du C<sup>4</sup>D TraceDec sur le capillaire avec un appareil d'EC. (a) 3D CE (Agilent) et (b) PACE/MDQ (Beckman).

Cette approche offre une grande souplesse d'utilisation et permet de moduler la longueur effective du capillaire. Ce mode de détection est non destructif et l'addition d'un second détecteur tel que l'UV permet la détection simultanée de composés absorbants ou non dans le domaine UV-visible [61]. Plusieurs détecteurs peuvent être ainsi positionnés le

long du capillaire. Par ailleurs, il n'est pas nécessaire d'enlever le film de polyimide recouvrant la silice fondue, ce qui limite les risques de cassure du capillaire lors de son montage dans la cassette.

### **III.1.3. Critères de sélection du tampon**

De façon générale, le tampon électrophorétique doit être constitué d'un co-ion de mobilité électrophorétique très différente de celle de l'analyte, afin d'obtenir la meilleure sensibilité de détection.

D'autre part, il est préférable de choisir un tampon contenant un co-ion de faible mobilité, afin de diminuer la conductivité de la solution et, minimiser ainsi l'effet Joule. Le bruit de fond est alors réduit et les limites de détection sont améliorées [88]. Cependant, le co-ion doit être de mobilité proche de celle de l'analyte afin de limiter la dispersion du pic par électromigration [64]. Ainsi, la composition de l'électrolyte doit être judicieusement ajustée afin de trouver un compromis entre la sensibilité de l'analyse et la symétrie des pics. Les molécules pouvant former des zwitterions, de faible conductivité ( $< 2 \text{ mS.cm}^{-1}$ ), composent généralement les tampons utilisés avec la détection conductimétrique en EC [83]. La force ionique du tampon ( $< 20 \text{ mM}$ ) est inférieure à celle utilisée avec une détection spectrométrique UV indirecte. Toutefois, de telles solutions électrolytiques possèdent une capacité de tampon élevée. Par exemple, un tampon constitué d'acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique (20 mM) et d'histidine (20mM), couramment utilisé pour l'analyse des ions minéraux [83], a un pouvoir tampon de  $690 \text{ mM.L}^{-1}.\text{pH}^{-1}$  [89]) ce qui contribue à une bonne reproductibilité des analyses. En revanche, la gamme de pH usuelle d'utilisation est, pour la plupart des tampons, limitée entre 5 et 9.

### **III.1.4. Principales utilisations du C<sup>4</sup>D en EC**

Ce mode de détection a été décrit pour la première fois en EC par l'équipe de Gas [90] et appliqué à l'analyse de composés inorganiques en isotachophorèse [90,91].

#### *a) Les ions minéraux*

Actuellement, les principales applications du détecteur C<sup>4</sup>D en EC décrivent la quantification d'ions minéraux dans diverses matrices [83]. Jusqu'à ce jour, la détection de ces espèces ioniques était réalisée par spectrométrie UV indirecte [92,93]. La simplicité d'utilisation et les limites de quantification plus faibles, obtenues par la détection conductimétrique, ont fait du C<sup>4</sup>D un détecteur de choix pour l'analyse des ions minéraux.

Le tampon classiquement utilisé pour la séparation des cations est constitué d'acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique (MES) et d'histidine auxquels est éventuellement ajouté un éther-couronne (18C6), ceci afin d'améliorer la séparation difficile entre les ions ammonium et potassium [83].

La séparation des anions est réalisée dans les mêmes conditions électrophorétiques que celles décrites ci-dessus. Cependant, un traitement du capillaire avec le bromure d'hexadécyltriméthylammonium (CTAB) est nécessaire pour inverser le flux électroosmotique et permettre la détection des analytes [83].

La séparation simultanée de 22 espèces ioniques, comprenant des anions organiques et minéraux, des cations alcalins, alcalino-terreux et des métaux de transition, a également été rapportée en EC-C<sup>4</sup>D [94]. La composition du tampon a été légèrement modifiée (L-histidine + acide lactique + 18C6). Le pH peu élevé du tampon (pH 4,25) permet d'éviter l'utilisation d'un inverseur de flux électroosmotique. Les 22 ions ont été complètement résolus en moins de 3 min et leurs limites de détection sont comprises entre 7,5 et 62 ppb, à l'exception des ions cadmium, chromate, fluorure (LOD = 125 ppb) et de l'ion fumarate (LOD = 250 ppb).

#### *b) Les composés pharmaceutiques*

La plupart des composés pharmaceutiques absorbent dans le domaine UV. Ils peuvent être analysés par des méthodes chromatographiques et électrophorétiques classiques avec une détection par spectrométrie UV. En revanche, certains d'entre eux sont

dépourvus de groupements chromophores. Quelques publications rapportent l'utilité du  $C^4D$  pour l'analyse de composés pharmaceutiques [83].

Ainsi, des molécules de  $\beta$ -bloquants ont été séparées comme standard ou dans diverses préparations pharmaceutiques [95]. L'analyse de l'atenolol, dans la forme pharmaceutique Ternormin<sup>®</sup>, révèle la présence de magnésium comme l'un des principaux excipients. Cette étude rend compte de l'universalité du détecteur conductimétrique qui permet la détection simultanée de composés organiques et minéraux.

### c) Les séparations énantiomériques

L'analyse énantiomérique de composés organiques chiraux constitue un nouvel axe de développement du  $C^4D$  en EC. A ce jour, seules 5 publications évoquent cette problématique (*Tableau III.10*).

Dans les travaux de Maier *et al.* [96] et de Petr *et al.* [62], une méthode de remplissage partielle du capillaire par le tampon électrolytique, a été développée pour la séparation énantiosélective de la tamsulosine et de l'acide lactique.

Gong et Hauser [97] ont réalisé la séparation simultanée des énantiomères des composés, 1-phényléthylamine et 1-cyclohexyléthylamine, en ajoutant une cyclodextrine (DM- $\beta$ -CD) et un éther couronne chiral possédant des groupements acides ionisables ((+)-18C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>) dans 0,5 M d'acide acétique. La méthode a permis de détecter l'énantiomère minoritaire présent à une teneur de 1% par rapport à l'énantiomère majoritaire. Toutefois, une étude quantitative a démontré que le biais de la méthode était supérieur à 80 %.

Les mêmes auteurs ont évalué l'aptitude du système EC- $C^4D$  pour la résolution chirale d'une vingtaine de dérivés aminés possédant des fonctions alcool, éther, acide ou des cycles non aromatiques [98]. L'électrolyte support est constitué d'acide acétique (0,5 M) auquel sont ajoutés 5 mM DM- $\beta$ -CD et 5 mM (+)-18C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>. Ces conditions ont permis la résolution de chacun de ces composés et, en particulier, celle simultanée des huit amines aliphatiques. Les limites de détection sont comprises entre 1 et 1,2  $\mu$ M. Toutefois, cette étude confirme les problèmes de justesse (biais = 60 %) évoqués précédemment, notamment lors de l'analyse d'un mélange d'énantiomères dans les proportions 99,5/0,5.

Par ailleurs, des principes actifs de médicaments et des acides aminés ont été séparés et détectés avec succès selon cette méthodologie [99].

A ce jour, aucune étude quantitative exhaustive n'a permis d'évaluer les potentialités du détecteur C<sup>4</sup>D pour déterminer la pureté énantiomérique de composés chiraux. Nous avons donc sélectionné des solutés tests (amines dépourvues de groupements chromophores), en vue d'évaluer les performances (linéarité dynamique, limites de détection, précision, justesse, exactitude) du détecteur. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus par une détection par spectrométrie UV indirecte. Ces travaux sont présentés dans le paragraphe suivant.

**Tableau III.10 : Etude bibliographique des séparations chirales réalisées en EC – C<sup>4</sup>D.**

Analyte	Composition de l'électrolyte	Détecteur C <sup>4</sup> D	LOD	Réf.
1-cyclohexyléthylamine 1-phényléthylamine	- tampon: 25 mM acide citrique, pH 2,4 - sélecteur chiral: 5 mM <b>DM-b-CD</b> + 5 mM <b>18C<sub>6</sub>H<sub>4</sub></b>  durée : <b>12 min</b> Rs : 2,3 – 3,3	<i>développé par les auteurs</i> 400 Vpp, 200 kHz	0,5 µM	[97]
Dérivés aminés : (alkylamines avec ou sans fonctions hydroxyles, cyclique, éther, ester)	- tampon: 0,5 M acide acétique, pH 2,45 - sélecteur chiral: 5 mM <b>DM-b-CD</b> + 5 mM (+)- <b>18C<sub>6</sub>H<sub>4</sub></b>  durée : <b>2 – 15 min</b> Rs : 0 – 6,0	<i>développé par les auteurs</i> 20 - 400 Vpp, 200 - 600 kHz	1 – 10 µM	[98]
Acide lactique	- tampon: 5 mM oxalate-histidine, pH 4,5 - sélecteur chiral: 1-10 mM <b>vancomycine</b>  durée : <b>5 min</b> Rs : 2,6	<i>développé par Gas et al.</i> N.R	N.R.	[96]
Composés pharmaceutiques : (doxylamine, noradrénaline, Isoprotérénol, éphédrine)	- tampon: acide lactique + histidine (diverses compositions) - sélecteur chiral: <b>HP-b-CD</b> (diverses concentrations)  Durée : <b>10 – 25 min</b> Rs : 0,95 – 1,86	<i>développé par les auteurs</i> 400 Vpp, 200 kHz	N.R.	[99]
Tamsulosine	- tampon: 100 mM acide acétique / Tris 100 mM acide acétique / NaOH - sélecteur chiral: 1000 mg.L <sup>-1</sup> <b>S-b-CD</b>  Durée : <b>10 – 20 min</b> Rs : 4,0 – 10,4	<i>développé par les auteurs</i> 300 kHz	N.R.	[62]

N.R. : non rapporté

**III.2. Article 7: Sensitivity improvement by using contactless conductivity rather than indirect UV detection for the determination of enantiomeric purity of amines by capillary electrophoresis**

**Acceptée dans Electrophoresis (2008)**

Marie Lecoeur-Lorin, Raphaël Delépée, Philippe Morin\*

*Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), CNRS FR 2708, UMR 6005, Université d'Orléans, Orléans, France*

**Abstract**

A capacitively coupled contactless conductivity detection ( $C^4D$ ) system for capillary electrophoresis (CE) with a flexible detection cell was applied for the enantioseparation of small chiral underivatized amines using chiral crown ether or cyclodextrin as chiral selector. Since these compounds are poorly UV-active,  $C^4D$  was an alternative detection mode. The composition (ionic strength, pH, chiral selector) of the electrolyte was optimized in order to be suitable for  $C^4D$ . (-)-18-crown-6 tetracyclic acid ( $18C_6H_4$ ) was required as chiral selector to resolve the enantiomers of small polar amines. However, TM- $\beta$ -CD was suitable to separate amines possessing hydrophobic carbon chains.

The performance of  $C^4D$  was compared with indirect UV detection in terms of sensitivity, repeatability and accuracy. The linearity range of  $C^4D$  was very large ( $1.5\text{--}1600\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) compared to indirect UV one ( $25\text{--}400\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and allowed the determination of the enantiomeric purity of isopinocampheylamine until 0.25%.

The CE- $C^4D$  method has been fully validated by applying a novel strategy using accuracy profiles. All relative biases of the developed method were included within the  $\pm 15\%$  limits of acceptance.

$C^4D$  is a good alternative to indirect UV detection for the enantioseparation of non-UV absorbing amines since the method development is fast and easy and, the sensitivity is improved by a factor of 100 compared to indirect UV mode.

*Keywords:* Capillary electrophoresis; Contactless Conductivity Detection; Indirect UV detection, Cyclodextrin; Chiral crown ether; Enantiomeric purity; Amine

### **III.2.1. Introduction**

Enantiomer separation is a major stake in pharmaceutical, food or agricultural industries due the difference of behavior between two enantiomers in terms of activity, pharmacokinetic and toxicity. Hence, the development of high-resolution analytical methods is required to resolve the enantiomers and quantify the enantiomeric impurity (diastomer /eutomer).

Most of chiral separations are achieved either by liquid chromatography (LC) using Pirkle-type, polysaccharide-, proteins-, chiral crown ether- and antibiotics-based stationary phases [100,101] or by capillary electrophoresis (CE) with cyclodextrins as chiral selectors added to the electrophoretic buffer [102,103]. Both techniques are generally coupled to UV detector since the majority of chiral drugs possess aromatic rings. UV-based detection for LC or CE remains popular because of its simplicity, reliability and low cost. However, the sensitivity of such detection is limited when poorly UV-active compounds are analyzed.

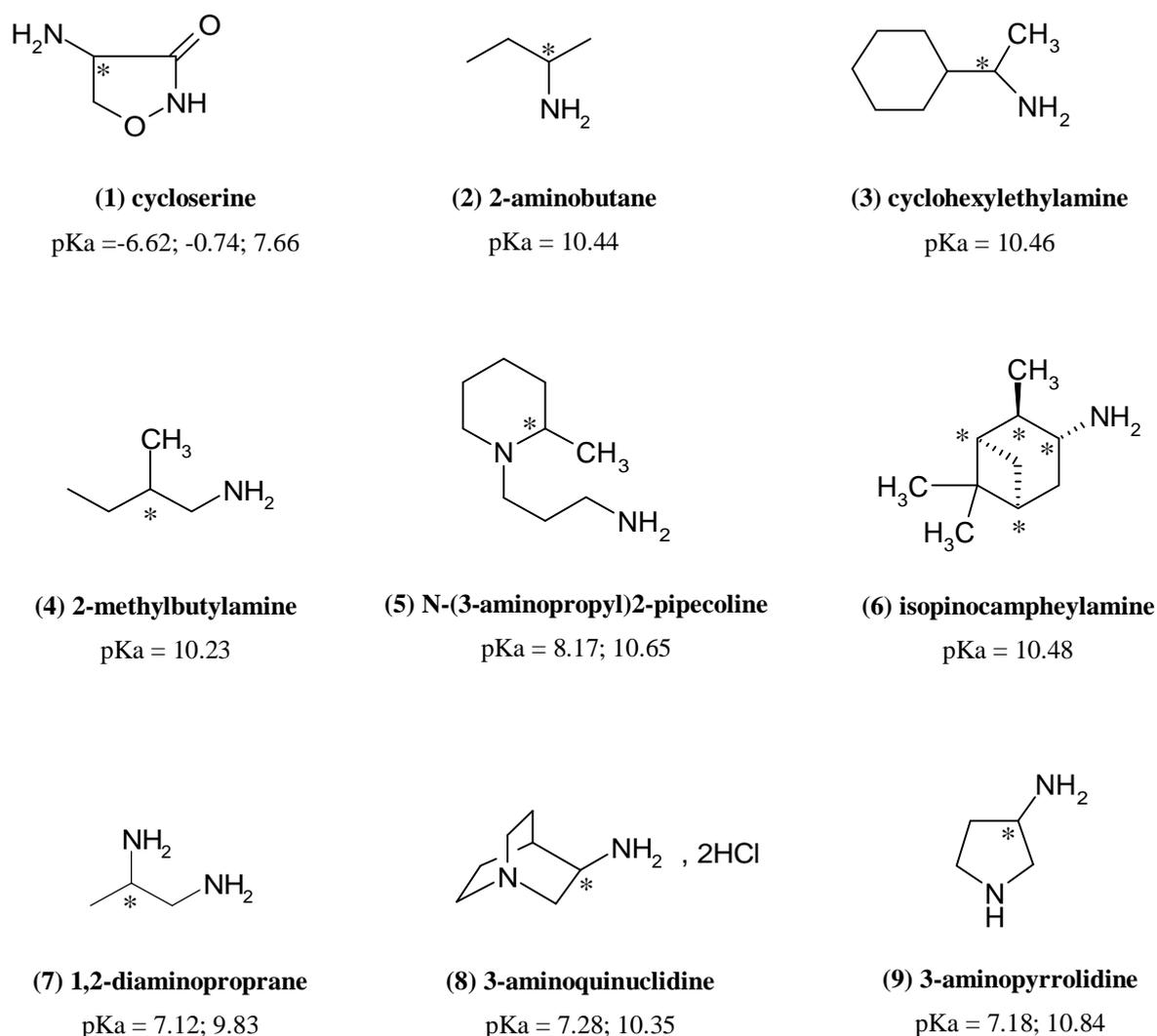
Hence, the chiral separation and the quantitative detection of non-UV-absorptive compounds is a real analytical challenge. To this end, evaporative light-scattering detection (ELSD) has been tested as an HPLC detector for non-volatile weak/no chromophore containing compounds. Thus, enantiomers of eflornithine have been detected with ELSD after separation on teicoplanin aglycone stationary phase [104]. But this method is not sensitive enough and the linearity range is too limited. Moreover, linear regression can be applied after logarithmic transformations of responses and concentrations. Other specific detectors based on refractive index, electrochemical or optical properties are traditionally used but their response depends on the solute. Additionally, most of them are not compatible with CE. Mass spectrometry has been widely used coupled to LC or EC since it provides simultaneously structural and quantitative information. LC-MS have proved its suitability for the analysis of numerous drugs by using electrospray ionization [105,106], atmospheric pressure chemical ionization (APCI) [107,108] or atmospheric pressure photoionization (APPI) [109] sources. The limit of quantification (LOQ) in terms of enantiomeric excess was 97% [106]. LC-APCI-MS was successfully applied for the separation and quantitation of pipercoline and camphorsulfonamide enantiomers and allowed an improvement of sensitivity by a factor 100-3600 compared with UV detection

[110]. Nevertheless, MS detector is not largely widespread in quality control laboratory due to its high cost.

Within recent years, capacitively coupled contactless conductivity detection ( $C^4D$ ) has become frequently used in CE due to the miniaturization of this system and the on-column detection.

In the contactless approach, the electrodes are in the shapes of tubes through which the capillary is passed. Several studies reported the separation and the quantitation by CE- $C^4D$  of chromophore- and fluorophore-free compounds as organic and inorganic ions [82,111,112], carbohydrates [88], fatty acids [113], polymers [114], chemical warfare and pesticides [115] and for the determination of dissociation constants of amino acids [116,117]. Only few applications described the interest of  $C^4D$  for the quantification of enantiomer impurity as standard [62,97-99] or in biological fluids [118].

In this work, the analysis of several non-UV absorbing amine derivatives has been performed by CE-  $C^4D$ . The lack of any hydrophobic moiety in the structure of amine prevents the use of any cyclodextrin as chiral selector. So, a chiral crown ether was tested for the enantiomer resolution of these amine derivatives. The aim of this work was to optimize the electrophoretic conditions (buffer composition, chiral selector) to quantify the enantiomeric impurity of amine derivatives (*Figure III.23*) by the use of contactless conductivity detector. The feasibility of its detection method and the quantitation data were compared with indirect UV detection. Then the CE- $C^4D$  method has been fully validated according to the methodology developed by SFSTP commission (Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques) [119-121]. The criteria used as decision tool is based on the build of accuracy profiles, which take into account the total error of measurement of the method *i.e.* systematic and random errors.



**Figure III.23** : Chemical structure and pKa value of some chiral amines.

### III.2.2. Materials and methods

#### a) Equipment

All experiments were carried out on an HP<sup>3D</sup>CE electrophoretic system (Agilent, Waldbronn, Germany) equipped with a photodiode-array detector (8.5 cm from the cathode) and an on-capillary capacitively coupled contactless conductivity detector (14.3 cm from the cathode). Indirect UV detection was achieved at 214 or 220 nm depending on the UV-absorbing co-ion added to the buffer. The conductivity detection was performed with a Tracedec system (Istech: Innovative Sensor Technologies GmbH, Strasshof,

Austria). The contactless conductivity sensor consisted of two tubular electrodes of 4 mm length, which are separated by a gap of 1 mm [79]. C<sup>4</sup>D signal was acquired with Tracemon software (Istech, version 0.07a). UV Data and CE parameters were recorded and analyzed with the Agilent software (3D-CE Chemstation, rev B.03.01).

*b) Electrophoretic conditions*

CE analysis was performed in an uncoated fused silica capillary (50 cm total length, 50 µm i.d.) purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). Separations were performed under normal polarity by applying a potential of +15 kV. The samples were hydrodynamically injected at the anodic side by applying a pressure of 50 mbars for a period of 5 s (corresponding to 9.15 nL i.e. 0.99% of the total volume of the capillary. The temperature of the capillary was set at 25°C. Prior to use, capillary was rinsed sequentially at 950 mbars with NaOH 0,1 N (20 min), H<sub>2</sub>O (20 min) and the running buffer (30 min). Between runs, the capillary was rinsed with the running buffer (3 min, 950 mbars). After the last run, the capillary was rinsed with 0.1 M NaOH, water and dry-stored.

*c) Chemicals*

All chemicals were of analytical grade. 1,2-diaminopropane, (*R*)-(+)-3-aminopyrrolidine dihydrochloride, (*S*)-(-)- 3-aminopyrrolidine dihydrochloride, 2-methylbutylamine, 1-(3-aminopropyl)-2-pipecoline, (*1S,2S,3S,5R*)-(+)-isopinocampheylamine, (*1R,2R,3R,5S*)-(-)-isopinocampheylamine were purchased from Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). (*R*)-(+)-3-aminoquinuclidine dihydrochloride, (*S*)-(-)-3-aminoquinuclidine dihydrochloride, (*S*)-(+)-cyclohexylethylamine and (*R*)-(-)-cyclohexylethylamine were provided by Fluka (St-Quentin-Fallavier, France) and 2-aminobutane were obtained by Riedel-de Haën (St-Quentin-Fallavier, France).

Electrolytic buffers were prepared using the following acidic or alkaline salts: (L)-aspartic acid, glacial acetic acid (99.99 %), TRIS [hydroxymethyl]aminomethane and naphthyl-1-amine were purchased from Aldrich; citric acid, creatinine and imidazole from Fluka; phosphoric acid (85 %) from Riedel de Haën.

Chiral separations were investigated using α-cyclodextrin (α-CD, Wacker, Munich, Germany), β-cyclodextrin (β-CD, Wacker), hydroxypropyl-α-cyclodextrin (HP-α-CD, DS = 3.6 per CD, Wacker), hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD, DS = 7 per CD,

Wacker), dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin (DM- $\beta$ -CD, DS = 4.2 per CD, Wacker,), carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin (CM- $\beta$ -CD, DS = 3 per CD, Cyclolab, Budapest, Hungary), trimethyl- $\beta$ -cyclodextrin (TM- $\beta$ -CD, DS = 18 per CD, Cyclolab), 18-crown-6 (Fluka) and (-)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid ((-)-18C6H<sub>4</sub>, Aldrich) as chiral selectors.

*d) Running buffers and sample preparation*

**a) Background electrolyte preparation**

Buffers were prepared with the help of Phoebus software (Analis, Namur, Belgium). The characteristics of buffers well suited for indirect UV or conductivity detection modes were given in *table III.11*.

**Table III.11 : Physico-chemical properties and preparation of buffers used in conductivity and indirect UV detections.**

Buffering species	Concentration (mM)	pH	Ionic strength (mM)	Conductivity (mS/cm)	l (nm)	Buffer capacity (mM/pH)
<b>Conductivity detection</b>						
CH <sub>3</sub> COOH	500	2.45	3.15	1.2	-	14.5
Citric acid / TRIS	84.4 / 2.9	2.20	10.00	2.8	-	37.0
Citric acid / Aspartic acid	83.6 / 7.09	2.20	10.00	2.7	-	40.9
<b>Indirect UV detection</b>						
Creatinine / H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	10 / 29.8	2.20	17.19	-	220	33.2
Naphtyl-1-amine / H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	5 / 20.5	2.20	11.99	-	214	28.0
Imidazole / CH <sub>3</sub> COOH	10 / 26.3	4.50	10.01	-	214	14.9

All buffers were prepared with the help of Phoebus software.

The pH value was measured with a Beckman pH-meter ( $\Phi$ 200 model) and adjusted if necessary. Working buffers were daily prepared by adding the suitable amount of chiral selector into the buffer. All buffers were prepared with ultra-pure 18 M $\Omega$ -water supplied from an Elgasat apparatus (Elga, Villeurbanne, France).

**b) Sample solutions used for method optimization**

Stock solutions of each analyte were prepared at a concentration of 2 mg.mL<sup>-1</sup> in MeOH. These solutions were then diluted 20-fold with BGE in order to obtain working solutions at a concentration of 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. All solutions were filtered through a 0.45  $\mu$ m

polyvinylidenedifluoride membrane filter (Millipore, Molsheim, France) and degassed by sonication before use.

**c) Sample solutions used for method validation**

Stock solutions of each enantiomer of isopinocampheylamine and 3-aminoquinuclidine were prepared by dissolving an accurately weighed amount of 20 mg in 10 mL of MeOH. Subsequent dilutions were carried out and each pair of enantiomers was mixed in order to obtain three independent series of calibration standards ( $k = 3$ ). Each calibration curve was plotted with five levels of enantiomeric impurity (0.25; 0.5; 1; 1.5; 2 % for C<sup>4</sup>D and 5.9; 7; 8; 9.1; 10.1 % for indirect UV detection) prepared in the buffer.

The validation standards were also prepared in the buffer. Three levels were selected ( $k = 3$ ) corresponding to low (2xLOQ), medium (50% ULQ) and high (80% ULQ) enantiomeric impurity levels, where ULQ is the upper level of the calibration curve. Validation standards were independently prepared in three different series ( $j = 3$ ). 0.5, 1.0 and 2.0% enantiomeric impurity levels have been selected for CE - C<sup>4</sup>D method and 6.9, 8.0, 9.3% enantiomeric impurity levels for CE - indirect UV method.

*e) Calculations*

The separation parameters were calculated as follows:

$$\text{Enantioselectivity: } a = \frac{t_{M2}}{t_{M1}} \quad \text{(III.25)}$$

$$\text{Resolution: } R_s = 1.18 \left( \frac{t_{M2} - t_{M1}}{w_{1/2}(1) + w_{1/2}(2)} \right) \quad \text{(III.26)}$$

$$\text{Apparent electrophoretic mobility: } m_{app} = \frac{L_T \cdot L_{eff}}{V \cdot t_M} \quad \text{(III.27)}$$

where  $t_M$  is the enantiomer migration time (min),  $w_{1/2}$  the peak width at half height (min),  $L_T$  and  $L_{eff}$  the total and effective lengths of the capillary (cm) and  $V$  the applied voltage (volt). The suffixes 1 and 2 refer to the first and the last migrating enantiomers.

If the analyte binds to the ligand in a 1:1 ratio, the electrophoretic mobility of the analyte is a weighted average of complexed and free form mobilities. After rearranging of the mobility relationship and by introducing the definition of the apparent binding constant ( $K_{app}$ ), the data are available for linearization:

$$\text{Apparent complexation constant: } \frac{[L]}{m_i - m_f} = \frac{1}{m_c - m_f}[L] + \frac{1}{(m_c - m_f)K_{app}} \quad (\text{III.28})$$

where  $K_{app}$  is the apparent binding constant,  $[L]$  the equilibrium concentration of non-complexed ligand,  $\mu_i$  the experimental mobility of enantiomer,  $\mu_f$  and  $\mu_c$  the electrophoretic mobility of the enantiomers, respectively under their free and complexed forms.

This leads to a reciprocal plot of  $[L]/(\mu_i - \mu_f)$  vs.  $[L]$  and the apparent binding constant ( $K_{app}$ ) equals slope/intercept.

### **III.2.3. Results and discussion**

#### *a) Optimization of the enantioseparation of amines using contactless conductivity detection*

The enantioseparation of nine amine derivatives (*Figure III.23*) has been investigated by CE/  $C^4D$ . They differ each other by the nature of substituents (aliphatic, cyclic) and also by the degree of substitution of the amine.

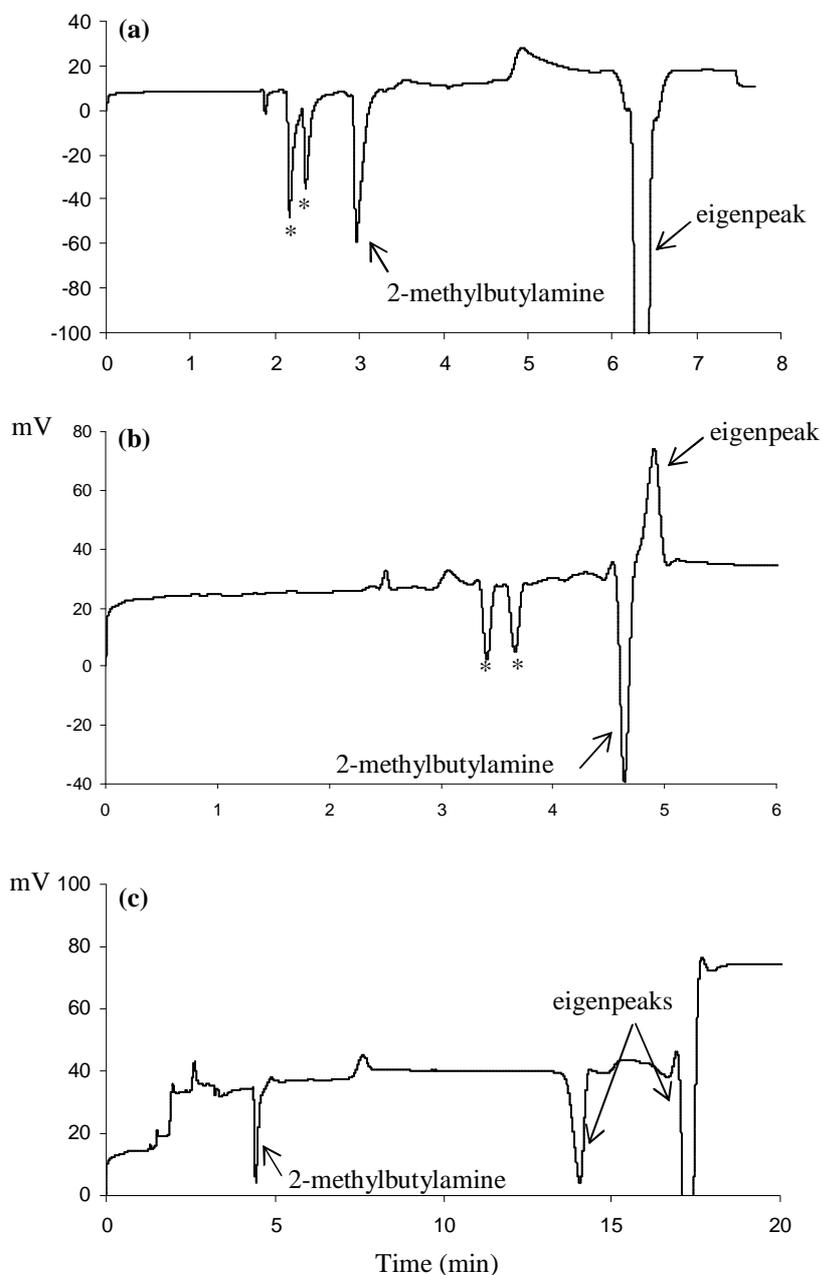
#### **a) Selection of the background electrolyte**

The selection of buffer composition for CE-  $C^4D$  was not an easily task due to a possible occurrence of system peaks (eigenpeaks) which may interfere with the peak of the analyte [122]. Otherwise, the conductivity of the background electrolyte must be as low as possible to have the best sensitivity of detection. Nevertheless, the selected ionic strength of BGE must ensure a sufficient buffering capacity. Additionally, the pH value must be as low as possible, typically around 2.2, in order to protonate chiral amines and to maintain the chiral selector ( $18C_6H_4$ ) under its neutral form to decrease buffer conductivity. Indeed,

the chiral selector (18C6H<sub>4</sub>) has four carboxylic acid groups whose pK<sub>a</sub> values are 2.13, 2.84, 4.29 and 4.88, respectively [123]. At pH 2.2, 18C6H<sub>4</sub> has a slight negative charge.

Three different buffers (acetic acid, citric acid-TRIS, and citric acid-aspartic acid) have been selected for the chiral separation of amine derivatives due to their low conductivities (1-3 mS/cm) and high buffer capacities (14-41 mM/ pH unity). Their chemical compositions are given in *Table III.11*. The influence of buffer composition on the relative position of each analyte versus eigenpeaks has been investigated without adding any chiral selector to the electrolyte. For example, *figure III.24* shows the influence of the buffer nature on the relative position of the 2-methylbutylamine peak versus eigenpeaks.

Although the conductivity of selected buffers was low, each analyte exhibited a negative peak due to its electrophoretic mobility, which is lower than the co-ion's one. The apparent mobility of 2-methylbutylamine ( $18 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) in citric acid – aspartic acid buffer was lower than the buffer co-ion one ( $55 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Indeed, each amine and the BGE co-ion (pK<sub>a</sub>-NH<sub>2</sub> = 10) are totally dissociated and the analyte conductivity signal is directly proportional to the difference of conductivity between the analyte and the BGE co-ion [124]. The two following buffers – acetic acid (pH 2.45) and citric acid / TRIS (pH 2.2) – were found to be unsuitable for the CE- C<sup>4</sup>D analysis of amine derivatives since analyte peaks were very close to unknown peaks (*Figure III.24-a*) or eigenpeaks (*Figure III.24-b*). Similar results were obtained for the other amines. According to the data provided by Peakmaster freeware [125], the unusual citric acid-aspartic acid buffer (pH 2.2, ionic strength of 10 mM,) was found to be convenient for the CE analysis of amine derivatives as shown in *figure III.24-c*, eigenpeaks (14.6 and 17.2 min) did not interfere with the migration peak of 2-methylbutylamine ( $t_M = 4.4 \text{ min}$ ). Nevertheless, sensitivity evaluated by the calculation of corrected area of 2-methylbutylamine was lower in citric acid – aspartic acid ( $53.5 \text{ AU} \cdot \text{min}^{-1}$ ) than in citric acid – TRIS ( $102 \text{ AU} \cdot \text{min}^{-1}$ ) or acetic acid ( $144 \text{ AU} \cdot \text{min}^{-1}$ ). This was attributed to the higher mobility of acetate counter-ion ( $85 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) compared to citrate's one ( $28.7 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). As a conclusion, the best sensitivity is obtained with a BGE counter-ion possessing a high electrophoretic mobility.



**Figure III.24:** Influence of buffer composition on the relative position of 2-methylbutylamine with eigenpeaks.

Fused-silica capillary: 50.2 cm total length (35.9 cm effective length) x 50  $\mu\text{m}$  i.d.; voltage: +15 kV; temperature: 25°C; detection:  $\text{C}^4\text{D}$ ; solute concentration: 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , \*: unknown compound.

Electrolyte composition: (a): 500 mM acetic acid buffer (pH 2.45); (b): 100 mM citric acid / 13.3 mM TRIS buffer (pH 2.20); (c): 43.9 mM citric acid / 25.5 mM aspartic acid buffer (pH 2.20).

### b) Selection of the chiral selector

Different types of chiral selectors were tested in order to resolve the enantiomers of amine derivatives. Several cyclodextrins ( $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD, HP- $\alpha$ -CD, HP- $\beta$ -CD, DM- $\beta$ -CD, TM- $\beta$ -CD, CM- $\beta$ -CD), which differ by the size of the cavity and the number of substituents, were investigated at three concentrations (5, 20, 40 mM). No start of enantioseparation was observed except for compound 6. Indeed, the enantiomers of isopinocampheylamine, which contains hydrophobic rings, were totally resolved ( $R_s = 5.1$ ) in a short runtime (9.5 min) by adding 20 mM TM- $\beta$ -CD to BGE. The other analytes are not hydrophobic enough to interact with CD due to the presence of amine groups and also due to the lack of aromatic ring or long aliphatic chain able to include them into the hydrophobic cavity of CD.

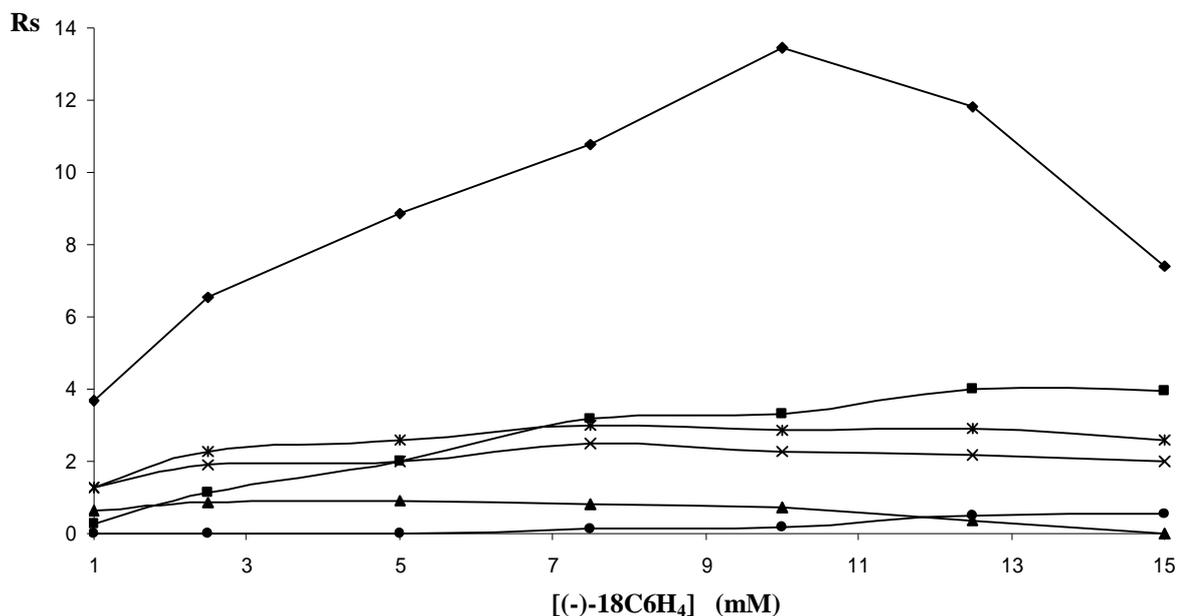
Crown ethers are macrocyclic polyethers able to form inclusion complex with alkali, alkali-earth and primary ammonium cations. To date, only (+)- or (-)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid ( $18C_6H_4$ ) has been successfully used as chiral selector in CE to resolve natural amino-acids [126], derived amino-acids [2,127], aliphatic and cyclic amines [98]. The chiral recognition mechanism involves the inclusion of the primary protonated amine into the polar crown ether cavity via the formation of three hydrogen bonds. Moreover, extra hydrophilic interactions between the carboxylic groups of crown ether and the analyte are necessary to ensure the chiral discrimination [128].

Otherwise, Huang *et al.* [129] has shown that the addition of 18-crown-6 to DM- $\beta$ -CD improved the chiral discrimination of 1-methyl-3-phenylpropylamine and 1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthylamine even though no separation occurred with the CD alone. In this case, the chiral recognition has been attributed by the formation of a sandwiched complex between the 18-crown-6, the analyte and the chiral selector (CD) [130-132].

Due to the high cost of the chiral (-)- $18C_6H_4$ , first, we tried to improve the chiral separation of amine derivatives by the addition of 18-crown-6 (5, 10, 20 mM) to 5 mM DM- $\beta$ -CD or 5 mM TM- $\beta$ -CD. These two CDs were selected because the migration times of each analyte increased substantially when they were added to the BGE, translating a strong interaction between the analyte and the CD. Whatever, the tested conditions, no improvement of separation occurred. Contrary to Gong *et al.* [97], who achieved a partial resolution of cyclohexylamine enantiomers using a combination of 10 mM DM- $\beta$ -CD + 5

mM 18-crown-6, we failed in the separation of these enantiomers in the same conditions, probably because we used a DM- $\beta$ -CD having a different substitution degree or substituent positions..

Finally, (-)-18C6H<sub>4</sub> was assessed as chiral selector for amines described in *figure III.23*. The influence of (-)-18C6H<sub>4</sub> concentration on the enantioresolution and enantioselectivity was studied in 1-15 mM concentration range (*Figure III.25*).



**Figure III.25:** Influence of the (-)-18C6H<sub>4</sub> concentration on the enantioresolution of studied amine derivatives.

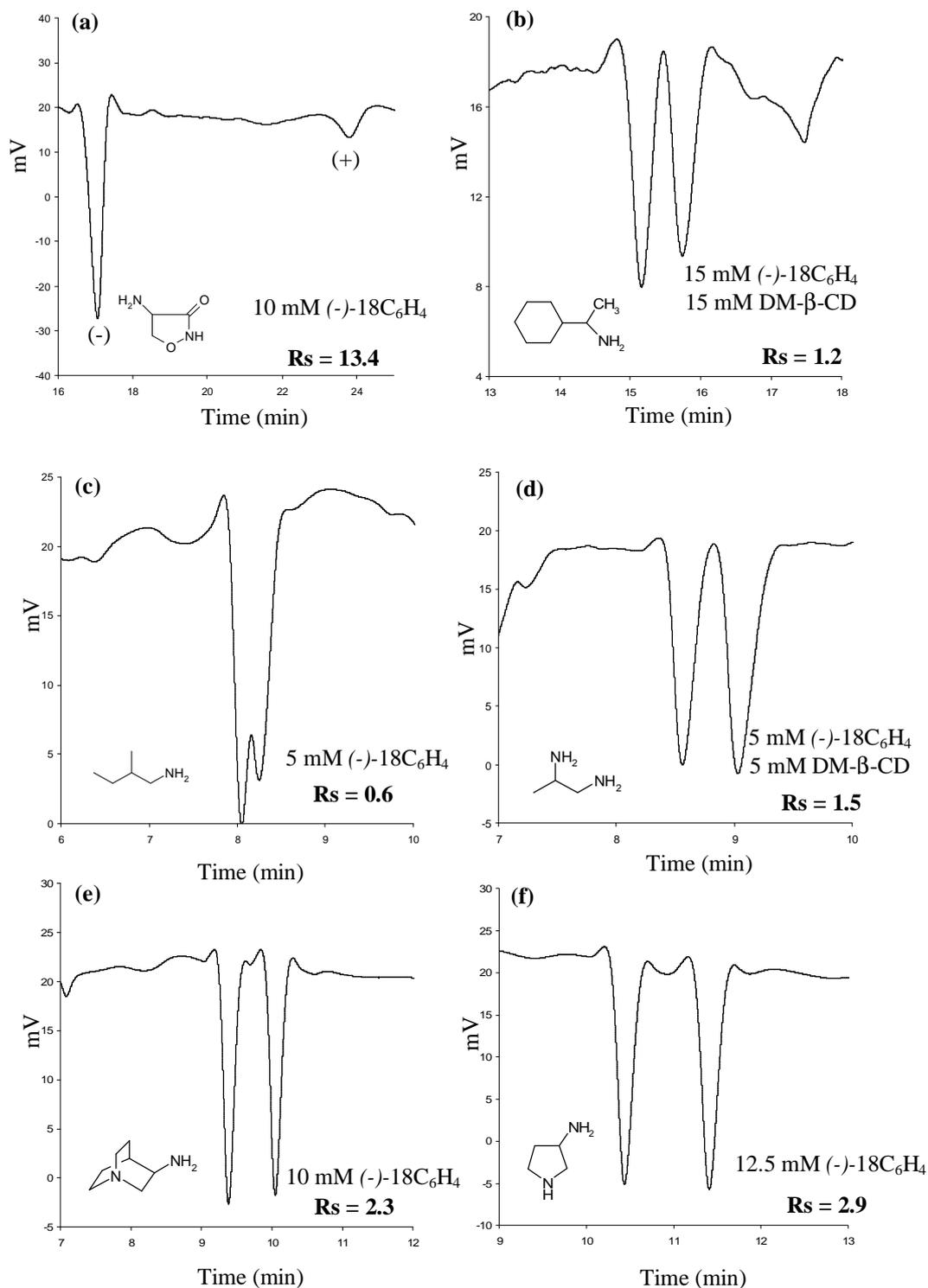
Conditions: fused-silica capillary: 50.2 cm total length (35.9 cm effective length) x 50  $\mu$ m i.d.; electrolyte: citric acid / aspartic acid buffer (I = 10 mM, pH 2.2) + (-)-18C6H<sub>4</sub>; voltage: +15 kV; temperature: 25°C; detection: C<sup>4</sup>D; solute concentration: 100  $\mu$ g.L<sup>-1</sup>.

◆: Cycloserine; ■: Isopinocampheylamine; \* : 3-aminopyrrolidine; X: 3-aminoquinuclidine; ▲: 1,2-diaminopropane; ●: 2-methylbutylamine.

No enantioseparation was observed for compounds **2**, **3**, **5**, whatever the concentration of (-)-18C6H<sub>4</sub>. The chiral discrimination of compound **2** failed because the short aliphatic chains located near the stereogenic carbon center of this molecule cannot interact with the crown ether. For the compound **5**, the primary amine group was too far from the stereogenic center and prevents the formation of a stable complex [98,133]. Otherwise, the compound **5** possesses a ternary amine group close to the asymmetric carbon, but a ternary amine group did not provide the right type of interactions with crown ether required for the chiral discrimination contrary to a primary amine group [128]. Indeed, for the other compounds **1**, **6**, **7**, **8** and **9**, the best separations were performed by adding (-)-18C6H<sub>4</sub> in the 5–12.5 mM concentration range to the citric acid/aspartic acid

buffer (pH 2.2). The enantioresolution values were equal to 13.4, 4.0, 0.9, 2.3 and 2.9 for compounds **1**, **6**, **7**, **8** and **9**, respectively. The higher resolution observed for compound **8** was unexpected since this compound is composed of secondary and ternary amine groups, which were not favorable to interact with the crown ether.

No satisfactory separation was observed when (-)-18C6H<sub>4</sub> was added to the BGE for compounds **4** ( $R_s = 0.6$ ) and **7** ( $R_s = 0.9$ ); so, DM- $\beta$ -CD or TM- $\beta$ -CD was added to the BGE to form a sandwiched amine-crown ether complex. So, a dual chiral selector system was investigated. After optimization, 5 mM (-)-18C6H<sub>4</sub> + 5 mM DM- $\beta$ -CD system provided a good enantioresolution ( $R_s = 1.5$ ) for compound **7**. Likewise, the simultaneous addition of 15 mM (-)-18C6H<sub>4</sub> + 15 mM DM- $\beta$ -CD allowed to resolve the enantiomers of compound **3** [97]. Optimized separations of several amine enantiomers are shown in *figure III.26*.



**Figure III.26: Optimized separations of several amine derivatives enantiomers by capillary electrophoresis - contactless conductivity detector.**

Conditions: fused-silica capillary: 50.2 cm total length (35.9 cm effective length) x 50 μm i.d.; electrolyte: citric acid / aspartic acid buffer (pH 2.2, ionic strength 10 mM.); voltage: +15 kV; temperature: 25°C; solute concentration: 100 μg.L<sup>-1</sup>.

Analyte: **(a)**: cycloserine (enantiomeric ratio (-)/(+)-100/10) ; **(b)**: cyclohexylethylamine ; **(c)**: 2-methylbutylamine; **(d)**: 1,2-diaminopropane); **(e)**: 3-aminoquinuclidine; **(f)**: 3-aminopyrrolidine.

Otherwise, it has to be noted that the addition of chiral crown ether, which is slightly negatively charged in the experimental conditions, allowed a gain in sensitivity. Indeed, in indirect conductivity detection, signal-to-noise ratio is favored if the conductivity of BGE is as high as possible.

In order to determine the lowest quantity of each enantiomer that can be detected (LOD) but not accurately quantified, the dynamic linearity range of C<sup>4</sup>D was evaluated. The signal was found to be proportional to the concentration over the 1.5 – 1600 µg.mL<sup>-1</sup> range. This result suggested that the quantification of 0.09% of the enantiomeric impurity among the majority one could be quantified. Nevertheless, due to an insufficient resolution (Rs = 3.3), the injection of 1.5 µg.mL<sup>-1</sup> of minor enantiomer among the majority one was totally hidden by the peak broadening (1600 µg.mL<sup>-1</sup>) of major enantiomer. Hence, the quantification of the enantiomeric impurity was done in the 1.5 – 600 µg.mL<sup>-1</sup> range. The LOD and LOQ, expressed in µg.mL<sup>-1</sup>, were reported in *table III.12*.

**Table III.12:** Comparison of limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of isopinocampheylamine, 3-aminoquinuclidine and 3-aminopyrrolidine obtained by indirect UV and conductivity detections.

Compound	Enantiomer	Indirect UV detection		Conductivity detection	
		LOD (µg.mL <sup>-1</sup> )	LOQ (µg.mL <sup>-1</sup> )	LOD (µg.mL <sup>-1</sup> )	LOQ (µg.mL <sup>-1</sup> )
(6) isopinocampheylamine	+	7.5	25.0	0.2	0.7
	-	9.4	31.2	0.2	0.6
(8) 3-aminoquinuclidine	+	7.0	23.4	0.3	0.6
	-	8.8	29.3	0.2	0.5
(9) 3-aminopyrrolidine	+	4.2	17.9	0.3	0.9
	-	5.5	18.2	0.3	0.9

*b) Determination of binding constants*

Binding constants of the optical isomers of several studied chiral amine derivatives with crown ether were determined using electrophoretic mobility data gained from separations performed by capillary electrophoresis. The apparent binding constants have been assessed according to the model described by Wren and Rowe [134] and by assuming 1:1 stoichiometry complex formation. The enantioseparation mechanism of a protonated chiral amine with a chiral crown ether is based, first, on the inclusion of the analyte in the

polar cavity of the crown ether, and then, on the formation of hydrophilic interactions between the carboxylic groups of crown ether and the amine groups of the analyte.

It appeared that the binding constants of hydrophilic compounds -  $K_{app} = 19 \text{ M}^{-1}$  for **7** ( $\log P = -0.99$ ) and  $K_{app} = 9 \text{ M}^{-1}$  for **9** ( $\log P = -1.05$ ) - were higher than those of hydrophobic solutes -  $K_{app} = 2 \text{ M}^{-1}$  for **6** ( $\log P = 1.90$ ). Moreover, compound **7** possess another secondary amine function able to interact with carboxylic moiety of the crown ether via hydrogen bonds which can explain the high value of binding constant compared with the another one. Concerning compound **6**, results showed that binding constant with TM- $\beta$ -CD ( $K_{app} = 14 \text{ M}^{-1}$ ) was higher than those calculated with (-)-18C6H<sub>4</sub> ( $K_{app} = 2 \text{ M}^{-1}$ ). This is in agreement with the hydrophobicity of this molecule ( $\log P = 1.9$ ). The well-known mechanism of chiral recognition with the CD is referred to the inclusion of the aromatic rings into the hydrophobic CD cavity and to the formation of hydrophilic interaction between the amino groups of the analyte with the hydrophilic rim of the CD. On the contrary, once the protonated amine is included into the crown ether, the cyclic skeleton of compound **6** seemed to be not hydrophilic enough to interact with the carboxylic substituents of the crown ether.

c) Method validation – comparison with indirect UV detection.

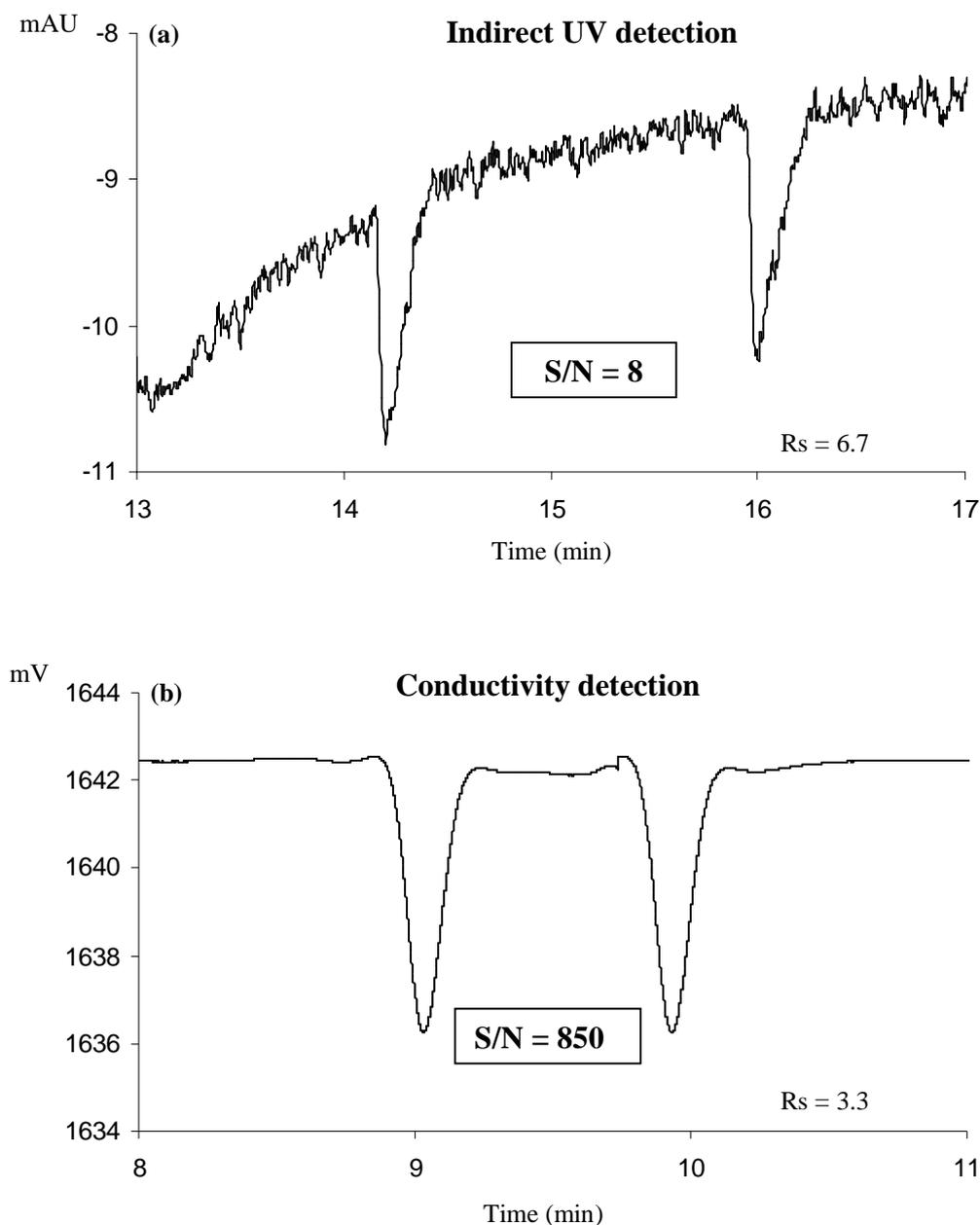
a) Optimization of buffer compatible with indirect UV detection

In indirect UV detection, the best sensitivity is obtained by selecting a background electrolyte with high UV absorbance containing a low concentration of UV absorbing co-ion. For good peak symmetry, the electrophoretic mobility of the co-ion must be similar to those of the analytes. Three cationic UV-absorbing co-ions, creatinine (220 nm), naphthyl-1-amine (214 nm) and imidazole (214 nm) were investigated for the indirect UV detection of isopinocampheylamine (**6**), 3-aminoquinuclidine (**8**) and 3-aminopyrrolidine (**9**) enantiomers (*Table III.11*). Initially, the co-ion concentration was fixed at 10 mM and a suitable amount of counter-ion was added to obtain the selected pH. For naphthyl-1-amine, its concentration was reduced to 5 mM and 10% MeOH was added to the BGE in order to avoid any problem of solubility of both co-ion and chiral selector.

The two buffers composed of naphthyl-1-amine-phosphoric acid and imidazole-acetic acid induced a weak sensitivity for the detection of compound **6** ( $S/N = 3$  at  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). So, 15 mM TM- $\beta$ -CD was added to 10 mM creatinine - H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> buffer to resolve

enantiomers of compound **6**. The sensitivity was improved nevertheless due to a difference of electrophoretic mobility between co-ion creatinine ( $33.1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) and compound **6** ( $17.0 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ); electrophoretic peaks shape was very asymmetric ( $A_s = 3.7 - 5.2$ ) compared with asymmetric factor ( $A_s = 1.3$ ) obtained with  $\text{C}^4\text{D}$ . The concentration of creatinine was increased until 30 mM and allowed an improvement of the resolution ( $R_s = 11.7$  instead of 6.7) but to the detriment of sensitivity since the amplitude of noise was increased by a factor 3. As a consequence, a concentration of 10 mM creatinine was selected to the following experiments. The dynamic linearity of the indirect UV signal was investigated in the  $25 - 400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  concentration range. The saturation of the signal occurred quickly and the LOQ was 35 times higher compared with  $\text{C}^4\text{D}$  detection (*Table III.12*). Moreover, there was a lack of precision during the integration of electrophoretic peak due to the large peak asymmetry ( $R_s = 3.7 - 5.2$ ). Consequently, the LOD in terms of quantification of the enantiomeric impurity was equal to 1.8 – 2.3%.

Finally, the two modes of detection, indirect UV and contactless conductivity detection, have been compared in terms of sensitivity. For the quantification of isopinocampheylamine enantiomers ( $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),  $\text{C}^4\text{D}$  appeared to be significantly more sensitive than indirect UV detection as reported in *figure III.27*.



**Figure III.27:** Comparison of sensitivity between indirect UV and conductivity detections for the chiral analysis of isopinocampheylamine by capillary electrophoresis.

Conditions: fused-silica capillary: 50.2 cm total length x 50  $\mu\text{m}$  i.d.; voltage: +15 kV; temperature: 25°C; solute concentration: 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

(a): Indirect UV detection (220 nm) at 41.5 cm effective length; buffer: 10 mM creatinine /  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (pH 2.2) + 15 mM TM- $\beta$ -CD.

(b): Conductivity detection at 35.9 cm effective length; buffer: citric acid – aspartic acid (I = 10 mM, pH 2.2) + 15 mM TM- $\beta$ -CD.

### b) Protocol of validation

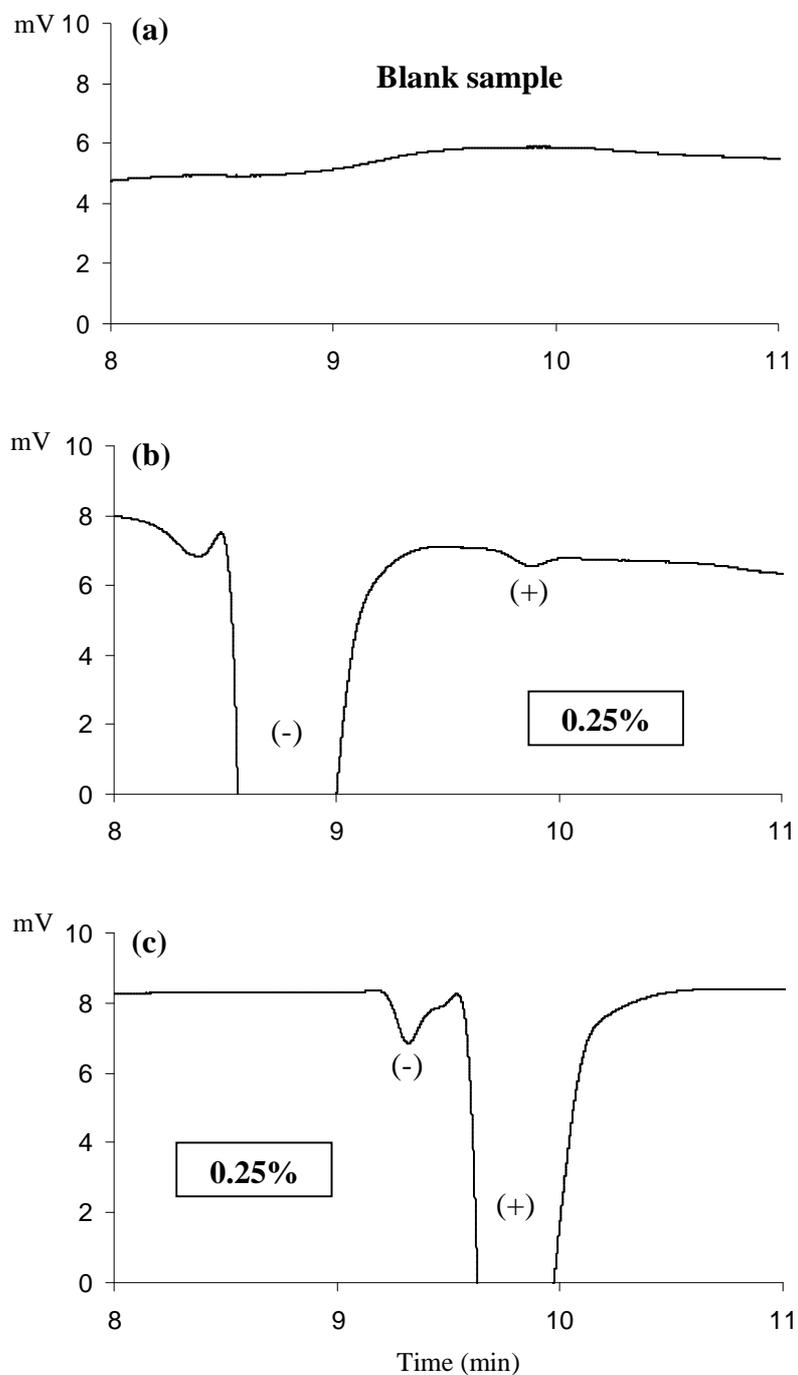
CE methods based on the separation of isopinocampheylamine enantiomers with TM- $\beta$ -CD and their detection by indirect UV or conductivity detections were validated according to the protocol extracted from SFSTP Guidelines [119]. These guidelines tried to harmonize validation steps of analytical procedure and propose experimental protocols to validate an analytical method. The objective of a good analytical procedure is to be able to quantify unknown sample as accurately as possible with an acceptance limit fixed by the analyst and admitted by the practice. The decision rules were based on the notion of total error (bias + standard deviation) to build the accuracy profile. All statistical calculations necessary to build the graphical accuracy profile were detailed in some recent articles [120,121,135]. In the last procedure of validation method, the rules of decision were essentially based on the bias. A procedure was declared not biased and wrongly qualified as accurate, when 95 % of confidence limits of the average bias included the value zero. Otherwise, some procedures, which are characterized by a significant bias and a high precision, were rejected and some others, which had a poor bias and a low precision, were inside the acceptance region. These results showed that the older method validation was inadequate in many cases. The validation procedure based on accuracy profile leads to the simplification of the method validation procedure while checking the associated risk to its usage.

The validation of the method was carried out on three consecutive days. Each day, a series of 15 experiments were performed: 5 calibration standards, 3 independent preparations for each validation standard (3 levels), a blank sample. The total number of experiments was 45. As already mentioned, all solutions (electrolytic buffer, calibration and validation standard) were daily prepared.

#### - *Specificity*

The method specificity was assessed by comparing the typical electrophoregrams obtained by injecting a blank sample consisting of diluted buffer (x10), diluted (0.75  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) and concentrated (1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) solutions of (+)- or (-)-isopinocampheylamine and a standard solution containing the two enantiomers.

As illustrated in *figure III.28*, no interference was observed in migration times corresponding to isopinocampheylamine enantiomers.



**Figure III.28:** Quantification of the enantiomeric impurity of isopinocampheylamine at a level of 0.25%.

Conditions: Conditions: fused-silica capillary: 50.2 cm total length (39.5 cm effective length) x 50  $\mu\text{m}$  i.d.; buffer: citric acid – aspartic acid (I = 10 mM, pH 2.2) + 15 mM TM- $\beta$ -CD; voltage: +15 kV; temperature: 25°C; detection:  $\text{C}^4\text{D}$ .

(a): blank sample: buffer diluted by 10; (b): (+)-enantiomer: 1.5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , (-)-enantiomer: 600  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (c): (+)-enantiomer: 600  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , (-)-enantiomer: 1.5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

- *Response function*

Calibration curves expressing the corrected peak areas ratio (minor enantiomer / major enantiomer) versus enantiomeric impurity rate (minor enantiomer concentration / major enantiomer concentration x 100) were plotted over the 0.25 to 2% and 5.9 to 10.1% impurity range, respectively for C<sup>4</sup>D and indirect UV detections. Three response functions included the ordinary least squares linear regression (OLS), OLS forced through zero and quadratic regression models were tested in order to select the most appropriate model for the intended use of the analytical method. From these data, different accuracy profiles were plotted and the regression model corresponding to the best accuracies covering the entire enantiomeric impurity range was selected. The acceptance limit was set at  $\pm 15\%$  according to the regulatory requirements. The OLS was the best regression model and yielded better coefficients of determination ( $r^2 = 0.993$  and  $0.992$ ) with C<sup>4</sup>D detection than indirect UV one ( $r^2 = 0.98$  and  $0.99$ ). This calibration model was successfully applied over the enantiomeric impurity range with C<sup>4</sup>D.

*Table III.13* reports the validation parameters of CE-indirect UV and CE-C<sup>4</sup>D for the quantification of (+)- and (-)-isopinocampheylamine, respectively. The sensitivity of C<sup>4</sup>D detection was twice better than indirect UV one since the slopes of the calibration curves of (+)- and (-)-enantiomers were higher in the C<sup>4</sup>D method (0.012, 0.012) than those obtained by indirect UV detection (0.0076, 0.0067).

- *Trueness*

According to SFSTP 2003 [119], trueness expressed the closeness of agreement between a series of measurements obtained from multiple sampling of the same homogeneous sample and a value accepted as true. Trueness, expressed as relative bias (%) was assessed from the validation standards at three enantiomeric impurity levels ( $n = 3$ ,  $k = 3$ ,  $j = 3$ ). As shown in *table III.13*, relative biases of the developed method with C<sup>4</sup>D were acceptable since they were less than 8%. In the method based on indirect UV detection, several values exceeded 15%.

**Table III.13: Validation parameters of CE-indirect UV and CE- C<sup>4</sup>D for the quantification of (+)- and (-)-isopinocampheylamine enantiomeric impurity.**

Criterion	(+) -isopinocampheylamine enantiomeric impurity		(-) -isopinocampheylamine enantiomeric impurity	
	Indirect UV	C <sup>4</sup> D	Indirect UV	C <sup>4</sup> D
Response function	Linear regression Slope: 0.0064 Intercept: 0.0310 r <sup>2</sup> : 0.99	Linear regression Slope: 0.012 Intercept: 0.0012 r <sup>2</sup> : 0.993	Linear regression Slope: 0.0063 Intercept: 0.0396 r <sup>2</sup> : 0.98	Linear regression Slope: 0.012 Intercept: 0.0051 r <sup>2</sup> : 0.992
Enantiomeric impurity level (%)	7.0 – 10.25	0.25 - 2	7.0– 10.25	0.25 - 2
Trueness (expressed as relative bias %)	7%: -10.4 8.75%: -12.8 10.25%: 16.3	0.5%: 5.8 1.0%: -6.9 1.6%: -7.6	7%: -20.0 8.75%: -9.3 10.25%: -2.9	0.5%: -0.5 1.0%: -8.0 1.6%: -10.1
Repeatability (R.S.D. %)	6.5%: 4.4 8.0%: 3.9 9.3%: 3.3	0.5%: 5.4 1.0%: 1.3 1.6%: 1.6	6.5%: 6.4 8.0%: 1.4 9.3%: 7.0	0.5%: 3.02 1.0%: 2.31 1.6%: 1.71
Intermediate precision (R.S.D. %)	6.5%: 9.0 8.0%: 4.3 9.3%: 6.6	0.5%: 5.4 1.0%: 3.8 1.6%: 2.2	6.5%: 7.5 8.0%: 6.7 9.3%: 7.7	0.5%: 3.02 1.0%: 2.89 1.6%: 3.43
Linearity	Slope: 1.003 Intercept: 0.001 r <sup>2</sup> : 0.99	Slope: 1.003 Intercept: -0.0009 r <sup>2</sup> : 0.993	Slope: 1.005 Intercept: 0.0028 r <sup>2</sup> : 0.98	Slope: 1.0072 Intercept: +0.0023 r <sup>2</sup> : 0.992

*- Precision*

Precision expressed the closeness of agreement (relative standard deviation) between a series of measurements obtained from multiple sampling of the same homogeneous sample [119]. It was evaluated through the repeatability and the intermediate precision. The RSD values presented in *table III.13* were rather low (between 1.3 and 5.4%) for the method based on C<sup>4</sup>D and slightly higher (between 1.4 and 9.0%) by indirect UV detection.

*- Accuracy*

Accuracy takes into account the total error of the method namely the sum of the systematic (brought to the fore by the trueness) and the random (precision) errors. The accuracy profile was selected as a decision tool to evaluate the performances of the method to quantify samples with an acceptance risk of 5%. The method was accurate if the limits of tolerance do not exceed the acceptance limits ( $\pm 15\%$ ).

The accuracy profile was built within 0.5 – 1.6% and 6.5 – 9.3% enantiomeric impurity range, respectively for the CE-  $C^4D$  and CE-indirect UV methods. As shown in *figure III.29*, accuracy profiles obtained with  $C^4D$  method were included within the acceptance limits ( $\pm 15\%$ ). On the basis of the validation experiments, CE-indirect UV method provided insufficient guarantees to quantify the enantiomeric impurity of isopinocampheylamine within the entire enantiomeric impurity range studied.

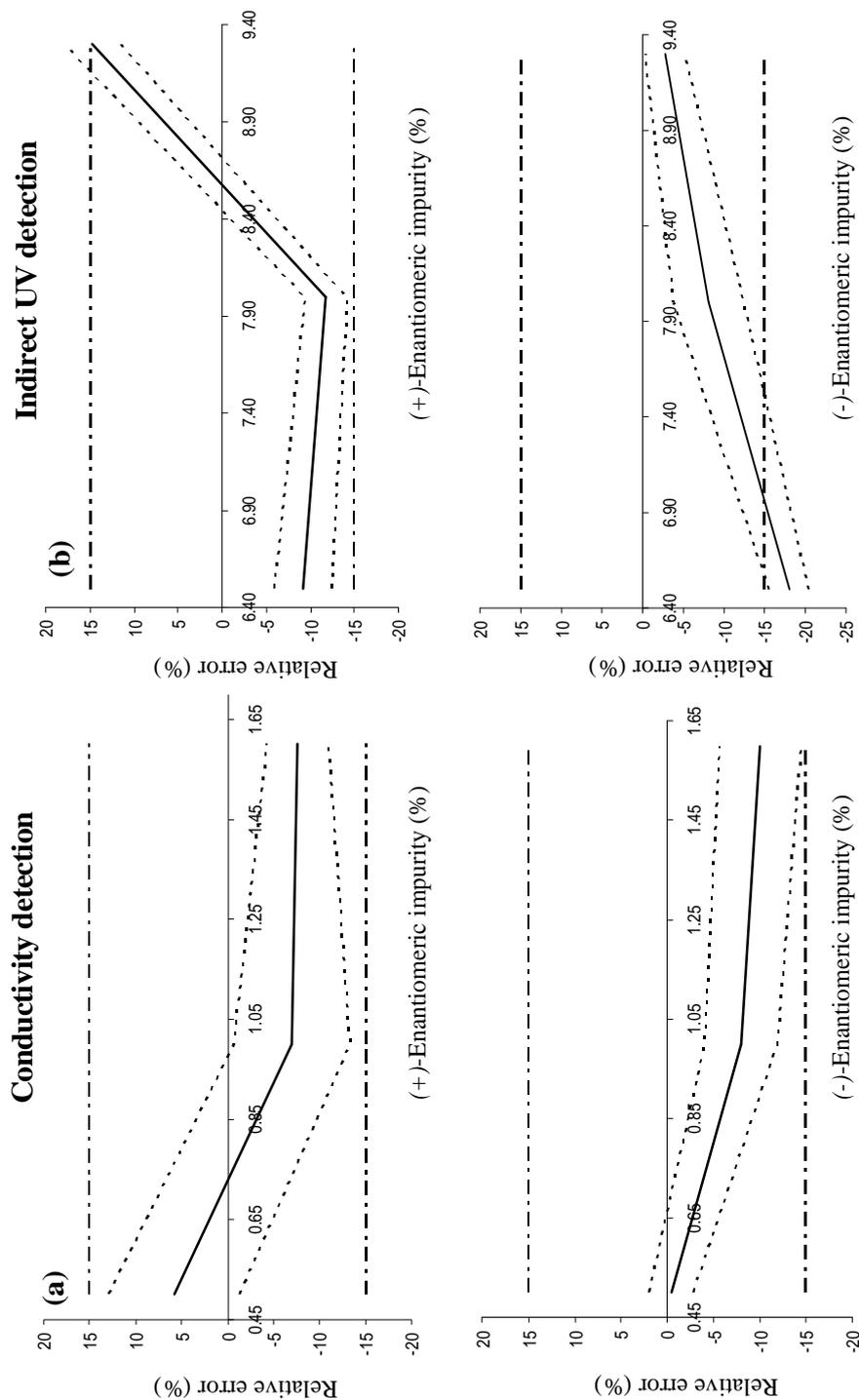
*Figure III.28* represents the electropherogram related to the analysis of 0.25% of each isopinocampheylamine enantiomeric impurity. As shown in *figure III.30*, the method based on chiral analysis of 3-aminoquinuclidine with (-)-18C6H<sub>4</sub> as chiral selector and  $C^4D$  can be totally validated in the limits of acceptance ( $\pm 15\%$ ).

#### - *Quantification limit*

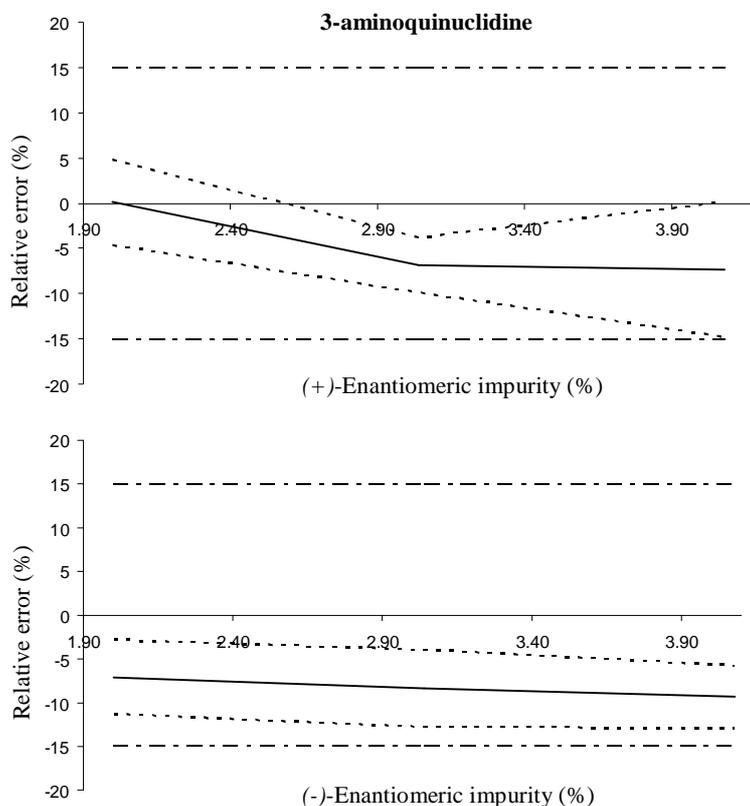
The limit of quantification (LOQ) of an analytical procedure is the smallest quantity of substance that can be quantitatively determined with a known accuracy. The intersection between the accuracy profile and the acceptance limits defines the lower limit of quantitation (LQL) as well as the upper limit of quantitation (UQL) of the procedure [27]. As the accuracy profile of the  $C^4D$  method was inside the acceptance limits over the whole enantiomeric impurity levels investigated, the validation level (0.5%) was considered as the LQL.

In indirect UV method, the LQL of (-)-isopinocampheylamine was found to be 7.6 % corresponding to the intersection of accuracy profile with the -15% limit of acceptance (*Figure III.29*).

**Figure III.29:** Accuracy profiles for the validation of isopinocampheylamine in CE – contactless conductivity and indirect UV detections using the linear regression model with three enantiomeric impurity levels.



Experimental conditions: see Fig. 5. Enantiomeric impurity levels: **(a)**: 0.50%, 1.00%, 1.50%; **(b)**: 6.50%, 8.00%, 9.30%. The dashed lines represent the acceptance limits (15%), the dotted lines correspond to the accuracy profile namely to the  $\beta$ -expectation tolerance limit expressed in relative error and the relative bias was materialized by a plain line.



**Figure III.30:** Accuracy profile for the validation 3-aminoquinuclidine in CE – conductivity detection.

Conditions: fused-silica capillary: 50.2 cm total length (39.5 cm effective length) x 50  $\mu\text{m}$  i.d.; buffer: citric acid – aspartic acid (I = 10 mM, pH 2.2) + 12.5 mM (-)-18C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>; voltage: +15 kV; temperature: 25°C; detection: C<sup>4</sup>D. The dashed lines represent the acceptance limits (15%), the dotted lines correspond to the accuracy profile namely to the  $\beta$ -expectation tolerance limit expressed in relative error and the relative bias was materialized by a plain line.

### III.2.4. Concluding remarks

Capillary electrophoresis with contactless conductivity detection was convenient for the determination of the enantiomeric impurity of amine derivatives, which do not possess any chromophoric moiety. (-)-18C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> was a powerful chiral selector able to resolve hydrophilic amine derivatives enantiomers, which were not resolved with cyclodextrins. The selection of the suitable buffer compatible with C<sup>4</sup>D was an easier task compared with indirect UV detection and peak shapes were more symmetrical ( $A_s = 1.3$ ). The linearity range of C<sup>4</sup>D was very large (1.5 – 1600  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  for isopinocampheylamine) allowing the determination of the enantiomeric impurity until extreme values (LQL = 0.5%). This method satisfied all criteria imposed by the new SFSTP guidelines and seemed to be suitable for the quantification of enantiomeric purity of pharmaceutical drug.

### **III.3. Bilan sur l'intérêt du C<sup>4</sup>D en électrophorèse capillaire**

L'analyse chirale de neuf dérivés aminés dépourvus de groupements chromophores a été réalisée en EC, couplée au détecteur conductimétrique sans contact à couplage capacitif. L'électrolyte est constitué d'acide aspartique et d'acide citrique (force ionique = 10 mM, pH 2,2) auxquels est ajouté un éther-couronne chiral ((-)-18C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>) seul ou en combinaison avec la DM-β-CD. Cette étude a montré que la reconnaissance chirale du (-)-18C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> est favorisée lorsque le centre d'asymétrie de l'analyte est substitué par une fonction amine et par une chaîne aliphatique longue et hydrophobe. Ainsi, les énantiomères de certaines amines remplissant ces critères ont été résolus de façon satisfaisante ( $0,9 < R_s < 13,4$ ). L'analyse quantitative de l'isopinocamphéylamine a montré que le C<sup>4</sup>D possède un large domaine de linéarité lequel s'étend sur 3,5 ordres de grandeur. Toutefois, la pureté énantiomérique de ce composé n'a pu être déterminée qu'à un seuil minimal de 0,5 %. Cette méthode a été validée selon un nouveau concept de validation reposant sur la détermination de l'erreur totale associée à la procédure (guides de la SFSTP pharma). Les résultats ont montré que l'erreur totale de la méthode, mise en évidence lors la construction du profil d'exactitude, était inférieure à la limite d'acceptation de 15 %.

Une étude comparative a été réalisée en détection UV indirecte. Après optimisation de l'électrolyte support (10 mM créatinine - H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2,2 + 15 mM TM-β-CD), les limites de quantification des énantiomères de l'isopinocamphéylamine étaient comprises entre 25 et 32 μg.mL<sup>-1</sup>. La limite de quantification de 7,6 %, en terme de teneur en impureté énantiomérique, a pu être déterminée à partir du profil d'exactitude.

La principale limitation de la méthode électrophorétique EC-C<sup>4</sup>D est liée à l'utilisation d'un éther couronne chiral onéreux (3 euros par mg). Cependant, cet inconvénient est atténué par les faibles volumes d'électrolyte consommés.

#### **IV. Conclusion**

Jusqu'à ce jour, l'EC était unanimement reconnue pour la séparation de molécules chirales dont l'asymétrie était introduite par un atome de carbone.

Une première étude, basée sur l'analyse énantiosélective de différents pesticides organophosphorés, a permis de montrer l'aptitude de l'électrophorèse capillaire à résoudre les stéréoisomères de composés possédant des atomes de phosphore ou de soufre comme centres d'asymétrie. Les cyclodextrines anioniques (HS-CD ou CM- $\beta$ -CD) sont des sélecteurs chiraux de choix pour permettre la migration de ces pesticides neutres vers le système de détection. En outre, l'ajout d'urée (2 M) dans le tampon a permis de résoudre les problèmes de solubilité de certains pesticides organophosphorés en milieu aqueux.

De plus, la séparation énantiomérique simultanée d'un pesticide organophosphoré, le fenamiphos, et ses deux métabolites a été réalisée en EC avec un système combiné de deux cyclodextrines ; l'une anionique (CM- $\beta$ -CD) et l'autre neutre (HP- $\alpha$ -CD). Cette méthode a été pré-validée et appliquée à la quantification de ces pesticides dans des extraits de sol. Toutefois, des études complémentaires doivent être menées afin d'améliorer les limites de quantification.

Ces méthodes possèdent, néanmoins, quelques limitations liées aux propriétés physico-chimiques des OP étudiés. L'hydrophobie et la faible solubilité dans l'eau de ces composés sont à l'origine des problèmes rencontrés durant la mise au point de ces méthodes. La chromatographie liquide en polarité normale pourrait être une technique alternative efficace.

L'analyse par EC de molécules dénuées de groupements chromophores est un véritable problème analytique. En effet, la plupart des appareils électrophorétiques sont commercialisés avec un détecteur UV ou un détecteur à fluorescence laser, or leur détection nécessite une étape de dérivation. La spectrométrie de masse permet de résoudre ce problème de sensibilité mais l'investissement matériel et le coût d'une analyse sont élevés par rapport à la détection UV. De plus, la complexité du développement analytique nécessite souvent un remplissage partiel du capillaire afin d'éviter la pollution du spectromètre de masse par les CD non volatiles.

Le couplage de l'électrophorèse capillaire avec la détection conductimétrique s'est révélé une bonne alternative à l'ensemble des problèmes évoqués précédemment. Pour la

première fois, la méthode EC-C<sup>4</sup>D a été validée et l'erreur totale mise en évidence lors de la construction du profil d'exactitude était inférieure à  $\pm 15\%$ . La limite de quantification de l'impureté énantiomérique de l'isopinocamphéylamine était alors de 0,5%.

Le détecteur conductimétrique sans contact à couplage capacitif est donc un outil de choix pour l'analyse des ions et des petites molécules organiques dépourvues de groupements chromophores par EC. La simplicité d'utilisation, la gamme de linéarité dynamique étendue et la sensibilité sont les principaux atouts de ce détecteur.

## Références bibliographiques

- [1] B. Chankvetadze, G. Blaschke, J. Chromatogr. A 906 (2001) 309.
- [2] K. Verleysen, P. Sandra, Electrophoresis 19 (1998) 2798.
- [3] C. Fischer, U. Schmidt, T. Dwars, G. Oehme, J. Chromatogr. A 845 (1999) 273.
- [4] C. Garcia-Ruiz, G. Alvarez-Llamas, A. Puerta, E. Blanco, A. Sanz-Medel, L. Marina, Anal. Chim. Acta 543 (2005) 77.
- [5] E. Rudzinska, P. Dzygiel, P. Wiczorek, P. Kafarski, J. Chromatogr. A 979 (2002) 115.
- [6] C. Masetto de Gaitani, A.S. Martinez, P.S. Bonato, Electrophoresis 24 (2003) 2723.
- [7] F. Prost, J. Caslavská, W. Thormann, J. Sep. Sci. 25 (2002) 1043.
- [8] R. Jeannot, B. Lenière, S. Chinon, Guide méthodologique pour l'analyse de sols pollués - Documents 298 du Bureau de Recherches Géologiques et Minières (BRGM), éd. BRGM, Orléans, 2001.
- [9] J. Fournier, Chimie des pesticides - Cultures et techniques, Agence de coopération culturelle et technique, éd. Des Trois Moutiers, Vienne, 1988.
- [10] E.C. John, B.Q. Gary, Chem. Res. Toxicol. 17 (2004) 983.
- [11] I.P.D. <http://www.syres.com/esc/physdemo.htm>.
- [12] v. Logiciel Pallas, CompuDrug Chemistry Ltd, version 1.2.
- [13] J. Devilliers, R. Farret, P. Girardin, J.L. Rivière, G. Soulas, Indicateurs pour évaluer les risques liés à l'interaction de pesticides, éd. Lavoisier, Paris, 2005.
- [14] J.-M. Meunier, A. Shvaloff, Neurotransmetteurs, éd. Masson, Paris, 1992.
- [15] <http://www.biotechnologie-vegetale.com/pages/chimie-insecticides.htm>.
- [16] <http://www.sante.gouv.fr/htm/popinsur/zoonose/chikungunyainsecticides.pdf>.
- [17] A. Williams, Pesticide Sci. 46 (1996) 3.
- [18] H. Ohkawa, N. Mikami, J. Miyamoto, J. Agric. Biol. Chem. 41 (1979) 369.
- [19] M. Ueji, Bull. Natl. Inst. Agro. Environm. Sci. 4 (1988) 125.
- [20] D.J. Armstrong, T.R. Fukuto, J. Agric. Food Chem. 35 (1987) 500.
- [21] Y.S. Wang, K.-T. Tai, J.-H. Yen, Ecotoxicol. Environ. Safety 57 (2004) 346.
- [22] N. Fidalgo-Ruiz, E. Blanco-Gonzalez, A. Sanz-Medel, Talanta 70 (2006) 1057.
- [23] I.H. Hardt, C. Wolf, B. Gehrcke, H. Hochmuth, B. Pfeffenberger, H. Hühnerfuss, W.A. König, J. High Resol. Chromatogr. 17 (1994) 859.
- [24] W.A. König, D. Icheln, T. Runge, B. Pfeffenberger, P. Ludwig, H. Hühnerfuss, J. High Resol. Chromatogr. 14 (1991) 530.
- [25] P. Wang, S. Jiang, D. Liu, H. Zhang, Z. Zhou, J. Agric. Food Chem. 54 (2006) 1577.
- [26] R.Y. Gao, H.F. Wang, Z.Y. Chen, H.Z. Yang, Q.S. Wang, Chromatographia 54 (2000) 322.
- [27] R.Y. Gao, G.S. Yang, H.Z. Yang, Z.Y. Chen, Q.S. Wang, J. Chromatogr. A 763 (1997) 125.
- [28] R.Y. Gao, G.S. Yang, H.Z. Yang, Z.Y. Chen, Q.S. Wang, J. Chromatogr. A 763 (1997) 125.
- [29] J.J. Ellington, J.J. Evans, K.B. Prickett, W.L. Champion, Journal of chromatography A 928 (2001) 145.
- [30] W. Liu, K. Lin, J. Gan, chirality 18 (2006) 713.
- [31] P. Schmitt, A.W. Garrison, D. Freitag, A. Kettrup, J. Chromatogr. A 792 (1997) 419.
- [32] J.L. Jarman, W.J. Jones, L.A. Howell, A.W. Garrison, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 6175.

- [33] V.C. Anigbogu, H. Woldeab, A.W. Garrison, J.K. Avants, Intern. J. Environ. Anal. Chem. 83 (2003) 89.
- [34] The pesticide Manual, 13<sup>e</sup> édition, éd Tomlin CDS, 2003, p 1344.
- [35] K. Lin, S. Zhou, C. Xu, W. Liu, J. Agric. Food Chem. 54 (2006) 8134.
- [36] N. Kurihara, J. Miyamoto, G.D. Paulson, B. Zeeh, M.W. Skidmore, R.M. Hollingworth, H.A. Kuiper, Pure Appl. Chem 69 (1997) 2007.
- [37] M. Beaufour, P. Morin, J.-P. Ribet, J. Sep. Sci. 28 (2005) 529.
- [38] Y. Liu, H. Shi, X. Ling, P. Tu, J Chromatogr. Sci. 45 (2007) 605.
- [39] J.H. Smelt, A.E. Van de Peppel-Groen, L.J.T. Van der Pas, A. Dijksterhuis, Soil Biol. Biochem. 28 (1996) 1757.
- [40] B.K. Singh, A. Walker, D.J. Wright, Environment and Toxicological Chemistry 21 (2002) 2600.
- [41] M. Lorin, R. Delépée, P. Morin, J.-P. Ribet, Anal. Chim. Acta 2007 (2007) 139.
- [42] T. Caceres, M. Megharaj, R. Naidu, Chemosphere 66 (2006) 1264.
- [43] N. Fidalgo-Used, E. Blanco-Gonzalez, A. Sanz-Medel, Talanta 70 (2006) 1057.
- [44] T. Perez-Ruiz, C. Martinez-Lozano, A. Sanz, E. Bravo, Chromatographia 61 (2005) 493.
- [45] C. Perrin, Y. Vander Heyden, M. Maftouh, D. Luc Massart, Electrophoresis 22 (2001) 3203.
- [46] G. Gübitz, M.G. Schmidt, Biopharm. Drug Dispos. 22 (2001) 291.
- [47] A.F.N.O.R. Association Française de Normalisation, NF ISO 10390 - Soil Quality. pH determination, vol 1, pp 339-347, Paris, 1999.
- [48] A.F.N.O.R. Association Française de Normalisation, NF ISO 11465 - Soil Quality. Determination of dry matter and water content on a mass basis. Gravimetric method, vol 2, pp 408, 1999.
- [49] N. Matthijs, Y. Vander Heyden, Biomed. Chromatogr. 20 (2006) 696.
- [50] N. Matthijs, S. Van Hemelryck, M. Maftouh, D. Luc Massart, Anal. Chim. Acta 525 (2004) 247.
- [51] M. Fillet, P. Hubert, J. Crommen, J. Chromatogr. A 875 (2000) 123.
- [52] S. Wei, H. Guo, J.-M. Lin, J. Chromatogr. B 832 (2006) 90.
- [53] V.C. Anigbogu, V.C. Copper, M.J. Sepaniak, J. Chromatogr. A 705 (1995) 343.
- [54] I.E. Valko, H. Siren, M.-L. Riekkoka, J. Microcolumn Sep. 11 (1999) 199.
- [55] M. Fillet, B. Chankvetadze, J. Crommen, G. Blaschke, Electrophoresis 20 (1999) 2691.
- [56] V. Bezy, P. Chaimbault, P. Morin, S.E. Unger, M.-C. Bernard, L.A. Agrofoglio, Electrophoresis 27 (2006) 2464.
- [57] A. Garrido Frenich, I. Martinez Salvador, J.L. Martinez Vidal, T. Lopez-Lopez, Anal. Bioanal. Chem. 383 (2005) 1106.
- [58] H. Obana, K. Kikuchi, M. Okihashi, S. Hori, Analyst 122 (1997) 217.
- [59] R. Zhu, W.T. Kok, J. Pharm. Biomed. Anal. 17 (1998) 985.
- [60] M.T. Veledo, M. de Frutos, J.C. Diez-Masa, J. Sep. Sci. 28 (2005) 935.
- [61] T. Chvojka, I. Jelinek, F. Opekar, K. Stulik, Anal. Chim. Acta 433 (2001) 13.
- [62] J. Petr, V. Maier, J. Horakova, J. Sevcik, Electrophoresis 27 (2006) 4735.
- [63] J. Barek, J. Fischer, T. Navratil, K. Peckova, B. Yosypchuk, J. Zima, Electroanalysis 19 (2007) 2003.
- [64] A.J. Zemann, TrAC, Trend. Anal. Chem. 20 (2001) 346.
- [65] R.M. Guijt, C.J. Evenhuis, M. Macka, P.R. Haddad, Electrophoresis 25 (2004) 4032.
- [66] E. Groussac, M. Ortiz, J. François, Enzyme and Microbial Technology 26 (2000) 715.
- [67] J. Tanyanyiwa, P.C. Hauser, Electrophoresis 23 (2002) 3781.

- [68] L.A. Holland, A.M. Leigh, *Electrophoresis* 23 (2002) 3649.
- [69] T. Kappes, P.C. Hauser, *Electroanalysis* 12 (2000) 165.
- [70] R.P. Baldwin, *Electrophoresis* 21 (2000) 4017.
- [71] X.H. Huang, T.K.J. Pang, M.J. Gordon, R.N. Zare, *Anal. Chem.* 59 (1987) 2747.
- [72] X.H. Huang, J.A. Luckey, M.J. Gordon, R.N. Zare, *Anal. Chem.* 61 (1989) 766.
- [73] X.H. Huang, M.J. Gordon, R.N. Zare, *J. Chromatogr.* 425 (1988) 385.
- [74] X.H. Huang, R.N. Zare, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2193.
- [75] H. Zhao, R. Dadoo, R.J. Reay, G.T.A. Kovacs, R.N. Zare, *J. Chromatogr. A* 813 (1998) 205.
- [76] C. Haber, W.R. Jones, J. Soglia, M.A. Surve, A. McGlynn, J.R. Caplan, C. Reineck, C. Krtanovic, *Journal of Capillary Electrophoresis* 3 (1996) 1.
- [77] N. Avdalovic, C.A. Pohl, R.D. Rocklin, J.R. Stillian, *Anal. Chem.* 65 (1993) 1470.
- [78] P.K. Dasgupta, L.Y. Bao, *Anal. Chem.* 65 (1993) 1003.
- [79] A.J. Zemmann, E. Schnell, D. Volgger, G.K. Bonn, *Anal. Chem.* 70 (1998) 563.
- [80] J.A. Fracassi Da Silva, C.L. Do Lago, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4339.
- [81] K. Mayrhofer, A.J. Zemmann, E. Schnell, G.K. Bonn, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3926.
- [82] P. Kuban, P.C. Hauser, *Electroanalysis* 16 (2004) 2009.
- [83] P. Kuban, P.C. Hauser, *Anal. Chim. Acta* 607 (2008) 15.
- [84] J. Tanyanyiwa, P.C. Hauser, *Anal. Chem.* 74 (2002) 6378.
- [85] J. Tanyanyiwa, B. Galliker, M.A. Schwarz, P.C. Hauser, *Analyst* 127 (2002) 214.
- [86] E. Baltussen, R.M. Guijt, G. Van der Steen, F. Laugere, S. Baltussen, G.W.K. Van Dedem, *Electrophoresis* 23 (2002) 2888.
- [87] J.A. Fracassi da Silva, N. Guzman, C.L. Do Lago, *J. Chromatogr. A* 942 (2002) 249.
- [88] A. Zatkovskis Carvalho, J.A.F. Da Silva, C.L. Do Lago, *Electrophoresis* 24 (2003) 2138.
- [89] P. Morin, E. Vangrevelinghe, S. Mayer, PHoEBuS, version 1.30, *Analisis*, Namur, Belgium, 2001.
- [90] B. Gas, M. Demjaninko, J. Vacik, *J. Chromatogr.* 192 (1980) 253.
- [91] J. Vacik, J. Zuska, I. Muselasova, *J. Chromatogr.* 320 (1985) 233.
- [92] F. De l'Escaille, J.-B. Falmagne, *Sep. Sci. Technol.* 9 (2008) 317.
- [93] A. Padarauskas, V. Olsauskaite, V. Paliulionyte, *J. Chromatogr. B* 829 (1998) 359.
- [94] P. Kuban, P. Kuban, V. Kuban, *Electrophoresis* 23 (2002) 3725.
- [95] J. Tanyanyiwa, P.C. Hauser, *Electrophoresis* 25 (2004) 3010.
- [96] V. Maier, J. Petr, R. Knob, J. Horakova, J. Sevcik, *Electrophoresis* 28 (2007) 1815.
- [97] X.Y. Gong, P.C. Hauser, *J. Chromatogr. A* 1094 (2005) 196.
- [98] X.Y. Gong, P.C. Hauser, *Electrophoresis* 27 (2006) 4375.
- [99] X.Y. Gong, P. Kuban, J. Tanyanyiwa, P.C. Hauser, *J. Chromatogr. A* 1082 (2005) 230.
- [100] B. Chankvetadze, I. Kartoziya, C. Yamamoto, Y. Okamoto, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 467.
- [101] R. Steffek, Y. Zelechonok, K. Gahm, *J. Chromatogr. A* 947 (2002) 301.
- [102] G. Gübitz, M.G. Schmid, *Electrophoresis* 28 (2007) 114.
- [103] T.J. Ward, *Anal. Chem.* 78 (2006) 3947.
- [104] M. Malm, Y. Bergquist, *J. Chromatogr. B* 846 (2007) 98.
- [105] L.N. Nikolai, E.L. McLure, S.L. MacLeod, C.S. Wong, *J. Chromatogr. A* 1131 (2006) 103.
- [106] R. Coles, E.D. Kharasch, *J. Chromatogr. B* 857 (2007) 67.
- [107] S. Morante-Zarcelero, I. Del Hierro, M. Fajardo, I. Sierra, *Anal. Chim. Acta* 566 (2006) 185.

- [108] J. Meera, D. Armstrong, D.W. Armstrong, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 251.
- [109] J. Martens-Lobenhoffer, I. Reiche, U. Tröger, K. Mönkemüller, P. Malfertheiner, S.M. Bode-Böger, *J. Chromatogr. B* 857 (2007) 301.
- [110] M. Kagan, M. Chlenov, A. Greenfield, D.M. Ho, *J. Chromatogr. A* 1120 (2006) 82.
- [111] P. Kuban, B. Karlberg, P. Kuban, V. Kuban, *J. Chromatogr. A* 964 (2002) 227.
- [112] J.S. Fritz, *J. Chromatogr. A* 884 (2000) 261.
- [113] I. Surowiec, I. Kaml, E. Kenndler, *J. Chromatogr. A* 1024 (2004) 245.
- [114] K.A. Oudhoff, M. Macka, P.R. Haddad, P.J. Schoenmakers, W.T. Kok, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 183.
- [115] S.Y. Chang, W.-L. Tseng, S. Mallipattu, H.-T. Chang, *Talanta* 66 (2005) 411.
- [116] Y. Henchoz, J. Schappler, L. Geiser, J. Prat, P.-A. Carrupt, J.-L. Veuthey, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1869.
- [117] I. Zuskova, A. Novotna, J. Vcelakova, J. Sevcik, *J. Chromatogr. A* 841 (2006) 129.
- [118] W.S. Law, P. Kuban, L.L. Yuan, J.H. Zhao, S.F.Y. Li, P.C. Hauser, *Electrophoresis* 27 (2006) 1932.
- [119] P. Hubert, J.J. Nguyen-Hu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, *STP Pharma Pratiques* 13 (2003) 101.
- [120] P. Hubert, J.J. Nguyen-Hu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, *STP Pharma Pratiques* 16 (2006) 28.
- [121] P. Hubert, J.J. Nguyen-Hu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, *STP Pharma Pratiques* 16 (2006) 87.
- [122] B. Gas, P. Coufal, M. Jaros, J. Muzikar, I. Jelinek, *J. Chromatogr. A* 905 (2001) 269.
- [123] P.J. Dutton, T.M. Fyles, S.J. McDermid, *Can. J. Chem.* 66 (1998) 1097.
- [124] M. Jaros, T. Soga, T. Van de Goor, B. Gas, *Electrophoresis* 26 (2005) 1948.
- [125] <http://www.natur.cuni.cz/gas>.
- [126] K. Verleysen, T. Van der Bosch, P. Sandra, *Electrophoresis* 20 (1999) 2650.
- [127] H.J. Park, Y. Choi, W. Lee, K.R. Kim, *Electrophoresis* 25 (2004) 2755.
- [128] M. Blanco, I. Valverde, *TrAC, Trend. Anal. Chem.* 22 (2003) 428.
- [129] W.X. Huang, H. Xu, S.D. Fazio, R.V. Vivilecchia, *J. Chromatogr. A* 875 (2000) 361.
- [130] D.W. Armstrong, L.W. Chang, S.S.C. Chang, *J. Chromatogr. A* 793 (1998) 115.
- [131] M.A. Schwarz, P.C. Hauser, *Anal. Chem.* 75 (2003) 4691.
- [132] M.A. Schwarz, P.C. Hauser, *J. Chromatogr. A* 928 (2001) 225.
- [133] M. Hilton, D.W. Armstrong, *J. Liq. Chromatogr.* 14 (1991) 9.
- [134] S.A.C. Wren, R.C. Rowe, *J. Chromatogr.* 603 (1992) 235.
- [135] M. Feinberg, *J. Chromatogr. A* 1158 (2007) 174.

## *CONCLUSION GENERALE*

---



---

## Conclusion générale

En raison des différences d'activité biologique qui peuvent résider entre deux isomères optiques, la séparation des énantiomères revêt une importance capitale dans de nombreux domaines telles que les industries pharmaceutique, cosmétique, agroalimentaire et phytosanitaire. Ainsi, des techniques de plus en plus performantes et sensibles sont nécessaires pour quantifier l'éventuelle présence du distomère parmi l'eutomère.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont montré les potentialités de deux détecteurs atypiques utilisés en chromatographie en phase liquide et en électrophorèse capillaire pour déterminer la pureté énantiomérique de principes actifs pharmaceutiques et de composés aminés.

Actuellement dans de nombreux laboratoires de contrôle qualité, l'accès à la pureté globale d'un principe actif chiral nécessite le développement de deux méthodes chromatographiques. Ainsi, la pureté énantiomérique est déterminée après séparation des énantiomères sur un support chiral tandis qu'une analyse sur une colonne greffée C<sub>18</sub> permet de détecter les impuretés chimiques. Afin de minimiser les coûts de développement, de consommables et de personnels, nous avons développé une méthode alternative.

Ainsi, le premier chapitre a été consacré au développement du détecteur à dichroïsme circulaire en vue de quantifier simultanément les puretés énantiomérique et chimique de principes actifs pharmaceutiques en chromatographie en phase liquide sur un support non chiral.

Dans un premier temps, les énantiomères de l'efaroxan ont été analysés sur une phase stationnaire chirale polysaccharique de type carbamate d'amylose. Après optimisation de la longueur d'onde de détection, le signal dichroïque a fourni deux pics chromatographiques de même intensité mais de signe opposé. Ainsi, d'un point de vue qualitatif, la détection par dichroïsme circulaire a permis de prévoir l'ordre de rétention des énantiomères. Cet atout supplémentaire peut s'avérer intéressant lors des étapes de screening pharmaceutique afin d'identifier rapidement chacun des énantiomères.

D'un point de vue quantitatif, le choix de la longueur d'onde de détection est un paramètre important lors de l'optimisation de la méthode. Celle-ci doit correspondre à la

---

différence d'ellipticité maximale entre les deux énantiomères. Lorsque le spectre dichroïque de l'analyte possède plusieurs maxima, il est préférable de travailler à une longueur d'onde élevée en raison d'un moindre bruit de fond.

L'utilisation d'un filtre électronique passe-bas (LINK) a été une option intéressante afin de réduire le bruit de fond du signal dichroïque. Une sélection judicieuse de la fréquence de coupure du filtre a permis de réduire l'intensité du bruit de fond d'un facteur 70 et d'améliorer les limites de détection par 10. La limite de quantification de l'impureté énantiomérique de l'efaroxan dans les conditions d'analyse optimisées est de 0,8%.

Ensuite, le détecteur à dichroïsme circulaire a permis de déterminer la pureté énantiomérique du milnacipran et de l'efaroxan sans séparation préalable de leurs énantiomères sur un support chromatographique chiral. Dans ces deux cas, un support chromatographique en carbone graphite poreux ou une colonne de silice greffée C<sub>8</sub> ont été utilisés. L'analyse de ces composés pharmaceutiques possédant tous deux une fonction ionisable a mis en évidence l'influence du pH du milieu de solubilisation sur la réponse dichroïque. Par ailleurs, l'étude menée sur le milnacipran a démontré le manque de robustesse de ce détecteur vis-à-vis des fluctuations de température. Un simple contrôle de la température de la cellule de détection a permis de résoudre ce désagrément.

La quantification de l'impureté énantiomérique de l'efaroxan a été validée selon les critères de justesse, précision et exactitude. Toutefois, la limite de quantification de 1% s'avère élevée par rapport à celles couramment obtenues en CPL-UV (0,05 – 0,1%).

Enfin, l'attrait principal de ce détecteur a été mis à profit lors de l'analyse d'une benzoxathiépine possédant deux centres d'asymétrie et qui donne naissance à quatre stéréoisomères. Seul l'un d'entre eux est pharmacologiquement actif. Le carbone graphite poreux était le seul support chromatographique ayant permis la séparation des paires d'énantiomères et de leurs impuretés chimiques. Les sept composés ont été élués en mode gradient par une phase mobile ternaire constituée de chloroforme, d'acétonitrile et de méthanol. Un modèle mathématique a été développé afin de déterminer la pureté diastéréoisomérique en fonction de l'excès énantiomérique de chaque couple d'énantiomères et du rapport de leur concentration. Les limites de quantification des impuretés optiques de la benzoxathiépine, voisines de 5 %, sont au-delà des limites imposées par les directives réglementaires. Toutefois, cette méthode présente l'avantage de quantifier simultanément les puretés optique et chimique de la benzoxathiépine.

---

Nous avons montré au travers de quelques exemples que les limites de quantification en CPL-DC sont fortement dépendantes de la structure moléculaire des analytes et notamment de la nature des groupements chromophores qui les constituent.

En conclusion, la sensibilité du détecteur à dichroïsme circulaire ne répond pas aux critères pharmaceutiques exigés lors de la vérification de la pureté énantiomérique d'un principe pharmaceutique dans un lot de production. Des améliorations techniques doivent être apportées par le constructeur (laser, double-faisceau) afin d'élargir la gamme de linéarité dynamique et la sensibilité de ce détecteur. Toutefois, les performances actuelles du détecteur à dichroïsme circulaire sont adaptées pour vérifier la pureté (99 %) de molécules potentiellement actives en vue de tests biologiques.

Dans une seconde partie, les qualités reconnues de l'électrophorèse capillaire ont été mises à profit pour la séparation énantiosélective de produits phytosanitaires et de dérivés aminés.

Tout d'abord, l'analyse de pesticides organophosphorés, dont l'asymétrie est introduite par des hétéroatomes de soufre ou de phosphore, a été développée. L'utilisation de cyclodextrines hautement sulfatées a permis la résolution énantiosélective de plusieurs composés testés. L'ajout d'urée dans le tampon a favorisé la solubilisation des pesticides organophosphorés les plus hydrophobes et amélioré la séparation de leurs énantiomères.

Une étude a ensuite été consacrée à la séparation énantiomérique et simultanée du fenamiphos et de ses métabolites en EC avec un système combiné de deux cyclodextrines (CM- $\beta$ -CD et HP- $\alpha$ -CD). L'application d'une pression assistée (0,2 psi) simultanément à la tension de séparation a permis de diminuer le temps d'analyse, d'améliorer l'efficacité des pics et d'accroître la sensibilité. Cette méthode a été pré-validée et appliquée à la quantification de ces pesticides dans des extraits de sol. Un couplage avec la spectrométrie de masse pourrait être envisagé afin d'améliorer les limites de quantification. Un remplissage partiel du capillaire serait alors nécessaire afin d'éviter l'entrée des CD non volatiles dans le spectromètre de masse.

Enfin, l'analyse de molécules dénuées de groupements chromophores a été réalisée en électrophorèse capillaire avec la détection conductimétrique sans contact à couplage capacitif.

Le choix de l'électrolyte support est un paramètre important qui conditionne la sensibilité de la détection. Un tampon constitué d'acide aspartique et d'acide citrique

---

(force ionique = 10 mM, pH 2,2) a permis la détection des différentes amines étudiées, par conductimétrie indirecte, sans aucune co-migration avec les pics systèmes. L'éther couronne chiral (-)-18C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, ajouté seul ou en combinaison avec une cyclodextrine (DM-β-CD) dans la solution électrolytique, est particulièrement adapté pour résoudre les énantiomères d'amines primaires dépourvues de noyau aromatique.

La méthode EC-C<sup>4</sup>D a été validée, pour la première fois, lors que la détermination de la pureté énantiomérique de l'isopinocamphéylamine. La limite de quantification était de 0,5 % avec une erreur totale maximale de ± 15 %, mise en évidence lors de la construction du profil d'exactitude.

Le détecteur conductimétrique sans contact à couplage capacitif est donc un outil alternatif à la détection UV indirecte pour l'analyse par EC, de petites molécules ioniques dépourvues de groupements chromophores. La simplicité d'utilisation, la gamme de linéarité dynamique étendue et la sensibilité sont les principaux atouts de ce détecteur.

**Marie LECOEUR LORIN**

**Intérêt du détecteur à dichroïsme circulaire en chromatographie liquide et du détecteur conductimétrique à couplage capacitif en électrophorèse capillaire pour l'analyse de molécules chirales**

Applications aux composés pharmaceutiques et aux pesticides

La séparation des énantiomères de principes actifs pharmaceutiques suscite un vif intérêt en raison des propriétés pharmacologiques, toxicologiques ou biologiques différentes qui peuvent exister entre deux isomères optiques. Le développement de méthodes d'analyse spécifiques et sensibles est donc nécessaire afin de contrôler la présence de traces de l'énantiomère inactif dans des lots de fabrication de médicaments.

L'utilisation d'un détecteur à dichroïsme circulaire en chromatographie en phase liquide a permis de déterminer simultanément les puretés optique et chimique de plusieurs principes actifs pharmaceutiques. La sensibilité de la détection dichroïque est toutefois influencée par différents facteurs (nature des chromophores de l'analyte, pH de la phase mobile, température de la cellule de détection, utilisation d'un filtre électronique). Malgré un manque de sensibilité, le détecteur à dichroïsme circulaire permet de déterminer rapidement la pureté énantiomérique de principes actifs en CPL, sans séparation préalable des énantiomères sur un support chiral.

D'autre part, l'aptitude de l'électrophorèse capillaire à séparer des énantiomères de pesticides possédant des hétéroatomes comme centres d'asymétrie a été confirmée. Ainsi, la séparation des énantiomères d'un pesticide organophosphoré et de ses deux métabolites chiraux a été réalisée. Cette méthode a été pré-validée puis appliquée à des matrices environnementales.

Enfin, la simplicité d'utilisation et la sensibilité de la détection conductimétrique sans contact à couplage capacitif sont des atouts indéniables lors de la détermination de la pureté énantiomérique d'amines dénuées de groupements chromophores en électrophorèse capillaire.

Mots-clés : chromatographie en phase liquide, détecteur conductimétrique sans contact à couplage capacitif, détecteur à dichroïsme circulaire, électrophorèse capillaire, pesticide, molécules pharmaceutiques, validation de méthode.

**Interest of circular dichroism detector in liquid chromatography and of capacitive coupled contactless conductivity detector in capillary electrophoresis for the analysis of chiral molecules**

Application for drugs and pesticides

The resolution of enantiomers is necessary due to considerable differences that may exist between two enantiomers in terms of pharmacokinetics, activity and toxicity. The development of efficient, specific and sensitive analytical methods is required in order to detect some traces of inactive enantiomer during manufactured batch of medicinal products.

The use of circular dichroism detector in liquid chromatography allowed the simultaneous determination of optical and chemical purities of several drugs. The sensitivity is influenced by several factors (nature of analyte chromophore, pH of the mobile phase, temperature of the detection cell, use of electronic filter). Despite a lack of sensitivity, circular dichroism detector allowed a fast analytical development for the determination of enantiomeric purity, without resolving enantiomers on a chiral chromatographic support.

Furthermore, the ability of capillary electrophoresis to separate pesticide enantiomers which possess heteroatoms as chiral centers was confirmed. Hence, enantioselective separation of one organophosphorus pesticide and its two metabolites has been performed. This method was pre-validated and experiments have been carried out on environmental samples.

Finally, the ease of use and the sensitivity of capacitively coupled contactless detector offer some advantages to determine the enantiomeric purity of amines which do not possess any chromophores by capillary electrophoresis.

Keywords: Liquid chromatography, capacitively coupled contactless conductivity detector, circular dichroism detector, capillary electrophoresis, pesticides, pharmaceutical compounds, method validation.

**INSTITUT DE CHIMIE ORGANIQUE ET ANALYTIQUE (ICOA)  
CNRS-UMR 6005 – Université d'Orléans  
BP 6759  
45067 ORLEANS Cedex 5 – France**