



HAL
open science

Nouveaux sélecteurs chiraux à base d'aminoglycosides pour la séparation chirale par échange de ligands

Mustapha Zaher

► **To cite this version:**

Mustapha Zaher. Nouveaux sélecteurs chiraux à base d'aminoglycosides pour la séparation chirale par échange de ligands. Autre. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2010. Français. NNT : . tel-00551787

HAL Id: tel-00551787

<https://theses.hal.science/tel-00551787>

Submitted on 4 Jan 2011

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

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



UNIVERSITE DE GRENOBLE

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
en Sciences du Médicament

Spécialité: chimie analytique

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée et soutenue publiquement par

Mustapha ZAHER

Le 14 décembre 2010

Nouveaux sélecteurs chiraux à base d'aminoglycosides pour la séparation chirale par échange de ligands

Thèse dirigée par le Pr **PEYRIN Eric** et codirigée par le Dr **RAVELET Corinne**

Thèse préparée au sein du
Département de Pharmacochimie Moléculaire (DPM)
Equipe de chimie bioanalytique
UMR 5063 CNRS
Ecole doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Membres du Jury

Civilité/Nom/Prénom	Fonction et lieu de la fonction	Rôle
Mme Demesmay Claire	Pr/Université de Lyon 1	Rapporteur
Mr Goossens Jean-François	Pr/Université de Lille 2	Rapporteur
Mr Cottaz Sylvain	Pr/Université de Grenoble	Examineur
Mr Decout Jean-Luc	Pr/Université de Grenoble	Invité



UNIVERSITE DE GRENOBLE

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
en Sciences du Médicament

Spécialité: chimie analytique

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée et soutenue publiquement par

Mustapha ZAHER

Le 14 décembre 2010

Nouveaux sélecteurs chiraux à base d'aminoglycosides pour la séparation chirale par échange de ligands

Thèse dirigée par le Pr **PEYRIN Eric** et codirigée par le Dr **RAVELET Corinne**

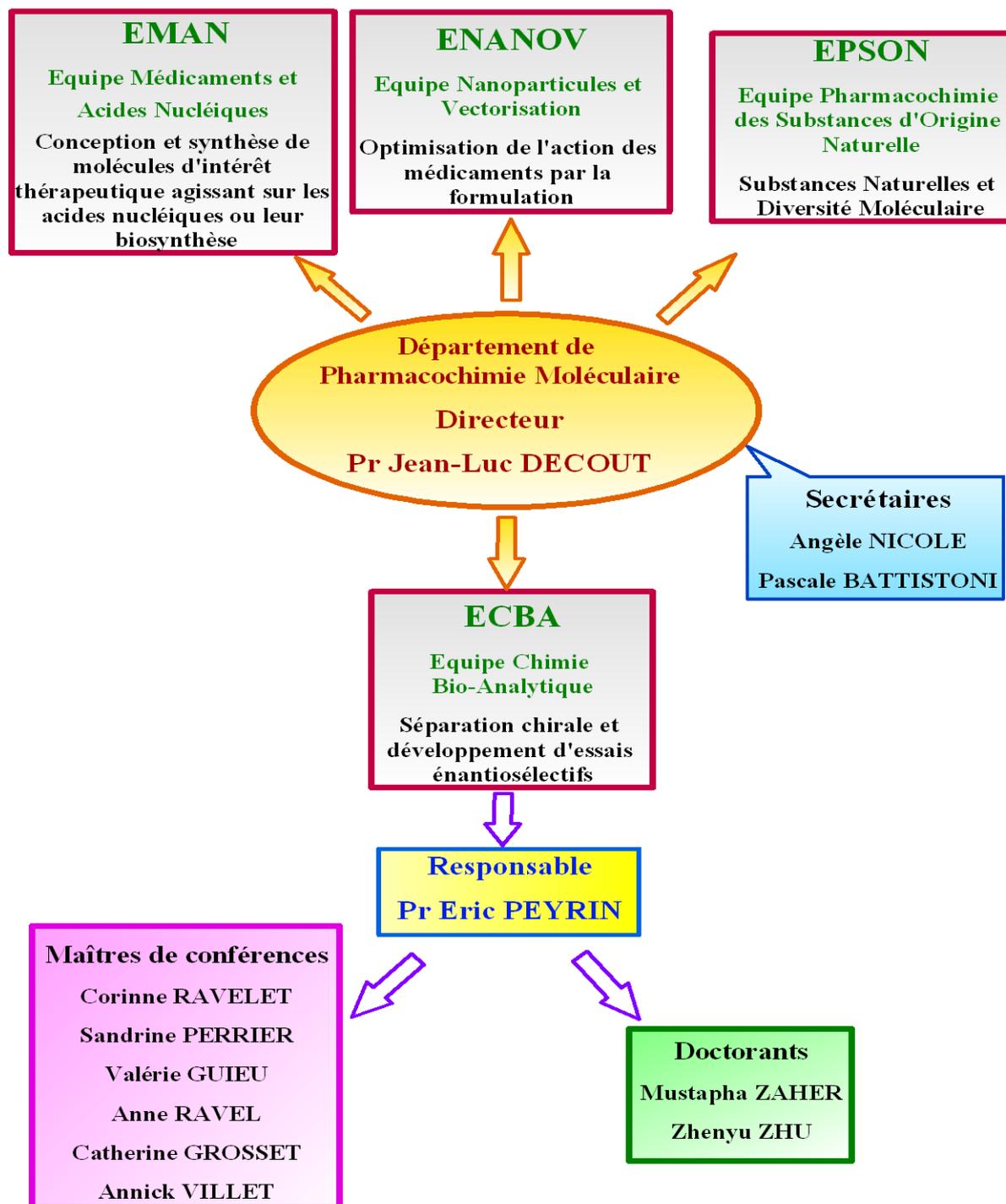
Thèse préparée au sein du
Département de Pharmacochimie Moléculaire (DPM)
Equipe de chimie bioanalytique
UMR 5063 CNRS
Ecole doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Membres du Jury

Civilité/Nom/Prénom	Fonction et lieu de la fonction	Rôle
Mme Demesmay Claire	Pr/Université de Lyon 1	Rapporteur
Mr Goossens Jean-François	Pr/Université de Lille 2	Rapporteur
Mr Cottaz Sylvain	Pr/Université de Grenoble	Examineur
Mr Decout Jean-Luc	Pr/Université de Grenoble	Invité

AVANT PROPOS

Cette thèse s'est déroulée au sein de l'équipe de chimie bioanalytique du Département de Pharmacochimie Moléculaire (DPM) UMR 5063 CNRS, Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble (ICMG) FR 2607, UFR de Pharmacie de Grenoble, Université Joseph Fourier (UJF) de Grenoble. L'organisation des équipes au sein du DPM et la composition de l'équipe de chimie bioanalytique sont présentées dans l'organigramme suivant :



Le laboratoire est localisé depuis mars 2007 sur le campus universitaire de Saint Martin d'Hères afin d'établir un rapprochement entre les équipes de recherche composant l'ICMG.

L'équipe de chimie bioanalytique (ECBA) travaille sur le développement de nouveaux sélecteurs chiraux (aptamères en série ADN et ARN, dérivés de la néamine) afin de séparer des énantiomères de molécules bioactives (acides aminés, médicaments...).

Mes travaux de thèse ont commencé en novembre 2006 sous la direction du Pr. Eric Peyrin et de Corinne Ravelet. Ces travaux ont donné lieu à trois publications internationales (cf partie Résultats et Discussion). Ma thèse a été financée par une bourse du gouvernement Syrien.

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse est le fruit d'une alliance entre les compétences, la disponibilité, les encouragements et l'affection de nombreuses personnes que je désire toutes remercier chaleureusement.

Tout d'abord, j'adresse toute ma gratitude à Monsieur le **Professeur Eric Peyrin**, mon directeur de thèse, qui m'a accueilli dans son laboratoire, m'a permis de commencer cette thèse. Grâce à lui, j'ai pu réaliser ce rêve qui n'a fait que croître en moi durant toutes mes années d'étude. Au cours de ces années, votre grande disponibilité, votre rigueur scientifique, votre enthousiasme et vos précieux conseils m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions. C'est un honneur pour moi d'avoir travaillé avec un excellent chercheur et professeur dont je ne peux qu'admirer le talent.

Mes plus vifs remerciements s'adressent à ma « co-directrice » de thèse : le **Dr Corinne Ravelet**, pour tous les efforts fournis, sans elle cette thèse ne serait pas ce qu'elle est. Ses importantes qualités humaines et sa grande disponibilité m'ont été d'une aide précieuse tout au long de la réalisation de ce travail. Merci pour tout ce que vous m'avez appris et pour " m'avoir tenu la main " jusqu'aux dernières lignes de ce mémoire.

Je tiens à remercier vivement le **Dr Sandrine Perrier** et le **Dr Valérie Guieu** pour l'aide précieuse qu'elles m'ont apportée pendant la rédaction de ce manuscrit.

Comment ne pas remercier aussi **Sylviane Verdier**, mon professeur de français qui a joué un rôle primordial dans le déroulement de mon travail et notamment dans la rédaction.

Je tiens à remercier les amis, ex-thésards de l'équipe de chimie bioanalytique, **Joséphine RUTA** et **Mohamed HAROUN** qui m'ont aidé lors de cette thèse.

Je continuerai par remercier tous les autres membres de l'équipe de chimie bioanalytique : **Jennifer Fize, Anne Ravel, Annick Villet, Danièle Esnault, Catherine Grosset.**

Des remerciements spéciaux à l'équipe EMAN du DPM pour m'avoir accueilli avec gentillesse au sein de leur laboratoire pendant plusieurs mois et notamment **Isabelle**

Baussanne pour son encadrement en synthèse, sa disponibilité et sa gentillesse, et **Jean-Luc Décout** pour son encadrement en synthèse.

Je n'oublierai pas de remercier le responsable informatique du DPM, **Dr Antoine Fortuné**, pour avoir résolu tous mes problèmes informatiques avec beaucoup de patience.

Je souhaite évidemment remercier toutes les personnes du DPM que je n'ai pas citées ici.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury qui me font l'honneur d'examiner ce travail.

Enfin, j'adresse toute mon affection à mes parents, mon frère **Ali**, mes sœurs **Fatema** et **Safa** et surtout à mes grands parents, qui m'ont soutenu et encouragé tout au long de cette aventure.

Je remercie enfin et surtout celle avec qui j'ai la chance de partager ma vie. Elle a été pour moi un soutien constant. Merci à toi **Najwa**.

Je n'oublie pas mes petits anges **Noor** et **Ali**. Je suis sûr qu'ils garderont de très bons souvenirs de ses années agréables passées en France.

La réalisation de cette thèse a été possible grâce à une bourse du **gouvernement Syrien**. Je remercie les gens qui m'ont facilité cette tâche.

ABBREVIATIONS

ACPM:	Additif Chiral de la Phase Mobile
ADME:	Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination
ADN:	Acide Désoxyribonucléique
ADP:	Adénosine Diphosphate
Ado:	Adénosine
AGP:	α -Acid glycoprotein (=Alpha 1 Glycoprotéine Acide)
AIDA:	1-Aminoindane-1,5-Dicarboxylique Acid
Ala:	Alanine
Allo-Ile	Alloisoleucine
AMP:	Adénosine Monophosphate
ARN:	Acide Ribonucléique
ATIDA	2-(5'-carboxy-thien-2'-yl) glycine
ATP:	Adénosine Triphosphate
CCEL :	Chromatographie Chirale par Echange de Ligands
CD:	Cyclodextrine
CE-MS:	Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry
CGP:	Carbone Graphite Poreux
CLHP:	Chromatographie Liquide Haute Performance
CMC :	Concentration Micellaire Critique
CPG:	Chromatographie en Phase Gazeuse
CPS:	Chromatographie en Phase Supercritique
CZE:	Electrophorèse Capillaire de Zone
DNP:	Dinitrophényle
DPM:	Département de Pharmacochimie Moléculaire
EC:	Electrophorèse Capillaire
ECA:	Electrophorèse Capillaire d'Affinité
ECBA:	Equipe Chimie Bio-Analytique
ECC:	Electrochromatographie Capillaire
EMAN:	Equipe Médicaments et Acides Nucléiques
ENANOV:	Equipe Nanoparticules et Vectorisation
EPSON:	Equipe Pharmacochimie des Substances d'Origine Naturelle
FDA:	Food and Drug Administration
FEO:	Flux Electroosmotique
Gln:	Glutamine
Glu:	Acide Glutamique
Guo:	Guanosine
Gly-Tyr:	Glycyl-Tyrosine
HCH:	Hexachlorocyclohexane
His:	Histidine
Ig:	Immunoglobuline
Ile :	Isoleucine
Leu :	Leucine
MEKC:	Chromatographie Electrocinétique Micellaire

Met :	Méthionine
MIP:	Molecularly Imprinted Polymer (=Polymère à empreinte moléculaire)
Nor-Leu:	Norleucine
Nor-Val:	Norvaline
OBS:	O-Benzyl-(S)-sérine
OVM:	Ovomucoïde
Phe:	Phénylalanine
Pro:	Proline
PSC:	Phases Stationnaires Chirales
RMN:	Résonance Magnétique Nucléaire
SAB	Sérum Albumine de Boeuf
SAH	Sérum Albumine Humaine
SELEX:	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
Ser:	Sérine
SDS:	Sodium Dodecyl Sulfate (= Dodécylsulfate de sodium)
STS:	Sodium Tetradecyl Sulfate (= Tétradécyle sulfate de sodium)
THF:	Tétrahydrofurane
Tyr:	Tyrosine
UV:	Ultra-Violet
Val :	Valine
VIH:	Virus de l'Immunodéficience Humaine

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	13
-----------------------------	----

Chapitre I

CHIRALITE ET INCIDENCES

I La reconnaissance chirale.....	18
II La chiralité et les acides aminés.....	19
III La chiralité et l'environnement.....	19
IV Incidences de la chiralité dans le domaine thérapeutique	21
IV.1 Introduction	21
IV.2 La Chiralité et les médicaments	22
IV.2.1 Enantiomères présentant qualitativement et quantitativement la même activité.....	22
IV.2.2 Enantiomères présentant qualitativement le même type d'activité mais d'intensités différentes	22
IV.2.3 Un des deux énantiomères est l'eutomère tandis que l'autre est inactif	23
IV.2.4 Les deux énantiomères possèdent des activités biologiques différentes.....	23
IV.2.5 Un des deux énantiomères est l'eutomère tandis que l'autre est toxique.....	24
V Chiralité et propriétés pharmacocinétiques	24
VI Chiralité et affaires réglementaires.....	25
VII Chiralité et intérêt économique	26
Bibliographie.....	28

Chapitre II

TECHNIQUES UTILISEES POUR L'OBTENTION D'ENANTIOMERES PURS

I La synthèse asymétrique.....	32
II Résolution des racémiques.....	33
II.1 Méthodes classiques	34
II.2 Méthodes modernes	35
II.2.1 Les membranes.....	35

II.2.2 Les biocapteurs.....	35
II.2.3 Les méthodes chromatographiques et électrophorétique.....	36
II.2.3.1 Les deux approches permettant la séparation des énantiomères..	37
II.2.3.2 Le sélecteur chiral.....	39
II.2.3.3 La reconnaissance chirale en méthodes séparatives.....	39
II.2.3.4 Classification des sélecteurs chiraux.....	41
II.2.3.4.1 Les sélecteurs conventionnels.....	42
II.2.3.4.1.1 Type I-A : Les sélecteurs de type Pirkle et analogues...	42
II.2.3.4.1.2 Type I-B : Les sélecteurs par échange de ligands.....	45
II.2.3.4.1.3 Type II: Les sélecteurs à cavités : cyclodextrines et éthers couronnes.....	45
II.2.3.4.1.3.1 Type II –A : Les cyclodextrines	45
II.2.3.4.1.3.2 Type II –B : Les éthers couronnes.....	48
II.2.3.4.1.4 Type III: Les polymères naturels et synthétiques.....	50
II.2.3.4.1.4.1 Type III : Les polymères naturels.....	50
II.2.3.4.1.4.2 Type III : Les polymères synthétiques.....	52
II.2.3.4.1.5 Type IV : Les protéines.....	53
II.2.3.4.1.6 Type V : les sélecteurs chiraux à base d'antibiotiques macrocycliques.....	54
II.2.3.4.2 Les sélecteurs chiraux sur mesure.....	55
II.2.3.4.2.1 Les sélecteurs chiraux à empreinte moléculaire.....	56
II.2.3.4.2.2 Les anticorps.....	57
II.2.3.4.2.3 L'approche combinatoire.....	59
II.2.3.4.2.3.1 Les sélecteurs à faible masse moléculaire.....	59
II.2.3.4.2.3.2 Les aptamères.....	63
Bibliographie.....	66

Chapitre III

L'ÉCHANGE DE LIGANDS EN SÉPARATION CHIRALE

I Introduction.....	83
II Principe de la chromatographie par échange de ligands.....	84
III Séparation chirale par échange de ligands en chromatographie liquide	84
III.1 Les sélecteurs chiraux en chromatographie chirale par échange de ligands immobilisés de manière covalente sur un support chromatographique.....	84
III.2 Les sélecteurs chiraux en chromatographie chirale par échange de ligands immobilisés de manière non covalente sur un support chromatographique.....	89
III.3 Les sélecteurs chiraux en chromatographie chirale par échange de ligands comme additifs de la phase mobile.....	94

III.4 Optimisation des conditions de séparation chirale par CCEL.....	95
III.4.1 Composition de la phase mobile.....	95
III.4.2 pH de la phase mobile.....	97
III.4.3 Nature et concentration du cation métallique.....	97
III.4.4 Nature des contre-ions du cation métallique utilisé.....	98
III.4.5 Température.....	99
III.4.6 Débit de la phase mobile.....	99
IV Séparation chirale par échange de ligand en électrophorèse capillaire.....	100
IV.1 Électrophorèse capillaire de zone	100
IV.2 Chromatographie électrocinétique micellaire.....	102
IV.3 Electrochromatographie.....	104
V Applications.....	106
VI Les aminoglycosides en chromatographie chirale d'échange de ligands	107
VI.1 Propriétés pharmacologiques et structurales.....	107
VI.2 Propriétés de complexation des cations métalliques par les aminoglycosides.....	108
VI.3 Utilisation des aminoglycosides en séparation chirale.....	110
VI.4 Les dérivés lipophiles de la néamine.....	110
Bibliographie.....	113

Chapitre IV

RESULTATS ET DISCUSSION

I Dérivés lipophiles de la néamine complexés au cuivre (II) en tant que sélecteurs chiraux en CLHP.

I.1 Publication N°1	128
“Complexes Cu(II)-dérivés lipophiles d'aminoglycosides pour la séparation énantiomérique d'acides aminés en chromatographie chirale par échange de ligands”	
I.2 Publication N°2	138
“Chromatographie chirale par échange de ligands utilisant le carbone graphite poreux modifié par des dérivés dinaphtyle de la néamine en tant que phase stationnaire pour la séparation des énantiomères d'acides aminés”	
I.3 Les dérivés dialkylés de la néamine complexés au cuivre (II) en tant que sélecteurs chiraux en CLHP	146

I.3.1 Introduction.....	146
I.3.2 Matériel et méthodes	146
I.3.2.1 Synthèse et caractérisation des dérivés dialkylés de la néamine.....	146
I.3.2.1.1 Synthèse de néamine 4', 5 di C ₁₈	147
I.3.2.1.2 Synthèse de néamine 3', 6 di C ₁₈	148
I.3.2.2 Procédure d'immobilisation.....	149
I.3.2.3 Appareillage.....	150
I.3.2.4 Réactifs.....	150
I.3.2.5 Conditions chromatographiques.....	151
I.3.3 Résultats et discussion.....	152
I.3.3.1 Les propriétés énantiosélectives de la PSC néamine 4', 5 di C ₁₈	152
I.3.3.2 Les propriétés énantiosélectives de la PSC néamine 3', 6 di C ₁₈	155
I.3.3.3 Proposition d'un mécanisme de reconnaissance chirale.....	159
I.3.3.4 Durée de vie et régénération des supports immobilisés avec le ligand chiral de type néamine 4', 5 di C ₁₈ et néamine 3', 6 di C ₁₈	160
I.3.4 Conclusion.....	160
Bibliographie.....	162

II Dérivés lipophiles de la néamine en tant que sélecteurs chiraux en électrophorèse capillaire.

II.1 Publication N° 3	163
"Enantioséparation par chromatographie électrocinétique micellaire via l'utilisation d'une phase pseudo-stationnaire chirale en échange de ligands"	

CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	170
--	------------

INTRODUCTION GENERALE

Les travaux de nombreux scientifiques, Biot, Pasteur, le Bel, Van't Hoff puis Lord Kelvin, au XIX^e siècle, ont conduit à démontrer l'existence de l'isomérisation et à dévoiler les secrets et les propriétés des molécules chirales.

Une molécule chirale est une molécule asymétrique qui existe sous deux formes non superposables et images l'une de l'autre dans un miroir. Ces deux entités sont nommées des énantiomères. Comprendre la chiralité a permis d'expliquer les différents phénomènes observés au niveau de la réactivité biologique. Un exemple tristement célèbre est celui du thalidomide, que je détaillerai dans le premier chapitre, qui a conduit à de nombreuses malformations irréversibles chez les nouveau-nés attribuées à l'usage du mélange racémique. Les autorités sanitaires et réglementaires prennent désormais de sérieuses précautions pour éviter de renouveler cette erreur en exigeant une documentation complète d'essais pharmacologiques, pharmacocinétiques et toxicologiques, tant sur le mélange racémique que sur chaque énantiomère pur.

Pour commercialiser un médicament chirale sous une forme énantiomériquement pure, il est donc impératif de contrôler la présence éventuelle de traces de l'autre énantiomère dans le lot de fabrication. Cette détermination exige des méthodes analytiques capables de répondre à ces objectifs. De nos jours, le nombre croissant de molécules pharmaceutiques, pour lesquelles la pureté énantiomérique doit être déterminée avant la poursuite de leur développement, incite l'industrie pharmaceutique à rechercher des méthodes d'analyse rapides basées sur des protocoles simples.

Actuellement, parmi les nombreuses méthodes de discrimination chirale, les techniques chromatographiques et électrophorétiques constituent des méthodes de choix pour la séparation et la quantification d'énantiomères. Deux approches distinctes sont utilisées pour résoudre des racémates en chromatographie liquide et en électrophorèse capillaire. L'approche indirecte consiste à dériver des énantiomères en diastéréoisomères. L'approche directe implique l'utilisation de sélecteurs chiraux soit dans la phase mobile (en chromatographie, additif chirale de la phase mobile : ACPM) ou dans le tampon de migration (méthode électrophorétique), soit immobilisés à la surface de la phase stationnaire (phases stationnaires chirales : PSCs). Jusqu'à présent, la plupart des séparations chirales ont été réalisées en mode direct. Un grand nombre de sélecteurs chiraux ont été découverts et utilisés avec succès. Plus de 100 PSCs sont disponibles commercialement avec le sélecteur chirale déposé, immobilisé ou greffé sur un gel de silice. La résolution des énantiomères sur ces phases est fonction de la différence de stabilité des complexes diastéréoisomériques formés

entre les énantiomères et le sélecteur chiral. Le processus de reconnaissance chirale est fondé sur différentes interactions entre l'énantiomère et la phase stationnaire telles que les liaisons hydrogène, les interactions π - π , les interactions dipôle-dipôle, l'effet hydrophobe, les interactions ioniques et les effets stériques.

Les sélecteurs chiraux ont été classés en deux grandes familles : les sélecteurs dits «conventionnels» (polysaccharides, glycopeptides, Pirkle, cyclodextrines et éther couronnes, protéines et les sélecteurs utilisés par échange de ligands) et les sélecteurs dits «sur mesure» (les polymères à empreinte moléculaire, les anticorps et les aptamères). Généralement, la découverte de nouveaux sélecteurs chiraux est motivée par le besoin croissant de séparer des molécules chirales, mais aussi et surtout de proposer un sélecteur ayant un domaine d'applications le plus vaste possible.

La séparation chirale par échange de ligands est une technique intéressante qui a été développée par Davankov en 1971. Elle repose sur la formation d'un complexe diastéréoisomérique entre un métal de transition, un ligand et un énantiomère.

Jusqu'à présent, seulement deux types de ligands ont été utilisés, à savoir les acides aminés ou dérivés et le chitosane. Ces sélecteurs présentent l'inconvénient de posséder un nombre limité de groupements réactifs pouvant être fonctionnalisés, ce qui représente un handicap pour moduler les interactions avec le support solide ou avec les énantiomères à séparer.

Les aminoglycosides de type néamine sont capables de complexer des cations métalliques. De plus, ils possèdent de nombreuses fonctions réactives qui peuvent être fonctionnalisées de façon à pouvoir les immobiliser.

L'objectif de ce travail a consisté à développer un nouveau type de sélecteur chiral à base d'aminoglycosides. La première partie de la thèse se focalisera sur un rappel bibliographique. Le premier chapitre rappellera les notions de chiralité et ses incidences biologiques et thérapeutiques. Le deuxième chapitre sera dédié aux différentes techniques utilisées pour obtenir des énantiomères purs et aux propriétés de différents sélecteurs chiraux utilisés en chromatographie et électrophorèse. Nous nous attacherons, dans le troisième chapitre, à étudier les aspects concernant l'échange de ligands et ses applications en séparation chirale. La deuxième partie de la thèse sera consacré au travail expérimental et sera présentée dans le chapitre IV en majorité sous forme d'articles scientifiques. La première partie de l'étude expérimentale portera sur le développement de nouvelles PSCs à partir de dérivés de la

Introduction générale

néamine synthétisés par l'équipe EMAN du Département de Pharmacochimie Moléculaire (DPM). La seconde partie du travail illustrera l'utilisation de ces dérivés en chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC).

Chapitre I

CHIRALITE ET INCIDENCES

I La reconnaissance chirale

La chiralité est une propriété inhérente à tous les systèmes biologiques et peut expliquer les différents phénomènes observés au niveau de leur réactivité.

Les propriétés biologiques varient fréquemment d'un énantiomère à l'autre. Ceci peut s'expliquer par le fait que la fixation des ligands aux récepteurs biologiques fait intervenir la configuration tridimensionnelle des molécules. Cette **reconnaissance chirale** a été expliquée en 1933 par Easson et Stedman [1] qui ont introduit la notion d'interaction en trois points pour expliquer les différences d'activité liées à la stéréochimie. Cette notion a été reprise plus tard par Ogston [2] et Dalglish [3].

Ce concept de reconnaissance chirale indique que les deux énantiomères ont des affinités différentes pour un même récepteur (ou enzyme). Cette affinité est basée sur un minimum de trois sites d'interaction entre le soluté et le récepteur. Le récepteur sera capable de différencier les deux énantiomères car un seul énantiomère aura une complémentarité satisfaisante et sera l'énantiomère actif appelé **eutomère**. L'autre énantiomère inactif, qui ne peut interagir qu'avec un ou deux groupements du récepteur, est appelé **distomère** (figure 1). De nombreux exemples sont décrits dans la littérature où une activité biologique donnée est essentiellement liée à un seul des deux énantiomères.

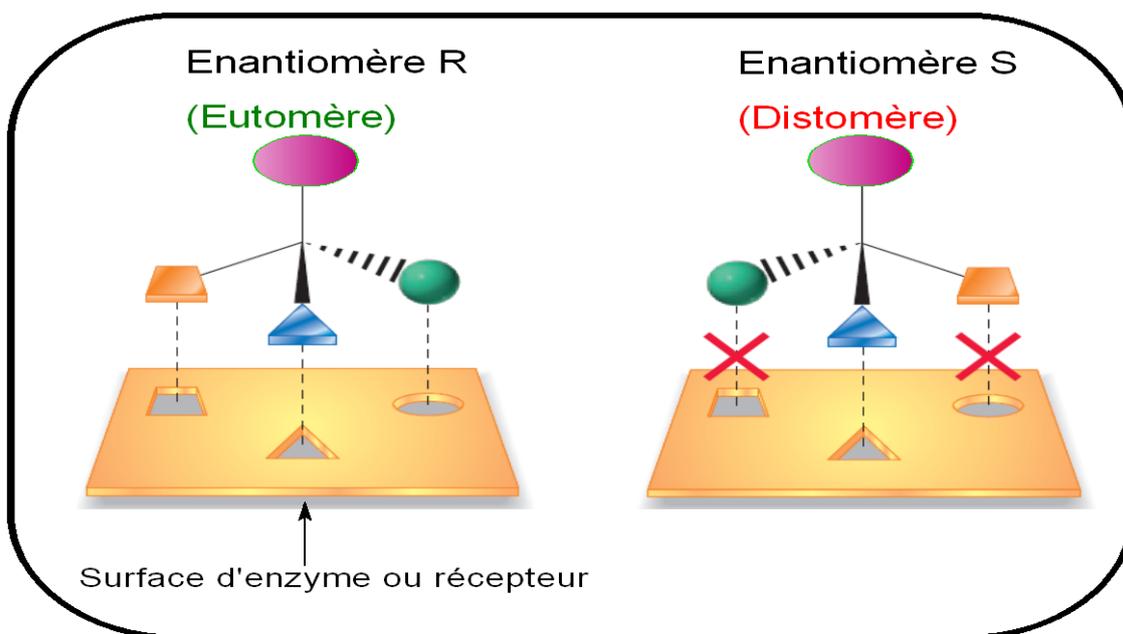


Figure 1 : Modèle de reconnaissance chirale [4].

II La chiralité et les acides aminés

Les acides aminés sont des molécules essentielles à la vie, ils jouent un rôle important, soit sous forme libre, soit assemblés en peptides ou protéines. Malgré la prédominance des acides aminés de la série L, on trouve également des acides aminés en série D à faible concentration dans les organismes vivants où ils peuvent jouer un rôle prépondérant en biochimie et en physiopathologie humaine [5]. Par exemple la D-sérine, un acide aminé synthétisé et libéré par les cellules gliales, est un puissant neuromodulateur [6]. L'aspartate en série D est impliqué dans le développement et les fonctions endocriniennes [7] et la D-arginine joue un rôle dans le cycle de l'urée. Plus récemment, l'alanine en série D a été détectée dans le pancréas au niveau des îlots de Langerhans et plus particulièrement au niveau des cellules β produisant l'insuline. Il a été suggéré que la D-alanine est impliquée dans la régulation de la glycémie [8].

Des différences de comportements des énantiomères des acides aminés sont également observées dans de nombreux domaines. A la mort de l'individu, les acides aminés présents au niveau des différents tissus et os ne sont pas renouvelés et les acides aminés en série L ont tendance à être transformés en acides aminés en série D par une transformation non enzymatique. Ainsi, en sciences médico-légales, le taux de racémisation de l'acide aspartique a été utilisé pour estimer l'âge des individus au moment du décès [9]. Il en est de même en archéologie où la mesure de la racémisation d'acides aminés spécifiques est utilisée pour la datation des fossiles.

Une autre application intéressante concerne la détermination de l'excès énantiomérique des acides aminés dans les météorites. Ainsi, Pizzarello et ses collaborateurs ont étudié les météorites de Murchison et de Murray, des météorites carbonées renfermant plusieurs acides aminés différents [10,11]. Ils ont ainsi trouvé un excès de l'énantiomère L pour certains acides aminés non protéiques allant de 2,8 à 9,2% pour la météorite de Murchison et de 1,0 à 6,0% pour la météorite de Murray.

Enfin, dans le domaine de l'agroalimentaire, le degré de racémisation ou le rapport énantiomérique des acides aminés est un paramètre fiable pour tester la qualité des produits alimentaires et pour vérifier leur conformité [12].

III La chiralité et l'environnement

De nombreux polluants tels que les produits agrochimiques, les pesticides comme les insecticides, les fongicides, les herbicides et les parasitocides sont des molécules chirales, dont

le mode d'action et les effets pathogènes (toxicité, effets mutagènes, carcinogènes ...) dépendent de leur configuration énantiomérique.

Dans de nombreux cas, l'activité herbicide est principalement liée à un isomère optique particulier, de sorte que l'on s'efforce de synthétiser ces produits sous forme d'énantiomères purs. Par exemple, l'énantiomère (R) du dichlorprop (acide 2-(2,4-dichlorophénoxy) propionique) (*figure 2*) possède des propriétés herbicides, alors que l'énantiomère (S) est inactif. Afin de diminuer la quantité d'herbicide employée et d'éviter la possibilité d'un impact défavorable de l'énantiomère inutile, plusieurs pays européens ont décrété que seul l'énantiomère R serait commercialisé comme herbicide.

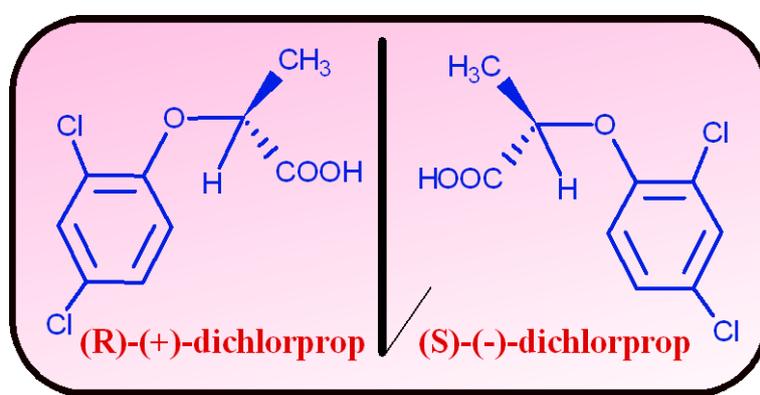


Figure 2 : Structure des énantiomères du dichlorprop [13].

À côté des principaux contaminants chimiques de l'environnement, on trouve divers médicaments sous forme initiale ou métabolisée. Diverses molécules actives sont consommées en quantité très importante dans notre société, comme les stéroïdes synthétiques (œstradiol, testostérone) [14], les β -bloquants (propranolol), les antidépresseurs (diazépam, amitriptyline), les analgésiques (ibuprofène, paracétamol, diclofénac), les antibiotiques (néomycine, chloramphénicol, tétracyclines...) [15,16], les hypolipémiants [17] (acide clofibrique, gemfibrozil) ...etc. Parmi ces groupes, on peut distinguer plusieurs médicaments chiraux (propranolol, ibuprofène, chloramphénicol, tétracyclines, néomycine ...) dont les énantiomères peuvent présenter des risques environnementaux non négligeables. En général, ces composés sont retrouvés dans la totalité des compartiments aquatiques de l'environnement [18, 19].

IV Incidences de la chiralité dans le domaine thérapeutique

IV.1 Introduction

Sur le plan thérapeutique, étant donné que la majorité des médicaments mis sur le marché possèdent au moins un centre de chiralité, il n'est donc pas étonnant d'observer des effets différents des énantiomères d'un médicament chiral, lorsque celui-ci est administré chez l'homme. De nombreux énantiomères présentent des propriétés pharmacocinétiques, pharmacodynamiques, une toxicité et une capacité de liaison aux protéines différentes. Pour cette raison, il faut considérer les énantiomères comme des substances distinctes.

L'exemple le plus dramatique est celui du thalidomide, qui a été synthétisé en 1954 par la firme pharmaceutique allemande Grünenthal, et commercialisée comme sédatif antiémétique et hypnotique non barbiturique, en Europe en octobre 1957, sous la forme d'un mélange racémique nommé Contergan® [20]. Ce médicament a été administré aux femmes enceintes parce qu'il avait une action rapide et montrait une faible toxicité à haute dose dans les études pharmacologiques, réalisées chez le rat [21].

Après quelques années de commercialisation, en 1961, les épidémiologistes ont noté un effet tératogène sur le développement fœtal créant une amélie ou une phocomélie induite par la capacité du médicament à inhiber l'angiogénèse, c'est-à-dire, à interférer avec le développement des vaisseaux sanguins du fœtus [22]. La molécule fût alors retirée du marché en 1965.

Des travaux ultérieurs ont permis de séparer les deux énantiomères de cette molécule [23] et d'étudier leurs propriétés biologiques. Ces études ont montré que l'activité tératogène néfaste était essentiellement due à l'énantiomère (S) [24] (figure 3).

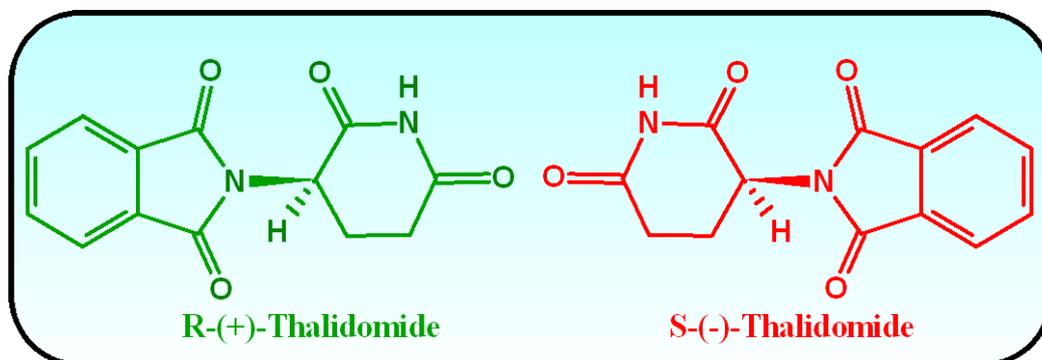


Figure 3 : Structure des énantiomères du thalidomide [25].

Cet épisode tragique a montré le risque potentiel de développer des médicaments chiraux sous forme de mélange racémique. C'est pourquoi, aujourd'hui les énantiomères d'une molécule pharmaceutiquement active sont considérés comme des entités différentes avec des propriétés pharmacologiques et toxicologiques distinctes.

IV.2 La chiralité et les médicaments [26]

Différents cas de figure peuvent se présenter au cours de l'étude des relations entre la chiralité et l'activité biologique d'un médicament. Bien qu'un médicament puisse présenter différents types d'isoméries, dans ce chapitre, seules les différences d'activités biologiques liées à des médicaments présentant un seul centre de chiralité seront abordées. Ainsi, différentes situations peuvent se présenter en fonction des activités pharmacologiques, pharmacocinétiques et toxicologiques des deux énantiomères.

IV.2.1 Enantiomères présentant qualitativement et quantitativement la même activité

Dans ce cas précis, la séparation a peu d'intérêt. Les énantiomères de la cocaïne, par exemple appartiennent à cette catégorie.

IV.2.2 Enantiomères présentant qualitativement le même type d'activité mais d'intensité différente

Lorsque deux énantiomères possèdent la même activité biologique mais d'intensité différente, le composé le plus actif correspond à celui dont l'affinité de fixation au site actif ou au récepteur est la plus forte et implique une interaction stéréosélective. Ainsi, l'énantiomère (R) de l'adrénaline a un effet vasoconstricteur plus important que l'isomère (S). Cette différence d'activité entre les deux énantiomères a été expliquée par la théorie d'Easson et Stedman, évoquée précédemment, envisageant trois points de contact pour l'antipode le plus actif. Ainsi, la meilleure activité de la (R)-adrénaline s'explique par une meilleure fixation de celle-ci au récepteur (3 sites de fixation : une interaction de Van der Waals pour le noyau benzénique, une liaison hydrogène pour l'hydroxyle et une interaction charge-charge de la fonction amine ionisée) par rapport à la (S)-adrénaline (2 sites d'ancrage) [1] (*figure 4*). Dans ce cas, la commercialisation de l'énantiomère le plus actif présente l'avantage de l'emploi d'une dose plus faible de principe actif.

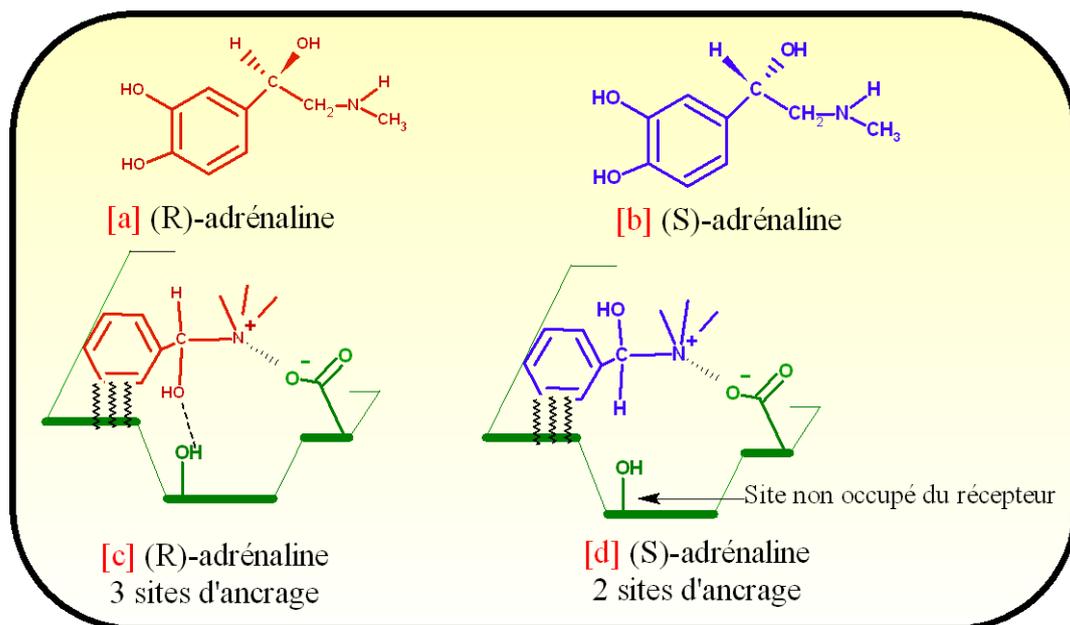


Figure 4 : Représentation des énantiomères de l'adrénaline (a et b) ainsi que leurs sites d'ancrage sur un récepteur (c et d) [26].

IV.2.3 Un des deux énantiomères est l'eutomère tandis que l'autre est inactif

Dans ce cas, la séparation d'un mélange racémique s'avère parfois peu intéressante. Dans le cas de l'ibuprofène, l'action antalgique et antirhumatismale est présente seulement chez l'énantiomère (S) et pourtant le racémique est utilisé. Ce choix peut s'expliquer par le fait que le composé (R)-ibuprofène n'est pas toxique et d'autre part, dans l'organisme, le composé lévogyre inactif subit une inversion chirale en composé dextrogyre actif.

Cependant, l'emploi exclusif d'un énantiomère peut se révéler intéressant dans la mesure où il épargne l'organisme de l'obligation de procéder à la métabolisation et à l'élimination de l'énantiomère inactif, diminuant ainsi les risques d'interactions médicamenteuses.

IV.2.4 Les deux énantiomères possèdent des activités biologiques différentes

Lorsque les énantiomères possèdent des propriétés pharmacologiques différentes, l'usage du mélange racémique peut être maintenu si leurs effets sont bénéfiques sur le plan thérapeutique. En revanche dans le cas de la lévothyroxine, la séparation des énantiomères a un intérêt économique puisqu'elle permet d'accéder à deux médicaments distincts ayant des activités thérapeutiques différentes. En effet, la lévothyroxine, l'hormone thyroïdienne physiologique, est commercialisée pour traiter des patients souffrant d'hypothyroïdie alors que la dextrothyroxine permet le traitement de patients atteints d'hypercholestérolémie.

IV.2.5 Un des deux énantiomères est l'eutomère tandis que l'autre est toxique

Lorsque l'un des deux antipodes est toxique, la séparation des énantiomères s'avère obligatoire pour ne retenir que l'énantiomère actif non toxique, grâce à la mise en œuvre du dédoublement du racémique ou par une méthode de séparation énantiosélective et de purification appropriée. Cependant, même en cas d'utilisation d'un énantiomère pur, il convient toujours d'être prudent et de ne pas exclure la possibilité d'une racémisation métabolique possible, se traduisant par l'apparition éventuelle d'une toxicité ou d'effets secondaires inattendus. L'usage d'un antipode actif, dont l'énantiomère est toxique, nécessite donc une étude préliminaire, démontrant la non-isomérisation métabolique du principe actif en son énantiomère toxique ainsi que la non-formation de métabolites toxiques.

Ainsi, dans le cas du thalidomide décrit précédemment, des études ont montré que l'énantiomère (S) était responsable des effets tératogènes. Cependant, des études portant sur les métabolites du thalidomide ont été réalisées indiquant que les malformations fœtales observées étaient plus précisément liées au métabolite hydroxylé de l'énantiomère (S) (*figure 5*) [27, 28].

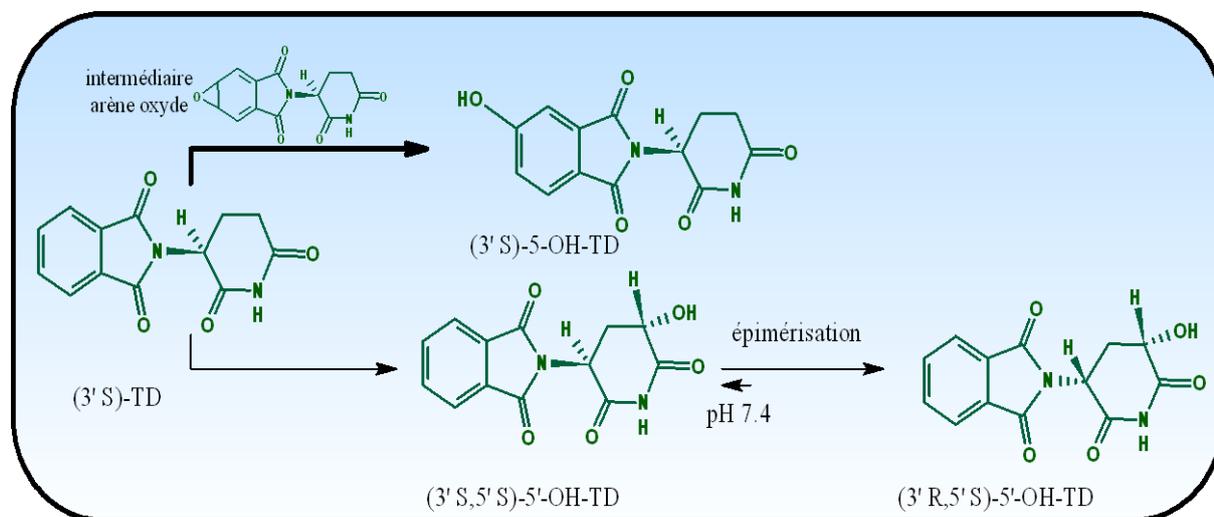


Figure 5 : Représentation des métabolites du (S)-thalidomide (TD). Le métabolite majoritaire est représenté par une flèche plus épaisse [28].

V Chiralité et propriétés pharmacocinétiques

Les propriétés pharmacocinétiques des énantiomères d'un médicament, l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination (ADME) peuvent être fort différentes.

La stéréosélectivité de l'absorption est associée au transport actif, processus impliquant l'interaction de composés chimiques avec des protéines de transport. Bien que l'absorption et le transport gastro-intestinal peuvent être considérés comme étant pratiquement identiques, des différences de fixation à des protéines de transport entre les énantiomères sont observées. C'est le cas par exemple de la DOPA, un antiparkinsonien. La L-DOPA est transportée à travers les membranes par une protéine de transport alors que l'énantiomère D ne l'est pas. Le passage intestinal de la L-DOPA est par conséquent plus rapide [29,30].

La stéréosélectivité de la distribution est associée à la fixation aux protéines plasmatiques qui peut être différente selon l'énantiomère. C'est le cas, par exemple des isomères du propranolol. La fixation de l'énantiomère lévogyre sur ces protéines est plus importante que celle de l'antipode dextrogyre [31].

De même, les enzymes peuvent agir différemment sur chaque énantiomère et conduire à la formation de métabolites différents. Le métabolisme du (S)-(-)-propranolol, par exemple, conduisant à la formation d'un glucuronide et à l'oxydation de la chaîne latérale, est plus rapide que celui de l'antipode dextrogyre. Il convient d'étudier les activités propres de chaque métabolite car le métabolisme stéréosélectif peut entraîner des problèmes de toxicité (cas du thalidomide évoqué précédemment).

Enfin, des différences de vitesse d'élimination des énantiomères et de leurs métabolites correspondants peuvent se présenter et induire des conséquences sur le plan thérapeutique. En effet, une accumulation de l'un des énantiomères, et par conséquent de ses métabolites, peut donner lieu à des interactions médicamenteuses pouvant s'avérer dangereuses.

VI Chiralité et affaires réglementaires

A la suite de l'évènement dramatique du thalidomide, des répercussions profondes sur l'industrie pharmaceutique sont apparues, mettant l'accent sur la prudence nécessaire à la commercialisation d'un médicament racémique. Ainsi, les autorités réglementaires en Europe, au Japon et aux Etats-Unis (Food and Drug Administration (FDA)) ont fourni des directives concernant la mise sur le marché d'un médicament. En tout état de cause, les règles établies pour les principes actifs non chiraux s'appliquent également aux énantiomères. Par ailleurs, des indications doivent être fournies sur les propriétés pharmacologiques, pharmacocinétiques et toxicologiques de chaque énantiomère et du racémique, l'inversion chirale éventuelle de l'énantiomère d'une forme à l'autre doit être également étudiée *in vitro* et *in vivo*. Dans tous les cas, l'industriel doit justifier de l'intérêt de l'emploi du racémique ou d'un énantiomère pur.

VII Chiralité et intérêt économique

Les firmes pharmaceutiques sont maintenant dans l'obligation de fournir aux patients des composés énantiomériquement purs, à moins que l'on ne prouve que l'autre isomère optique est sans danger. Pour cette raison, la demande en produits chiraux, souvent sous la forme d'un seul énantiomère, a augmenté de façon considérable ces dernières années.

Cette demande est stimulée par deux facteurs principaux :

- Les deux énantiomères d'un composé chiral peuvent présenter des activités biologiques drastiquement différentes.
- La deuxième raison est purement commerciale car la commercialisation de médicaments sous forme énantiopure a donné naissance à une nouvelle tendance appelée « chiral switching ». Cette tendance consiste à développer les énantiomères purs de molécules chirales et à réévaluer les anciens médicaments racémiques afin d'estimer les éventuels bénéfices du passage du racémate à l'énantiomère pur.

Les entreprises pharmaceutiques remplacent ainsi un produit racémique efficace arrivant en fin de brevet par sa nouvelle version énantiomériquement pure. Ceci a pour effet d'éviter ou de minimiser la compétition avec les médicaments génériques [32].

De plus, la procédure d'enregistrement de l'énantiomère est simplifiée puisqu'une grande part des données du racémate est utilisée. L'énantiomère devient ainsi une nouvelle entité chimique, couverte par une protection de brevet plus importante. Cependant, la majorité de ces substances ne sont pas innovantes puisqu'il s'agit de l'eutomère du mélange racémique déjà commercialisé. Un exemple bien connu de chiral switching est celui de l'oméprazole (Antra®), un anti-ulcéreux inhibiteur de la pompe à protons enregistré à la fin des années 1980. Alors qu'il était en tête des ventes des médicaments sur ordonnance dans les années 2000, ce qui le rendait idéal pour les firmes de génériques, AstraZeneca a introduit, avant expiration du brevet, l'ésoméprazole (Nexium®), l'énantiomère S de l'oméprazole.

Une poussée économique spectaculaire a été observée au niveau de la commercialisation des médicaments énantiopurs à la place des mélanges racémiques (*figure 6*).

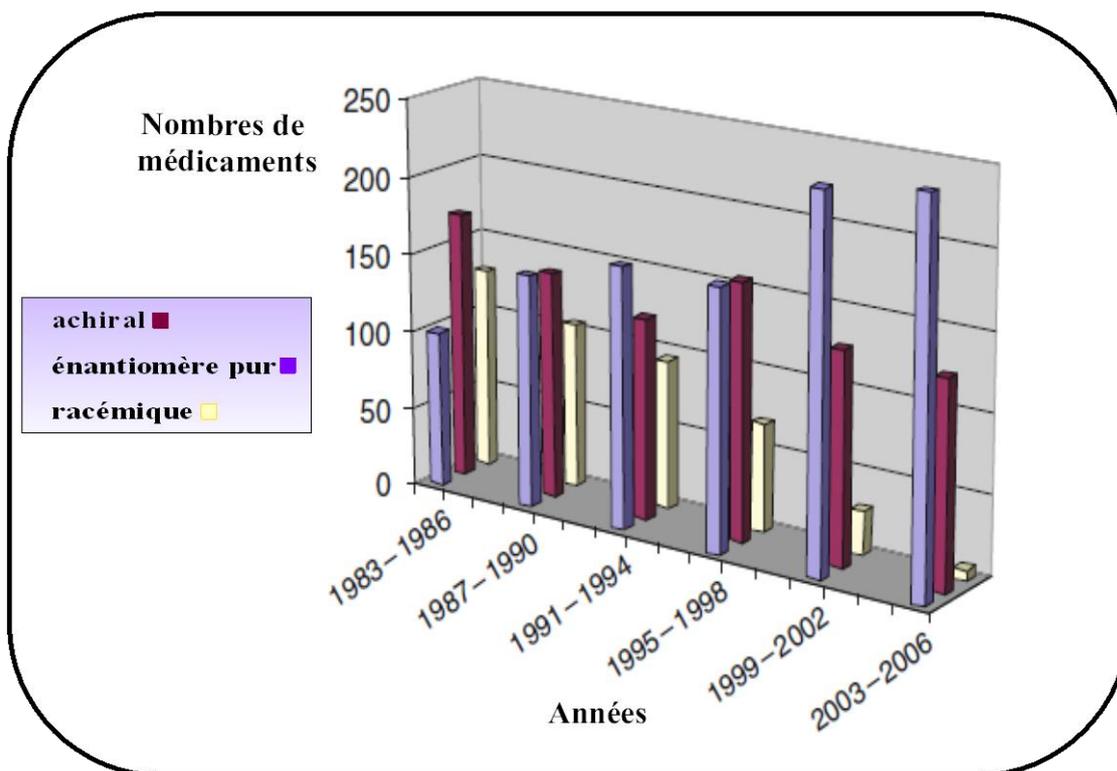


Figure 6 : Représentation de la distribution des médicaments approuvés à travers le monde en fonction de leurs propriétés chirales entre 1983-2006 [33].

Environ 300 milliards de dollars ont été dépensés dans le monde entier pour la commercialisation des médicaments en 1997 et environ 28% de cette somme a concerné un seul énantiomère [34]. En fait, parmi les dix médicaments les plus vendus dans le monde actuellement, neuf contiennent un principe actif chiral. Le marché des molécules commercialisées sous la forme d'un unique énantiomère représentait près de 9 milliards \$ en 2004 [35].

La chiralité joue donc un rôle fondamental dans différents domaines, et tout particulièrement dans celui de la pharmacie, tant au point 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. Celles-ci seront présentées dans le chapitre suivant.

Bibliographie

1. Easson L. H. and Stedman E., "*Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action: Molecular dissymmetry and physiological activity*", Biochemical Journal, **1933**, 27, 1257-0.
2. Ogston A. G., "*Interpretation of experiments on metabolic processes, using isotopic tracer elements*", Nature, **1948**, 162, 963.
3. Dalgliesh C. E., "*The optical resolution of aromatic amino acids on paper chromatograms*", Journal of the Chemical Society, **1952**, 137, 3940-3952.
4. Bruice P. Y., "*Organic Chemistry, Fourth Edition*", **2003**, Prentice Hall, pp.182-237.
5. Fuchs S. A., Berger R., Klomp L. W. J. and De Koning T. J., "*D-Amino acids in the central nervous system in health and disease*", Molecular Genetics and Metabolism, **2005**, 85, 168-180.
6. Schell M. J., Molliver M. E. and Snyder S. H., "*D-Serine, an Endogenous Synaptic Modulator: Localization to Astrocytes and Glutamate-Stimulated Release*", Proceedings of the National Academy of Sciences, **1995**, 92, 3948-3952.
7. Hashimoto A. and Oka T., "*Free -aspartate and -serine in the mammalian brain and periphery*", Progress in Neurobiology, **1997**, 52, 325-353.
8. Morikawa A., Hamase K., Ohgusu T., Etoh S., Tanaka H., Koshiishi I., Shoyama Y. and Zaitso K., "*Immunohistochemical localization of D-alanine to beta-cells in rat pancreas*", Biochemical and Biophysical Research Communications, **2007**, 355, 872-876.
9. Lubec G. and Lubec B., "*Racemization rates of amino acids for dating ancient samples*", Amino Acids, **1993**, 4, 1-3.
10. Cronin J. R. and Pizzarello S., "*Enantiomeric Excesses in Meteoritic Amino Acids*", Science, **1997**, 275, 951-955.
11. Pizzarello S. and Cronin J. R., "*Non racemic amino acid in the Murchison and Murray meteorites*", Geochimica Cosmochimica Acta, **2000**, 64, 329-338.
12. Marchelli R., Dossena A. and Palla G., "*The potential of enantioselective analysis as a quality control tool*", Trends in Food Science & Technology, **1996**, 7, 113-119.
13. <http://www.epa.gov/athens/research/process/chiralchemistry.html>.
14. Aboul-Enein H. Y. and Ali I., "*Chiral Pollutants: Distribution, Toxicity and Analysis by Chromatography and Capillary Electrophoresis*", **2004**, John Wiley & Sons Ltd, pp.75-108.

15. Shore L.S., Gurevich M. and Shemesh M., "*Estrogen as an environmental pollutant*" Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, **1993**, 51, 361–366.
16. Heberer T., "*Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data*", Toxicology Letters, **2002**, 131, 5–17.
17. Metcalfe C.D., Koenig B.G., Bennie D.T., Servos M., Ternes T.A. and Hirsch R., "*Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluent of canadian sewage treatment plants*", Environmental toxicology and chemistry, **2003**, 22, 2872-2880.
18. Farré M., Ferrer I. and Ginebreda A., "*Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with vibrio fischeri*", Journal of Chromatography A, **2001**, 938, 187-97.
19. Heberer T., "*Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water*", Journal of Hydrology, **2002**, 266, 175-189.
20. Zwingenberger K. and Wnendt S., "*Immunomodulation by thalidomide: systematic review of the literature and of unpublished observations*", Journal of inflammation, **1995-96**, 46, 177-211.
21. D'Arcy P. and Griffin J., "*Thalidomide revisited*", Adverse Drug Reaction Toxicology Review, **1994**, 13, 65-76.
22. McBride W.G., "*Thalidomide and congenital anomalies*", Lancet, **1961**, 2, 1358.
23. Shealy Y. F., Opliger C. E. and Montgomery J. A., "*Synthesis of D- and L-thalidomide and related studies*", Journal of Pharmaceutical Sciences, **1968**, 57, 757-764.
24. Ockenfels H. and Köhler F., "*The L-isomer as teratogenic principle of N-phthalyl-DL-glutamic acid*", Experientia, **1970**, 26, 1236-7.
25. Bartlett J.B., Dredge K. and Dalgleish A.G., "*The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents*", Nature Reviews Cancer, April **2004**, 4, 314-322.
26. Kirkiacharian S., "*Chiralité et médicaments*", Techniques de l'ingénieur, **2005**, 1, 3340.
27. Knoche B. and Blaschke G., "*Stereoselectivity of the in vitro metabolism of thalidomide*", Chirality, **1994**, 6, 221-224.
28. Meyring M., Muhlbacher J., Messer K., Kastner-Pustet N., Bringmann G., Mannschreck A. and Blaschke G., "*In Vitro Biotransformation of (R)- and (S)-Thalidomide: Application of Circular Dichroism Spectroscopy to the Stereochemical Characterization of the Hydroxylated Metabolites*", Analytical Chemistry, **2002**, 74, 3726-3735.

29. Dess P.J.V. and Fleishaker J., *"Development of chiral compounds, in Pharmacokinetics in drug development: regulatory and developmental paradigms"*, (Bonate P., Howard D., eds.), **2004**, vol 2, AAPS press, pp.305-339.
30. Claverie I. and Hedde H., *"Pharmacologie générale-Toxicologie : Mécanismes fondamentaux"*, **2008**, 2^e édition, pp.13-27.
31. Lalonde R. L., Tenero D. M., Burlew B. S., Herring V. L. and Bottorff M. B., *"Effects of age on the protein binding and disposition of propranolol stereoisomers"*, Clinical Pharmacology and Therapeutics, **1990**, 47, 447-455.
32. Desmeules J., *"Miroir, miroir dis-moi lequel de nous deux..."*, Pharma-Flash, **2006**, 33, 7-10.
33. Berthod A., *"Chiral Recognition Mechanisms in Enantiomers Separations: A General View, in Chiral Recognition in Separation Method: Mechanisms and Applications"*, (A. Berthod, ed.), **2010**, Springer, pp.1-32.
34. Stinson S.C., *"Counting on chiral drugs"*, Chemical and Engineering News, **1998**, 76, 83-104.
35. Rouhi A. M., *"Chiral chemistry"*, Chemical and Engineering News, **2004**, 82, 47-62.

Chapitre II

TECHNIQUES UTILISEES POUR L'OBTENTION D'ENANTIOMERES PURS

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 préparative.

Les méthodes pour obtenir des énantiomères purs peuvent être classées en deux principales catégories, synthèse asymétrique et résolution de racémiques [1-3]. La première catégorie est basée essentiellement sur une approche chirale incluant des synthèses énantiosélectives en utilisant des synthons et auxiliaires chiraux, des enzymes ou des processus catalytiques énantiosélectifs. La deuxième catégorie est une approche racémique et, dans ce cas là, les énantiomères sont obtenus par la discrimination de diastéréoisomères (cristallisation, membranes, biocapteurs ou méthodes électrophorétiques et chromatographiques) [1,4].

I La synthèse asymétrique

La voie royale pour obtenir des composés chiraux purs est la synthèse directe de l'énantiomère (synthèse asymétrique) sans passer par l'intermédiaire d'un racémique et par l'élimination de l'une des deux formes.

En 1904, Marckwald a donné une définition des synthèses asymétriques qui reste d'actualité : « *Les synthèses asymétriques sont celles qui, à partir de corps de structure symétrique et en utilisant intermédiairement des substances optiquement actives, mais sans faire intervenir aucun processus analytique, conduisent à des produits optiquement actifs* » [5].

Ainsi, la synthèse asymétrique consiste à préparer un produit sous forme d'un énantiomère en partant d'une matière première achirale. Cette transformation nécessite l'aide d'un auxiliaire chiral qui est temporairement lié au substrat, à un réactif ou à un catalyseur. L'auxiliaire chiral, employé en quantité stoechiométrique par rapport au substrat, transforme directement le substrat achiral en l'énantiomère désiré.

La première synthèse asymétrique industrielle a été la préparation de la L-DOPA, en 1975, par W. S. Knowles (prix nobel en 2001) en utilisant un catalyseur chiral (*figure 1*). Ce dernier est un complexe de rhodium ayant une phosphine chirale (dipamp) comme ligand chélatant. La L-DOPA a ensuite été commercialisée comme médicament antiparkinsonien par la société Hoffmann-La-Roche.

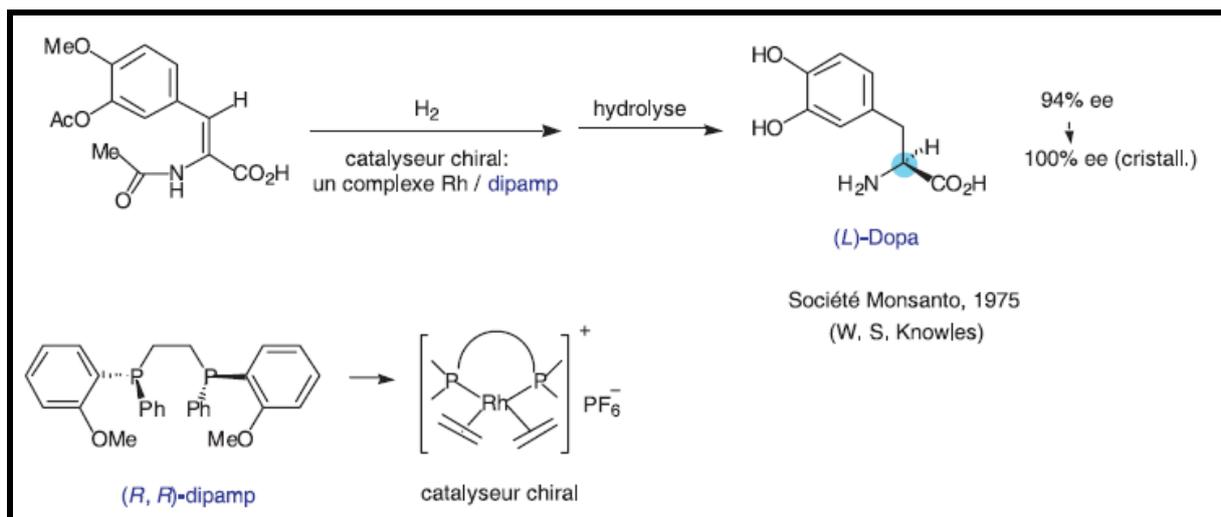


Figure 1 : Synthèse asymétrique industrielle de la L-DOPA [6].

La synthèse asymétrique a connu au cours de ces dernières années, un développement considérable et a donné lieu à de nombreuses applications industrielles telles que la synthèse des acides aminés, des antibiotiques, des phéromones, du menthol... Cependant, le développement de la synthèse asymétrique est à la fois coûteux et long à mettre en place.

II Résolution des racémiques

La résolution des racémiques a toujours été considérée comme l'un des problèmes les plus difficiles en chimie.

Deux aspects coexistent :

- La séparation chirale analytique lorsqu'il s'agit de caractériser la pureté énantiomérique d'un composé ou de suivre le devenir du mélange racémique, par exemple dans une métabolisation.
- La séparation chirale préparative pour obtenir des énantiomères de grande pureté optique lorsque la synthèse énantiosélective fait défaut.

Plusieurs méthodologies ont été utilisées pour résoudre les mélanges racémiques. Ces différentes techniques peuvent être divisées en deux catégories : les **méthodes classiques**, regroupant les méthodes de biotransformations et la cristallisation et les **technologies « plus modernes »** comprenant les méthodes par membranes chirales, les biocapteurs, les méthodes chromatographiques et électrophorétiques ainsi que les méthodes spectroscopiques qui ne seront pas abordées (*figure 2*) [7].

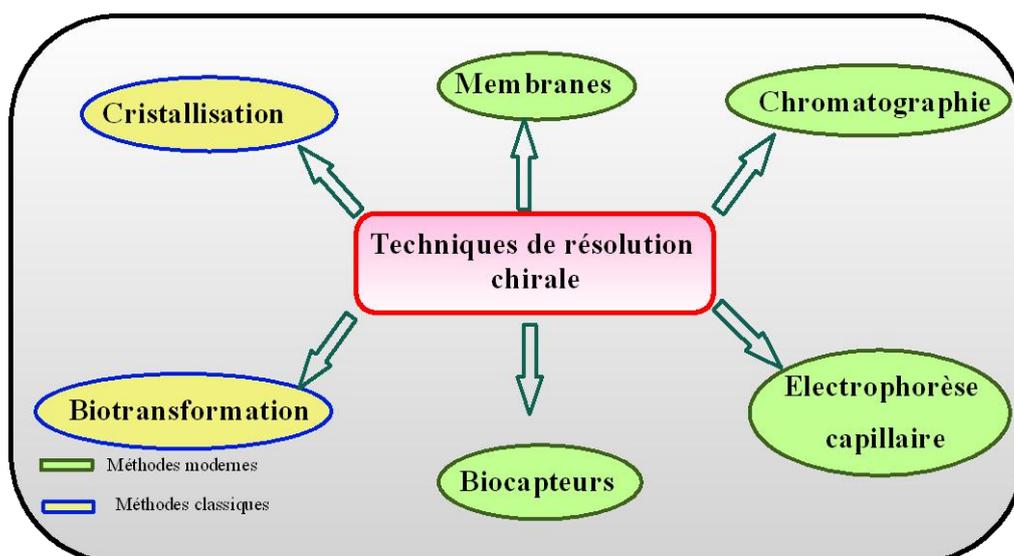


Figure 2 : Les différentes techniques de résolution chirale.

II.1 Méthodes classiques

La résolution du racémique peut être une résolution enzymatique (ou biotransformation). Les **réactions de biotransformation** mettent en oeuvre les propriétés catalytiques hautement énantiosélectives des enzymes pour un substrat. En effet, les enzymes ne reconnaissent qu'un des deux énantiomères proposés. Un exemple illustrant ce phénomène est l'observation de Pasteur, en 1858, lequel avait constaté que lorsque la moisissure *Penicillium glaucum* était ajoutée à une solution de tartrate de sodium et d'ammonium, la solution devenait lévogyre, la forme dextrogyre étant sélectivement détruite en solution. Une solution énantiomériquement pure est ainsi obtenue. Mais, il n'est pas toujours aisé de trouver l'enzyme la plus appropriée à un substrat. De plus, le succès d'une technologie enzymatique demeure lié à divers facteurs environnementaux (pH et taux d'oxygène dissous). Ainsi ces différents inconvénients constituent souvent un obstacle à l'essor des opérations enzymatiques, notamment à l'échelle industrielle.

La deuxième méthode classique est la cristallisation dont le principe repose sur la formation de sels de diastéréoisomères, formés par réaction entre les énantiomères et un réactif optiquement pur. Les diastéréoisomères obtenus possèdent des propriétés physico-chimiques différentes et peuvent donc cristalliser sélectivement [8]. Malheureusement, cette technique présente plusieurs inconvénients : mise en oeuvre longue, nécessité de posséder un réactif de très grande pureté énantiomérique, racémisation possible du centre chiral (soit au niveau du composé lui-même, soit au niveau du réactif). De plus, le composé chiral doit posséder un groupement fonctionnel permettant la dérivation [9].

Pour toutes ces raisons, les analystes se sont tournés vers des techniques de séparation dites « modernes ».

II.2 Méthodes "modernes"

II.2.1 Les membranes

La technique de discrimination chirale par des membranes a été explorée il y a une quinzaine d'années [10,11] et peut être divisée en deux catégories : soit la séparation est « directe » sur une membrane « intrinsèquement » énantiosélective, c'est le cas des polymères énantiosélectifs, soit la séparation se produit par l'intermédiaire d'une membrane non-sélective assistant le processus énantiosélectif, c'est le cas des membranes liquides comportant un transporteur chiral [12]. Les membranes liquides sont les plus courantes, elles comportent généralement une phase organique prise en sandwich entre deux solutions aqueuses. Une des solutions aqueuses contient le mélange racémique à séparer, la phase organique contient le transporteur chiral qui est insoluble dans les deux phases aqueuses. Les énantiomères diffusent, à partir de la solution aqueuse de départ, à travers la membrane liquide organique jusqu'à la solution aqueuse receveuse. A l'interface entre la solution aqueuse de départ et la phase organique, chaque énantiomère forme un complexe avec le transporteur chiral. La constante d'équilibre de formation du complexe ainsi que la diffusion des complexes diastéréoisomériques peuvent être différentes, ce qui peut mener à des vitesses différentes de transport des énantiomères à travers la phase organique et donc à la résolution du mélange racémique initialement présent dans un compartiment. Les membranes liquides peuvent également être formées par une phase aqueuse, contenant un transporteur chiral hydrophile, pris en sandwich entre deux solutions organiques [13].

Cette technique de séparation d'énantiomères présente un grand intérêt dans le domaine industriel car elle permet la séparation de mélanges racémiques en grande quantité et avec une bonne pureté énantiomérique [14].

II.2.2 Les biocapteurs

D'une manière générale, un biocapteur est constitué d'une membrane qui comprend une espèce d'origine biologique (enzyme, anticorps, récepteur...), permettant la reconnaissance moléculaire et d'un transducteur chargé de convertir le signal biologique (fixation d'un ligand sur un récepteur) en un signal physique (électrique ou lumineux par exemple) mesurable et aisément exploitable (*figure 3*).

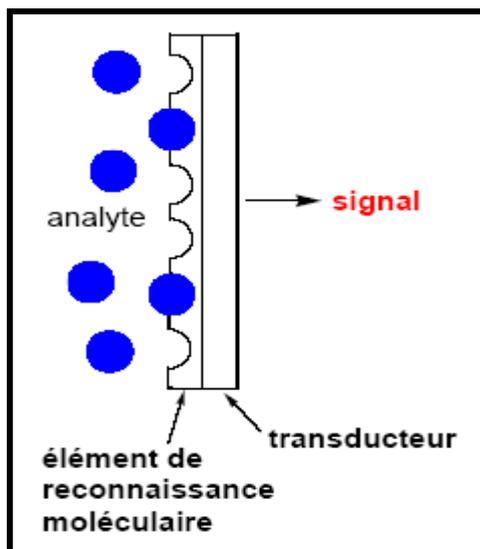


Figure 3 : Principe de fonctionnement d'un biocapteur [23].

Dans la littérature, de nombreux exemples ont été cités sur l'application de biocapteurs en analyse énantiosélective. Ces biocapteurs font intervenir de nombreux sélecteurs chiraux. Nous pouvons citer sans être exhaustifs, les cyclodextrines [15], les antibiotiques macrocycliques [16], les éthers couronnes [17] et les aptamères [18,19]. Le mode de fonctionnement de ces sélecteurs chiraux sera décrit ultérieurement.

II.2.3 Les méthodes chromatographiques et électrophorétiques

De part leur simplicité, sensibilité et robustesse, la chromatographie et l'électrophorèse capillaire (EC) sont deux techniques qui remportent le plus de succès dans le domaine de la discrimination chirale [12]. Elles ont notamment prouvé leur efficacité lors de la séparation des énantiomères de produits pharmaceutiques, phytosanitaires et agroalimentaires.

Parmi les techniques chromatographiques employées pour la séparation chirale, on peut citer la chromatographie liquide haute performance (CLHP) [20–22], la chromatographie sur couche mince (CCM) [26–28], la chromatographie en phase gazeuse (CPG) [29] et la chromatographie en phase supercritique (CPS) [30-32]. La chromatographie en phase liquide (CLHP) est de loin la plus utilisée.

Le principe de fonctionnement de la chromatographie repose sur des différences de distribution des solutés entre deux phases (la phase mobile et la phase stationnaire) non

miscibles, ce qui se traduit au niveau macroscopique par une différence de vitesse de migration des différents constituants du mélange.

La CLHP représente une technique de choix pour la quantification des énantiomères. On peut estimer qu'environ 90% des séparations chirales se font par CLHP [7] et de nombreux sélecteurs chiraux sont disponibles [41,7]. La séparation chirale sur PSCs peut être développée en utilisant trois modes chromatographiques différents : en phase normale, en polarité de phase inversée et en mode organique polaire.

Dans les années 1990, les techniques électrophorétiques modernes ont connu un véritable essor pour la séparation des énantiomères [33–40]. L'électrophorèse capillaire de zone (CZE), la chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC) et l'isotachophorèse sont devenues les outils les plus performants. Ceci tient à la fois à la souplesse 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.

Par ailleurs l'EC offre de nombreux moyens d'inverser l'ordre d'élution des énantiomères par comparaison avec les méthodes chromatographiques. Il est possible de :

- Changer la chiralité du sélecteur (sélecteurs synthétiques) [44].
- Changer l'ionisation du sélecteur chiral, en changeant le pH du tampon de migration [45-47]. Par exemple, la direction de migration du complexe diastéréoisomérique formé est différente suivant que le sélecteur est chargé ou neutre.
- Eliminer ou inverser le flux électroosmotique (FEO), ce qui a également comme conséquence l'inversion de migration des énantiomères [45, 48].
- Augmenter la concentration du sélecteur chiral ce qui peut produire une inversion ou une disparition du FEO [49].

II.2.3.1 Les deux approches permettant la séparation des énantiomères

Généralement deux approches permettent la séparation des énantiomères par la formation de diastéréoisomères :

a) Approche indirecte par formation de diastéréoisomères covalents

L'approche indirecte implique la formation avant l'injection (dérivation pré-colonne), de diastéréoisomères avec un réactif chiral (ou agent chiral) de haute pureté énantiomérique et

leur séparation ultérieure au moyen de méthodes chromatographiques ou électrophorétiques achirales moins coûteuses.

Les énantiomères à séparer doivent posséder un groupement fonctionnel permettant la dérivation et cette dérivation doit être réalisée près du centre de chiralité ce qui permet une augmentation de la différenciation physico-chimique entre les diastéréoisomères [7].

L'avantage de cette approche est la prédétermination de l'ordre d'éluion ce qui facilite la détermination de la pureté optique. De plus, elle permet parfois d'améliorer simultanément la sensibilité d'une méthode car il est possible d'ajouter un groupement fluorophore, par exemple, qui pourrait améliorer la détection globale du composé par fluorimétrie. Cependant, cette méthode présente un certain nombre de limitations. Elle est limitée aux molécules possédant des groupements fonctionnels permettant la dérivation (amines, alcools, acides, etc), elle nécessite des agents chiraux de très bonne pureté et, pour une application préparative, une étape synthétique additionnelle est nécessaire pour éliminer l'agent de dérivation chiral.

Aujourd'hui, ces approches analytiques indirectes sont en déclin face au développement de nombreux sélecteurs chiraux capables de séparer, directement, différents énantiomères sans la nécessité d'agents de dérivation.

b) Approche directe par formation de diastéréoisomères labiles

L'analyse directe des énantiomères sans dérivation préalable est de plus en plus répandue. Cette méthodologie consiste en la formation de diastéréoisomères labiles. Les sélecteurs chiraux sont utilisés soit dans la phase mobile (ACPM) ou dans le tampon de migration, ou ils peuvent être liés chimiquement ou adsorbés sur un support solide convenable (PSC).

L'ACPM est une approche plus coûteuse nécessitant une plus grande quantité de sélecteur chiral. D'autre part, l'utilisation de sélecteurs chiraux, absorbant dans l'ultraviolet (UV), peut compromettre la sensibilité de la méthode. La séparation d'énantiomères sur des phases stationnaires chirales est par conséquent la méthode de choix en chromatographie.

En électrophorèse capillaire, l'approche « directe », utilisant le sélecteur chiral dissous dans le tampon de migration, est la méthode la plus couramment utilisée. L'utilisation de capillaires remplis par des phases stationnaires chirales se fait en électrochromatographie. Cette technique est une méthode hybride entre l'électrophorèse capillaire et la chromatographie liquide.

Nous insisterons essentiellement sur les séparations chirales directes au moyen de PSCs, étant donné leur plus grand intérêt pratique et la plus grande diversité des sélecteurs chiraux qui y sont retrouvés.

II.2.3.2 Le sélecteur chiral

Le sélecteur chiral est une espèce ayant une affinité préférentiellement plus élevée vers l'un des énantiomères d'un mélange racémique.

De nombreux composés optiquement actifs (naturels, semi-synthétiques ou synthétiques) ont été développés en tant que sélecteurs chiraux pour la séparation d'énantiomères.

Toutefois, pour qu'un sélecteur chiral soit intéressant, il doit répondre à certains critères [12,51] :

- 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 ne doit pas interférer avec la détection des analytes, s'il est utilisé comme additif de la phase mobile ou du tampon de migration.
- Il doit être soluble et chimiquement stable dans les conditions d'analyse (température, pH, solvant...), en tant qu'additif dans la phase mobile ou dans le tampon de migration.

II.2.3.3 La reconnaissance chirale en méthodes séparatives

Le phénomène de reconnaissance chirale en chromatographie ou en électrophorèse capillaire repose sur le principe décrit précédemment de la reconnaissance ligand-récepteur (*figure 4*).

Le premier modèle de reconnaissance chirale a été proposé par Dalglish [52] puis modifié par Pirkle [53]. Il suppose l'existence d'un minimum de trois points d'interaction entre le soluté et le sélecteur. Ces interactions, déterminées par la composition chimique de ces deux protagonistes, peuvent être attractives ou répulsives [54]. Ce modèle autorise deux

interactions pour chaque énantiomère, la troisième, de nature stéréosélective, est possible seulement pour l'un d'entre eux.

Les interactions pouvant participer au processus de discrimination chirale peuvent être des attractions ou répulsions coulombiennes, des liaisons hydrogène, des effets hydrophobes, des encombrements stériques, des phénomènes d'inclusion dans des cavités, des transferts de charges, des interactions π - π , et des interactions dipôle-dipôle.

Ainsi, ce modèle de reconnaissance chirale, simplifié, a le mérite d'expliquer le fonctionnement de la plupart des sélecteurs chiraux utilisés en séparation chirale à l'exception des polymères. En effet, lorsque la PSC est un polymère, il convient d'ajouter aux interactions attractives et répulsives classiques, un phénomène de reconnaissance qui tient compte de la géométrie globale du soluté. Ainsi ce mécanisme de reconnaissance est comparable au processus de reconnaissance enzymatique de type clef-serrure [9].

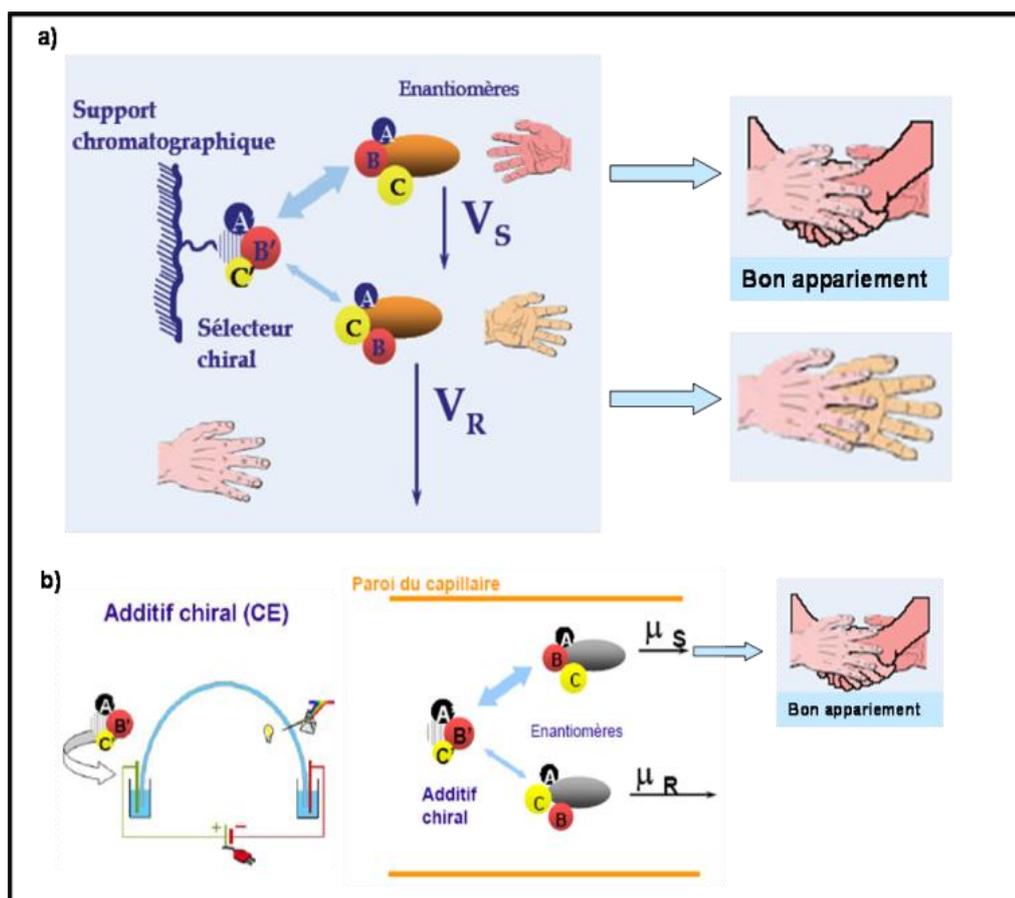


Figure 4 : Principe de la reconnaissance chirale en CLHP (a) et en électrophorèse capillaire (b) [55].

II.2.3.4 Classification des sélecteurs chiraux

On peut distinguer deux grandes familles de sélecteurs chiraux : les sélecteurs dits « conventionnels » et les sélecteurs dits « sur mesure », spécifiques d'un énantiomère pré-déterminé (figure 5).

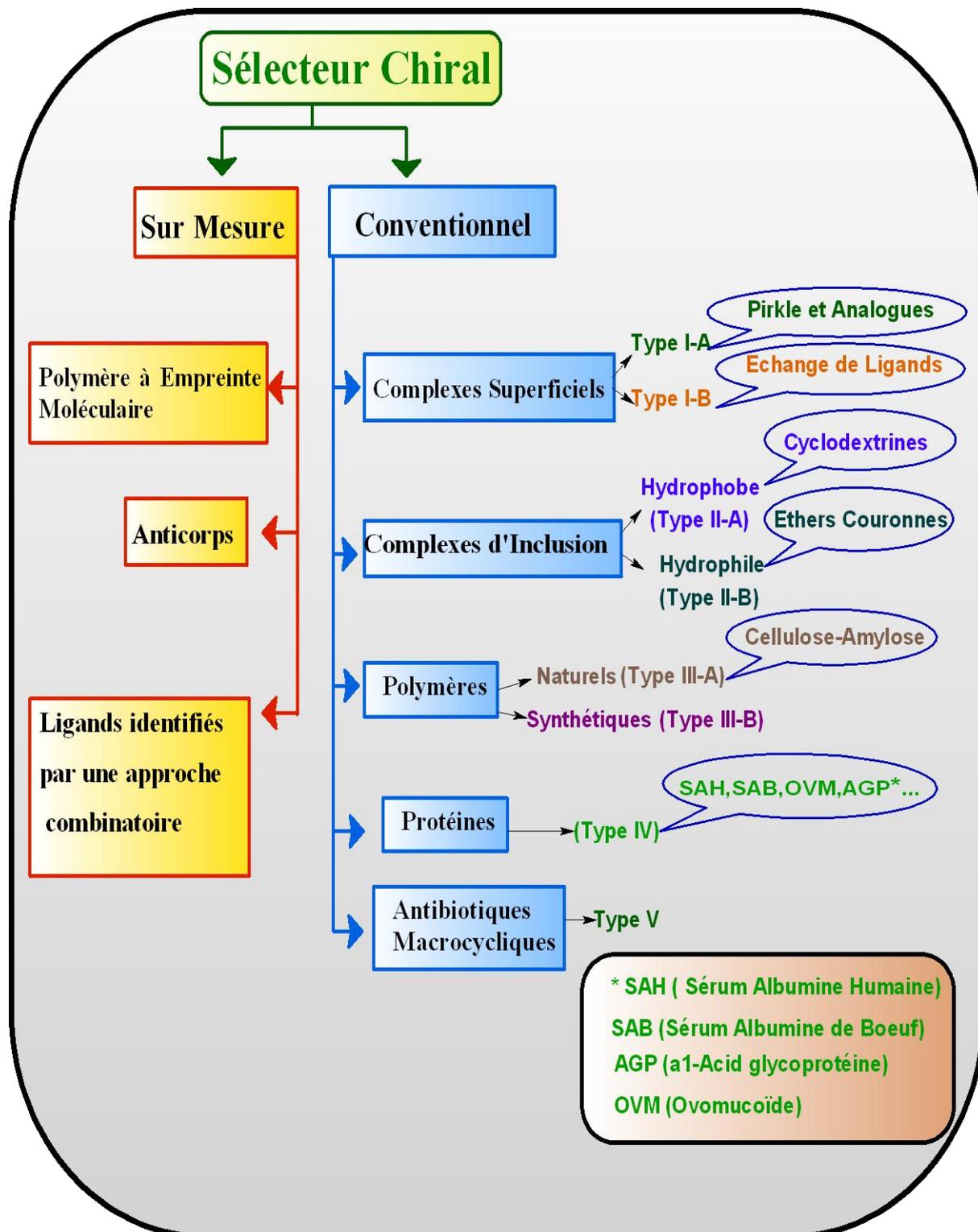


Figure 5 : Classification des sélecteurs chiraux conventionnels et sur mesure.

II.2.3.4.1 Les sélecteurs conventionnels

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

La première famille (*type I*) regroupe les sélecteurs chiraux permettant la séparation d'énantiomères par formation de complexes diastéréoisomériques « superficiels » basés sur des interactions attractives (sélecteurs de type Pirkle) ou faisant intervenir des ions métalliques (échange de ligands).

Les sélecteurs chiraux de *type II* impliquent la formation de complexes d'inclusion hydrophobes (cyclodextrines) ou hydrophiles (éthers couronnes).

Les sélecteurs de *type III* impliquent une combinaison d'interactions attractives et la formation de complexe d'inclusion pour induire une séparation. Cette famille regroupe les polymères naturels et synthétiques.

Les protéines appartiennent à la famille des sélecteurs de *type IV*. La séparation chirale est gouvernée par une combinaison d'effets hydrophobes et d'interactions polaires.

II.2.3.4.1.1 Type I-A : Les sélecteurs de type Pirkle et analogues

En 1976, Mikes introduit une nouvelle phase stationnaire chirale en accrochant directement une petite molécule chirale, un dérivé de l'acide propionique, à un gel de silice [56]. Il qualifie cette nouvelle phase de type « brush ». Plus tard, Pirkle et ses collaborateurs ont développé ces phases de façon plus étendue et, aujourd'hui, elles sont nommées phases stationnaires de type Pirkle (voir Tableau 1) [57]. Elles ont en commun de posséder un noyau aromatique à caractère accepteur d'électrons π (π -acide) comme les dérivés benzoylés, ou donneur d'électrons π (π -basique) comme les dérivés naphtyles. Plus tard, un troisième sélecteur chiral est apparu portant les deux types de noyaux aromatiques (accepteur / donneur d'électrons π) (*figure 6*). Il peut donner des complexes diastéréoisomériques par transfert de charge avec un soluté lui-même donneur ou accepteur d'électrons π .

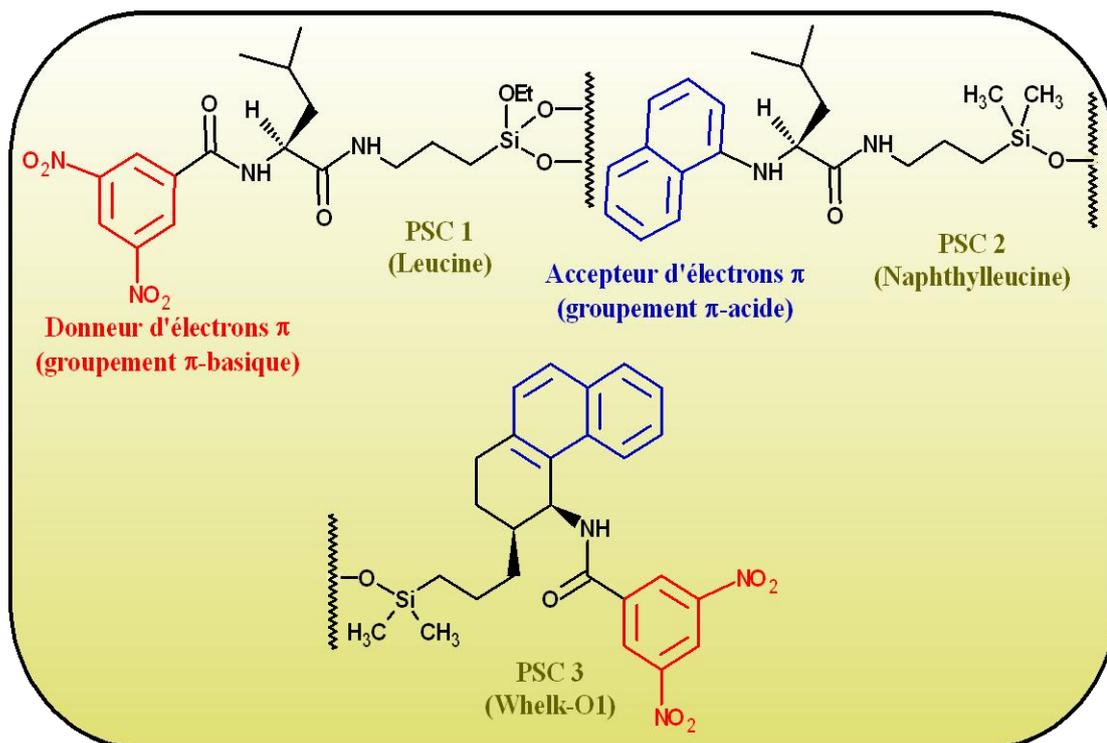


Figure 6 : Trois phases stationnaires chirales différentes de type Pirkle commercialisées par Regis (USA) [24].

Par exemple, la PSC 1, contenant un groupement aromatique π -acide (*figure 6*), a été utilisée pour la résolution des racémates π -basiques [58]. Au contraire, la PSC 2, qui possède un groupement aromatique π -basique (*figure 6*), a été utilisée pour résoudre des racémates π -acides [58] et la PSC 3 (whelk-o 1), qui possède deux types de groupements aromatiques π -acide-basique, a été employée pour résoudre plusieurs racémates présentant des groupements aromatiques π -acides ou π - basiques [59,60].

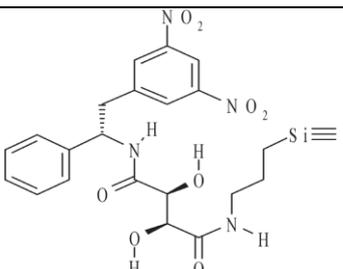
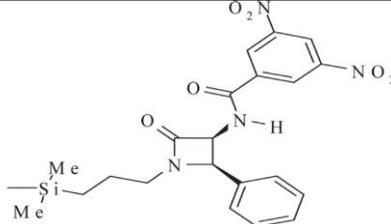
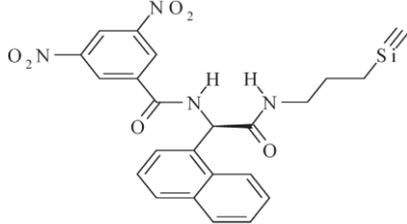
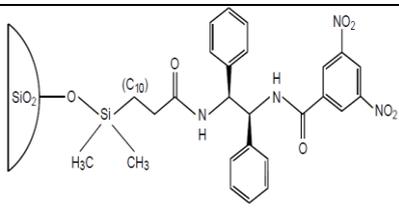
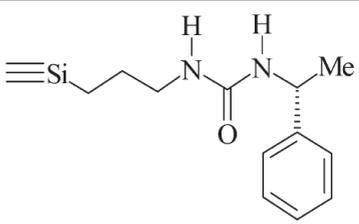
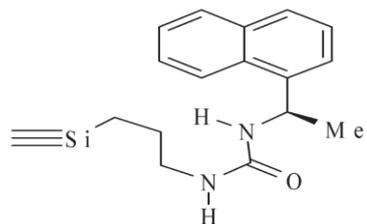
Nom commercial de la colonne	Structure chimique	Sélecteur chiral	Nom de société
Nucleosil chiral 2		(1)- acide Tartrique-(1)-phényléthylamine	Macherey-Nagel (Germany)
Pirkle 1-J		Cis-N-3-(3,5-Dinitrobenzoyl)-amino-4-phényl-β-lactame	Regis (USA)
Sumichiral OA-2500 Chirex 3005 Sumichiral OA-2500R		N-Dinitrobenzoyl-(R)-1-Naphthylglycine	Sumika (Japan) Phenomenex (USA) Sumika (Japan)
ULMO		(Mono-3,5-dinitrobenzoyl (S,S)-phényléthanediamine greffé via un lien amide	Regis (USA)
Spherisorb Chiral I Supelcosil-LC-(R)-phenylUrea		(R)-N-Alpha-Phényléthyl-Npropyl urée	Phases Separations (UK) Supelco (USA)
KK-Carnu		(R)-alpha-(1-Naphthyl)éthylamine urée	YMC (USA)

Tableau 1 : PSCs de type Pirkle [43].

Bien que quelquefois utilisés comme additifs chiraux en électrophorèse capillaire [61], les sélecteurs chiraux de type Pirkle sont généralement employés comme phases stationnaires en chromatographie liquide. Ces phases stationnaires sont généralement utilisées en polarité de phase normale afin de favoriser les interactions de type π - π entre l'analyte et le greffon chiral. Cependant, quelques applications ont été aussi développées en polarité de phase inversée pour l'analyse de composés polaires ou ioniques [62]. Bien que certains médicaments aient été séparés directement sur ce type de PSC, la dérivation du soluté est souvent nécessaire car, pour la séparation des composés chiraux, ces phases imposent des caractéristiques structurales strictes. Citons, sans être exhaustifs, les acides aminés [65], les alcools aminés [63, 64], les β -bloquants [65], etc.

Des sélecteurs chiraux semblables à ceux développés par Pirkle et ses collaborateurs ont été conçus par l'équipe de Dobashi [66]. Ces sélecteurs, à la différence de ceux décrits précédemment, ne possèdent pas de noyau aromatique mais généralement deux fonctions amides (sélecteur de type Hara) [67]. Ces groupements sont simultanément donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène. Pour les PSCs de type Hara, le mécanisme de reconnaissance est basé uniquement sur l'établissement de liaisons hydrogène et elles sont, du fait de cette spécificité, nettement moins utilisées.

II.2.3.4.1.2 Type I-B : Les sélecteurs par échange de ligands

Le principe et l'application d'échange de ligands en séparation chirale, ainsi que les différents sélecteurs chiraux utilisés, en chromatographie et en électrophorèse capillaire, seront développés dans le chapitre suivant.

II.2.3.4.1.3 Type II : Les sélecteurs à cavité : cyclodextrines et éthers couronnes

II.2.3.4.1.3.1 Type II –A : Les cyclodextrines (CDs)

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques constitués d'unités glucopyranose liées entre elles par des liaisons glucosidiques α (1-4) et chaque unité glucopyranose possède 5 atomes de carbone asymétriques, ce qui confère aux cyclodextrines des propriétés chirales. Elles résultent de la dégradation enzymatique de l'amidon par les cyclodextrines glucosyltransférases (CGTases) d'origine bactérienne. Bien que des cyclodextrines contenant jusqu'à 12 unités de glucose aient été isolées, seules les cyclodextrines α (cyclomaltohexaose,

6 unités de glucose), β (cyclomaltoheptaose, 7 unités de glucose) et γ (cyclomaltooctaose, 8 unités de glucose), ont été l'objet d'études poussées et sont commercialement disponibles (figure 7).

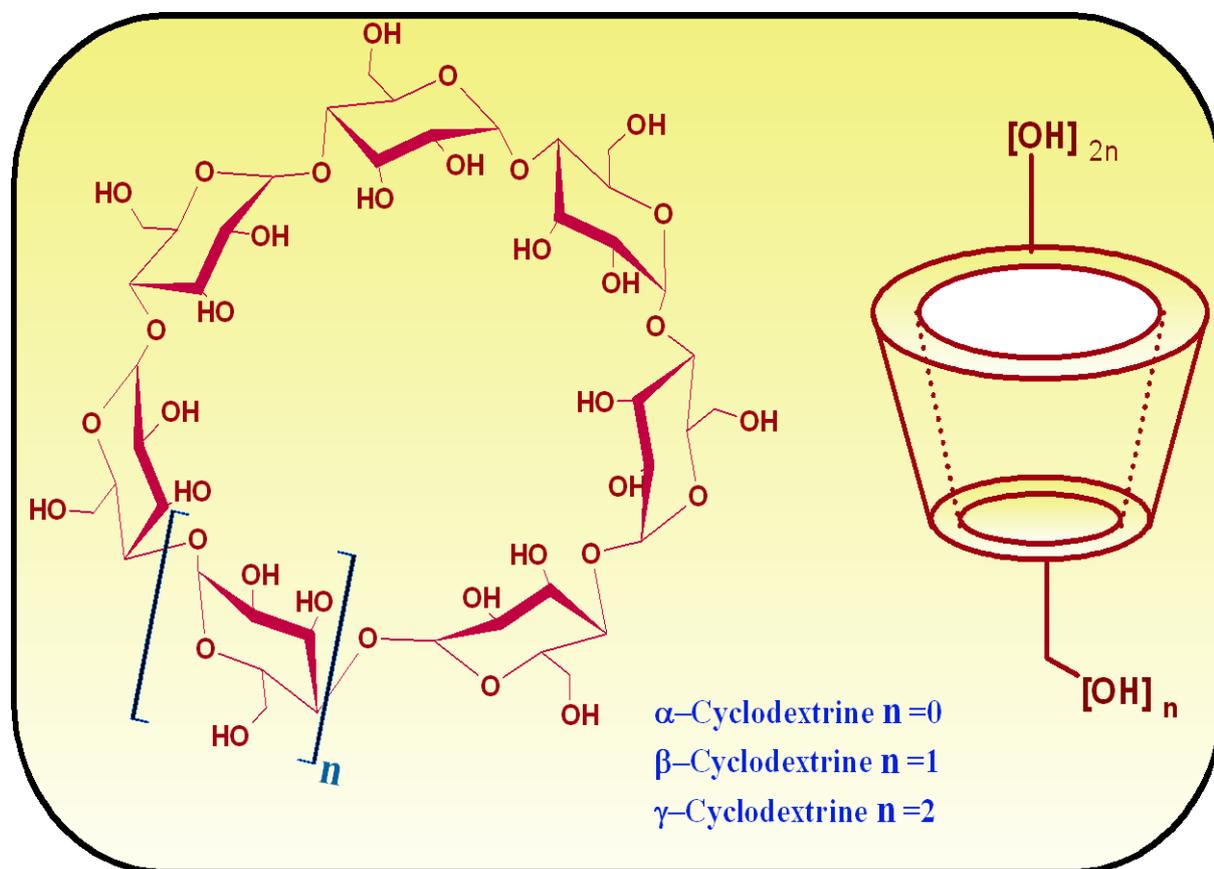


Figure 7: Représentation structurale des cyclodextrines α , β et γ [42].

Les cyclodextrines forment une cavité hydrophobe de forme toroïdale. Les groupements hydroxyles secondaires (OH en position C2 et C3) bordent l'entrée de la cavité alors que les groupements hydroxyles primaires (OH en position C6) plus rapprochés, et par ailleurs plus flexibles, obstruent partiellement l'accès opposé, plus étroit, de la cavité. Cette disposition des groupes -OH confère à l'extérieur de la molécule un caractère hydrophile.

Du fait de : l'absence de groupements hydroxyles, la densité électronique élevée due aux atomes d'oxygène glucosidiques et la présence de groupements -CH- dans la cavité; l'intérieur de la cyclodextrine est à la fois hydrophobe et apolaire, ce qui favorise la formation d'un complexe d'inclusion avec les solutés comportant un motif hydrophobe.

Les liaisons hydrogène et les interactions électrostatiques faisant intervenir les fonctions hydroxyles ou leurs substituants jouent également un rôle important dans l'orientation relative des molécules hôte et invité [68].

Les CDs sont capables de différencier des molécules de structure chimique proche, telles que les isomères et plus particulièrement les énantiomères. Par ailleurs, les CDs ont des propriétés physico-chimiques compatibles avec de nombreuses techniques analytiques comme la chromatographie (CLHP, CPG, CPS et CCM) et l'électrophorèse capillaire (EC et ECC) [69-73]. En effet, les CDs présentent les avantages suivants :

- Elles n'absorbent pas en ultraviolet (UV),
- Elles sont stables sur une large gamme de pH,
- Elles peuvent accroître la fluorescence d'un composé et en faciliter la détection.

Pour qu'une résolution énantiomérique soit possible, un complexe d'inclusion où la molécule invitée est étroitement encastrée dans la cavité de la cyclodextrine est indispensable en milieu aqueux ou hydroorganique. La formation du complexe dépendra de la polarité, de l'hydrophobie, de la taille, et de la géométrie de l'invité, mais aussi de la taille de la cavité de la CD. De plus la température, le pH, et la composition de la phase mobile influencent cette formation [78].

Wainer et Drayer [79] ont proposé quelques règles afin de faciliter la reconnaissance chirale :

- L'analyte doit être constitué au moins d'un noyau aromatique situé en position α ou β du centre chiral.
- Le soluté doit posséder des groupements hydrophiles proches du centre d'asymétrie susceptibles de former des liaisons hydrogène 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.

Généralement le mécanisme de reconnaissance chirale est fondé sur trois points d'interaction entre l'énantiomère et la cyclodextrine : au moins un substituant de l'invité (partie hydrophobe) doit être en interaction avec la cavité apolaire de la cyclodextrine (inclusion) et les substituants de l'atome asymétrique doivent être à proximité des groupements hydroxyles secondaires du bord de la cavité afin que les deux autres points d'interaction interviennent (formation de liaisons hydrogène) (*figure 8*) (concept de Dalglish).

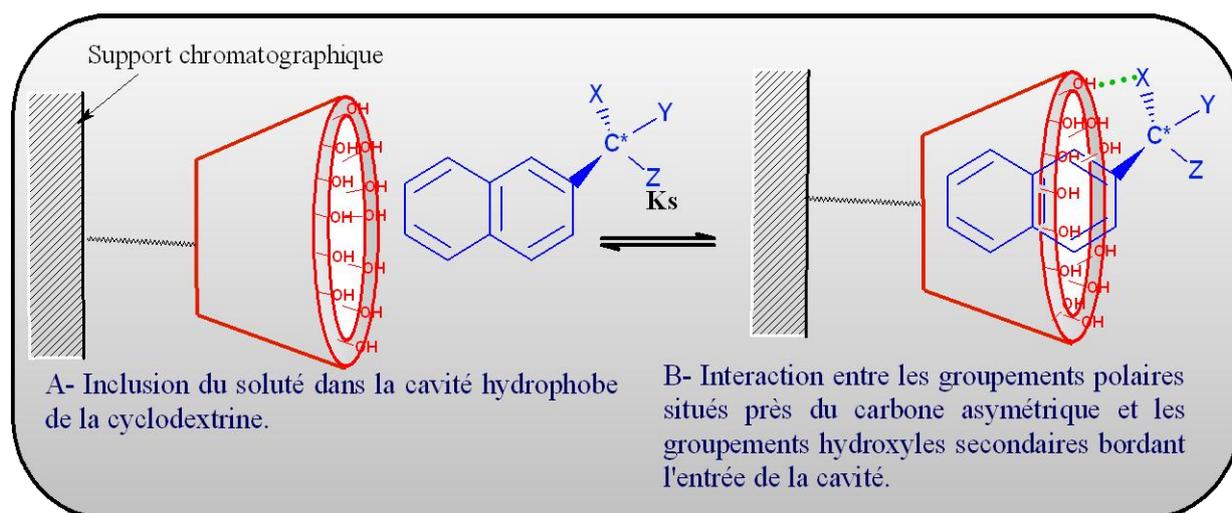


Figure 8 : Représentation schématique des deux étapes de discrimination chirale sur PSC de type cyclodextrine [80].

Les cyclodextrines natives présentent certains inconvénients, notamment des problèmes de solubilité ainsi que des contraintes de faible interaction avec l'analyte. L'ajout de solvants organiques à la phase mobile ou au tampon de migration permet d'améliorer leur solubilité. Une autre alternative est l'emploi de cyclodextrines modifiées par substitution de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle par différents groupements (alkyle-, hydroxyalkyle-, amino-, thio-, glucosyle-, maltosyle-, méthyle-, hydroxyéthyle-, hydroxypropyle-, acétyle-, etc) [79].

De nombreuses CDs modifiées ont été utilisées comme sélecteurs chiraux en tant qu'additifs de phase mobile et de tampon de migration [70, 73, 74, 75] ou comme phases stationnaires chirales [76, 77]. Les phases stationnaires cyclodextrines natives et modifiées sont utilisées en polarité de phase normale, en polarité de phase inversée, ou encore en mode organique polaire [79].

Parmi les nombreuses molécules qui ont été résolues avec les cyclodextrines, citons, sans être exhaustifs, les benzodiazépines [81], les dérivés d'imidazole [82], les β -bloquants [74,83], les anti-inflammatoires non stéroïdiens [84], la warfarine [74, 85], les alcaloïdes [86], les barbituriques [87], les dérivés d'acides aminés [88].

II.2.3.4.1.3.2 Type II –B : Les éthers couronnes

Les éthers couronnes sont des polyéthers macrocycliques découverts en 1967 par Pedersen [89]. L'unité de répétition essentielle est la fonction éthylénoxy ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$) qui se répète 4,

5 et 6 fois, respectivement pour le 12-couronne-4 (12 C₄), le 15-couronne-5 (15 C₅) et le 18-couronne-6 (18 C₆) (figure 9).

Généralement les éthers couronnes possèdent une cavité hydrophile et un environnement extérieur hydrophobe. 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 polyétheré.

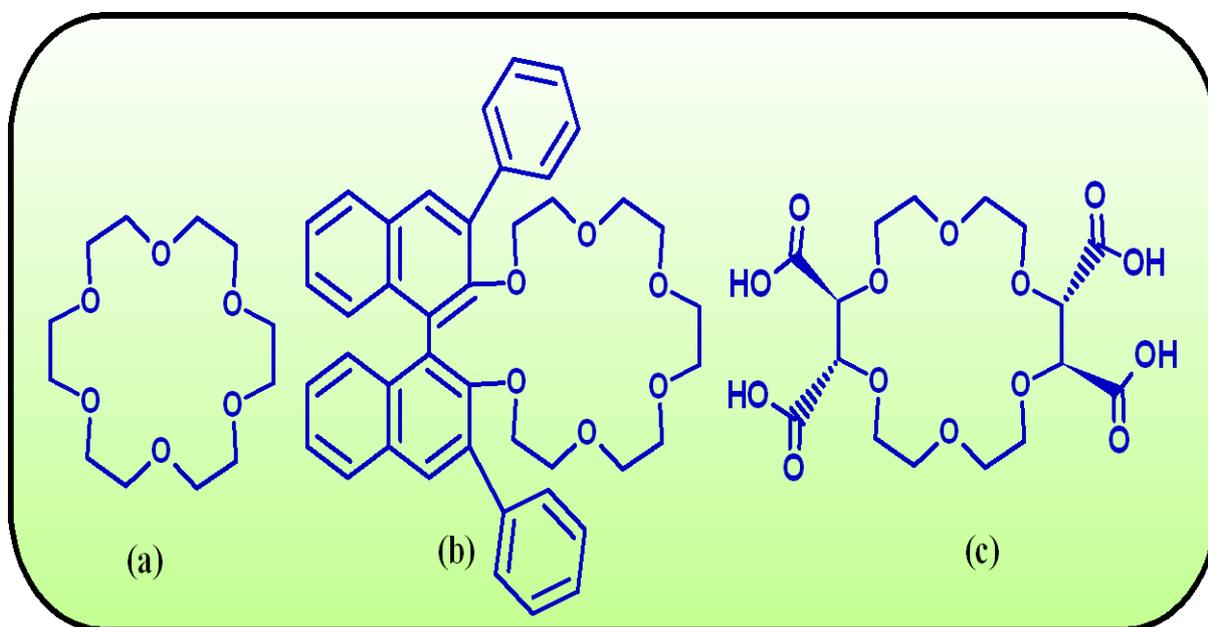


Figure 9 : Structure de quelques éthers couronnes.

(a) : 18-couronne-6 (18C₆); (b) : Crownpak CR (+); (c) : l'acide (-)-2,3,11,12-18-couronne-6 tétracarboxylique ((-)-18C₆H₄) [42].

Le mécanisme de reconnaissance chirale repose sur la formation de liaisons hydrogène et d'interactions électrostatiques entre une fonction aminée du composé chiral et les hétéroatomes de l'éther couronne (figure 10). Les interactions secondaires entre les groupes carboxyliques de l'éther couronne et des groupes situés à proximité du centre chiral de l'analyte sont essentielles pour la reconnaissance chirale [90].

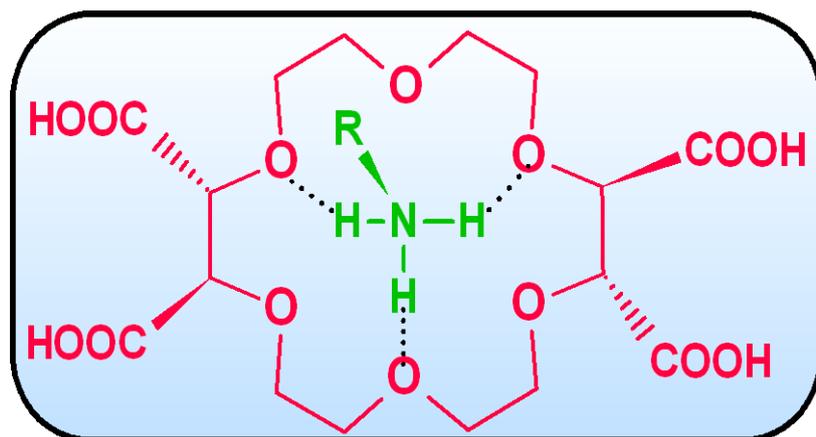


Figure 10 : Modèle de complexation entre une amine primaire et un éther couronne tetracarboxylé [72].

Ces sélecteurs chiraux offrent des sélectivités élevées, cependant, leur domaine d'application est limité aux solutés possédant une fonction amine primaire (acides aminés, amines, amides, alcools aminés, esters aminés, etc).

Les éthers couronnes ont été utilisés avec succès pour la reconnaissance chirale des amines aromatiques (1-naphthyl-éthyl-amine, 1-phényl-éthyl-amine, etc) et des amino-alcools (noréphédrine, noradrénaline, 2-amino-1,2-diphényl-éthanol) [91]. Cependant, la séparation les acides aminés et leurs dérivés constituent la cible majeure de ce sélecteur [72].

II.2.3.4.1.4 Type III : Les polymères naturels et synthétiques

II.2.3.4.1.4.1 Type III : Les polymères naturels

Les polysaccharides tels que la cellulose, l'amylose, le chitosane, le xylane, le curdlan, le dextran, et l'inuline ont été utilisés pour la séparation chirale en chromatographie liquide [92]. La cellulose et l'amylose sont composés d'unités de D-(+)-glucose reliées respectivement par des ponts β -(1-4) ou α -(1-4). Ils présentent une structure hélicoïdale asymétrique permettant la séparation d'énantiomères. Cependant, ces polymères naturels ne sont pas commercialisés en tant que phases stationnaires chirales (PSCs) car les résolutions obtenues sont généralement faibles [93]. Afin d'améliorer leur énantiosélectivité, ils ont été modifiés par dérivation des fonctions -OH libres. La dérivation de ces groupements -OH permet à la fois de conserver la structure hélicoïdale de la molécule et de favoriser l'apparition de cavités chirales capables d'inclure stéréosélectivement des molécules.

Les nouveaux sélecteurs ainsi formés sont essentiellement des dérivés ester ou carbamate de cellulose (Chiralcel) ou d'amylose (Chirapak) (*figure 11*).

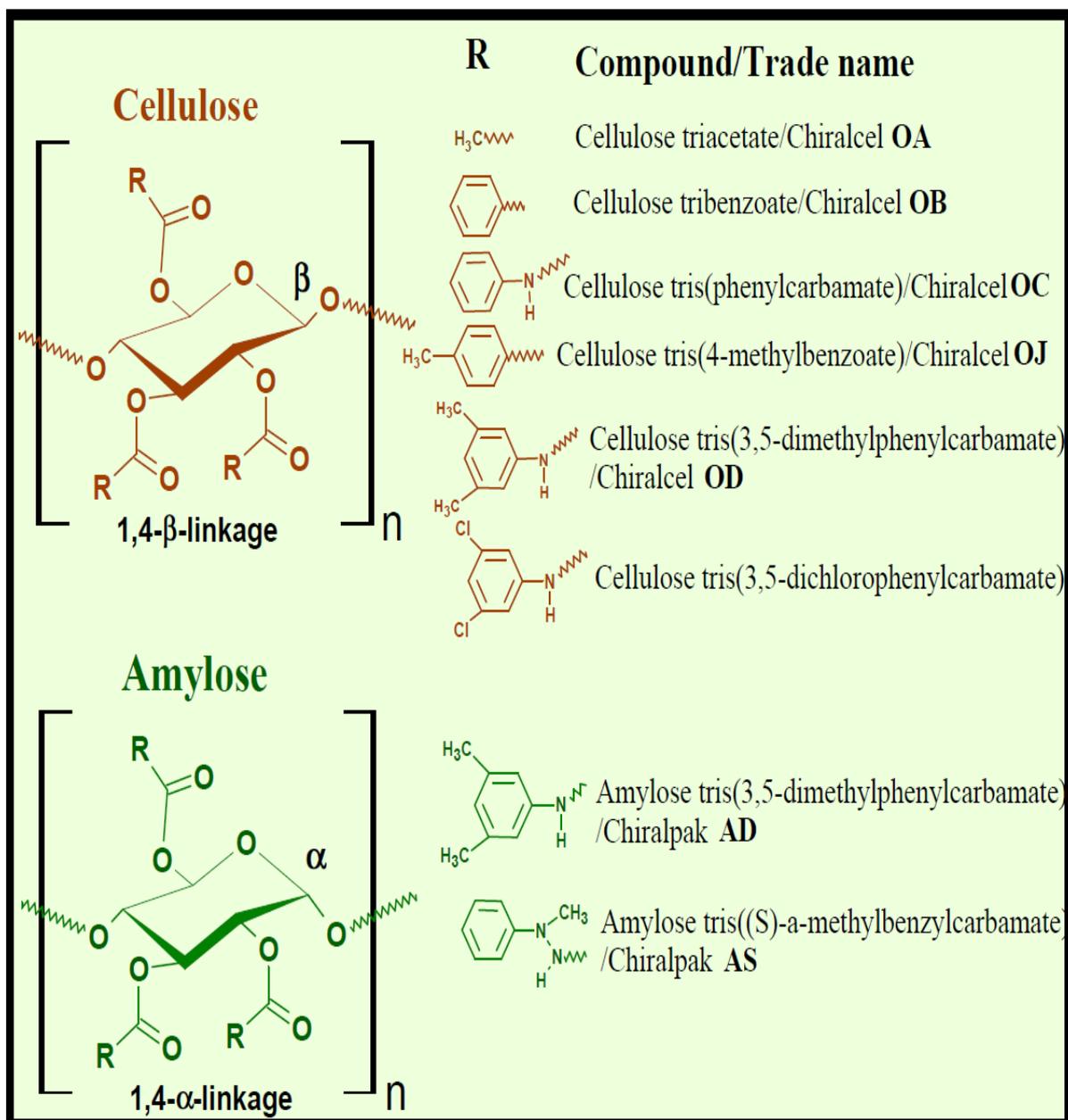


Figure 11 : Structures chimiques des dérivés de la cellulose et de l'amylose commercialisés par Daicel (Japan) [42].

La reconnaissance chirale implique des phénomènes d'inclusion, des interactions de type π - π , des liaisons hydrogène, des interactions dipôle-dipôle et des interactions électrostatiques [94-96].

Certains des polysaccharides modifiés tels que les dérivés carboxyméthylés, méthylés et hydroxypropylés de la cellulose, ont été utilisés également en électrophorèse capillaire en tant qu'additifs chiraux dans le tampon de migration [94, 97, 98]. Mais, les dérivés

polysaccharidiques sont plutôt utilisés, avec un grand succès, en tant que phases stationnaires chirales en chromatographie liquide haute performance [99 - 101].

Les phases stationnaires cellulosiques ou amylosiques sont utilisées en polarité de phase normale ou inversée [96, 102].

Le principal défaut de ces PSCs 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 méthyle *t*-butyle 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 de la silice [99]. Celles-ci montrent une meilleure robustesse vis-à-vis d'un large panel de solvants et ouvrent de nouvelles possibilités quant au choix de la composition de la phase mobile pour la résolution d'énantiomères. De nombreux médicaments chiraux, à caractère acide, neutre ou basique, présentant un noyau aromatique et un groupement polaire près du centre d'asymétrie ont été résolus sur ce type de PSC. Citons les alcaloïdes, les dérivés atropiniques, les β -bloquants, les anti-histaminiques, les anti-inflammatoires [103-105]. De plus, ces sélecteurs sont très intéressants à l'échelle préparative, en raison de leur nombre élevé de cavités chirales qui induisent une forte capacité de charge. De plus, ces sélecteurs sont disponibles en grandes quantités [104].

II.2.3.4.1.4.2 Type III : Les polymères synthétiques

Ces sélecteurs chiraux introduits par Blaschke [107], sont produits par polymérisation de monomères chiraux. Cette polymérisation aboutit à la formation d'un réseau tridimensionnel permettant la création de cavités asymétriques. L'inclusion des énantiomères dans ces cavités constituerait le principal mécanisme de reconnaissance chirale [106,107]. Cependant, les chaînes polymériques, possédant de multiples centres de chiralité provenant du monomère, interviennent également dans ce mécanisme de reconnaissance.

De nombreux polymères d'origine synthétique ont été utilisés en tant que sélecteurs chiraux. Citons les molécules de polyméthacrylate, de polyacrylamide, de polyméthacrylamide et les dérivés du polystyrène, du polyoléfine, d'éther de polyvinyle, du polychlorure, du polyisocyanide, du polyacétylène, du polyéther, du polyamide, du polyuréthane, etc [108].

Ces sélecteurs chiraux ont été principalement utilisés comme phases stationnaires en chromatographie. Leur utilisation à l'échelle préparative connaît un grand succès (plus de 200 composés chiraux ont été résolus sur ce type de sélecteur chiral [93,109]). Citons à titre d'exemple la nilvadipine [110], les dérivés de prostaglandines [111], les dérivés de calixarènes [112] et le thalidomide [113].

II.2.3.4.1.5 Type IV : Les protéines

La première utilisation de protéines immobilisées en tant que phase stationnaire chirale remonte à 1973. La BSA-Sépharose (albumine de sérum de bœuf) a été utilisée avec succès pour la séparation des énantiomères du tryptophane [114].

Diverses protéines telles que l'avidine [115], l' α_1 -glycoprotéine acide (AGP) [116, 117], l'ovomucoïde (OVM) [118], la cellulase (CBH) [119], l'albumine de sérum humain (HSA) [120] ou de bœuf (BSA) [121, 122] ont la capacité de fixer certaines molécules de façon stéréosélective. Les sélecteurs protéiques sont caractérisés par la présence de nombreux sites chiraux dans lesquels des effets hydrophobes, des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogène sont responsables de la reconnaissance chirale [42]. 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 [51].

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.

Ces sélecteurs chiraux permettent la résolution d'une large gamme de mélanges racémiques. Ainsi, des molécules médicamenteuses chirales acides, neutres ou basiques ont été séparées en CLHP ou en électrophorèse capillaire à l'aide des différents sélecteurs chiraux protéiques existants [9].

Cependant, l'application de ces sélecteurs chiraux en tant que PSC est limitée par un certain nombre de points critiques : les protéines sont sujettes à des dégradations irréversibles dans le temps et leur coût est élevé. Elles ne sont pas utilisées à l'échelle préparative [42].

II.2.3.4.1.6 Type V : Les sélecteurs chiraux à base d'antibiotiques macrocycliques

En 1994, Armstrong a introduit une nouvelle classe de sélecteurs chiraux à base d'antibiotiques macrocycliques en électrophorèse capillaire [123] et en CLHP [124].

Les antibiotiques macrocycliques employés en tant que sélecteurs chiraux, sont classés en quatre groupes (les ansamycines, les peptides macrocycliques, les glycopeptides macrocycliques et les aminoglycosides). Parmi ces groupes, les glycopeptides macrocycliques (ristocétine, vancomycine, teicoplanine et avopracine) sont les plus utilisés et donnent les meilleurs résultats en tant que sélecteurs chiraux [125,126].

La structure de ces sélecteurs, est composée de trois ou quatre macrocycles fondus reliés à des unités saccharidiques (nombre important de centres chiraux, de cavités d'inclusion) et à différents groupements fonctionnels acides, basiques ou neutres (par exemple, groupement aromatique, hydroxyle, amine, et acide carboxylique). Ces sélecteurs montrent des propriétés énantiosélectives vis-à-vis d'une large variété de composés anioniques, neutres et cationiques. La première PSC commerciale était constituée de vancomycine (Chirobiotic V) [124]. Des PSC à base de teicoplanine (Chirobiotic T) [128] et de ristocétine A (Chirobiotic R) ont ensuite été développées. La ristocétine a également été utilisée avec succès en EC [129]. La dernière PSC commercialisée de cette famille est la teicoplanine aglycone (Chirobiotic-TAG) [130] qui a été produite en enlevant les parties saccharidiques de la teicoplanine (*figure 12*).

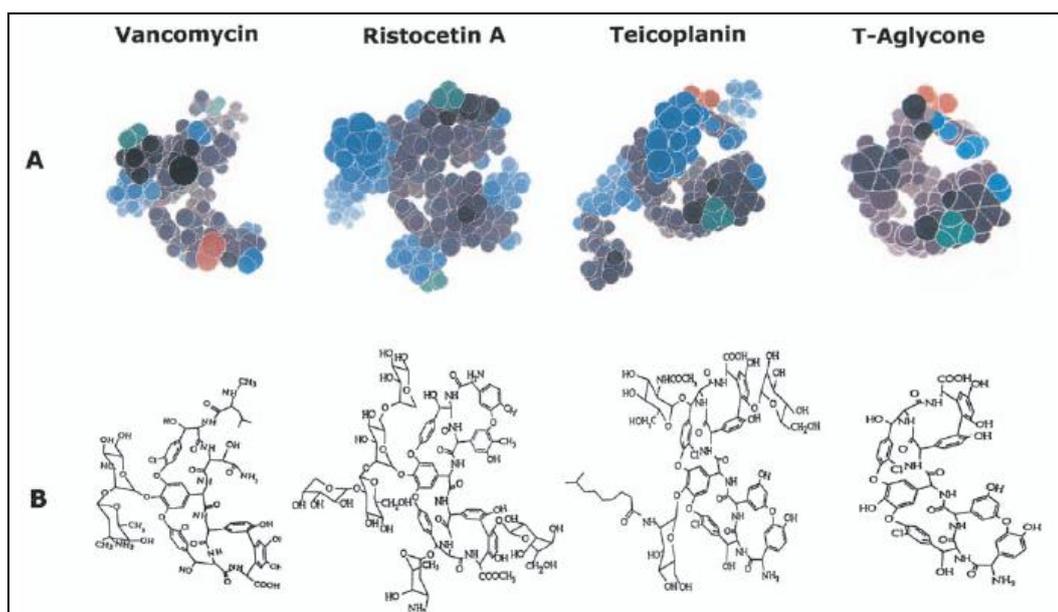


Figure 12 : Structures de quelques glycopeptides [25].

Bien que le mécanisme de reconnaissance de ces sélecteurs chiraux ne soit pas clairement élucidé, il semblerait que des mécanismes d'inclusion dans la cavité hydrophobe, des interactions dipôle-dipôle, des liaisons hydrogène, des interactions de type π - π , électrostatiques ou des répulsions stériques, jouent un rôle dans la reconnaissance chirale [125, 131, 132]. Les propriétés énantiosélectives des antibiotiques macrocycliques semblent se rapprocher de celles des protéines, des cyclodextrines et des sélecteurs chiraux polymériques.

Ils ont été très largement utilisés pour la séparation de divers composés chiraux en utilisant différentes technologies analytiques (CLHP, CCM, CE, CE-MS...) [127]. Nous pouvons citer les acides aminés et dérivés, les peptides, des composés acides, alcools, aminés, esters, sulfamides, aromatiques ou aliphatiques.

II.2.3.4.2 Les sélecteurs chiraux sur mesure

L'un des problèmes majeurs avec les sélecteurs conventionnels est qu'il n'existe pas de règle simple de choix du sélecteur en fonction de la structure des composés à séparer (plus de 100 PSCs commerciales). Ces sélecteurs ne sont pas dirigés spécifiquement contre une molécule cible pré-déterminée.

Le choix du sélecteur chiral s'effectue en règle générale de manière empirique, en fonction des données existantes pour des molécules voisines, ou en effectuant un « screening » des sélecteurs disponibles. De plus, la présence de sites non spécifiques, dans la plupart des cas, entraîne une diminution de l'énantiosélectivité apparente, et une efficacité limitée se traduisant par des pics asymétriques. D'autre part, l'ordre d'éluion des énantiomères séparés par ces sélecteurs conventionnels n'est pas défini. De nouvelles voies de recherche ont été explorées afin de mettre au point des outils de reconnaissance moléculaire capables d'afficher de hautes spécificités et affinités. Trois stratégies générales ont été décrites pour créer un sélecteur chiral spécifiquement désigné contre un racémique à résoudre : la formation de polymères à empreinte moléculaire, la production d'anticorps et l'approche combinatoire. Cette dernière méthode implique deux procédures différentes : une approche à partir d'une petite bibliothèque de sélecteurs à faible poids moléculaire et une approche impliquant une large banque d'oligonucléotides simples brin (aptamères ADN et ARN).

II.2.3.4.2.1 Les sélecteurs chiraux à empreinte moléculaire

Les polymères à empreinte moléculaire (Molecularly Imprinted Polymer : MIP) sont des réseaux de polymères réticulés possédant des sites récepteurs spécifiques d'une molécule cible. L'impression moléculaire consiste à créer des images complémentaires en terme de structure et de fonctionnalités chimiques d'une molécule chimique cible, dite « template », au sein d'un polymère synthétique tridimensionnel (c'est à dire création de cavités de forme et de dimension déterminées) et à considérer cette empreinte comme le mime d'une interaction enzyme-substrat.

Deux approches ont été mises au point pour la préparation des MIPs, l'impression covalente [133,135] et l'impression non covalente développée par Mosbach et ses collaborateurs [136]. L'approche covalente est basée sur la dérivation chimique de la molécule cible avec des molécules contenant des groupements polymérisables utilisant des liaisons covalentes réversibles. La deuxième approche est une impression non-covalente. Dans ce procédé, le complexe entre la molécule empreinte et le monomère est formé in-situ par des interactions non covalentes de type liaisons hydrogène, interactions π - π ou liaisons électrostatiques. L'approche la plus courante est la technique d'impression non covalente [134].

Le principe de la synthèse d'un MIP (approche non covalente) est fondé sur trois principales étapes (*figure 13*) : formation d'un complexe, polymérisation et extraction. Pour ce faire, une molécule empreinte est mise, dans le solvant de synthèse, en présence a) de monomères choisis pour leur grande affinité avec la molécule empreinte (dérivés méthacryliques, vinyliques, acryliques), b) d'un agent réticulant et c) d'un initiateur de polymérisation. Par initiation thermique ou photochimique, les monomères polymérisent autour de la molécule empreinte ce qui induit la création de cavités spécifiques présentant une complémentarité structurale avec la molécule empreinte. Une fois la polymérisation achevée, la molécule empreinte est éliminée de la matrice polymérique, ce qui conduit à la formation d'un polymère rigide renfermant des sites de reconnaissance spécifique de la molécule modèle. La présence d'un solvant porogène dans le mélange de polymérisation permet le développement d'une structure macroporeuse qui facilite l'élimination de la molécule empreinte et l'accès aux sites lors de l'utilisation ultérieure du polymère.

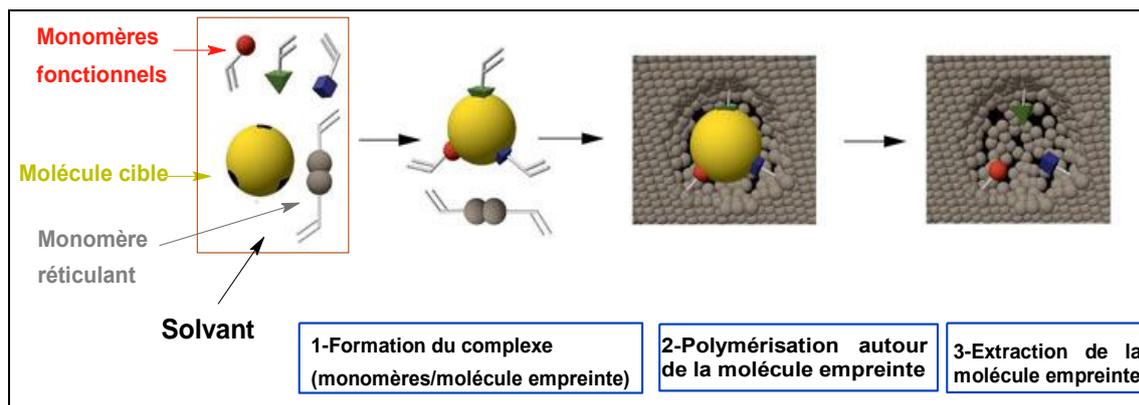


Figure 13 : Principe de synthèse d'un polymère à empreinte moléculaire. Adapté de [142].

Cette technique a été utilisée pour la séparation de divers composés chiraux en utilisant différentes technologies analytiques comme les CEC [137], CLHP [138], CCM [139] et CPS [140]. Les phases stationnaires à base de MIP présentent plusieurs caractéristiques intéressantes : leur préparation est simple et facile, les réactifs nécessaires à la synthèse de la phase stationnaire sont commercialement disponibles et peu onéreux. Ces phases présentent une remarquable stabilité mécanique et chimique [141]. Enfin, les polymères à empreinte moléculaire (MIPs) présentent en général une très haute sélectivité pour leur molécule cible, comparable à celle des anticorps pour leur antigène.

Un nombre important de PSCs de type MIP a été décrit dans la littérature. Ces PSCs ont permis la séparation d'énantiomères d'acides aminés et de leurs dérivés [143], de peptides [144], d'hormones [145], d'antibiotiques [146].

Les MIPs présentent des inconvénients dus à une grande disparité des sites énantiosélectifs et non-spécifiques situés à la surface du polymère. Ceci entraîne une efficacité médiocre, une traînée importante des pics et une capacité de fixation énantiosélective limitée en CLHP [138]. 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 quantité limitée.

II.2.3.4.2.2 Les anticorps

Les immunoglobulines (Ig) sont formées de 4 chaînes polypeptidiques: 2 chaînes lourdes (H pour *heavy*) et 2 chaînes légères (L pour *light*) (*figure 14*) qui sont reliées entre elles par un nombre variable de ponts disulfure assurant une flexibilité de la molécule. L'anticorps

identifie l'antigène grâce à la complémentarité entre une partie de l'anticorps et une zone précise sur l'antigène nommée épitope [149].

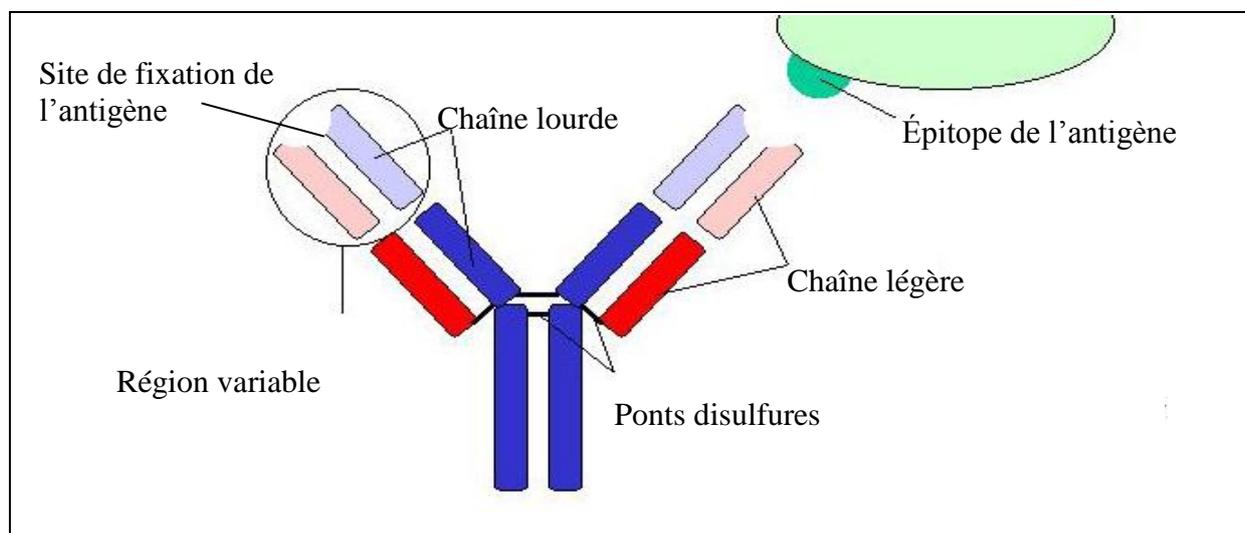


Figure 14 : Représentation de la structure générale d'un anticorps [147].

Le fait que les anticorps soient composés d'acides aminés en série L et de sucres en série D leur donne une chiralité intrinsèque. En 1917, Karl Landsteiner et ses collaborateurs ont démontré que les anticorps pouvaient être stéréosélectifs et qu'ils étaient capables de reconnaître les énantiomères d'une molécule chirale [157].

Leur utilisation comme sélecteurs chiraux pour la résolution des racémiques en CLHP, a été décrite plus récemment. Ils sont greffés sur des billes d'agarose ou immobilisés à la surface de la silice pour constituer la phase stationnaire [150-157].

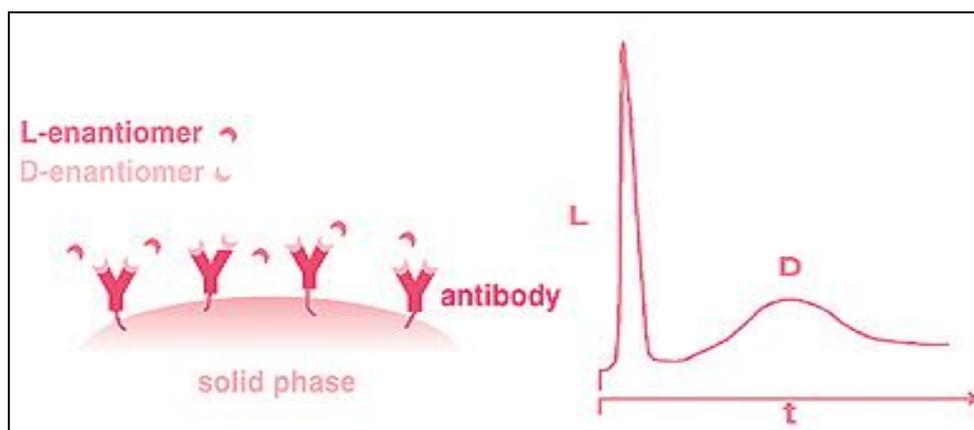


Figure 15 : Phase stationnaire chirale à base d'anticorps [148].

Les interactions spécifiques entre l'anticorps et la molécule cible sont de nature non covalentes et impliquent des interactions électrostatiques, des effets hydrophobes, des liaisons hydrogène et des interactions de type Van der Waals [154].

La plupart des applications chromatographiques relatives à l'utilisation d'anticorps comme sélecteurs chiraux a permis la séparation de principes actifs pharmaceutiques [150,155], d'acides aminés et dérivés [151-154] et d'acides- α -hydroxylés [156].

Toutefois, cette technique présente un certain nombre d'inconvénients. Les anticorps spécifiques d'un énantiomère donné sont obtenus à partir d'animaux. Ceci implique des étapes longues de production, des problèmes de reproductibilité et des difficultés d'obtention d'anticorps contre des molécules non tolérées par les animaux (exemple : toxines). De plus, les capacités d'immobilisation sur support chromatographique sont limitées à cause de leur taille importante. D'autre part, et en règle générale, les petites molécules sont faiblement immunogéniques [158]. Par ailleurs, la longueur des cycles d'éluion des analytes et de régénération de la phase stationnaire rend cette méthode inutilisable en laboratoire de contrôle qualité. Enfin, les anticorps sont sensibles à la température et peuvent subir des dénaturations irréversibles [158].

II.2.3.4.2.3 L'approche combinatoire

La chimie combinatoire constitue un processus qui permet de déterminer, parmi N molécules, les ligands sélectifs d'une molécule cible. L'utilisation d'une méthode combinatoire repose sur la maîtrise de trois étapes essentielles : la synthèse d'une banque de composés, le criblage de ces composés afin de sélectionner celui (ceux) qui possède(nt) les propriétés désirées et enfin l'identification des candidats sélectionnés.

Cette stratégie combinatoire s'est montrée très prometteuse en discrimination chirale. Elle utilise des méthodes rapides selon différentes approches. La première méthode combinatoire décrite impliquait une petite bibliothèque contenant des sélecteurs chiraux à faible masse moléculaire. Plus récemment, une approche combinatoire très efficace, à partir d'une très grande bibliothèque contenant des oligonucléotides simple brin, a permis la création d'une nouvelle classe de sélecteurs chiraux à base d'aptamères en série ADN et ARN [159].

II.2.3.4.2.3.1 Les sélecteurs à faible masse moléculaire

La découverte de sélecteurs chiraux à faible masse moléculaire par la stratégie combinatoire implique plusieurs approches faisant intervenir un « screening » par chromatographie liquide (ou électrophorèse capillaire) ou un « screening » séquentiel.

La première approche (réciproque) introduite par Pirkle et ses collaborateurs [160-161], établit que, si un sélecteur chiral possède différentes affinités pour les énantiomères d'une molécule cible, alors les énantiomères de la molécule cible, pris séparément, devraient posséder une affinité différente pour les énantiomères du sélecteur chiral. Dans cette approche, un énantiomère du racémique cible est immobilisé sur un support chromatographique, puis, un criblage est réalisé par CLHP en faisant passer au niveau de cette phase stationnaire chirale une banque de composés racémiques à faible masse moléculaire (sélecteur candidat), préparés par synthèse combinatoire, susceptibles d'être séparés sur cette PSC. Le racémique le mieux résolu est alors préparé sous une forme énantiomériquement pure et fixé par la suite sur un support chromatographique (*figure 16*). La phase stationnaire ainsi obtenue permet alors une très bonne résolution du racémique cible [162].

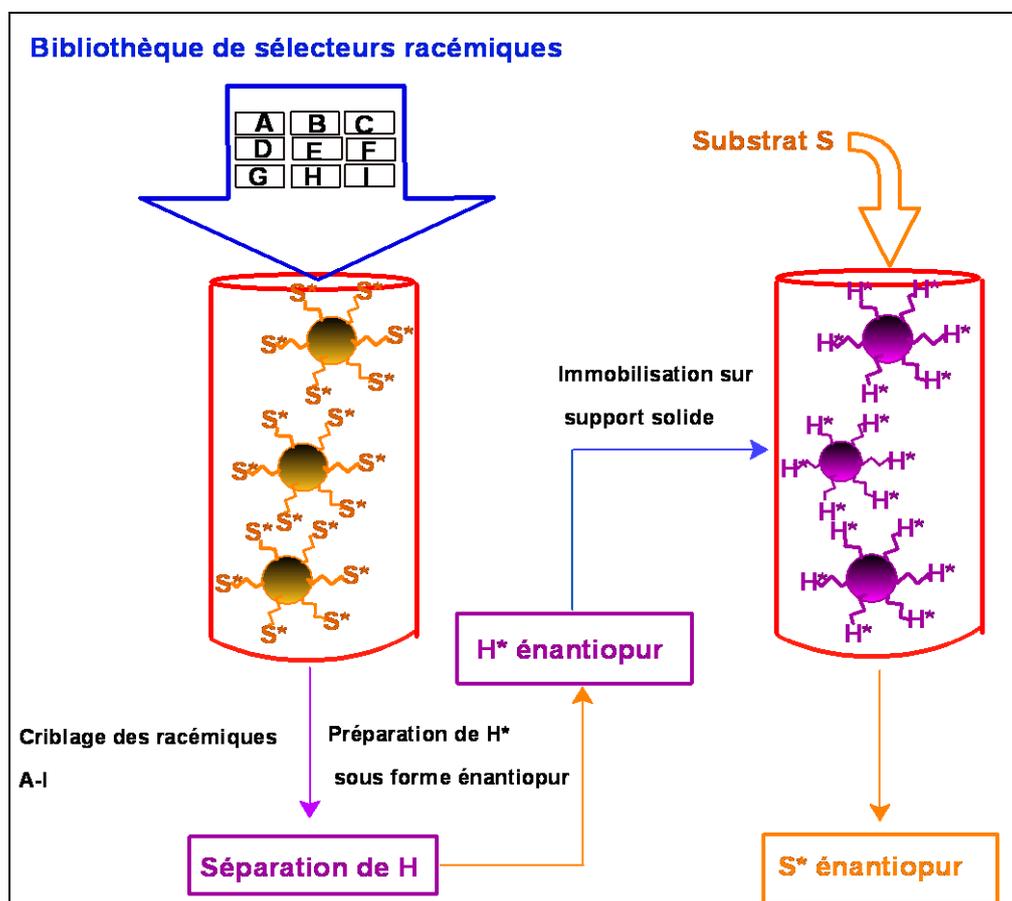


Figure 16 : Concept de criblage réciproque pour l'identification d'un sélecteur spécifique pour la préparation d'une phase stationnaire chirale [162].

Cette technique a l'avantage de faire intervenir seulement deux colonnes afin de développer une PSC optimisée pour la séparation énantiomérique d'un seul composé. Cependant, il a été montré que ces colonnes ont la capacité de séparer d'autres racémiques avec des

énantiosélectivités plus faibles. Cette technique a été employée par plusieurs équipes pour le criblage de diverses familles de composés chiraux [163-166].

La deuxième approche implique une bibliothèque contenant un mélange de sélecteurs chiraux potentiels énantiomériquement purs. Celle-ci a été fixée sur un support chromatographique et testée par un protocole de criblage pour évaluer la séparation des énantiomères de l'analyte cible (figure 17). Si une séparation est réalisée, des sous-banques de colonnes contenant les sélecteurs chiraux les plus énantiosélectifs, sont ensuite préparées afin d'identifier le sélecteur optimal [159]. Cette approche présente l'« avantage du parallélisme » c'est-à-dire que le nombre de colonnes nécessaires lors de l'étape de criblage du sélecteur optimal, par déconvolution, est très inférieur au nombre de sélecteurs chiraux présents dans la bibliothèque initiale [167].

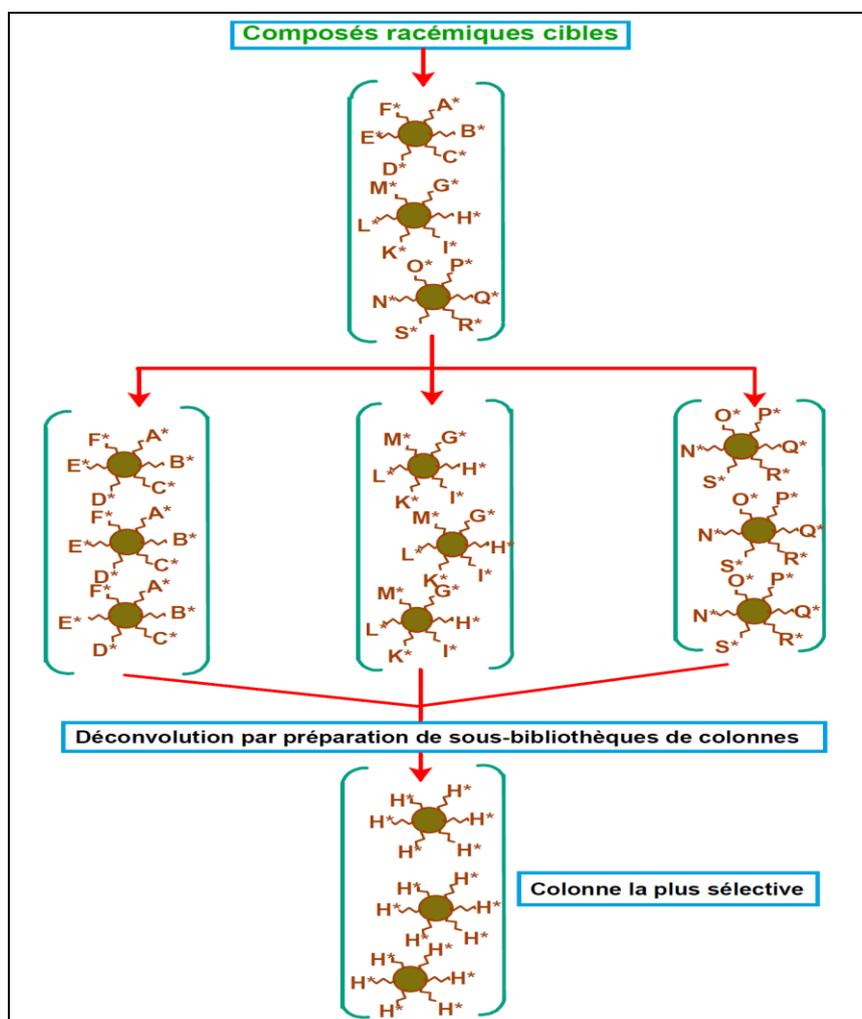


Figure 17 : Concept de criblage par greffage sur billes d'une large bibliothèque de sélecteurs potentiels [167].

En suivant cette approche, Welch et al. [168, 169] ont synthétisé une large banque de dérivés d'oligopeptides dinitrobenzoylés qu'ils ont fixé sur un support chromatographique afin d'identifier les sélecteurs spécifiques d'analytes à caractère π -basique. De la même façon, Chiari et ses collaborateurs ont utilisé une banque contenant plus de 8000 cyclohexapeptides afin d'évaluer leurs propriétés énantiosélectives pour les dérivés d'acides aminés dinitrophénylés (DNP) par électrophorèse capillaire [170].

La recherche de nouvelles techniques rapides et efficaces pour cribler des composés afin d'identifier des ligands qui se lient spécifiquement à une cible particulière, a conduit Weingarten et ses collaborateurs à développer une troisième approche basée sur un criblage visuel en utilisant la microscopie optique. Cette technique permet de sélectionner manuellement des sélecteurs chiraux potentiels. Les auteurs ont identifié par cette méthode des sélecteurs chiraux spécifiques de dérivés d'acides aminés [171].

Cette approche s'effectue en incubant un support solide contenant 60 membres d'une banque d'amines chirales, formées principalement de macrocycles, de diamines, et de différents acides aminés, avec deux énantiomères (composé cible) marqués par des chromophores absorbant dans le visible à des longueurs d'ondes différentes (l'énantiomère S et l'énantiomère R sont marqués respectivement en "bleu" et en "rouge"). Ainsi, l'attachement énantiosélectif entre l'analyte et les sélecteurs peut être observé visuellement pour chaque énantiomère (*figure 18*), par exemple l'association entre le sélecteur chiral et l'énantiomère S produira des billes colorées en bleu alors que l'association avec l'énantiomère R entraînera une coloration des billes en rouge et, la présence de billes non colorées (marron) indique la non-affinité de la molécule immobilisée sur le support pour les énantiomères cibles. D'autre part les molécules les plus intensément colorées correspondent aux sélecteurs chiraux qui présentent le plus d'affinité pour la cible [12].

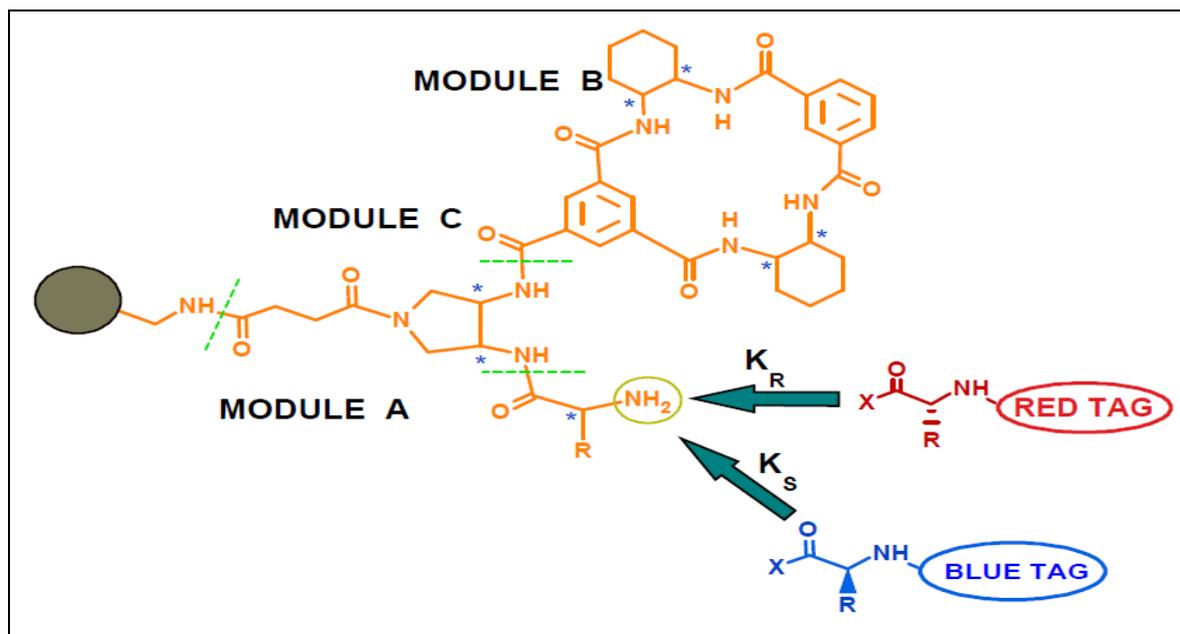


Figure 18 : Approche combinatoire permettant le criblage de sélecteurs chiraux par inspection visuelle [12].

II.2.3.4.2.3.2 Les aptamères

Les aptamères nucléotidiques sont des ADN ou des ARN, simple brin, synthétiques, qui ont la particularité d'adopter une conformation tridimensionnelle unique (tige-boucle, tétrades, boucles internes, pseudo-noeuds...) qui leur permet de se lier spécifiquement à des molécules cibles [172]. Ils sont capables de se fixer spécifiquement à de très nombreuses classes d'espèces comme les ions métalliques [173], les colorants organiques [174], les peptides [175], les protéines [176], les acides aminés [177], les nucléotides [178] ou encore les médicaments [179].

Les aptamères nucléotidiques sont sélectionnés *in vitro* par la méthode SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) [176,180]. Elle repose sur un principe simple d'enrichissement exponentiel d'une banque d'oligonucléotides par des cycles successifs de sélection/amplification [172].

L'utilisation des aptamères en tant que nouveaux sélecteurs chiraux spécifiques d'un énantiomère cible prédésigné, en CLHP et électrophorèse capillaire, a été introduite récemment par notre équipe [181-183].

L'utilisation d'acides nucléiques aptamères comme sélecteurs chiraux offre de nombreux avantages. Les oligonucléotides aptamères sont sélectionnés *in vitro*, stables en série ADN (pas de dénaturation irréversible) et facilement fonctionnalisables pour une immobilisation ou un marquage (greffage de biotine ou de fluorescéine par exemple).

La procédure d'immobilisation de l'aptamère sur le support chromatographique a été réalisée par deux méthodes différentes. La première méthode se fait par l'intermédiaire d'un lien biotine-streptavidine. Dans ce cas, chaque aptamère est biotinylé en 5', ce qui permet sa fixation sur un support chromatographique de polystyrène divinyle benzène contenant des greffons streptavidine (POROS-streptavidine). La deuxième méthode implique une stratégie d'immobilisation covalente de l'aptamère modifié par un groupement amino sur un support commercial de silice (Macrosphère-WCX, Alltech Assoc) fonctionnalisé par des groupements carboxyliques. La liaison amide créée permet d'obtenir une PSC résistante à des conditions plus drastiques (pourcentage de solvant organique et température appliquée plus élevés) par rapport aux PSCs possédant une liaison biotine-streptavidine.

Les aptamères en série ADN ont été utilisés avec succès pour la séparation énantiomérique de la vasopressine (oligopeptide) [181], de l'adénosine (nucléoside) et du tyrosinamide (dérivé d'acide aminé) [182]. Une PSC formée à partir d'un aptamère ARN en série L (produit par synthèse chimique) a été conçue afin de s'affranchir des problèmes de dégradation de l'ARN. Il a été démontré qu'une PSC formée d'un aptamère ARN en série L, image dans un miroir de l'aptamère ARN en série D naturel, est stable pendant une longue période (~ 1600 volumes de colonne) dans des conditions chromatographiques d'utilisation et de stockage normales [184]. Plusieurs aptamères en série ARN ont été utilisés pour séparer les énantiomères de l'arginine [184], de l'histidine [185] et un aptamère a même montré des capacités énantiosélectives vis à vis de plusieurs couples d'énantiomères [186].

Notre équipe a également testé les sélecteurs chiraux de type aptamère en électrophorèse capillaire. L'utilisation d'une méthode de remplissage partiel d'un capillaire en silice fondue a permis de séparer les énantiomères de l'arginine avec un aptamère L-ARN anti D-arginine [183]. La résolution chirale a été réalisée entre 50 et 60°C, à 15 kV. De plus, un essai énantiosélectif par compétition en ECA (électrophorèse capillaire d'affinité) a été réalisé pour la première fois au laboratoire, et a permis la détection d'une impureté énantiomérique à 0,01% avec le même aptamère [187,188].

Récemment, l'équipe a utilisé un capillaire modifié avec de l'alcool polyvinylique, partiellement rempli par une phase micellaire non ionique (chaîne cholestéryle (Apt-chol)) pour la séparation par chromatographie électrocinétique micellaire des molécules anioniques (nucléotides) qui ne présentent pas de différence de mobilité électrophorétique avec l'aptamère. Cette technique a permis la séparation des énantiomères de l'AMP (adénosine monophosphate), l'ADP (adénosine diphosphate) et l'ATP (adénosine triphosphate) en une

seule analyse [189]. Une méthode de déplacement de brin complémentaire a également été développée pour discriminer les énantiomères de l'AMP [190].

Malgré leurs avantages, les aptamères présentent un certain nombre d'inconvénients :

- Comme nous l'avons vu, les aptamères sont aujourd'hui obtenus par sélection *in vitro* (SELEX), qui est une méthode très efficace mais relativement lourde car elle nécessite des équipements sophistiqués et des réactifs coûteux. Elle peut être relativement longue à réaliser.
- En comparaison avec les sélecteurs chiraux « conventionnels », les PSCs aptamères sont généralement caractérisées par des cinétiques de désorption plus faibles, ce qui entraîne une faible efficacité.
- Un autre problème est le prix élevé des aptamères (300 € pour 100 nmoles d'oligonucléotides), ce qui limite leur application à des systèmes miniaturisés tels que les puces (« chips »), l'électrophorèse capillaire, et la micro/nano-CLHP. Cette contrainte exclut, à l'heure actuelle, une application en chromatographie énantiométrique à l'échelle préparative.

Bibliographie

1. Saigo K. and K. Sakai, "Resolution of Chiral Drugs and Drug Intermediates by Crystallisation, in *Chirality in drug research*", (Francotte E. and Lindner W., eds.), **2006**, vol 33, WILEY-VCH, pp.127-154.
2. Breuer M., Ditrich K., Habicher T., Hauer B., Kessler M., Stürmer R. and Zelinski T., "Industrial methods for the production of optically active intermediates", Angewandte Chemie International Edition, **2004**, 43, 788-824.
3. Suteu C., "Chiralité et stabilité ", STP Pharma Pratiques, mai/juin **2004**, 14,293-301.
4. Francotte E., "Chiral stationary phases for preparative enantioselective chromatography, in *Preparative Enantioselective Chromatography*", (Cox G. B., ed.), **2005**, Blackwell Publishing Ltd, pp.48-77.
5. Collet A., Crassous J., Dutasta J-P. and Guy L., "Molécules chirales", EDP Sciences, **2006**, 7-33.
6. Kagan H., "La synthèse asymétrique de composés biologiquement actifs", L'actualité chimique, **2003**, 10-14.
7. Aboul-Enein H. Y. and Ali I., "Chiral Separations by Liquid Chromatography and Related Technologies", Chromatographic Science Series, **2003**, vol 90, Marcel Dekker, INC., 1-20.
8. Hegstrom R. and Kondepudi D.K., "The Handedness of the Universe", Scientific American, **1990**, 262, 108-115.
9. Ceccato A., Hubert Ph and Crommen J., "Analyse de médicaments énantiomériques en chromatographie liquide", STP Pharma Pratiques, **1999**, 9, 295-309.
10. Keurentjes J. T. F., Nabuurs L. J. W. M. and Vegter E. A., "Liquid membrane technology for the separation of racemic mixtures", Journal of Membrane Science, **1996**, 113, 351-360.
11. Pickering P. J. and Chaudhuri J. B., "Emulsion liquid membranes for chiral separations: Selective extraction of rac-phenylalanine enantiomers", Chirality, **1997**, 9, 261-267.
12. Maier N. M., Franco P. and Lindner W., "Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives", Journal of Chromatography A, **2001**, 906, 3-33.
13. Clark J. D., Han B., Bhowan A. S. and Wickramasinghe S. R., "Amino acid resolution using supported liquid membranes", Separation and Purification Technology, **2005**, 42, 201-211.

14. Pirkle W. H. and Bowen W. E., "*Preparative separation of enantiomers using hollow-fiber membrane technology*", Tetrahedron: Asymmetry, **1994**, 5, 773-776.
15. Bodenhofer K., Hierlemann A., Juza M., Schurig V. and Gopel W., "*Chiral Discrimination of Inhalation Anesthetics and Methyl Propionates by Thickness Shear Mode Resonators: New Insights into the Mechanisms of Enantioselectivity by Cyclodextrins*", Analytical Chemistry, **1997**, 69, 4017-4031.
16. Ratko A. A., Stefan R.-L., Van Staden J. F. and Aboul-Enein H. Y., "*Determination of -carnitine using enantioselective, potentiometric membrane electrodes based on macrocyclic antibiotics*", Talanta, **2004**, 63, 515-519.
17. Stefan R.-L., Van Staden J. F. and Aboul-Enein H. Y., "*A new construction for a potentiometric, enantioselective membrane electrode-its utilization to the S-captopril assay*", Talanta, **1999**, 48, 1139-1143.
18. Kleinjung F., Klussmann S., Erdmann V. A., Scheller F. W., Furste J. P. and Bier F. F., "*High-Affinity RNA as a Recognition Element in a Biosensor*", Analytical Chemistry, **1998**, 70, 328-331.
19. Ruta J., Perrier S., Ravelet C., Fize J. and Peyrin E., "*Noncompetitive fluorescence polarization aptamer-based assay for small molecule detection*", Analytical Chemistry, **2009**, 81, 7468-7473.
20. Gübitz G., "*Separation of drug enantiomers by HPLC using chiral stationary Phases: a selective review*", Chromatographia, **1990**, 30, 555-564.
21. Bojarski J., "*Recent progress in chromatographic enantioseparations*", Chemia Analityczna (Warsaw), **1997**, 42, 139-185.
22. Gasparri F., Misiti D. and Villani C., "*HPLC chiral stationary phases based on low-molecular-mass selectors*", Journal of Chromatography A, **2001**, 906, 35-50.
23. <http://www.esi.umontreal.ca/~badiaa/biocapteurs.pdf>.
24. Hyun M. H. and Cho Y. J., "*Chiral Separation by HPLC With Pirkle-Type Chiral Stationary Phase, in Chiral Separation, Methods and Protocols*", (Gübitz G. and Schmid M.G., eds) **2004**, Methods in Molecular Biology, vol 243, Humana Press Inc., pp.197-205.
25. Gasper M. P., Berthod A., Nair U. B. and Armstrong D. W., "*Comparison and modeling study of vancomycin, ristocetin A, and teicoplanin for CE enantioseparations*", Analytical Chemistry, **1996**, 68, 2501-2514.
26. Duncan J. D., "*Chiral separations: a comparison of HPLC and TLC*", Journal of liquid chromatography, **1990**, 13, 2737-2755.
27. Lepri L., "*Enantiomer separation by thin-layer chromatography*", Journal of Planar Chromatography-Modern TLC, **1997**, 10, 320-331.

28. Aboul-Enein H. Y., El-Awady M. I., Heard C. M. and Nicholls P. J., "*Application of thin-layer chromatography in enantiomeric chiral analysis-an overview*", Biomedical Chromatography, **1999**, 13, 531–537.
29. Schurig V., "*Separation of enantiomers by gas chromatography*", Journal of Chromatography A, **2001**, 906, 275–299.
30. Terfloth G., "*Enantioseparations in super-and subcritical fluid chromatography*", Journal of Chromatography A, **2001**, 906, 301–307.
31. Williams K. L. and Sander L. C., "*Enantiomer separations on chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography*", Journal of Chromatography A, **1997**, 785, 149–158.
32. Petersson P. and Markides K. E., "*Chiral separations performed by supercritical fluid chromatography*", Journal of Chromatography A, **1994**, 666, 381–394.
33. Nishi H. and Terabe S., "*Optical resolution drugs by capillary electrophoretic techniques*", Journal of Chromatography A, **1995**, 694, 245–276.
34. Fanali S., "*Identification of chiral drug isomers by capillary electrophoresis*", Journal of Chromatography A, **1996**, 735, 77–121.
35. Chankvetadze B., "*Separation selectivity in chiral capillary electrophoresis with charged selectors*", Journal of Chromatography A, **1997**, 792, 269–295.
36. Fanali S., "*Controlling enantioselectivity in chiral capillary electrophoresis with inclusion-complexation*", Journal of Chromatography A, **1997**, 792, 227–267.
37. Gübitz G. and Schmid M. G., "*Chiral separation principles in capillary electrophoresis*", Journal of Chromatography A, **1997**, 792, 179–225.
38. Fanali S., "*Enantioselective determination by capillary electrophoresis with cyclodextrins as chiral selectors*", Journal of Chromatography A, **2000**, 875, 89–122.
39. Verleysen K. and Sandra P., "*Separation of chiral compounds by capillary-Electrophoresis*", Electrophoresis, **1998**, 19, 2798–2833.
40. Gübitz G. and Schmid M. G., "*Recent progress in chiral separation principles in capillary electrophoresis*", Electrophoresis, **2000**, 21, 4112–4135.
41. Yamamoto C. and Okamoto Y., "*HPLC resolution using polysaccharide derivatives as CSP, in Chiral Analysis*", (Busch K.W. and M.A. Busch, eds.), **2006**, First edition, Elsevier B.V., pp.215-239.

42. Maier N. M. and Lindner W., "*Stereoselective Chromatographic Methods for Drug Analysis, in Chirality in drug research*", (Francotte E. and Lindner W., eds.), **2006**, vol 33, WILEY-VCH, pp.189-260.
43. Felix G. and Berthod A., "*Commercial Chiral Stationary Phases for the Separations of Clinical Racemic Drugs*", Separation & Purification Reviews, **2007**, 36,285 – 481.
44. Bjornsdottir I., Hansen S.H. and Terabe S., "*Chiral separation in non-aqueous media by capillary electrophoresis using the ion-pair principle*", Journal of Chromatography A, **1996**, 745, 37.
45. Schmitt T. and Engelhardt H., "*Charged and uncharged cyclodextrins as chiral selectors in capillary electrophoresis*", Chromatographia, **1993**, 37, 475-481.
46. Chankvetadze B., Pintore G., Burjenadze N., Bergenthal D., Strickmann D., Cerri R., and Blaschke G., "*Capillary electrophoresis, nuclear magnetic resonance and mass spectrometry studies of opposite chiral recognition of chlorpheniramine enantiomers with various cyclodextrins* ", Electrophoresis, **1998** ,19, 2101-2108.
47. Rizzi A.M. and Kremser L., "*pKa shift-associated effects in enantioseparations by cyclodextrin-mediated capillary zone electrophoresis*", Electrophoresis, **1999**, 20, 2715-2722.
48. Schmitt T. and Engelhardt H., "*Optimization of enantiomeric separations in capillary electrophoresis by reversal of the migration order and using different derivatized cyclodextrins* ", Journal of Chromatography A, **1995**, 697, 561-570.
49. Schulte G., Chankvetadze B., and Blaschke G., "*Enantioseparation in capillary electrophoresis using 2-hydroxypropyltrimethylammonium salt of β -cyclodextrin as a chiral selector*", Journal of Chromatography A, **1997**, 771, 259-266.
50. Ha P.T.T., Hoogmartens J. and Van Schepdael A., "*Recent advances in pharmaceutical applications of chiral capillary electrophoresis*", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2006**, 41, 1-11.
51. Gübitz G. and Schmid M.G., "*Chiral Separation by Chromatographic and Electromigration Techniques. A Review*", Biopharmaceutics & Drug Disposition, **2001**, 22, 291–336.
52. Dalgliesh C. E., "*The optical resolution of aromatic amino acids on paper chromatograms*", Journal of the Chemical Society, **1952**, 137, 3940-3952.
53. Pirkle W. H. and Pochapsky T. C., "*Considerations of chiral recognition relevant to the liquid chromatography separation of enantiomers*", Chemical Reviews, **1989**, 89, 347-362.
54. Berthod A., "*Chiral Recognition Mechanisms*", Analytical Chemistry, **2006**, 78, 2093-2099.

55. Veuthey J. L. and Rudaz S., "*Electrophorèse capillaire: historique et perspectives*", Club lyonnais de chromatographie, **2005**.
56. Mikes F., Boshart G. and Gil-Av E., "*Resolution of optical isomers by high-performance liquid chromatography, using coated and bonded chiral charge-transfer complexing agents as stationary phases*", Journal of Chromatography, **1976**, 122, 205-221.
57. Pirkle W. H. and Sikkenga D. L., "*Resolution of optical isomers by liquid chromatography*", Journal of Chromatography A, **1976**, 123, 400-404.
58. Perrin S. R. and Pirkle W. H., "*Commercially available brush-type chiral selectors for the direct resolution of enantiomers, in Chiral Separations by Liquid Chromatography*", (Ahuja, S., ed.), ACS Symposium Series 471, American Chemical Society, Washington, **1991**, D.C., pp. 43-66.
59. Pirkle W. H., Welch C. J. and Lamm B., "*Design, synthesis, and evaluation of an improved enantioselective naproxen selector*", Journal of Organic Chemistry, **1992**, 57, 3854-3860.
60. Pirkle W. H. and Welch C. J., "*Use of simultaneous face to face π - π interactions to facilitate chiral recognition*", Tetrahedron: Asymmetry, **1994**, 5, 777-780.
61. Thomann W., Prost F. and Prochazhova A., "*Capillary electrophoresis with (R)-(-)-N-(3,5-dinitrobenzoyl)- α -phenylglycine as chiral selector for separation of albendazole sulfoxide enantiomers and their analysis in human plasma*", Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, **2002**, 27, 555-567.
62. Zhang Y., Wu D.R., Wang-Iverson D.B. and Tymiak A.A., "*Enantioselective chromatography in drug discovery*", Drug Discovery Today, **2005**, 10, 571-577.
63. Bourgue A. J. and Krull I. S., "*Solid-phase reagent containing the 3,5-dinitrophenyl tag for the improved derivatization of chiral and achiral amines, amino alcohols and amino acids in high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection*", Journal of Chromatography A, **1991**, 537, 123-152.
64. Wu Y., Krocka M. and Li T., "*Noncovalent linking of a chiral selector to unmodified silica gel through amine functional groups*", Journal of Chromatography A, **1998**, 822, 11-18.
65. Petersen P. V., Ekelund J., Olsen L. and Ovesen V. S., "*Chiral separations of beta-blocking drug substances using the Pirkle-type alpha-Burke I chiral stationary phase*", Journal of Chromatography A, **1997**, 757, 65-71.
66. Dobashi A., Dobashi Y. and Hara S., "*Enantioselectivity of Hydrogen-Bond Association in Liquid-Solid Chromatography*", Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, **1986**, 9, 243 - 267.

67. Dobashi Y. and Hara S., "A chiral stationary phase derived from (R, R)-tartramide with broadened scope of application to the liquid chromatographic resolution of enantiomers", Journal of Organic Chemistry, **1987**, 52, 2490-2496.
68. Liu L. and Guo Q.-X., "The Driving Forces in the Inclusion Complexation of Cyclodextrins", Journal of Inclusion Phenomena and Macroscopic Chemistry, **2002**, 42, 1-14.
69. Herraez-Hernandez R. and Campins-Falco P., "Chromatographic separation of chlorthalidone enantiomers using β -cyclodextrins as chiral additives", Journal of Chromatography B, **2000**, 740, 169-177.
70. Healy L.O., Murrihy J.P., Tan A., Cocker D., McEnery M. and Glennon J.D., "Enantiomeric separation of R, S-naproxen by conventional and nano-liquid chromatography with methyl- β -cyclodextrin as a mobile phase additive", Journal of Chromatography A, **2001**, 924, 459-464.
71. Juvancz Z. and Szejtli J., "The role of cyclodextrins in chiral selective chromatography", Trends in Analytical Chemistry, **2002**, 21, 379-388.
72. Blanco M. and Valverde I., "Choice of chiral selector for enantioseparation by capillary electrophoresis", Trends in Analytical Chemistry, **2003**, 22, 428-439.
73. Mangelings D., Perrin C., Massart D. L., Maftouh M., Eeltink S., Kok W. Th., Schoenmakers P. J. and Vander Heyden Y., "Optimisation of the chlorthalidone chiral separation by capillary electrochromatography using an achiral stationary phase and cyclodextrin in the mobile phase", Analytica Chimica Acta, **2004**, 509, 11 - 19.
74. Perrin C., Fabre H., Maftouh M., Massart D.L. and Vander Heyden Y., "Robustness testing of chiral separations by capillary electrophoresis using highly-sulfated cyclodextrins", Journal of Chromatography A, **2003**, 1007, 165-177.
75. Vaccher M.P., Lipka E., Bonte J.P. and Vaccher C., "Chiral capillary electrophoretic resolution of baclofen, gabaergic ligand, using highly sulfated cyclodextrins", Electrophoresis, **2004**, 25, 1111-1119.
76. Bai Z.W., Lai X.H., Chen L., Ching C.B., Ng S.C., "Arylcarmoylated allylcarmido- β -cyclodextrin: synthesis and immobilization on nonfunctionalized silica gel as a chiral stationary phase", Tetrahedron Letters, **2004**, 45, 7323-7326.
77. Shitangkoon A., Yanchinda J. and Shiowatana J., "Thermodynamic study on the gas chromatographic separation of the enantiomers of aromatic alcohols using heptakis (2, 3-di-O-methyl-6-O-tert-butyl-dimethylsilyl)- β -cyclodextrin as a stationary phase", Journal of Chromatography A, **2004**, 1049, 223-226.
78. Grinberg N., Thompson R., "Chiral separation by HPLC, in *Encyclopaedia of Chromatography*", (Cazes J., ed.), **2004**, Second Edition, Marcel Dekker, Inc, pp.321-327.

79. Bressolle F., Audran M., Pham T.-N. and Vallon J.-J., "*Cyclodextrins and enantiomeric separations of drugs by liquid chromatography and capillary electrophoresis: basic principles and new developments*", Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, **1996**, 687, 303-336.
80. Caude M. and Bargmann-Leyder N., "*Séparations chirales par CPL, CPS et CPG*", Techniques de l'ingénieur, **2001**, 1, 1470.
81. Bertucci C., Domenici E., Uccello-Barretta G. and Salvadori P., "*High performance liquid chromatographic resolution of racemic 1,4-benzodiazepin-2-ones by means of a beta cyclodextrin silica bonded chiral stationary phase*", Journal of Chromatography A, **1990**, 506, 617-625.
82. Foulon C., Danel C., Vaccher M.P., Bonte J.P., Vaccher C. and Goossens J.F., "*Chiral separation of N-imidazole derivatives, aromatase inhibitors, by cyclodextrin-capillary zone electrophoresis. Mechanism of enantioselective recognition*", Electrophoresis, **2004**, 25, 2735-2744.
83. Vargas M.G., Vander Heyden Y., Maftouh M., and Massart D.L., "*Rapid development of the enantiomeric separation of b-blockers by capillary electrophoresis using an experimental design approach*", Journal of Chromatography A, **1999**, 855, 681-693.
84. Armstrong D.W., Chang C.D. and Lee S.H., "*(R)- and (S)-Naphthylethylcarbamate-substituted β -cyclo-dextrin bonded stationary phases for the reversed-phase liquid chromatographic separation of enantiomers*", Journal of Chromatography A, **1991**, 539, 83-90.
85. Yau W.P. and Chan E., "*Chiral CE separation of warfarin in albumin containing samples*", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2002**, 28, 107-123.
86. Stalcup A.M., Faulkner J.R., Tang Y., Armstrong D.W., Levy L.W. and Regalado E., "*Determination of the enantiomeric purity of scopolamine isolated From plant extract using achiral/chiral coupled column chromatography*", Biomedical Chromatography, **1991**, 5, 3-7.
87. Riering H. and Sieber M., "*Covalently bonded permethylated cyclodextrins, new selectors for enantiomeric separations by liquid chromatography*", Journal of Chromatography A, **1996**, 728, 171-177.
88. Zakaria P., Macka M. and Haddad P.R., "*Selectivity control in the separation of aromatic amino acid enantiomers with sulphated β -cyclodextrin*", Journal of Chromatography A, **2004**, 1031, 179-186.
89. Pedersen C.J., "*Cyclic polyethers and their complexes with metal salts*", Journal of the American Chemical Society, **1967**, 89, 2495-2496.

90. Kim E., Koo Y. and Chung D.S., "*Chiral counter-current chromatography of gemifloxacin guided by capillary electrophoresis using (+)-(18-crown-6)-tetracarboxylic acid as a chiral selector*", Journal of Chromatography A, **2004**, 1045, 119-124.
91. Mori Y., Ueno K. and Umeda T., "*Enantiomeric separations of primary amino compounds by nonaqueous capillary zone electrophoresis with a chiral crown ether*", Journal of Chromatography A, **1997**, 757, 328-332.
92. Yashima E. and Okamoto Y., "*Chiral recognition mechanism of polysaccharides chiral stationary phase in*, *The Impact of Stereochemistry on Drugs Development and Use*" (Aboul-Enein H.Y., Wainer I.W., Eds.), **1997**, John Wiley & Sons, New York, pp. 345-376.
93. Okamoto Y., Yashima E., "*Chiral recognition by optically active polymers, in Macromolecular Design of polymeric materials*", (Hatada K., Kitayama T., Voglo O., Eds.), **1997**, Dekker, New York, pp. 731-746.
94. Nishi H., "*Enantioselectivity in chiral capillary electrophoresis with polysaccharides*", Journal of Chromatography A, **1997**, 792, 327-347.
95. Gotti R., Cavrini V., Andrisano V. and Macellani G., "*Dermatan sulfate as useful chiral selector in capillary electrophoresis*", Journal of Chromatography A, **1998**, 814, 205-211.
96. Belloli E., Foulon C., Yous S., Vaccher M.P., Bonte J.P. and Vaccher C., "*Direct separation of the stereoisomers of methoxytetrahydronaphthalene derivatives, new agonist and antagonist ligands for melatonin receptors, by liquid chromatography on cellulose chiral stationary phases*", Journal of Chromatography A, **2001**, 907, 101-113.
97. Chankvetadze B., Saito M., Yashima E. and Okamoto Y., "*Enantioseparation using selected polysaccharides as chiral buffer additives in capillary electrophoresis*", Journal of Chromatography A, **1997**, 773, 331-338.
98. Nishi H. and Kuwahara Y., "*Enantiomer separation by capillary electrophoresis utilizing carboxymethyl derivatives of polysaccharides as chiral selectors*", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2002**, 27, 577-585.
99. Franco P., Senso A., Oliveros L. and Minguillon C., "*Covalently bonded polysaccharide derivatives as chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography*", Journal of Chromatography A, **2001**, 906, 155-170.
100. Ye Y.K., Lynam K.G. and Stringham R.W., "*Effect of amine mobile phase additives on chiral subcritical fluid chromatography using polysaccharide stationary phases*", Journal of Chromatography A, **2004**, 1041, 211-217.

101. Ye Y.K., Lord B.S., Yin L. and Stringham R.W., "*Memory effect of mobile phase additives in chiral separations on a Chiralpak AD column*", Journal of Chromatography A, **2002**, 945, 139-146.
102. Ceccato A., Boulanger B., Chiap P., Hubert PH. and Crommen J., "*Simultaneous determination of methylphenobarbital enantiomers and phenobarbital in human plasma by on-line coupling of an achiral precolumn to a chiral liquid chromatographic column*", Journal of Chromatography A, **1998**, 819, 143-153.
103. Yamamoto C., Okamoto Y., "*Optically Active Polymers for Chiral Separation*", Bulletin of the Chemical Society of Japan, **2004**, 77, 227-257.
104. Chankvetadze B., Chankvetadze L., Sidamonidze S., Yashima E. and Okamoto Y., "*High performance liquid chromatography enantioseparation of chiral pharmaceuticals using tris(chloro-methylphenylcarbamate)s of cellulose*", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **1996**, 14, 1295-1303.
105. Blaschke G. and Maibaum J., "*Chromatographic resolutions: XIV. Optical resolution of the racemic anticancer drug ifosfamide and other chiral oxazaphosphorines*", Journal of Chromatography A, **1986**, 366, 329-334.
106. Okamoto Y. and Yashima E., "*Polysaccharide Derivatives for Chromatographic Separation of Enantiomers*", Angewandte Chemie International Edition, **1998**, 37, 1020-1043.
107. Okamoto Y. and Kaida Y., "*Resolution by high-performance liquid chromatography using polysaccharide carbamates and benzoates as chiral stationary phases*", Journal of Chromatography A, **1994**, 666, 403-419.
108. Nakano T., "*Optically active synthetic polymers as chiral stationary phases in HPLC*", Journal of Chromatography A, **2001**, 906, 205-225.
109. Irurre J., Santamari J. and Gonzalez-Rego M.C., "*Resolution by chiral HPLC of the stable free radical perchlorotriphenylmethyl: Thermodynamic and chiroptical properties*", Chirality, **1995**, 7, 154-157.
110. Tokuma Y., Fujiwara T. and Noguchi H., "*Determination of (+)-and (-)-nilvadipine in human plasma using chiral stationary-phase liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry, and a preliminary pharmacokinetic study in humans*", Journal of Pharmaceutical Sciences, **1987**, 76, 310-313.
111. Clark C.P., Snider B. and Bowman P.B., "*High-performance liquid chromatographic method for determining the enantiomeric purity of a benzindene prostaglandin by a diastereomeric separation*", Journal of Chromatography A, **1987**, 408, 275-283.

112. Araki K., Inada K. and Shinikai S., "*Chiral Recognition of α -Amino Acid Derivatives with a Homooxacalix[3]arene: Construction of a Pseudo- C2-Symmetrical Compound from a C3-Symmetrical Macrocycle*", Angewandte Chemie International Edition, **1996**, 35, 72-74.
113. Blaschke G., Broker W. and Frankel W., "*Enantiomeric Resolution by HPLC on Silica-Gel-Bound, Optically Active Polyamides*", Angewandte Chemie International Edition, **1986**, 25, 830 - 831.
114. Haginaka J., "*Protein Stationary Phases, in Encyclopedia of separation science*", (Wilson I.D., Adlard E.R., Cook M., Pool C.F., eds.), **2000**, Academic Press, pp. 2397-2406.
115. Haginaka J., "*Protein-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography enantioseparations*", Journal of Chromatography A, **2001**, 906, 253-273.
116. Hermansson J., "*Direct liquid chromatographic resolution of racemic drugs using alpha-1-acid glycoprotein as the chiral stationary phase*", Journal of Chromatography A, **1983**, 269, 71-80.
117. Hermansson J., "*Enantiomeric separation of drugs and related compounds based on their interaction with alpha-1-acid glycoprotein*", Trends in Analytical Chemistry, **1989**, 8, 251-259.
118. Miwa T., Miyakawa T., Kayano M. and Miyake Y., "*Application of an ovomucoid-conjugated column for the optical resolution of some pharmaceutically important compounds*", Journal of Chromatography A, **1987**, 408, 316-322.
119. Marle I., Erlandsson P., Hansson L., Isaksson R., Pettersson C. and Pettersson G., "*Separation of enantiomers using cellulase (CBH I) silica as a chiral stationary phase*", Journal of Chromatography A, **1991**, 586, 233-248.
120. Ahmed A. and Lloyd D. K., "*Effect of organic modifiers on retention and enantiomeric separations by capillary electrophoresis with human serum albumin as a chiral selector in solution*", Journal of Chromatography A, **1997**, 766, 237-244.
121. Zhang X., Davidian E. W., Nguyen T. H., Evans R. W., Im Sung J. and Barker G. E., "*Investigation of chiral resolution using displacement interactions with polymer networks in capillary affinity zone electrophoresis*", Journal of Chromatography A, **1996**, 745, 1-8.
122. Eberle D., Hummel R. P. and Kuhn R., "*Chiral resolution of pantoprazole sodium and related sulfoxides by complex formation with bovine serum albumin in capillary electrophoresis*", Journal of Chromatography A, **1997**, 759, 185-192.
123. Armstrong D. W., Rundlett K. L. and Chen J.-R., "*Evaluation of the macrocyclic antibiotic vancomycin as a chiral selector for capillary electrophoresis*", Chirality, **1994**, 6, 496-509.

124. Armstrong D. W., Tang Y., Chen S., Zhou Y., Bagwill C. and Chen J.-R., "*Macrocyclic Antibiotics as a New Class of Chiral Selectors for Liquid Chromatography*", Analytical Chemistry, **1994**, 66, 1473-1484.
125. Armstrong D. W. and Nair U. B., "*Capillary electrophoretic enantioseparations using macrocyclic antibiotics as chiral selectors*", Electrophoresis, **1997**, 18, 2331-2342.
126. Ward T., "*Macrocyclic antibiotics: the newest class of chiral selectors*", LC-GC, **1996**, 14, 886-894.
127. Ward T. J. and Farris III A. B., "*Chiral separations using the macrocyclic antibiotics: a review*", Journal of Chromatography A, **2001**, 906, 73-89.
128. Armstrong D. W., Liu Y., and Ekborgott K. H., "*A covalently bonded teicoplanin chiral stationary phase for HPLC enantioseparations*", Chirality, **1995**, 7, 474-197.
129. Ekborg-Ott K., Liu Y., and Armstrong D. W., "*Highly enantioselective HPLC separations using the covalently bonded macrocyclic antibiotic, ristocetin A, chiral stationary phase* ", Chirality, **1998**, 10, 434-483.
130. Berthod A., Chen X., Kullman J. P., Armstrong D. W., Gasparrini F., D'Acquarica I., Villani C. and Carotti A., "*Role of the carbohydrate moieties in chiral recognition on teicoplanin-based LC stationary phases* ", Analytical Chemistry, **2000**, 72, 1767-1780.
131. Ward T., Dann III C. and Blaylock A., "*Enantiomeric resolution using the macrocyclic antibiotics rifamycin B and rifamycin SV as chiral selectors for capillary electrophoresis*", Journal of Chromatography A, **1995**, 715, 337-344.
132. Ward T. J. and Oswald T. M., "*Enantioselectivity in capillary electrophoresis using the macrocyclic antibiotics*", Journal of Chromatography A, **1997**, 792, 309-325.
133. Wulff G. and Biffis A., "*Molecular imprinting with covalent or stoichiometric non-covalent interactions, in Molecularly Imprinted Polymers: Man Made Mimics of Antibodies and Their Applications in Analytical Chemistry*", (Sellergren, B., ed.), (**2001**) Elsevier, New York, pp. 71-111.
134. Sellergren B. "*The non-covalent approach to molecular imprinting, in Molecularly Imprinted Polymers: Man Made Mimics of Antibodies and Their Applications in Analytical Chemistry*", (Sellergren, B., ed.), **2001**, Elsevier, New York, pp.113-184.
135. Wulff G., "*Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates - A Way towards Artificial Antibodies*", Angewandte Chemie International Edition in English, **1995**, 34, 1812-1832.

136. Mosbach K., "Molecular imprinting", Trends in Biochemical Sciences, **1994**, 19, 9-14.
137. Schweitz L., Spégel P., and Nilsson S., "Approaches to molecular imprinting based selectivity in capillary electrochromatography", Electrophoresis, **2001**, 22, 4053-4063.
138. Sellergren B., "Imprinted chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography", Journal of Chromatography A, **2001**, 906, 227–252.
139. Kriz D., Berggren Kriz C., Andersson L. I., and Mosbach K., "Thin-layer chromatography based on molecular imprinting technique", Analytical Chemistry, **1994**, 66, 2636–2639.
140. Ellwanger A., Owens P. K., Karlsson L., Bayouhd S., Cormack P., Sherrington D. and Sellergren B., "Application of molecularly imprinted polymers in supercritical fluid chromatography", Journal of Chromatography A, **2000**, 897, 317–327.
141. Kriz D. and Mosbach K., "Competitive amperometric morphine sensor based on an agarose immobilised molecularly imprinted polymer", Analytica Chimica Acta, **1995**, 300, 71-75.
142. Haupt K., "Molecularly Imprinted Polymers: The Next Generation", Analytical Chemistry, **2003**, 75, 376 A–383 A.
143. Andersson L. I. and Mosbach K., "Enantiomeric resolution on molecularly imprinted polymers prepared with only non-covalent and non-ionic interactions", Journal of Chromatography A, **1990**, 516, 313-322.
144. Ramstrom O., Nicholls I. A. and Mosbach K., "Synthetic peptide receptor mimics: highly stereoselective recognition in non-covalent molecularly imprinted polymers", Tetrahedron: Asymmetry, **1994**, 5, 649-656.
145. Ramstrom O., Ye L. and Mosbach K., "Artificial antibodies to corticosteroids prepared by molecular imprinting", Chemistry & Biology, **1996**, 3, 471-477.
146. Siemann M., Andersson L. I. and Mosbach K., "Separation and Detection of Macrolide Antibiotics by HPLC Using Macrolide-imprinted Synthetic Polymers as Stationary Phases", The Journal of Antibiotics, **1997**, 50, 89-95.
147. <http://www.pasteur.fr/recherche/unites/ImmStr/en/projects/recognition.html>.
148. http://www.niu.edu/chembio/faculty/directory/o_hofstetter.shtml.
149. R. Nezlin, "The Immunoglobulins, Structure and Function" Academic Press, San Diego, (1998).

150. Lua A. C. and Chou T.-Y., "Preparation of immunoaffinity columns for direct enantiomeric separation of amphetamine and/or methamphetamine", Journal of Chromatography A, **2002**, 967, 191-199.
151. Hofstetter O., Hofstetter H., Schurig V., Wilchek M. and Green B. S., "Antibodies Can Recognize the Chiral Center of Free alpha-Amino Acids", Journal of the American Chemical Society, **1998**, 120, 3251-3252.
152. Hofstetter O., Hofstetter H., Wilchek M., Schurig V. and Green B. S., "Production and Applications of Antibodies Directed Against the Chiral Center of alpha-Amino Acids", International Journal of Bio-Chromatography, **2000**, 5, 165-174.
153. Hofstetter O., Lindstrom H. and Hofstetter H., "Direct Resolution of Enantiomers in High-Performance Immunoaffinity Chromatography under Isocratic Conditions", Analytical Chemistry, **2002**, 74, 2119-2125.
154. Hofstetter O., Lindstrom H. and Hofstetter H., "Effect of the mobile phase on antibody-based enantiomer separations of amino acids in high-performance liquid chromatography", Journal of Chromatography A, **2004**, 1049, 85-95.
155. Nevanen T. K., Soderholm L., Kukkonen K., Suortti T., Teerinen T., Linder M., Soderlund H. and Teeri T. T., "Efficient enantioselective separation of drug enantiomers by immobilised antibody fragments", Journal of Chromatography A, **2001**, 925, 89-97.
156. Zeleke T. K., Zeleke J. M., Hofstetter H. and Hofstetter O., "Stereoselective antibodies to free alpha-hydroxy acids", Journal of Molecular Recognition, **2005**, 18, 334-340.
157. Hofstetter H. and Hofstetter O., "Antibodies as tailor-made chiral selectors for detection and separation of stereoisomers", Trends in Analytical Chemistry, **2005**, 24, 869-879.
158. Jayasena S. D., "Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics", Clinical Chemistry, **1999**, 45, 1628-1650.
159. Ravelet C. and Peyrin E., "Recent developments in the HPLC enantiomeric separation using chiral selectors identified by a combinatorial strategy", Journal of separation science, **2006**, 29, 1322-1331.
160. Pirkle W. H., House D. W., and Finn J. M., "Broad spectrum resolution of optical isomers using chiral high-performance liquid chromatographic bonded phases", Journal of Chromatography, **1980**, 192, 143-158.
161. Pirkle W. H., Hyun, M. H. and Bank B., "A Rational Approach to the Design of Highly-Effective Chiral Stationary Phases", Journal of Chromatography, **1984**, 316, 585-604.

162. Brahmachary E., Ling F. H., Svec F. and Frechet J. M. J., "*Chiral Recognition: Design and Preparation of Chiral Stationary Phases Using Selectors Derived from Ugi Multicomponent Condensation Reactions and a Combinatorial Approach*", Journal of Combinatorial Chemistry, **2003**, 5, 441-450.
163. Pirkle W. H. and Burke J. A., "*Chiral stationary phase designed for β -blockers*", Journal of Chromatography, **1991**, 557, 173-185.
164. Pirkle W. H. and Koscho M. E., "*Structural optimization of a chiral selector for use in preparative enantioselective chromatography*", Journal of Chromatography, **1999**, 840, 151-158.
165. Welch C. J., "*Evolution of chiral stationary phase design in the Pirkle laboratories*", Journal of Chromatography A, **1994**, 666, 3-26.
166. Lewandowski K., Murer P., Svec F. and Fréchet J. M. J., "*A Combinatorial Approach to Recognition of Chirality: Preparation of Highly Enantioselective Aryl-Dihydropyrimidine Selectors for Chiral HPLC*", Journal of Combinatorial Chemistry, **1999**, 1, 105-112.
167. Murer P., Lewandowski K., Svec F. and Frechet J. M. J., "*On-Bead Combinatorial Approach to the Design of Chiral Stationary Phases for HPLC*", Analytical Chemistry, **1999**, 71, 1278-1284.
168. Welch C., Bhat G. and Protopova M.N., "*Silica-based solid phase synthesis of chiral stationary phases*", Enantiomer, **1998**, 3, 463-469.
169. Welch C., Bhat G. and Protopova M.N., "*Selection of an Optimized Adsorbent for Preparative Chromatographic Enantioseparation by Microscale Screening of a Second-Generation Chiral Stationary Phase Library*", Journal of Combinatorial Chemistry, **1999**, 1, 364-367.
170. Chiari M., Desperati V., Manera E. and Longhi R., "*Combinatorial Synthesis of Highly Selective Cyclohexapeptides for Separation of Amino Acid Enantiomers by Capillary Electrophoresis*", Analytical Chemistry, **1998**, 70, 4967-4973.
171. Weingarten M. D., Sekanina K. and Still W. C., "*Enantioselective Resolving Resins from a Combinatorial Library. Kinetic Resolution of Cyclic Amino Acid Derivatives*", Journal of the American Chemical Society, **1998**, 120, 9112-9113.
172. Stoltenburg R., Reinemann C. and Strehlitz B., "*SELEX—A (r) evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands*", Biomolecular Engineering, **2007**, 24, 381-403.
173. Ciesiolka J. and Yarus M., "*Small RNA-divalent domains*", RNA, **1996**, 2, 785- 793.
174. Vianini E., Palumbo M. and Gatto B., "*In vitro Selection of DNA Aptamers that Bind L-Tyrosinamide*", Bioorganic and Medicinal Chemistry, **2001**, 9, 2543-2548.

175. Ye X., Gorin A.D., Ellington D.A. and Patel D.J., "*Deep penetration of an alpha-helix into a widened RNA major groove in the HIV-1 rev peptide-RNA aptamer complex*", Nature Structural Biology, **1996**, 3, 1026–1033.
176. Ellington A.D. and Szostak J.W., "*In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands* ", Nature, **1990**, 346, 818-822.
177. Golden M. C., Collins B. D., Willis M. C. and Koch T. H., "*Diagnostic Potential of PhotoSELEX-Evolved ssDNA Aptamers*", Journal of Biotechnology, **2000**, 81, 167-178.
178. Kiga D., Futamura Y., Sakamoto K., and Yokoyama S., "*An RNA aptamer to the xanthine/guanine base with a distinctive mode of purine recognition*", Nucleic Acids Research, **1998**, 26, 1755-1760.
179. Stojanovic M.N., De Prada P. and Landry D.W., "*Aptamer-based folding fluorescent sensor for cocaine*", Journal of the American Chemical Society, **2001**, 123, 4928-4931.
180. Tuerk C. and Gold L., "*Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase*", Science, **1990**, 249, 505-510.
181. Michaud M., Jourdan E., Villet A., Ravel A., Grosset C. and Peyrin E., "*A DNA aptamer as a new target-specific chiral selector for HPLC*", Journal of the American Chemical Society, **2003**, 125, 8672-8679.
182. Michaud M., Jourdan E., Ravelet C., Villet A., Ravel A., Grosset C. and Peyrin E. , "*Immobilized DNA aptamers as target-specific chiral stationary phases for resolution of nucleoside and amino acid derivative enantiomers*", Analytical Chemistry, **2004**, 76, 1015-1020.
183. Ruta J., Ravelet C., Grosset C., Fize J., Ravel A., Villet A. and Peyrin E. , "*Enantiomeric separation using a L-RNA aptamer as chiral additive in partial-filling capillary electrophoresis* ", Analytical Chemistry, **2006**, 78, 3032-3039.
184. Brumby A., Ravelet C., Grosset C., Ravel A., Villet A. and Peyrin E., "*Chiral stationary phase based on a biostable L-RNA aptamer*", Analytical Chemistry, **2005**, 77, 1993-1998.
185. Ruta J., Grosset C., Ravelet C., Fize J., Villet A., Ravel A. and Peyrin E., "*Chiral resolution of histidine using an anti-D-histidine L-RNA aptamer microbore column*" , Journal of Chromatography B, **2007**, 845 , 186-190.
186. Ravelet C., Boukdedid R., Ravel A., Grosset C., Villet A., Fize J. and Peyrin E., "*A LRNA aptamer chiral stationary phase for the resolution of target and related compounds*", Journal of Chromatography A, **2005**, 1076, 62-70.

187. Ruta J., Ravelet C., Baussanne I., Décout J.-L. and Peyrin E., "*Aptamer-Based Enantioselective Competitive Binding Assay for the Trace Enantiomer Detection*", Analytical Chemistry, **2007**, 79, 4716-4719.
188. Ruta J., Ravelet C., Baussanne I., Fize J., Decout J.-L and Peyrin E., "*Competitive affinity capillary electrophoresis assay based on a hybrid pre- incubation/on-capillary mixing format using an enantioselective aptamer as affinity ligand*", Journal of Separation Science, **2008**, 31, 2239-2243.
189. Ruta J., Perrier S., Ravelet C., Roy B., Perigaud C. and Peyrin E., "*Aptamer-Modified Micellar Electrokinetic Chromatography for the Enantioseparation of Nucleotides*", Analytical Chemistry, **2009**, 81, 1169-1176.
190. Zhu Z., Ravelet C., Perrier S., Guieu V., Roy B., Perigaud C. and Peyrin E., "*Multiplexed detection of small analytes by structure-switching aptamer-based capillary electrophoresis*", Analytical Chemistry, **2010**, 82, 4613-4620.

Chapitre III

L'ECHANGE DE LIGANDS EN SEPARATION CHIRALE

I Introduction

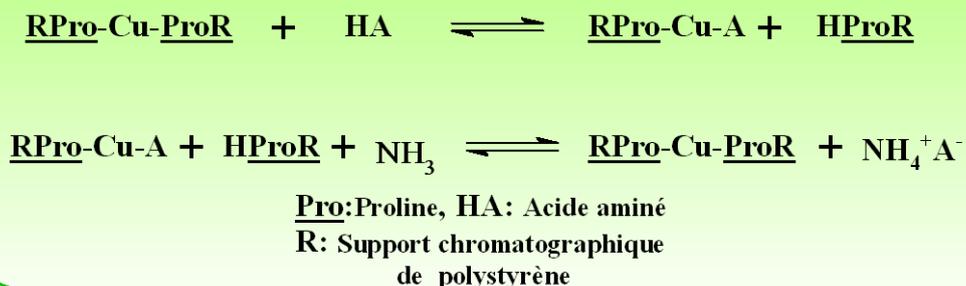
La première utilisation d'un complexe métal-ligand en séparation a été décrite par Tsuji en 1960 [1]. Cet auteur a immobilisé un hydrazide d'acide isonicotinique sur une résine échangeuse cationique chargée de divers ions métalliques. Il a observé que la plus forte rétention de l'hydrazide était obtenue avec le cuivre (II), puis par ordre décroissant : le nickel (II), le mercure (II), le cobalt (II), le cadmium (II), le zinc (II), le fer (II), le manganèse (II), et l'aluminium (III). Dans tous les cas, le composé d'intérêt était ensuite élué de la résine par un mélange ammoniacque-eau. Mais Tsuji n'a pas appelé ce processus échange de ligands [1].

Le principe de la chromatographie par échange de ligands (CEL) a été brièvement présenté pour la première fois, en 1961, par Helfferich [2]. Helfferich a isolé la diamine (1,3-diamino-2-hydroxypropane) en utilisant une résine échangeuse de cations et une solution ammoniacale de cuivre. Chaque molécule de diamine déplace deux molécules d'ammoniaque :



C'est ainsi que la chromatographie par échange de ligands a débuté pour la séparation des composés complexant les cations métalliques.

En 1968, Rogozhin et Davankov ont développé la technique de chromatographie par échange de ligands pour la séparation des isomères optiques des acides aminés [3]. Les auteurs ont greffé un acide aminé optiquement pur, la L-proline, sur un support de polystyrène, puis ils ont fait percoler sur la phase stationnaire une solution de sulfate de cuivre dissoute dans de l'hydroxyde d'ammonium. Un complexe est formé entre l'ion cuivrique et deux molécules de prolines fixées sur le polymère. Les énantiomères de la proline ont ainsi été séparés après fixation sur la colonne via le cuivre puis sont élués par une solution aqueuse ou ammoniacale. La L-proline est l'énantiomère élué en premier.



II Principe de la chromatographie par échange de ligands

La séparation chirale en chromatographie par échange de ligands est fondée sur la formation de complexes entre un soluté donneur de doublets électroniques et un cation métallique présentant des orbitales vacantes. Ces complexes diastéréoisomériques ont différentes stabilités et/ou différentes affinités pour la colonne. Les cations métalliques utilisés sont principalement des métaux de transition : Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} qui donnent des complexes stables avec des ligands très variés.

Les molécules chirales possédant des atomes à caractère donneur d'électrons, tels que l'azote, l'oxygène et le soufre, sont considérées comme de bons ligands car elles ont la capacité de coordonner les cations métalliques (métaux de transition). Généralement les acides aminés et leurs dérivés sont les plus utilisés pour la séparation chirale. A titre d'exemple, on peut citer la proline, l'hydroxyproline, l'histidine, la phénylalanine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, la méthionine, la thréonine, la leucine, et la valine [6-9]. D'autres composés tels que la pénicillamine (métabolite de la pénicilline) [10] ou le chitosane [11,12] ont été envisagés comme une alternative aux acides aminés pour la séparation chirale.

La séparation chirale par échange de ligands a été utilisée pour différentes techniques chromatographiques (CPG [14], CCM [13,15], CPS [16], CLHP [17]), en électrophorèse capillaire [18] et en électrochromatographie [130].

Dans cette partie, les techniques chromatographiques (CLHP) et électrophorétiques mises en œuvre pour la séparation chirale par échange de ligands seront détaillées et l'utilisation des aminoglycosides en chromatographie par échange de ligands (CCEL) sera introduite.

III Séparation chirale par échange de ligands en chromatographie liquide

Généralement, trois approches différentes sont mises en œuvre pour dédoubler les mélanges racémiques en chromatographie chirale par échange de ligands (CCEL).

III.1 Les sélecteurs chiraux en CCEL immobilisés de manière covalente sur un support chromatographique

La première approche est fondée sur l'utilisation de sélecteurs chiraux greffés soit sur des matrices polymériques organiques soit sur des gels de silice ou plus récemment sur des monolithes. La formation des complexes ternaires entre le ligand-cuivre (II) et l'analyte à

séparer a lieu dans la phase stationnaire. L'énantiomère qui forme un complexe ternaire plus stable avec le ligand-cuivre (II) est le plus retenu dans la colonne chromatographique.

1- Les premières phases stationnaires proposées pour la CCEL étaient de nature polymérique. Ainsi, la première résine d'échange de ligands présentée par Rogozhin et Davankov était constituée de polystyrène (*figure1*) [20].

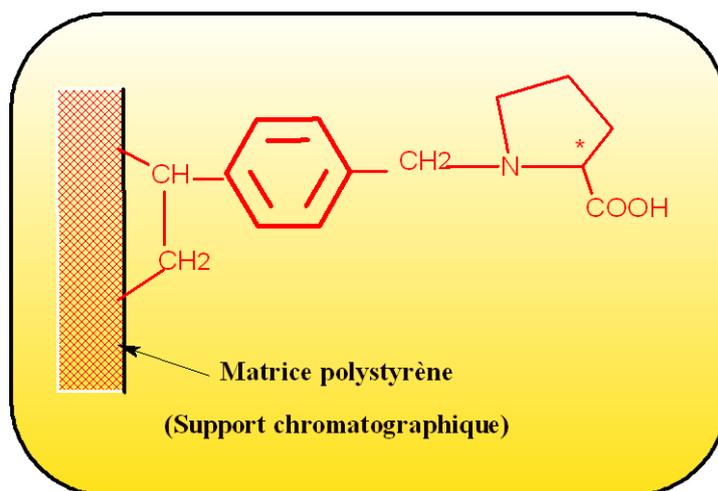


Figure 1 : Polystyrène sur lequel est greffé une molécule de proline [3].

Un autre polymère de type polyacrylamide sur lequel étaient greffés plusieurs acides aminés comme la proline et ses dérivés a ensuite été introduit par Lefebvre et al. en 1977 pour la séparation chirale [20]. Plus tard, ce type de phase stationnaire chirale a été commercialisé sous le nom de Chiosolve par JPS chimie (Suisse). Celle-ci est utilisée pour des applications préparatives pour la séparation d'énantiomères d'acides aminés (*figure2*).

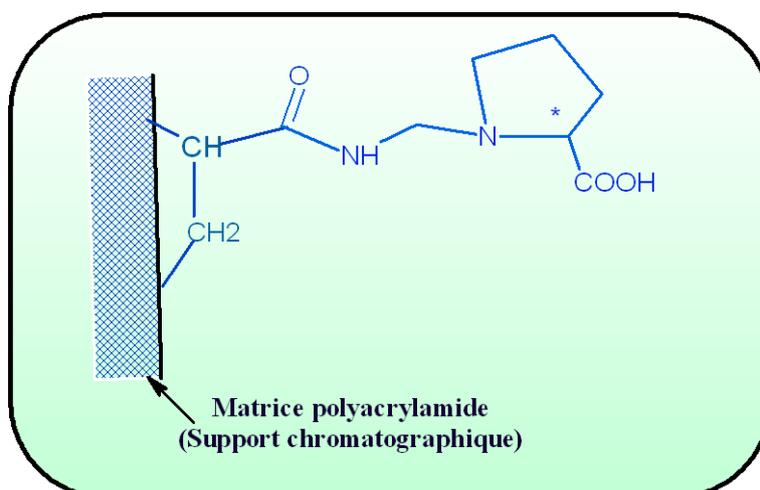


Figure 2 : Polyacrylamide sur lequel est greffé une molécule de proline [3].

D'autres types de polymères ont également été utilisés comme supports chromatographiques pour la CCEL comme par exemple le polyméthacrylate [21], la polyvinylpyridine [22-23]. Mais ce type de support présente plusieurs inconvénients: gonflement des résines, en présence d'une phase mobile aqueuse, mauvaise efficacité des colonnes due aux faibles débits utilisés par manque de résistance aux pressions élevées. Afin de pallier ces différents problèmes, les gels de silice sont aujourd'hui préférés.

2- En 1979, trois équipes différentes (Foucault, Davankov et Guebitz) [3,19, 24-27] ont présenté indépendamment et simultanément des PSCs à base de gels de silice pour la CCEL avec un sélecteur chiral fixé de manière covalente sur la colonne chromatographique.

Le principe de ces immobilisations est fondé sur le greffage covalent sur gel de silice d'un groupement chimique de type aminopropyl, chloroalkyl ou 3- glycidoxypropyl (*figure 3*).

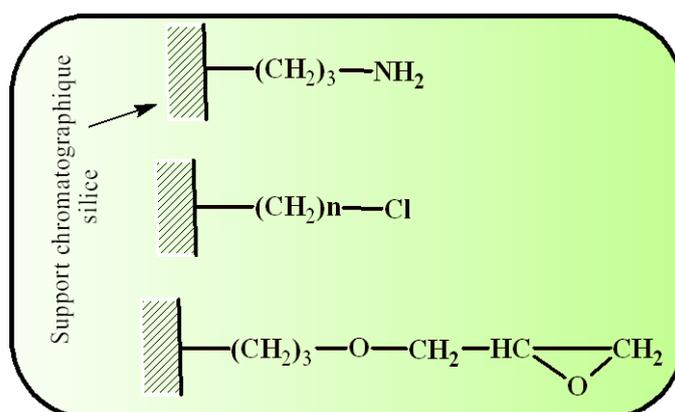


Figure 3 : Les groupements aminopropyl, chloroalkyl , 3- glycidoxypropyl fixés sur la silice [19].

Le bras aminopropylé du gel de silice est relié au sélecteur chiral via la fonction carboxylique de l'acide aminé alors que les groupements chloroalkyl et 3- glycidoxypropyl réagissent plus facilement avec le groupement amino du sélecteur. La première PSC disponible sur le marché, avec ce type d'immobilisation, a été la L-proline immobilisée sur gel de silice par un époxyde-activé (ProCu chiral, Serva, Heidelberg, Allemagne) [27].

Plus tard, plusieurs stratégies d'immobilisation covalente des sélecteurs chiraux sur gel de silice ont été développées pour la CCEL [8,9, 28-33]. On peut citer quelques exemples de sélecteurs chiraux immobilisés sur un support chromatographique :

- Yang et al. [34] ont préparé une PSC contenant de la L-proline comme ligand chiral greffé par l'intermédiaire d'un bras espaceur (S)-triazine.

- Du N1-benzyl-(R)-1,2-propanediamine peut également être utilisé comme ligand chiral et permet de séparer 10 couples d'énantiomères d'acides aminés [3].
- De l'acide tartrique ou de la L-phénylalaninamide peuvent être respectivement employés pour la séparation de certaines catécholamines [36] ou d'énantiomères d'acides aminés dansylés ou dabsylés [37].
- De nombreux ligands chiraux ont été développés par Hyun et al. [35] comme le N-carboxyméthyl-L-leucinol pour la séparation de 24 acides aminés. Récemment, le même groupe a créé de nouvelles PSCs en immobilisant le N- [(S)-1-hydroxyméthyl-3-méthylbutyl]-N-undécyl aminoacétate, le N-[(R)-2-hydroxy-1-phényléthyl]-N-undécyl aminoacétate [38] et le sel monosodique de (R)-N,N-carboxyméthyl undécylphénylglycinol sur gel de silice [39]. Ces PSCs ont montré des valeurs importantes de résolution pour la séparation des α -acides aminés et une forte énantiosélectivité pour la séparation des β -acides aminés. Les auteurs ont réussi également à résoudre une série d' α -hydroxyacides en utilisant ces phases [40].
- Une nouvelle PSC, utilisant un complexe métallique cuivre(II)-chitosane, a été préparée et utilisée pour la séparation chirale de divers énantiomères d' α -acides aminés et les énantiomères d'acides α -hydroxycarboxyliques par CCEL (*figure 4*) [41].

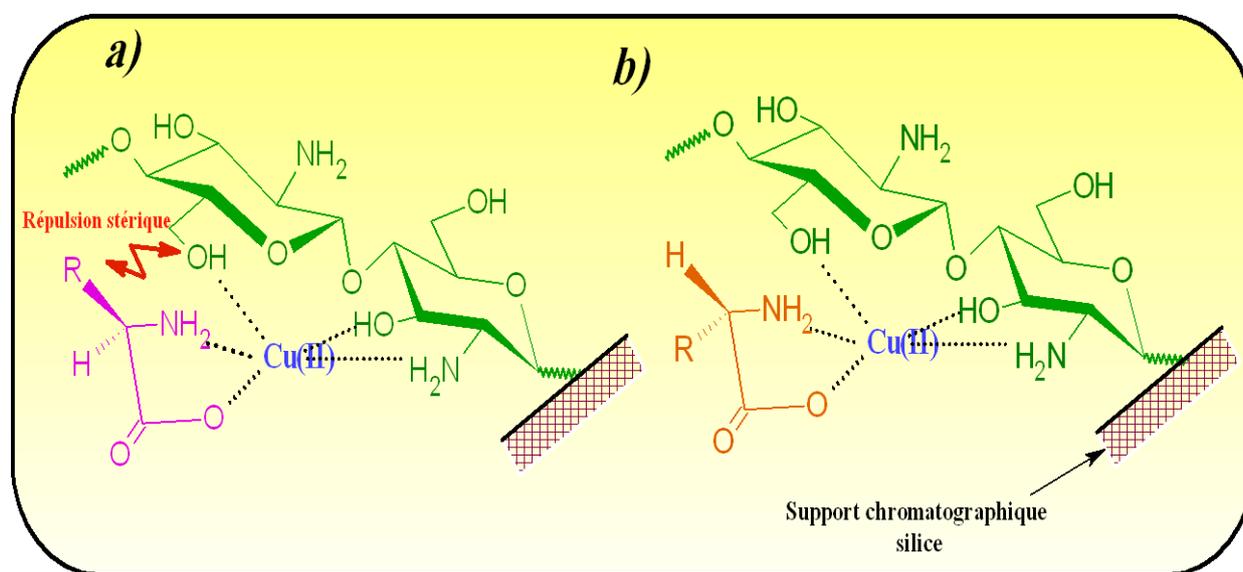


Figure 4 : Les structures proposées du complexe ternaire formé entre le sélecteur chiral chitosane-Cu (II) et l'acide aminé en série D (a) ou l'acide aminé en série L (b) [41].

3- Chen et al. [42] ont préparé des phases monolithiques par polycondensation du tétraméthoxysilane dans un processus sol-gel, puis cette phase a été activée par le 3-

glycidoxypropyl triméthoxysilane qui réagit avec la L-phénylalaninamide, la L-alaninamide ou la L-prolinamide (figure 5).

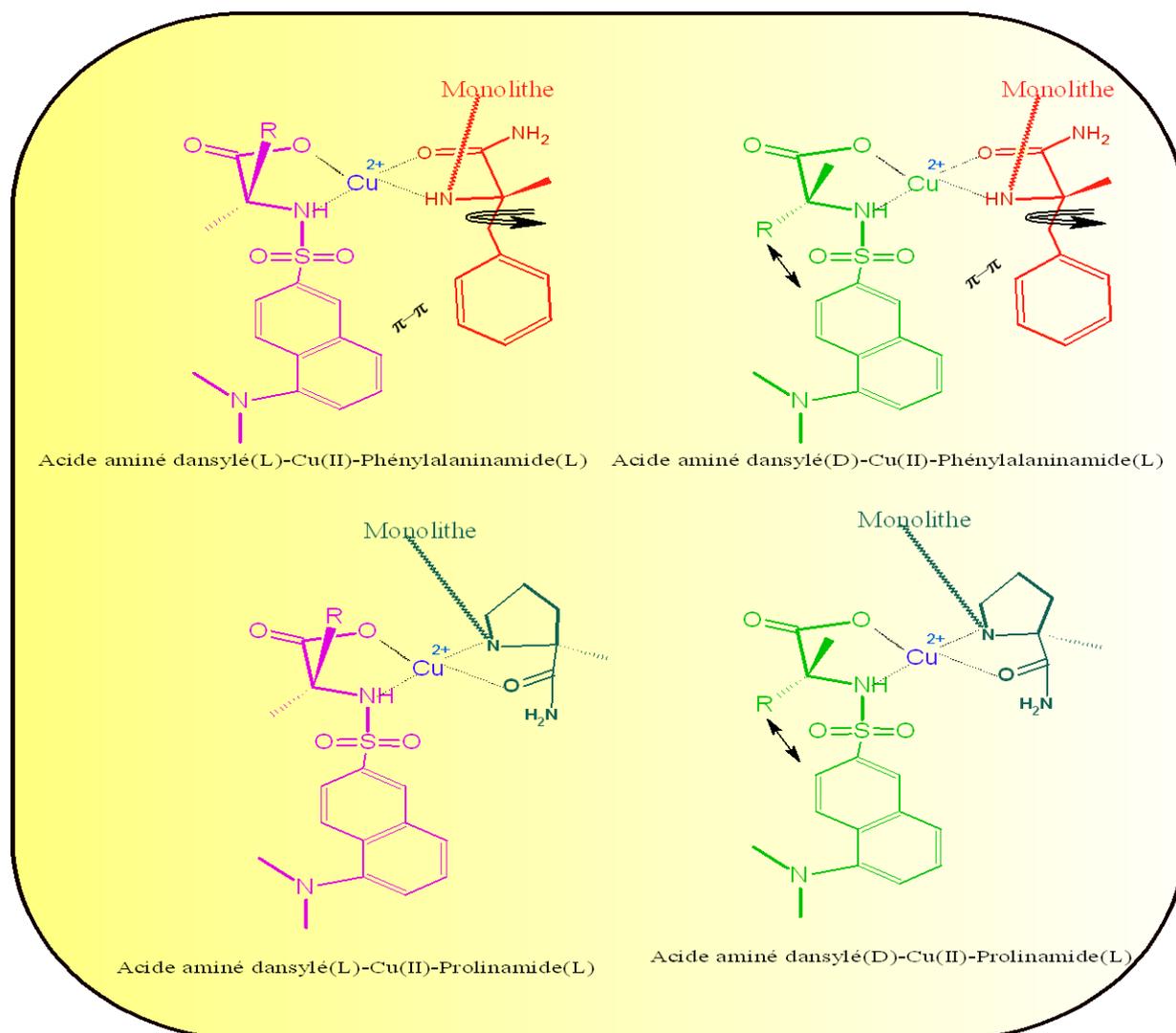


Figure 5 : Les structures proposées des complexes diastéréoisomériques obtenus entre des énantiomères d'acides aminés dansylés et le sélecteur chirale immobilisé sur support monolithique [42].

Ces phases ont montré une perméabilité élevée et ont permis la séparation chirale des acides aminés dansylés et de quelques hydroxyacides en micro CLHP. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le L-prolinamide.

4- Une autre approche intéressante de séparation chirale repose sur l'utilisation d'un polymère à empreinte moléculaire avec échange de ligands. Vidyasankar et al. [44] ont co-polymérisé sur gel de silice un diméthylacrylate d'éthylène-glycol et un complexe ternaire de N-vinylbenzyliminodiacétate-Cu(II)-D-phénylalanine immobilisé. Après élimination de

l'empreinte moléculaire (D-phénylalanine), ils ont obtenu une cavité imprimée chirale qui est capable de reconnaître sélectivement la D-phénylalanine, la D-tyrosine et la (S)- α -méthylphényléthylamine.

Pour conclure, on peut donner, d'une manière non exhaustive, des exemples de PSCs utilisées en CCEL et disponibles sur le marché, pour lesquelles le sélecteur chirale est greffé sur des matrices polymériques ou sur un gel de silice:

Nom commercial de la colonne	Ligand chirale	Nom de société
Chiralpak (WH)	(L)-Proline greffée sur gel de silice	Daicel (Japan) J. T. Baker(USA)
Nucleosil Chiral-1	L-Hydroxyproline greffée sur gel de silice	Macherey-Nagel (Germany)
Chiral Hypro-Cu-100	L-Hydroxy-proline greffée sur gel de silice	Serva (Germany)
ChirosolveD-Pipec	Acide (D)-Pipicolinique greffé sur gel de polyacrylamide	JPS Chimie (Switzerland)

Tableau 1 : Exemples de PSCs utilisées pour la séparation chirale par CCEL et disponibles sur le marché [43].

III.2 Les sélecteurs chiraux en CCEL immobilisés de manière non covalente sur un support chromatographique

La deuxième approche consiste à immobiliser le sélecteur chirale de manière non covalente sur un support : il sera adsorbé sur la surface chromatographique. Par ce mode dynamique décrit par Davankov [45], on peut préparer des PSCs par simple effet hydrophobe entre des dérivés alkylés du sélecteur chirale (heptyle, décyle ou hexadécyle) et des colonnes disponibles dans le commerce préalablement remplies de silice greffée par des chaînes octyles ou octadécyles, ou en carbone graphite poreux. La formation de complexes diastéréoisomériques ternaires dans ce cas, a lieu sur la surface de la phase stationnaire chirale. Des interactions

supplémentaires entre l'analyte à séparer et la surface de la PSC peuvent jouer un rôle important dans la reconnaissance chirale.

Une colonne sur laquelle a été dynamiquement immobilisée de la N-décyl-L-4-hydroxyproline a été commercialisée sous le nom « colonne de Davankov » par REGIS (Etats-Unis), et peut séparer sept couples d'énantiomères d'acides aminés (figure 6).

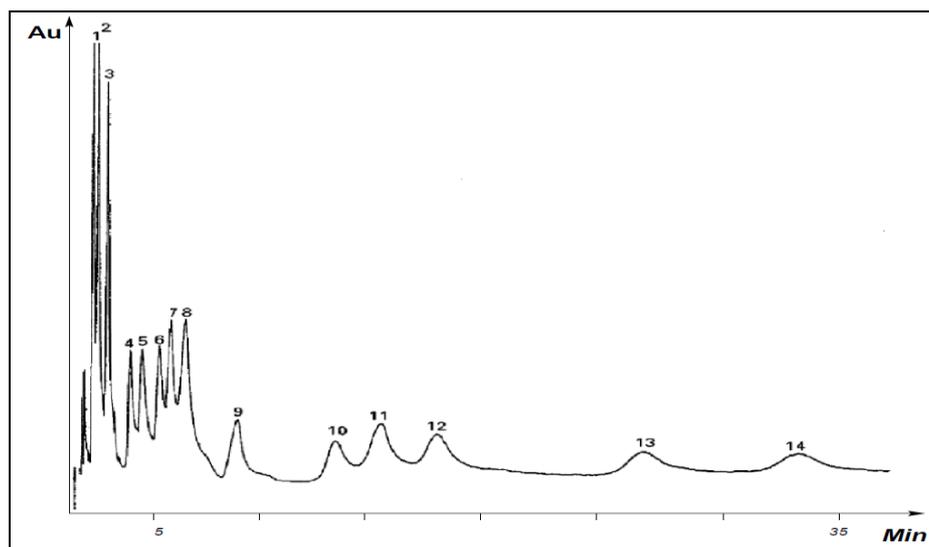


Figure 6 : Séparation d'un mélange de sept couples d'énantiomères d'acides aminés sur une colonne adsorbée de N-décyl-L-Hydroxyproline en polarité de phase inversée. Les conditions : colonne : 100 x 4.2 mm, LiChrosorb RP 18, dp 5µm. Phase mobile : (eau : méthanol) (15 : 85) + 0,1 mM acétate de Cu (II), pH : 5,0, débit : 2 ml/min; température : 20°C, UV 254 nm. Ordre d'élution : 1-L-alanine, 2- D-alanine, 3- L-valine, 4- L-arginine, 5- D-arginine, 6- L-leucine, 7- L-N-isobutyglycine, 8- D-valine, 9- L-phénylalanine, 10- D-leucine, 11- L-tryptophane, 12- D- N-isobutyglycine, 13- D-phénylalanine, 14- D-tryptophane [27].

Davankov [6] a également testé un autre sélecteur chirale, la N-décyl-L-histidine-Cu(II). Plusieurs types de sélecteurs chiraux, N-n-décyl-L-histidine-Cu(II) [47], N-n-décyl-L-spinacine-Cu(II) [48], N, N-dioctyl-D-pénicillamine-Cu(II) [10], N-substitué (S)-phénylglycinole-Cu(II) [53], (R, R)-acide tartrique mono (R)-1-(α -naphthyléthylamide)-Cu(II) [54], (R, R)-acide tartrique mono-L-valine (S)-1-(α -naphthyl)éthylamide)-Cu(II) [55], O-benzyl-(S)-sérine-Cu(II) [56] , S-benzyl-(R)-cystéine-Cu(II) [57] (figure 7) et N, N-dioctyl-L ou D-alanine-Cu(II) [49], immobilisés de manière non covalente sur un support chromatographique alkyle, ont montré une capacité à séparer des mélanges d'énantiomères.

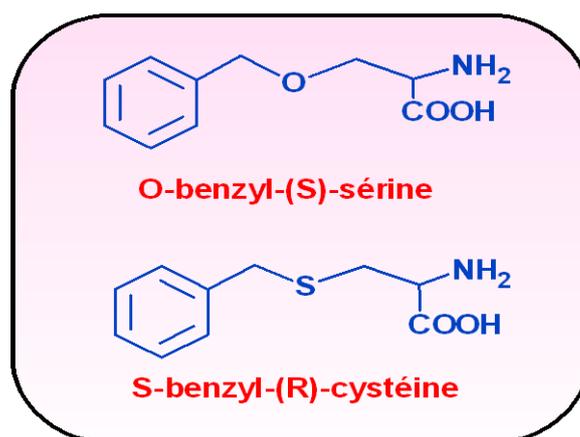


Figure 7 : Les ligands chiraux O-benzyl-(S)-sérine et S-benzyl-(R)-cystéine [56,57].

Plusieurs d'entre eux sont commercialisés et disponibles sur le marché sous une forme de colonne chromatographique. On peut citer :

- Les sélecteurs N,N-dioctyl-L-alanine-Cu(II) et N,N-dioctyl-D-alanine-Cu(II) qui sont commercialisés par Mitsubishi Kasei (Tokyo, Japon) sous les noms respectifs de MCI GEL CRS10W et CRS10WD (figure 8). Ces phases ont été utilisées pour la séparation d'énantiomères d'acides aminés. Nagasawa et al. [50] ont réussi à séparer les formes de D, D- méso et L, L de l'acide 2,6 diaminopimélique sur la colonne MCI gel CRS10W.

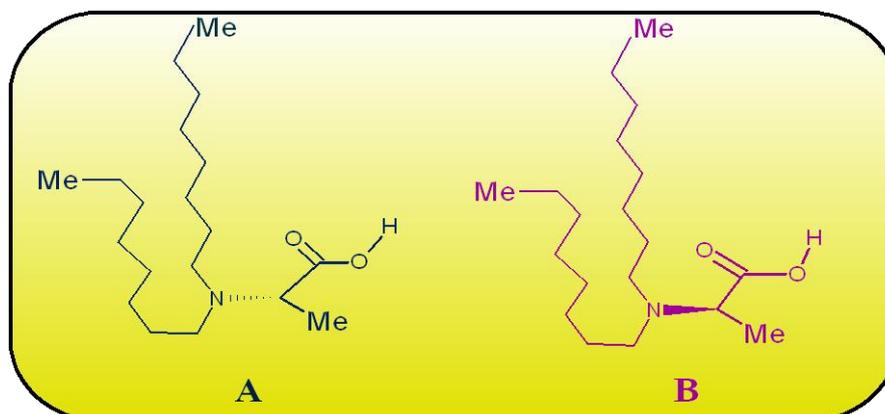


Figure 8 : Les ligands N,N-dioctyl-L-alanine (A) et N,N-dioctyl-D-alanine (B) [43].

- Le sélecteur N, S-dioctyl-D-pénicillamine-Cu(II) immobilisé sur un support C₁₈ a été commercialisé par Phenomenex (USA) sous le nom de Chirex (D) penicillamine et par Sumica Chemical Analysis Service (Osaka, Japon) sous le nom de Sumichiral OA-5000 (figure 9). Cette phase a des applications pour la séparation chirale d'énantiomères

d'acides aminés, d' α -alkyl-acides aminés [51], de plusieurs acides carboxyliques et de diamines [52].

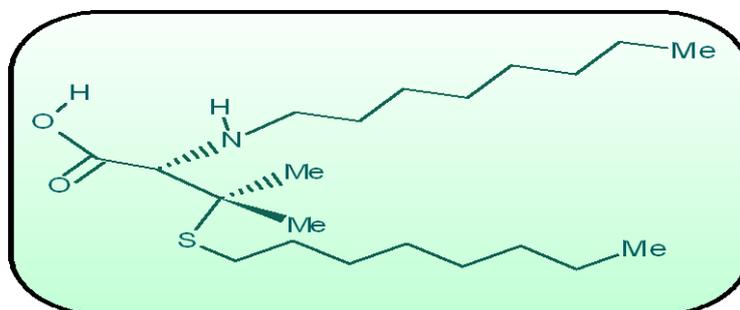


Figure 9 : Le ligand N, S-dioctyl-D-pénicillamine (Sumichiral OA-5000[®] ou Chirex (D) penicillamine[®])[43].

- Un autre sélecteur chiral disponible commercialement, est le (R, R)-acide tartrique mono (R)-1-(α - naphthyléthylamide)-Cu(II), qui est commercialisé sous le nom de Sumichiral OA-6000 (*figure 10*) par Sumica Chemical Analysis Service (Osaka, Japan). Ce sélecteur adsorbé sur un support chromatographique a été utilisé pour analyser les énantiomères de l'acide p-hydroxymandélique dans l'urine [54].

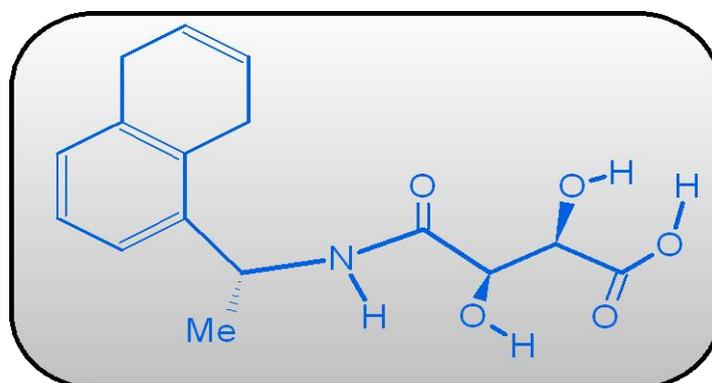


Figure 10 : Le ligand (R, R)-acide tartrique mono (R)-1-(α - naphthyléthylamide) (Sumichiral OA-6000[®]) [43].

- Le sélecteur chiral (R, R)-acide tartrique mono-L-valine (S)-1-(α -naphthyl)éthylamide-Cu(II) est commercialisé sous forme d'une colonne appelée Sumichiral OA-6100 (*figure 11*) et utilisé pour la détermination de la pureté énantiomérique de l'acétyl-L-carnitine. Une concentration de 0,1% de l'énantiomère en série D a pu être détectée comme impureté dans les échantillons d'acétyl-carnitine [55].

- Facilité et simplicité de préparation puisque ces phases sont préparées par introduction directe d'une solution de sélecteur chiral dans une colonne chromatographique achirale disponible dans le commerce.
- Elle permet de modifier l'énantiosélectivité des PSCs (par la modification de la structure du sélecteur chiral), la rétention des énantiomères (en variant la quantité du sélecteur chiral immobilisé) et leur ordre d'élution (en changeant la configuration du sélecteur).
- Le coût est relativement faible car la colonne chromatographique utilisée n'est pas chirale.
- On peut restaurer le support chromatographique en utilisant des solvants organiques comme le méthanol ou l'éthanol.

Par rapport aux phases stationnaires chirales pour lesquelles le sélecteur est attaché d'une manière covalente, les phases stationnaires sur lesquelles le sélecteur est adsorbé dynamiquement ne peuvent pas être utilisées avec tout type de phase mobile, le risque majeur étant la désorption du sélecteur [59].

III.3 Les sélecteurs chiraux en CCEL comme additifs de la phase mobile

La troisième approche se base sur l'utilisation de sélecteurs chiraux comme additifs de la phase mobile. Pour cela, ils doivent être solubles dans la phase mobile. Les énantiomères à séparer forment alors des complexes diastéréoisomériques avec le sélecteur chiral dans la phase mobile. Ceux-ci peuvent, par conséquent, être différemment retenus par interaction avec le support chromatographique de la colonne achirale. L'énantiomère qui forme un complexe diastéréoisomérique plus stable avec le sélecteur dans la phase mobile, sera élué en premier, par rapport aux modes précédents où l'énantiomère qui forme le complexe diastéréoisomérique le plus stable est élué en second.

En 1979 deux équipes différentes [60 -62] ont décrit ce modèle pour la première fois. LePage et al. [60] ont utilisé comme sélecteur chiral la L-2-alkyl-4-octyldiéthylentriamine complexée au Zn (II), afin de séparer les énantiomères des dérivés d'acides aminés dansylés sur une colonne achirale de type C₈.

La même équipe [61] a testé différents sélecteurs chiraux comme additifs de la phase mobile tels que la L-propyl-N-octylamine avec du Ni (II) pour la séparation chirale des amines et acides aminés. Plus tard, Gil-Av et al. [62,63] ont employé des complexes de [D- ou L-

proline-Cu(II)] en tant que sélecteurs chiraux pour la séparation d'énantiomères d'acides aminés.

D'autres ligands chiraux ont également été utilisés avec du cuivre (II). La plupart sont des dérivés d'acides aminés, comme l'ester méthylique de la L-histidine [64], la N-tosyl-L-phénylalanine [65], la L-phénylglycine [66], l'aspartame et son ester méthylique [67]. Mais également des alkylamides d'acides aminés [68,69].

Plusieurs énantiomères ont été séparés grâce à ce mode chromatographique : les acides aminés et leurs dérivés, les acides hydroxylés, les amides aminés, les dipeptides, les alcools aminés et d'autres molécules bifonctionnelles [60, 70,71].

L'avantage majeur de cette technique est de pouvoir tester différents types de sélecteurs dans un temps relativement court, par comparaison avec les autres modes de CCEL.

Par contre, ce mode chromatographique présente deux inconvénients: la consommation d'une grande quantité de sélecteurs chiraux et la difficulté d'une application en chromatographie préparative.

III.4 Optimisation des conditions de séparation chirale par CCEL

Généralement, pour réaliser une bonne séparation chirale par CCEL, plusieurs paramètres doivent être considérés. Parmi ces paramètres expérimentaux, une attention particulière a été portée sur l'éluant, le type et le pourcentage de solvant organique, la nature et la concentration de l'ion métallique, le pH, la température de la colonne et le débit de la phase mobile [74].

III.4.1 Composition de la phase mobile

En général, les phases mobiles sont constituées d'eau ou d'un tampon phosphate ou acétate. La concentration du tampon de la phase mobile est un facteur très important pour la séparation d'énantiomères par CCEL. Il est observé qu'une augmentation de la concentration du tampon acétate conduit à une diminution du temps de rétention et de la sélectivité pour tous les acides aminés, exceptés les acides aminés basiques [47]. Une étude a été effectuée afin d'optimiser la séparation chirale des acides aminés en faisant varier la concentration d'acétate d'ammonium (1, 10 et 100 mM) en utilisant deux dérivés de L-hydroxyproline-Cu(II) et L-proline-Cu(II) comme sélecteurs chiraux immobilisés de manière covalente sur un support de silice [8]. Cette étude montre une diminution de la valeur de la rétention pour une

concentration élevée d'acétate d'ammonium. Les auteurs ont expliqué ce résultat par la compétition entre l'ammonium et les acides aminés pour le sélecteur chiral. Davankov et ses collaborateurs [6] ont également étudié la résolution chirale de quelques acides aminés en utilisant le n-décyl-L-histidine-Cu(II) comme sélecteur chiral immobilisé de manière non covalente sur un support alkyle avec et sans chlorure d'ammonium dans la phase mobile. Les auteurs ont montré une diminution rapide de la résolution chirale après addition du chlorure d'ammonium dans la phase mobile. Ils ont expliqué ces résultats par l'effet de diminution du pH de la phase mobile en présence de chlorure d'ammonium. Celle-ci entraîne une protonation partielle des acides aminés fixes et mobiles. D'autre part la concentration importante du ligand (ammonium) influence la coordination des acides aminés avec le cuivre (II).

Plusieurs solvants organiques ont été utilisés dans la phase mobile afin d'améliorer la résolution, comme par exemple l'acétonitrile [75], le méthanol, l'éthanol et le tétrahydrofurane (THF) [6, 8, 76, 77]. Généralement, l'addition de solvant organique à la phase mobile permet de modifier la rétention des solutés. Classiquement, une augmentation de la teneur en solvant entraîne une diminution de la rétention. Celle-ci est surtout utilisée dans le cas de séparations d'énantiomères à forte rétention sur la PSC, car ces ajouts de solvants organiques réduisent l'effet hydrophobe conduisant à l'amélioration de la séparation. Roumeliotis et al. [8, 76] ont étudié l'effet des ajouts de solvant comme le méthanol, l'acétonitrile et le tétrahydrofurane sur la résolution chirale d'acides aminés analysés sur une colonne contenant le sélecteur L-hydroxyproline-Cu(II) immobilisé de manière covalente sur un support de silice. Ils ont rapporté que l'utilisation du méthanol dans la phase mobile permet d'atteindre des valeurs plus élevées de résolution et d'énantiosélectivité. Row et ses collaborateurs ont également testé les mêmes solvants pour la séparation des énantiomères de l'ofloxacin avec deux sélecteurs chiraux différents, la L-leucine-Cu(II) [80] et la L-phénylalanine-Cu(II) [81]. La meilleure séparation a été obtenue avec le méthanol à un pourcentage de 12% pour la L-leucine et de 20% pour la L-phénylalanine dans la phase mobile.

Seulement quelques publications ont démontré une utilisation de PSCs en phase normale [27, 78,79].

III.4.2 pH de la phase mobile

Le pH de la phase mobile est considéré comme le facteur le plus important, qu'il faut optimiser en premier [82]. Globalement, le pH a une grande influence sur l'état d'ionisation des ligands et agit donc sur la formation des complexes diastéréoisomériques.

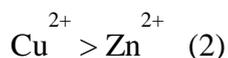
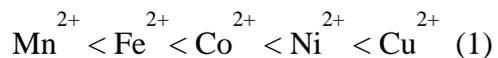
En général, une augmentation du temps de rétention de tous les racémates est observée lorsque le pH de la phase mobile croît [19]. Watanabe et al. [87] ont étudié l'effet du pH (4 – 5,5) sur la résolution chirale de l'asparagine, de la thréonine et de l'histidine en utilisant un dérivé de l'histidine-Cu (II) immobilisé de manière covalente comme sélecteur chiral. Ils ont indiqué que la valeur optimale du pH pour la séparation d'énantiomères d'acides aminés est 5,5. Roumeliotis et al. [76] ont obtenu de meilleurs résultats à pH 4,5. En outre, Roumeliotis et al. [8] ont optimisé la séparation chirale des acides aminés sur différentes PSCs en utilisant une phase mobile de différents pH. La meilleure résolution a été obtenue avec un pH de 4,75. Par contre, Gübitz et Juffmann [86] ont réalisé la séparation des énantiomères de la thyroxine avec une phase mobile à pH 8,5.

Généralement, la zone optimale de pH pour la séparation chirale des α -acides aminés est comprise entre 4,5 et 6 [7, 63, 83-85].

III.4.3 Nature et concentration du cation métallique

Les cations métalliques utilisés en CCEL, sont principalement des cations de métaux de transition : Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} qui donnent des complexes stables avec des ligands très variés.

Irving-Williams a classé des complexes constitués par un cation métallique selon leurs stabilités relatives [93] :



Parmi ces cations, on peut observer que l'ion cuivrique convient le mieux car il donne des complexes plus stables avec un grand nombre de ligands et ces complexes sont facilement détectables (généralement, les solutés sont élués sous la forme de complexes avec le cuivre (II) qui absorbent, pour la plupart d'entre eux, dans l'ultraviolet). De petites quantités d'ions Cu^{2+} sont généralement ajoutées à la phase mobile de façon à maintenir la capacité d'échange de ligands de la colonne chromatographique constante et à empêcher sa variation au cours de l'analyse [88].

Watanabe et al. [87] ont étudié l'influence de la concentration de cuivre (II) sur la résolution chirale de la glutamine, de la thréonine et de l'asparagine. Ils ont trouvé que la meilleure résolution était observée à la concentration de 0,5 mM de cuivre (II). Les auteurs ont proposé d'éviter l'utilisation d'une trop grande concentration d'ions cuivriques car elle augmente la limite de détection des composés étudiés. Davankov et ses collaborateurs [6] ont également effectué une étude sur l'effet de la variation de la concentration en acétate de cuivre (de 0,05 mM à 0,2 mM) dans la phase mobile sur la séparation chirale d'acides aminés. Ils ont observé qu'une augmentation de la concentration de cuivre (II) entraîne une diminution du temps de rétention des énantiomères. Okubo et al. [89] ont fait varier la concentration du sulfate de cuivre de 0,5 à 2 mM dans la phase mobile pour la séparation des énantiomères du lactate en utilisant un dérivé de la L-proline-Cu(II) comme sélecteur chiral immobilisé de manière covalente sur gel de polyméthacrylate. Avec une concentration de 1 mM, la résolution des énantiomères est meilleure.

Li et son équipe [90] ont testé le complexe de L-aspartame-cuivre(II) comme additif à la phase mobile pour la séparation chirale de quelques antifongiques par CCEL. Ils ont obtenu une résolution optimale avec 1 mM d'acétate de cuivre dans la phase mobile. L'augmentation de la concentration en cuivre (II) de 1 à 2 mM n'a pas modifié la rétention ni la résolution, mais a entraîné une augmentation significative du bruit de fond en raison de l'absorbance élevée de la phase mobile. Une diminution de la concentration de cuivre (II) à 0,5 mM a entraîné une diminution de la résolution et une augmentation du temps de rétention.

III.4.4 Nature des contre-ions du cation métallique utilisé

Remelli et al. [47] ont étudié, pour la séparation d'énantiomères d'acides aminés, l'effet des contre-ions du cuivre (II) (acétate, chlorure, nitrate, perchlorate, sulfate) dans la phase mobile avec de la N-n-décyl-L-histidine comme ligand chiral adsorbé sur un support C₁₈. Les résultats obtenus montrent que l'anion du sel cuivrique utilisé dans la phase mobile n'a que peu d'influence sur le temps de rétention ou sur l'énantiosélectivité. Néanmoins en utilisant l'acétate de cuivre dans la phase mobile, la rétention et l'énantiosélectivité sont plus élevées.

Plusieurs types de sels cuivriques organiques (acétate, formate) et inorganiques (bromure, chlorure, nitrate, perchlorate, sulfate) ont également été testés pour la séparation d'énantiomères d'acides aminés aliphatiques (allo-isoleucine, isoleucine, leucine, norleucine, norvaline, valine) et d'acides aminés aromatiques (acide 1-aminoindane-1,5-dicarboxylique

(AIDA), 2-(5'-carboxy-thien-2'-yl) glycine (ATIDA), phénylglycine, tyrosine, histidine, phénylalanine) par Natalini et al. [74], sur une colonne chromatographique chirale contenant la S-trityl-(R)-cystéine comme ligand chiral immobilisé d'une manière non covalente sur un support C₁₈. La variation de la nature des sels de cuivre (II), entraîne un changement significatif du facteur de résolution. Pour presque tous les acides aminés aliphatiques et aromatiques testés, les valeurs de résolution les plus élevées sont obtenues avec le nitrate de cuivre alors que l'acétate de cuivre donne les valeurs les plus faibles. Le même groupe [56] a également testé plusieurs types de sels de cuivre (II) (acétate, chlorure, nitrate, perchlorate, sulfate) pour séparer des énantiomères d'acides aminés naturels et de synthèse en utilisant la O-Benzyl-(S)-sérine (OBS) comme ligand chiral ajouté à la phase mobile ou immobilisé dynamiquement sur un support C₁₈. Ils ont également démontré que le nitrate de cuivre permet d'atteindre les valeurs de résolution et d'énantiosélectivité les plus élevées.

III.4.5 Température

La température est également un paramètre très important pour optimiser la séparation chirale par CCEL. En général l'augmentation de la température de la colonne chromatographique conduit à une diminution du temps de rétention [89] et des valeurs d'énantiosélectivité [19]. Au contraire, l'efficacité de la colonne est augmentée car le transfert de masse des composés entre les phases mobiles et stationnaires est plus rapide [90]. Les valeurs de résolution associées sont très souvent réduites lors de l'augmentation de la température de la colonne chromatographique [90].

III.4.6 Débit de la phase mobile

Il y a très peu de données sur l'optimisation de la résolution chirale par ajustement du débit de la phase mobile. Ainsi, Davankov a indiqué qu'une meilleure résolution peut être réalisée à faible débit [73], le même résultat a été obtenu par Gui-Juan et al. [72]. Jin et He [91] ont étudié l'effet du débit de la phase mobile (débits compris entre 0,12 et 0,56 mL /min) sur la séparation chirale des acides aminés. Ils ont montré que la sélectivité et la résolution augmentent lorsqu'un débit faible est appliqué. Aboul-Enein et Ali [79] ont mis en évidence une meilleure résolution pour la séparation des énantiomères de l'éconazole, du miconazole et du sulconazole à un débit de 0,5 mL /min. Ce faible débit permet un temps de contact important des énantiomères dans la PSC, ce qui améliore le processus d'échange de ligands.

IV Séparation chirale par échange de ligands en électrophorèse capillaire

Trois modes d'électrophorèse capillaire ont été développés pour la séparation des énantiomères : l'électrophorèse capillaire de zone (ECZ), la chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC) et l'électrochromatographie (ECC). Deux stratégies sont adoptées pour la discrimination chirale par échange de ligands [92]:

- Le mode dynamique où la séparation est effectuée en ajoutant le sélecteur chiral au tampon de migration pour former des complexes diastéréoisomériques (ECZ, MEKC).
- La séparation directe des énantiomères sur phase stationnaire chirale (PSC) qui contient le sélecteur chiral immobilisé. Dans ce cas, des complexes diastéréoisomériques labiles sont formés sur les supports chiraux (ECC).

IV.1 Électrophorèse capillaire de zone (ECZ)

La première application de discrimination chirale par échange de ligands en électrophorèse capillaire a été rapportée par Zare et al. en utilisant des complexes L-histidine-cuivre(II) [18] comme additifs au tampon de migration pour la séparation des énantiomères d'acides aminés natifs et dansylés. Globalement, trois approches sont utilisées :

- La première approche est basée sur l'ajout d'un complexe (ligand chiral-cuivre(II)) au tampon de migration (*figure 13*). Les énantiomères forment un complexe ternaire diastéréoisomérique présentant différentes stabilités et / ou différentes mobilités [94-101].

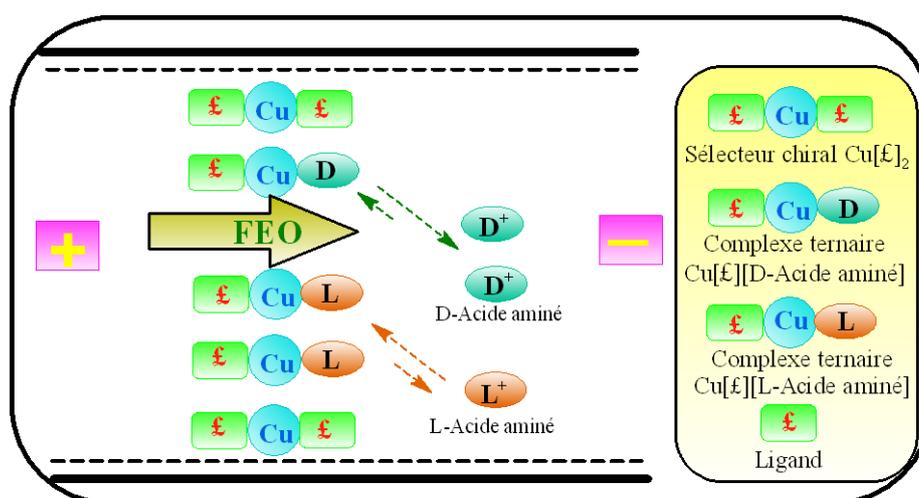


Figure 13 : Principe d'échange de ligands en électrophorèse capillaire [102].

En général, le mécanisme de séparation chirale par échange de ligands dépend de plusieurs paramètres électrophorétiques tels que la nature du tampon de migration (solvants organiques, pH d'électrolyte), la température appliquée, la nature et la concentration en sélecteur chiral [103].

Des travaux ont montré que le principe d'échange de ligands pouvait être appliqué en milieu non aqueux, en utilisant des complexes cuivriques de la L-proline ou de la L-isoleucine comme sélecteurs chiraux [104].

- La deuxième approche est fondée sur la combinaison de deux principes différents de séparation chirale, l'échange de ligands et la formation de complexes d'inclusion hydrophobes (cyclodextrines (CD)). La première application de ce principe a été présentée par Horimai et al. [105] qui ont employé un système basé sur l'utilisation de deux sélecteurs chiraux, le γ -CD et le complexe D-phénylalanine-Zn(II) pour séparer quelques dérivés de quinolones. Ils ont constaté que des complexes ternaires diastéréoisomériques de dérivés de quinolones-Zn(II)-D-phénylalanine étaient formés. Aucune séparation n'est obtenue en l'absence de γ -CD. Les auteurs ont supposé que des inclusions différentielles, entre les deux complexes diastéréoisomériques se déroulaient, à l'intérieur de la cavité de la cyclodextrine. À la suite de ces résultats, une nouvelle méthodologie a été utilisée, basée sur l'immobilisation covalente du ligand chirale sur la CD (*figure 14*) [106-109].

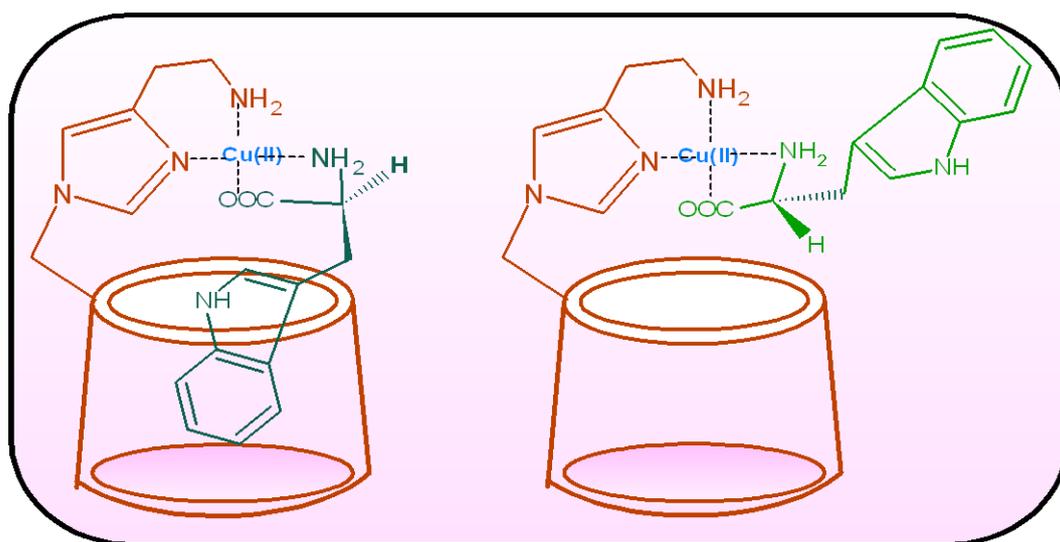


Figure 14 : Mécanisme proposé de la séparation chirale du tryptophane par échange de ligands en utilisant une β -CD modifiée par une histamine comme ligand chirale [107].

- La troisième approche est basée sur la formation des complexes mixtes (énantiomère–borate–ligand chirale) pendant l'analyse électrophorétique. Afin de former ces complexes, l'énantiomère à séparer et le ligand chirale doivent posséder un groupement diol (cis-1, 2 diols ou cis-1, 3 diols par exemple) (*figure 15*) [110-114].

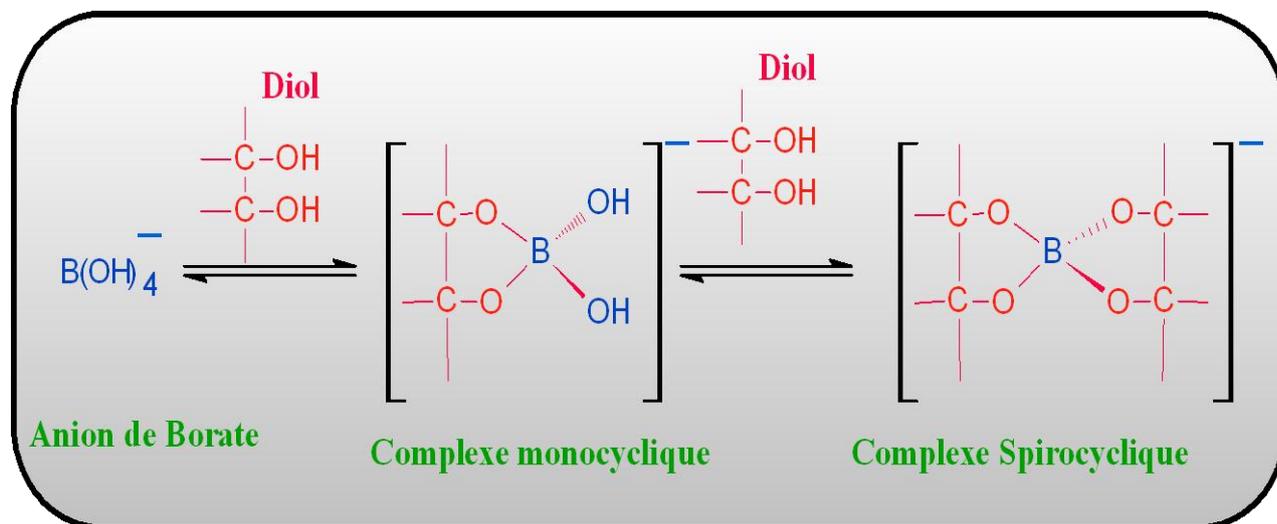


Figure 15: Formation des complexes mixtes de borate [114].

IV.2 Chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC)

La MEKC consiste à ajouter des micelles ioniques ou neutres qui jouent le rôle de pseudo-phase stationnaire dans la solution électrophorétique (tampon de migration) afin de séparer des petites molécules neutres, hydrophobes, hydrophiles ou chargées (*figure 16*). La séparation des composés est fondée sur leur partage entre la micelle et le tampon de migration [115]. Le pH du tampon est un paramètre déterminant puisqu'il conditionne l'ionisation du surfactant (dans le cas d'un surfactant non neutre) et la vitesse du flux électroosmotique.

Les surfactants utilisés sont constitués d'une chaîne hydrophobe et d'une tête hydrophile. Ils sont employés à une concentration supérieure à leur concentration micellaire critique (CMC). L'orientation tête – queue des molécules au sein de la micelle dépend de la polarité du solvant de solubilisation.

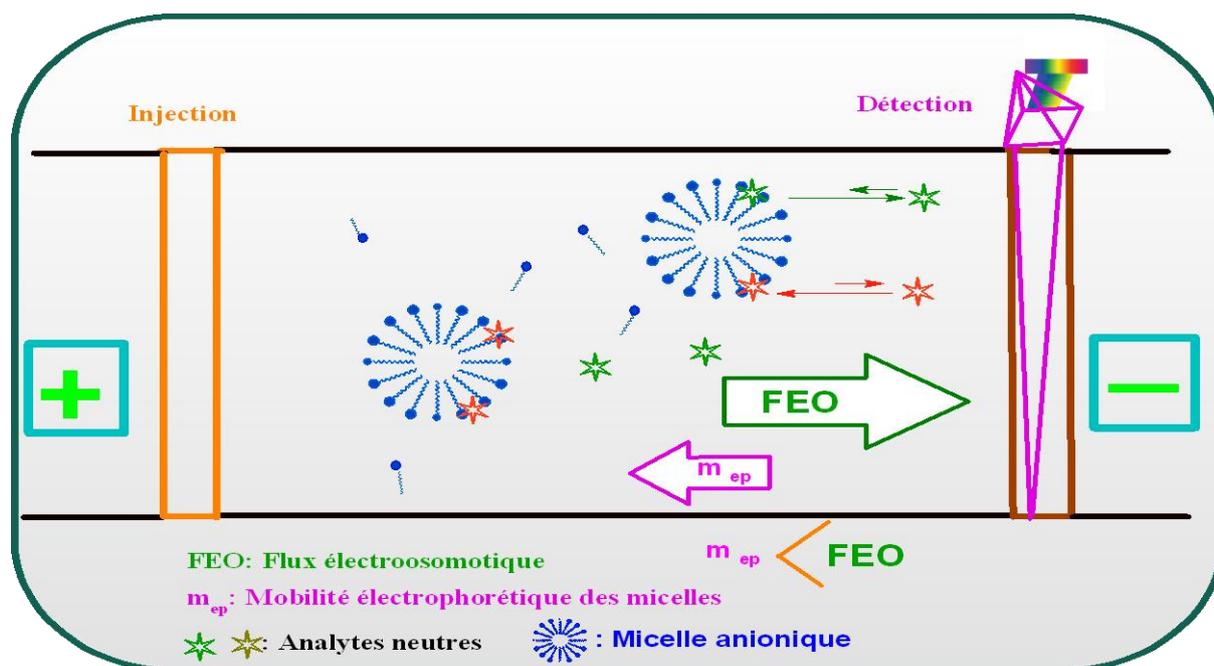


Figure 16 : Principe de séparation en électrophorèse micellaire (surfactant anionique). Adapté de [102].

Deux approches distinctes permettent de séparer les énantiomères en MEKC utilisant les surfactants chiraux et achiraux.

Les surfactants chiraux peuvent être divisés en deux principaux groupes :

- Les surfactants naturels tels que les sels biliaries (acide cholique), les saponines ou leurs dérivés organiques, la digitonine.
- Les surfactants synthétiques comme les N-alkanoyl-L-acides aminés, les N-dodécoxycarbonyl acides aminés, l'alkylglucoside, les glycosides stéroïdiens, l'acide tartrique (R, R) et les acides aminés polymériques [116].

Parmi les surfactants chiraux naturels, les sels biliaries sont les surfactants les plus utilisés [117]. Ils sont capables de discriminer les énantiomères de composés rigides tels que les hydrocarbures polyaromatiques planaires. Cependant, l'utilisation de surfactants synthétiques offre de nombreux avantages par rapport aux surfactants naturels. De part un transfert de masse plus rapide du soluté du tampon de migration vers la micelle, l'efficacité et la résolution sont meilleures [118]. De plus, ils montrent une plus grande stabilité chimique (pH extrêmes et haute tolérance aux solvants organiques (50 - 60 %)).

La deuxième approche est reliée à l'utilisation d'un surfactant achiral auquel est ajouté un sélecteur chiral. Cette approche est particulièrement bien adaptée pour la séparation énantiomérique des composés hydrophobes. La majorité des applications décrivent l'addition conjointe d'une cyclodextrine neutre avec le sodium dodécyle sulfate (SDS). En effet, en

MEKC classique, les composés hydrophobes montrent trop d'affinité envers la micelle et ne se partagent pas suffisamment entre les phases micellaires et aqueuses. Avec les sélecteurs chiraux de type cyclodextrine, chaque énantiomère, complexé préférentiellement soit par la micelle soit par la CD, possède des mobilités électrophorétiques différentes, ce qui explique leur séparation.

La première application de l'échange de ligands en MEKC pour la séparation chirale des acides aminés dansylés a été rapportée par le groupe de Zare en utilisant des complexes de cuivre(II)-aspartame [119] comme additifs au tampon de migration qui contient un surfactant achiral de type tétradécyle sulfate de sodium (STS). Les ligands les plus souvent utilisés sont les suivants : N,N-didécyl-L-alanine[120, 121], L-proline[122] ou L-hydroxyproline [122,124,125, 126], L-lysine[123], L-valine[127], D-pénicillamine[128]. Le SDS est le surfactant achiral le plus couramment employé.

Deux équipes différentes [120,121] ont décrit la participation du ligand chiral alkylé (N, N-didécyl-L-alanine) dans les micelles mixtes formées avec le surfactant achiral (SDS) permettant à la partie hydrophile de l'alanine de complexer le cuivre (II) présent dans la solution.

Plusieurs équipes ont effectué une étude comparative de la séparation des énantiomères d'acides aminés natifs ou dérivés en électrophorèse capillaire de zone et MECK [122,123, 125]. Ils ont prouvé que l'addition de SDS à un tampon de migration contenant le complexe ligand-Cu(II) améliorerait significativement la résolution, inversait l'ordre de migration des acides aminés et les séparait en fonction de leur hydrophobie. Ils ont montré que l'effet hydrophobe et les interactions électrostatiques avec les micelles chargées négativement sont probablement responsables de ce phénomène.

IV.3 Electrochromatographie

L'électrochromatographie est une technique séparative qui conjugue les phénomènes d'électrophorèse capillaire (EC), avec une séparation sous champ électrique, et les phénomènes de chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP), qui impliquent des interactions entre les analytes et une phase stationnaire. Les solutés se déplacent vers le détecteur selon deux processus, l'un de migration électrophorétique et l'autre de rétention chromatographique.

Généralement, l'électrochromatographie peut être réalisée en utilisant trois types de capillaires: le capillaire ouvert, où le sélecteur est greffé sur la paroi du capillaire, les capillaires remplis de particules et les colonnes monolithiques. Le principe d'échange de ligands en électrochromatographie a été décrit avec les colonnes monolithiques et particulaires [129].

Deux étapes principales ont été établies pour créer ces colonnes:

- Fixation ou greffage du ligand sur le support.
- Saturation des sites actifs du sélecteur chirale par le passage d'une phase mobile contenant l'ion métallique (cuivre (II)).

Le principe d'échange de ligands, en électrochromatographie chirale, a été présenté pour la première fois par Schmid et al. pour la séparation chirale des acides aminés en utilisant des phases stationnaires monolithiques à base de polymères organiques. Ils ont immobilisé les ligands par des réactions de copolymérisation « in situ » [130].

Chen et Hobo ont rapporté la synthèse d'une nouvelle colonne capillaire chirale monolithique à partir de la polycondensation du tétraméthoxysilane dans le processus sol-gel en utilisant, la L-phénylalaninamide[131], la L-alaninamide[131], la L-prolinamide[132], la L-lysineamide [133], la L-hydroxyproline [134] comme ligand chirale (*figure 17*).

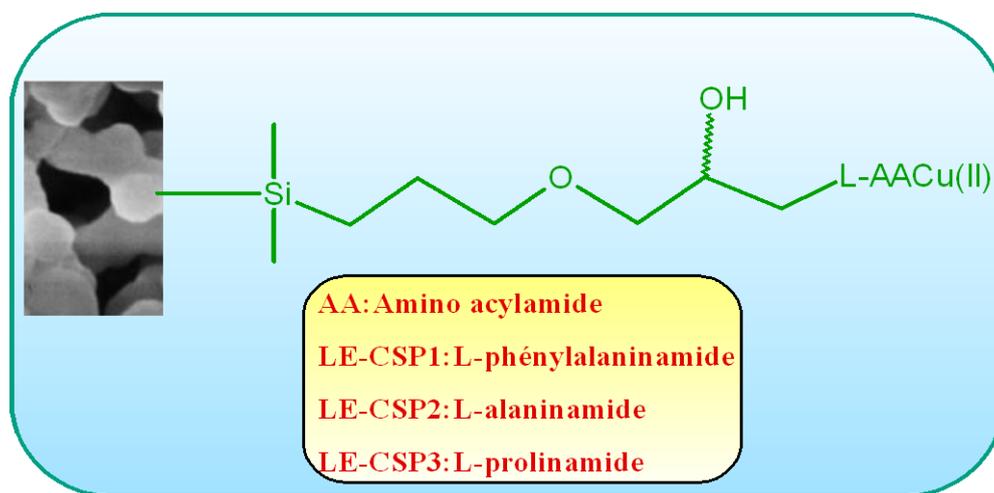


Figure 17 : Structure chimique de la phase stationnaire chirale monolithique synthétisée par Chen et al. [102].

Ces colonnes produisent un flux électroosmotique (FEO) important et inversé, en raison des charges positives créées par les complexes avec le cuivre (II) sur la paroi de la colonne monolithique [102].

Le deuxième type de capillaire utilisé en électrochromatographie par échange de ligands est le capillaire rempli de particules [129]. Deux approches différentes ont été utilisées pour créer les PSCs. La première est basée sur l'immobilisation covalente entre le sélecteur chirale et le gel de silice par l'intermédiaire d'un bras espaceur. La deuxième approche consiste à immobiliser les dérivés alkylés du sélecteur chirale de manière non covalente sur un support chromatographique. Pittler et al. [129] ont présenté les deux types d'immobilisation en utilisant la L-4-hydroxyproline comme ligand chirale pour la séparation des énantiomères d'acides aminés, d'acides hydroxylés et de dipeptides. Ils ont montré que la PSC contenant le ligand immobilisé de manière covalente présente une meilleure énantiosélectivité pour la séparation des énantiomères d'acides aminés et de dipeptides. Par contre, la PSC contenant le ligand immobilisé de manière non covalente montre une énantiosélectivité supérieure pour la séparation des énantiomères d'acides hydroxylés.

V Applications

Le domaine d'application de la chromatographie chirale par échange de ligands est très vaste puisque cette technique permet de séparer, en principe, tous les solutés donneurs de doublets électroniques. Ils doivent être bifonctionnels pour établir deux liaisons avec le cation métallique. La plupart des applications concerne la séparation de molécules azotées (amines, acides aminés, peptides, etc ...).

Les phases stationnaires de type CCEL ont permis la résolution de mélanges racémiques d'acides aminés et de leurs dérivés [85, 135, 136], d'acides α -hydroxycarboxyliques [83], d'amino-alcools [137] et de composés possédant une fonction imide. Les énantiomères d'hormones thyroïdiennes [86], de β -bloquants [83], d'antifongiques [79], de pénicillamine [138], d'ofloxacine [80, 81], de lactate [89], de dipeptides [82], ont également été séparés en utilisant ce type de phases stationnaires chirales.

VI Les aminoglycosides en CCEL

VI.1 Propriétés pharmacologiques et structurales

Les aminoglycosides sont des pseudo-polysaccharides polyaminés synthétisés par les bactéries pour lutter contre d'autres bactéries. Les premiers composés de cette famille ont été découverts dans les années 40. Ils sont doués d'une activité antibiotique et possèdent un spectre d'activité antibactérienne étendu et variable selon les composés.

La plupart des aminoglycosides ont un effet antibiotique à la fois contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. En revanche, tous les aminoglycosides sont inactifs sur les bactéries anaérobies et les mycoplasmes.

De nombreux aminoglycosides (apramycine, hygromycine B, néomycine, etc...) se fixent au niveau de l'ARN ribosomal 16S, sur le site de décodage de l'ARN de transfert aminoacylé (site A). Cette fixation perturbe la synthèse des protéines provoquant ainsi un effet bactéricide [139]. Cependant, la forte toxicité au niveau des reins (néphrotoxicité) et des oreilles (ototoxicité), l'apparition rapide de résistance, la mauvaise biodisponibilité orale et l'instabilité de ces antibiotiques ont limité leur utilisation [140].

La néamine est un antibiotique 20 fois moins toxique que la néomycine, mais de plus faible affinité pour le site A et de moindre efficacité [152]. Plus récemment, il a été découvert que la néamine et ses dérivés présentent aussi, *in vitro*, un effet contre le virus du VIH-1 [153, 154].

La majorité des aminoglycosides ont pour élément de structure commun le cycle streptomine ou 2-déoxystreptomine (2-DOS) lié par liaison glycosidique à une ou deux unités mono ou disaccharidiques. La paromamine et la néamine, constituées du cycle 2-déoxystreptomine lié par liaison glycosidique sur la position 4, constituent les motifs de base de deux grandes familles d'aminoglycosides : la famille de la paromomycine à laquelle la néomycine appartient, ainsi que la famille de la kanamycine (*figure 18*).

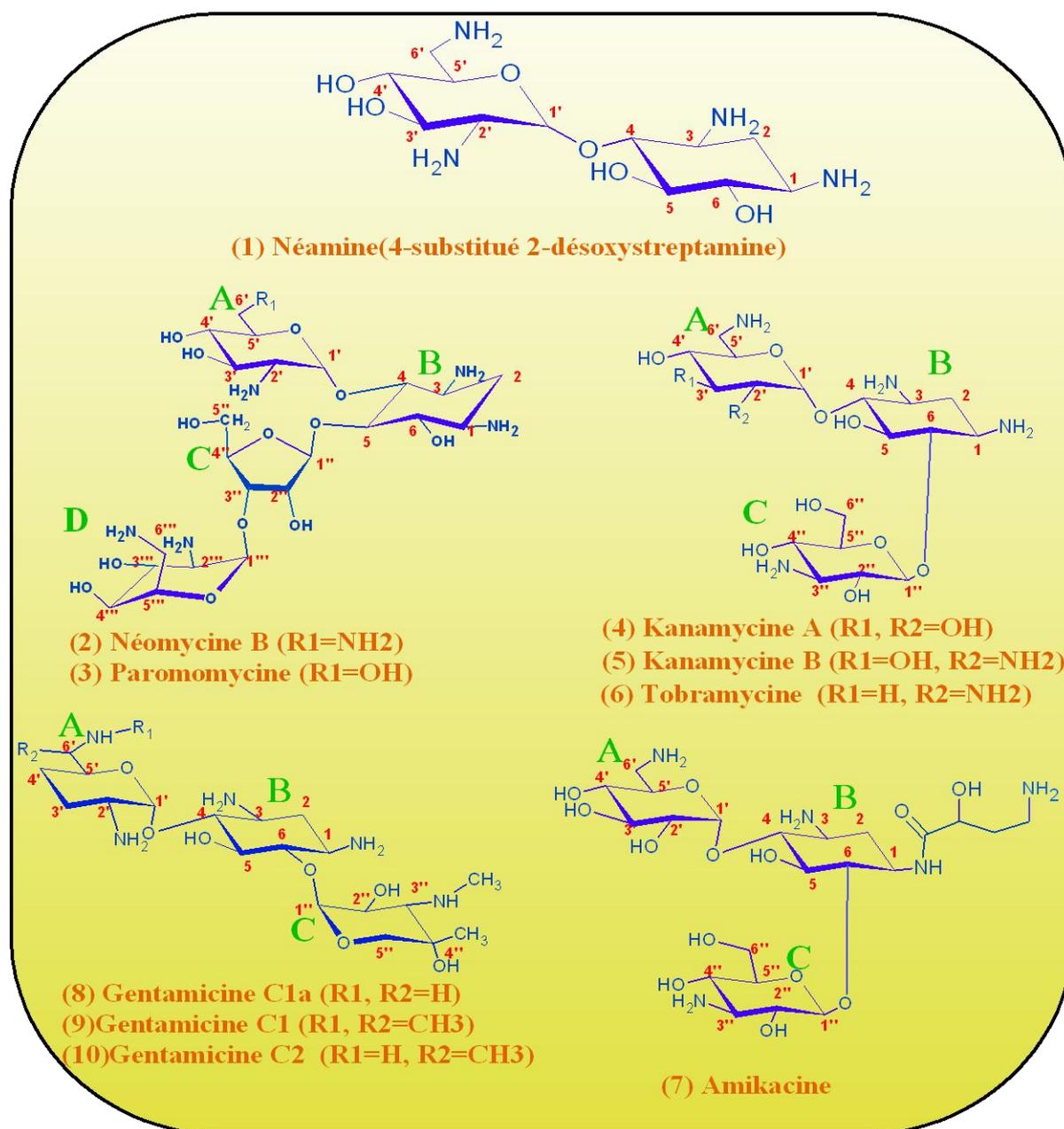


Figure 18 : La famille d'aminoglycosides [155].

VI.2 Propriétés de complexation des cations métalliques par les aminoglycosides

Les aminoglycosides de type néamine et kanamycine sont capables de complexer avec de fortes affinités des cations métalliques tels que le Cu(II) [141] (*figure 19*). Ces complexes d'aminoglycosides-Cu(II) peuvent être liés aux activités pharmacologiques et à la toxicité des aminoglycosides [141-149].

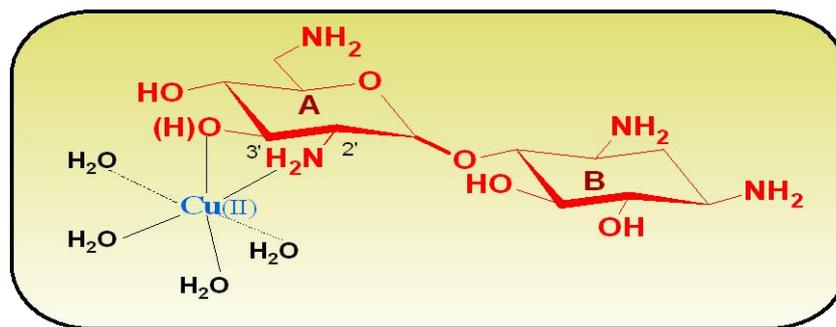


Figure 19 : Complexe néamine-Cu(II) [141].

Une étude par RMN [150] a mis en évidence huit complexes possibles (*figure 20*) entre la néamine et le cuivre (II). Elle a montré que parmi les 4 groupements amino de la néamine, il y a deux groupements (localisés en position C2' et C1) qui coordonnent fortement le cuivre (II).

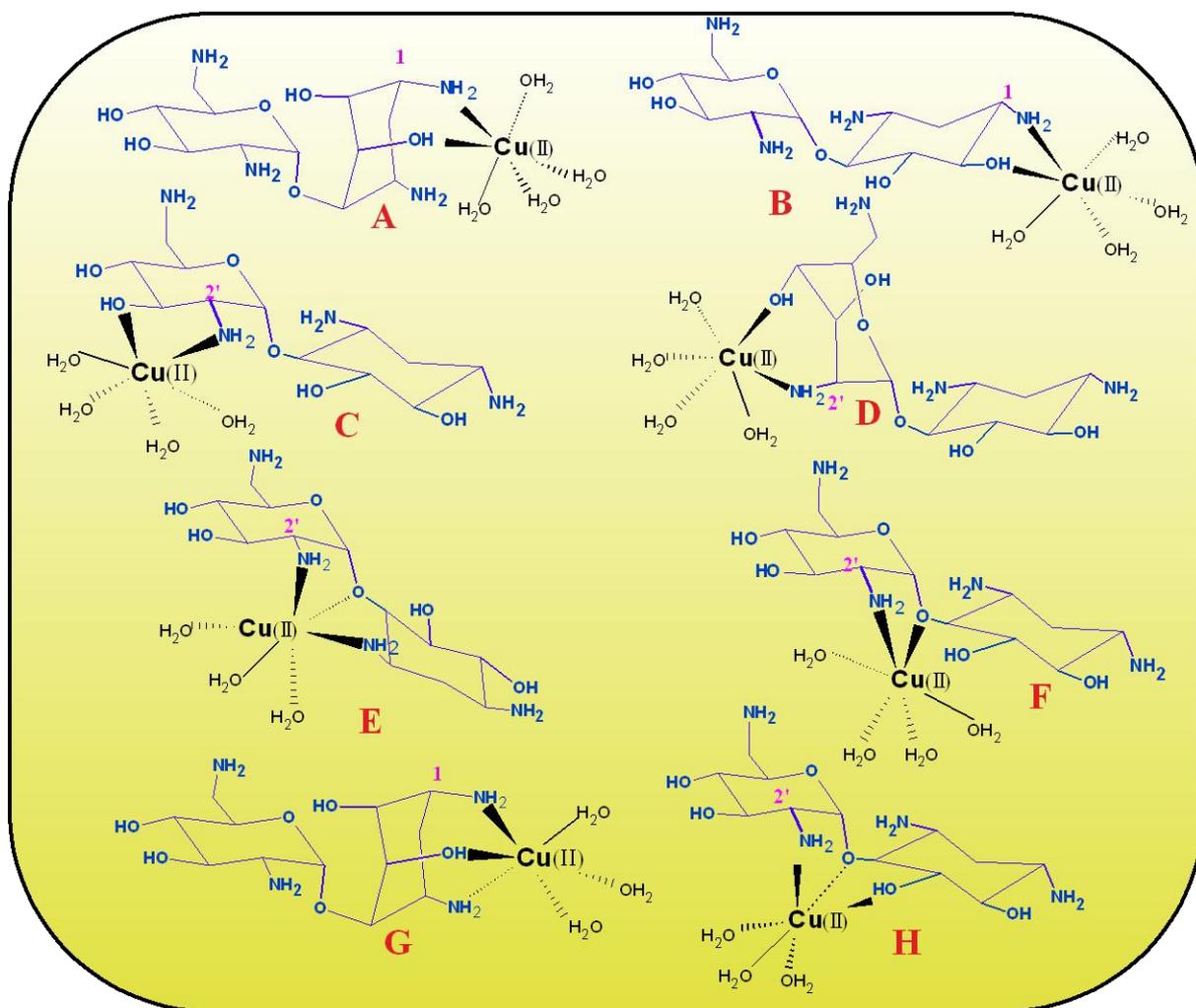


Figure 20 : Les complexes possibles entre le cuivre (II) et la néamine (A, B, C, et D prédominent dans la solution) [150].

Une autre étude, réalisée par Cowan et ses collaborateurs [141], a montré que les complexes formés entre le cuivre (II) et la néamine faisaient intervenir principalement le groupement amino du carbone C2' et la fonction hydroxyle située en position 3'. Ainsi la propriété des aminoglycosides à complexer les cations métalliques (surtout le cuivre (II)) permet d'envisager leur utilisation, la néamine en particulier, en chromatographie chirale par échange de ligands.

VI.3 Utilisation des aminoglycosides en séparation chirale

L'utilisation des aminoglycosides en séparation chirale est très rare. Nishi et al. [151] ont utilisé trois aminoglycosides, caractérisés par leur faible masse moléculaire et leur faible absorbance UV (sulfate de fradiomycine, sulfate de kanamycine et sulfate de streptomycine), comme agents de résolution chirale en électrophorèse capillaire (EC) (conditions opératoires sans cuivre (II)). L'utilisation de ces antibiotiques aminoglycosidiques en EC a permis de séparer les énantiomères de plusieurs molécules chirales telles que le 1,1'-binaphthyl-2,2'-diyl hydrogénophosphate, l'acide 1,1'-binaphthyl-2,2'-dicarboxylique et un intermédiaire de synthèse du clentiazem. Cependant, leur énantiosélectivité réduite et leur forte adsorption sur les parois du capillaire ont limité leur utilisation. Nishi et al. ont montré, par contre, que l'ajout du méthanol au tampon de migration améliorait la forme du pic et l'énantiorésolution.

VI.4 Les dérivés lipophiles de la néamine

Des méthodes de synthèse de nouveaux dérivés aminoglycosidiques ont été développées par l'équipe EMAN du Département de Pharmacochimie Moléculaire, afin d'obtenir des agents antibiotiques ou antiviraux à partir d'un aminoglycoside naturel, la néomycine, et plus spécifiquement de sa sous-structure néamine [156, 157].

De nombreux dérivés lipophiles de la néamine ont été synthétisés, parmi ceux-ci, six dérivés sont présentés ici (*figure 21*).

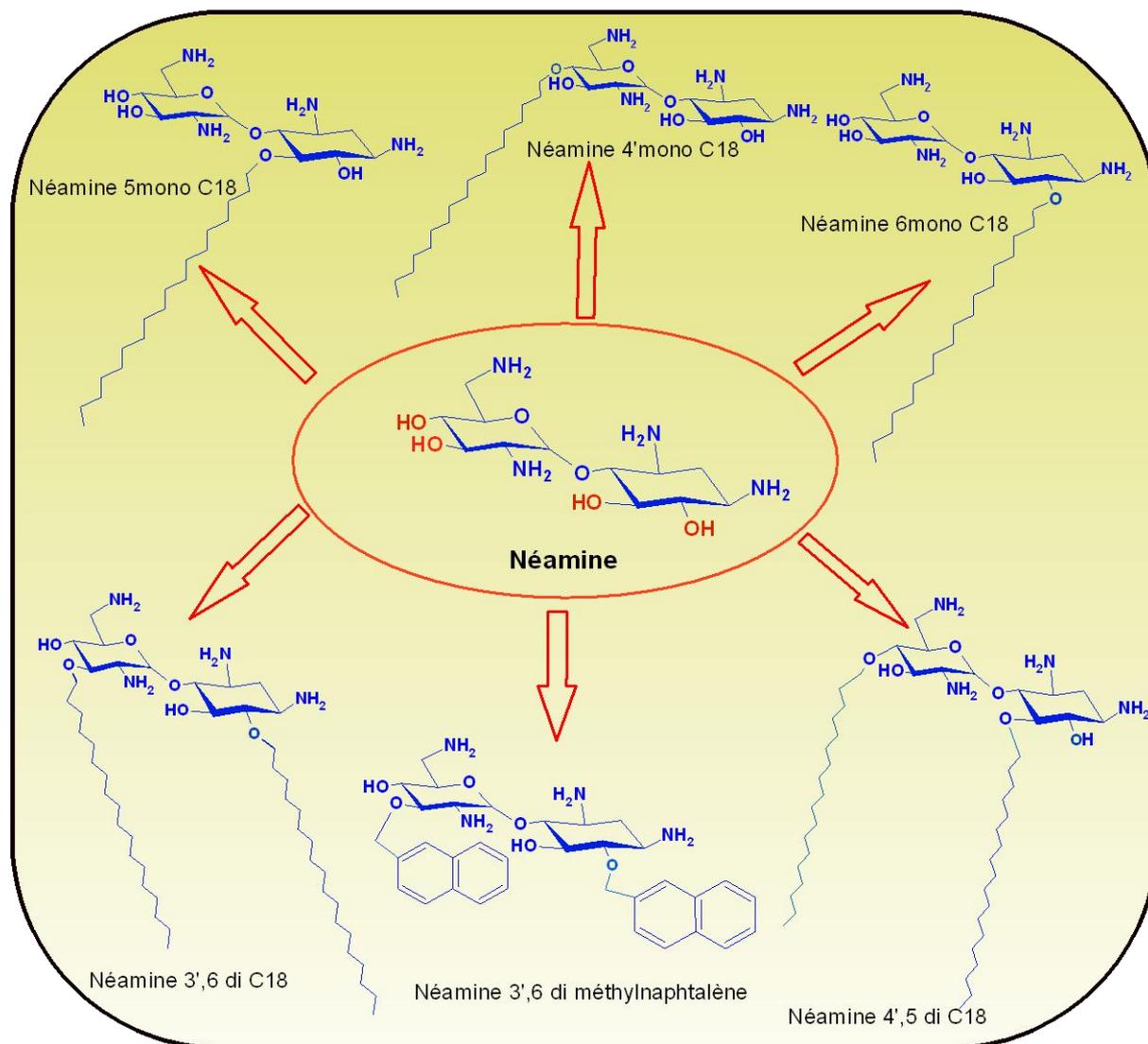


Figure 21: Les dérivés lipophiles de la néamine synthétisés par l'équipe EMAN du DPM.

La méthodologie suivie pour synthétiser les dérivés lipophiles de la néamine est fondée sur deux principales étapes :

- Protection des fonctions amines et alcools de la néamine (protection des amines par des groupements trityles acido labiles et une protection sélective des alcools par le groupement 4-méthoxy benzyle).
- Introduction des groupements hydrophobes (soit C₁₈, soit méthylnaphtalène) et obtention des produits finaux.

La stratégie de synthèse des dérivés lipophiles de la néamine sera développée au chapitre IV.

En considérant les propriétés remarquables des aminoglycosides à complexer le cuivre (II) avec une forte affinité, les dérivés lipophiles de la néamine ont été testés en tant que nouveaux ligands pour la séparation chirale par échange de ligands.

Dans le chapitre suivante, les principaux résultats obtenus au cours du mon travail de thèse seront présentés. Ceux-ci ont fait l'objet de trois publications proposées dans ce manuscrit.

En considérant les techniques analytiques utilisées, ce chapitre sera traité sous la forme de deux parties :

- Dans la première partie, les études réalisées par CLHP seront exposées. Elles présentent l'utilisation des différents dérivés lipophiles cuivriques de la néamine en tant que nouveaux sélecteurs chiraux adsorbés sur deux supports chromatographiques achiraux différents. L'un de type C₁₈ et l'autre en carbone graphite poreux (CGP).
- Dans la deuxième partie, la possibilité d'utiliser ces ligands en électrophorèse capillaire, en mode MEKC, sera présentée.

Bibliographie

1. Tsuji A. and Sekiguchi K., "Adsorption of nicotine acid hydrazide on cation exchanger of various metal forms", *Nippon Kagaku Zasshi*, **1960**, 81, 847.
2. Helfferich F., "Ligand exchange. A novel separation technique", *Nature* (London), **1961**, 189, 1001.
3. Davankov V.A., "Separation of enantiomers, in *Ligand-exchange chromatography*", (Davankov V.A., Navratil J.D. and Walton H.F., authors), **1988**, CRC Press, Boca Raton, pp 67-176.
4. Davankov V.A. and Rogozhin S.V., "Ligand chromatography as a novel method for the investigation of mixed complexes: stereoselective effects in α -amino acid copper (II) complexes", *Journal of Chromatography A*, **1971**, 60, 280-283.
5. Davankov V.A., "Enantioselective ligand exchange in modern separation techniques", *Journal of Chromatography A*, **2003**, 1000, 891-915.
6. Davankov V.A., Bochkov A.S. and Belov Y.P., "Ligand-exchange chromatography of racemates. XV. Resolution of α -amino acids on reversed-phase silica gels coated with *n*-decyl-*l*-histidine", *Journal of Chromatography*, **1981**, 218, 547-557.
7. Gübitz G., Jellenz W. and Santi W., "Separation of the optical isomers of amino acids by ligand-exchange chromatography using chemically bonded chiral phases", *Journal of Chromatography*, **1981**, 203, 377-384.
8. Roumeliotis P., Unger K.K., Kurganov A.A. and Davankov V.A., "High-performance ligand-exchange chromatography of α -amino acid enantiomers. Studies on monomerically bonded 3-(*L*-prolyl)- and 3-(*L*-hydroxypropyl)propyl silicas", *Journal of Chromatography*, **1983**, 255, 51-66.
9. Gübitz G., Jellenz W. and Santi W., "Resolution of the optical isomers of underivatized amino acids on chemically bonded chiral phases by ligand exchange chromatography", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **1981**, 4, 701- 712.
10. Ōi N., Kitahara H. and Kira R., "Direct separation of enantiomers by high-performance liquid chromatography on a new chiral ligand-exchange phase", *Journal of Chromatography A*, **1992**, 592, 291-296.
11. Liu Y., Zou H. and Jun H., "Preparation and evaluation of a novel chiral stationary phase based on covalently bonded chitosan for ligand-exchange chromatography", *Journal of separation science*, **2006**, 29, 1440-1446.

12. Muzzarelli R.A.A., Tanfani F., Muzzarelli M.G., Scarpini G. and Rocchetti R., "*Ligand-Exchange Chromatography of Amino Acids on Copper-Loaded Chitosan*", Separation Science and Technology, **1978**, 13, 869-879.
13. Bhushan R. and Gupta D., "*Ligand-Exchange TLC Resolution of Some Racemic β -Adrenergic Blocking Agents*", Journal of Planar Chromatography, **2006**, 19, 241-245.
14. Schurig V., "*Practice and Theory of Enantioselective Complexation Gas Chromatography*", Journal of Chromatography A, **2002**, 965, 315-356.
15. Günther K., "*Thin-layer chromatographic enantiomeric resolution via ligand exchange*", Journal of Chromatography A, **1988**, 448, 11-30.
16. Schurig V. and Fluck M., "*Enantiomer separation by complexation SFC on immobilized Chirasil-nickel and Chirasil-zinc*", Journal of Biochemical and Biophysical Methods, **2000**, 43, 223-240.
17. Ilisz I., Tourwé D., Armstrong D.W. and Péter A., "*High-performance liquid chromatographic enantioseparation of unusual secondary amino acids on a D-penicillamine-based chiral ligand exchange column*", Chirality, **2006**, 18, 539-543.
18. Gassman E., Kuo J.E. and Zare R.N., "*Electrokinetic separation of chiral compounds*", Science, **1985**, 230, 813-814.
19. Davankov V. A., "*Ligand-exchange chromatography of chiral compounds, in complexation chromatography*", (Cagniant D., ed.), **1992**, Chromatographic science series, vol 57, pp.197-243.
20. Davankov V.A., "*Chiral chelating resins in chromatography of optical isomers*", Pure and Applied Chemistry, **1982**, 54, 2159-2168.
21. Yamskov I.A. , Berezin B.B., Davankov V .A., Zolotarev Y.A. , Dostovalov I.N. and Myasoedov N .F., "*Ligand-exchange chromatography of amino acid race-mates on separon gels containing L-proline or L-hydroxyproline groupings*", Journal of Chromatography , **1981**, 217, 539-543.
22. Charmotl D., Audebert R. and Quivoron C., "*Retention Mechanism in Ligand exchange Chromatography of α -Amino Acids: Improved Resolution of Racemates with A New Mutildentate Polymeric Packing*", Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, **1985**, 8, 1753-1767.
23. Charmot D., Audebert R. and Quivoron C. , "*High Efficiency Ligand Exchange Chromatography of Amino Acid Enantiomers*", Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, **1985**, 8, 1769-1781.
24. Gübitz G., Jellenz W., Lofler G. and Santi W., "*Chemically bonded chiral stationary phases for the separation of racemates by high performance liquid chromatography*", Journal of High Resolution Chromatography, **1979**, 2, 145-146.

25. Bochkov A.S., Zolotarev Y.A., Belov Y.P. and Davankov V.A., "Ligand exchange chromatographic separation of amino acid enantiomers on silica gel with fixed chiral ligands", Second Danube Symposium on Progress in Chromatography, Paper B 3.23 (1979).
26. Sugdan K., Hunter C. and Lloyd-Jones G., "Ligand-exchange chromatography: I. Resolution of l- and d-proline on a copper (II)-proline complex bound to microparticulate silica gel", Journal of Chromatography, **1980**,192, 228-231.
27. Davankov V. A., "Ligand Exchange Chromatography, in *Encyclopedia of separation science*", (M.Cooke, C. F. Poole., eds.), **2000**, pp.2369-2380.
28. Davankov V.A., "Ligand exchange phases, in *Chiral Separations by HPLC*", (Krstulovic A., Ed.), **1989**, Ellis Horwood, Chichester, pp. 447.
29. Gübitz G. and Jellenz W., "Separation of the optical isomers of amino acids by ligand-exchange chromatography using chemically bonded chiral phases", Journal of Chromatography, **1981**, 203, 377-384.
30. Lindner W., "HPLC separation of enantiomers on bonded chiral phases", Naturwiss, **1980**, 67, 354-356.
31. Engelhardt H. and Kromidas S., "Chiral chemically bonded phases on silica gel for HPLC", Naturwiss, **1980**, 67, 353-354.
32. Davankov V.A. and Kurganov A.A., "The role of achiral sorbent matrix in chiral recognition of amino acid enantiomers in ligand-exchange chromatography", Chromatographia, **1983**, 17, 686-690.
33. Foucault A., Caude M. and Oliveros L., "Ligand-exchange chromatography of enantiomeric amino acids on copper-loaded chiral bonded silica gel and of amino acids on copper(II)-modified silica gel", Journal of Chromatography, **1979**,185, 345-360.
34. Yang M., Hsieh M. and Lin J., "Optical resolution on 2-L-alanyl-4-amino-6-chloro-s-triazine-derived chiral stationary phases by high-performance liquid chromatography", Taiwan Kexue, **1997**, 50, 17.
35. Hyun M.H., Han S.C., Lee C.W. and Lee Y.K., "Preparation and application of a new ligand exchange chiral stationary phase for the liquid chromatographic resolution of alpha-amino acid enantiomers", Journal of Chromatography A, **2002**, 950, 55-63.
36. Kicinski H.G. and Kettrup A., "Synthesis and characterization of L (+)-diacetyltartaric acid silica gel for high-performance liquid chromatography", Analytical Chemistry, **1983**, 316, 39-42.
37. Galli B., Gasparri F., Misiti D., Villani C., Corradini R., Dossena A. and Marhelli R., "Enantiomeric Separation of DNS-Amino Acids and DBS-Amino Acids by Ligand Exchange Chromatography with (S)- and (R)-Phenylalaninamide Modified Silica Gel", Journal of Chromatography A, **1994**, 666, 77-89.

38. Hyun M.H., Whangbo S.H. and Cho Y. J., "Effect of analyte lipophilicity on the resolution of *a*- and *b*-amino acids on liquid chromatographic ligand exchange chiral stationary phases", Journal of separation science, **2003**, 26, 1615-1622.
39. Hyun M.H., Han S.C. and Whangbo S.H., "New ligand exchange chiral stationary phase for the liquid chromatographic resolution of *alpha*- and *beta*-amino acids", Journal of Chromatography A, **2003**, 992, 47-56.
40. Hyun M.H., Kim J. I., Cho Y. J. and Han S. C., "Liquid Chromatographic Resolution of Racemic *a*-Hydroxycarboxylic Acids on Ligand Exchange Chiral Stationary Phases", Chromatographia, **2004**, 60, 275-280.
41. Liu Y., Zou H. and Jun H., "Preparation and evaluation of a novel chiral stationary phase based on covalently bonded chitosan for ligand-exchange chromatography", Journal of separation science, **2006**, 29, 1440-1446
42. Chen Z., Uchiyama K. and Hobo T., "Chemically modified chiral monolithic silica column for the enantioseparation by μ -HPLC", Journal of Chromatography A, **2002**, 942, 83-91.
43. G.Felix and A. Berthod, "Commercial Chiral Stationary Phases for the Separations of Clinical Racemic Drugs", Separation & Purification Reviews, **2007**, 36, 285-481
44. Vidyasankar S., Ru M., and Arnold F.H., "Molecularly imprinted ligand-exchange adsorbents for the chiral separation of underivatized amino acids", Journal of Chromatography A, **1997**, 775, 51-63.
45. Davankov V. A., Bochkov A. S., Kurganov A. A., Roumeliotis P., and Unger K. K. , "Separation of unmodified *alpha*-amino acid enantiomers by reversed phase HPLC ", Chromatographia ,**1980**, 13, 677-685.
46. Schmid M.G., Schreiner K., Reisinger D. and Gübitz G., "Fast chiral separation by ligand-exchange HPLC using a dynamically coated monolithic column", Journal of separation science, **2006** , 29, 1470-5.
47. Remelli M., Fornasari P. and Pulidori F., "Study of retention, efficiency and selectivity in chiral ligand-exchange chromatography with a dynamically coated stationary phase", Journal of Chromatography A, **1997**, 761, 79-89.
48. Remelli M., Trombin D. and Conato C., "Chiral Ligand-Exchange Chromatography on a RP-HPLC Column Coated with a New Chiral Selector Derived from L-Spinacine", Chromatographia, **2002**, 55, 301-306.
49. Katoh H., Ishida T., Baba Y. and Kiniwa H., "Optical resolution of amino acids, peptides and hydroxyl-carboxylic acids using anew chiral column for ligand-exchange chromatography", Journal of Chromatography, **1989**, 473, 241-250.

50. Nagasawa T., Ling J. R. and Onodera R., "Chiral high-performance liquid chromatographic separation of the three stereoisomers of 2, 6-diaminopimelic acid without derivatisation", Journal of Chromatography A, **1993**, 653, 336-340.
51. Miyazawa T., Minowa H., Imagawa K. and Yamada T., "Enantiomeric separation of non-protein amino acids by chiral ligand-exchange high-performance liquid chromatography", Analytical letters, **1997**, 30, 867-882.
52. Ôi N., Kitahara H. and Aoki F., "Direct separation of carboxylic acid and amine enantiomers by high-performance liquid chromatography on reversed-phase silica gels coated with chiral copper(II) complexes", Journal of Chromatography A, **1995**, 707, 380-383.
53. Sliwka M., Słebioda M. and Kolodziejczyk A.M., "Dynamic ligand-exchange chiral stationary phases derived from N-substituted (S)-phenylglycinol selectors", Journal of Chromatography A, **1998**, 824, 7-14.
54. Arai K., Jin D., Kusu F. and Takamura K., "Determination of p-hydroxymandelic acid enantiomers in urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **1997**, 15, 1509-1514.
55. Kagawa M., Machida Y., Nishi H. and Haginaka J., "Direct enantiomeric purity determination of acetyl-L-carnitine by LC with a ligand-exchange chiral stationary phase", Chromatographia, **2005**, 62, 239-244.
56. Natalini B., Sardella R. and Pellicciari R., "O-Benzyl-(S)-Serine, a New Chiral Selector for Ligand-Exchange Chromatography of Amino Acids", Current Analytical Chemistry, **2005**, 1, 85-92.
57. Natalini B., Sardella R., Macchiarulo A. and Pellicciari R. "Dynamic Ligand-Exchange Chiral Stationary Phase from S-Benzyl-(R)-Cysteine", Chirality, **2006**, 18, 509-518.
58. Knox J.H. and Wan Q.H., "Chiral chromatography of amino- and hydroxy-acids on surface modified porous graphite", Chromatographia, **1995**, 40, 9-14.
59. Davankov V. A., "Chiral Separation by HPLC Using the Ligand-exchange Principle, in *Chiral separations method and protocol*", (G. Gübitz and M.G. Schmid, eds.), **2004**, 243, pp.207-215.
60. LePage J., Lindner W., Davies G., Seitz D. and Karger B.L., "Reversed-phase separation of optical isomers of Dns-amino acids and peptides using chiral metal chelate additives", Journal of Chromatography, **1979**, 185, 323.
61. LePage J., Lindner W., Davies G., Seitz D. and Karger B.L., "Resolution of the optical isomers of dansyl amino acids by reversed phase liquid chromatography with optically active metal chelate additives", Analytical Chemistry, **1979**, 51, 433.
62. Hare P.E. and Gil-Av E., "Separation of d and l amino acids by liquid chromatography: use of chiral eluants", Science, **1979**, 204, 1226-1228.

63. Gil-Av E., Tishbee A. and Hare P., "*Resolution of underivatized amino acids by reversed-phase chromatography*", Journal of the American Chemical Society, **1980**,102, 5115-5117.
64. Lam S. and Karmen A. "*Stereoselective D- and L-amino acid analysis by high-performance liquid chromatography*", Journal of Chromatography, **1984**, 289, 339-345.
65. Nimura N., Suzuki T., Kasahara Y. and Kinoshita T., "*Reversed-phase liquid chromatographic resolution of amino acid enantiomers by mixed chelate complexation*", Analytical Chemistry, **1981**, 53, 1380-1383.
66. Nimura N., Toyama A., Kasahara Y. and Kinoshita T., "*Reversed-phase liquid chromatographic resolution of underivatized DL-amino acids using chiral eluents*", Journal of Chromatography, **1982**, 239, 671-675.
67. Gilon C., Leshem R., Tapuhi Y. and Grushka E., "*Reversed phase chromatographic resolution of amino acid enantiomers with metal-Aspartam eluants*", Journal of the American Chemical Society, **1979**, 101, 7612-7613.
68. Gilon C., Leshem R. and Grushka E., "*Determination of enantiomers of amino acids by reversed phase high performance liquid chromatography*", Analytical Chemistry, **1980**, 52, 1206-1209.
69. Tapuhi Y., Miller N. and Karger B. L., "*Practical considerations in the chiral separation of dns-amino acids by reversed-phase liquid chromatography using metal chelated additives*", Journal of Chromatography, **1981**, 205, 325-337.
70. Duchateau A., Crombach M., Aussems M. and Bongers J., "*Determination of the enantiomers of α -amino acids and α -amino acid amides by high-performance liquid chromatography with a chiral mobile phase*", Journal of Chromatography, **1989**, 461,419-428.
71. Galaverna G., Panto F., Dossena A., Marchelli R. and Bigi F., "*Chiral Separation of Unmodified α -Hydroxy Acid by Ligand Exchange HPLC Using Chiral Copper (II) Complexes of (S)-Phenylalaninamide as Additives to the Eluent*", Chirality, **1995**, 7, 331-336.
72. Gui-Juan M., Bo-Lin G. and Chao Y., "*Preparation of polymer-bonded chiral ligand exchange chromatographic stationary phase and resolution of racemates*", Chinese Journal of Analytical Chemistry, **2008**, 36, 275-279.
73. Davankov V.A., "*Chiral selectors with chelating properties in liquid chromatography: fundamental resections and selective review of recent developments*", Journal of Chromatography A, **1994**, 666, 55-76.

74. Natalini B., Sardella R., Carbone G., Macchiarulo A. and Pellicciari R., "The effect of the copper (II) salt anion in the Chiral Ligand-Exchange Chromatography of amino acids", Analytica Chimica Acta, **2009**, 638, 225-233.
75. Feibush B., Cohen M.J. and Karger B.L., "The role of bonded phase composition on the ligand-exchange chromatography of dansyl-D, L-amino acids", Journal of Chromatography, **1983**, 282, 3-26.
76. Roumeliotis P., Kurganov A.A. and Davankov V.A., "Effect of the hydrophobic spacer in bonded [Cu (L-hydroxypropyl) alkyl] + silicas on retention and enantioselectivity of α -amino acids in high-performance liquid chromatography", Journal of Chromatography, **1983**, 266, 439-350.
77. Shieh C.H., Karger B.L., Gelber L.R. and Feibush B., "Ligand exchange chromatography of amino alcohol enantiomers as Schiff bases", Journal of Chromatography, **1987**, 406, 343-352.
78. Perry J.A., Rateike J.D. and Szczerba T.J., "Eluting trace components before major constituents: I. Sensitivity enhancement in analytical determinations of optical purity", Journal of Chromatography, **1987**, 389, 57-64.
79. H. Y. Aboul-Enein and I. Ali, "Enantiomeric resolution of some imidazole antifungal agents on Chiralpak WH chiral stationary phase using HPLC", Chromatographia, **2001**, 54, 200-202.
80. Yan H. and Row K. H., "Rapid chiral separation and impurity determination of levofloxacin by ligand-exchange chromatography", Analytica Chimica Acta, **2007**, 584, 160-165.
81. Tian M., Yan H. and Row K. H., "Investigation of ofloxacin enantioseparation by ligand exchange chromatography", Journal of Chemical Technology & Biotechnology, **2009**, 84, 1001-1006.
82. Remelli M., Fornasari P., Dandi F. and Pulidori F., "Dynamic column-coating procedure for chiral ligand-exchange chromatography", Chromatographia, **1993**, 37, 23-30.
83. Galaverna G., Corradini R., DeMunari E., Dossena A. and Marchelli R., "Chiral separation of unmodified amino acids by ligand-exchange high-performance liquid chromatography using copper(II) complexes of L-amino acid amides as additives to the eluent", Journal of Chromatography A, **1993**, 657, 43-54.
84. Gilon C., Leshem R. and Grushka E., "Structure-resolution relationship: I. The effect of the alkylamide side-chain of aspartyl derivatives on the resolution of amino acid enantiomers", Journal of Chromatography, **1981**, 203, 365-375.
85. Lindner W.F. and Hirschbock, I., "Chromatographic resolution of amino acids using tartaric acid mono-n-octylamide as mobile phase additive", Journal of Liquid Chromatography, **1986**, 9, 551-571.

86. Gübitz G. and Juffmann F., "*Resolution of the enantiomers of thyroid hormones by high-performance ligand-exchange chromatography using a chemically bonded chiral stationary phase*", Journal of Chromatography, **1987**, 404, 391-393.
87. Watanabe N., Ohzeki H. and Niki E., "*Enantiomeric resolution of amino acids by high-performance ligand-exchange chromatography using a chemically modified hydrophilic porous polymer gel*", Journal of Chromatography , **1981**, 216, 406-212.
88. Sanaie N. and Haynes C.A., "*Interpreting the effects of temperature and solvent composition on separation of amino-acid racemates by chiral ligand-exchange chromatography*", Journal of chromatography A, **2006**, 1104, 164-172.
89. Okubo S., Mashige F., Omori M., Hashimoto Y., Nakahara K., Kanazawa H. and Matsushima Y., "*Enantiomeric determination of L- and D-lactic acid in human cerebrospinal fluid by chiral ligand exchange high-performance liquid chromatography*", Biomedical chromatography, **2000**, 14, 474-477.
90. Yujin B., Jing Y., Xiumei L., Taili S., Jinhua D. and Famei Li, "*Validated chiral separation of M9, a Mannich ketone compound, by chiral ligand-exchange chromatography*", Journal of Separation Science, **2007**, 30, 1839-1843.
91. Jin R. and He B., "*Chiral Polymers and Optical Resolution: Investigation of the Mechanism of Ligand Exchange for Resolution of DL-Amino Acids*", Journal of liquid chromatography, **1989**, 12, 501-513.
92. Rudaz S. and Veuthey J.-L., "*Capillary Electrophoresis Coupled to Mass Spectrometry for Chiral Drugs Analysis, in Chirality in Drug Research*", (E. Francotte and W. Lindner, eds.), **2006**, vol 33, WILEY-VCH, pp.261-281.
93. Gerloch M. and Constable E.G., "*Transition Metal Chemistry*", (Mager T., ed), **1994**, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, pp.145-165.
94. Desiderio C., Aturki Z. and Fanali S., "*Separation of α -hydroxy acid enantiomers by high performance capillary electrophoresis using copper(II)-L-amino acid and copper(II)-aspartame complexes as chiral selectors in the background electrolyte*", Electrophoresis, **1994**, 15, 864-869.
95. Schmid M.G. and Gubitzi, G., "*Direct resolution of underivatized amino acids by capillary zone electrophoresis based on ligand exchange*", Enantiomer, **1996**, 1, 23-27.
96. Yuan Z.B., Yang L.L. and Zhang S.S., "*Enantiomeric separation of amino acids by copper (II)-L-arginine ligand exchange capillary zone electrophoresis*", Electrophoresis, **1999**, 20, 1842-1845.

97. Soontornniyomkij B., Scandrett K. and Pietrzyk D.J., "Capillary zone electrophoresis separation of amino acid enantiomers as dansylated derivatives through control of electroosmotic flow" , Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, **1998**, 21, 2245-2263.
98. Vegvari A., Schmid M.G., Kilar F. and Gubitz G., "Chiral separation of alpha-amino acids by ligand-exchange capillary electrophoresis using N-2-hydroxy-octyl-L-4-hydroxyproline as a selector", Electrophoresis, **1998**, 19, 2109-2112.
99. Schmid M.G., Rinaldi R., Dvereny D. and Gubitz G., "Enantioseparation of α -amino acids and dipeptides by ligand-exchange capillary electrophoresis of various L-4-hydroxyproline derivatives", Journal of Chromatography A, **1999**, 846, 157-163.
100. Schmid M.G., Laffranchini M., Dreveny D. and Gubitz G., "Chiral separation of sympathomimetics by ligand exchange capillary electrophoresis", Electrophoresis, **1999**, 20, 2458-2461.
101. Schmid M.G., Lecnik O.L., Sitte U. and Gubitz G., "Application of ligand-exchange capillary electrophoresis to the chiral separation of α -hydroxy acids and beta-lockers" Journal of Chromatography A, **2000**, 875, 307-314.
102. Chen Z., "Developemnt of chiral separation systems for capillary electrophoresis, electrochromatography and liquid chromatography", Chromatography, **2004**, 25, 9-23.
103. Gubitz G. and Schmid M.G., "Chiral Separation by Ligand Exchange, in Chiral Separation Techniques", **2007**, (Subramanian G., ed), Third Edition, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp.155-179.
104. Karbaum A. and Jira T., "Chiral separation of unmodified amino acids with non-aqueous capillary electrophoresis based on the ligand-exchange principle", Journal of Chromatography A, **2000**, 874, 285-292.
105. Horimai T., Ohara M. and Ichinose M., "Optical resolution of new quinolone drugs by capillary electrophoresis with ligand-exchange and host-guest interactions", Journal of Chromatography A, **1997**, 760, 235-244.
106. Cucinotta V., Giuffrida A., Grasso G., Maccarrone G. and Vecchio G., "Ligand exchange chiral separation by cyclodextrin derivative in capillary electrophoresis", Analyst, **2003**, 128, 134-136.
107. Cucinotta V., Giuffrida A., La Mendola D., Maccarrone G., Puglisi A., Rizzarelli E. and Vecchio G., "3-Amino derivative of beta-cyclodextrin: Thermodynamics of copper(II) complexes and exploitation of its enantioselectivity in the separation of amino acid racemates by LECE", Journal of Chromatography B, **2004**, 800, 127-133.
108. Cucinotta V., Giuffrida A., Maccarrone G., Messina M. and Vecchio G., "Ligand exchange capillary electrophoresis by cyclodextrin derivatives, a powerful tool for enantiomeric separations", Electrophoresis, **2006**, 27, 1471-1480.

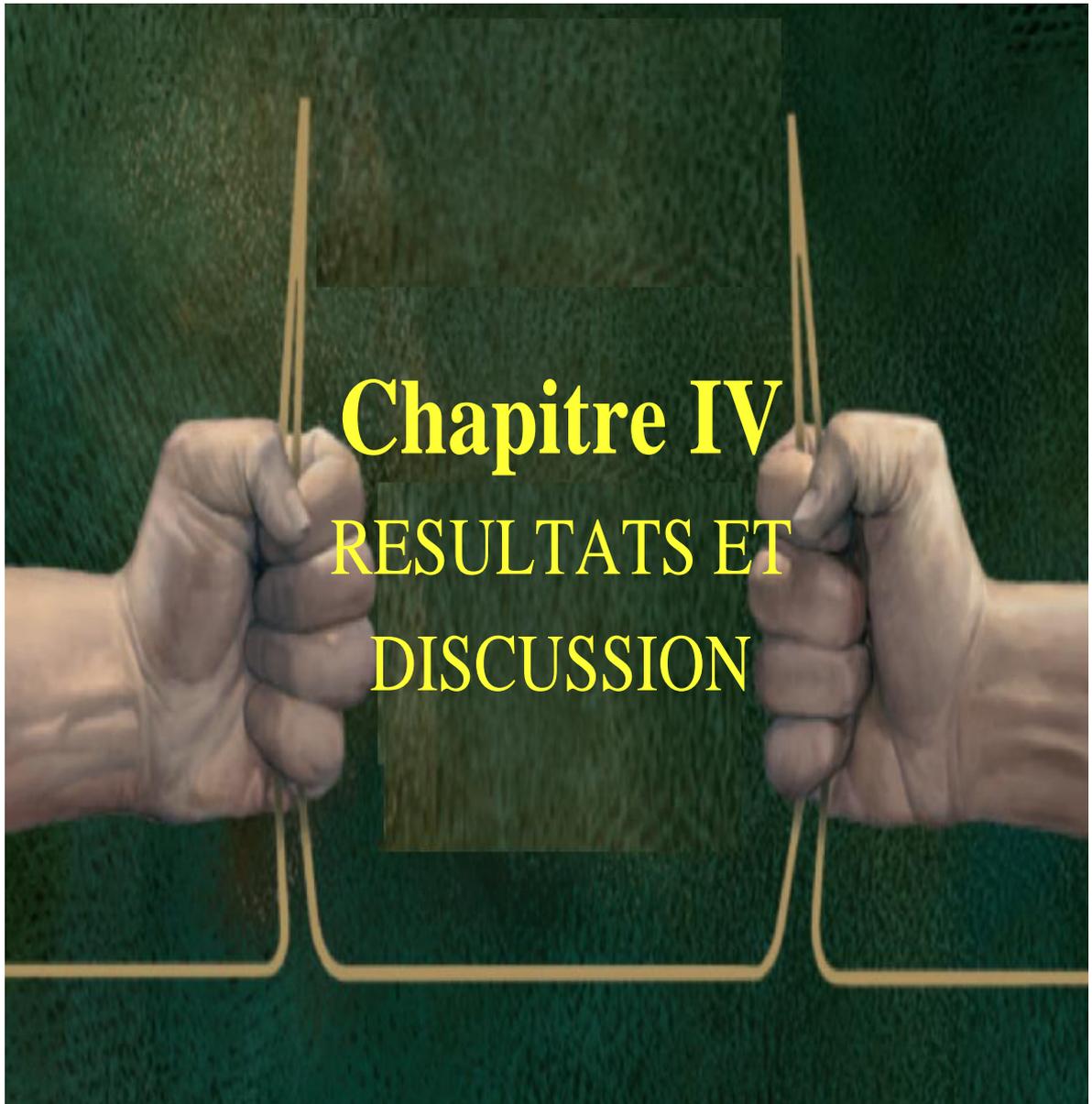
109. Wu B., Wang Q., Xie J. and Yun L., "Amino-substituted β -cyclodextrin copper(II) complexes for the electrophoretic enantioseparation of dansyl amino acids: Role of dual chelate-inclusion interaction and mechanism", *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 558, 80-85.
110. Stefansson M. and Novotny M., "Electrophoretic Resolution of Monosaccharide Enantiomers in Borate-Oligosaccharide Complexation Media", *Journal of the American Chemical Society*, **1993**, 115, 11573-11580.
111. Schmid M.G., Wirnsberger K., Jira T., Bunke A. and Gübitz G., "Capillary electrophoretic chiral resolution of 1,2-diols by borate-cyclodextrin complexation-comparative studies on different cyclodextrin derivatives", *Chirality*, **1997**, 9, 153-156.
112. Jira T., Bunke A., Schmid M.G. and Gübitz G., "Chiral resolution of diols by capillary electrophoresis using cyclodextrin-borate complexation", *Journal of Chromatography A*, **1997**, 761, 269-275.
113. Noroski J. E., Mayo D.J. and Moran M., "Determination of the enantiomer of a cholesterol-lowering drug by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **1995**, 13, 45-52.
114. Kodama S., Yamamoto A., Iio R., Sakamoto K., Matsunaga A. and Hayakawa K., "Chiral ligand exchange capillary electrophoresis using borate anion as a central ion", *Analyst*, **2004**, 129, 1238-1242.
115. Ha T.T., Hoogmartens J. and Schepdael A.V., "Recent advances in pharmaceutical applications of chiral capillary electrophoresis", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2006**, 41, 1-11.
116. Otsuka K. and Terabe S., "Enantiomer separation of drugs by micellar electrokinetic chromatography using chiral surfactants", *Journal of Chromatography A*, **2000**, 875, 163-178.
117. Crego A.L., Gonzalez M.J. and Marina M.L., "Chiral separation of polychlorinated biphenyls by micellar electrokinetic chromatography with sodium holate", *Electrophoresis*, **1998**, 19, 2113-2118.
118. Yarabea H. H., Billiotb E. and Warnera I. M., "Enantiomeric separations by use of polymeric surfactant electrokinetic chromatography", *Journal of Chromatography A*, **2000**, 875, 179-206.
119. Gozel P., Gassman E., Michelsen H., and Zare R. N., "Electrokinetic resolution of amino acid enantiomers with copper (II)-aspartame support electrolyte", *Analytical Chemistry*, **1987**, 59, 44-49.
120. Cohen A.S., Paulus A. and Karger B.L., "High-performance capillary electrophoresis using open tubes and gels", *Chromatographia*, **1987**, 24, 15-24.

121. Sundin N.G., Dowling T.M., Grinberg N. and Bicker G., "*Enantiomeric Separation of Dansyl Amino Acids Using MECC with a Ligand Exchange Mechanism*", Journal of Microcolumn Separations, **1996**, 8, 323-329.
122. Schmid M. G. and Gübitz G., "*Direct resolution of underivatized amino acids by capillary zone electrophoresis based on ligand-exchange*", Enantiomer, **1996**, 1, 23-27.
123. Lu X., Chen Y., Guo L. and Yang Y., "*Chiral separation of underivatized amino acids by ligand-exchange capillary electrophoresis using a copper (II)-L-lysine complex as selector*", Journal of Chromatography A, **2002**, 945, 249-255.
124. Chen Z., Lin J.M., Uchiyama K. and Hobo T., "*Simultaneous separation of sixteen positional and optical isomers of the tryptophan family by ligand-exchange micellar electrokinetic chromatography*", Chromatographia, **1999**, 49, 436-443.
125. Chen Z., Lin J.M., Uchiyama K. and Hobo T., "*Separation behavior of amino acid enantiomers in ligand exchange micellar electrokinetic chromatography*", Journal of Microcolumn Separation, **1999**, 11, 534-540.
126. Chen Z., Lin J.M., Uchiyama K. and Hobo T., "*Determination of critical micelle concentrations of anionic surfactants based on ligand exchange micellar electrokinetic chromatography*", Analytica Chimica Acta, **2000**, 403, 173-178.
127. Zheng Z. X., Lin J.M. and Qu F., "*Chiral separation of underivatized and dansyl amino acids by ligand-exchange micellar electrokinetic capillary chromatography using a copper (II)-L-valine complex as selector*", Journal of Chromatography A, **2003**, 1007, 189-196.
128. Zheng Z. X., Lin J.M., Qu F. and Hobo T., "*Chiral separation with ligand-exchange micellar electrokinetic chromatography using a D-penicillamine-copper (II) ternary complex as chiral selector*", Electrophoresis, **2003**, 24, 4221-4226.
129. Pittler E., Grawatsch N., Paul D., Gübitz G. and Schmid M.G., "*Enantioseparation of amino acids, α -hydroxy acids, and dipeptides by ligand-exchange CEC using silica-based chiral stationary phases*", Electrophoresis, **2009**, 30, 2897-2904.
130. Schmid M.G., Grobuschek N., Tuscher C., Gubitiz G., Vegvari A., Machtejevas E., Maruska A. and Hjerten S., "*Chiral separation of amino acids by ligand-exchange capillary electrochromatography using continuous beds*", Electrophoresis, **2000**, 21, 3141-3144.
131. Chen Z. and Hobo T., "*Chemically L-phenylalaninamide-modified monolithic silica column prepared by a sol-gel process for enantioseparation of dansyl amino acids by ligand exchange-capillary electrochromatography*", Analytical Chemistry, **2001**, 73, 3348-3357.
132. Chen Z. and Hobo T., "*Chemically L-prolinamide-modified monolithic silica column for enantiomeric separation of dansyl amino acids and hydroxy acids by capillary*

- electrochromatography and μ -high performance liquid chromatography*", Electrophoresis, **2001**, 22, 3339-3346.
133. Nishiyama T., Chen Z., Nakagama T., Uchiyama K. and Hobo T., "*Separation of dansyl amino acid enantiomers by ligand exchange capillary electrochromatography using L-lysineamide-modified monolithic silica column*", Bunseki Kagaku, **2003**, 52, 1005-1010.
134. Chen Z., Nishiyama, T., Uchiyama K. and Hobo T., "*Electrochromatographic enantioseparation using chiral ligand exchange monolithic sol-gel column*", Analytica Chimica Acta, **2004**, 501, 17-23.
135. Chen Z., Uchiyama K. and Hobo T., "*Chiral resolution of dansyl amino acids by ligand exchange-capillary electrophoresis using Cu (II)-L-prolinamides as chiral selector*", Analytica chimica acta, **2004**, 523, 1-7.
136. Lu X., Chen Y. , L. Guo and Y. Yang, "*Chiral separation of underivatized amino acids by ligand-exchange capillary electrophoresis using copper (II)-L-lysine complex as selector*", Journal of Chromatography A, **2002**, 945, 249-255.
137. Bazylak G., "*Chiral separation of some amino alcohols by addition of helical nickel(II) chelate to the mobile phase used in reversed-phase high-performance liquid chromatography*", Journal of Chromatography A, **1994**, 665, 75-86.
138. Busker E., Gunther K. and Martens J., "*Application of chromatographic chiral stationary phases to pharmaceutical analysis. Enantiomeric purity of D-penicillamine*", Journal of Chromatography, **1985**, 350,179-185.
139. Woodcock J., Moazed D., Cannon M., Davies J. and Noller H., "*Interaction of antibiotics with A- and P-site-specific bases in 16S ribosomal RNA*", The EMBO Journal, **1991**, 10, 3099-3103.
140. Ryu D., Tan C., Rando R., "*Synthesis of (+), (-)-neamine and their positional isomers as potential antibiotics* ", Bioorganic & medicinal chemistry letters, **2003**, 13, 901-903.
141. Sreedhara A., Freed J. and Cowan J., "*Efficient inorganic deoxyribonucleases. Greater than 50-million-fold rate enhancement in enzyme-like DNA cleavage*", Journal of the American Chemical Society, **2000**, 122, 8814-8824.
142. Jezowska-Bojczuk M., Bal W. and Kozłowski H., "*Kanamycin revisited: a combined potentiometric and spectroscopic study of copper (II) binding to kanamycin B*", Inorganica Chimica Acta, **1998**, 275-276, 541-545.
143. Jezowska-Bojczuk M., Karaczyn A. and Bal W., "*Copper (II) binding to geneticin, a gentamycin analog*", Journal of Inorganic Biochemistry, **1998**, 71, 129-134.
144. Jezowska-Bojczuk M. and Bal W., "*Co-ordination of copper (II) by amikacin. Complexation equilibria in solution and oxygen activation by the resulting complexes*", Journal of the Chemical Society. Dalton transactions, **1998**, 153-159.

145. Jezowska-Bojczuk M., Lesniak W., Bal W., Kozłowski H., Gatner K., Jezierski A., Sobczak J., Mangani S. and Meyer-Klaucke W., "*Molecular mechanism of hydrogen peroxide conversion and activation by Cu(II)-amikacin complexes*", Chemical Research in Toxicology, **2001**, 14, 1353-1362.
146. Jezowska-Bojczuk M., Szczepanik W., Bal W., Lesniak W., Ciesiolka J. and Wrzesinski, J., "*DNA and RNA damage by Cu (II)-amikacin complex – a possible element of ototoxicity of aminoglycosides*", Journal of Inorganic Biochemistry, **2001**, 86, 280-280.
147. Sreedhara A., Patwardhan A., and Cowan J.A., "*Novel reagents for targeted cleavage of RNA sequences: towards a new family of inorganic pharmaceuticals*", Chemical Communications, **1999**, 12, 1147-1148.
148. Sreedhara A. and Cowan JA., "*Efficient catalytic cleavage of DNA mediated by metalloaminoglycosides*", Chemical Communications, **1998**, 16, 1737-1738
149. Chen C. A. and Cowan J.A., "*In vivo cleavage of a target RNA by copper kanamycin A. Direct observation by a fluorescence assay*", Chemical Communications, **2002**, 3, 196-197.
150. Grapsas I., Massova I. and Mobashery S., "*H-NMR Analysis of Copper -Aminoglycoside Complexes in Solution and Its Implication for Regioselective Modification of Multifunctional Aminoglycoside Antibiotics*", Tetrahedron, **1998**, 54, 7705-7720.
151. Nishi H., Nakamura K., Nakai H. and Sato T., "*Enantiomer separation by capillary electrophoresis using DEAE-dextran and aminoglycosidic antibiotics*", Chromatographia, **1996**, 43, 426-430.
152. Hirukawa S., Olson K., Tsuji T. and Hu G., "*Neamine inhibits xenograft human tumor growth and angiogenesis in athymic mice*", Clinical Cancer Research, **2005**, 11, 8745-8752.
153. Mei H., Cui M., Heldsinger A., Lemrow S., Loo J., Sannes-Lowery K., Sharmeen L. and CzarnCzarnik A., "*Inhibitors of protein-RNA complexation that target the RNA: Specific recognition of human immunodeficiency virus type 1 TAR RNA by small organic molecules*", Biochemistry, **1998**, 37, 14204-14212.
154. Zapp M., Stern S. and Green M., "*Small molecules that selectively block RNA binding of HIV-1 Rev protein inhibit Rev function and viral production*", Cell, **1993**, 74, 969-978.
155. Gokhale N., Patwardhan A., and Cowan J. A., "*Metalloaminoglycosides: Chemistry and Biological Relevance, in Aminoglycoside Antibiotics from chemical biology to drug discovery*", (Arya D.P., ed.), **2007**, John Wiley & Sons, Inc, pp.235-254.
156. Riguet E., Désiré J., Bailly C. and Décout J.L., "*A route for preparing new neamine derivatives targeting HIV-1 TAR RNA*", Tetrahedron, **2004**, 60, 8053-8064.

157. Riguet E., Tripathie S., Chaubey B., Désiré J., Pandey V. and Décout J.L., "*A peptide nucleic acid-neamine conjugate that targets and cleaves HIV-1 TAR RNA inhibits viral replication*", Journal of medicinal chemistry, **2004**, 47,4806-4809.



I Dérivés lipophiles de la néamine complexés par le cuivre (II) en tant que sélecteurs chiraux en CLHP

I.1 Publication N° 1 “Complexes Cu(II)-dérivés lipophiles d'aminoglycosides pour la séparation énantiomérique d'acides aminés en chromatographie chirale par échange de ligands”

Les aminoglycosides de type néamine et kanamycine sont capables de complexer avec de fortes affinités des cations métalliques tels le cuivre (II). Dans la partie bibliographique, nous avons rappelé les principes de l'échange de ligands. En se basant sur ces observations, nous avons émis l'hypothèse que les aminoglycosides, et en particulier la néamine, pouvaient être utilisés comme sélecteurs chiraux en chromatographie chirale d'échange de ligands.

Pour prouver cette hypothèse, trois dérivés monoalkylés de la néamine, contenant une chaîne C₁₈ introduite sur la fonction hydroxyle localisée en position 4', 5 ou 6, ont été synthétisés pour tester les propriétés énantiosélectives de la néamine. Ces dérivés lipophiles de la néamine présentent l'avantage d'être chiraux et peuvent être dynamiquement adsorbés sur un support achiral de type C₁₈.

Trois PSCs à base de néamine modifiée ont été créées. Leurs propriétés énantiosélectives ont été comparées dans des conditions de chromatographie chirale par échange de ligands pour la séparation d'énantiomères d'acides aminés.

Les résultats obtenus montrent que la phase stationnaire contenant la néamine 4'-mono C₁₈ est plus stéréosélective que les autres phases chirales testées (néamine 5-mono C₁₈, néamine 6-mono C₁₈).

L'effet de différents paramètres chromatographiques sur la rétention et l'énantiosélectivité de la néamine modifiée en position 4' a été étudié sur un acide aminé test, la proline.

Short communication

Copper(II) complexes of lipophilic aminoglycoside derivatives for the amino acid enantiomeric separation by ligand-exchange liquid chromatography

Mustapha Zaher, Isabelle Baussanne, Corinne Ravelet, Somnath Halder, Mohamed Haroun, Jennifer Fize, Jean-Luc Decout*, Eric Peyrin*

Département de Pharmacochimie Moléculaire UMR 5063 CNRS, Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble FR 2607, Université Grenoble I (Joseph Fourier), UFR de Pharmacie, 38041 Grenoble Cedex 9, France

Received 21 November 2007; received in revised form 5 February 2008; accepted 6 February 2008
Available online 12 February 2008

Abstract

In this paper, a new class of ligand-exchange chiral stationary phase (LE-CSP) based on the copper complexes of lipophilic aminoglycoside derivatives was reported. Different stationary phases were developed by coating reversed-phase liquid chromatography supports with three neamine derivatives carrying a lipophilic octadecyl chain at the 4', 5 and 6 positions, respectively. The enantioselective ability of these LE neamine-based CSPs was evaluated and the 4'-derivative coated column was found to be the most interesting one for the amino acid resolution. The effects of the variation of several chromatographic parameters on the enantioseparation were evaluated in order to identify the analysis optimal conditions. © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Chiral separation; Amino acid enantiomers; Ligand-exchange; Aminoglycoside derivatives

1. Introduction

During the last decades, the chiral analysis of amino acids is appeared to be of great interest in the study of the formation and differentiation of cells or tissues, in biological and geological dating, in the study of origin of life on Earth, in food control, and in clinical biochemistry and diagnostics [1]. To date, a variety of chiral selectors including crown-ethers [2], macrocyclic antibiotics [3], target-specific bioaffinity receptors [4,5] and ligand-exchange (LE)-based selectors [6] have been reported for the liquid chromatography (LC) enantiomeric separation of native amino acids.

The enantioselective LE-LC, originally introduced in the 1970s [7], constitutes one of the most useful methods for the resolution of amino acids. At the present time, bi- or trifunctional chiral compounds selected from the group of “simple” α -amino acids, amino amides and amino alcohols represent the

most used ligands for the development of LE chiral stationary phases (CSPs) [6–9]. Relatively few other kinds of optically active materials have been evaluated for enantioselective LE-LC [10,11]. However, the design of new chiral ligand exchanging systems remains a challenging task to enhance the chemical diversity of ligands and evaluate the effects of alternative chemical structures on the chiral differentiation.

Aminoglycosides are highly potent and broad-spectrum antibiotics used in clinics for over 50 years. These compounds are cationic oligosaccharides which, in most cases, include a modified α -glucose unit attached to a 2-deoxystreptamine ring. They possess many stereogenic centers and their resulting stereochemical features have been shown to be of importance for the selective binding to the RNA targets and activity [12]. Moreover, it has been shown that some aminoglycosides can be employed as chiral selectors, albeit with a limited applicability [13]. Furthermore, due to their numerous amino, hydroxyl and glycosidic oxygen functions, aminoglycosides can form a great variety of transition metal complexes [14–16].

The unique stereochemical/conformational features of aminoglycosides, and their strong capacity to coordinate transition metal ions through a multiple-site pattern, encouraged us to

* Corresponding authors. Tel.: +33 4760 41033; fax: +33 4760 41007.

E-mail addresses: Jean-Luc.Decout@ujf-grenoble.fr (J.-L. Decout), eric.peyrin@ujf-grenoble.fr (E. Peyrin).

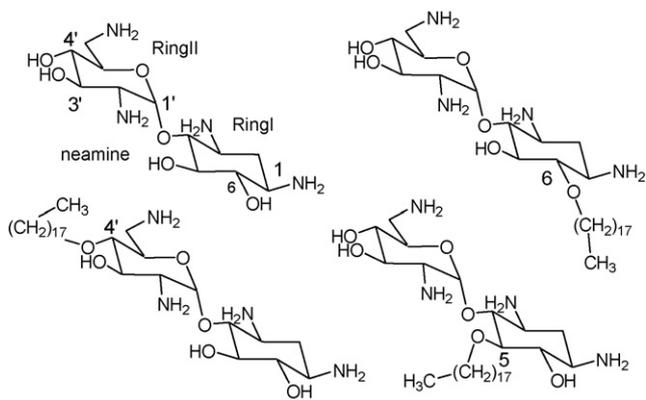


Fig. 1. Structures of neamine and 4', 5- and 6-neamine derivatives.

combine these aspects and consider their use as a new class of ligands for enantioselective LE-LC. In this paper, we report, for the first time, the preparation and the evaluation of LE-CSPs based on an aminoglycosidic ligand, i.e. neamine. Neamine (Fig. 1) is the common pseudodisaccharide core of several aminoglycosides and can be easily obtained through methanolysis of the cheap neomycin B. In this work, three neamine derivatives carrying a lipophilic octadecyl chain at the 4', 5 and 6 (Fig. 1) positions, respectively, were synthesized. The lipophilic derivatives were then dynamically adsorbed on C18 reversed-phase LC supports to create three neamine-modified stationary phases. These coated phases were subsequently evaluated and screened for the chromatographic resolution of test amino acid racemates.

2. Experimental

2.1. Synthesis of the neamine derivatives and preparation of the coated stationary phases

Details on the synthesis as well as the characterization of the neamine derivatives can be found in the supplementary data.

Commercial end-capped C18 reversed-phase columns (Inertsil-ODS 3: 150 mm × 1 mm I.D.; particle diameter: 3 μm; pore size 100 Å) were employed to immobilize hydrophobically the 4', 5- and 6-derivatives of neamine through an in situ method, as previously described [17]. Briefly, the methodology involved the passage of coating solutions containing the modified neamine (23.5 mM in water–methanol 98:2, v/v) through the columns at a flow rate of 15 μL/min during at least 8 h. The Cu(II) binding capacity of the stationary phases was subsequently evaluated by frontal chromatography. The modified columns were washed with water and then treated with a copper(II) sulfate solution (20 mM in water) at a flow rate of 15 μL/min. From the observed breakthrough curve for copper (detection at 220 nm), the amount of Cu(II) loaded on the different columns was estimated using the following relation: $Q = [(V_e - V_0)c]/V_s$ where Q is the dynamic binding capacity, V_e the 50% breakthrough volume, V_0 the void volume, c the copper concentration in the mobile phase and V_s is the stationary phase volume.

2.2. Chromatographic experiments

All racemates and enantiomers were purchased from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin, France), Bachem (Weil am Rhein, Germany) or ChemGenes (Wilmington, MA, USA). Copper(II) sulfate was obtained from Prolabo (Rhône-Poulenc, France), cobalt(II) sulfate, nickel(II) sulfate and zinc(II) sulfate were purchased from Aldrich (Saint-Quentin, France). Methanol HPLC grade was purchased from Fischer Scientific (Loughborough, UK). Water was obtained from an Elgastat option water purification system (Odil, Talant, France) fitted with a reverse osmosis cartridge. The HPLC system consisted of a LC Shimadzu pump 10AT (Sarreguemines, France), a Cheminert TM CN2-4346 injection valve (250 nL sample loop), a Shimadzu SPD-10A UV–vis detector (detection at 236 nm for injected solutes, cell volume 140 nL), a Shimadzu SCL-20A system controller with LC solution software (Shimadzu), and an oven Igloocil (Interchim). Unless otherwise stated, the mobile phase consisted of water–methanol (98:2, v/v) containing 0.5 mM CuSO₄. The flow rate was varied from 10 to 40 μL/min in relation to the compound analyzed. Samples were injected in triplicate. The chromatographic parameters were determined as previously reported [17]. When not in use, the stationary phases 4', 5 and 6 were stored in the mobile phase at 4 °C.

3. Results and discussion

3.1. Design and characterization of the neamine derivative-based stationary phases

Two strategies are generally reported to create CSPs. The first one involves the covalent immobilization of the chiral selector on the chromatographic surface. The second approach is related to the physical adsorption of the optically active species on a functionalized matrix. Such methodology is frequently based on the coating of apolar RPLC chromatographic surfaces with chiral selectors covalently attached to a suitable apolar anchor molecule. The ligand-coated columns represent a useful approach to evaluate quickly the enantioselective potentialities of a new chiral selector. As a consequence, neamine was monosubstituted by a lipophilic C18 chain to allow the subsequent dynamic coating of an octadecyl chromatographic support by the aminoglycosidic motif.

It is well established that the location and/or the nature of the substituent (anchor, spacer) present on a given ligand affect the enantioselective properties of the LE-based CSPs [6,18,19]. In this context, the hydrophobic C18 chain was regioselectively attached to the 4', 5- or 6-OH groups of neamine (see supplementary data) to allow the generation of three aminoglycosidic core-containing positional isomers.

After the coating procedure (see Section 2), the Cu(II) dynamic binding capacity of the neamine derivative-based stationary phases was evaluated by frontal chromatography. The experimental breakthrough curves are presented in the supplementary data, for the three coated columns. The Cu(II) load was estimated to be equal to 3.9, 2.5 and 5.2 μmol/column for the stationary phases 4', 5 and 6, respectively.

3.2. Evaluation of the retention and enantioseparation properties of the copper complexes of the three neamine derivative-based stationary phases

The LE-based enantioseparation ability of the three neamine derivative-based stationary phases was evaluated in order to select the most useful ligand positional isomer for the chromatographic resolution of amino acids. Several amino acids were tested as model solutes (Table 1). To note, some nucleosidic and dipeptidic species were also included in the study. The enantioselective properties of the neamine-modified stationary phases were firstly analyzed with a mobile phase which did not contain any transition metal ion. The racemates of test solutes were not resolved on the three modified supports, using a water–methanol mixture (98:2, v/v) as mobile phase, at a column temperature of 20 °C. However, when 0.5 mM CuSO₄ was added to the eluent, enantioseparations were observed for the three columns. This demonstrates that, for the tested compounds, the enantiodiscrimination properties of the neamine derivative-based stationary phases were dependent on the ligand-exchange principle. The obtained chromatographic data are summarized in Table 1. Here, it is important to point out that the stability of the modified C18 columns over the time was evaluated by comparing the proline retention factor and enantioselectivity during an extended period of time, under such operating conditions. The k and α value did not change significantly after the passage of around 5000 column volumes of mobile phase, demonstrating the good stability of the CSPs. The solute retention factors appeared to be relatively important on the three CSPs, especially for the CSP 5. The retention properties of the CSPs for the amino acids were found to be inversely proportional to their Cu(II) binding capacities. The amino acid retention factors varied as follows: $k_{6\text{-CSP}} < k_{4'\text{-CSP}} < k_{5\text{-CSP}}$ whereas the Cu(II) loads displayed the following trend: $Q_{5\text{-CSP}} < Q_{4'\text{-CSP}} < Q_{6\text{-CSP}}$. From a chiral resolution point of view, the 9 amino acids tested were separated on the CSP

4' while the CSPs 5 and 6 were able to discriminate only some amino acid enantiomers, with typically a lower apparent enantioselectivity (Table 1). Fig. 2 shows representative chromatograms obtained using the three CSPs, for the proline and methionine racemates. In all cases, D-enantiomers were eluted after L-enantiomers. To note also, the enantiomers of nucleosides (adenosine, guanosine) were separated only by the CSP 5 while Gly–Tyr was resolved by the two CSPs 5 and 6. The efficiency performances were similar for the three columns, the number of theoretical plates for the amino acids being comprised between about 300 and 1500 in relation to the tested solutes. Such low efficiencies are in accordance with the data usually observed with other types of LE-based CSPs [6,18].

As expected above, these results show clearly the preponderant role of the substituent position on the chiral recognition properties of the copper complex of the aminoglycosidic ligand. This screening study indicates that the 4'-derivative of neamine was the most useful ligand for the enantioseparation of amino acids by LE-LC and then the CSP 4' was selected for subsequent optimization experiments.

3.3. Optimization of the chromatographic operating conditions for the amino acid enantioseparation using the CSP 4'

The effects of the variation of various chromatographic parameters on the amino acid enantioseparation were evaluated for the CSP 4' in order to define the analysis optimal conditions. D,L-Proline was used as test racemate.

The role of the metal ion type [Cu(II) vs. Zn(II), Ni(II) and Co(II), sulfate salts at 0.5 mM] on the separation of the proline enantiomers was evaluated at a column temperature of 24 °C. Cu(II) appeared to be the most efficient transition metal ion for the enantioseparation. The use of Zn(II) as metal ion determined a slight retention factor increase with a significant decrease in

Table 1
Retention factor k_L (first eluted, L-enantiomer), enantioselectivity α and resolution R_s for the test solutes using the three neamine derivative-based stationary phases^a

	CSP 4'			CSP 5			CSP 6		
	k_L	α	R_s	k_L	α	R_s	k_L	α	R_s
Pro	3.90	1.61	2.18	12.8	1.61	2.64	2.59	1.32	0.63
Ile	40.1	1.42	2.51	166.8	1.23	0.80	32.4	1.10	0.60
Leu	44.1	1.30	1.54	nd	nd	nd	37.5	1.05	0.46
Val	11.9	1.39	1.90	49.2	1.20	0.84	8.68	–	–
Met	25.5	1.31	2.03	102.4	–	–	17.3	–	–
Gln	1.64	1.23	0.69	4.95	–	–	1.05	–	–
Ala	1.36	1.20	0.69	4.30	–	–	0.73	–	–
Ser	0.81	1.19	0.55	3.05	–	–	0.71	–	–
Glu	18.8	1.21	0.81	77.6	–	–	14.5	–	–
Gly–Tyr	17.0	–	–	34.7	1.15	1.27	26.9	1.51	2.78
Ado ^b	29.7	–	–	33.8	1.16	0.90	17.2	–	–
Guo ^c	13.5	–	–	16.9	1.07	0.81	15.1	–	–

^a Experimental conditions—phase mobile: H₂O–CH₃OH (98:2, v/v) containing 0.5 mM CuSO₄; column temperature: 20 °C; injection volume: 250 nL; detection at 236 nm. Relative standard deviation of the solute retention factors was typically less than 3%. nd: not determined; –: no apparent enantioselectivity.

^b Ado: adenosine.

^c Guo: guanosine.

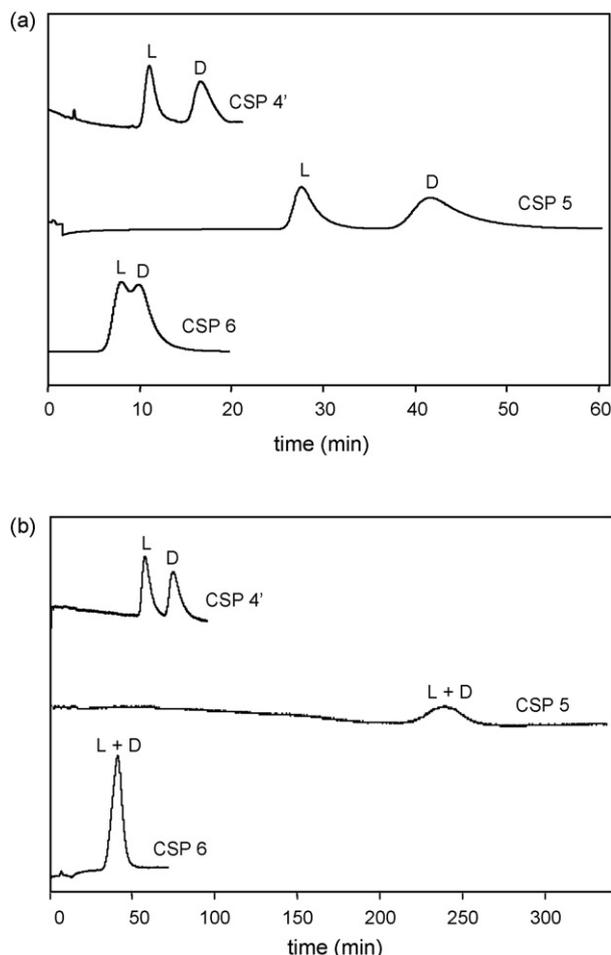


Fig. 2. Representative chromatograms obtained using the three neamine derivative-based CSPs for (a) proline and (b) methionine racemates. Experimental conditions: phase mobile: H₂O–CH₃OH (98:2, v/v) containing 0.5 mM CuSO₄; column temperature: 20 °C; injection volume: 250 nL; detection at 236 nm; flow rate: 40 μL/min.

the enantioselectivity and efficiency. This was responsible for a strong diminution of the resolution (2.20 ± 0.05 vs. 1.12 ± 0.14). Ni(II) and Co(II) did not allow any chiral resolution. The effects of the nature of associated anion (sulfate vs. acetate) was also investigated, at the same temperature and using Cu(II) as central ion. The replacement of the sulfate by the acetate anion determined a decrease in the apparent retention, enantioselectivity and efficiency, which governed a significant decrease in the resolution (2.20 ± 0.05 vs. 1.29 ± 0.08).

The influence of the column temperature on the enantioseparation was evaluated between 15 and 35 °C, using an eluent CuSO₄ concentration of 0.5 mM. When the column temperature increased, both the retention and enantioseparation factor values diminished while no crucial change in the chiral resolution was observed.

The most interesting feature was related to the effects of the eluent Cu(II) concentration (sulfate salt, variation from 0.1 to 10 mM, column temperature of 24 °C). The increase in the CuSO₄ concentration was responsible for an enhancement of the enantioselectivity and chiral resolution (Fig. 3a), with a significant decrease in the analysis time (Fig. 3b).

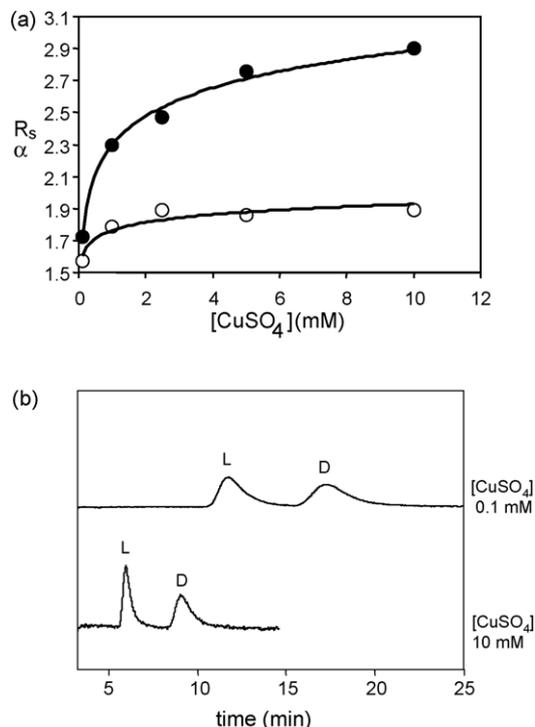


Fig. 3. (a) Effects of the eluent CuSO₄ concentration on the apparent enantioselectivity (○) and resolution (●) for the proline racemate. (b) Chromatograms illustrating the influence of the eluent CuSO₄ concentration on the enantioseparation of proline. Experimental conditions: column: CSP 4'; phase mobile: H₂O–CH₃OH (98:2, v/v); column temperature: 24 °C; injection volume: 250 nL; detection at 236 nm; flow rate: 40 μL/min.

4. Conclusion

In summary, the present report demonstrates that copper complexes of immobilized lipophilic aminoglycoside derivatives can be used as a new, alternative class of LE-based CSP. A simple change in the substituent position appears to have crucial effects on the chiral discrimination properties of the immobilized neamine metalloderivatives, the 4'-neamine derivative being the most efficient ligand for the amino acid enantiomeric separation. Further regioselective substitutions/modifications of the neamine template are readily possible. Various bi-, tri-, tetra-substituted derivatives, with different functionalizing groups, as well as dimers and trimers of neamine were recently synthesized in our laboratory and experiments are currently in process to test the potentialities of such derivatives.

Acknowledgements

This work was supported by a 1 year financial support for the post-doctoral position of S.H. from the "Ministère délégué recherche et nouvelles technologies," which is gratefully acknowledged.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.chroma.2008.02.017.

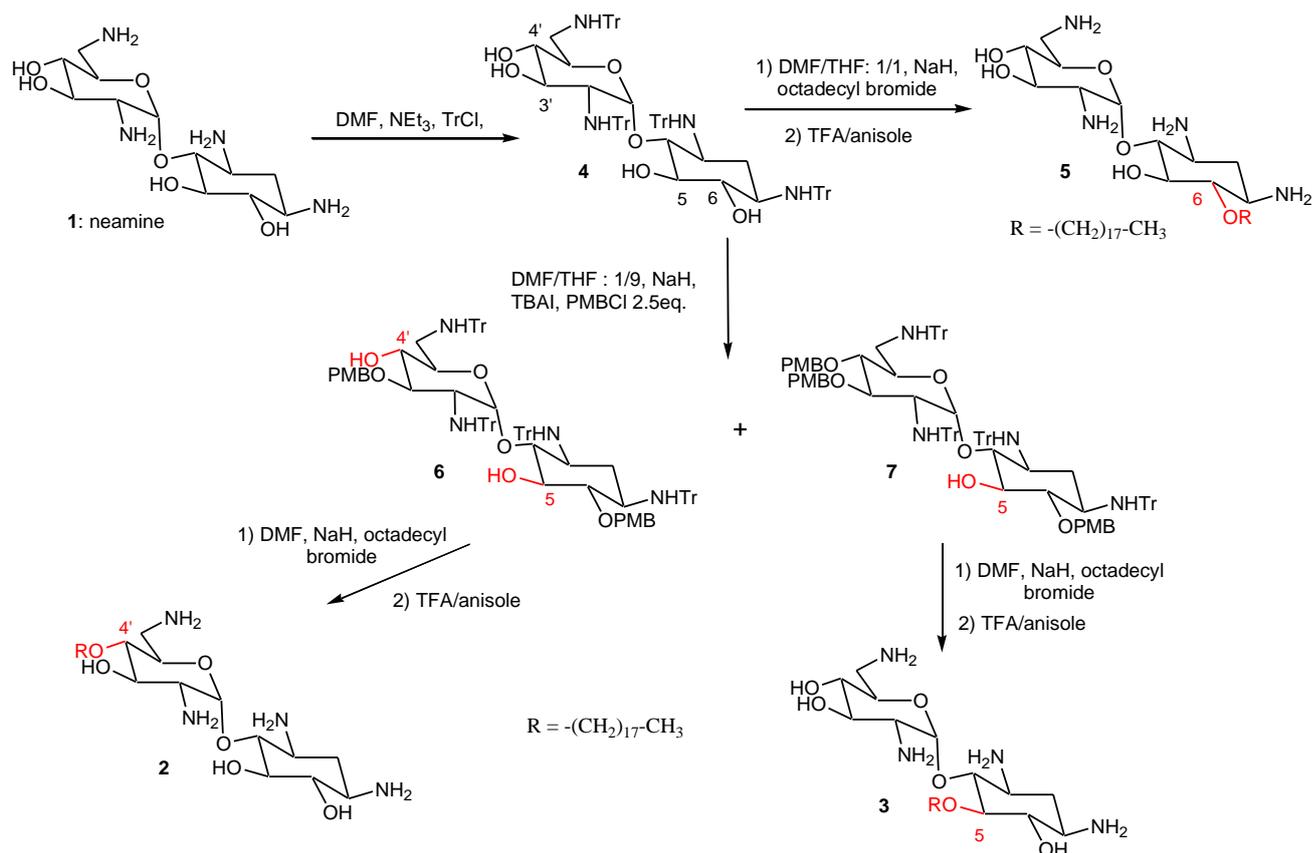
References

- [1] C.L. Schultz, M. Moini, *Anal. Chem.* 75 (2003) 1508.
- [2] G. Dotsevi, Y. Sogaah, D.J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.* 97 (1975) 1259.
- [3] A. Berthod, Y. Liu, C. Bagwill, D.W. Armstrong, *J. Chromatogr.* 731 (1996) 123.
- [4] O. Hofstetter, H. Lindstrom, H. Hofstetter, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2119.
- [5] C. Ravelet, C. Grosset, E. Peyrin, *J. Chromatogr. A* 1117 (2006) 1.
- [6] V.A. Davankov, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 892.
- [7] S.V. Rogozhin, V.A. Davankov, *Chem. Commun.* 490 (1971).
- [8] G. Galaverna, F. Pantò, A. Dossena, R. Marchelli, F. Bigi, *Chirality* 7 (1995) 331.
- [9] B. Natalini, R. Sardella, A. Macchiarulo, S. Natalini, R. Pellicciari, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 21.
- [10] A.A. Ozcan, R. Say, A. Denizli, A. Ersoz, *Anal. Chem.* 78 (2006) 7253.
- [11] R. Corradini, A. Dossena, G. Impellizzeri, G. Maccarrone, R. Marchelli, E. Rizzarelli, G. Sartor, G. Vecchio, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 10267.
- [12] D.H. Ryu, A. Litovchick, R.R. Rando, *Biochemistry* 41 (2002) 10499.
- [13] T.J. Ward, A.B. Farris, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 73.
- [14] I. Grapsas, I. Massova, S. Mobashery, *Tetrahedron* 54 (1998) 7705.
- [15] T.L. Nagabhushan, A.B. Cooper, W.N. Turner, H. Tsai, S. McCombie, A.K. Mallams, D. Rane, J.J. Wright, P. Reichert, D.L. Boxler, J. Weinstein, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 5253.
- [16] A. Sreedhara, J.D. Freed, J.A. Cowan, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 8814.
- [17] M. Haroun, C. Ravelet, C. Grosset, A. Ravel, A. Villet, E. Peyrin, *Talanta* 68 (2006) 1032.
- [18] M. Remelli, P. Fornasari, F. Pulidori, *J. Chromatogr. A* 761 (1997) 79.
- [19] Q.W. Wan, P. Shaw, M. Davies, D. Barrett, *J. Chromatogr. A* 765 (1997) 187.

Supplementary data

Copper (II) Complexes of Lipophilic Aminoglycoside Derivatives for the Amino Acid Enantiomeric Separation by Ligand-Exchange Liquid Chromatography

1. Synthesis and characterization of the lipophilic neamine derivatives

**General**

^1H NMR (400 MHz) and ^{13}C NMR (100 MHz) spectra were recorded with a Bruker Advance 400 spectrometer using the residual solvent signal as internal standard. HRMS were obtained from the Mass Spectrometry Service, CRMPO, at the University of Rennes I, France, using a MICROMASS ZABSPEC-TOF spectrometer and a VARIAN MAT311 spectrometer. Melting points were determined with a Büchi 510 apparatus. Thin layer chromatography was performed on silica gel (Alugram Sil G/UV₂₅₄) or Alumina gel (Alugram Alox N/UV₂₅₄) from Macherey-Nagel and spots were detected either by UV-absorption or by charring with ninhydrin. Column chromatography were performed on alumina gel (MP Ecochrom Biomedicals, Act II-III acc. to Brockman) or on C₁₈ silica gel (Macherey-Nagel polygoprep 60-50 C₁₈). All starting materials were obtained from suppliers and used without further purification unless otherwise noted. DMF was distilled in the presence of CaH_2 , THF on sodium with benzophenone and stored under argon atmosphere prior to use. Compounds **4**, **6** and **7** were synthesised as previously described (Riguet, E.; Désiré, J.; Bailly, C.; Décout, J.-L. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 8053).

4'-octadecylneamine derivative 2

To the protected neamine derivative **6** (1.0 g, 0.65 mmol) dissolved in DMF (60 mL) under argon was added NaH (60% in oil, 520 mg, 13 mmol). After 30 min stirring at room temperature, 1-octadecyl bromide (325 mg, 0.95 mmol) was added. The reacting mixture was stirred at 70°C for 24 h and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ (100 mL) and washed with sat. aq. NH₄Cl (100 mL), water (100 mL) then brine (100 mL). The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and evaporated to dryness. After purification on alumina gel eluting with CH₂Cl₂/cyclohexane (30/70), the protected 4'-octadecylneamine derivative was obtained (40%). The protecting groups were then removed in a TFA/CH₂Cl₂/anisole mixture (10 mL/10 mL/1 mL). After concentration under reduced pressure, coevaporation with MeOH and purification on a C18 silica gel column with an eluting gradient H₂O/MeOH, compound **2** was obtained in a 60% yield.

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ = 5.98 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H1'), 4.00-4.16 (m, 3H, H3', H4, H5', H6), 3.83 (m, 1H, CH₂O chain), 3.73 (t, J = 9.2 Hz, 1H, H5), 3.50-3.65 (m, 4H, H3, H2', H6, 1H CH₂O chain), 3.26-3.46 (m, 3H, H1, H4', H6'b), 3.20 (m, 1H, H6'a), 2.51 (m, 1H, H2_{eq}), 1.94 (dd, J = 12.4 Hz, 1H, H2_{ax}), 1.53 (s, 2H, CH₂ chain) 1.05-1.35 (m, 30H, CH₂ chain), 0.78 (t, J = 6.4 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ = 95.2 (C_{1'}), 79.5 (C_{4'}), 77.1 (C₄), 75.2 (C₅), 74.3 (CH₂O), 72.5 (C₆), 68.6 (C_{5'}), 68.5 (C_{3'}), 53.8 (C_{2'}), 49.8 (C₁), 48.7 (C₃), 40.6 (C_{6'}), 32.0, 29.9, 29.8 et 29.5 (CH₂ chain), 28.2 (C₂), 25.7 et 22.7 (CH₂ chain), 13.9 (CH₃ chain); MS (FAB): *m/z* = 615 [M+K]⁺, 575 [M+H]⁺, 413, 395, 366, 324, 203, 163; HRMS (ESI): [M+H]⁺ *m/z* calculated = 575.4548, found = 575.4748.

5-octadecylneamine derivative 3

To the protected neamine **7** (1.0 g, 0.60 mmol) dissolved in DMF (60 mL) under argon was added NaH (60% in oil, 250 mg, 6.25 mmol). After 30 min stirring at room temperature, 1-octadecyl bromide (1.0 g, 3.0 mmol) was added. The reacting mixture was stirred at 70°C for 24 h and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ (100 mL) and washed with sat. aq. NH₄Cl (100 mL), water (100 mL) then brine (100 mL). The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and evaporated to dryness. After purification on alumina gel with CH₂Cl₂/cyclohexane (20/80), the protected 5-octadecylneamine derivative was obtained (68%). The protecting groups were then removed in a mixture of TFA/CH₂Cl₂/anisole (10 mL/10 mL/1 mL) to give, after concentration under reduced pressure, coevaporation with MeOH and purification on a C18 silica gel column with an eluting gradient H₂O/MeOH, the compound **3** in a 64% yield.

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ = 5.70 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H1'), 3.77-3.96 (m, 4H, H3', H4, H5', H6), 3.52-3.68 (m, 3H, H5, CH₂O chain), 3.37-4.48 (m, 2H, H3, H4'), 3.30 (t, J = 9 Hz, 1H, H6'b), 3.19-3.27 (m, 2H, H1, H2'), 3.04 (dd, J = 8.4 et 13.2 Hz, 1H, H6'a), 2.35 (dd, J = 4.0 et 12.4 Hz, 1H, H2_{eq}), 1.76 (dd, J = 12.4 Hz, 1H, H2_{ax}), 1.43 (s, 2H, CH₂ chain) 1.05-1.25 (m, 30H, CH₂ chain), 0.76 (t, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ = 92.9 (C_{1'}), 82.4 (C₅), 73.5 (C₄), 72.9 (C₆), 72.2 (CH₂O), 70.7 (C_{4'}), 70.0 (C_{5'}), 68.7 (C_{3'}), 53.5 (C_{2'}), 49.9 (C₁), 48.9 (C₃), 40.5 (C_{6'}), 31.8, 29.7, 29.5, 29.4, 29.3 et 29.2 (CH₂ chain), 27.9 (C₂), 25.3 et 22.5 (CH₂ chain), 13.7 (CH₃ chain); MS (FAB): *m/z* = 575 [M+H]⁺, 415, 397, 161; HRMS (ESI): [M+H]⁺ *m/z* calculated = 575.4548, found = 575.4751, [M+Na]⁺ *m/z* calculated = 597.4567, found = 597.4546.

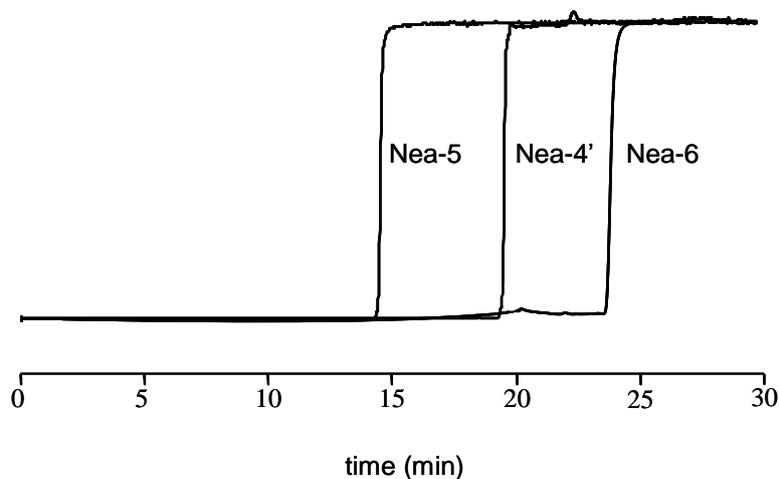
6-octadecylneamine derivative 5

To the tritylated neamine derivative **4** (1.5 g, 1.16 mmol) dissolved in a mixture of DMF/THF (20 mL/120 mL) under argon was added NaH (60% in oil, 439 mg, 11 mmol). After 30 min stirring at room temperature, 1-octadecyl bromide (850 mg, 2.55 mmol) was added. The reacting mixture was stirred at room temperature for 4 h and concentrated under reduced

pressure. The residue was dissolved in CH_2Cl_2 (100 mL) and washed with sat. aq. NH_4Cl (100 mL), water (100 mL) then brine (100 mL). The organic phase was dried over MgSO_4 , filtered and concentrated to dryness. After purification on alumina gel with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (99.5/0.5), the protected 6-octadecylneamine derivative was obtained (21%). The protecting groups were then removed in a mixture of TFA/ CH_2Cl_2 /anisole (10 mL/10 mL/1 mL) to give, after concentration under reduced pressure, coevaporation with MeOH and purification on a C18 silica gel column with an eluting gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, the compound **5** in a 56% yield.

^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ = 5.83 (d, J = 3.2 Hz, 1H, $\text{H1}'$), 3.80-3.93 (m, 3H, $\text{H3}'$, H4 , $\text{H5}'$), 3.78 (m, J = 7.6 Hz, 1H, CH_2O chain), 3.67 (t, J = 9.2 Hz, 1H, H5), 3.52 (m, J = 7.6 Hz, 1H, CH_2O chain), 3.29-3.41 (m, 5H, H3 , $\text{H2}'$, H6 , $\text{H4}'$, $\text{H6}'\text{b}$), 3.10-3.24 (m, 2H, H1 , $\text{H6}'\text{a}$), 2.37 (m, 1H, H2_{eq}), 1.82 (dd, J = 12.4 Hz, 1H, H2_{ax}), 1.48 (s, 2H, CH_2 chain) 1.05-1.25 (m, 30H, CH_2 chain), 0.75 (t, J = 6.8 Hz, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O): δ = 95.9 (C_1'), 80.5 (C_6), 77.8 (C_4), 75.7 (C_5), 74.2 (CH_2O), 70.8 (C_4'), 69.2 (C_5'), 68.3 (C_3'), 53.5 (C_2'), 49.0 (C_1), 48.4 (C_3), 40.2 (C_6'), 31.8, 29.6, 29.5 et 29.3 (CH_2 chain), 28.3 (C_2), 25.3 et 22.5 (CH_2 chain), 13.7 (CH_3 chain); MS (FAB): m/z = 615 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 575 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 415, 397, 161; HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z calculated = 575.4548, found = 575.4749.

2. Breakthrough curves for copper (20 mM in water, flow rate of 15 $\mu\text{L}/\text{min}$) on the three neamine derivative-modified stationary phases.



Trois nouvelles phases stationnaires chirales (C18 N_{éa}4', C18 N_{éa}5 et C18 N_{éa}6) ont donc été utilisées avec succès pour la séparation d'un nombre total de douze couples d'énantiomères. Les propriétés énantiosélectives et le domaine d'application des PSCs créées dépendent de la position de la chaîne C₁₈ sur la néamine (4', 5 ou 6).

I.2 Publication N°2 “Chromatographie chirale par échange de ligands utilisant le carbone graphite poreux modifié par des dérivés dinaphtyle de la néamine en tant que phase stationnaire pour la séparation des énantiomères d'acides aminés”

Le principal avantage des nouveaux sélecteurs chiraux à base de néamine, par rapport aux dérivés d'acides aminés, est que la position, la nature et le nombre de groupements lipophiles (substituants) sur la néamine ainsi que le type de support chromatographique peuvent être aisément modifiés avec une grande diversité, afin de moduler et d'optimiser l'énantiosélectivité.

D'une manière générale, le choix des substituants de la néamine est orienté en fonction du type de support chromatographique utilisé, par exemple la fonctionnalisation de la néamine avec des substituants aromatiques exige l'utilisation d'une phase stationnaire constituée de carbone graphite poreux (CPG).

Dans ce travail, deux groupements naphtyles ont été introduits en position 3' et 6 de la néamine créant un nouveau dérivé lipophile qui peut être immobilisé d'une manière non covalente sur un support solide de type CGP. Ce nouveau type de support est intéressant car il est caractérisé par une structure cristalline en feuillet de plans d'atomes de carbone permettant une stabilité chimique et une adsorption plus efficace de ce type de dérivés. Par ailleurs l'absence de groupements résiduels silanoates (qui altèrent la reconnaissance chirale) lui permet d'être un support idéal pour l'immobilisation non covalente de sélecteurs chiraux constitués de substituants aromatiques hydrophobes.

Nous avons donc étudié les propriétés énantiosélectives du dérivé dinaphtyle de la néamine dans les conditions de chromatographie chirale par échange de ligands après son adsorption sur CGP. une deuxième partie du travail aura pour objectif de modifier la nature et la position des substituants lipophiles de la néamine.

Chiral ligand-exchange chromatography of amino acids using porous graphitic carbon coated with a dinaphthyl derivative of neamine

Mustapha Zaher · Corinne Ravelet ·
Isabelle Baussanne · Anne Ravel · Catherine Grosset ·
Jean-Luc Décout · Eric Peyrin

Received: 9 September 2008 / Revised: 10 October 2008 / Accepted: 15 October 2008 / Published online: 9 November 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract In this paper, we describe the preparation and the evaluation of a porous graphitic carbon (PGC) column coated with a new dinaphthyl derivative of neamine for chiral ligand-exchange (LE) chromatography. It was shown that the graphitic surface/dinaphthyl anchor system efficiently ($1.15 \mu\text{mol}/\text{m}^2$) and stably (three months of intensive use) adsorbs the neamine template onto the chromatographic support. The resulting coated PGC stationary phase showed appreciable LE-based enantioselective properties towards several native amino acids.

Keywords Porous graphitic carbon · Chiral separation · Amino acid enantiomers · Ligand-exchange chromatography · Neamine derivative

Introduction

During the last few decades, the chromatographic separation of native amino acid enantiomers has been accomplished using various kinds of chiral stationary phases (CSPs). Such CSPs are typically based on immobilized crown ethers [1], macrocyclic antibiotics [2, 3], target-specific bioaffinity receptors [4, 5] and ligand-exchange (LE)-based selectors [6].

LE-based chromatography using immobilized amino acids or amino amides as ligands and copper as the central

ion constitutes one of the most useful techniques for the resolution of nonderivatized amino acids. Two design strategies have been reported for LE-based CSPs. The first one involves the covalent immobilization of the ligand onto the chromatographic surface. The second approach is related to the physical adsorption of the optically active species onto a matrix. Such ligand-coated columns present some important advantages in terms of simplicity, readiness and economy, and they represent a useful approach for quickly evaluating the enantioselective potentialities of a new central ion–ligand complex. The methodology commonly involves coating C18-modified silica surfaces with ligands that are covalently functionalized by a suitable apolar anchor [7, 8]. An interesting alternative strategy, the use of porous graphitic carbon (PGC) as the immobilization matrix, has also been reported for LE-based chromatography [9–11]. It was shown that, due to the unique characteristics of PGC, including surface uniformity, chemical stability, high binding capacity, particular retentive properties and an absence of residual silanol groups, this kind of support is particularly well suited to the development of permanently coated stationary phases.

Very recently, we reported a new class of ligands for enantioselective LE chromatography. This was based on lipophilic derivatives of a cationic oligosaccharide, i.e., the aminoglycoside neamine [12]. Neamine derivatives carrying a lipophilic octadecyl chain at the 4', 5 or 6 positions were dynamically adsorbed onto C18 reversed-phase silica gel supports to create three different LE-based CSPs. It was demonstrated that, under copper-containing mobile phase conditions, these stationary phases were able to enantio-separate various compounds, such as amino acids, nucleosides and dipeptides [12].

In this work, we tested the feasibility of designing a LE-based CSP by coating the surface of PGC with an adequate

M. Zaher · C. Ravelet · I. Baussanne · A. Ravel · C. Grosset ·
J.-L. Décout · E. Peyrin (✉)
Département de Pharmacochimie Moléculaire UMR 5063 CNRS,
Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble FR 2607, Université
Grenoble I (Joseph Fourier), UFR de Pharmacie,
38041 Grenoble cedex 9, France
e-mail: eric.peyrin@ujf-grenoble.fr

derivative of neamine. It is well established that aromatic, planar species are well adsorbed onto the PGC support due to intense London-type dispersive interactions between the flat surface and the functional groups [13]. In addition, polar ionic species are also known to interact significantly with PGC due to charge-induced interactions with the polarizable surface of graphite [13]. Thus, it was expected that a neamine derivative with aromatic cycles serving as anchor groups would be strongly adsorbed onto a graphitic surface. In this context, a dinaphthyl (at positions 3' and 6) derivative of neamine was synthesized in our laboratory (Fig. 1). This neamine derivative was then dynamically adsorbed on a PGC support to create the LE-based stationary phase. The PGC surface concentration of the neamine derivative and the stability of this coated stationary phase over time, were assessed, and its enantioseparation properties towards several amino acid racemates were subsequently evaluated.

Experimental

Chemicals

All racemates and enantiomers were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin, France) and Bachem (Weil am Rhein, Germany). Copper(II) sulfate was obtained from Prolabo (Rhône-Poulenc, France). HPLC-grade methanol was purchased from Fischer Scientific (Loughborough, UK). Water was obtained from an Elgastat option water purification system (Odil, Talant, France) fitted with a reverse osmosis cartridge.

All starting materials for the neamine derivative synthesis were obtained from suppliers and used without further purification unless otherwise noted. DMF was distilled in the presence of CaH_2 , THF over sodium with benzophenone, and stored under argon atmosphere prior to use.

Synthesis and characterization of 3',6-di-*O*-2-methylnaphthalene-neamine

^1H NMR (400 MHz) and ^{13}C NMR (100 MHz) spectra were recorded with a Bruker (Rheinstetten, Germany) Avance 400 spectrometer using the residual solvent signal as internal standard. LRMS were achieved with a Nermag (Argentueil, France) spectrometer for the FAB, DCI and EI techniques, with a Bruker Autoflex spectrometer for the MALDI, and with a Waters (Milford, MA, USA) ZQ for the ESI. HRMS were obtained from the Mass Spectrometry Service, CRMPO, at the University of Rennes I, France, using a Micromass (Milford, MA, USA) ZabSpec TOF spectrometer and a Varian (Palo Alto, CA, USA) MAT311 spectrometer. Melting points were determined with a Buchi (Flawil, Switzerland) 510 apparatus. Thin-layer chromatography was performed on silica gel (Alugram Sil G/UV₂₅₄) or alumina gel (Alugram Alox N/UV₂₅₄) from Macherey-Nagel (Dueren, Germany) and spots were detected either by UV-absorption or by charring with ninhydrin. Column chromatography was performed on alumina gel (EcoChrom MP, MP Biomedicals, Eschwege, Germany; Brockman activity II–III) or on C_{18} silica gel (Polygoprep 60-50 C_{18} , Macherey-Nagel).

To a solution of compound **1** [14] (2.0 g, 1 equiv.) in 20 mL of dry DMF under argon, sodium hydride (60%, 217 mg, 4 equiv.) was added, and after 15 min of stirring at room temperature, 2-(bromomethyl)naphthalene (857 mg, 3 equiv.) was added too. The resulting mixture was stirred for 24 h at room temperature and then dichloromethane was added. The organic solution was washed with an ammonium chloride aqueous saturated solution, water and then brine, before being dried over MgSO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue obtained was purified by chromatography on alumina gel with a cyclohexane/dichloromethane mixture (v/v: 50/50) employed as eluent to give com-

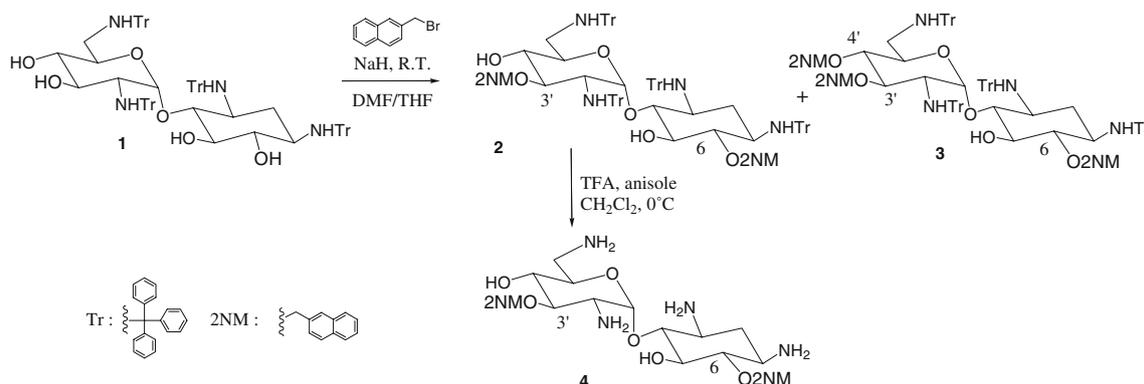


Fig. 1 Synthesis and structure of 3',6-di-*O*-2-methylnaphthalene-neamine (**4**)

pounds **2** and **3** with yields of 40% and 38%, respectively. Compound **2**: LRMS (FAB⁺, NBA) $m/z = 1594$ [M+Na]⁺; compound **3**: LRMS (FAB⁺, NBA) $m/z = 1735$ [M+Na]⁺. The protected compound **2** was dissolved at 0 °C in CH₂Cl₂/trifluoroacetic acid (1/1, v/v) with a small quantity of anisole. After two hours of stirring, the solvents were removed under reduced pressure. H₂O and Et₂O were added and the aqueous phase was washed twice with Et₂O before being concentrated and poured onto a C18 silica gel column. The compound was eluted with a gradient of H₂O/MeOH and obtained pure as trifluoroacetic acid salt with 70% yield.

3',6-Di-*O*-2-methylnaphthalene-neamine (compound **4**): 70%, ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ ppm = 7.84–7.89 (m, 8H, H-naphthyl), 7.47–7.50 (m, 6H, H-naphthyl), 5.86 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H-1'), 5.05 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, CH₂-naphthyl), 5.02 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, CH₂-naphthyl), 4.88 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, CH₂-naphthyl), 4.85 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, CH₂-naphthyl), 4.04 (dd, $J = 8.5$ and 10.4 Hz, 1H, H-3'), 3.96 (m, 1H, H-5'), 3.91 (dd, $J = 10.0$ Hz, 1H, H-4), 3.82 (dd, $J = 9.2$ Hz, 1H, H-5), 3.65 (dd, $J = 9.2$ Hz, 1H, H-4'), 3.58 (dd, $J = 9.2$ Hz, 1H, H-6), 3.45 (dd, $J = 3.6$ and 10.4 Hz, 1H, H-2'), 3.43–3.28 (m, 3H, H-3, H-6'b, H-1), 3.22 (dd, $J = 9.6$ and 12.8 Hz, 1H, H-6'a), 2.42 (ddd, $J = 4.0$ and 12.4 Hz, 1H, H-2eq.), 2.01 (ddd, $J = 12.4$ Hz, 1H, H-2ax.); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ ppm = 132.9–134.6 (6C-naphthyl), 126.3–128.6 (14CH-naphthyl), 95.8 (C-1'), 79.8 (C-6), 77.5 (C-4), 75.6 (C-5 and C-3'), 75.1 (2CH₂-naphthyl), 70.9 (C-4'), 69.9 (C-5'), 52.6 (C-2'), 48.8 (C-1), 48.3 (C-3), 39.8 (C-6'), 28.1 (C-2); LRMS (DCI⁺) $m/z = 603$ [M+H]⁺, 463, 303, 141; HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺ m/z calculated 603.3183, found 603.3186; [M+Na]⁺ m/z calculated 625.3002, found 625.3006.

Preparation of the coated PGC

A commercial PGC column (Hypercarb: 150×4.6 mm i.d.; particle diameter: 5 μm; pore size: 250 Å; batch number: 260R3) was supplied by Thermo Electron Corporation (Waltham, MA, USA). The coating procedure was performed using a water–methanol (98–2, v/v) mixture containing 3',6-di-*O*-2-methylnaphthalene-neamine at a concentration of 10 mM. This coating solution was passed through the PGC column at a flow rate of 0.1 mL/min for one night. Unbound 3',6-di-*O*-2-methylnaphthalene-neamine was then removed by washing the PGC column extensively with a water–methanol (98–2, v/v) mobile phase. The amount of ligand adsorbed onto the chromatographic support was estimated by subtracting the UV absorbance, at 275 nm, of the unbound modified neamine solution (corresponding to both the unbound ligand fraction of the coating solution and the washed fraction) from the initial solution.

Chromatographic experiments

The HPLC system consisted of a 10AT LC Shimadzu pump (Sarreguemines, France), a model 7125 Rheodyne injection valve (Interchim, Montluçon, France) fitted with a 20 μL sample loop, and a SPD-10A Shimadzu UV-visible detector (detection at 236 nm). The mobile phase consisted of water or water–methanol (98–2, v/v) containing various concentrations of CuSO₄. The flow rate was varied from 0.10 to 1.50 mL/min in relation to the compound analyzed. Solute samples were prepared in water and injected in triplicate at ambient temperature (~23 °C). The elution order of the enantiomers was checked by injecting single enantiomers. The retention factor (k) and the efficiency of the column (N) were estimated by calculating the first and second moments of the peaks, as previously described [15]. The first solvent disturbance peak was used as a void time marker. The retention times and column void time were corrected for the extra-column void time. The enantioselectivity α was calculated as follows: $\alpha = k_2/k_1$, where k_2 is the retention factor for the more strongly retained enantiomer and k_1 is the retention factor for the less strongly retained enantiomer. The chromatographic resolution R_s was calculated using the following relation: $R_s = [1.18(t_{R2} - t_{R1})]/(w_{(50)2} + w_{(50)1})$, where t_R is the retention time determined at the peak apex and $w_{(50)}$ is the width at 50% of the peak height. When not in use, the column was stored in the mobile phase at 4 °C.

Results and discussion

PGC surface concentration of dinaphthylneamine

The amount of the 3',6-di-*O*-2-methylnaphthalene-neamine derivative (compound **4** in Fig. 1) adsorbed onto the PGC support was found to be 160 μmol/column. Using a PGC specific surface area of 120 m²/g and a packing weight of 1.15 g [16], the surface concentration of the modified neamine was calculated to be 1.15 μmol/m². This result compares very well with previous data. As an example, the surface coverage of a PGC support with aryl-substituted ligands (such as proline and phenylalanine) was found to lie between 0.59 and 1.26 μmol/m² [10, 11]. Note that a surface coverage of 1.15 μmol/m² corresponds to an average surface area available for each dinaphthyl neamine molecule of 145 Å². As the accessible surface area for a methylnaphthalene moiety is estimated to be ~80 Å² [17], it would seem that only one naphthyl anchor group is in contact with the graphitic surface.

For a comparison, the surface coverages of C18 chromatographic supports coated with octadecylneamine derivatives

were calculated. Using the Cu(II) dynamic binding capacity of the neamine derivative-based stationary phases, evaluated by frontal chromatography [12], and assuming a 1:1 complex between Cu(II) and neamine, the surface coverage can be estimated to range between 0.06 and 0.12 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ (for a specific surface area of the C18 octadecyl silica support equal to 450 m^2/g). This is an order of magnitude lower than the value obtained for the coating of the PGC support with the dinaphthylneamine derivative. Such data indicate that the use of the graphitic surface/dinaphthyl anchor system is particularly useful for obtaining the efficient adsorption of the neamine template to the chromatographic support.

Stability over the time of the dinaphthylneamine-coated PGC column

The temporal stability of the dinaphthylneamine-coated PGC column was estimated, under conventional LE-based

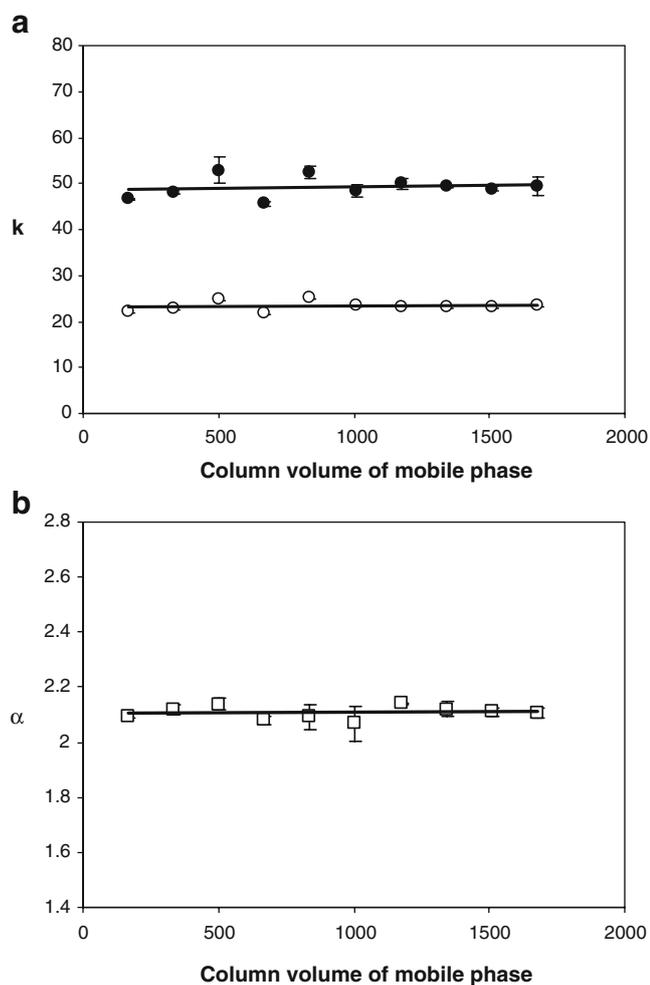


Fig. 2 Stability of the coated PGC column as exemplified by the effect of the column volume of the mobile phase on **a** the retention factor (unfilled circles, L-enantiomer; filled circles, D-enantiomer) and **b** the enantioselectivity for the methionine racemate. Mobile phase consisted of water–methanol (98–2, v/v) containing 0.5 mM CuSO_4

chromatographic conditions (the mobile phase consisted of water–methanol 98–2, v/v, containing 0.5 mM CuSO_4), by evaluating the variation of the solute retention factor and the enantioselectivity with the mobile phase volume that is passed through the column. As shown in Fig. 2, the values of k and α for methionine were largely unchanged after the passage of more than 1500 column volumes of mobile phase. This stability was also tested after intensive use of the column for more than three months (under an aqueous mobile phase containing 1 mM CuSO_4), and the chromatographic parameters were found to be unaltered. This was after the passage of about 15,000 column volumes of mobile phase. As a comparison, the previously prepared octadecylneamine-coated C18 columns were found to be stable for a period corresponding to about 5000 column volumes of mobile phase [12]. In addition, the effects of long-term storage (for a period of about one month) under the mobile phase conditions were evaluated. Such long-term storage did not significantly affect the retention and enantioselective properties of the PGC column. Such results demonstrate the very good temporal stability of the coated stationary phase, due to the strong affinity of the dinaphthylneamine for the PGC support and the inert nature of the graphitic surface.

Evaluation of the retention and enantioseparation properties of the dinaphthylneamine-coated PGC column

The properties of the dinaphthylneamine-coated PGC column were evaluated using thirteen amino acids as probe solutes (Table 1). In order to achieve a rapid and optimized

Table 1 Chromatographic parameters for the probe amino acids using the neamine derivative-coated PGC column^a

	k	A	N	R_s
Alanine	2.87	1.00	220	0.00
Arginine ^b	6.43	1.00	30	0.00
Asparagine	4.94	1.14	640	0.92
Aspartic acid ^b	72.97	1.92	75	1.94
Glutamine ^b	8.81	1.35	100	0.95
Histidine ^b	16.03	1.00	70	0.00
Isoleucine ^b	6.92	1.24	50	0.44
Leucine ^b	11.36	1.00	50	0.00
Methionine ^b	37.66	2.14	90	2.45
Proline	3.58	1.22	155	0.74
Serine	3.53	1.00	575	0.00
Tyrosine ^b	168.78	1.00	70	0.00
Valine	4.28	1.15	440	0.73

^a Experimental conditions: mobile phase: H_2O containing 1 mM CuSO_4 ; injection volume: 20 μL ; detection at 236 nm; flow rate: 0.1 mL/min. Relative standard deviation of the solute retention factors was typically less than 5%. N and k values are reported for the more strongly retained enantiomer

^b Flow rate: 1.5 mL/min

analysis, some different operating chromatographic conditions were tested in preliminary experiments using three test racemates (methionine, aspartic acid, and glutamine). These include changes in the eluent copper concentration (from 0.1 to 5 mM), the nature of its associated anion (sulfate, acetate, chloride), and the mobile phase flow rate (0.1 to 1.5 mL/min). In all cases, replacing the sulfate with the acetate or chloride resulted in a decrease in the solute retention factor and the enantioselectivity, as previously observed with the octadecylneamine-coated C18 chromatographic supports [12]. The most interesting feature was related to the modification of the eluent Cu(II) concentration (sulfate salt). As an example of this, k , α and R_s versus eluent CuSO_4 concentration plots are presented in Fig. 3 for the methionine racemate. The enantiomer retention factors decreased greatly as the Cu(II) concentration in the mobile phase increased. This can be explained by the fact that, as the copper content of the mobile phase was enhanced, the equilibrium between fixed and mobile complexes was

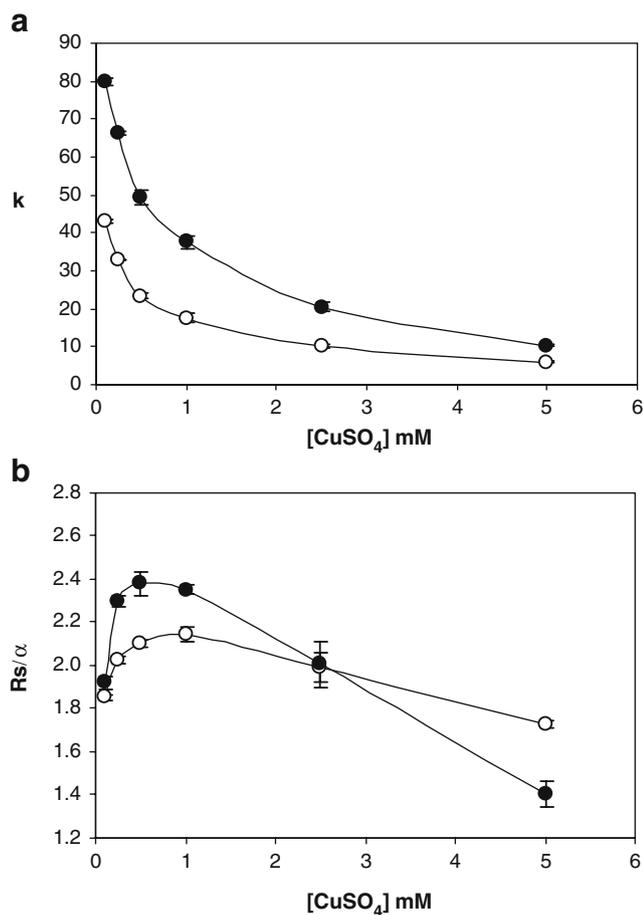


Fig. 3 Effects of the eluent CuSO_4 concentration on **a** the retention factor (unfilled circles, L-enantiomer; filled circles, D-enantiomer) and **b** the enantioselectivity (unfilled circles) and resolution (filled circles) for the methionine racemate. Experimental conditions: mobile phase: H_2O ; injection volume: 20 μL ; detection at 236 nm; flow rate: 1.5 mL/min

shifted in favor of the latter. This retention behavior was associated with an initial increase and then a decrease in the enantioselectivity and resolution for the two racemates (Fig. 3b). The maximum was reached for a copper concentration of 0.5–1 mM. Therefore, a mobile phase CuSO_4 concentration of 1 mM was chosen for work performed under optimal conditions, i.e., achieving the highest resolution with a reduced analysis time. The mobile phase flow rate was adjusted for the injected solutes in order to provide acceptable retention times.

The chromatographic data are summarized in Table 1 for all of the tested amino acids. The k value for the more strongly retained enantiomer varied from ~ 3 to ~ 40 , except for the anionic (aspartic acid) and the aromatic (tyrosine) species, which were characterized by very high retention factors (~ 70 and ~ 170). This was likely due to intense electrostatic interactions with the immobilized cationic ligand for aspartic acid, and due to strong dispersive interactions with the graphitic surface and/or the naphthyl moiety of adsorbed neamine for tyrosine. From an enantioseparation point of view, seven of the thirteen amino acid racemates were resolved, at least partially, using the dinaphthylneamine-coated PGC column. Figure 4 presents the enantiomeric separation obtained for aspartic acid and methionine. In all cases, the L-enantiomer was eluted before the D-enantiomer, as previously reported with the octadecylneamine-coated

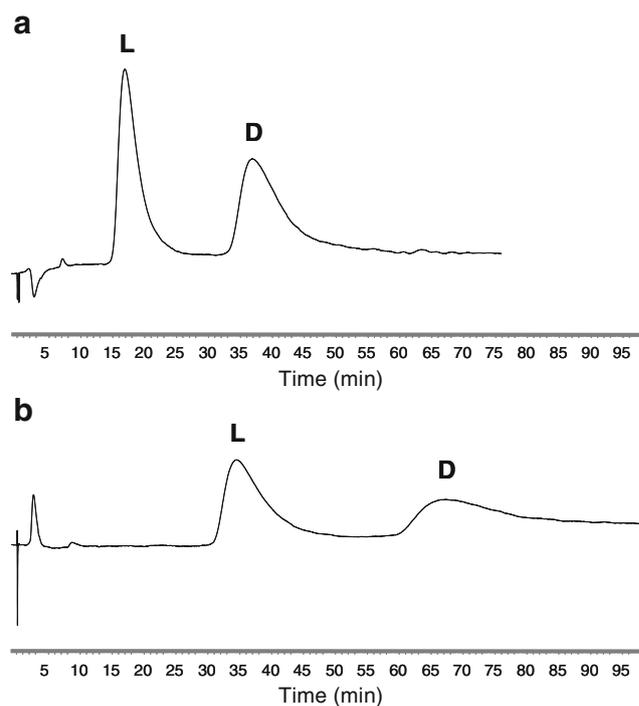


Fig. 4 Representative chromatograms obtained using the neamine derivative-coated PGC column for the **a** methionine and **b** aspartic acid racemates. Experimental conditions: phase mobile: H_2O containing 1.0 mM CuSO_4 ; injection volume: 20 μL ; detection at 236 nm; flow rate: 1.5 mL/min

C18 chromatographic supports [12]. The efficiency performances were weak; the number of theoretical plates for the D-enantiomers ranged between 30 and 100 for the highest flow rate and 150 and 650 for the lowest flow rate (Table 1). Such low efficiencies are consistent with data commonly observed for coated LE-based CSPs [7, 8].

Some amino acids, such as glutamine and methionine, which were not resolved on the previously prepared 5- and 6-octadecylneamine-based C18 columns [12], can be enantiodiscriminated using the dinaphthylneamine-coated PGC column. On the other hand, enantiomers of valine, isoleucine and serine were not separated in the present study, while they were discriminated using the 4'-octadecylneamine-coated C18 column [12]. Proline was the amino acid that was most efficiently resolved with the coated C18 chromatographic systems [12], and methionine presented the best resolution and enantioselectivity values on the present coated PGC stationary phase. Such differences in the chiral resolution properties between the two kinds of LE-based CSPs can be explained by a variety of factors. These include different operating chromatographic conditions (particle diameter, flow rate, eluent copper concentration) and differences in the surface concentrations of the immobilized neamine derivative (see above). In addition, in comparison with the octadecylneamine-coated C18 stationary phases, some important physicochemical differences can be identified for the dinaphthylneamine-coated PGC stationary phase. The planar surface of the PGC differs strongly, in terms of its three-dimensional structure and affinity characteristics, from a "conventional" octadecyl silica support. Moreover, the neamine ligand was heterogeneously substituted, i.e., disubstitution at positions 3', 6 versus monosubstitution at positions 4', 5 or 6, and a methylnaphthyl versus an octadecyl group was used as an anchor moiety. These structural differences are assumed to affect the stability of the diastereoisomeric ternary complexes between the neamine ligand, the Cu(II) ion and the enantiomers significantly [6], with crucial implications for the enantioselective ability of the coated PGC column.

Conclusion

In this paper, we report a LE-based CSP which employs a graphitic surface/dinaphthyl anchor strategy for the immo-

bilization of the neamine ligand onto the chromatographic support. This methodology appears to be a convenient approach, as it enables the easy creation of a stable, high-capacity coated stationary phase exhibiting good enantioselectivity towards some native amino acids. The present report is also of interest because it demonstrates that important modifications in terms of the type of substitution, the nature of the functionalizing group and the kind of chromatographic matrix employed do not negate the chiral recognition ability of the ligand. This suggests that the active neamine core is able to accept a wide variety of substitutions/modifications in order to modulate its enantioselective properties.

References

1. Dotsevi G, Sogaah Y, Cram DJ (1975) *J Am Chem Soc* 97:1259–1261
2. Berthod A, Liu Y, Bagwill C, Armstrong DW (1996) *J Chromatogr* 731:123–137
3. Haroun M, Ravelet C, Grosset C, Ravel A, Villet A, Peyrin E (2006) *Talanta* 68:1032–1036
4. Hofstetter O, Lindstrom H, Hofstetter H (2002) *Anal Chem* 74:2119–2125
5. Brumbt A, Ravelet C, Grosset C, Ravel A, Villet A, Peyrin E (2005) *Anal Chem* 77:1993–1998
6. Davankov VA (2003) *J Chromatogr A* 1000:891–915
7. Remelli M, Trombin D, Conato C (2002) *Chromatographia* 55:301–306
8. Natalini B, Sardella R, Macchiarulo A, Pellicciari R (2008) *J Sep Sci* 31:696–704
9. Knox JH, Wan QH (1995) *Chromatographia* 40:9–14
10. Wan QW, Shaw P, Davies MC, Barrett DA (1997) *J Chromatogr A* 765:187–200
11. Wan QW, Shaw P, Davies MC, Barrett DA (1997) *J Chromatogr A* 765:249–257
12. Zaher M, Baussanne I, Ravelet C, Halder S, Haroun M, Fize J, Décout JL, Peyrin E (2008) *J Chromatogr A* 1185:291–295
13. Hanai T (2003) *J Chromatogr A* 989:183–196
14. Riguét E, Désiré J, Bailly C, Décout JL (2004) *Tetrahedron* 60:8053–8064
15. Ruta J, Grosset C, Ravelet C, Fize J, Villet A, Ravel A, Peyrin E (2007) *J Chromatogr B* 845:186–190
16. Thermo Electron Corp. (2004) Hypercarb™ HPLC columns: technical guide. http://www.interscience.nl/promotiesites/hypersil/topics/promotiesites/hypersil/nieuws/hypercarb_technical.pdf, last accessed 23 Oct 2008
17. Yamamoto FM, Rokushika S (2001) *Anal Sci* 17:i213–i216

La phase stationnaire chirale constituée du dérivé dinaphthyle de la néamine peut donc séparer plusieurs couples d'énantiomères. Ces résultats sont importants car ils montrent que la reconnaissance chirale de la néamine n'est pas altérée par la modification de la nature des substituants sur la néamine ou par le changement du type de support chromatographique.

Par ailleurs, ce type de support chromatographique (CPG) présente une grande affinité envers le dérivé naphthyle de la néamine ce qui permet d'obtenir une phase stationnaire de grande stabilité (3 mois d'utilisation intensive).

I.3 Les dérivés dialkylés de la néamine complexés par le cuivre (II) en tant que nouveaux sélecteurs chiraux en chromatographie chirale par échange de ligands

I.3.1 Introduction

Les dérivés lipophiles de la néamine présentent en CCEL des propriétés énantiosélectives pour la séparation de plusieurs familles d'énantiomères (acides aminés, nucléosides et dipeptide) [1,2]. Ces différents types de sélecteurs chiraux ont été immobilisés d'une manière non covalente sur des supports solides chromatographiques (C_{18} ou CPG).

Dans le cas d'une immobilisation des ligands monoalkylés de la néamine sur des supports chromatographiques C_{18} , la position de la chaîne C_{18} greffée à la néamine (4', 5 ou 6) influence les propriétés énantiosélectives de ces sélecteurs, la nature des énantiomères résolus et le temps de rétention des énantiomères.

Afin d'établir une relation entre les dérivés de la néamine et le type de composés chiraux à séparer et augmenter la durée de vie des colonnes testées, deux dérivés dialkylés de la néamine ont été synthétisés et testés en tant que ligands chiraux immobilisés d'une manière non covalente sur des supports de type C_{18} (figure 1).

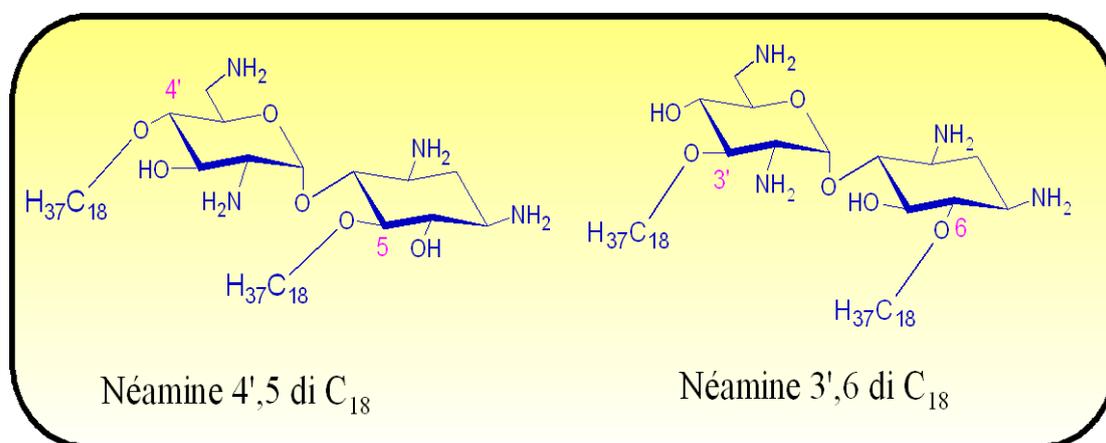


Figure 1 : Structure chimique de la néamine 4',5 di C_{18} et de la néamine 3',6 di C_{18} .

I.3.2 Matériel et méthodes

I.3.2.1 Synthèse et caractérisation des dérivés dialkylés de la néamine

L'alkylation sélective de la néamine est basée sur la protection des fonctions amine par des groupements encombrants. Ensuite, les fonctions 3' et 6 sont sélectivement alkylées. En

revanche l'alkylation des positions 4' et 5 nécessite une protection préalable des groupements hydroxyles par le para-méthoxybenzyle (PMB) (*figure 2*).

I.3.2.1.1 Synthèse de néamine 4',5 di C₁₈

Les synthèses des composés **1**, **2**, **3** ont été décrites par Riguet et al. (*figure 2*).

A une solution du composé **2** (350 mg, 0.22 mmol) dans du DMF (16 mL) sous argon, sont ajoutés successivement de l'hydrure de sodium (60% en suspension, 182 mg, 4.55 mmol) et du 1-bromo-octadécane (700 mg, 2,01 mmol). La réaction est laissée à 70 °C pendant 24 h puis refroidie à température ambiante. Au mélange réactionnel est ajouté 100 mL de dichlorométhane (DCM) et une solution saturée de chlorure d'ammonium (NH₄Cl). La phase organique est ensuite lavée avec 50 mL d'eau puis séchée sur sulfate de magnésium. Après évaporation des solvants organiques sous pression réduite, le résidu est chromatographié sur gel d'alumine en utilisant un mélange éluant pentane : DCM (7 : 3) pour obtenir le composé **7** (350 mg, 75%). Le composé **7** (100 mg, 0,05 mmol) est mis en solution dans un mélange DCM/TFA (1 :1) avec un peu d'anisole. Après 12 h de réaction à température ambiante du méthanol est ajouté, puis le mélange réactionnel est concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est lavé plusieurs fois avec de l'éther après addition d'eau. Le composé **8** (45 mg, 70 %) est obtenu après concentration de la phase aqueuse sous pression réduite.

Caractérisation :

¹H NMR (400 MHz, D₂O) : δ ppm = 5.9 (d, $J_{1'-2'}$ = 3.6 Hz, 1H, H1'), 3.2-4.2 (m, 15H, CH₂O, H3', H4, H5', H5, H6, H3, H2', H6', H4', H6', H1), 2.42 (m, 1H, H2_{eq}), 1.6 (m, 1H, H2_{ax}), 1.3-1.6 (m, 64H, CH₂ chain), 0.92 (t, J = 6.8 Hz, 6H, 2CH₃)

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ ppm = 93.9 (C-1'), 84.8 (C-5), 79.2 (C-4'), 77.3 (C-4), 74.8 (CH₂-O), 74.6 (CH₂-O), 73.8 (C-6), 73.3 (C-5'), 69.0 (C-3'), 54.4 (C-2'), 51.7 (C-1), 50.6 (C-3), 41.1 (C-6'), 33.2 (2CH₂), 31.5-30.6 (27CH₂), 29.6 (C-2), 27.2 (CH₂), 23.9 (2CH₂), 14.6 (2CH₃).

HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺ m/z calculé 827,7564, trouvé 827,7558 ; [M+Na]⁺ m/z calculé 849,7384, trouvé 849,7377 ; [M+K]⁺ m/z calculé 865,7123, trouvé 865,7149.

I.3.2.1.2 Synthèse de néamine 3',6 di C₁₈

A une solution du composé **1** (500 mg, 0.38 mmol) dans du DMF (16 mL) sous argon, sont ajoutés successivement de l'hydruure de sodium (60% en suspension, 220 mg, 5,5 mmol) et du 1-bromo-octadecane (1,3 g, 3,89 mmol). La réaction est laissée à 70 °C pendant 24 h puis refroidie à température ambiante. Au mélange réactionnel est ajouté 100 mL de dichlorométhane (DCM) et une solution saturée de chlorure d'ammonium (NH₄Cl). La phase organique est ensuite lavée avec 50 mL d'eau puis séchée sur sulfate de magnésium. Après évaporation des solvants organiques sous pression réduite, le résidu est chromatographié sur gel d'alumine en utilisant un mélange éluant pentane : DCM (3 :1) pour obtenir le composé **4** (499 mg, 56%) et le composé **5** (270 mg, 34%). Le composé **5** (175 mg, 0,09 mmol) est mis en solution dans un mélange TFA/DCM (1 :1) avec un peu d'anisole. Après 12 h de réaction à température ambiante du méthanol est ajouté et le mélange réactionnel est concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est lavé avec de l'éther après addition d'eau. Le composé **6** est obtenu (78 mg, 80%) après concentration de la phase aqueuse sous pression réduite.

Caractérisation :

¹H NMR (400 MHz, D₂O) : δ ppm = 5.9 (d, $J_{1',2'}$ = 3.6 Hz, 1H, H1'), 3.1-4.2 (m, 15H, CH₂O, H3', H4, H5', H5, H6, H3, H2', H6', H4', H6', H1), 2.5 (m, 1H, H_{2eq}), 2.0 (ddd, $J_{2ax-1} = J_{2ax-3} = J_{2eq-2ax} = 12.4$ HZ, 1H, H_{2ax}) , 1.30-1.68 (m, 64H, CH₂ chain), 0.92 (t, $J = 3.2$ Hz, 6H, 2CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ ppm = 95.6 (C-1'), 81.0 (C-6), 78.4 (C-4), 76.6 (C-5), 76.2 (C-3'), 73.6 (CH₂-O), 73.3 (CH₂-O), 72.0 (C-4'), 70.3 (C-5'), 53.2 (C-2'), 49.4 (C-1), 48.7 (C-3), 40.3 (C-6'), 31.7 (2CH₂), 29.8-29.1 (27CH₂, C-2), 25.6 (CH₂), 22.3 (2CH₂), 13.0 (2CH₃).

HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺ m/z calculé 827,7564, trouvé 827,7570 ; [M+Na]⁺ m/z calculé 849,7384, trouvé 849,7415 ; [M+K]⁺ m/z calculé 865,7123, trouvé 865,7121.

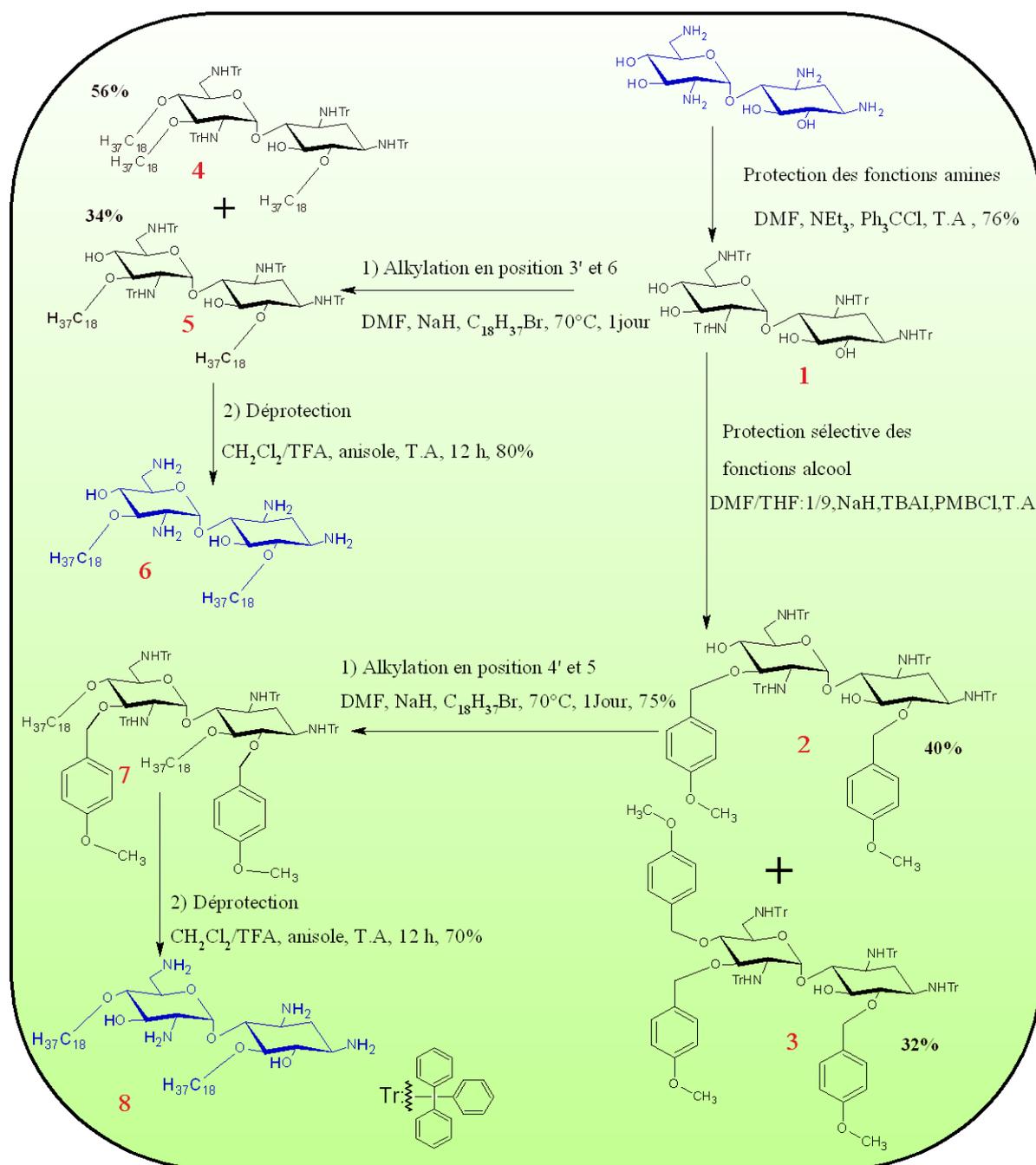


Figure 2 : Stratégie utilisée pour synthétiser des dérivés dialkylés de la néamine

I.3.2.2 Procédure d'immobilisation

Les deux chaînes hydrophobes greffées sur la néamine vont permettre de fixer le ligand sur un support chromatographique de type C_{18} par adsorption dynamique afin de créer deux nouvelles PSCs nommées néamine 4',5 di C_{18} et néamine 3', 6 di C_{18} .

Deux solutions d'un mélange H₂O/CH₃OH (50:50, v/v) contenant 6,54 mM de chaque dérivé de la néamine (néamine 4',5 di C₁₈ ou néamine 3', 6 di C₁₈) sont préparées par dissolution aux ultrasons, puis filtrées sur des filtres de porosité 0,2 µm.

L'adsorption des dérivés est réalisée à un débit de 15 µL/min sur une colonne de type Inertsil ODS-3, 3µm C18 1mm × 15 cm (le volume de la colonne est de 118 µL) pendant 16 heures soit 292 volumes de colonne.

I.3.2.3 Appareillage

Les études sont réalisées sur un poste de micro-CLHP. Les différents modules qui composent cette installation sont :

- Une pompe Shimadzu[®] LC 10 AD (Sarreguemines, France).
- Un système d'injection manuel, vanne d'injection Cheminert TM CN2-4346 boucle 250 nL.
- Un détecteur UV-Visible SPD-10A ($\lambda = 236$ nm pour détecter la plupart des composés injectés), volume de cellule 140 nL.
- Un système de commande et de contrôle (Shimadzu[®] CBM-20A) qui permet de gérer les différents modules.
- Un logiciel d'exploitation (Shimadzu[®] LC solution) pour enregistrer et traiter les chromatogrammes.

La phase mobile et les échantillons injectés sont préalablement filtrés (0,45 µm) et dégazés aux ultrasons. Les deux colonnes C₁₈ sont utilisées à une température contrôlée par un four Igloocil (Interchim).

I.3.2.4 Réactifs

Tous les énantiomères des acides aminés injectés (méthionine, isoleucine, acide glutamique, leucine, sérine, alanine, proline, glutamine) sont obtenus chez Sigma Aldrich (Saint-Quentin, France) ou chez Fluka chemie (GmbH, Steinheim, Germany).

Les énantiomères de nucléosides (guanosine et adénosine) sont fournis par ChemGenes (Wilmington - U.S.A). Les énantiomères du dipeptide glycine-tyrosine (gly-tyr) sont fournis par Bachem AG (Bubendorf - Switzerland). Le sulfate de cuivre est fourni par Prolabo (Rhône-Poulenc - France). La néamine 4',5 di C₁₈ et la néamine 3', 6 di C₁₈ utilisées pour la préparation des PSCs ont été synthétisées par l'équipe EMAN du DPM. Le méthanol de pureté CLHP est fourni par Fischer scientific (Leicestershire, UK), l'eau CLHP est obtenue à

partir d'un système de purification d'eau d'Elgastat option (Odil, Talant, France) équipé d'une cartouche d'osmose inverse.

I.3.2.5 Conditions chromatographiques

Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

- Une phase stationnaire contenant la néamine 4',5 di C₁₈ ou la néamine 3', 6 di C₁₈ immobilisée de la manière précédemment décrite.
 - Une phase mobile composée d'eau-méthanol (98:2, v/v) additionnée de CuSO₄ à 0,5 mM.
 - Un débit variant de 5 à 40 µL/min selon la molécule à séparer.
 - Chaque mélange racémique est préparé dans une solution aqueuse à diverses concentrations.
 - Le volume injecté est de 250 nL pour les deux PSCs néamine 4',5 di C₁₈ et néamine 3', 6 di C₁₈. Les injections sont répétées 3 fois.
 - La température est fixée à 20°C et contrôlée par le four.
 - Le facteur apparent de rétention k , l'énantiosélectivité apparente α , l'efficacité de la colonne N , la résolution R_s et le facteur d'asymétrie A_s sont déterminés ainsi:
- Le facteur apparent de rétention k est déterminé en utilisant la relation suivante :

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

où t_R : temps de rétention des solutés, t_0 : temps de rétention nulle

- Le temps de rétention t_R est déterminé par le sommet du pic du soluté.
- Les volumes de rétention et le volume mort de la colonne sont corrigés par le volume extra-colonne (injection du soluté dans le système chromatographique sans colonne).
- L'énantiosélectivité apparente α est calculée de la manière suivante :

$$\alpha = k_2 / k_1$$

où k_2 est le facteur de rétention pour l'énantiomère le plus retenu et k_1 est le facteur de rétention pour l'énantiomère le moins retenu.

- L'efficacité de la colonne est caractérisée en calculant le nombre de plateaux théoriques :

$$N = 5,54 (t_R / \delta)^2$$

où δ est la largeur du pic à mi-hauteur.

- La résolution R_s est calculée en utilisant la relation suivante :

$$R_s = 1,18 (t_{R2} - t_{R1}) / (\delta_2 + \delta_1)$$

où l'indice 1 désigne l'énantiomère le moins retenu et l'indice 2 l'énantiomère le plus retenu.

- Le facteur d'asymétrie A_s est déterminé en calculant le rapport entre la partie droite et la partie gauche du pic à 10% de sa hauteur.

I.3.3 Résultats et discussion

I.3.3.1 Les propriétés énantiosélectives de la PSC néamine 4',5 di C₁₈

Les énantiomères de différentes familles chimiques (acide aminé, nucléoside et dipeptide) ont été injectés sur la colonne néamine 4',5 di C₁₈ dans les mêmes conditions chromatographiques que celles utilisées avec les colonnes néamine 4' mono C₁₈ et néamine 5 mono C₁₈ (débit, concentrations de solutés injectés, température) (publication N1).

Les résultats indiquent que les dix mélanges racémiques appartenant aux trois familles testées sont résolus avec ce type de PSC. Les couples d'énantiomères séparés et leurs données chromatographiques (k , α et R_s) pour la colonne néamine 4',5 di C₁₈ sont présentés dans le Tableau 1.

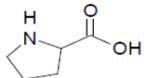
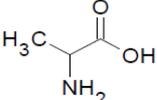
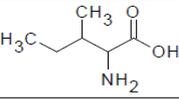
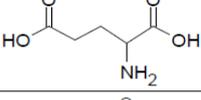
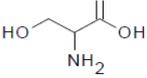
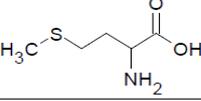
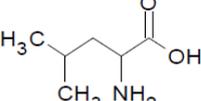
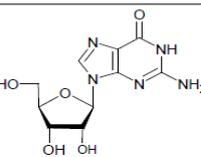
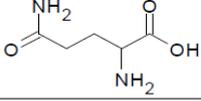
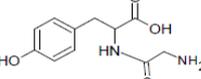
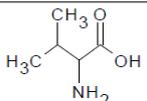
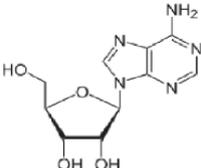
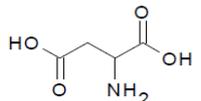
Composé	Structure	k_L	k_D	α	R_s
Proline (Pro)		2,1	7,6	3,59	4,33
Alanine (Ala)		1,9	3,5	1,79	2,1
Isoleucine (Ile)		94,6	257	2,72	21,4
Acide Glutamique (Glu)		27,3	46	1,68	5,02
Sérine (Ser)		2,4	2,9	1,18	1,68
Méthionine (Met)		34,17	65,79	1,92	12,03
Leucine (Leu)		155	280	1,8	12,45
Guanosine		5,6	5,79	1,03	0,65
Glutamine (Gln)		2,27	3,48	3,13	1,53
Gly-Tyr		47	18	2,5	15,8
Valine (Val)		28,38	—	—	—
Adénosine		7,16	—	—	—
Acide Aspartique (ASP)		25,39	—	—	—

Tableau 1 : Les composés testés sur la colonne néamine 4',5 di C₁₈ et leurs données chromatographiques.
Phase mobile: H₂O/CH₃OH (98:2, v/v) + CuSO₄ 0,5 mM; température: 20°C ; volume d'injection: 250 nL; détection: 236 nm; concentration et débit pour chaque énantiomère: alanine (0,117 mM, 40 µL/min), leucine (0,94 mM, 40 µL/min), isoleucine (0,94 mM, 40 µL/min), acide aspartique (0,18 mM, 15 µL/min), acide glutamique (0,37 mM, 40 µL/min), guanosine (0,094 mM, 20 µL/min), proline (0,117 mM, 40 µL/min), méthionine (0,37 mM , 40 µL/min), sérine (0,094 Mm , 5 µL/min), glutamine (0,18 mM , 10 µL/min), gly-tyr (0,094mM , 15 µL/min), valine (0,117 Mm, 40 µL/min), adénosine(0,16 mM, 20 µL/min).

La colonne néamine 4',5 di C₁₈ présente des capacités de discrimination vis-à-vis d'acides aminés polaires neutres (sérine et glutamine), d'acides aminés hydrophobes (proline, valine, méthionine, alanine, leucine et isoleucine), d'un acide aminé acide (acide glutamique), d'un nucléoside (guanosine) et d'un dipeptide (Gly-Tyr).

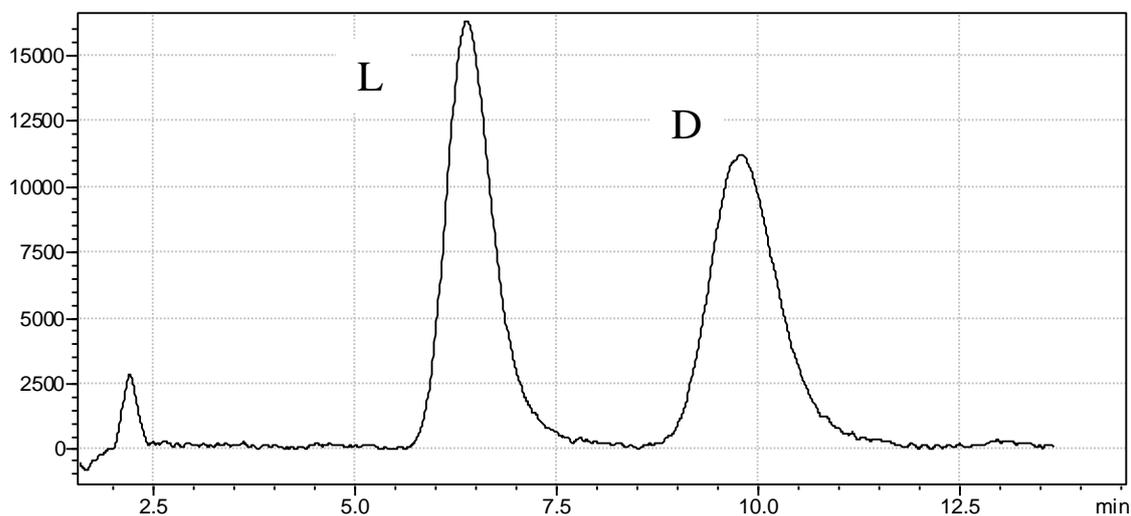


Figure 3 : Résolution de la D/L alanine sur la colonne néamine 4',5 di C₁₈.

Phase mobile: H₂O/CH₃OH (98:2, v/v) + CuSO₄ 0,5 mM; phase stationnaire: néamine 4',5 di C₁₈; température: 20°C; volume d'injection: 250 nL; concentration de chaque énantiomère: 0,117 mM; débit: 40 µL/min; détection: 236 nm.

La comparaison des données chromatographiques de la colonne néamine 4',5 di C₁₈ (tableau 1) avec celles obtenues en utilisant les colonnes Néamine 4' mono C₁₈ et Néamine 5 mono C₁₈ (tableau 2) montre que:

- Les ordres de rétention pour tous les énantiomères testés (excepté l'acide aspartique et l'adénosine) sont :
 k Néamine 5 mono C₁₈ > k Néamine 4',5 di C₁₈ > k Néamine 4' mono C₁₈
- La PSC néamine 4',5 di C₁₈ montre une sélectivité et une résolution plus élevée que les deux PSCs (Néamine 4' mono C₁₈ et Néamine 5 mono C₁₈).
- La colonne néamine 4',5 di C₁₈ présente des propriétés énantiosélectives équivalentes car elle permet de séparer presque tous les énantiomères résolus sur les deux colonnes néamine 4' mono C₁₈ et néamine 5 mono C₁₈ (excepté la valine et l'adénosine).
- L'ordre d'élution des énantiomères testés pour la colonne néamine 4',5 di C₁₈ est généralement le même que celui observé sur les phases C₁₈ immobilisées avec les dérivés Néamine 4' mono C₁₈ et Néamine 5 mono C₁₈ (D>L). Une seule exception est constatée avec les énantiomères du dipeptide (Gly - Tyr) (D<L) séparés sur la colonne dialkylée.

	Néamine 4' mono C ₁₈			Néamine 5 mono C ₁₈			Néamine 4', 5 di C ₁₈		
	<i>k_L</i>	<i>α</i>	<i>Rs</i>	<i>k_L</i>	<i>α</i>	<i>Rs</i>	<i>k_L</i>	<i>α</i>	<i>Rs</i>
Proline	3,9	1,61	2,18	12,8	1,61	2,64	2,1	3,59	4,33
Alanine	1,36	1,2	0,69	4,30	Pas de séparation		1,9	1,79	2,1
Isoleucine	40,1	1,42	2,51	166,8	1,23	0,8	94,6	2,72	21,4
Acide aspartique	13,47	Pas de séparation		12,39	Pas de séparation		25,39	Pas de séparation	
Acide Glutamique	18,8	1,21	0,81	77,6	Pas de séparation		27,3	1,68	5,02
Sérine	0,8	1,19	0,55	3,05	Pas de séparation		2,4	1,18	1,68
Méthionine	25,5	1,31	2,03	102,4	Pas de séparation		34,17	1,92	12,3
Leucine	44,1	1,3	1,54	nd*	nd		155	1,8	12,45
Guanosine	13,5	Pas de séparation		16,9	1,07	0,81	5,6	1,03	0,65
Glutamine	1,64	1,23	0,69	4,95	Pas de séparation		2,27	3,13	1,53
Adénosine	29,7	Pas de séparation		33,8	1,16	0,90	7,16	Pas de séparation	
Gly-Tyr	17,0	Pas de séparation		34,7	1,15	1,27	47 <i>k_D</i> =18	2,5	15,8
Valine	11,9	1,39	1,90	49,2	1,20	0,48	28,38	Pas de séparation	

Tableau 2 : Résultats de la séparation énantiomérique pour les 3 phases stationnaires néamine 4',5 di C₁₈, néamine 5 mono C₁₈ et néamine 5 mono C₁₈. nd* : non déterminé.

I.3.3.2 Les propriétés énantiosélectives de la PSC néamine 3',6 di C₁₈

La PSC néamine 3',6 di C₁₈ a montré une aptitude à résoudre différentes classes de composés comme les acides aminés hydrophobes (proline, méthionine, leucine), les nucléosides (guanosine, adénosine) et un dipeptide (Gly-Tyr) (Tableau 3).

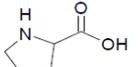
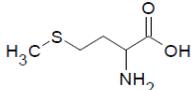
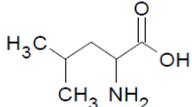
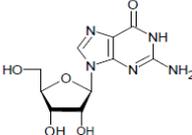
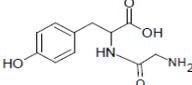
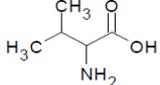
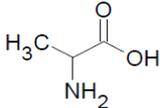
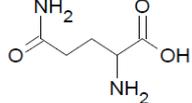
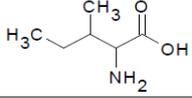
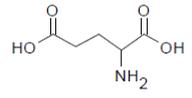
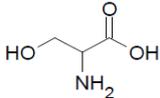
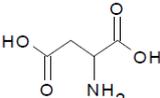
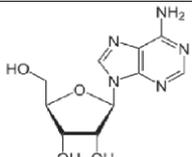
Composé	Structure	k_L	k_D	α	R_s
Proline (Pro)		10,31	13,5	1,3	1,28
Méthionine (Met)		43,6	38,3	1,14	1,57
Leucine (Leu)		65,8	58,73	1,12	1,81
Guanosine		8,99	10	1,11	1,23
Gly-Tyr		33,28	58,5	1,76	12
Valine (Val)		18,83	—	—	—
Alanine (Ala)		12,08	—	—	—
Glutamine (Gln)		18,18	—	—	—
Isoleucine (Ile)		39,12	—	—	—
Acide Glutamique (Glu)		167,42	—	—	—
Sérine (Ser)		21,55	—	—	—
Acide Aspartique (Asp)		23,11	—	—	—
Adénosine		10,14	—	—	—

Tableau 3 : Les composés testés sur la colonne néamine 3',6 di C₁₈ et leurs données chromatographiques. Phase mobile: H₂O/CH₃OH (98:2, v/v) + CuSO₄ 0,5 mM; température: 20°C ; volume d'injection: 250 nL; détection: 236 nm; concentration et débit pour chaque énantiomère: leucine (0,94 mM, 40 µL/min), isoleucine (0,94 mM, 40 µL/min), guanosine (0,094 mM, 20 µL/min), proline (0,117 mM, 40 µL/min), méthionine (0,37 mM , 40 µL/min), gly-tyr (0,094 mM , 15 µL/min), valine (0,117mM, 40 µL/min), adénosine (0,16 mM, 20 µL/min), acide aspartique (0,18 mM,15 µL/min), acide glutamique (0,37 mM, 40 µL/min), sérine (0,094 mM , 5 µL/min), glutamine (0,18 mM , 10 µL/min), gly-tyr (0,094 mM , 15 µL/min).

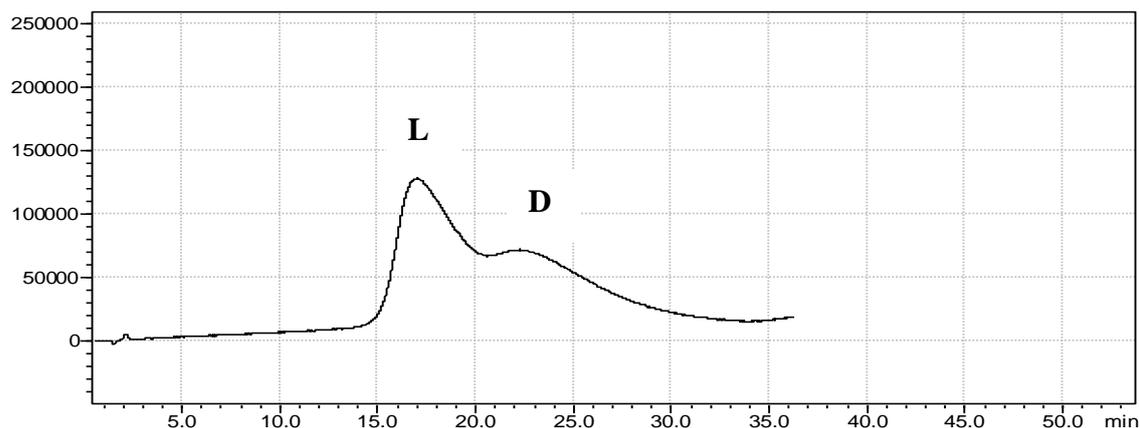


Figure 4 : Résolution de la D/L proline sur la colonne néamine 3',6 di C₁₈.

Phase mobile: H₂O/CH₃OH (98:2, v/v) + CuSO₄ 0,5 mM; phase stationnaire: néamine 3',6 di C₁₈; température: 20°C; volume d'injection: 250 nL; concentration de chaque énantiomère: 0,117 mM; débit: 40 µL/min; détection: 236 nm.

La comparaison des résultats présentés dans le Tableau 3 avec ceux obtenus avec la colonne néamine 6 mono C₁₈ pour les racémates (proline, leucine, Gly-Tyr) est détaillée dans le Tableau 4. Elle montre que la néamine 6-mono C₁₈ présente des valeurs de k inférieures à celles de la PSC néamine 3',6 di C₁₈ dans les mêmes conditions chromatographiques. Par contre, la colonne néamine 3',6 di C₁₈ a des valeurs supérieures de R_s .

Généralement l'ordre d'élution des énantiomères séparés est (D>L) avec la colonne néamine 3',6 di C₁₈, mais une inversion de cet ordre est observée pour les énantiomères de la méthionine et de la leucine (D<L).

	Néamine 6 monoC ₁₈			Néamine 3', 6 di C ₁₈		
	k_L	α	R_s	k_L	α	R_s
Proline	2,59	1,32	0,63	10,31	1,33	1,28
Isoleucine	32,42	1,10	0,6	39,12	Pas de séparation	
Méthionine	17,3	Pas de séparation		43,6 $k_D= 38,3$	1,14	1,57
Leucine	37,5	1,05	0,46	65,8 $k_D=58,7$	1,12	1,81
Gly-Tyr	26,6	1,51	2,78	33,28	1,76	12

Tableau 4 : Résultats de la séparation énantiomérique pour les 2 phases stationnaires néamine 3',6 di C₁₈ et néamine 6 mono C₁₈.

Les différentes valeurs des données chromatographiques observées entre les 5 PSCs créées, néamine 4' mono C₁₈, néamine 5 mono C₁₈, néamine 4',5 di C₁₈, néamine 6 mono C₁₈ et néamine 3',6 di C₁₈, peuvent être expliquées par le fait que :

- Le nombre de sites actifs déterminé par analyse frontale, pour les ligands immobilisés, de ces colonnes est différent (tableau 5). Ces résultats peuvent être expliqués par l'orientation du sélecteur chiral à la surface du support, l'accessibilité et le nombre de sites de complexation.

Néamine 4' mono C ₁₈	Néamine 5 mono C ₁₈	Néamine 6 mono C ₁₈	Néamine 3',6 di C ₁₈	Néamine 4',5 di C ₁₈
3,9 μmoles /colonne	2,5 μmoles /colonne	5,2 μmoles /colonne	7 μmoles /colonne	ND*

Tableau 5 : Nombre de sites actifs sur les 5 PSCs, à base de dérivés de la néamine, déterminé par analyse frontale. ND* : non déterminé

- La chaîne C₁₈ localisée sur différentes positions de la néamine joue un rôle essentiel sur l'affinité des composés chiraux à séparer. Cette chaîne entraîne certaines modifications d'orientation ou de conformation de la molécule de néamine, rendant les sites d'interaction des PSCs différemment accessibles aux solutés testés. On peut supposer que la capacité discriminante de ces PSCs peut être reliée à la position de la chaîne C₁₈ plus ou moins proche des sites principaux de fixation de l'ion cuivrique (figure 5). Cette chaîne semble participer à la formation des complexes diastéréoisomériques formés entre le cuivre (II), le ligand chiral de type néamine et les solutés. La position différente de la chaîne lipophile sur la néamine modifie les propriétés énantiosélectives des PSCs. Ces modifications pourraient jouer également un rôle sur l'ordre d'éluion.

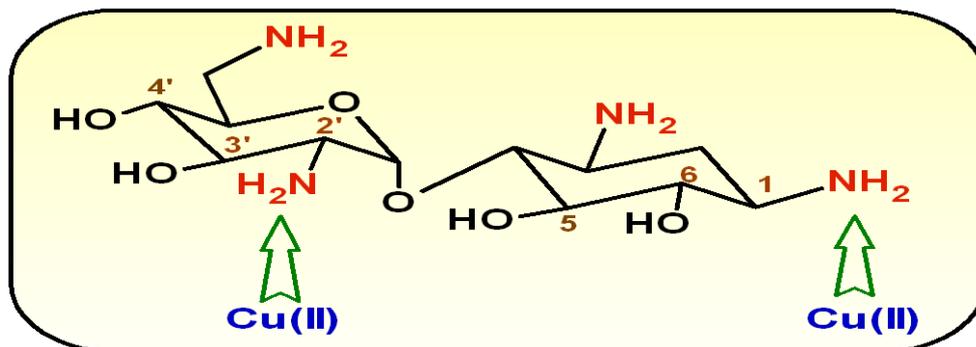


Figure 5 : Les deux principaux sites de fixation du cuivre (II) sur la néamine [1].

I.3.3.3 Proposition d'un mécanisme de reconnaissance chirale

En général, le mécanisme de séparation chirale par échange de ligands est fondé sur la formation de complexes ternaires diastéréoisomériques formés entre l'analyte, le ligand chirale et l'ion métallique, qui présentent différentes stabilités [2, 4]. Dans ce travail, le cuivre (II) est impliqué d'une manière essentielle dans le processus de séparation des énantiomères testés. Par exemple, la résolution des énantiomères de la proline sur la colonne néamine 4',5 di C₁₈ et la colonne néamine 3',6 di C₁₈ a été testée avec et sans cuivre (II) dans la phase mobile. La présence du cuivre (II) est indispensable pour réaliser la séparation énantiomérique.

On peut donc supposer qu'il y a formation d'un complexe par chélation de l'ion cuivrique avec l'aminoglycoside immobilisé et l'énantiomère qui établit en général deux liaisons de coordination. Des interactions additionnelles (liaisons hydrogène, effet hydrophobe et interactions stériques) entre les analytes et les supports solides C₁₈ de la phase stationnaire ou avec les chaînes C₁₈ du sélecteur chirale peuvent également avoir un effet crucial sur l'énantiosélectivité et l'ordre d'éluion. Cet effet pourrait correspondre au troisième point d'interaction entre le soluté et le sélecteur chirale (modèle de reconnaissance chirale proposé par Dalglish) [5].

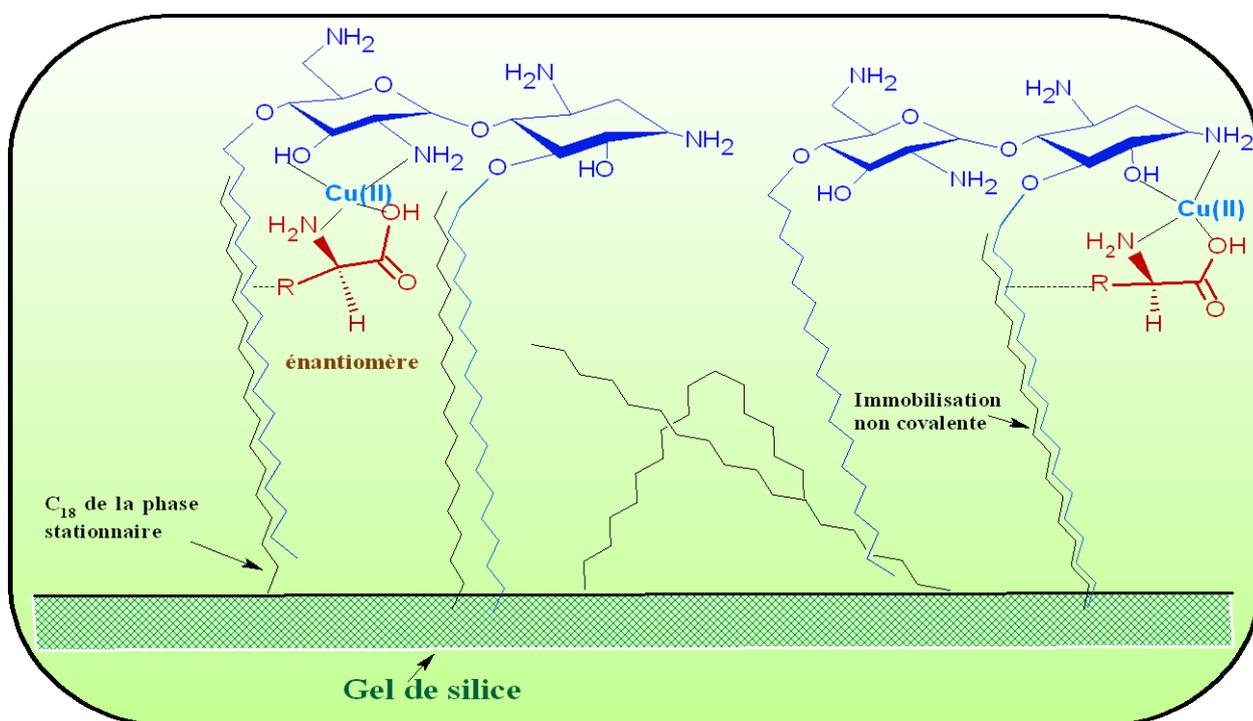


Figure 6 : Proposition d'un mécanisme de reconnaissance chirale pour la PSC néamine 4',5-di C₁₈ avec les trois points d'interaction de Dalglish sur les 2 principaux sites de fixation du cuivre (II).

I.3.3.4 Durée de vie et régénération des supports immobilisés avec le ligand chiral de type néamine 4',5 di C₁₈ et néamine 3',6 di C₁₈

La stabilité des PSCs néamine 4',5 di C₁₈ et néamine 3',6 di C₁₈ a été évaluée au cours du temps, en injectant la proline comme molécule témoin pour la colonne néamine 3',6 di C₁₈ et l'alanine pour la colonne néamine 4',5 di C₁₈, dans les mêmes conditions de température et de phase mobile.

Les deux PSCs ont été utilisées pendant une durée d'un mois (néamine 3',6 di C₁₈) et de trois mois (néamine 4',5 di C₁₈) sans modification de la sélectivité et du facteur de rétention. L'ajout de méthanol (2-25%) dans la phase mobile n'a entraîné aucune dégradation des valeurs de sélectivité et de résolution sur la PSC néamine 4',5 di C₁₈, alors qu'un ajout de 7% de méthanol dans la phase mobile entraînait une dégradation des propriétés énantiosélectives de la colonne néamine 4' mono C₁₈. On peut expliquer ce phénomène par la présence des deux chaînes C₁₈ de la première colonne qui permet une adsorption plus forte du ligand chiral sur la phase stationnaire et donc augmente la stabilité de la PSC. Par contre un ajout de 35 % de méthanol de la phase mobile cause une perte des propriétés énantiosélectives de cette PSC. Il est à noter qu'après dégradation, la colonne peut facilement être régénérée en procédant de la même manière que lors de l'étape d'immobilisation. Une telle régénération permet la restauration complète des caractéristiques originales de rétention et d'énantiosélectivité.

I.3.4 Conclusion

Deux nouvelles PSCs (néamine 4',5 di C₁₈ et néamine 3',6 di C₁₈) ont été utilisées avec succès pour la séparation d'un nombre total de 10 couples d'énantiomères sur les deux colonnes. La position d'attachement de la chaîne C₁₈ sur la néamine (en 4' et en 5 ou en 3' et en 6) influence l'énantiosélectivité et l'ordre d'élution énantiomérique. La colonne néamine 4',5 di C₁₈ a montré une énantiosélectivité et une capacité discriminante plus importante que la colonne néamine 3',6 di C₁₈ sur les même énantiomères testés. De plus, cette colonne combine les propriétés séparatives des 2 colonnes néamine 4' mono C₁₈ et néamine 5 mono C₁₈. On peut supposer que l'origine des propriétés énantiosélectives de la colonne néamine 4',5 di C₁₈ provient du fait que les deux chaînes C₁₈ greffées sur la néamine sont voisines des deux sites principaux de fixation de l'ion cuivrique. Elles peuvent donc participer à la formation des complexes diastéréoisomériques. Un mécanisme de reconnaissance chirale, basé sur les trois points d'interaction de Dalgliesh, a été proposé.

Toutefois, ces PSCs ne sont pas exemptes d'inconvénients. Le temps d'analyse très long s'avère être l'inconvénient le plus important, celui-ci pouvant s'élever jusqu'à 8,5 heures dans le cas de la séparation des énantiomères de la leucine avec la colonne néamine 4',5 di C₁₈ à 2% de méthanol dans la phase mobile. De plus, certaines molécules plus hydrophobes, comme le tryptophane par exemple, sont éluées trop tardivement et par conséquent, ne sont pas détectables. L'objectif principal du travail présenté dans la partie suivante a donc été de remédier à ces différents problèmes. Pour cela l'utilisation des dérivés de la néamine a été envisagée en électrophorèse capillaire.

Bibliographie

1. Grapsas I., Massova I. and Mobashery S., "*¹H-NMR Analysis of Copper-Aminoglycoside Complexes in Solution and Its Implication for Regioselective Modification of Multifunctional Aminoglycoside Antibiotics*", Tetrahedron, **1998**, 54, 7705-7720.
2. Schlauch M., Kos O. and Frahm A., "*Comparison of three chiral stationary phases with respect to their enantio- and diastereoselectivity for cyclic β -substituted α -amino acids*", Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, **2002**, 27, 409-419.
3. Riguet E., Désiré J., Bailly C., Décout J-L., "*A route for preparing new neamine derivatives targeting HIV-1 TAR RNA*", Tetrahedron, **2004**, 60, 8053-8064.
4. Gübitz G., "*Direct Separation of Enantiomers by High Performance Ligand Exchange Chromatography on Chemically Bonded Chiral Phases*", Journal of liquid chromatography, **1986**, 9, 519-535.
5. Dalgliesh C. E., "*The optical resolution of aromatic amino acids on paper chromatograms*", Journal of the Chemical Society, **1952**, 137, 3940-3952.

II Dérivés lipophiles de la néamine complexés par le cuivre(II) en tant que sélecteurs chiraux en électrophorèse capillaire

II.1 Publication N° 3 “Enantioséparation par chromatographie électrocinétique micellaire via l’utilisation d’une phase pseudo-stationnaire chirale en échange de ligands”

L’objectif de ce travail est de remédier au problème de la séparation des molécules chirales à caractère hydrophobe, qui sont éluées trop tardivement en CLHP et par conséquent, qui ne sont pas détectables.

L’électrophorèse capillaire (EC) est une méthode d’analyse complémentaire des méthodes chromatographiques, qui présente un grand nombre d’avantages. Son succès repose sur ses qualités intrinsèques : efficacité et résolution élevées, rapidité des séparations, conditionnement aisé du capillaire de séparation, compatibilité avec de nombreux détecteurs et faible consommation d’échantillons, de tampon de migration et surtout de sélecteur chiral. La chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC) est un mode qui consiste à ajouter des micelles ioniques ou neutres jouant le rôle de pseudo- phase stationnaire dans la solution électrophorétique (tampon de migration) afin de séparer des petites espèces neutres ou chargées.

Pour répondre à notre objectif, nous avons considéré la propriété de la néamine 4'-mono C₁₈ à former des micelles, permettant son utilisation en LE-MEKC.

Le but de ce travail est d’étudier les propriétés énantiosélectives de la néamine 4'-mono C₁₈ en présence de Cu(II) en mode MEKC pour les acides aminés hydrophobes et d’évaluer les conditions électrophorétiques optimales (concentration du sélecteur chiral, addition de méthanol dans le tampon de migration).

Mustapha Zaher
Corinne Ravelet
Cecile Vanhaverbeke
Isabelle Baussanne
Sandrine Perrier
Jennifer Fize
Jean-Luc Décout
Eric Peyrin

Département de Pharmacochimie
Moléculaire UMR 5063 CNRS,
Institut de Chimie Moléculaire de
Grenoble FR 2607, Université
Grenoble I (Joseph Fourier), UFR
de Pharmacie, Grenoble, France

Received December 22, 2008
Revised February 2, 2009
Accepted February 17, 2009

Research Article

Enantioseparation by MEKC using a ligand exchange-based chiral pseudostationary phase

In this paper, a new ligand-exchange -MEKC mode, based on the design of a unique lipophilic species (4'-octadecylneamine derivative), which served both as micelle-forming surfactant (by its hydrophobic part) and central ion-complexing ligand (by its hydrophilic part) is described. The CMC of the used lipophilic neamine derivative was first determined by surface tension measurements. Subsequent NMR experiments were performed in order to investigate the Cu(II) binding properties of the neamine micellar phase. The enantioseparation properties of both the octadecylneamine derivative-Cu(II) MEKC and the native neamine-Cu(II) CE systems were evaluated and compared using the tryptophan racemate as a probe analyte. The effects of several different electrophoretic conditions on the enantiomer migration behavior in the ligand-exchange-MEKC mode were examined. The developed methodology was also applied to the enantioseparation of other analytes such as 1-methyl-tryptophan, 3,5-diiodo-tyrosine and 1-naphthyl-alanine.

Keywords:

Ligand-exchange / MEKC / Neamine derivative DOI 10.1002/elps.200800832

1 Introduction

Zare and co-workers have described the first application of ligand-exchange (LE)-CE for the chiral resolution of dansylated amino acids [1]. Since this pioneering work, a great variety of papers dealing with LE-CE enantioseparation of amino acids, amino alcohols and derivatives have been published [2–8]. CE chiral LE principle satisfies the classical three-point contact rule of Dalgliesh. Two interaction points are typically represented by the coordination of the analyte and the chiral selector (ligand and central ion) while the enantiomer side chain substituents contribute to the third point *via* attractive or repulsive forces with the ligand. However, based on this LE principle only, the difference in the thermodynamic stabilities of the diastereomeric ternary complexes are frequently insufficient to enable good enantioseparation [4].

A significant improvement in resolution is generally attained upon addition of the SDS surfactant to the electrolyte to perform the LE-MEKC mode [1, 2, 8–12]. In such system, the SDS micelles form an achiral pseudostationary

phase while the central ion–ligand complex is employed as a CE chiral additive. As a consequence, the partition of the analytes and their ternary complexes between the bulk solution and the pseudostationary phase favors the chiral discrimination process through the involvement of additional mechanisms dependent on the different hydrophobicities, stereoconformations and complex formation constants [9]. The SDS micellar phase not only improves the chiral resolution but also causes a reversal of the enantiomer migration order [2, 8, 9, 12]. This behavior has been explained by synergetic interactions of the distribution of analyte enantiomers between the micellar phase and bulk electrolyte and the LE mechanism of solutes with chiral selectors [12].

Alternatively, another interesting type of LE-MEKC system can be employed to improve the enantiodiscrimination mechanism. This involves the use of mixed micelles containing both SDS and central ion complexes of a lipophilic ligand [13]. In such case, the chiral selector alone does not form individual micelles but allows converting the SDS micelles into a LE-based chiral pseudostationary phase. The hydrophilic part of the selector, exposed to the surface of the mixed micelles, is able to form ternary complexes with the analytes whereas the micellar hydrophobic core is expected to participate to the enantioselective mechanism through hydrophobic forces engaged with the complexed analytes [13].

The objective of this work was to evaluate the feasibility to use a unique lipophilic species, which would serve both as micelle-forming surfactant (by its hydrophobic part) and central ion-complexing ligand (by its hydrophilic part). This

Correspondence: Professor Eric Peyrin, Département de Pharmacochimie Moléculaire UMR 5063 CNRS, Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble FR 2607, Université Grenoble I (Joseph Fourier), UFR de Pharmacie, 38041 Grenoble cedex 9, France
E-mail: eric.peyrin@ujf-grenoble.fr
Fax: +33-4-76-63-52-98

Abbreviation: LE, ligand exchange

novel approach, based on the design of a “pure” LE-based micellar phase, could provide interesting information on the influence of the micellar pseudostationary phase in the LE-based chiral discrimination process. In recent works, several lipophilic derivatives of neamine have been employed as a new class of immobilized ligands in LE-based chiral chromatography for the amino acid enantioseparation [14, 15]. In this paper, the 4'-octadecylneamine derivative (4'-C18-Nea, Fig. 1) was selected as a pseudostationary phase-forming model species in LE-MEKC. The CMC of the lipophilic neamine derivative was first determined by surface tension measurements. Subsequent NMR titration measurements were performed in order to investigate the Cu(II)-binding properties of the neamine micelles. Due to the polycationic nature of neamine (Nea, Fig. 1), which consists of two rings (glucosamine, ring II and deoxystreptamine, ring I) with four NH_2 groups ($\text{p}K_{\text{a}} > 6.35$), the MEKC-based separation was carried out in a reversed polarity mode (reversal of EOF). The enantioseparation properties of both the 4'-C18-Nea-Cu(II) MEKC and the native Nea-Cu(II) CE systems were evaluated and compared using the tryptophan racemate as a probe analyte. Using the LE-MEKC mode, the effects of several different electrophoretic conditions (such as changes in the effective capillary length, 4'-C18-Nea-Cu(II) stoichiometry, 4'-C18-Nea and Cu(II) concentrations and volume fraction of methanol in the electrolyte) on the solute enantioseparation were evaluated. The developed methodology was also applied to the enantioseparation of other analytes, including 1-methyl-tryptophan, 3,5-diiodo-tyrosine and 1-naphthyl-alanine.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

Solute enantiomers were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin, France) or Bachem (Weil am Rhein, Germany). Cu(II)SO_4 was obtained from Prolabo (Rhône-Poulenc, France). Dodecanophenone (micelle marker) and mesityl oxide (EOF marker) were supplied by Sigma-Aldrich. Neamine was obtained through methanolysis of neomycin B and the 4'-octadecylneamine derivative was synthesized, purified and fully characterized as previously reported [14, 16]. Methanol HPLC grade was purchased from Fischer Scientific (Leicestershire, UK). Water was obtained from a Purite Still Plus water purification system (Thame, UK) fitted with a reverse osmosis cartridge.

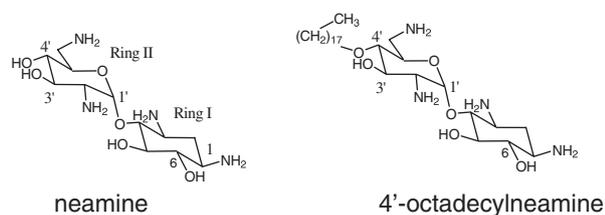


Figure 1. Chemical structure of the neamine and 4'-octadecylneamine ligands.

2.2 Surface tension experiments

The CMC of the 4'-octadecylneamine derivative was determined with a Du Nöuy tensiometer (LAUDA, Baden, Germany) using the ring detachment method. The surface tension of aqueous solutions of 4'-C18-Nea (at various concentrations, C) was measured in duplicate at room temperature ($\sim 20^\circ\text{C}$). The surface tension *versus* $\ln C$ plot allowed calculating the CMC of 4'-C18-Nea from the intersection of two straight lines, one in the descending part of the curve, the other through the plateau [17].

2.3 NMR experiments

Titration of a 10 mM solution of 4'-C18-Nea in D_2O was performed in a NMR tube (550 μL) in adding aliquots (1–10 μL) of a 0.25 M CuSO_4 solution in D_2O . NMR spectra were recorded at 25°C on an Avance 400 MHz spectrometer. Final concentrations corresponded to those used in the CE experiments (see below).

2.4 Electrophoretic experiments

2.4.1 Apparatus

A CE Agilent CE system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a DAD and an Agilent Chemstation software was used throughout. A 50 μm id and 363 μm od uncoated fused-silica capillary with extended light path (total and effective lengths of 64.5 and 56 cm, respectively) was used (Agilent Technologies).

2.4.2 Reagents

The background electrolyte (aqueous solution of CuSO_4) was daily prepared and degassed using an ultrasonic bath. The solutions of racemate (2 mM) or single enantiomers were prepared in water (or in a 75/25 v/v water-methanol solution for naphthyl-alanine). The 4'-octadecylneamine derivative stock solution was prepared in water and stored at 4°C . The working solutions were obtained by dilution of the filtered stock solution with an adequate aqueous solution of CuSO_4 .

2.4.3 Electrophoretic procedures

A new capillary was conditioned with the following sequence: (i) 10-min rinse with water (ii) 15-min rinse with NaOH 1 M (iii) 5-min rinse with water and (iv) 4-min rinse with the background electrolyte at 8 bar. During the experiment period, the capillary was conditioned at the beginning of the day as follows: (i) 5-min rinse with water (ii) 5-min rinse with HCl 1 M (iii) 5-min rinse with water and (iv) 5-min rinse with NaOH 1 M (v) 5-min rinse with water (vi) 4-min rinse with the background electrolyte at 8 bar. At the end of the day, the capillary was conditioned

with the following sequence: (i) 5-min rinse with water, (ii) 5-min rinse with HCl 1 M, (iii) 5-min rinse with water and (iv) 2-min with air at 8 bar. Experiments were carried out in anionic mode (solute migration from the cathode to the anode) using the short-end injection (effective length: 8.5 cm) method, unless otherwise notified. The electrophoretic conditions for the enantiomer separation were as follows: detection wavelength, 220 nm; applied voltage, 15 kV; capillary cassette temperature set to 25°C. Before sample injection, the capillary was filled with the working solutions of 4'-C18-Nea-Cu(II) or Nea-Cu(II) complexes. Injection of the analyte solutions (racemate and single enantiomers) were performed hydrodynamically (−50 mbar for 4 s) in triplicate. Between runs, the capillary was rinsed with the working solutions.

3 Results and discussion

3.1 Determination of the CMC of the 4'-octadecylneamine derivative

The CMC of the 4'-octadecylneamine derivative was determined classically through surface tension measurements. Figure 2 shows the obtained surface tension *versus* $\ln C$ plot. From the intersection of the two straight lines, the CMC was estimated to be 2.25 mM. This was in the same order of magnitude than those retrieved at 25°C in water for typical cationic surfactants used in MEKC such as cetyltrimethylammonium bromide (CMC = 0.9 mM) or tetradecyltrimethylammonium bromide (CMC = 3.5 mM) and significantly inferior to that of dodecyltrimethylammonium bromide (CMC = 15 mM).

3.2 NMR titration data

The binding of Cu(II) ions to the neamine micelles (at a 10 mM concentration) was studied by ¹H NMR spectrometry in order to obtain titration curves. Figure 3 shows the obtained

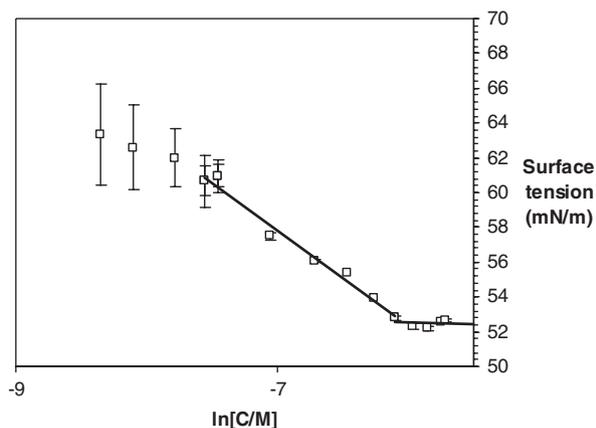


Figure 2. Surface tension *versus* $\ln C$ plot for the determination of the CMC of the 4'-octadecylneamine derivative.

NMR data. Addition of aqueous CuSO₄ resulted in concomitant signal broadening and strong deshielding of the proton chemical shifts. The main effects were observed for three protons, *i.e.* H2a, H4 and H1' (Fig. 3, insert B). This suggests that Cu(II) was preferentially bound to the deoxystreptamine ring I. This complexation mode is quite unusual; it has been previously established by NMR studies that the binding of Cu(II) to neamine implies mainly the vicinal C₂'-NH₂ and C₃'-OH of ring II [18]. As shown by the NMR analysis performed by Grapsas *et al.* [19], other chelates involving notably the C₁-NH₂, C₅-OH and C₆-OH groups of ring I can be also formed, with a lower stability. Such result seems to indicate that the orientation of the neamine core in the expected micelles hinder the access of Cu(II) to its main complexation sites of ring II and favor its binding to the ring I through interactions with water at the micelle surface. To note, from the final solution containing the micellar neamine–Cu(II) complexes, it was not possible to detect the formation of the amino acid–neamine–Cu(II) complex (using tryptophan as test amino acid) due to the broadening and overlapping of the NMR signals.

3.3 Enantioseparation by the 4'-octadecylneamine-based LE-MEKC mode

When cationic surfactants are employed as CE electrolyte additive using an uncoated fused-silica capillary, they adsorb on the capillary wall surface by a mechanism involving electrostatic attraction between positively charged moieties and the silanoate groups. The non-polar chains create a hydrophobic layer and a bilayer can be formed through hydrophobic effect between the lipophilic groups. In such case, the cationic head groups are facing the buffer solution so that the polarity of the surface is reversed. Consequently, a reversal of the EOF takes place. In the present study, as expected from the cationic nature of the 4'-C18-Nea derivative (see above), a significant anodic EOF ($\mu_{eo} = -4.60 \times 10^{-4} \pm 0.03 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) was observed when the capillary was conditioned with the 4'-C18-Nea:Cu(II) (10 mM:5 mM) chiral selector solution. Owing to the unusual polycationic nature of neamine, the mobility of the micelles towards the anodic end was expected to be very low, if any. This was exemplified by the fact that dodecanophenone, used as a micelle migration time marker, cannot be visualized after 80 min of analysis performed under an applied voltage of 15 kV, for an effective length of 8.5 cm. The tryptophan racemate was subsequently injected in such MEKC conditions. The solute migrated towards the anode under the dependence of the reversed EOF. As can be seen in Figs. 4A and B, the tryptophan racemate was successfully resolved using both a long (56 cm) and a short (8.5 cm) effective capillary length.

As a comparison, additional experiments were performed using the native neamine as CE chiral ligand in replacement to its lipophilic derivative. In the same electrophoretic conditions, the EOF was also directed

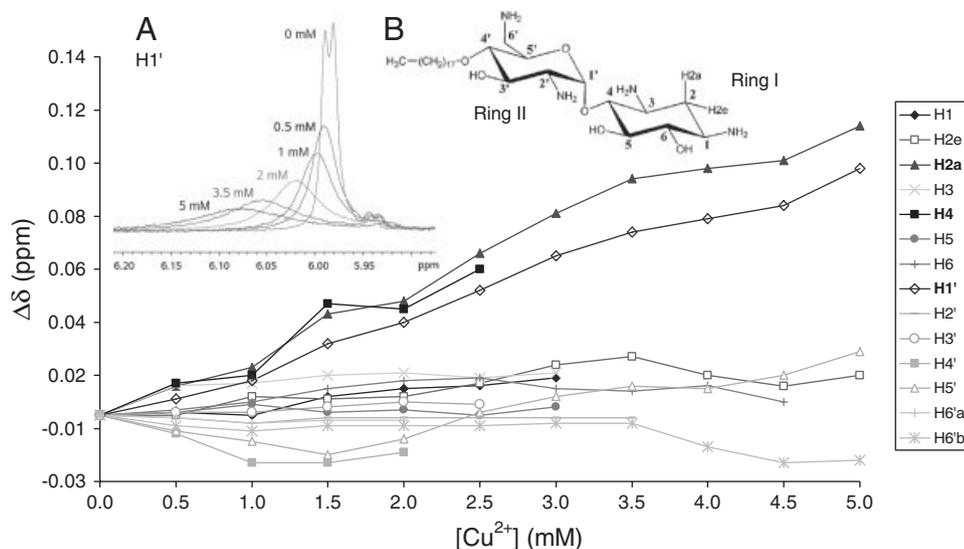


Figure 3. Variations of the ^1H chemical shifts of the 4'-octadecylneamine in D_2O at micellar concentration (10 mM) on complex formation monitored by aliquot addition of a 0.25 M CuSO_4 solution. For each proton, the difference ($\Delta\delta$) between the chemical shifts in presence of Cu(II) and free is displayed as a function of the Cu(II) concentration. (Inset A) ^1H NMR (400 MHz) signals observed for the $\text{H1}'$ proton of the neamine core free and in presence of Cu(II) at 0.5, 1, 2, 3.5 and 5 mM concentrations. (Inset B) Detailed chemical structure of 4'-octadecylneamine.

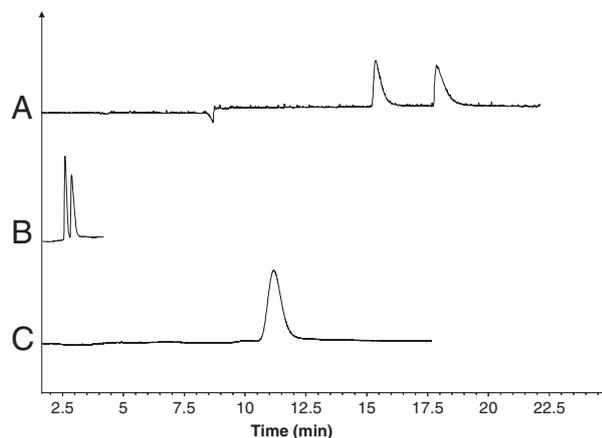


Figure 4. Representative electropherograms for the tryptophan enantiomers obtained using (A), (B) the neamine derivative- Cu(II) MEKC and (C) the neamine- Cu(II) CE modes. Experimental conditions: electrolyte: (A), (B) aqueous solution of 4'-C18-Nea: Cu(II) (10 mM:5 mM), (C) aqueous solution of Nea: Cu(II) (10 mM:5 mM); effective length: (A) 56 cm, (B) (C) 8.5 cm; detection wavelength, 220 nm; applied voltage, 15 kV; capillary cassette temperature: 25°C .

towards the anodic end, due to the strong adsorption of the cationic aminoglycoside on the capillary wall surface. However, in such case, the EOF magnitude was very weak ($\mu_{\text{eo}} = -2.20 \times 10^{-5} \pm 0.04 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Thus, the analyte migrated towards the cathodic end in relation to its ability to form complexes with both the free Cu(II) and the Nea- Cu(II) species. As shown in Fig. 4C, no enantioseparation was attained under such Nea- Cu(II) additive conditions. This demonstrates clearly that the presence of the micellar phase constituted an essential factor for the tryptophan LE-based chiral discrimination process.

The influence of the 4'-C18-Nea: Cu(II) chiral selector concentration on the separation of the amino acid enantiomers was investigated. The 4'-C18-Nea concentration was

varied from 5 to 20 mM for a constant ligand-central ion ratio (2:1). As the neamine surfactant concentration increased, a significant enhancement of the solute migration time was observed for the two enantiomers (Table 1). The tryptophan enantioselectivity, defined as the ratio of the enantiomer migration time, varied from 1.00 for 5 mM to 1.03 for 20 mM, with an optimal value of 1.10 for a 10 mM concentration.

The effects of the C18-Nea: Cu(II) stoichiometry on the solute enantioseparation was also evaluated. A 1:1 stoichiometry was selected, using a 10 mM concentration for both C18-Nea and Cu(II) . The analyte migration time increased relatively to that retrieved with a 2:1 stoichiometry. This was associated to a complete loss of the tryptophan chiral resolution (data not shown).

The influence of the addition of methanol in the electrolyte on the analyte enantioseparation was further analyzed. The volume fraction of methanol in the electrolyte varied from 0 to 15%, using the 4'-C18-Nea: Cu(II) (10:5 mM) solution as a chiral separation medium. The migration time of the tryptophan enantiomers reached a maximum value for a 10% volume fraction of methanol (Table 1). The solute enantioselectivity value was found to be reduced from 1.10 to 1.05 when the methanol content in the electrolyte increased.

Finally, in order to evaluate the applicability of this methodology, a mixture of racemates, including tryptophan but also analytes such as 1-methyl-tryptophan, 3,5-diiodo-tyrosine and 1-naphthyl-alanine, was injected under LE-MEKC conditions. A representative electropherogram is shown in Fig. 5. Although only a partial resolution was obtained for both 3,5-diiodo-tyrosine and 1-naphthyl-alanine, the LE-MEKC system was able to enantiodiscriminate these four compounds in a single run. It is important to note that the three 1-methyl-tryptophan, 3,5-diiodo-tyrosine and 1-naphthyl-alanine racemates were also injected under the Nea- Cu(II) additive conditions. As reported above for tryptophan, the

Table 1. Effects of the 4'-C18-Nea:Cu(II) chiral selector concentration (constant 2:1 ratio) and electrolyte methanol content on the migration time (t_m) of the tryptophan enantiomers^{a)}

	t_{m1}	t_{m2}
<i>Chiral selector concentration (mM)</i>		
5	1.56	1.56
10	2.51	2.76
20	4.11	4.25
<i>Volume fraction of methanol (%)</i>		
0	2.51	2.76
5	3.18	3.38
10	4.09	4.36
15	3.18	3.33

a) RSD of the migration time was typically less than 5%.

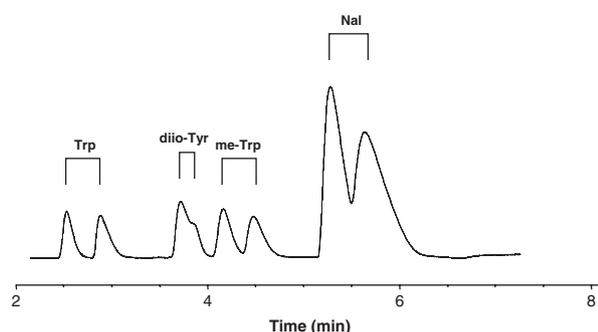


Figure 5. Representative electropherogram for the separation of enantiomers of tryptophan (Trp), 1-methyl-tryptophan (me-Trp), 3,5-diiodo-tyrosine (diiio-Tyr) and 1-naphtyl-alanine (Nal) using the 4'-C18-Nea:Cu(II) LE-MEKC mode. Experimental conditions identical to those reported in Fig. 4b.

analytes were not enantioresolved in such a system (data not shown), confirming the importance of the micellar phase.

4 Concluding remarks

In this paper, we describe a proof-of-concept study for the design of a MEKC mode, which consists of a pure LE-based pseudostationary phase. This is achieved by using a unique lipophilic species, which serves both as micelle-forming surfactant and central ion-complexing ligand. This work shows that, under the tested electrophoretic conditions, the micellar pseudostationary phase promotes the enantioseparation of the tested racemates. This could be attributed to several factors involving (i) a modification of the mobility difference between the temporary diastereomeric complexes, (ii) a change in the difference between the binding constants of the enantiomers with the chiral selector micelles and/or (iii) an improvement of the efficiency performances of the LE-MEKC system [8]. Further

experiments will be performed in the next future to evaluate more widely the enantioseparation potentialities of such new LE-MEKC mode by (i) evaluating other lipophilic neamine derivatives [14] as micelle-forming ligands and (ii) testing a broader range of analytes.

This work was supported by the ANR program "Physique et Chimie du Vivant" no. 07-PCVI-0036-03. We would like to sincerely thank Pierre Labbé for the tensiometer facility.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Gassmann, E., Kuo, J. E., Zare, R. N., *Science* 1985, **230**, 813–814.
- [2] Schmid, M.G., Gübitz, G., *Enantiomer* 1996, **1**, 23–27.
- [3] Desiderio, L., Aturki, Z., Fanali, S., *Electrophoresis* 1994, **15**, 864–869.
- [4] Davankov, V. A., *J. Chromatogr. A* 2003, **1000**, 891–915.
- [5] Qi, L., Han, Y. L., Zuo, M., Chen, Y., *Electrophoresis* 2007, **28**, 2629–2634.
- [6] Hödl, H., Krainer, A., Holzmüller, K., Koidl, J., Schmid, M. G., Gübitz, G., *Electrophoresis* 2007, **28**, 2675–2682.
- [7] Zheng, Z. X., wie, Y., Lin, J. M., *Electrophoresis* 2005, **26**, 1007–1012.
- [8] Lu, X., Chen, Y., Guo, L., Yang, Y., *J. Chromatogr. A* 2002, **945**, 249–255.
- [9] Chen, Z., Lin, J. M., Uchiyama, K., Hobo, T., *J. Chromatogr. A* 1998, **813**, 369–378.
- [10] Dobashi, A., Hamada, M., *Electrophoresis* 1999, **20**, 2761–2765.
- [11] Zheng, Z. X., Lin, J. M., Qu, F., Hobo, T., *Electrophoresis* 2003, **24**, 4221–4226.
- [12] Chen, Z., Lin, J., Uchiyama, K., Hobo, T., *Anal. Sci.* 2000, **16**, 131–137.
- [13] Sundin, N. G., Dowling, T. M., Grinberg, N., Bicker, G., *J. Microcol. Sep.* 1996, **8**, 323–329.
- [14] Zaher, M., Baussanne, I., Ravelet, C., Halder, S., Haroun, M., Fize, J., Décout, J. L., Peyrin, E., *J. Chromatogr. A* 2008, **1185**, 291–295.
- [15] Zaher, M., Ravelet, C., Baussanne, I. J., Décout, J. L., Peyrin, E., *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, **393**, 655–660.
- [16] Riguet, E., Désiré, J., Bailly, C., Décout, J. L., *Tetrahedron* 2004, **60**, 8053–8064.
- [17] Khatua, D., Gupta, A., Dey, J., *J. Colloid. Interface Sci.* 2006, **298**, 451–456.
- [18] Sreedhara, A., Freed, J. D., Cowan, J. A., *J. Am. Chem. Soc.* 2000, **122**, 8814–8824.
- [19] Grapsas, I., Massova, I., Mobashery, S., *Tetrahedron* 1998, **54**, 7705–7720.

Un nouveau sélecteur chiral a été utilisé avec succès pour la séparation des énantiomères d'acides aminés à caractère hydrophobe par échange de ligands en mode MEKC. Les objectifs visés ont été réalisés, c'est-à-dire une analyse rapide des énantiomères de molécules hydrophobes. Par exemple, les énantiomères du tryptophane sont séparés en moins de cinq minutes sur une longueur de capillaire de 8,5 cm.

Cette méthode d'analyse a ensuite été testée avec succès sur d'autres analytes tels que le 1-méthyl-tryptophane, la 3,5-diiodo-tyrosine et la 1-naphtyl-alanine.

Conclusion et Perspectives

Nous avons abordé dans la partie bibliographique plusieurs aspects concernant :

- la chiralité et ses incidences d'un point de vue biologique et pharmaceutique.
- les différentes PSCs utilisées en CLHP pour la résolution chirale.
- les aspects concernant l'échange de ligands et ses applications en séparation chirale.

Nous nous sommes intéressés notamment à présenter pour la première fois l'utilisation des aminoglycosides comme la néamine, en tant que sélecteurs chiraux, à des fins de séparation des composés chiraux.

Les dérivés de la néamine, synthétisés au sein de l'équipe EMAN du DPM, ont été utilisés pour la première fois en CCEL. Cinq molécules dérivées de la néamine (néamine 4'-mono C₁₈, néamine 5-mono C₁₈, néamine 6-mono C₁₈, néamine 3',6-di C₁₈ et néamine 4',5-di C₁₈) immobilisées sur un support chromatographique de type C₁₈ ont permis la séparation des énantiomères de douze espèces. Une comparaison a été menée afin d'étudier l'influence de la position d'attachement de la chaîne aliphatique C₁₈ sur les propriétés énantiosélectives de ces PSCs. Les expériences montrent que la PSC néamine 4',5-di C₁₈ possède un pouvoir résolutif plus important que les autres PSCs. De plus cette colonne combine les propriétés séparatives des 2 colonnes néamine 4'-mono C₁₈ et néamine 5-mono C₁₈.

Un autre dérivé lipophile de la néamine (néamine 3',6-di méthylnaphtalène) a été synthétisé. Nous avons étudié les propriétés énantiosélectives de ce dérivé, immobilisé d'une manière non covalente sur un support solide de type carbone graphite poreux (CPG). Dans les conditions de chromatographie chirale d'échange de ligands, cette nouvelle colonne a présenté une capacité séparative envers sept couples d'énantiomères testés montrant une stabilité remarquable pendant trois mois d'utilisation intensive. Ces résultats montrent que la néamine peut être modifiée par des groupements de différente nature. Ceux-ci peuvent être positionnés de différentes manières. Toutes ces modifications ainsi que le changement du type de support chromatographique n'inhibent pas la capacité de reconnaissance chirale de la néamine.

La dernière partie de l'étude expérimentale a concerné l'utilisation des dérivés alkylés de la néamine, en particulier la néamine 4'-mono C₁₈, par chromatographie chirale d'échange de ligands en chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC) afin de remédier au problème de la séparation des énantiomères hydrophobes comme le tryptophane qui est élué trop tardivement en CLHP. Les résultats obtenus montrent une résolution du mélange

racémique du tryptophane et d'autres analytes tels que le 1-méthyl-tryptophane, la 3,5-diiodo-tyrosine et la 1-naphtyl-alanine.

Des expériences supplémentaires sont encore nécessaires, notamment en ce qui concerne l'application des méthodologies analytiques développées. Il serait intéressant de :

- Tester les dérivés de la néamine pour le dosage énantiosélectif des acides aminés en série D en milieu biologique.
- Tester un support solide de type monolithe C₁₈ pour l'immobilisation non-covalente des dérivés lipophiles de la néamine pour réaliser des analyses rapides en appliquant des débits plus importants.
- Fixer les dérivés de la néamine d'une manière covalente sur un support solide afin de tester leurs propriétés énantiosélectives en appliquant des conditions de phase normale.

Nouveaux sélecteurs chiraux à base d'aminoglycosides pour la séparation chirale par échange de ligands

Résumé : La séparation d'énantiomères suscite un vif intérêt pour les industries pharmaceutiques, chimiques et agroalimentaires. Les dérivés lipophiles de la néamine ont été utilisés en tant que nouveaux ligands en chromatographie chirale par échange de ligands. Ce travail s'est attaché à étudier les propriétés énantiosélectives des dérivés lipophiles de la néamine en CLHP et en EC. Des dérivés de la néamine (néamine 4'-mono C₁₈, néamine 5-mono C₁₈, néamine 6-mono C₁₈, néamine 3',6-di C₁₈, néamine 4',5-di C₁₈, ou néamine 3',6-di méthyl-naphtalène), ont été synthétisés au sein de notre laboratoire et immobilisés de manière non covalente sur des supports chromatographiques de type C₁₈ et graphite poreux et utilisés avec succès en CCEL pour séparer divers couples d'énantiomères d'acides aminés, de nucléosides et de dipeptides. Néanmoins, certaines molécules hydrophobes, comme le tryptophane, sont éluées trop tardivement et par conséquent, ne sont pas détectables. Pour remédier à ce problème, nous avons considéré la propriété de la néamine 4'-mono C₁₈ à former des micelles, et avons envisagé son utilisation en MEKC. Les énantiomères du tryptophane sont séparés en moins de cinq minutes. Les effets de différentes conditions (concentration du sélecteur chiral, addition de méthanol dans le tampon de migration) sur le temps de migration ont été évalués. Cette méthode d'analyse a ensuite été testée avec succès sur d'autres analytes hydrophobes tels que le 1-méthyl-tryptophane, la 3,5-diiodo-tyrosine et la 1-naphtyl-alanine.

Mots clés : séparation chirale, sélecteur chiral, chromatographie chirale par échange de ligands, énantiosélectivité, chromatographie liquide haute performance, chromatographie électrocinétique micellaire, aminoglycoside, néamine, acides aminés, immobilisation non covalente.

New chiral selectors using aminoglycosides for ligands-exchange based chiral separation

Abstract : The resolution of racemates is necessary in the pharmaceutical, chemical and food fields. The lipophilic derivatives of neamine have been used as a new class of ligands. The aim of this work was to study the enantioselective properties of the lipophilic derivatives of neamine by HPLC and CE. Many derivatives of neamine (4'- mono C₁₈-neamine, 5-mono C₁₈ -neamine, 6-mono C₁₈-neamine, 3', 6-di C₁₈-neamine, 4', 5-di C₁₈-neamine, or 3',6-di-O-2-methylnaphthalene-neamine), have been synthesized by our team and immobilized by dynamic coating on a chromatographic support (C₁₈ type or porous graphitic carbon) and used successfully for the first time in LEC to discriminate various couples of enantiomers such as amino acids, nucleosides and dipeptides. However, certain hydrophobic molecules, such as tryptophan, are long retained and consequently not detectable. To overcome these problems, we have considered the property of the neamine 4'-mono C₁₈ to form micelles allowing its use in LE-MEKC. The enantiomers of tryptophan are then separated in less than five minutes. The effects of various conditions (chiral selector concentration and electrolyte methanol content) on the migration time were evaluated. This method was also applied successfully to other hydrophobic enantiomers such as 1-methyl-tryptophan, 3, 5-diiodo-tyrosin and 1-naphtyl-alanine.

Keys words : chiral separation, chiral selector, chiral ligand-exchange chromatography, enantioselectivity, high performance liquid chromatography, micellar electrokinetic chromatography, aminoglycoside, neamine, amino acids, coating.