



**HAL**  
open science

## Séparation d'isomères Z-E par CLHP et électrophorèse capillaire

Frédéric Hasdenteufel

► **To cite this version:**

Frédéric Hasdenteufel. Séparation d'isomères Z-E par CLHP et électrophorèse capillaire. Sciences pharmaceutiques. 2006. hal-01733046

**HAL Id: hal-01733046**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733046>**

Submitted on 14 Mar 2018

**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.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

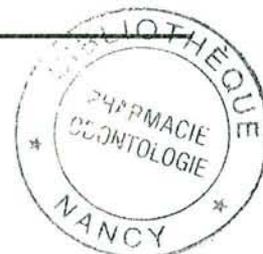
UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I



2006



FACULTE DE PHARMACIE



**SEPARATION D'ISOMERES Z-E PAR CLHP  
ET ELECTROPHORESE CAPILLAIRE**

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 25 septembre 2006

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par Frédéric HASDENTEUFEL

né le 2 Septembre 1983 à Thionville (57)

Membres du jury :

Président et directeur de thèse : Alain NICOLAS, Professeur des Universités, UHP-Nancy

Juges : Jean-Luc COLIN, Docteur ès sciences, Capsugel Colmar

Alain MARSURA, Professeur des Universités, UHP-Nancy

# ERRATA

- Pour l'ensemble du document : indication des pourcentages volumiques : privilégier l'emploi de « V » au lieu de « v » (ex : m/V ; V/V).
- Page 16 et pour l'ensemble du document : « amitriptyline » au lieu de « amitryptiline » (tableau II). Les 2 isomères présentés dans ce tableau ne sont en fait que deux représentations différentes de la même molécule (pas d'isomérisation Z-E dans ce cas).
- Page 22 : nomenclature chimique systématique de l'amitriptyline : remplacer « -N-méthyl-1-propanamine » par « -N,N-diméthyl-1-propanamine ».
- Page 23 : nomenclature chimique systématique du clomifène : remplacer « -N,N-diéthylamine » par « N,N-diéthyl-éthanamine ».
- Page 24 : nomenclature chimique systématique du tamoxifène : remplacer « -1-butényl » par « -but-1-ényl ».
- Page 27 : remplacer «  $\alpha$ -ionone » par «  $\alpha$ -irone » à la fin du paragraphe 2.2.1.
- Page 46 : étape 8 de la figure 7 : la chaîne latérale du produit de la réaction doit comporter un atome de carbone supplémentaire.
- Page 48 : « amidure de lithium » au lieu de « amide de lithium ».
- Page 76 : « la traînée des pics [...] était *importante* » au lieu de « la traînée des pics [...] était *conséquente* ».

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I



2006



FACULTE DE PHARMACIE

SEPARATION D'ISOMERES Z-E PAR CLHP  
ET ELECTROPHORESE CAPILLAIRE

THESE



Présentée et soutenue publiquement

Le 25 septembre 2006

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par Frédéric HASDENTEUFEL

né le 2 Septembre 1983 à Thionville (57)

Membres du jury :

Président et directeur de thèse : Alain NICOLAS, Professeur des Universités, UHP-Nancy

Juges : Jean-Luc COLIN, Docteur ès sciences, Capsugel Colmar

Alain MARSURA, Professeur des Universités, UHP-Nancy

BU PHARMA-ODONTOL



104 075411 8

## Membres du personnel enseignant 2005/2006

**Doyen**

Chantal FINANCE

**Vice Doyen**

Francine PAULUS

**Président du Conseil de la Pédagogie**

Pierre LABRUDE

**Responsable de la Commission de la Recherche**

Jean-Claude BLOCK

**Directeur des Etudes**

Gérald CATAU

**Responsable de la Filière officine**

Gérald CATAU

**Responsables de la Filière industrie**

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Isabelle LARTAUD

**Responsable de la Filière hôpital**

Jean-Michel SIMON

**DOYEN HONORAIRE**

M. VIGNERON Claude

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Mlle BESSON Suzanne

Mlle GIRARD Thérèse

M. JACQUE Michel

M. LECTARD Pierre

M. LOPPINET Vincent

M. MARTIN Jean-Armand

M. MORTIER François

M. MIRJOLET Marcel

M. PIERFITTE Maurice

**PROFESSEURS EMERITES**

M. BONALY Roger

M. HOFFMAN Maurice

M. SIEST Gérard

**MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES**

Mme FUZELLIER Marie-Claude

Mlle IMBS Marie-Andrée

M. MONAL Jean-Louis

Mme POCHON Marie-France

Mme ROVEL Anne

Mme WELLMAN-ROUSSEAU Marie Monica

**PROFESSEURS**

M. ASTIER Alain

M. ATKINSON Jeffrey

M. AULAGNER Gilles

M. BAGREL Alain

M. BLOCK Jean-Claude

Mme CAPDEVILLE-ATKINSON Christine

Mme FINANCE Chantal

Mme FRIANT-MICHEL Pascale

Mlle GALTEAU Marie-Madeleine

M. HENRY Max

M. JOUZEAU Jean-Yves

M. LABRUDE Pierre

Mme LARTAUD Isabelle

Mme LAURAIN-MATTAR Dominique

M. LALLOZ Lucien

M. LEROY Pierre

M. MAINCENT Philippe

M. MARSURA Alain

M. MERLIN Jean-Louis

M. NICOLAS Alain

M. REGNOUF de VAINS Jean-Bernard

M. RIHN Bertrand

Mme SCHWARTZBROD Janine

M. SIMON Jean-Michel

M. VIGNERON Claude

Pharmacie clinique

Pharmacologie cardiovasculaire

Pharmacie clinique

Biochimie

Santé publique

Pharmacologie cardiovasculaire

Virologie, immunologie

Mathématiques, physique, audioprothèse

Biochimie clinique

Botanique, mycologie

Bioanalyse du médicament

Physiologie, orthopédie, maintien à domicile

Pharmacologie

Pharmacognosie

Chimie organique

Chimie physique générale

Pharmacie galénique

Chimie thérapeutique

Biologie cellulaire oncologique

Chimie analytique

Chimie Thérapeutique

Biochimie

Bactériologie, parasitologie

Droit officinal, législation pharmaceutique

Hématologie, physiologie

## MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - virologie
Mme	BANAS Sandrine	Parasitologie
Mme	BENOIT Emmanuelle	Communication et santé
M.	BOISBRUN Michel	Chimie Thérapeutique
Mme	BOITEUX Catherine	Biophysique, Audioprothèse
M.	BONNEAUX François	Chimie thérapeutique
M.	CATAU Gérald	Pharmacologie
M.	CHEVIN Jean-Claude	Chimie générale et minérale
M	CLAROT Igor	Chimie analytique
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie, conseils vétérinaires
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Botanique, mycologie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M.	DUCOURNEAU Joël	Biophysique, audioprothèse, acoustique
M.	DUVAL Raphaël	Microbiologie clinique
Mme	FAIVRE Béatrice	Hématologie
M.	FERRARI Luc	Toxicologie
Mle	FONS Françoise	Biologie végétale, mycologie
M.	GANTZER Christophe	Virologie
M.	GIBAUD Stéphane	Pharmacie clinique
Mle	HINZELIN Françoise	Mycologie, botanique
M.	HUMBERT Thierry	Chimie organique
M.	JORAND Frédéric	Santé, environnement
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie galénique
Mle	LAMBERT Alexandrine	Biophysique, biomathématiques
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
Mme	LIVERTOUX Marie-Hélène	Toxicologie
Mle	MARCHAND Stéphanie	Chimie physique
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MERLIN Christophe	Microbiologie environnementale et moléculaire
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PERRIN-SARRADO Caroline	Pharmacologie
Mme	PICHON Virginie	Biophysique
Mme	SAUDER Marie-Paule	Mycologie, botanique
Mle	THILLY Nathalie	Santé publique
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacologie
M.	ZAIYOU Mohamed	Biochimie et biologie moléculaire appliquées aux médicaments
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

## PROFESSEUR ASSOCIE

Mme	GRISON Geneviève	Pratique officinale
-----	------------------	---------------------

## PROFESSEUR AGREGE

M.	COCHAUD Christophe	Anglais
----	--------------------	---------

## ASSISTANTS

Mme	BEAUD Mariette	Biologie cellulaire
Mme	BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie, phytothérapie
Mme	PAVIS Annie	Bactériologie

# SERMENT DES APOTHICAIRES



**Je** jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

**D'** honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

**D'**exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

**De** ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

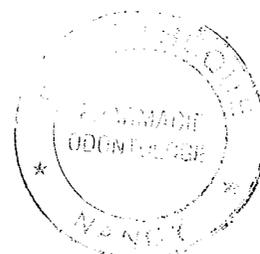
**Que** les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

**Que** je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,  
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES  
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES  
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

# Sommaire



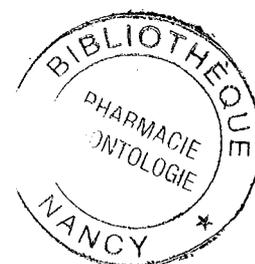
<b>Remerciements</b> -----	<b>6</b>
<b>Liste des tableaux et figures</b> -----	<b>7</b>
• Liste des tableaux.	
• Liste des figures.	
<b>Liste des abréviations utilisées</b> -----	<b>11</b>
<b>1. Introduction</b> -----	<b>13</b>
<b>2. Analyse de la littérature</b> -----	<b>22</b>
<b>2.1 Composés issus de la chimie de synthèse</b> -----	<b>22</b>
<b>2.1.1 Antidépresseurs tricycliques: dérivés de l'imipramine</b>	
<b>2.1.2 Antagonistes et agonistes-antagonistes des estrogènes</b>	
<b>2.1.3 Neuroleptiques : dérivés du thioxanthène</b>	
<b>2.1.4 Autres composés</b>	
<b>2.2 Composés d'origine naturelle</b> -----	<b>27</b>
<b>2.2.1 Irones</b>	
<b>2.2.2 Néoxanthine</b>	
<b>2.2.3 Autres composés naturels</b>	

<b>2.3</b>	<b>Acides gras et vitamines-----</b>	<b>28</b>
2.3.1	Acides gras	
2.3.2	Acide rétinoïque, tocophérol et caroténoïdes	
<b>2.4</b>	<b>Analyse et discussion-----</b>	<b>30</b>
2.4.1	Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Méthodologies conventionnelles</li> <li>• Phases stationnaires greffées alkyl en C<sub>30</sub> (CLHP à polarité de phases inversée)</li> <li>• Carbone graphite poreux et carbone pyrolytique poreux</li> <li>• Phases stationnaires chirales <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Phases stationnaires greffées calixarène ou résorcinarène</li> <li>○ Phases stationnaires greffées cyclodextrine</li> </ul> </li> <li>• Autres types de phases stationnaires utilisées en CLHP</li> </ul>	
2.4.2	Chromatographie en phase supercritique ou subcritique	
2.4.3	Electrophorèse capillaire	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Séparations en électrophorèse capillaire (milieux aqueux ou non-aqueux) utilisant des cyclodextrines ou d'autres agents comme sélecteurs</li> <li>• Séparations en électrophorèse capillaire sans sélecteur</li> </ul>	
	<b>Conclusions préliminaires.</b>	
<b>3.</b>	<b>Présentation des analytes-----</b>	<b>41</b>
3.1	Généralités-----	41
3.2	Citrate de clomifène-----	41
3.2.1	Caractéristiques organoleptiques	

3.2.2	Caractéristiques physico-chimiques et pharmacologiques des 2 isomères	
3.2.3	Spécialités commercialisées en France	
3.2.4	Voies de synthèse potentielles et profil d'impuretés	
3.3	Chlorhydrate de doxépine-----	44
3.3.1	Caractéristiques organoleptiques	
3.3.2	Caractéristiques physico-chimiques et pharmacologiques des 2 isomères	
3.3.3	Spécialités commercialisées en France	
3.3.4	Voies de synthèse potentielles et profil d'impuretés	
3.4	Dichlorhydrate de flupentixol-----	48
3.4.1	Caractéristiques organoleptiques	
3.4.2	Caractéristiques physico-chimiques et pharmacologiques des 2 isomères	
3.4.3	Spécialités commercialisées en France	
3.4.4	Voies de synthèse potentielles et profil d'impuretés	
4.	Le carbone graphite poreux (CGP) et son emploi en CLHP-----	52
4.1	Introduction – Historique du CGP et mode de fabrication-----	52
4.1.1	Historique du développement des phases stationnaires CGP	
4.1.2	Mode de fabrication (selon procédé Hypercarb <sup>®</sup> , Thermo Electron Corporation)	
4.2	Structure du CGP-----	53
4.3	Mécanismes de rétention sur support CGP-----	55
4.3.1	Interactions soluté-solvant	

4.3.2	Interactions soluté-surface de graphite	
4.4	Force relative des solvants sur CGP-----	58
4.5	Applications du CGP-----	61
5.	Utilisation de sélecteurs en électrophorèse capillaire-----	62
5.1	Théorie de l'électrophorèse capillaire-----	62
5.1.1	Introduction	
5.1.2	Mobilité électrophorétique	
5.1.3	Mobilité électro-osmotique / électro-osmose (EOS)	
5.1.4	Mobilité apparente	
5.2	Description des appareils commerciaux-----	65
5.2.1	Sources de haute tension	
5.2.2	Capillaires	
5.2.3	Cartouche et source de gaz	
5.2.4	Contrôle de la température	
5.2.5	Systèmes de détection et d'acquisition des résultats	
5.3	Facteurs influençant la séparation en électrophorèse capillaire-----	67
5.4	Séparation isomérique à l'aide de sélecteurs-----	68
6.	Travail expérimental-----	71
6.1	Matériel et méthodes-----	71
6.1.1.	Analytes	
6.1.2.	Réactifs et solvants	

6.1.3. Matériel	
6.1.4. Paramètres chromatographiques et électrophorétiques optimisés	
6.2 Développement de la méthode chromatographique : cas du flupentixol--	76
6.3 Développement de la méthode électrophorétique-----	78
6.4 Comparaison des résultats Ph. Eur. / CLHP sur CGP / Electrophorèse capillaire-----	82
7. Conclusion-----	87
Annexe-----	89
Bibliographie-----	103



# Remerciements

*Ce travail de thèse a été accompli dans son intégralité au sein du Laboratoire de Chimie analytique et Bioanalyse du médicament de la Faculté de Pharmacie de Nancy (UMR 7561 UHP-CNRS).*

*Mes remerciements s'adressent en premier lieu à Monsieur Alain Nicolas, Professeur des Universités. Vous qui avez grandement contribué à faire de moi ce que je suis, qui m'avez écouté et conseillé lorsque j'en avais besoin, veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de ma profonde estime. J'espère que cette thèse sera à la hauteur de vos exigences.*

*Mes remerciements s'adressent en outre à Monsieur Colin, mon maître de stage industriel, pour ses qualités humaines et sa gentillesse.*

*Merci également à Monsieur Marsura, qui me fait l'honneur d'avoir accepté d'être membre du jury de cette thèse d'exercice.*

*Je souhaite également remercier Monsieur Igor Clarot, Maître de Conférences, pour son aide précieuse et sa disponibilité sans faille non seulement pendant ce travail de thèse, mais également au cours de mes études à la Faculté, ainsi que l'ensemble du personnel du laboratoire de chimie analytique et bioanalyse du médicament.*

*Enfin, je remercie l'ensemble des membres de ma famille pour leur soutien constant tout au long de mon parcours d'étudiant.*

A mes grands-parents.  
A ma mère. A ma tante.  
A Emilie.

# Liste des tableaux et figures

- Liste des tableaux.

Tableau I . Exemples illustrant les différents types d'isomérisie pouvant exister au sein de familles de composés organiques.

Tableau II . Structure chimique des isomères (Z) et (E) pour chacun des composés considérés.

Tableau III . Monographies traitant de l'isomérisie (Z)-(E) dans la Pharmacopée Européenne, 5<sup>ème</sup> édition..

Tableau IV . Descriptif détaillé des étapes de rinçages ayant lieu avant et entre deux injections.

Tableau V . Plan d'expérience type PLACKETT-BURMANN utilisé pour optimiser la méthode électrophorétique (logiciel MODDE 5.0).

Tableau VI . Récapitulatif des résultats du plan d'expérience précédemment décrit.

Tableau VII . Récapitulatif de l'étude force ionique / durée d'injection pour le citrate de clomifène et le dichlorhydrate de flupentixol.

Tableau VIII . Récapitulatif des résultats obtenus avec les 2 techniques analytiques envisagées ainsi qu'avec les méthodes Ph. Eur. correspondantes pour le citrate de clomifène, le chlorhydrate de doxépine et le dichlorhydrate de flupentixol.

- Liste des figures.

Figure 1. Structure chimique de l'acide linoléique.

Figure 2 (a). Structure d'une phase silice greffée calix[n]arène (Caltrex<sup>®</sup> AI, II, III, Synaptec, Allemagne ; n=4, 6, 8 respectivement).

Figure 2 (b). Structure d'une phase silice greffée para-tert.-butylcalix[n]arène (Caltrex<sup>®</sup> BI, II, III, Synaptec, Allemagne ; n=4, 6, 8 respectivement).

Figure 2 (c). Structure d'une phase silice greffée resorcinarène (RES<sup>®</sup>, Synaptec, Allemagne).

Figure 3. Structure chimique de l' $\alpha$ -cyclodextrine.

Figure 4. Structure chimique de l'acide maléique (à gauche) et de l'acide fumarique (à droite).

Figure 5. Schéma réactionnel illustrant une des voies de synthèse possible des dérivés du triphényléthylène (Merrel Company, US Patent 2,914,563).

Figure 6. Formules chimiques semi-développées des impuretés du citrate de clomifène selon Pharmacopée Européenne.

Figure 7. Schéma réactionnel illustrant deux voies de synthèse potentielles de dérivés dibenzoxépines (Pfizer & Co., Inc., US Patent 3,420,851).

Figure 8. Autres approches envisageables en chimie de synthèse des dibenzoxépines (Pfizer & Co., Inc., US Patent 3,420,851).

Figure 9. Formules chimiques semi-développées des impuretés du chlorhydrate de doxépine selon Pharmacopée Européenne.

Figure 10. Schéma réactionnel illustrant la synthèse de dérivés hydroxyalkylènepipérazine (Smith Kline & French Laboratories, US Patent 3,282,930).

Figure 11. Formules chimiques semi-développées des impuretés du dichlorhydrate de flupentixol selon Pharmacopée Européenne.

Figure 12. Aspect du support après l'étape de carbonisation (vue au microscope).

Figure 13. Structure schématique comparée d'une phase stationnaire greffée C<sub>18</sub> et d'une phase stationnaire CGP type Hypercarb<sup>®</sup>.

Figure 14. Orientation des couches d'atomes de carbone dans le CGP.

Figure 15. Aspect du CGP vu en microscopie électronique.

Figure 16. Les électrons délocalisés à la surface du graphite sont attirés par la charge positive s'approchant de celle-ci (gauche), alors qu'ils sont repoussés par une charge négative dans les mêmes conditions (droite).

Figure 17. Représentation schématique des interactions soluté-surface de graphite dans le cas de solutés plans (gauche) et non-plans (droite).

Figure 18. Classification de différents solvants selon leur force d'élution avec une phase stationnaire CGP pour le phénol (A), l'aniline (B), le naphthalène (C), l'éthylbenzène (D) et le nitrobenzène (E).

Figure 19. Variation du flux électro-osmotique en fonction du pH.

Figure 20. Photographie d'un système d'électrophorèse capillaire BECKMAN type P/ACE 5500.

Figure 21. Structure chimique semi-développée des cyclodextrines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (de haut en bas et de gauche à droite).

Figure 22. Chromatogramme obtenu avec le dichlorhydrate de flupentixol dans les conditions expérimentales précitées.

Figure 23. Chromatogramme obtenu avec le citrate de clomifène avec la méthode Ph. Eur.

Figure 24. Chromatogramme obtenu avec le citrate de clomifène sur colonne CGP dans les conditions optimisées.

Figure 25. Electrophérogramme obtenu avec le citrate de clomifène dans les conditions optimisées.

Figure 26. Chromatogramme obtenu avec le chlorhydrate de doxépine avec la méthode Ph. Eur.

Figure 27. Chromatogramme obtenu avec le chlorhydrate de doxépine sur colonne CGP dans les conditions optimisées.

Figure 28. Electrophérogramme obtenu avec le chlorhydrate de doxépine dans les conditions optimisées.

Figure 29. Chromatogramme obtenu avec le dichlorhydrate de flupentixol avec la méthode Ph. Eur.

Figure 30. Chromatogramme obtenu avec le dichlorhydrate de flupentixol sur colonne CGP dans les conditions optimisées.

Figure 31. Electrophérogramme obtenu avec le dichlorhydrate de flupentixol dans les conditions optimisées.

# Liste des abréviations utilisées

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché  
As : facteur d'Asymétrie (calculé selon Ph. Eur. dans le cas présent)  
 $\beta$ -CD :  $\beta$ -Cyclodextrin  
CASRN : Chemical Abstract Service Registry Number  
CCM : Chromatographie sur Couche Mince  
CD : Cyclodextrine  
CMEC : Chromatographie Micellaire ElectroCinétique  
CGP : Carbone Graphite Poreux  
CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance  
CMBCD : Carboxymethylated  $\beta$ -Cyclodextrin  
CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse  
CPP : Carbone Pyrolytique Poreux  
DAD : Diode Array Detector (Détecteur à barrette de diodes)  
DCI : Dénomination Chimique Internationale  
DIMEB : Dimethylated  $\beta$ -Cyclodextrin  
E : Entgegen  
EC : Electrophorèse Capillaire  
ECHP : Electrophorèse Capillaire Haute Performance  
ERPG : Effet de Rétention Polaire sur le Graphite  
EtOH : ethanol (alcool éthylique)  
FDA : Food and Drug Administration  
FID : Flame Ionization Detector  
HPBCD : Hydroxypropylated  $\beta$ -Cyclodextrin  
ICH : Commission internationale sur l'harmonisation  
IMS/MS : Ion Mobility Spectrometry / Mass Spectrometry  
IM : IntraMusculaire  
IV : IntraVeineuse  
IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry  
LIF : Laser Induced Fluorescence

LOD : Limit Of Detection (limite de detection)

LOQ : Limit of Quantification (limite de quantification)

LP : Libération Prolongée

MeOH : methanol (alcool méthylique)

m/m : masse / masse

m/v : masse / volume

NACE : Non-Aqueous Capillary Electrophoresis

Ph. Eur. : Pharmacopée Européenne

PrOH : propanol (alcool propylique)

R : rectus

RAMEB : Randomly Methylated  $\beta$ -Cyclodextrin

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RP : Reversed-Phase

RSS : Remboursement Sécurité Sociale

S : sinister

SC : Sous-Cutané(e)

SCR : Substance Chimique de Référence (Pharmacopée Européenne)

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

TEA : TriEthylAmine

TRIMEB : Trimethylated  $\beta$ -Cyclodextrin

UV : Ultraviolet

v/v : volume / volume

Z : zusammen

# 1. Introduction

Les composés ayant une même formule chimique mais des structures différentes sont appelés isomères. En considérant ces différences, il est possible de classer l'isomérisation en différents sous-types, que nous allons décrire ci-après. Pour chaque sous-type, des exemples seront donnés à la fin de ce paragraphe introductif (tableau I). Les définitions sont en accord avec les recommandations émises par l'IUPAC – Union Internationale de la Chimie Pure et Appliquée (1997).

L'isomérisation de constitution désigne la relation existant entre des structures qui diffèrent en leur constitution, et décrites par des formules semi-développées différentes (par exemple l'éther  $\text{CH}_3\text{OCH}_3$  et l'éthanol  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ). L'isomérisation due à des différences dans l'arrangement spatial des atomes sans modification des liaisons ou de l'enchaînement de ceux-ci est appelée stéréoisomérisation. Les stéréoisomères peuvent à leur tour être répartis en isomères de conformation (appelés également conformères) ou de configuration.

Les isomères de configuration peuvent être de deux types distincts : on parlera soit d'isomères géométriques (terme au demeurant obsolète pour désigner l'isomérisation *cis-trans*), soit d'isomères optiques (c'est-à-dire des stéréoisomères possédant une activité optique différente : diastéréoisomères et énantiomères). Un énantiomère peut être défini comme étant une molécule appartenant à une paire d'entités moléculaires, chacune étant l'image non-superposable l'une de l'autre dans un miroir. Les diastéréoisomères (ou diastéréomères) sont des stéréoisomères qui ne sont pas images l'un de l'autre dans un miroir; ils sont caractérisés par des différences en termes de propriétés physiques, et par certaines différences dans leur comportement chimique vis-à-vis des réactifs chiraux et achiraux.

Les isomères *cis-trans* sont des alcènes ou cycloalcanes (ou hétéro-analogues) stéréoisomères qui se différencient dans la position d'atomes ou de groupes d'atomes par rapport à un plan de référence ; dans l'isomère *cis*, les atomes sont situés du même côté, alors que dans le *trans*, ils sont opposés.

Les termes *E* (de l'allemand « entgegen » : opposé) et *Z* (de l'allemand « zusammen » : ensemble) sont utilisés pour décrire les relations existant entre des alcènes, des cumulènes (ou systèmes apparentés) stéréoisomères. Le groupement attaché à l'un des atomes de carbone doublement liés et de priorité la plus élevée selon la règle de Cahn-Ingold-Prelog (Cahn *et al.*, 1966) est comparé avec le groupement de priorité la plus élevée attaché à l'autre carbone. On qualifiera le stéréoisomère de *Z* si les 2 groupements sont situés du même

côté par rapport à un plan de référence passant par la double liaison et perpendiculaire au plan contenant les liaisons reliant les différents groupements aux atomes doublement liés ; l'autre stéréoisomère sera appelé *E*. Ces termes peuvent également être employés pour décrire des structures possédant des doubles liaisons mettant en jeu d'autres atomes que le carbone.

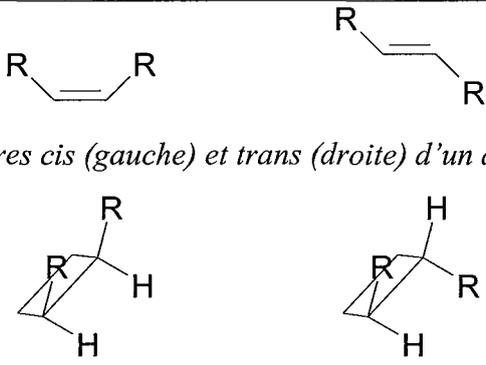
La séparation et la quantification des isomères *Z-E* constituent des objectifs importants pour l'analyste, en particulier s'il s'agit de composés d'intérêt pharmaceutique. Des autorités telles que la Pharmacopée Européenne exigent le contrôle de la teneur en isomères *Z* et *E* dans les substances où ce type d'isomérisation existe. Ceci est en accord avec le fait que les isomères peuvent présenter des caractéristiques biologiques, pharmacologiques ou toxicologiques fondamentalement différentes (le *Z*-tamoxifène a une action antiestrogène, alors que l'isomère *E* est un agoniste total), et met en exergue la nécessité de développer des techniques fiables et adaptées dans ce domaine. Dans ce contexte, la FDA a émis une recommandation relative au développement de nouveaux principes actifs stéréoisomères (1992-2005), et insiste sur le fait que des « isomères géométriques (et les diastéréoisomères) devraient, avec la rare exception où une interconversion se produit *in vivo*, être traités et développés comme s'ils étaient des substances différentes. Il n'y a aucune raison de considérer le développement de mélanges d'isomères géométriques ou de diastéréoisomères à moins qu'ils ne constituent de manière fortuite une combinaison raisonnée à dose fixe ».

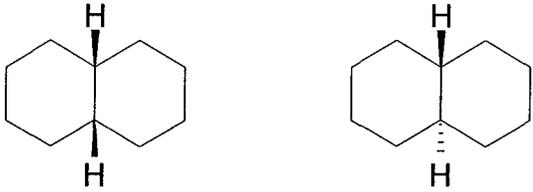
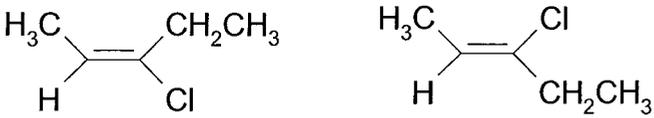
Dans le cadre de cette thèse, nous allons nous concentrer uniquement l'isomérisation *cis-trans* générée par une liaison éthylénique (double liaison carbone-carbone). Les autres types d'isomérisation géométrique (par exemple au sein d'entités cycliques substituées) ne seront pas abordées dans cet ouvrage.

Nous commencerons tout d'abord par une analyse de la littérature existante, puis nous envisagerons successivement les théories intéressant le support carbone graphite poreux (CGP) et l'électrophorèse capillaire en présence de sélecteurs.

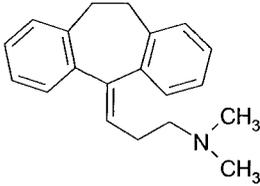
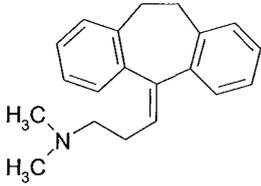
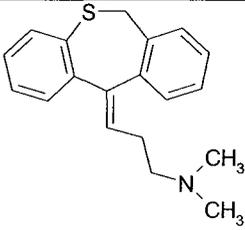
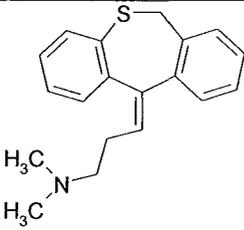
Nous considérerons enfin les résultats expérimentaux obtenus, et nous tenterons d'adopter un point de vue synthétique sur les conclusions et perspectives susceptibles d'en découler.

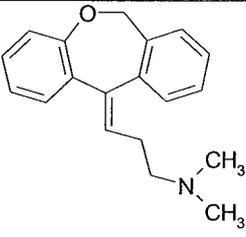
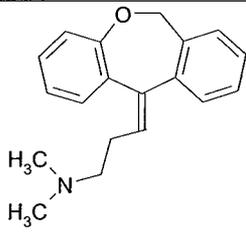
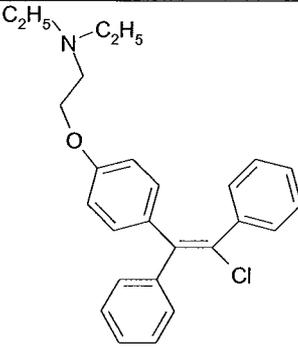
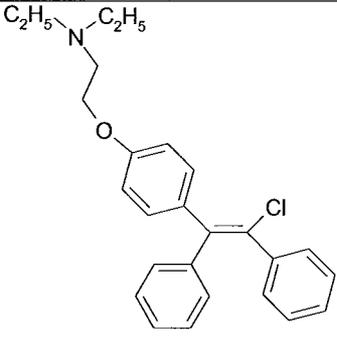
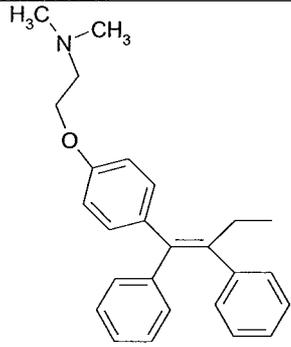
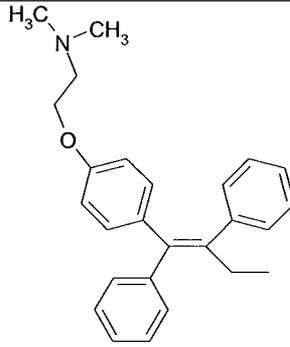
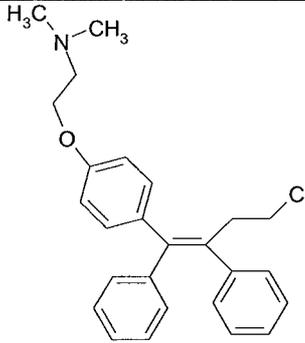
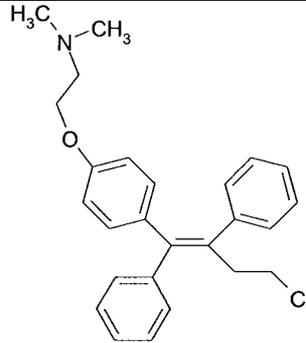
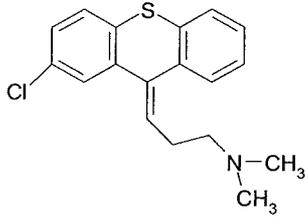
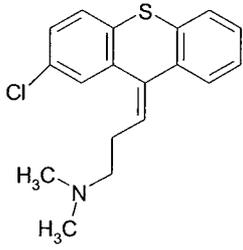
*Tableau I. Exemples illustrant les différents types d'isomérisie pouvant exister au sein de familles de composés organiques.*

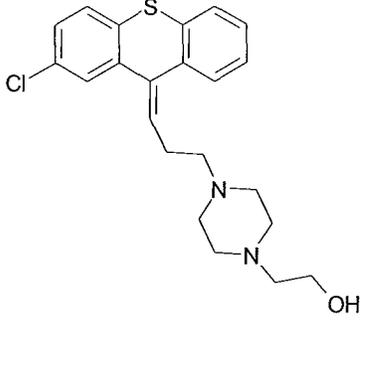
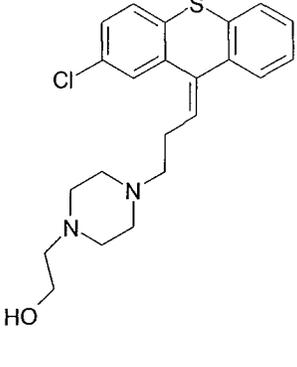
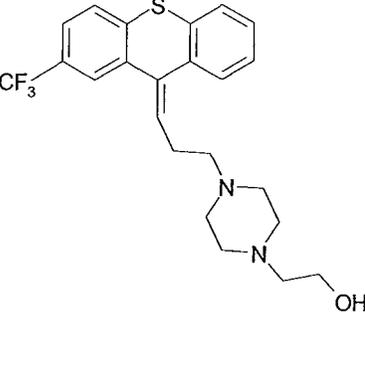
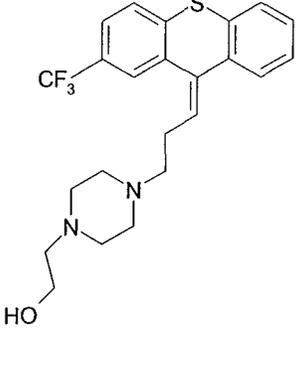
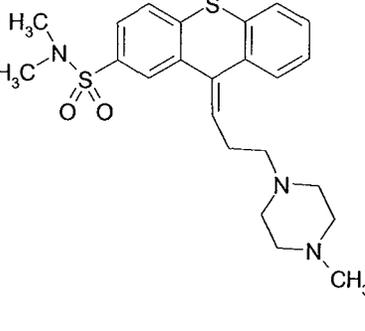
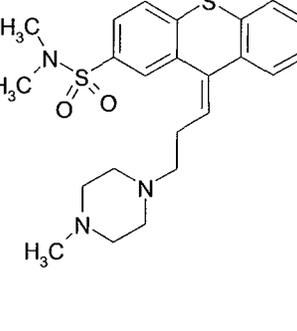
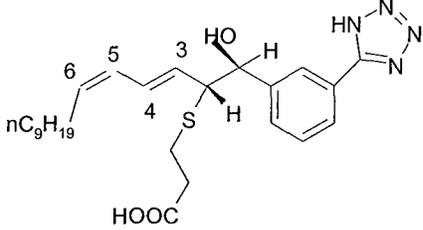
Type d'isomérisie	Exemples
<i>Isomérisie de conformation</i>	 <p><i>Formes décalée et éclipsée d'un alcane (butane)</i></p>
<i>Isomérisie optique : énantiomères</i>	 <p><i>Isomère (S)-(gauche) et (R)-(droite) du 2-chlorobutane</i></p>
<i>Isomérisie optique : diastéréoisomères</i>	 <p><i>Isomère (S,R)- (gauche, en partant du haut) et (R,R)- (droite) du 2-bromo-3-chlorobutane.</i></p>
<i>Isomérisie cis-trans.</i>	 <p><i>Isomères cis (gauche) et trans (droite) d'un alcène.</i></p> <p><i>Isomères cis (gauche) et trans (droite) d'un alcane cyclique</i></p>

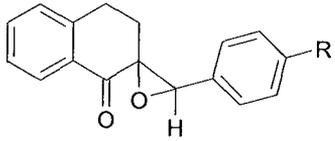
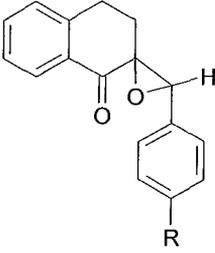
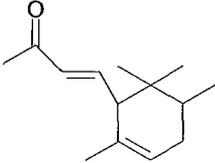
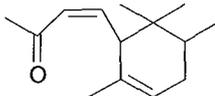
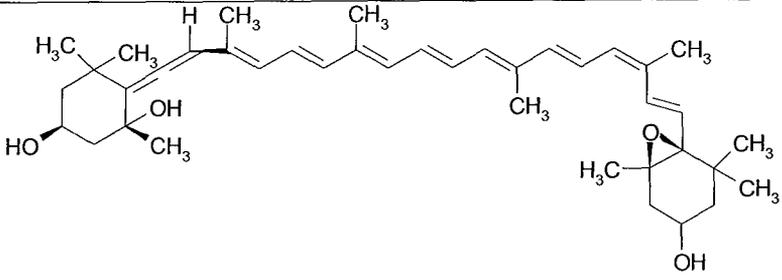
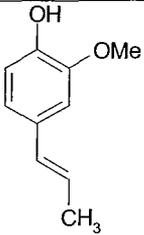
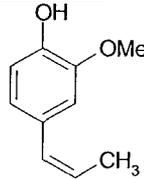
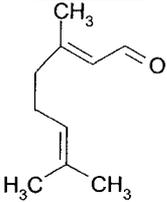
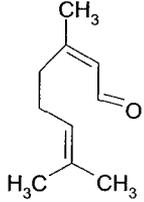
	 <p style="text-align: center;"><i>Isomères cis (gauche) et trans (droite) du décahydronaphtalène (naphtalane, naphtane)</i></p>
<i>Isomérisation Z-E</i>	 <p style="text-align: center;"><i>Isomères (E)-(gauche) et (Z)-(droite) d'un alcène (3-chloropent-2-ène).</i></p>

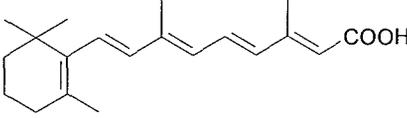
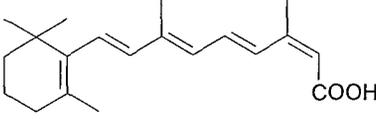
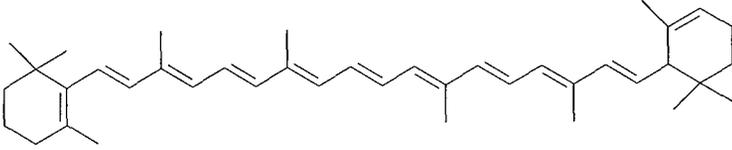
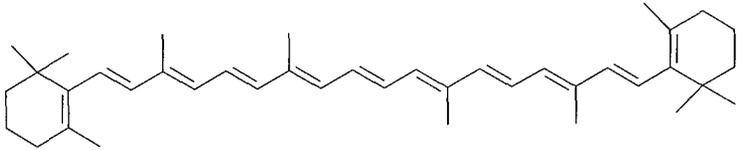
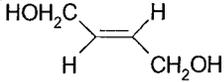
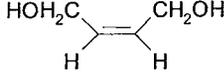
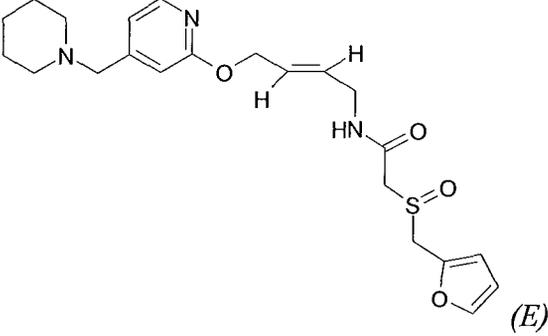
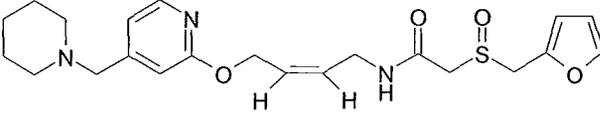
*Tableau II. Structure chimique des isomères (Z) et (E) pour chacun des composés considérés.*

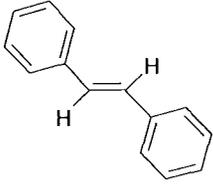
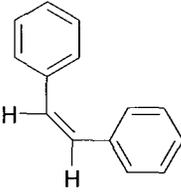
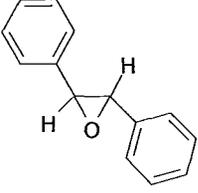
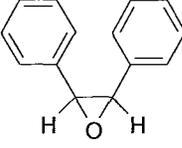
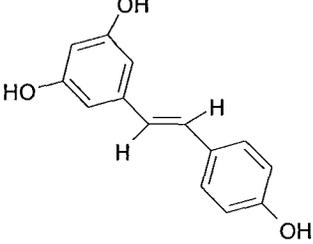
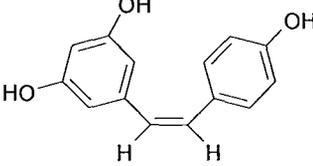
DCI	Structure chimique (E)	Structure chimique (Z)
<b>Amitryptiline</b>		
<b>Dosulépine</b>		

<b>Doxépine</b>		
<b>Clomifène</b>		
<b>Tamoxifène</b>		
<b>Toremifène</b>		
<b>Chlorprothixène</b>		

<p><b>Clopentixol</b></p>		
<p><b>Flupentixol</b></p>		
<p><b>Thiothixène</b></p>		
<p><b>LY 170680</b> <b>(ELI LILLY &amp; Co.)</b></p>	 <p><i>Ce composé peut se présenter sous 4 arrangements isomériques différents (présence d'un système diénique conjugué).</i></p>	

<p><b>2-arylméthylidène- 1-tetralones</b></p>	 <p><i>trans-2a-g</i></p>	 <p><i>cis-2a,c,e</i></p>
<p><b><math>\alpha</math>-irone</b></p>		
<p><b>Néoxanthine</b></p>	 <p><i>9'Z-(3S, 5R, 6R, 3'S, 5'R, 6'S)-néoxanthine</i></p>	
<p><b>Isoeugénol</b></p>		
<p><b>Citral</b></p>		

<b>Acide rétinoïque</b>	 <p style="text-align: right;">all <i>trans</i> (trétinoïne)</p>  <p style="text-align: right;">13-<i>cis</i> (isotrétinoïne)</p>
<b>Carotène</b>	 <p style="text-align: center;"><math>\alpha</math>-carotène tout-<i>trans</i></p>  <p style="text-align: center;"><math>\beta</math>-carotène tout-<i>trans</i></p>
<b>2-butène-1,4-diol</b>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div data-bbox="583 1167 807 1249">  </div> <div data-bbox="995 1167 1219 1249">  </div> </div>
<b>Lafutidine</b>	 <p style="text-align: right;">(E)</p>  <p style="text-align: right;">(Z)</p>

<b>Stilbène</b>	 <p>Chemical structure of trans-stilbene, showing two phenyl rings attached to a central carbon-carbon double bond in a trans configuration. The two hydrogen atoms on the double bond are also in a trans configuration.</p>	 <p>Chemical structure of cis-stilbene, showing two phenyl rings attached to a central carbon-carbon double bond in a cis configuration. The two hydrogen atoms on the double bond are also in a cis configuration.</p>
<b>Oxyde de stilbène</b>	 <p>Chemical structure of trans-stilbene oxide, showing the epoxide ring formed from the double bond of trans-stilbene. The phenyl rings are in a trans configuration, and the two hydrogen atoms on the epoxide ring are also in a trans configuration. The word <i>trans</i> is written below the structure.</p>	 <p>Chemical structure of cis-stilbene oxide, showing the epoxide ring formed from the double bond of cis-stilbene. The phenyl rings are in a cis configuration, and the two hydrogen atoms on the epoxide ring are also in a cis configuration. The word <i>cis</i> is written below the structure.</p>
<b>Resveratrol</b>	 <p>Chemical structure of trans-resveratrol, showing a stilbene core with two hydroxyl groups on the left phenyl ring and one hydroxyl group on the right phenyl ring. The two hydrogen atoms on the double bond are in a trans configuration.</p>	 <p>Chemical structure of cis-resveratrol, showing a stilbene core with two hydroxyl groups on the left phenyl ring and one hydroxyl group on the right phenyl ring. The two hydrogen atoms on the double bond are in a cis configuration.</p>

## 2. Analyse de la littérature

### 2.1 Composés issus de la chimie de synthèse

Cette première catégorie de composés sera divisée en 4 sous-parties : antidépresseurs tricycliques (dérivés de l'imipramine), antagonistes et agonistes-antagonistes des estrogènes, dérivés du thioxanthène à activité neuroleptique et autres composés. Le tableau II présente une liste exhaustive de tous les composés auxquels nous nous sommes intéressés.

#### 2.1.1 Antidépresseurs tricycliques : dérivés de l'imipramine

L'amitryptiline [CASRN : 72-69-5] (3-(10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cycloheptèn-5-ylidène)-N-méthyl-1-propanamine) appartient à la famille des dérivés de l'imipramine. Une méthode CLHP avec une colonne de silice, une phase mobile aqueuse contenant de l'ammoniaque et une détection UV (254 nm) destinée à la détermination de l'amitryptiline et de ses principaux métabolites (amitryptiline-N-oxide, nortryptiline, desméthylnortryptiline, isomères *E*- et *Z*- de la 10-hydroxyamitryptiline, isomères *E*- et *Z*- de la 10-hydroxynortryptiline) dans le plasma et le cerveau des animaux a été réalisée en 1992 (Coudore *et al.*, 1992).

La dosulépine [CASRN : 113-53-1] (3-dibenzo[b,e]thiépin-11(6H)-ylidène-N,N-diméthyl-1-propanamine) et la doxépine [CASRN : 1668-19-5] (3-dibenz[b,e]oxépin-11-(6H)-ylidène-N,N-diméthyl-1-propanamine), qui sont respectivement des dérivés de la dibenzo[b,e]thiépine et de la dibenz[b,e]oxépine, appartiennent également à cette famille thérapeutique. Les isomères (*E*)- et (*Z*) du chlorhydrate de dosulépine [CASRN : 897-15-4] ont été séparés par Pawlak *et al.* (1990) à l'aide d'une méthode CLHP sur colonne CGP avec détection UV (260 nm). Les isomères *cis* et *trans* de la doxépine et de la desméthyldoxépine ont été étudiés par Hrdina *et al.* (1990) en se servant d'une réaction de dérivation de l'amine secondaire et d'une méthodologie CPG sur colonne capillaire. Une technique CLHP pour la caractérisation simultanée des isomères géométriques de la doxépine et de la N-desméthyldoxépine dans le plasma et l'urine a été décrite (Yan *et al.*, 1997). Un autre type d'approche a été fourni par Sokoliess *et al.* (2002), dont l'équipe a réalisé la séparation des 2

isomères de la doxépine sur des phases stationnaires greffées calixarène- ou résorcinarène, en utilisant 2 types de solvant organique (méthanol et acétonitrile) sur chaque colonne testée.

Trois techniques d'électrophorèse capillaire pour la séparation des isomères de la doxépine ont été développées. Hu *et al.* ont exploité deux méthodes différentes, la première d'entre elles utilisant un tampon  $\text{H}_2\text{PO}_4\text{Na}$  / hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine et une détection à 297 nm (Hu *et al.*, 2001), la seconde basée sur la NACE (méthanol – acétonitrile – acétate d'ammonium / acide acétique glacial) avec une longueur d'onde de détection fixée à 254 nm (Hu *et al.*, 2002). Sokoliess *et al.* (2003) ont étudié la séparation de ces isomères en NACE avec des additifs calixarènes ou résorcinarènes.

### 2.1.2 Antagonistes et agonistes-antagonistes des estrogènes

Le clomifène [CASRN : 911-45-5] (2-[4-(2-Chloro-1,2-diphényléthényl)phénoxy]-N,N-diéthylamine) est un composé synthétique non-stéroïdien ayant des effets agonistes et antagonistes des estrogènes (on parle à cet effet d'agoniste-antagoniste). Il est utilisé pour la thérapie de l'infertilité anovulatoire. Le citrate de clomifène [CASRN : 50-41-9] est un mélange d'isomères *Z* (ou zuclomifène) et *E* (enclomifène).

Une technique CLHP de détermination de ces isomères et de leurs métabolites a été réalisée par Baustian *et al.* (1986) : CLHP à polarité de phases inversée (colonne Supelco<sup>®</sup> LC8 octyldiméthylsilyl, phase mobile méthanol / eau 80:20 ; v/v avec 2,30 mL/L d'acide phosphorique et 10  $\mu\text{L/L}$  de triéthylamine) associée à une réaction de dérivation post-colonne (oxydation du stilbène en phénanthrène) qui permet d'utiliser une détection par fluorescence (excitation à 255 nm, émission à 378 nm). La pharmacocinétique après administration d'une dose unique chez le volontaire sain a également été décrite la même année (Mikkelson *et al.*, 1986). Une autre méthode CLHP (sur LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18, phase mobile acétonitrile / méthanol / eau / chlorure d'ammonium 1% m/v / carbonate de potassium 1% m/v 950:30:20:4:8 ; v/v), nécessitant elle aussi une réaction de dérivation post-colonne et une détection par fluorescence (excitation à 247 nm, émission à 378 nm) a été développée (Urmos *et al.*, 1993).

Les autres types d'approche comprennent des séparations par électrophorèse capillaire. Juvancz *et al.* (1996) ont développé une séparation basée sur cette technique en y associant divers types de dérivés cyclodextrines (TRIMEB, DIMEB, RAMEB, HPBCD, CMBCD) comme additifs et explorèrent l'influence de différents paramètres : la concentration en

électrolytes de fond, le pH et le type et la concentration des cyclodextrines. La DIMEB a permis la meilleure séparation des isomères du clomifène ( $R_s > 14,1$  à pH 7) ; les dérivés RAMEB,  $\beta$ -CD et HPBCD montrent des profils de sélectivité proches de celui de la DIMEB. Dans le cas des dérivés DIMEB, RAMEB et  $\beta$ -CD, les propriétés de solubilisation des cyclodextrines ont été utilisées dans les séparations, alors que dans le cas de la DIMEB, ce sont les propriétés de complexation qui déterminèrent la migration du clomifène. Des mélanges de CMBCD et de DIMEB à pH 9 ont permis une séparation très rapide des deux isomères (moins de 3 minutes). Bempong *et al.* (1996) ont utilisé un design expérimental de Plackett-Burman (exploration simultanée de la force ionique du tampon, du pH, de la concentration en cyclodextrine, de la concentration en méthanol et du temps d'analyse) afin d'obtenir des précisions quant aux conditions optimales à employer pour séparer les isomères du clomifène ; leur système était aussi basé sur l'électrophorèse capillaire et l'usage de cyclodextrine, alors que Hansen *et al.* (1997) ont démontré qu'il était possible de réaliser cette analyse sans addition de dérivés de cyclodextrines (technique NACE), tout en obtenant des valeurs de résolution comparables ( $R_s$  variant de 0,48 à 1,29).

Le tamoxifène [CASRN : 10540-29-1] ((*Z*)-2-[4-(1,2-diphényl-1-butényl)phénoxy]-N,N-diméthyléthanamine), un dérivé du triphényléthylène, appartient à la classe des antagonistes stéroïdiens des estrogènes (antiestrogène). Il est utilisé en tant qu'agent antinéoplasique pour le traitement du cancer du sein. Il convient de préciser que l'isomère *Z* du tamoxifène a une action antiestrogène, alors que le *E* est un agoniste total des estrogènes. La CLHP à polarité de phases inversée a été appliquée avec succès sur ces composés (Chen *et al.*, 1987 ; Husain *et al.*, 1994). Husain *et al.* se sont également intéressés à l'effet de la lumière sur la stabilité du *Z*-tamoxifène et à la conversion de ce dernier en isomère *E*, et ont appliqué leur méthode chromatographique au clomifène en utilisant des conditions similaires. Manns *et al.* (1998) ont utilisé des raisonnements statistiques qui, une fois appliqués au triangle de sélectivité des solvants de Snyder (Snyder, 1978), leur a permis de déterminer quelle serait la composition optimale de phase mobile à employer pour l'analyse du tamoxifène présent dans le sérum par CLHP. Le système de détection était basé sur une irradiation post-colonne des analytes, qui convertissait ces derniers en leurs produits respectifs de photocyclisation, suivie par une détection par fluorescence (excitation à 254 nm, émission à 360 nm).

Le torémifène [CASRN : 89778-26-7] (2-[4-[(1Z)-4-chloro-1,2-diphényl-1-butényl]phénoxy]-N,N-diméthyléthanamine) est également un antiestrogène (non stéroïdien), apparenté structurellement au tamoxifène. Il est lui aussi utilisé dans le traitement du cancer du sein avancé. En 1998, Zhu *et al.* décrivent une méthode simple utilisant l'électrophorèse capillaire pour séparer les isomères *Z* et *E* de ce composé.

### 2.1.3 Neuroleptiques : dérivés du thioxanthène

Le chlorprothixène [CASRN : 113-59-7] ((Z)-3-(2-chloro-9H-thioxanthen-9-ylidène)-N,N-diméthyl-1-propanamine) est utilisé comme agent antipsychotique en thérapeutique. Hansen *et al.* (1997) ont réussi à séparer les isomères *Z* et *E* de ce composé sans addition de cyclodextrines ou de surfactants, en adoptant la NACE. La séparation de divers dérivés du thioxanthène, dont le chlorprothixène, avec des méthodes basées sur la CLHP ou l'électrophorèse capillaire, a été étudiée en détail par Sokoliess *et al.* dans trois études différentes (Sokoliess *et al.*, 2001 / 2002 / 2003).

Le clopenthixol [CASRN : 982-24-1] (4-[3-(2-chloro-9H-thioxanthen-9-ylidène)propyl]-1-piperazinéthanol) et le flupenthixol [CASRN : 2709-56-0] (4-[3-[2-(Trifluorométhyl)-9H-thioxanthen-9-ylidène]propyl]-1-piperazinéthanol) constituent deux autres représentants de cette classe. Le *Z*-flupenthixol (ou  $\alpha$ -flupenthixol) possède une plus grande activité pharmacologique que son isomère *E* (ou  $\beta$ -flupenthixol).

Le zuclopenthixol (isomère *Z* du clopenthixol, aussi dénommé  $\alpha$ -clopenthixol) et son principal métabolite N-déalkylé au sein de liquides biologiques (urine et plasma) ont été séparés du *E*-clopenthixol par CLHP à polarité de phases inversée avec appariement d'ions, associée à une détection par fluorescence (excitation à 260 nm, émission à 435 nm) consécutive à une réaction de dérivation post-colonne des analytes (formation de dérivés thioxanthes dans un réacteur photochimique) (Hansen B.B. et S.H., 1994). Les isomères *Z-E* du clopenthixol, ainsi que ceux du flupenthixol et du flupenthixol décanoate (ester du flupenthixol), ont été séparés en utilisant la NACE en milieu acide (Hansen *et al.*, 1997). Une méthode CLHP à polarité de phases normale, en mode isocratique, avec une colonne Hypersil<sup>®</sup> (silice greffée cyanopropyle) et une détection à 254 nm a été décrite pour la caractérisation simultanée des isomères géométriques du flupenthixol et de l'halopéridol (un autre neuroleptique, à structure butyrophénone) (Walter *et al.*, 1998). La séparation de divers

dérivés du thioxanthène -incluant celle du flupentixol- en CLHP ou électrophorèse capillaire avec emploi de calixarènes ou de résorcinarènes a été –comme nous l’avons déjà précisé- étudiée en détail par l’équipe de Sokoliess (Sokoliess *et al.*, 2001 / 2002 / 2003).

Le thiothixène [CASRN : 5591-45-7] (N,N-diméthyl-9-[3-(4-méthyl-1-piperaziny)propylidène]thioxanthène-2-sulfonamide), un autre dérivé du thioxanthène, est utilisé en tant que neuroleptique. Il faut remarquer à cet égard que l’isomère *Z* de cette substance possède une plus grande activité pharmacologique que l’isomère *E*.

En 1987, Severin *et al.* décrivent une méthode CLHP applicable à la séparation et à l’analyse quantitative des deux isomères du thiothixène, ainsi qu’à celles des précurseurs synthétiques et des produits de dégradation. Cette technique se basait sur une colonne type SiAl (silice-alumine) et une phase mobile aqueuse tamponnée. Une autre approche CLHP, avec l’emploi de perazine en tant qu’étalon interne, une colonne Hypersil® et une détection UV à 230 nm, a été proposée par Dilger *et al.* (1988). Plus récemment, l’équipe de Hansen (Hansen *et al.*, 1997) a réussi à réaliser cette même séparation (sans ajout de cyclodextrine) en NACE.

#### 2.1.4 Autres composés

Des techniques de type spectromètre de mobilité ionique (IMS/MS) ont été mises en œuvre avec succès pour obtenir des informations relatives à la structure et permettre la séparation d’isomères de composés ioniques possédant jusqu’à 55 atomes (Karpas *et al.*, 1988). 3 types d’isomères ont été étudiés, incluant les isomères géométriques *Z/E*. Fish (1993) décrit une méthode basée sur une colonne CGP pour réaliser la séparation des 4 isomères *cis* et *trans* d’un nouveau principe actif à action antiasthmatique (LY 170680), et compara la sélectivité du CGP pour ces isomères par rapport à celle d’une silice greffée ODS. Le PGC permet de séparer les isomères considérés beaucoup plus rapidement et avec une résolution plus élevée que si l’on avait employé une silice greffée ODS.

Adam *et al.* (1996) ont réalisé la synthèse et la séparation (par chromatographie sur gel de silice) des époxydes isomériques des 2-arylméthylidène-1-tétralones. La caractérisation de ces composés (structure, configuration relative et stéréochimie) a été déterminée par spectroscopie RMN. Zawisza *et al.* (1998) décrivent la reconnaissance d’isomères *cis* et *trans* de divers azobenzène et éthers-couronnes par réduction voltamétrique des espèces

adsorbées. La synthèse, l'isomérisation *Z/E* (par irradiation sous lumière UV) et la séparation de composés type poly-para-phénylènevinylène ont été étudiées (Lange *et al.*, 2001).

## 2.2 Composés d'origine naturelle

### 2.2.1 Irones

Les irones sont des terpénoïdes à odeur agréable issus de l'huile d'iris ; elles revêtent un intérêt certain dans l'industrie du parfum, et sont extraites à partir des rhizomes de certaines espèces d'iris (*I. pallida* var. *dalmatica*, *I. germanica* et *I. florentina*), dans lesquelles elles s'accumulent pendant le stockage. Ces composés sont des homologues des ionones, c'est-à-dire des acétonides de cyclogéranyl aisément accessibles à partir du citral naturel. L'irone, comme composé isolé, est constituée d'un mélange d' $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -irones, chacune ayant la même formule chimique. Petro *et al.* (1998) ont préparé divers adsorbants carbonés poreux par carbonisation du saccharose dans les pores d'un gel de silice. Le produit de la pyrolyse a été ensuite désactivé par hydrogénation ; une méthode CLHP avec colonne capillaire employant ce type de préparation en mode isocratique avec détection UV (254 nm) a permis de séparer les isomères *cis* et *trans* de l' $\alpha$ -ionone [CASRN : 79-69-6] (4-(2,5,6,6-tetraméthyl-2-cyclohexène-1-yl)-3-butène-2-one).

### 2.2.2 Néoxanthine

Le caroténoïde allénique (3S, 5R, 6R, 3'S, 5'R, 6'S)-néoxanthine est abondant dans les plantes supérieures et dans plusieurs classes d'algues. Il a été très tôt associé avec l'activité photosynthétique chez les euglénophytes et les algues vertes, et a été isolé du complexe collecteur de lumière de diverses algues. Dans les plantes supérieures, sa présence a été confirmée dans les membranes thylacoïdes d'épinard, dans le photosystème I du tabac, du maïs et des feuilles de coton ainsi que dans le photosystème II d'*Arabidopsis thaliana*. Strand *et al.* (2000) ont isolé la 9'Z-(3S, 5R, 6R, 3'S, 5'R, 6'S)-néoxanthine de l'épinard, puis soumis ce composé à une stéréomutation photoinduite n'impliquant pas l'isomérisation de la liaison allénique. Les 6 isomères géométriques individuels, tout-*E*, 9Z, 9'Z, 13Z, 13'Z, 15Z et trois isomères di-Z minoritaires présents dans le mélange obtenu ont été caractérisés en employant trois systèmes de CLHP, des données spectrales dans le visible (valeurs de  $\lambda_{\max}$ , intensités des pics *cis*), la RMN du proton ainsi que des tests de réversibilité.

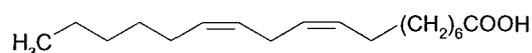
### 2.2.3 Autres composés naturels

Sokoliess *et al.* (2001) montrèrent comment des phases stationnaires silice greffées avec différents types de calixarènes ou résorcinarènes (au sein d'une méthode basée sur la CLHP) étaient capables de séparer les isomères géométriques *cis* et *trans* de l'isoeugénol [CASRN : 97-54-1] (2-méthoxy-4-(1-propenyl)-phénol) et du citral [CASRN : 5392-40-5] (3,7-diméthyl-2,6-octadiénal). Le citral issu de sources naturelles est un mélange 2 :1 de gèranial (isomère *E* du citral) et de néral (isomère *Z*). Les résultats obtenus par cette approche ont été confrontés à ceux obtenus à l'aide d'une colonne à polarité de phases inversée.

## 2.3 *Acides gras et vitamines*

### 2.3.1 Acides gras

Les acides linoléiques conjugués constituent un groupe d'isomères géométriques et de position de l'acide octadécadiénoïque (fig. 1). Différents modèles animaux ont démontré que ces dérivés possèdent une action anticarcinogène, hypolipémiant et antiasclérotique. Ils augmentent également les fonctions immunitaires et diminuent l'accumulation de graisse, et permettent pendant le même temps d'accroître les masses musculaire et osseuse. Ces isomères –au sein d'échantillons commerciaux- ont pu être séparés par CPG (Christie *et al.*, 1997 ; Precht et Molkentin, 1997). Christie *et al.* (1997) ont utilisé une réaction de dérivation avec la 4-méthyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione ; les dérivés obtenus étaient alors adaptés à une analyse consécutive par CPG couplée à la spectrométrie de masse ou à la RMN du carbone 13.



*Figure 1. Structure chimique de l'acide linoléique. CASRN : 60-33-3. Nomenclature chimique systématique : acide (Z,Z)-9,12-octadécadiénoïque.*

Jakubowski *et al.* (1997) ont étudié la composition en acides gras et les propriétés physiques de l'huile de soja pendant le processus industriel d'hydrogénation. La composition *cis* et *trans* a été analysée par CPG et CLHP. Kitayama *et al.* (1998) réalisèrent l'hydrogénation catalytique de l'acide linoléique et analysèrent les produits obtenus par cette réaction par CPG

(colonne capillaire isocyanopropyl trisilphenylène siloxane TC-70). De nombreuses espèces furent trouvées, y compris les isomères *trans*-diénoïque et diénoïque conjugué. Yang *et al.* (2002) ont étudié le modèle d'incorporation des isomères acides linoléïques conjugués dans le jaune d'œuf des poules relatif au régime de celles-ci ; l'analyse d'acides gras résultante a été accomplie par chromatographie gaz-liquide couplée au FID après méthylation catalysée par un acide, CCM et chromatographie à l'ion argent, qui permet la séparation des esters méthyliques de l'acide linoléïque conjugué.

### 2.3.2 Acide rétinolique, tocophérol et caroténoïdes

L'acide rétinolique et les autres dérivés rétinoliques constituent une classe importante de composés impliqués dans la régulation et le contrôle –entre autres- de la croissance et de la différenciation des cellules épithéliales et dans le mécanisme de la vision. Les dérivés rétinoliques ont de nombreuses indications thérapeutiques. Il convient de préciser que l'activité biologique des nombreux isomères *cis* et de l'isomère tout-*trans* varie, soulignant par là-même la nécessité de développer des méthodes de séparation et d'identification efficaces pour ces isomères.

Les dérivés rétinoliques sont instables, sensibles à l'action de la chaleur, de la lumière et de l'oxygène, et peuvent subir le phénomène d'isomérisation. La Pharmacopée Européenne utilise la CLHP à polarité de phases inversée pour la séparation des isomères *Z-E* de la trétinoïne et de l'isotrétinoïne. Bempong *et al.* (1995) employèrent une méthode CLHP à polarité de phases normale couplée à la spectrométrie de masse pour étudier les produits de dégradation des acides rétinoliques tout-*trans* et 13-*cis* après exposition à l'air et à la lumière, et trouvèrent 2 types de réaction différents : isomérisation *cis-trans* et autooxydation. Strohschein *et al.* (1997) ont confronté les colonnes greffées en C<sub>30</sub> aux C<sub>18</sub> en CLHP destinées à la séparation des isomères *cis/trans* de la trétinoïne. Bien que les colonnes greffées C<sub>30</sub> possèdent une meilleure capacité à séparer les isomères *cis/trans* des caroténoïdes que des colonnes greffées C<sub>18</sub>, une coélution des deux isomères n'a pas pu être évitée. Un autre type d'approche, basé sur une CLHP à polarité de phases inversée couplée à un détecteur à barrette de diodes, pour l'analyse du rétinol, du tocophérol et des dérivés caroténoïdes dans le plasma humain, a également été décrite (Lane *et al.*, 1997). L' $\alpha$ -carotène tout-*trans* et le  $\beta$ -carotène tout-*trans* ont été identifiés à l'aide de comparaisons des temps de rétention avec des étalons, alors que les isomères géométriques du  $\beta$ -carotène l'ont été grâce à des données spectrales

(UV-visible) générées par CLHP. Pour terminer, signalons que d'autres méthodes CLHP ont été pratiquées (Schmitz *et al.*, 1995), utilisant de l'hydroxyde de calcium comme phase stationnaire pour séparer les isomères du  $\beta$ -carotène.

## 2.4 *Analyse et discussion*

Nous allons tenter de fournir des explications relatives aux mécanismes mis en jeu dans certaines des techniques que nous venons d'exposer. L'information fournie dans cette section ne doit pas être considérée comme absolue, car certains mécanismes impliqués dans les phénomènes séparatifs n'ont pas encore été éclaircis.

### 2.4.1 Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

- *Méthodologies conventionnelles*

La CLHP à polarité de phases normale a été utilisée par exemple pour la séparation des isomères de la doxépine (Hrdina *et al.*, 1990), du flupentixol (Walter *et al.*, 1998) et des dérivés rétinoïdes (Bempong *et al.*, 1995); elle reste une méthode de choix dans la Pharmacopée Européenne (cf. tableau III).

Les CLHP à polarité de phases inversée avec ou sans appariement d'ions sont des techniques désormais très répandues, et ont été appliquées avec succès à de nombreux composés (clomifène, dosulépine, tamoxifène, clopenthixol, dérivés rétinoïdes, néoxanthine, etc.). Cependant, il convient de préciser que dans les deux cas, des études concernant le mécanisme précis impliqué dans la séparation des isomères font cruellement défaut. Si l'on se réfère à la théorie traditionnelle de la chromatographie de partage, des différences pendant la solvation des analytes dans la phase mobile pourraient expliquer le comportement des isomères.

*Tableau III. Monographies traitant de l'isomérisation (Z)-(E) dans la Pharmacopée Européenne, 5<sup>ème</sup> édition. La lettre « A » indique que l'isomère Z (ou l'isomère E, respectivement) est déterminé en même temps que les autres impuretés ; la lettre « I » indique que les isomères Z (ou E) le sont indépendamment des autres impuretés. PPI = polarité de phases inversée ; PPN = polarité de phases normale ; AI = appariement d'ions.*

DCI	Méthode employée pour la détermination des isomères (Z)-(E)	Limites (% m/m)
<i>Acide maléique</i>	CCM-PPN (I)	<i>E</i> : < 1,5
<i>Chlorprothixène (HCl)</i>	CLHP-PPI-AI (A)	<i>E</i> : < 2,0
<i>Cinnarizine</i>	CLHP-PPI (A)	<i>Z</i> : < 0,25
<i>Clomifène (citrate)</i>	CLHP-PPN (I)	<i>Z</i> : 30,0-50,0
<i>Dinoprost (trometamol)</i>	CLHP-PPI (A)	<i>E</i> : < 2,0
<i>Dinoprostone</i>	CLHP-PPI (A)	<i>E</i> : < 1,5
<i>Dosulépine (HCl)</i>	CLHP-PPI (A)	<i>Z</i> : < 5,0
<i>Doxépine (HCl)</i>	CLHP-PPI (I)	<i>Z</i> : 13,0-18,5
<i>Flupentixol (HCl)</i>	CLHP-PPN (I)	<i>Z</i> : 42,0-52,0
<i>Isotrétinoïne</i>	CLHP-PPI (A)	2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,6 <i>E</i> ,8 <i>E</i> : < 2,0 somme des autres < 0.5
<i>Morantel (hydrogénotartrate)</i> <i>usage vétérinaire</i>	CLHP-PPI (A)	<i>Z</i> : < 0,5
<i>Pyrantel (embonate)</i>	CLHP-PPN (A)	<i>Z</i> : < 0,5
<i>Sulindac</i>	CLHP-PPN (A)	<i>E</i> : < 0,5
<i>Tamoxifène (citrate)</i>	CLHP-PPI (A)	<i>E</i> : < 0,3
<i>Trétinoïne</i>	CLHP-PPI (A)	2 <i>Z</i> ,4 <i>E</i> ,6 <i>E</i> ,8 <i>E</i> : < 2,0 somme des autres < 0,5

<i>Ubidecarénone</i>	CLHP-PPN (I)	Z : < 0,5
<i>Zuclopenthixol (décanoate)</i>	CLHP-PPI (I)	E : < 1,25

- *Phase stationnaires greffées alkyl en C<sub>30</sub> (CLHP à polarité de phases inversée)*

Parmi les techniques faisant appel à la CLHP à polarité de phases inversée, les phases stationnaires greffées en C<sub>30</sub> représentent celles présentant la plus longue chaîne monomérique disponible à l'heure actuelle sur le marché. Ce type de colonne a été utilisé avec succès pour la séparation des isomères *cis-trans* des dérivés caroténoïdes. Ce comportement séparatif unique peut être expliqué par l'exceptionnelle sélectivité de forme présentée par ce type de phase. Des études RMN de l'état solide ont montré que cette sélectivité résulte des chaînes alkyl très ordonnées qui permettent par ce biais la reconnaissance de la forme moléculaire des dérivés caroténoïdes et des tocophérols (Pursch *et al.*, 1996).

- *Carbone graphite poreux et carbone pyrolytique poreux*

Le carbone graphite poreux (CGP) constitue une forme de graphite dont la surface présente des électrons délocalisés, capables d'interagir avec les électrons des solutés injectés (interaction  $\pi$ - $\pi$ ). Kiselev et son équipe ont été les pionniers de l'utilisation du CGP comme adsorbant en CLHP (Kiselev *et al.*, 1974). Knox *et al.* (1979) décrivent une nouvelle forme de carbone, appelée « porous glassy carbon » (carbone poreux vitreux), et réussirent à améliorer ses potentialités chromatographiques en 1986. Des études structurales ont indiqué que le carbone produit était graphitique, et non poreux, d'où son appellation CGP (Knox *et al.*, 1986 ; Kaur, 1986). Le CGP constitue un adsorbant extrêmement fort (Knox *et al.*, 1986), à cause de sa surface cristalline plane (Unger, 1983). Les supports CGP, avec un nombre minimal de sites actifs aux extrémités des feuillets de graphite, ont une surface énergétiquement homogène (Wan *et al.*, 1995 ; Petro *et al.*, 1998). Ce type de phase est souvent comparé aux silices greffées C<sub>18</sub> et décrit comme étant un adsorbant plus hydrophobe. Néanmoins, le mécanisme de rétention paraît être différent comparé aux silices greffées en CLHP à polarité de phases inversée (Hennion *et al.*, 1995), et le CGP présente également un comportement spécifique par

rapport à la force de solvant, cette dernière étant dépendante du soluté (Kaur, 1989 ; Hypersil SA, application notes). Colin et Guiochon (1982) ont démontré qu'il n'était pas possible de réaliser des comparaisons entre la force d'élution des solvants utilisés sur des phases « classiques » greffées C18 et celle sur des phases carbonées à cause de la nature spécifique du support chromatographique ; néanmoins, des molécules telles que le tétrachlorure de carbone ou le tétrahydrofurane –et ce quel que soit l'analyte considéré sur support CGP- peuvent être considérés comme des solvants forts sur adsorbant carboné (Colin et Guiochon, 1982). Si l'on s'intéresse par exemple aux isomères du LY 170680 (Eli Lilly & Co.), l'arrangement spatial différent des électrons  $\pi$  dans chacun des isomères pourrait être responsable d'une modification sensible de l'interaction entre ceux-ci et les électrons délocalisés en surface, et ainsi avoir pour conséquence la séparation des isomères (Fish, 1993). Les caractéristiques particulières du CGP comprennent, en complément d'une excellente sélectivité, une stabilité améliorée ainsi qu'un domaine d'utilisation couvrant toutes les valeurs de pH (0-14) sans aucune détérioration (Kaur, 1989).

En ce qui concerne les colonnes CPP, il est bien connu que leur surface en éponge présente un comportement particulier dû à la présence de sites polaires et non-polaires (présence de groupements chimiques aromatiques et de groupements contenant de l'oxygène à la surface). C'est pour cette raison que le comportement du CPP est quelquefois comparé à celui des phases stationnaires à polarité de phases normale et quelquefois à celui des phases stationnaires à polarité de phases inversée. De plus, tout comme c'est le cas pour les supports CGP, le CPP possède une aire spécifique très élevée (de l'ordre de 120 m<sup>2</sup>/g) ainsi qu'une surface plane et homogène du point de vue énergétique. Le mécanisme de séparation des isomères de l'irone (Petro *et al.*, 1998) a été brièvement expliqué en utilisant les différences de structure chimique existant entre les molécules (planéarité / surface de contact avec la phase stationnaire).

- *Phases stationnaires chirales*

La CLHP avec une phase stationnaire *chirale* (c'est-à-dire optiquement active) permet la séparation rapide des énantiomères, qui sont, comme déjà précisé précédemment, des images non-superposables l'une de l'autre dans un miroir d'un même composé.

Même si ce type de colonne n'est pas censé être employé dans ce contexte, il y a néanmoins eu un regain d'intérêt concernant leur possible utilisation dans la séparation des

isomères *cis-trans*. Par exemple, Pan *et al.* (2005) ont décrit la séparation et l'identification des isomères *cis* et *trans* du butène-1,4-diol et de la lafutidine (un antagoniste des récepteurs H<sub>2</sub> de l'histamine de seconde génération) sur 2 types de colonnes chirales ((S,S)-Whelk-O 1<sup>®</sup> / ChiraSpher<sup>®</sup>), alors que Schmid *et al.* (1990) ont discuté l'utilisation d'une phase stationnaire chirale greffée sur Nucleosil<sup>®</sup> afin de séparer certains stéréoisomères de la vitamine K<sub>1</sub>.

Parmi ces phases, nous allons faire un distinguo entre 2 types différents : phases stationnaires greffées calixarène ou resorcinarène et phases greffées cyclodextrine.

○ *Phases stationnaires greffées calixarène ou resorcinarène*

Dans le secteur des phases stationnaires greffées calixarène ou resorcinarène, Sokoliess *et al.* (2002) ont étudié différents mécanismes de séparation potentiels basés sur la taille des cavités d'une part (largeur, profondeur) et celle des analytes d'autre part ; la flexibilité des cavités a également été évoquée (fig. 2a, b et c).

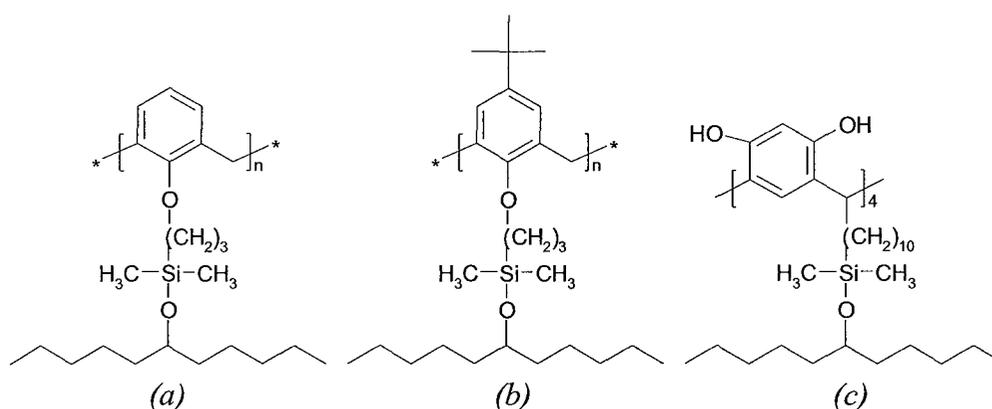


Figure 2 (a). Structure d'une phase silice greffée calix[n]arène (Caltrex<sup>®</sup> AI, II, III, Synaptec, Allemagne ; n=4, 6, 8 respectivement).

Figure 2 (b). Structure d'une phase silice greffée para-tert.-butylcalix[n]arène (Caltrex<sup>®</sup> BI, II, III, Synaptec, Allemagne ; n=4, 6, 8 respectivement).

Figure 2 (c). Structure d'une phase silice greffée resorcinarène (RES<sup>®</sup>, Synaptec, Allemagne).

Parmi les colonnes testées, la quantité de modificateur organique (méthanol, acétonitrile) était supposée dépendante de la substitution des calixarènes, amenant par conséquence de grandes différences en terme de sélectivité des phases stationnaires.

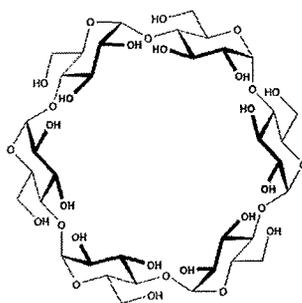
La phase stationnaire greffée résorcinarène a prouvé sa sélectivité à l'égard des isomères des dérivés du thioxanthène possédant un motif piperazine substitué hydroxyéthyl, comme par exemple pour le flupentixol et le clopenthixol ; ceci pourrait être dû à une interaction entre le groupement hydroxyle de l'analyte et les groupements phénols du résorcinarène. Sur la phase greffée calixarène aussi bien que sur la phase C<sub>18</sub>, où ce type d'interaction ne peut pas exister, des séparations de moins bonne qualité ont été obtenus.

Pour la séparation des isomères du chlorprothixène, des sélectivités similaires ont été observées sur la phase greffée calixarène et sur la phase C<sub>18</sub>, mais la résolution sur cette dernière était plus élevée. Un effet cinétique a été évoqué, mettant en exergue le fait que l'inclusion d'une certaine proportion des analytes dans les cavités des phases greffées calixarène nécessite un temps plus long que l'interaction entre les analytes et les chaînes hydrocarbonées de la phase C<sub>18</sub>.

Pour finir, les isomères de la doxépine ont été séparés au mieux sur des phases stationnaires contenant de petits motifs calixarènes sans groupements para-tertiobutyl ; ceci est supposé être imputable à une meilleure interaction et à une bonne adaptation entre les groupements aromatiques des analytes et ceux des calixarènes.

#### ○ *Phases stationnaires greffées cyclodextrine*

Depuis la découverte de la  $\beta$ -cyclodextrine par Villiers en 1891 (désignée autrefois par le terme « cellulosine »), il y a eu un nombre sans cesse croissant de publications relatives à ce sujet. Les cyclodextrines constituent une famille d'oligosaccharides cycliques -également présents de manière naturelle- en forme de tore ; elles sont composées respectivement de 6 ( $\alpha$ -), 7 ( $\beta$ -), 8 ( $\gamma$ -) ou 9 ( $\delta$ -cyclodextrine) unités D-glucoopyranose par molécule (liées en  $\alpha$ -1,4) (Schardinger, 1911 ; Szejtli, 1982) (cf. fig. 3).



*Figure 3. Structure chimique de l' $\alpha$ -cyclodextrine.*

Alors que l'extérieur de la molécule est hydrophile, sa cavité centrale relativement non-polaire (Street, 1987) peut inclure sélectivement des molécules de différentes espèces. Les cyclodextrines peuvent soit être greffées à la phase stationnaire ou être ajoutées à la phase mobile en tant que sélecteurs chiraux.

Les colonnes basées sur des dérivés de cyclodextrines constituent une classe très vaste de phases stationnaires chirales. Les hydroxyles peuvent être couverts avec des motifs chimiques tels que des pentyl ( $-C_5H_{11}$ ) ou des trifluoroacétyl ( $-COCF_3$ ), afin de diminuer la polarité des faces (Berthod *et al.*, 1992).

La séparation d'isomères géométriques est rendue possible par le fait que chacun d'entre eux possède une affinité différente pour la cavité à l'intérieur de la cyclodextrine (séparation d'isomères *cis-trans* de l' $\alpha$ -tocotrienol par CLHP utilisant une phase greffée  $\beta$ -cyclodextrine perméthylée (Drotleff et Ternes, 1998) ; séparation de la *E* et *Z* doxépine à l'aide d'une phase greffée  $\beta$ -cyclodextrine (Piperaki *et al.*, 1993) ; séparation des isomères géométriques du tamoxifène et de ses métabolites (Armstrong *et al.*, 1987)).

- *Autres types de phases stationnaires utilisées en CLHP*

Les autres types de phases stationnaires employées pour la séparation d'isomères *Z-E* incluent également l'utilisation de colonnes monolithiques. Les colonnes de silice monolithiques sont constituées d'une phase stationnaire continue et homogène présentant une surface spécifique ainsi qu'une perméabilité élevées (Nakanishi et Soga, 1991 ; Nakanishi et Soga, 1992). Il est possible de connecter plusieurs colonnes les unes à la suite des autres (Bamba *et al.*, 2004). La détermination du *cis*- et du *trans*-resvératrol présents dans le vin a par exemple été effectuée à l'aide de colonnes Chromolith<sup>®</sup>, en mode gradient, sans utiliser d'additifs dans la phase mobile (Vian *et al.*, 2005).

Les colonnes CLHP à base d'hydroxyde de calcium (Schmitz *et al.*, 1995) et la chromatographie ionique à l'argent (Yang *et al.*, 2002) ont également été utilisées. L'influence des interactions soufre-groupements aromatiques sur le comportement séparatif de phases stationnaires hybrides à polarité de phases inversée contenant des groupes thiol et / ou des sulfures insérés a été étudiée en utilisant divers tests pour colonnes chromatographiques (Horak et Lindner, 2004) ; différents types de groupements sulfures (S-RP) furent préparés par Horak et Lindner puis utilisés pour la séparation des isomères *cis-trans* du stilbène, de l'oxyde de stilbène et du resvératrol. Les différents temps de rétention et sélectivités de forme observés pendant cette étude ont été discutés en considérant la polarité (surfaces hydrophobes et interactions) et la disponibilité de sites aptes à constituer des liaisons hydrogène dans les composés analysés. En général, les propriétés séparatives de ces phases S-RP seraient à classer entre celles de phases « classiques » à polarité de phases inversée et celles de phases polyaromatiques polymériques.

Les colonnes avec phase stationnaire greffée par des groupements fluorés pourraient aussi permettre une meilleure reconnaissance des isomères géométriques et des épimères du fait d'une interaction considérée comme étant moins solvophile que sur colonnes C<sub>18</sub> classiques et d'une structure moléculaire rigide de la chaîne fluorocarbonée (Kamiusuki *et al.*, 1999).

#### 2.4.2 Chromatographie en phase supercritique ou subcritique

En chromatographie en phase supercritique, il a été démontré que la structure tridimensionnelle adoptée par la phase stationnaire dépend de l'adsorption de la phase mobile sur les greffons de la première. C'est pourquoi le fait de varier le pourcentage de modificateur organique influence la sélectivité concernant des composés ayant soit une structure linéaire, soit une structure courbée (cas de l'isomérisation *cis-trans* du  $\beta$ -carotène) (Lesellier *et al.*, 2003).

Récemment, plusieurs phases stationnaires monolithiques (incluant des colonnes type YMC<sup>®</sup> ou Chromolith<sup>®</sup>) ont été employées pour réaliser la séparation des isomères du  $\beta$ -carotène en chromatographie en phase subcritique (Nakanishi et Soga, 1991). D'autres essais, pour la plupart d'entre eux relatifs au  $\beta$ -carotène ou aux dérivés de la vitamine A, ont été menés à bien soit pendant la fin des années 1980, soit pendant les années 1990 dans le

domaine de la séparation d'isomères *cis-trans* (Schmitz *et al.*, 1989 ; Braumann *et al.*, 1997 ; Lesellier *et al.*, 1999).

### 2.4.3 Electrophorèse capillaire

En électrophorèse capillaire, de nombreux facteurs peuvent être modifiés pour influencer la séparation. Ces facteurs comprennent notamment la composition du tampon, la force ionique, le pH, la tension appliquée et les dimensions du capillaire. De plus, des additifs, tels des solvants organiques ou des surfactants peuvent être ajoutés au milieu pour jouer sur les paramètres de séparation.

- *Séparations en électrophorèse capillaire (milieux aqueux ou non-aqueux) utilisant des cyclodextrines ou d'autres agents comme sélecteurs*

Des techniques séparatives basées sur l'électrophorèse capillaire associée à l'emploi de dérivés de cyclodextrines ont déjà été décrites pour les isomères de la doxépine (Hu *et al.*, 2001) aussi bien que pour ceux du clomifène (Juvancz *et al.*, 1996 ; Bempong et Honigberg, 1996). Dans plusieurs cas, diverses cyclodextrines ont permis la séparation de différents types d'isomères en électrophorèse capillaire et en CMEC (Terabe *et al.*, 1993 ; Nishi et Terabe, 1995). L'analyse de la littérature disponible procure de nombreux exemples dans lesquels la valeur de la résolution montre un maximum différent en fonction de la cyclodextrine, et ce maximum ne met pas en jeu plus d'un seul type d'interaction (Wren et Rowe, 1992). Les dérivés de cyclodextrine possédant des substituants ioniques peuvent même séparer des composés neutres (Schmidt et Engelhardt, 1993). Des mélanges de divers types de cyclodextrines ont aussi été utilisés dans l'objectif d'atteindre de meilleures caractéristiques de séparation ; une cyclodextrine joue le rôle de sélecteur, alors que l'autre ne sert qu'en tant qu'agent promoteur de solubilisation ou qu'additif destiné à réduire le temps nécessaire dans certaines conditions (Terabe *et al.*, 1993 ; Lesellier *et al.*, 1999).

Juvancz *et al.* (1996) ont développé une séparation en électrophorèse capillaire pour les isomères du clomifène, utilisant pour ce faire divers dérivés de cyclodextrines comme additifs, et ont étudié l'effet de plusieurs paramètres (électrolytes de fond, pH et type et concentration des cyclodextrines) ; d'autres tentatives, utilisant le SDS au-dessus de sa

concentration micellaire critique, furent vouées à l'échec. Bempong et Honigberg (1996) ont étudié les facteurs affectant la résolution entre les deux isomères géométriques du clomifène ; l'électrophérogramme ne montrait aucune résolution en l'absence de cyclodextrine.

Sokoliess *et al.* (2003) décrivent l'usage de 6 calixarènes et résorcinarènes solubles comme additifs potentiels en électrophorèse capillaire en milieu non-aqueux (NACE), et discutèrent l'influence de plusieurs paramètres sur la sélectivité ; dans ce contexte, la concentration en calixarène, la valeur du pH apparent tout comme le type de modificateur organique se sont révélés être les facteurs les plus importants. Sokoliess *et al.* confirmèrent les principaux résultats obtenus par Hansen *et al.* (1997), à savoir qu'il est possible de séparer les isomères de structures thioxanthène en milieu acide sans employer d'additifs. Indépendamment de la nature du calixarène, tous les isomères *Z* migrèrent plus rapidement que les *E* ; Hansen et son équipe (Hansen *et al.*, 1997) proposaient déjà une explication au phénomène, en disant que ceci était dû à une forme plus « serrée » de la molécule, résultat d'interactions moléculaires entre des groupements de la chaîne latérale et des fonctions sur les systèmes cycliques et d'effets de solvation. Des interactions électrostatiques, tout comme les effets hydrophobes et la flexibilité de la partie supérieure de la cavité ont aussi été évoqués dans ce cadre.

- *Séparations en électrophorèse capillaire sans sélecteur*

La NACE en milieu acide procure des séparations efficaces et rapides dans le cas d'isomères *cis-trans* cationiques, tout particulièrement dans le cas de substances assez peu hydrosolubles, sans avoir besoin d'ajouter d'agent tensio-actif, des cyclodextrines ou d'autres agents complexants dans le milieu ; dans ce cas, la séparation est très dépendante du solvant utilisé. L'équipe de Hansen (Hansen *et al.*, 1997) a discuté l'influence du changement de pH apparent et de la nature et concentration de l'électrolyte utilisé sur la sélectivité de la séparation, considérant pour ce faire une grande quantité de milieux de séparation. Cet article apporte des preuves qui permettent de penser que la séparation ne dépend pas de différences de valeurs de  $pK_a$  des analytes, mais plutôt du volume apparent des conformères, qui est le résultat d'interactions intermoléculaires et de la solvation.

**Conclusions préliminaires.** L'isomérie *Z-E* reste une thématique importante, en particulier lorsque l'on s'intéresse à des composés d'intérêt pharmaceutique, car les isomères peuvent

avoir des propriétés biologiques, pharmacologiques ou toxicologiques très différentes. La séparation, puis la détection des isomères *Z* et *E*, qu'il s'agisse de composés issus de la chimie de synthèse ou d'origine naturelle, constituent en quelque sorte un défi pour l'analyste et peuvent faire appel à une grande variété de méthodes. Les techniques CLHP demeurent les plus employées, même si l'on note quelques études en chromatographie en phase supercritique ou en électrophorèse capillaire.

Parmi les colonnes destinées à la CLHP, il faut préciser que les colonnes CGP, bien que leur usage ne soit pas encore très répandu, présentent des caractéristiques très intéressantes, comme par exemple une stabilité prouvée sur toute la gamme de pH, une excellente sélectivité et une stabilité accrue. Les colonnes greffées avec des groupements fluorés présentent elles aussi un intérêt certain. Les phases stationnaires greffées en C<sub>30</sub> (CLHP à polarité de phases inversée) peuvent être employées avec succès pour la séparation des dérivés caroténoïdes, alors que les colonnes monolithiques, à cause de leur structure à la fois rigide et poreuse, permettent l'emploi de débits de solvant relativement élevés, un temps d'analyse réduit, un équilibrage rapide et la possibilité de connecter plusieurs colonnes entre elles. Des techniques telles que la CLHP sur support hydroxyde de calcium par exemple demeurent confidentielles.

En CLHP, tout comme en électrophorèse capillaire, l'utilisation de sélecteurs (dérivés cyclodextrines, calixarènes ou résorcinarènes), qui peuvent soit être greffés à la phase stationnaire –CLHP), soit être ajoutés à la phase mobile ou au milieu de séparation (CLHP / électrophorèse capillaire), constituent d'autres alternatives valables pour réaliser une séparation d'isomères *Z-E*.

## 3. Présentation des analytes

### 3.1 Généralités

La réaction de deshydratation d'un alcool constitue un point commun à de nombreuses synthèses conduisant à la formation de produits présentant une isomérisation Z/E. Cette réaction peut être qualifiée de stéréosélective, car elle conduit de façon préférentielle à l'un des produits stéréoisomères.

La valeur du rapport isomère Z / isomère E peut être expliquée par des paramètres tels que :

- l'encombrement stérique ou d'éventuels effets électroattracteurs des substituants,
- l'utilisation de catalyseurs particuliers, pouvant favoriser la formation de l'un ou l'autre des isomères,
- une plus grande stabilité d'un isomère par rapport à l'autre.

Les isomères Z et E des 3 molécules que nous allons considérer présentent, outre des nuances notables dans l'activité pharmacologique, des propriétés physico-chimiques différentes : point de fusion et maximum d'absorption en UV. Un autre exemple caractéristique de ce phénomène est le couple acide maléique / acide fumarique (fig. 4) ; l'acide maléique, ou acide (Z)-butènedioïque, présente un point de fusion de l'ordre de 138°C, alors que celui de l'isomère E correspondant, l'acide fumarique, se situe à 287°C.



*Figure 4. Structure chimique de l'acide maléique (à gauche) et de l'acide fumarique (à droite).*

### 3.2 Citrate de clomifène

#### 3.2.1 Caractéristiques organoleptiques

Le citrate de clomifène se présente sous la forme d'une poudre cristalline blanche ou jaune pâle, sans odeur, dont la couleur change progressivement à la lumière.

### 3.2.2 Caractéristiques physico-chimiques et pharmacologiques des 2 isomères

- Solubles dans le méthanol, peu solubles dans le chloroforme et l'eau et pratiquement insolubles dans l'alcool
- Formule chimique brute :  $C_{26}H_{28}ClNO - C_6H_8O_7$
- Masse moléculaire : 598,1 g/mol.
- Point de fusion :
  - isomère *E* (chlorhydrate) : 149,0-150,5°C
  - isomère *Z* (chlorhydrate) : 156,0-158,0°C
- Maximums d'absorption (UV, solution méthanolique) :
  - isomère *E* (chlorhydrate) : 239 et 297 nm
  - isomère *Z* (chlorhydrate) : 230 et 291 nm.
- La teneur en isomère *Z* est de 30,0 à 50,0 % selon Ph. Eur.

Les 2 isomères ont des effets estrogéniques et anti-estrogéniques mixtes, qui varient d'une espèce à l'autre. L'isomère *Z* (zuclomifène) possède une plus grande activité estrogénique que l'isomère *E* (enclomifène) (Goodman & Gilman's, 2006).

### 3.2.3 Spécialités commercialisées en France

Deux spécialités sont actuellement disponibles en France : CLOMID<sup>®</sup> 50 mg comprimés (laboratoires AVENTIS, AMM 3262338, RSS 65%) et PERGOTIME<sup>®</sup> 50 mg comprimés sécables (laboratoires SERONO France, AMM 3280098, RSS 65%).

### 3.2.4 Voies de synthèse potentielles et profil d'impuretés

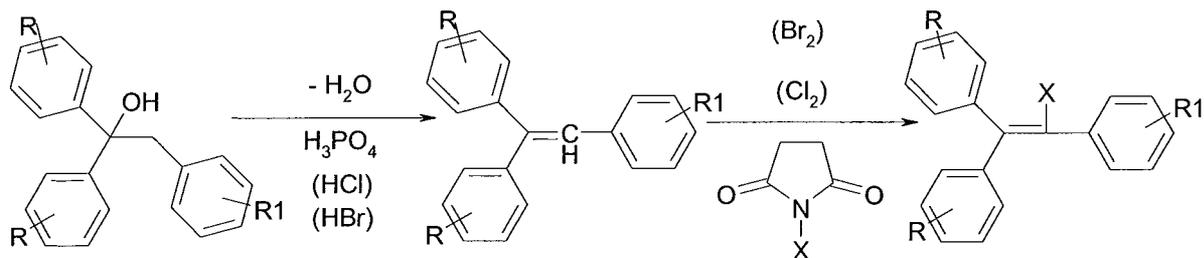
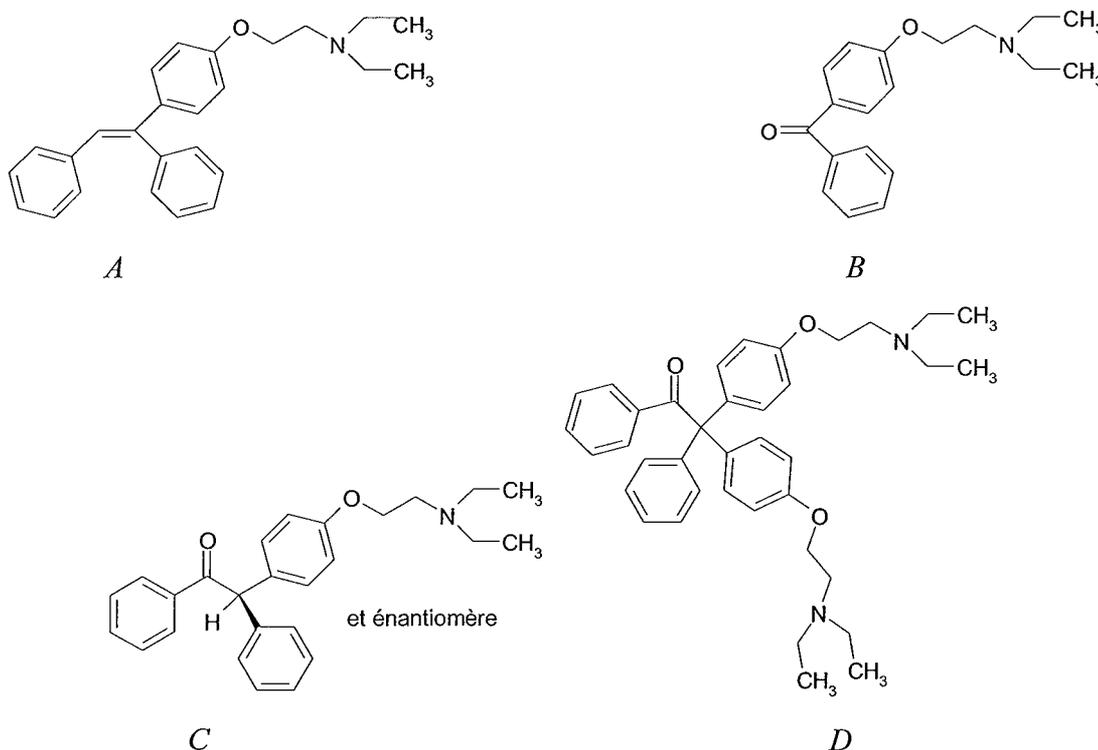
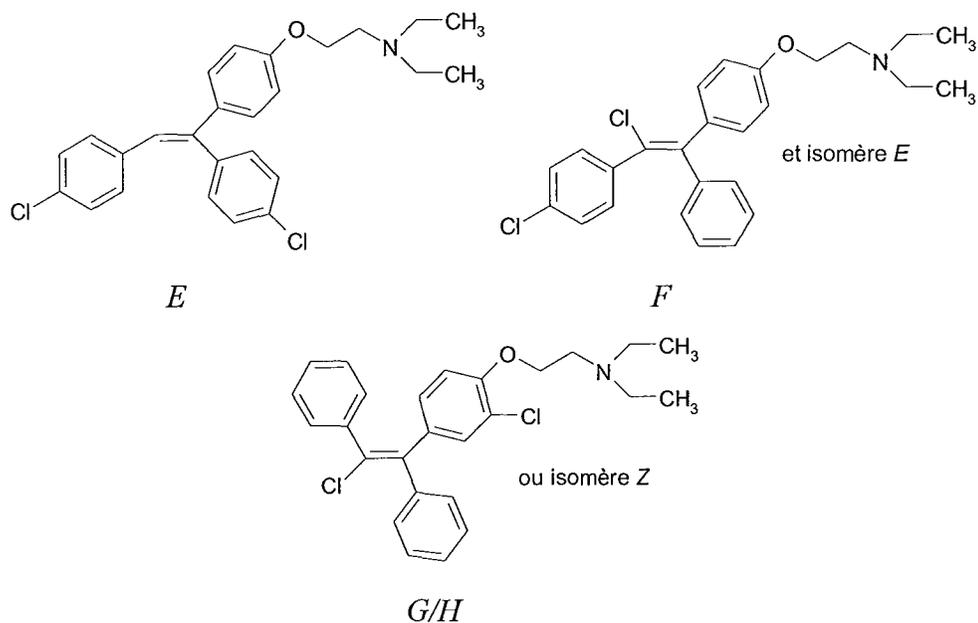


Figure 5. Schéma réactionnel illustrant une des voies de synthèse possible des dérivés du triphényléthylène (Merrel Company, US Patent 2,914,563).

La première étape de la synthèse est une réaction de déshydratation conduite en milieu acide ; on utilise généralement pour ce faire des acides minéraux tels que les acides phosphorique, chlorhydrique ou bromhydrique. On obtient alors un dérivé éthylénique, auquel on fait subir une réaction d'halogénéation, soit en présence de dibrome ou de dichlore, soit en présence de N-chloro- (X = Cl) ou de N-bromosuccinimide (X = Br).

Huit impuretés sont listées dans la Pharmacopée Européenne pour le citrate de clomifène.





*Figure 6. Formules chimiques semi-développées des impuretés du citrate de clomifène selon Pharmacopée Européenne.*

A : 2-[4-(1,2-diphényléthényle)phénoxy]-N,N-diéthyléthanamine

B : [4-[2-(diéthylamino)éthoxy]phényl]phénylméthanone

C : (2RS)-2-[4-[2-(diéthylamino)éthoxy]phényl]-1,2-diphényléthanone

D : 2,2-bis[4-[2-(diéthylamino)éthoxy]phényl]-1,2-diphényléthanone

E : 2-[4-[1,2-bis(4-chlorophényl)éthényle]phénoxy]-N,N-diéthyléthanamine

F : 2-[4-[2-chloro-2-(4-chlorophényl)-1-phényléthényle]phénoxy]-N,N-diéthyléthanamine

G/H : 2-[2-chloro-4-(2-chloro-1,2-diphényléthényle)phénoxy]-N,N-diéthyléthanamine (G : isomère à point de fusion supérieur ; H : isomère à point de fusion inférieur).

### 3.3 Chlorhydrate de doxépine

#### 3.3.1 Caractéristiques organoleptiques

Le chlorhydrate de doxépine est une poudre blanche ou sensiblement blanche

#### 3.3.2 Caractéristiques physico-chimiques et pharmacologiques des 2 isomères

- Solubles dans l'eau, l'alcool et le dichlorométhane.

- Formule chimique brute :  $C_{19}H_{21}NO - HCl$
- Masse moléculaire : 315,8 g/mol
- Point de fusion :
  - isomère *E* (chlorhydrate) : 192,0-193,0°C
  - isomère *Z* (chlorhydrate) : 209,0-210,5°C
- Le pourcentage maximal d'isomère *Z* est compris entre 13,0 et 18,5 % selon Ph. Eur.

Quels que soient les modèles animaux de dépression considérés, l'isomère *Z* possède une plus grande activité pharmacologique que l'isomère *E* (Goodman & Gilman's, 2006).

### 3.3.3 Spécialités commercialisées en France

Il n'existe à l'heure actuelle qu'une seule spécialité contenant du chlorhydrate de doxépine, à savoir QUITAXON<sup>®</sup> (Laboratoires PHARMA DEVELOPPEMENT), disponible en comprimés sécables dosés à 10 (AMM 3332926, RSS 65%) ou 50 mg (AMM 3332932, RSS 65%), en solution buvable à 10 mg/mL (AMM 3125972 et 3190165, respectivement RSS 65% et usage hospitalier) et en solution injectable 25 mg/2 mL (AMM 3126026, RSS 65%).

### 3.3.4 Voies de synthèse potentielles et profil d'impuretés

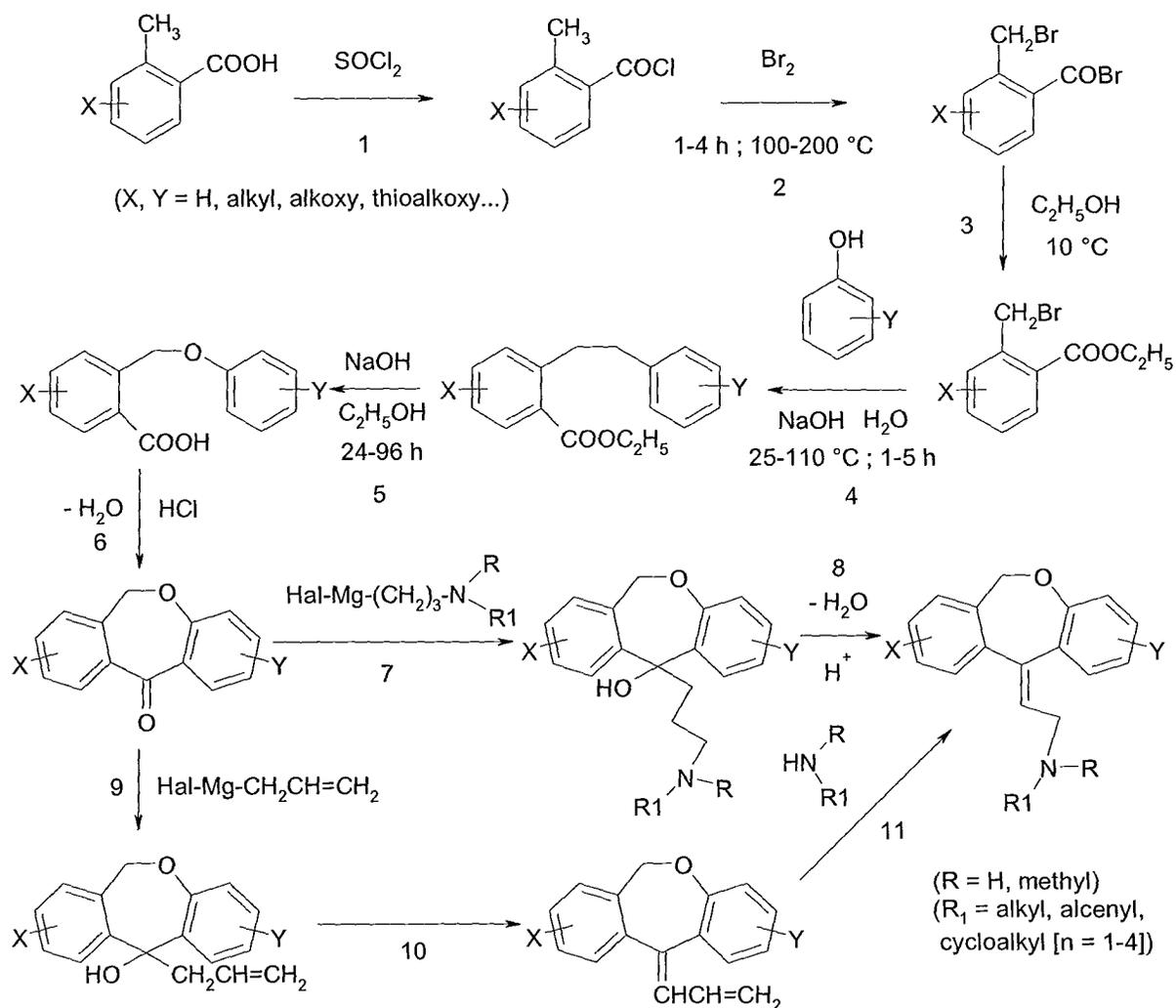
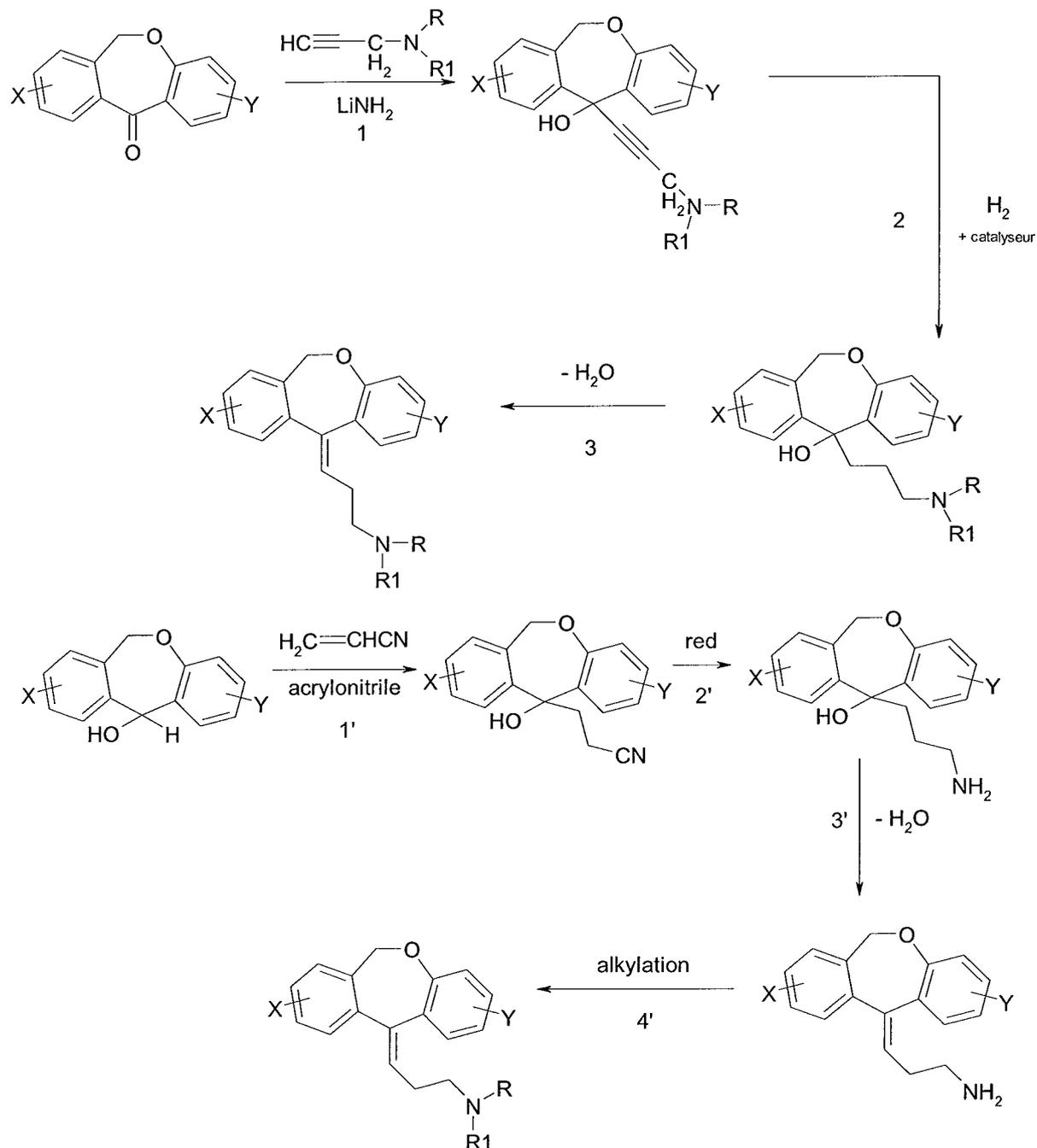


Figure 7. Schéma réactionnel illustrant deux voies de synthèse potentielles de dérivés dibenzoxépines (Pfizer & Co., Inc., US Patent 3,420,851).

Un dérivé de l'acide ortho-toluique est chloré à l'aide de chlorure de thionyle (étape 1), puis soumis à l'action du dibrome en proportions équimolaires ou en léger excès (étape 2). Le composé obtenu est ensuite ajouté à de l'éthanol (étape 3), puis à un dérivé phénolique (étape 4). L'ester est ensuite hydrolysé en milieu basique (étape 5), car des conditions acides pourraient provoquer un clivage de la liaison benzylether précédemment formée. Le dérivé de l'acide ortho-phenoxy-méthylbenzoïque est ensuite cyclisé (déshydratation : acide fluorhydrique, oxyde phosphoreux, anhydride de l'acide trifluoroacétique ; étape 6). La conversion des dérivés 6,11-dihydrodibenz[b,e]oxépin-11-ones en composés d'intérêt

pharmaceutique peut être accomplie par l'utilisation d'un réactif de Grignard (étape 7), puis déshydratation en milieu acide (étape 8) ; une autre possibilité est illustrée par les étapes 9-11 : réaction avec un réactif type allylmagnésium (Grignard), puis déshydratation et amination de la double liaison éthylénique (figure 8).



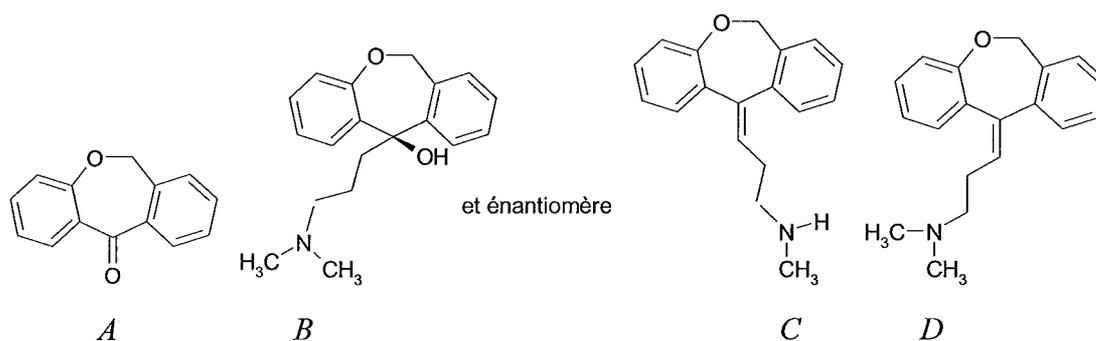
*Figure 8. Autres approches envisageables en chimie de synthèse des dibenzoxépines (Pfizer & Co., Inc., US Patent 3,420,851).*

Le schéma présenté en figure 8 présente d'autres approches envisageables pour synthétiser les dérivés dibenzoxépine. Une première alternative est la réaction du dérivé

oxépin-11-one avec de la dialkylaminopropyne en présence d'un agent de condensation (amide de lithium par exemple ; étape 1), suivie par une hydrogénation catalytique de la liaison acétylénique (étape 2) et une déshydratation de l'intermédiaire réactionnel obtenu. Une autre possibilité consiste en la réaction du dérivé oxépin-11-ol avec l'acrylonitrile (étape 1'), suivie d'une réduction de la fonction nitrile, de la déshydratation et de l'alkylation des dérivés intermédiaires (respectivement étapes 2'-4').

Le brevet US 3,438,981 (dérivés dibenzooxépine et dibenzothiépine, Boehringer & Söhne GmbH) présente diverses options similaires de synthèse de dérivés voisins.

Quatre impuretés sont listées dans la Pharmacopée Européenne pour le chlorhydrate de doxépine.



*Figure 9. Formules chimiques semi-développées des impuretés du chlorhydrate de doxépine selon Pharmacopée Européenne.*

A : dibenzo[b,e]oxépin-11(6H)-one

B : (11RS)-11-[3-(diméthylamino)propyl]-6,11-dihydrodibenzo[b,e]oxépin-11-ol

C : (E)-3-(dibenzo[b,e]oxépin-11(6H)-ylidène)-N-méthylpropan-1-amine

D : (Z)-3-(dibenzo[b,e]oxépin-11(6H)-ylidène)-N,N-diméthylpropan-1-amine (isomère Z)

### 3.4 Dichlorhydrate de flupentixol

#### 3.4.1 Caractéristiques organoleptiques

Le dichlorhydrate de flupentixol est une poudre blanche ou sensiblement blanche, très soluble dans l'eau.

### 3.4.2 Caractéristiques physico-chimiques et pharmacologiques des 2 isomères

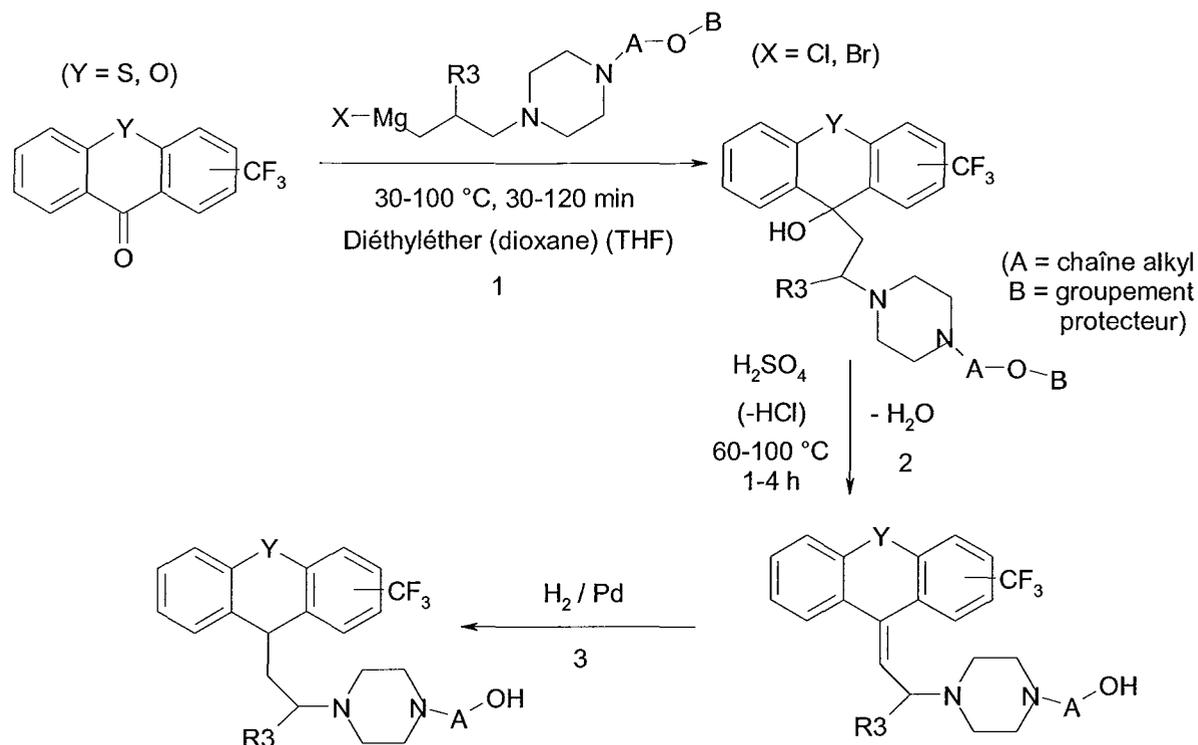
- Formule chimique brute :  $C_{23}H_{25}F_3N_2OS - 2 HCl$
- Masse moléculaire : 507,4 g/mol
- Le pourcentage d'isomère *Z* est compris entre 42,0 et 52,0 % selon Ph. Eur.

L'activité pharmacologique de l'isomère *Z* du flupentixol est supérieure à celle de l'isomère *E* (Goodman & Gilman's, 2006).

### 3.4.3 Spécialités commercialisées en France

Les laboratoires LUNDBECK SA assurent la commercialisation de la seule spécialité ayant pour principe actif du flupentixol, le FLUANXOL<sup>®</sup> ; ce dernier est disponible en solution buvable à 4% (AMM 316552, RSS 65%, dichlorhydrate de flupentixol), en solution injectable LP-IM à 20 mg/mL (AMM 3180965, RSS 65%, décanoate de flupentixol) et 100 mg/mL (AMM 3263496, RSS 65%, décanoate de flupentixol).

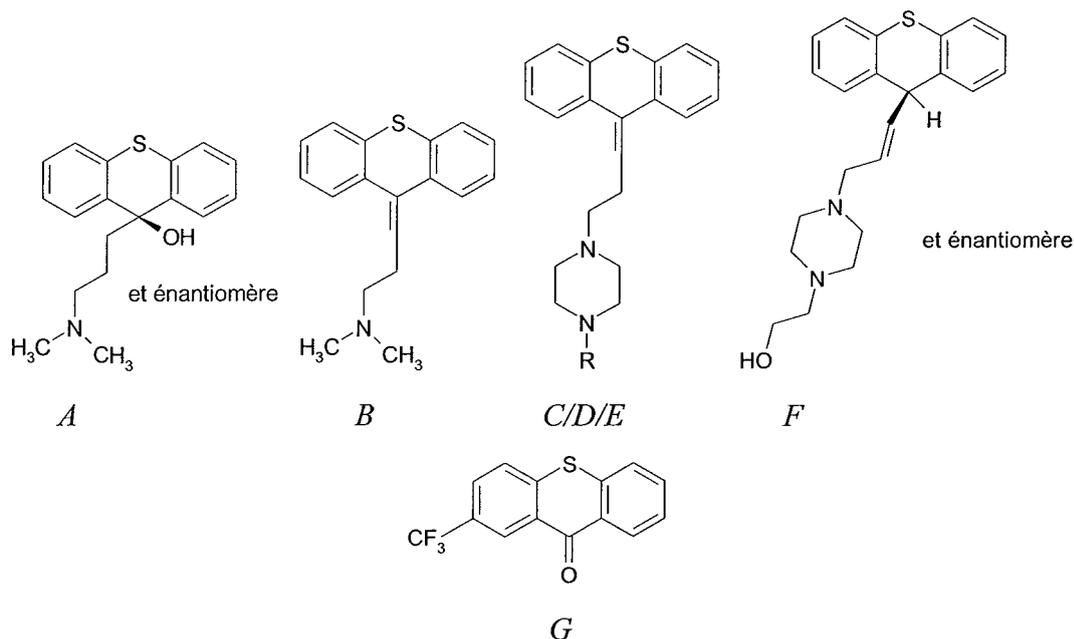
### 3.4.4 Voies de synthèse potentielles et profil d'impuretés



*Figure 10. Schéma réactionnel illustrant la synthèse de dérivés hydroxyalkylène-pipérazine (Smith Kline & French Laboratories, US Patent 3,282,930).*

Le composé de départ est un dérivé trifluorométhylxanthénone ou trifluorométhylthioxanthénone. Celui-ci est additionné à un organomagnésien benzyloxyalkylène-pipérazinylalkyl (1), puis l'intermédiaire réactionnel est déshydraté et déprotégé (action d'un acide minéral, étape 2). La dernière étape (3) consiste en une hydrogénation catalytique (sur Pd par exemple).

Sept impuretés sont listées dans la Pharmacopée Européenne pour le dichlorhydrate de flupentixol.



*Figure 11. Formules chimiques semi-développées des impuretés du dichlorhydrate de flupentixol selon Pharmacopée Européenne.*

A : (9RS)-9-[3-(diméthylamino)propyl]-2-(trifluorométhyl)-9H-thioxanthène-9-ol

B : N,N-diméthyl-3-[(*EZ*)-2-(trifluorométhyl)-9H-thioxanthène-9-ylidène]propan-1-amine

C: R = H : 1-[3-[(*EZ*)-2-(trifluorométhyl)-9H-thioxanthène-9-ylidène]propyl]piperazine

D : R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH : 2-[2-[4-[3-[(*EZ*)-2-(trifluorométhyl)-9H-thioxanthène-9-ylidène]propyl]piperazin-1-yl]éthoxy]éthanol

E : R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub> : acétate de 2-[4-[3-[(*EZ*)-2-(trifluorométhyl)-9H-thioxanthène-9-ylidène]propyl]piperazin-1-yl]éthyle

F : 2-[4-[(*EZ*)-3-[(9RS)-2-(trifluorométhyl)-9H-thioxanthène-9-yl]prop-2-ènyle]piperazin-1-yl]éthanol

G : 2-(trifluorométhyl)-9H-thioxanthène-9-one

## 4. Le carbone graphite poreux (CGP) et son emploi en CLHP

### 4.1 Introduction – Historique du CGP et mode de fabrication

#### 4.1.1 Historique du développement des phases stationnaires CGP

Depuis maintenant quelques dizaines d'années, l'avènement de la CLHP et les désavantages présentés par les silices greffées (instabilité aux pH extrêmes, présence de groupements silanol libres,...) ont mis en exergue l'intérêt que pourrait susciter l'apparition de nouvelles phases stationnaires. Le carbone présentait dans cette optique des caractéristiques particulières et depuis les travaux réalisés par Kiselev (Kiselev et Yashin, 1966), Liberti et Ciccioli (Ciccioli *et al.*, 1981) en CPG, le carbone graphite noir a été utilisé en chromatographie liquide. Malgré les nombreux perfectionnements apportés à ce matériau (Colin *et al.*, 1976), les performances chromatographiques obtenues étaient encore trop faibles.

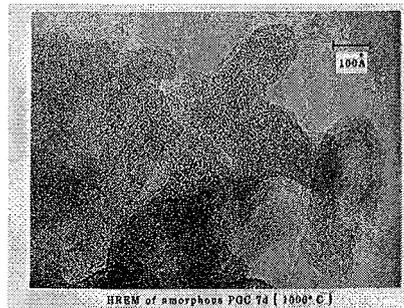
Cependant, une nouvelle forme de carbone, appelée « carbone poreux vitreux » a été décrite par Knox et Gilbert en 1979. Après quelques améliorations, le carbone obtenu démontre une très forte résistance mécanique ainsi que de très bonnes aptitudes chromatographiques. L'étude structurale de ce nouveau matériau montre qu'il s'agit d'un carbone graphite et non vitreux, d'où son appellation « carbone graphite 2D ». Ce nouveau CGP possède certaines caractéristiques similaires aux phases stationnaires C<sub>18</sub> mais au fil des années, de nombreuses différences entre les silices greffées C<sub>18</sub> et le CGP ont été mises en évidence.

Remarquons que les colonnes CGP actuellement disponibles sur le marché sont exclusivement de la marque Hypercarb<sup>®</sup> (brevet déposé par Hypersil en 1986, commercialisation de l'Hypercarb<sup>®</sup> 7 µm en 1988).

#### 4.1.2 Mode de fabrication (selon procédé Hypercarb<sup>®</sup>, Thermo Electron Corporation)

La fabrication peut se décomposer en 4 étapes principales :

- *Polymérisation* : la silice est imprégnée de polymère phénol-hexamine à 80-150 °C.
- *Carbonisation* : pyrolyse du polymère en atmosphère inerte à 1000 °C (fig. 12).



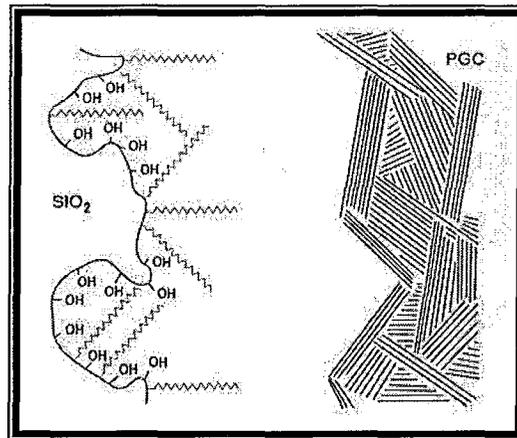
*Figure 12. Aspect du support après l'étape de carbonisation (vue au microscope).*

- *Dissolution de la silice* : utilisation de solutions aqueuses chaudes d'hydroxyde de potassium.
- *Graphitisation* : traitement dans un four à atmosphère inerte à haute température (2340 °C). Réarrangement structurel et fermeture des micropores.

## 4.2 Structure du CGP

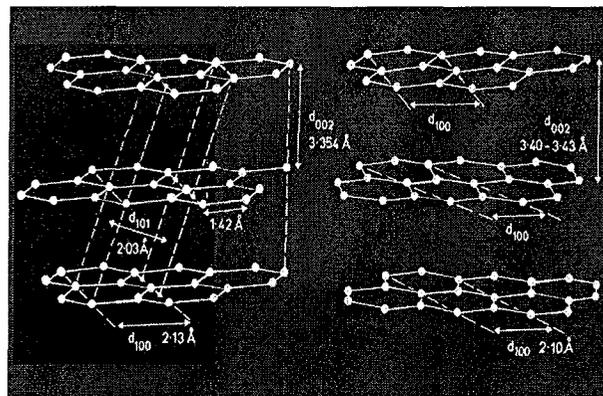
Le CGP est constitué de particules sphériques, poreuses à 75%, composées de couches de groupements hexagonaux d'atomes de carbone hybridés  $sp^2$ . Les couches de graphite sont planes et l'espacement entre les différents atomes de carbone à l'intérieur des couches est très proche de celui qui existe dans les molécules aromatiques polycycliques. On peut donc assimiler les couches de graphite à des molécules aromatiques géantes entièrement composées d'atomes de carbone.

A l'intérieur des différentes couches, la valence des atomes de carbone est satisfaite, de sorte que, contrairement au cas de la silice, il n'y a pas de groupements fonctionnels présents à la surface (Knox et Ross, 1997).

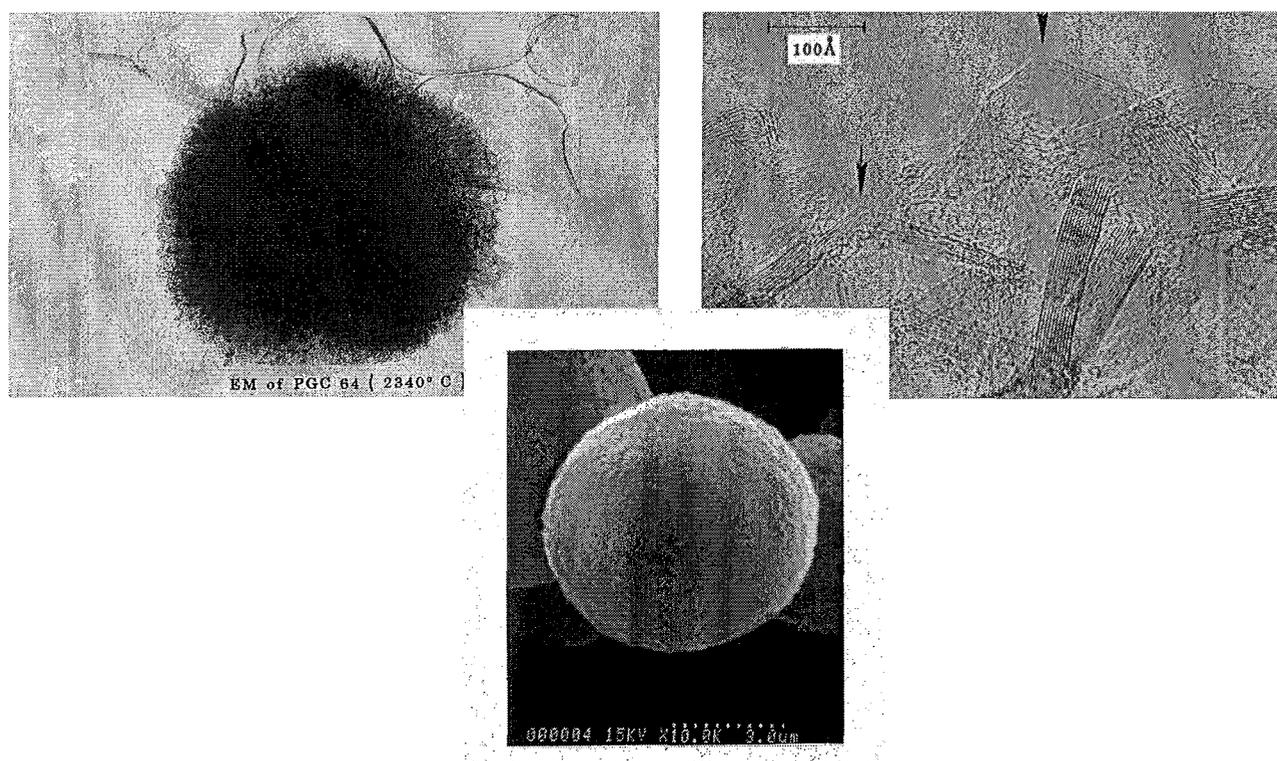


*Figure 13. Structure schématique comparée d'une phase stationnaire greffée C<sub>18</sub> et d'une phase stationnaire CGP type Hypercarb<sup>®</sup>.*

La structure tridimensionnelle du CGP est constituée de morceaux de graphite mélangés, entrecroisés en une architecture tridimensionnelle complexe. Les différentes couches sont parallèles mais non uniformément orientées les unes face aux autres (Knox et Ross, 1997).



*Figure 14. Orientation des couches d'atomes de carbone dans le CGP. Les dimensions sont données en Å (1Å équivaut à  $10^{-10}$  m).*



*Figure 15. Aspect du CGP vu en microscopie électronique.*

Les propriétés physiques du CGP sont les suivantes (Knox et Ross, 1997 ; Ross, 2000) :

- Surface spécifique élevée : 120 m<sup>2</sup>/g
- Diamètre de pore moyen : 250 Å
- Volume de pore : 0,7 cm<sup>3</sup>/g
- Diamètre moyen des particules : 7 μm
- Porosité : 75%
- Résistance mécanique : pressions supérieures à 400 bars.

### 4.3 Mécanismes de rétention sur support CGP

Le graphite est un adsorbant non sélectif qui ne montre pas de préférence pour quelque groupement fonctionnel que ce soit. Il est souvent comparé à la silice greffée C<sub>18</sub> mais décrit comme un adsorbant beaucoup plus hydrophobe (Knox *et al.*, 1986). Les composés non polaires sont séparés d'une manière similaire mais avec une résolution et une sélectivité accrues sur CGP (Kriz *et al.*, 1994). Cependant, en ce qui concerne les composés polaires, des

résultats contraires à ceux obtenus sur silice greffée ont été observés (Hennion *et al.*, 1995). En effet, une rétention croissante pour des molécules à polarité de plus en plus forte a mis en évidence un mécanisme spécifique de rétention pour le graphite appelé *ERPG* (Knox et Ross, 1997 ; Ross, 2000). Certains auteurs expliquent ce phénomène par l'angle spécifique formé entre la surface plane de graphite et la molécule adsorbée (Wan *et al.*, 1995). Cet angle serait fonction de la polarité du ou des groupements hydrophobes de la molécule de soluté.

Au vu de ces résultats, il apparaît que le mécanisme de rétention sur CGP est différent de celui admis pour la CLHP à polarité de phases inversée (Viron *et al.*, 1999). Aucune des théories existantes ne suffit à expliquer ces différences.

La théorie de rétention hydrophobe d'Horvath (Horvath *et al.*, 1976), par exemple, considère que les interactions soluté-solvant sont prédominantes dans le mécanisme de rétention alors que les interactions soluté-phase stationnaire ne mettent en jeu que des forces dispersives. Cette théorie ne peut s'appliquer au cas du CGP étant donné que des forces autres que dispersives jouent un rôle non négligeable dans le phénomène de rétention ERPG.

La théorie développée par Snyder (Karger *et al.*, 1973) ne peut elle aussi s'appliquer au CGP car elle est basée sur la capacité des solutés à déplacer les molécules de solvant à la surface de l'adsorbant par interaction de type liaison hydrogène entre l'analyte et la surface. Or, de telles interactions ne peuvent exister sur le graphite.

La rétention sur CGP résulte donc d'un équilibre d'interactions intermoléculaires non spécifiques, comprenant les interactions soluté-solvant et les interactions soluté-surface de graphite, que nous allons décrire plus en détail.

#### 4.3.1 Interactions soluté-solvant

La rétention est corrélée à l'énergie nécessaire pour créer une cavité permettant l'insertion du soluté dans la phase mobile (solvatation). Les facteurs importants sont la surface de contact entre le soluté et la phase stationnaire (théorie solvophobe) ou les volumes de la cavité créée dans la phase mobile et dans la phase stationnaire (théorie de partage).

Les interactions soluté-solvant comprennent :

- des forces intermoléculaires de dispersion, d'induction et d'orientation,
- des effets hydrophobes tendant à rejeter les solutés hors de la phase mobile.

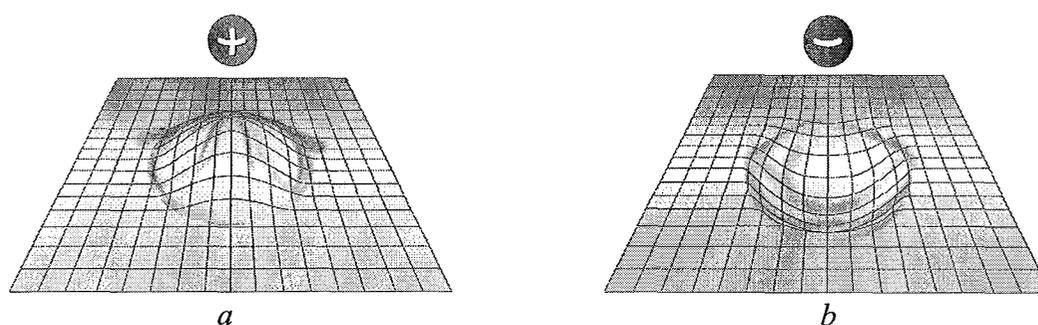
Les forces de dispersion (de l'ordre de 5 à 20 kJ/mol) s'établissent entre des molécules dont la configuration électrique présente, à un instant donné, une asymétrie (forces dites de

Van der Waals et de London). Le dipôle instantané d'une molécule polarise les électrons des molécules voisines. Les interactions par liaisons hydrogène et de transfert de charge sont des forces d'induction. Les liaisons hydrogène (25 à 40 kJ/mol) apparaissent entre un donneur et un accepteur de protons. La force de l'interaction dépend de l'acidité et de la basicité relative des molécules impliquées. Les interactions diélectriques proviennent d'attractions électrostatiques (25 à 40 kJ/mol) entre les molécules de soluté et un solvant de constante diélectrique donnée.

Les interactions hydrophobes résultent quant à elles des forces répulsives entre un solvant polaire et un soluté non polaire.

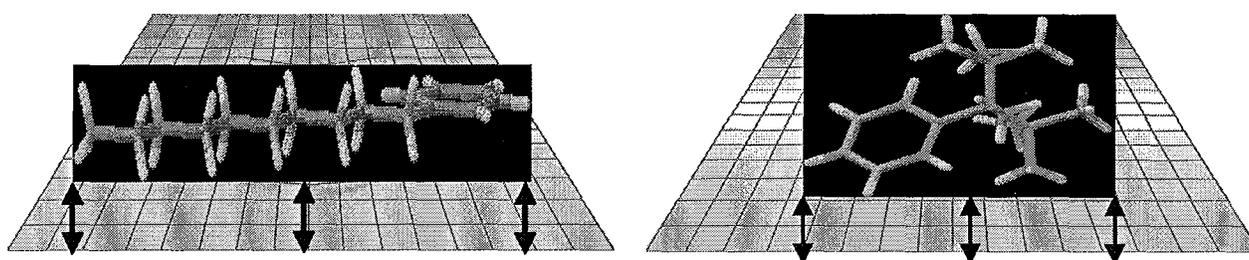
#### 4.3.2 Interactions soluté-surface de graphite

La surface plane de graphite possède de très fortes capacités d'adsorption. L'interaction des groupes fonctionnels polaires ou polarisables du soluté avec cette surface carbonée met en jeu des forces de dispersion du type forces de London entre le graphite et le soluté contrebalancées par le même type de forces entre le graphite et le solvant qui s'ajoutent aux forces solvophobes précédemment décrites (Hennion *et al.*, 1995). Elles sont dues à la délocalisation des électrons  $\pi$  au sein des larges bandes de graphite et à la haute polarisabilité du carbone (Bassler *et al.*, 1989). Les facteurs les plus importants pour la rétention sont donc les aspects structuraux qui reflètent la capacité des solutés à participer aux interactions intermoléculaires de type donneur-accepteur de doublets d'électrons (transfert de charge ; Mercier *et al.*, 1999) et de type dipôle-dipôle induits (Kaliszan *et al.*, 1990) (fig. 16).



*Figure 16. Les électrons délocalisés à la surface du graphite sont attirés par la charge positive s'approchant de celle-ci (gauche), alors qu'ils sont repoussés par une charge négative dans les mêmes conditions (droite).*

La planéité de la surface de graphite implique une orientation spécifique des molécules adsorbées (Tanaka *et al.*, 1991 ; Wan *et al.*, 1995 ;). Les interactions de dispersion étant de faible amplitude (proportionnelles à  $1/r^6$ ,  $r$  étant la distance interatomique), les molécules pouvant s'adapter parfaitement à la surface sont plus retenues : la force de l'interaction est déterminée par la surface de contact soluté-graphite (fig. 17). En règle générale, les molécules possédant une configuration plane et flexible sont plus retenues que les molécules rigides présentant la même masse moléculaire.



*Figure 17. Représentation schématique des interactions soluté-surface de graphite dans le cas de solutés plans (gauche) et non-plans (droite).*

La rétention est en outre d'autant plus forte que les groupements polaires des solutés sont proches de la surface de graphite. Cet effet de rétention polaire est spécifique au CGP (Kaur, 1989 ; Ross, 2000). Il semble être lié à la répartition des charges au sein des molécules de soluté et met en jeu la polarisation instantanée du nuage électronique du graphite (forces de London).

#### 4.4 Force relative des solvants sur CGP

Colin et Guiochon (1982) ont démontré qu'il n'était pas possible de comparer les forces éluotropiques des solvants utilisés sur support  $C_{18}$  avec celles obtenues en utilisant une phase stationnaire CGP. En chromatographie liquid-solide conventionnelle, avec des adsorbants polaires tels que les gels de silice ou d'alumine, plus le solvant utilisé est polaire, plus sa force éluotropique est élevée. Avec le CGP, adsorbant à caractère non-polaire pour lequel les interactions soluté-solvant jouent un rôle majeur, les solvants polaires ont des forces

éluotropiques faibles (Kaur, 1989). En conséquence, une classification empirique des solvants n'est pas adaptée car la force du solvant est fonction de la molécule éluee (Kaur, 1989 ; Knox et Ross, 1997 ; Simpson, 2000).

Il est cependant possible de faire un classement selon le groupement fonctionnel du soluté injecté (fig. 18). L'eau est bien sûr le solvant le plus faible. Pour un adsorbant type CGP, le méthanol et l'acétonitrile sont des solvants faibles, alors que des molécules plus grosses et plus facilement polarisables, telles que le tétrachlorure de carbone ou le tétrahydrofur constituent des solvants forts (Kaur, 1989 ; Colin *et al.*, 1976 ; Guenu et Hennion, 1996).

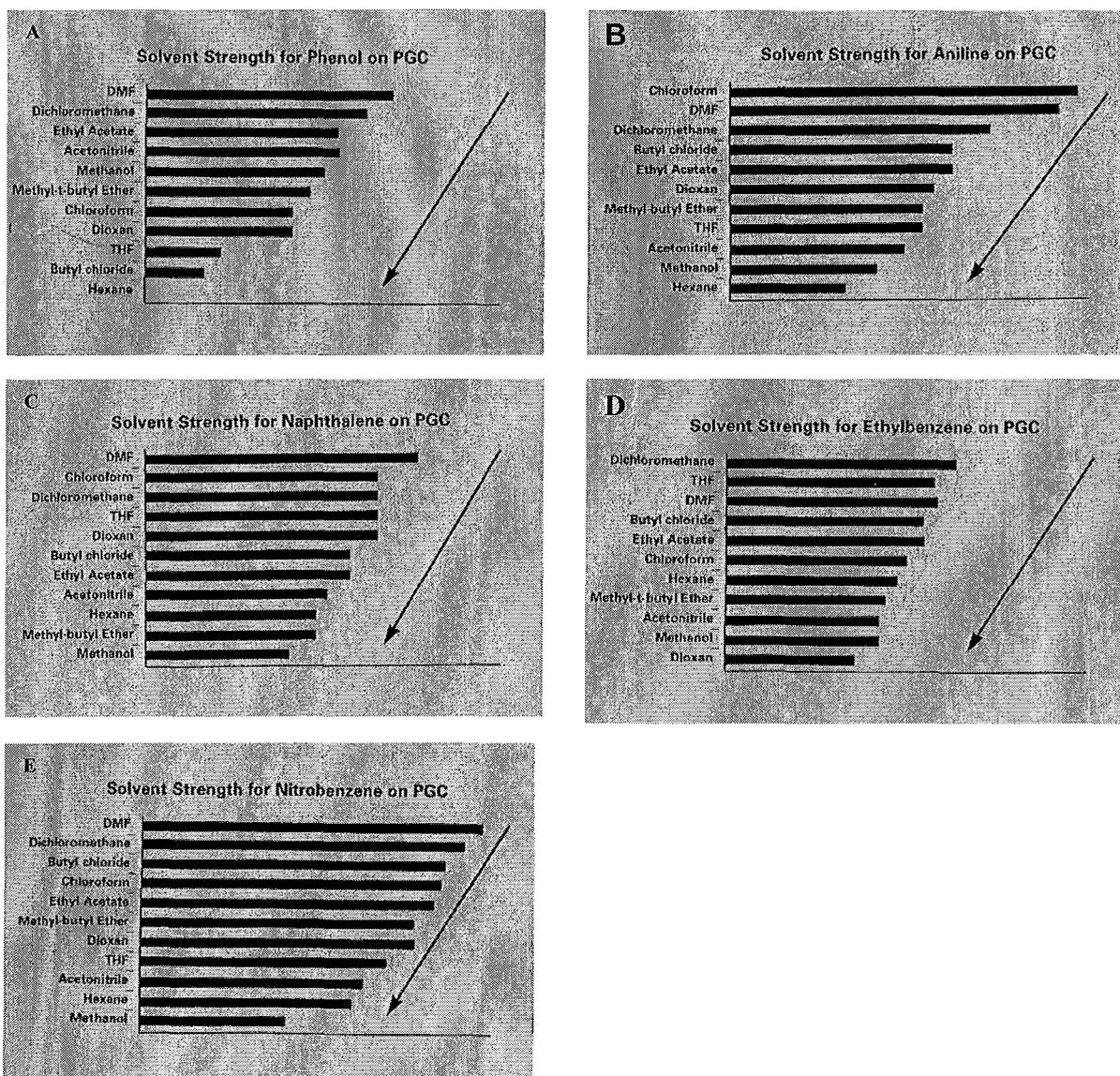


Figure 18. Classification de différents solvants selon leur force d'élution avec une phase stationnaire CGP pour le phénol (A), l'aniline (B), le naphthalène (C), l'éthylbenzène (D) et le nitrobenzène (E).

Au cours du développement de méthodes sur support CGP, et dans un souci de simplification, il est possible d'admettre que la force d'éluion des solvants augmente comme suit :

*Méthanol*  $\leq$  *acétonitrile* < *acétonitrile* : *2-propanol* (50/50, v/v) < *acétonitrile* : *2-propanol* (25/75, v/v) < *tétrahydrofurane* = *dichlorométhane*

Bien que le méthanol et l'acétonitrile possèdent une force d'éluion similaire dans la grande majorité des cas, ils peuvent permettre d'obtenir une sélectivité différente. Par exemple, si l'on considère l'ordre d'éluion d'un mélange phénol (1) / résorcinol (2) / phloroglucinol (3) :

- Si la phase mobile est constituée d'eau et de méthanol (50/50, v/v), l'ordre d'éluion sera (1)-(2)-(3) : l'analyte le plus polaire sera le plus retenu.
- Si la phase mobile est constituée d'eau et d'acétonitrile (50/50, v/v), l'ordre d'éluion devient (3)-(2)-(1), comme en CLHP à polarité de phases inversée classique.

Ceci peut être attribué à un moment dipolaire plus fort de l'acétonitrile, qui contribue à créer une interaction de dispersion analyte – phase mobile plus forte que ne le fait le méthanol. Le même phénomène peut être observé avec le dioxane, qui, bien qu'ayant une force d'éluion comparable à l'acétonitrile, présente néanmoins une sélectivité différente.

Pour les composés très hydrophobes (c'est-à-dire riches en combinaisons hydrocarbonées) analysés en milieu non-aqueux, qui sont retenus principalement par des interactions type dispersion, il a été démontré que le toluène était le solvant le plus fort, suivi du dichlorométhane et du tétrahydrofurane.

Remarquons enfin que comme pour d'autres types de supports utilisés en CLHP, il est possible d'employer des modificateurs électroniques, tels l'acide trifluoroacétique ou la diéthylamine. Selon le type et la concentration de ces composés au sein de la phase mobile, il est possible d'affecter considérablement les paramètres de rétention, la sélectivité ainsi que la symétrie des pics obtenus :

- l'acide trifluoroacétique agit par un mécanisme de compétition qui réduit la rétention polaire ; il permet ainsi d'éviter une trop forte rétention des analytes acides. Par contre, dans le cas de composés basiques, il amène une augmentation modérée de la

rétention, ceci étant vraisemblablement dû à la formation d'une espèce pseudo-moléculaire (paire d'ions analyte – modificateur électronique).

- la diéthylamine permet quant à elle de réduire la rétention de composés basiques sur le CGP, également par un phénomène de compétition.
- La 1-méthylpipéridine constitue une autre alternative intéressante pour les analytes basiques.

#### 4.5 Applications du CGP

Les applications analytiques industrielles du CGP sont nombreuses et variées. Il est principalement utilisé là où la CLHP utilisant des phases stationnaires classiques est prise en défaut : pH extrêmes, phases mobiles « agressives », séparation de solutés polaires ou de structures proches.

A titre d'exemple, parmi les dernières études publiées, on peut remarquer que le CGP a été utilisé pour :

- Analyse de dérivés glucocorticoïdes (Van den Hauwe *et al.*, 2001 et 2002) et de barbituriques (Fernandez Garcia-Borregon *et al.*, 2000),
- Analyse de céramides (Gaudin *et al.*, 2002),
- Analyse peptidique et d'acides aminés (Adoubel *et al.*, 2000 ; Desportes *et al.*, 2000 ; Petritis *et al.*, 2000),
- Séparation de dérivés glucidiques (Davies *et al.*, 1992) et de cyclodextrines (Koizumi, 1996),
- Séparation de solutés ioniques et de molécules hautement polaires (Lim, 1989 ; Elfakir *et al.*, 1998),
- Séparation d'énantiomères, de diastéréoisomères (Fell *et al.*, 1988 ; Karlsson et Petersson, 1991 ; Josefsson *et al.*, 1993 ; Dutton *et al.*, 1995 ; Knox et Wan, 1995) et d'isomères géométriques ou de position (Forgacs *et al.*, 1992 ; Forgacs et Cserhati, 1992 ; Bell *et al.*, 1994 ; Kriz *et al.*, 1994 ; Forgacs et Cserhati, 1995 ; Wan *et al.*, 1995 ; Guenu et Hennion, 1996).

# 5. Utilisation de sélecteurs en électrophorèse capillaire

## 5.1 *Théorie de l'électrophorèse capillaire*

### 5.1.1 Introduction

Les espèces présentes dans un liquide peuvent porter une charge électrique résultante dont la grandeur et le signe dépendent à la fois de leur taille, de leur nature et de celle de l'électrolyte, en particulier de son pH. Cette charge provient de l'ionisation et de la fixation, à leur surface, d'ions contenus dans l'électrolyte tampon. Sous l'effet de divers phénomènes ou facteurs agissant simultanément (température, viscosité, différence de potentiel), ces composés vont avoir des vitesses de migration d'autant plus grandes qu'ils seront plus petits et porteurs de charges plus importantes.

Pour chaque espèce de rayon  $r_s$ , la vitesse limite de migration  $v$  résulte de l'équilibre entre la force électrique  $F$  qui s'exerce dans le champ  $E$  sur la particule de charge  $q_s$ , et les forces de frottement qui découlent de la viscosité  $\eta$  du milieu. La séparation dépend ainsi du rapport volume / charge. Les espèces neutres se séparent mal entre elles, à moins d'ajouter à l'électrolyte un surfactant pouvant s'associer avec elles et provoquer leur entraînement différentiel. Hückel a proposé une équation rendant compte de l'influence de ces facteurs sur la vitesse électrophorétique  $v$  :

$$v = \frac{q_s E}{6\pi\eta r_s}$$

Les espèces présentes dans l'échantillon sont soumises à deux effets principaux, leur mobilité électrophorétique d'une part et d'autre part le flux électro-osmotique.

### 5.1.2 Mobilité électrophorétique

Tout composé porteur d'une charge électrique se déplace dans l'électrolyte à une vitesse  $v_{ep}$  qui dépend des conditions expérimentales et de sa mobilité électrophorétique vraie  $\mu_{ep}$ . Ce paramètre est défini à partir de la vitesse de migration électrophorétique du composé et du champ électrique  $E$  :

$$\mu_{ep} = v_{ep} / E = v_{ep} \cdot L / V$$

L désigne la longueur totale du capillaire et V la différence de potentiel appliquée à ses extrémités. On affecte à la mobilité électrophorétique un signe positif ou négatif selon la nature cationique ou anionique de l'espèce ;  $\mu_{ep}$  est nulle pour une espèce globalement neutre. On peut obtenir  $\mu_{ep}$  à partir d'un électrophérogramme, en calculant  $v_{ep}$  du composé dans un champ E connu en tenant compte de la vitesse de l'électrolyte.

### 5.1.3 Mobilité électro-osmotique / électro-osmose (EOS)

Le second facteur contrôlant la migration des solutés est l'écoulement de l'électrolyte, encore appelé flux électro-osmotique caractérisé par sa mobilité électro-osmotique ( $\mu_{eos}$ ). On a la relation suivante :

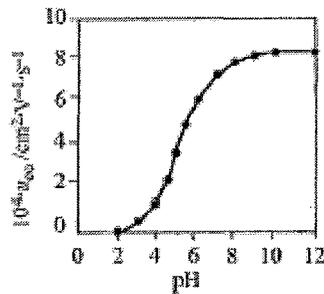
$$\mu_{eos} = v_{eos} / E = v_{eos} \cdot L / V$$

Pour calculer la mobilité électrophorétique, on doit d'abord déterminer  $v_{eos}$ . Cette dernière correspond à la vitesse d'écoulement dans l'électrolyte des espèces sans charge électrique globale. On y accède à partir du temps de migration  $t_{mn}$  que met un marqueur neutre à usage de traceur pour parcourir la distance effective l du capillaire. Dans ces conditions, on peut écrire :

$$v_{eos} = l / t_{mn}$$

On choisit comme marqueur une molécule organique, non polaire au pH de l'électrolyte utilisé, et facilement détectable par absorption dans le proche UV (par exemple de l'acétone, de l'oxyde de mésityle ou de l'alcool benzylique).

Le flux électro-osmotique, à l'origine du déplacement de toutes les espèces présentes dans l'échantillon, dépend de la nature de la paroi interne du tube capillaire. Cette paroi de silice est tapissée de groupements silanols qui s'ionisent si le pH est supérieur à 3, formant une surface avec des sites anioniques fixes qui créent un potentiel négatif (dit « potentiel Zeta ») et, en vis-à-vis, une couche cationique collée d'ions oxonium (fig. 19). Mais, plus au cœur de la solution, le champ électrique provoque la migration des cations vers la cathode. Ces ions sont solvatés et ils entraînent donc les molécules d'eau de l'électrolyte, en se dirigeant vers la cathode. Les anions suivent donc le mouvement général : ils progressent de manière « contre-électroosmotique ». Ainsi, une surface négative provoque généralement un flux électro-osmotique dirigé vers la cathode et inversement.



*Figure 19. Variation du flux électro-osmotique en fonction du pH.*

La maîtrise du flux électro-osmotique est une nécessité en électrophorèse capillaire pour obtenir des résultats reproductibles. L'emploi de tubes en silice fondue, partiellement désactivés par un revêtement interne, permet de diminuer, voire d'inverser le flux électro-osmotique en modifiant le pH. On peut également modifier ce flux en réalisant un gradient de tension.

#### 5.1.4 Mobilité apparente

Chaque ion possède une vitesse apparente de migration  $v_{app}$  qui dépend des deux paramètres précités, comme l'illustre la relation suivante :

$$v_{app} = v_{ep} + v_{eos}$$

On peut déterminer la valeur de  $v_{app}$  à partir de l'électrophérogramme :

$$v_{app} = l / t_m$$

où  $l$  est la longueur utile du capillaire entre les points d'injection et de détection et  $t_m$  le temps de migration. La mobilité électrophorétique apparente  $\mu_{app}$  est définie par :

$$\begin{aligned} \mu_{app} &= v_{app} / E = v_{app} \cdot L / V \\ &= (l \cdot L) / (t_m \cdot V) \end{aligned}$$

En combinant le flux électro-osmotique de l'analyte et la mobilité apparente, il est donc possible de calculer la mobilité électrophorétique vraie des espèces porteuses de charges. On pourra par conséquent écrire :

$$\mu_{ep} = \mu_{app} - \mu_{eos}$$

Ou bien encore :

$$\mu_{ep} = (L \cdot l) / V \cdot (1 / t_m - 1 / t_{mn})$$

## 5.2 *Description des appareils commerciaux*

Les instruments commerciaux sont disponibles depuis une vingtaine d'années. Les systèmes sont disponibles soit sous forme d'unité, soit sous forme modulaire.

### 5.2.1 Sources de haute tension

En règle générale, les séparations sont effectuées en employant des tensions comprises entre 5 et 30 kV. La force ionique de l'électrolyte choisi durant le développement de la méthode est telle que ces tensions génèrent des courants de 10 à 100  $\mu\text{A}$ . Sur de nombreux appareils, il est possible de travailler à tension, courant ou puissance constante à travers le capillaire. Les séparations effectuées à tension constantes sont de loin les plus employées.

### 5.2.2 Capillaires

Les capillaires sont généralement en silice fondue, leurs dimensions étant comprises entre 25 et 100  $\mu\text{m}$  pour le diamètre et 25 et 100 cm pour la longueur. Le volume global du capillaire est de l'ordre de quelques  $\mu\text{L}$  seulement.

Les capillaires sont recouverts d'une couche protectrice externe de polyimide, qui permet de leur conférer une bonne résistance mécanique mais absorbe également fortement dans l'UV. C'est pourquoi une partie de ce revêtement doit être retirée pour permettre la détection sur le capillaire (fenêtre). Certains capillaires possèdent un revêtement intérieur spécifique (par exemple un greffage cyclodextrine) pour faire varier la sélectivité.

### 5.2.3 Cartouche et source de gaz

De nombreux appareils commerciaux possèdent un capillaire inclus dans une cartouche. Cette dernière permet à la fois d'apporter un support mécanique fiable et de permettre un bon alignement du capillaire par rapport aux flacons placés dans le passeur automatique d'échantillons.

La cartouche est en principe insérée manuellement dans l'appareil, puis elle est verrouillée afin de garantir l'alignement optique ; elle peut être soit remplie avec un liquide réfrigéré soit avec de l'air refroidi pulsé à travers la cartouche. Le liquide réfrigérant est

généralement constitué de dérivés fluorocarbonés maintenus à la température requise. Le capillaire est quant à lui enroulé sur une bobine à l'intérieur de la cartouche. Il convient également de remarquer que :

- le chemin optique est relativement court comparé à la CLHP,
- et que le capillaire, de part son diamètre très faible, peut très facilement se boucher (formation de sels *in situ* par exemple) et/ou se casser (surtout lors de l'étape de mise en place de celui-ci au sein de la cartouche).

En ce qui concerne les rinçages et l'injection en mode hydrodynamique, la plupart des instruments utilisent une source de gaz régulée ; la nature de ce dernier ainsi que la pression requise peuvent varier très fortement entre 2 systèmes. Le système BECKMAN P/ACE 5500 (fig. 20) à notre disposition au laboratoire utilisait de l'azote à une pression d'approximativement 5 bars pour réaliser ces opérations.



*Figure 20. Photographie d'un système d'électrophorèse capillaire BECKMAN type P/ACE 5500.*

#### 5.2.4 Contrôle de la température

Les temps de migration des analytes dépendent fortement de la température. Il est donc essentiel qu'une température constante soit maintenue pendant une série d'analyses pour assurer une bonne répétabilité des temps de migration et des surfaces de pics. A ce titre, différents types d'approches ont été employés : refroidissement par effet Peltier, four à air pulsé à chauffage et refroidissement. On emploie généralement des températures comprises entre 20 et 50 °C. Sur certains appareils, il est également possible d'acquérir en option des

passeurs automatiques d'échantillons refroidis, qui peuvent s'avérer être particulièrement utiles si l'échantillon est thermolabile.

### 5.2.5 Systèmes de détection et d'acquisition des résultats

Le système de détection le plus répandu en électrophorèse capillaire est l'absorption dans l'UV. D'autres instruments font appel à une détection à barrette de diodes (DAD) ou par fluorescence / fluorescence induite laser. Les détecteurs UV sont similaires à ceux rencontrés en CLHP, l'intervalle de longueurs d'ondes couvert s'étendant de 190 à 760 nm. Les lampes UV sont en tout point similaires à celles utilisées en CLHP.

La fenêtre de détection du capillaire est généralement de 200 x 50  $\mu\text{m}$  ou de 800 x 100  $\mu\text{m}$ . Ces faibles dimensions exigent une focalisation parfaite du faisceau lumineux à travers le capillaire ; la focalisation en question est réalisée par l'utilisation de lentilles de haute qualité ou de fibres optiques.

La quasi-totalité des appareils d'électrophorèse capillaire est connectée à un ordinateur qui permet le contrôle de toutes les fonctionnalités. Il est également possible de pré-programmer l'instrument pour automatiser l'exécution de certaines opérations (séquences de rinçage / injections).

## 5.3 *Facteurs influençant la séparation en électrophorèse capillaire*

Parmi les facteurs susceptibles d'influencer la séparation en électrophorèse capillaire, on trouve :

- *La composition du tampon de migration.* Une augmentation de la concentration en électrolyte de travail conduit en théorie à une amélioration de la résolution due à la réduction de la traînée du pic. Cependant, si la concentration en électrolytes est trop importante, il y aura diminution de la résolution par augmentation de l'effet Joule au sein du capillaire.
- *L'utilisation de certains solvants organiques, tel le méthanol.*

- *La température à laquelle s'effectue la séparation.* On obtient généralement les meilleures résolutions à de faibles températures.
- *L'utilisation éventuelle d'additifs polymériques.* Ceux-ci entraînent une augmentation notable de la viscosité de la solution, et donc une traînée de pic réduite. Parmi ces additifs, citons des dérivés cellulosiques (méthylhydroxyéthylcellulose) ou l'alcool polyvinylique.
- *Le revêtement du capillaire.* Un revêtement à base de polyacrylamide peut permettre d'augmenter la sélectivité chirale (élimination du FEO + prévention de l'adsorption de l'analyte sur les parois). Il est également possible d'employer un revêtement dit « dynamique » (cellulose ou alcool polyvinylique).
- *Les paramètres d'injection de l'échantillon.* Augmenter à la fois la concentration de l'échantillon et la durée d'injection conduit à une diminution de la résolution. Cependant, des injections de durée plus longue permettent d'atteindre une meilleure répétabilité en termes de surfaces de pics.

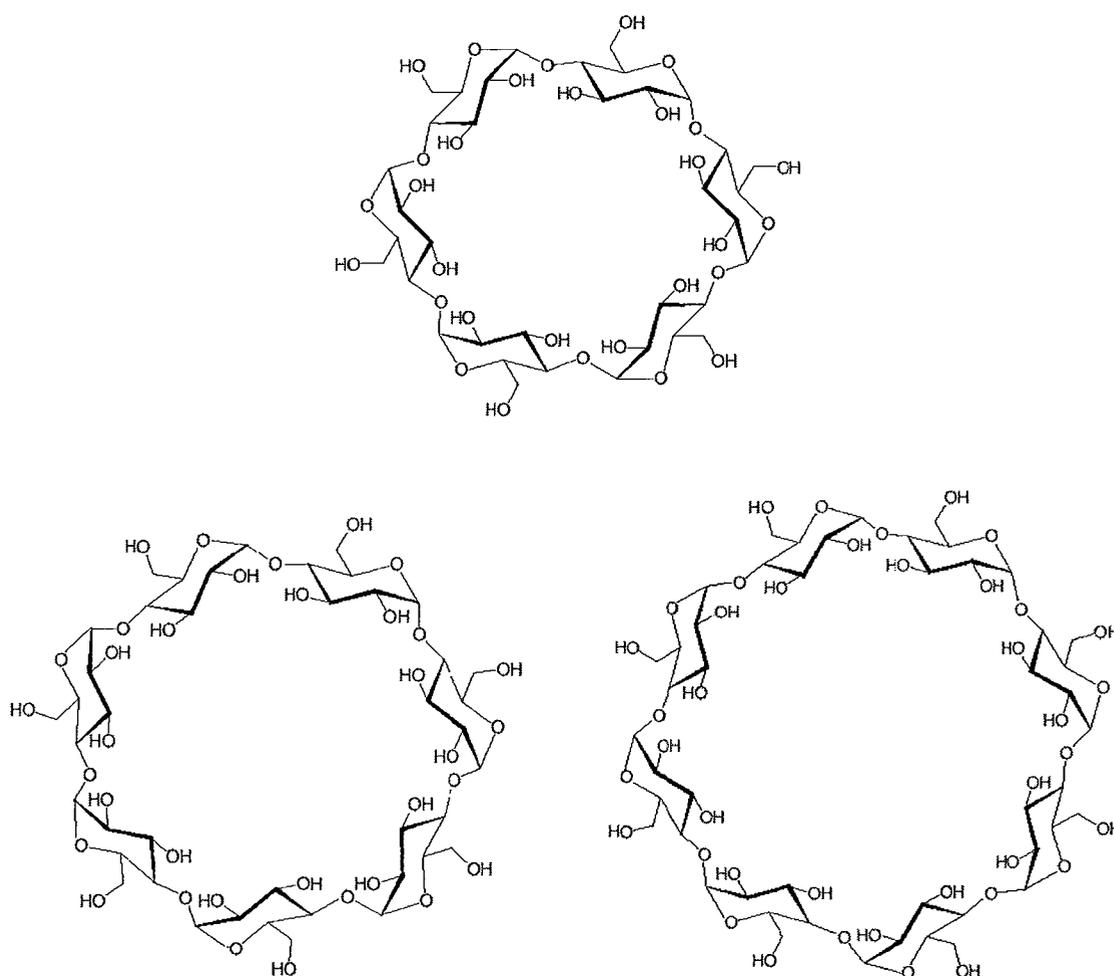
#### 5.4 Séparation isomérique à l'aide de sélecteurs

Les propriétés essentielles d'un sélecteur chiral utilisable en électrophorèse capillaire sont les suivantes :

- le sélecteur choisi doit pouvoir interagir de manière stéréosélective avec les isomères, et ce à l'aide de forces intermoléculaires,
- et les complexes formés doivent posséder des mobilités électrophorétiques différentes de celles de l'analyte seul.

D'autres propriétés importantes (solubilité dans l'électrolyte de fond, transparence vis-à-vis du détecteur utilisé [en particulier en UV], disponibilité commerciale, coût de revient, stabilité) doivent être prises en considération au moment du choix. Les cyclodextrines remplissent tous les critères sus-cités, et sont de fait les sélecteurs chiraux les plus appréciés en électrophorèse capillaire.

Les principales forces intermoléculaires sont les liaisons hydrogène, les interactions hydrophobes, dipôle-dipôle et de Van der Waals. Les cyclodextrines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (fig. 21) possèdent respectivement 18, 21 et 24 groupes hydroxyls, qui peuvent être impliqués dans des liaisons hydrogène. En outre, les groupements hydroxyls présents aux bords de ces molécules peuvent être soumis très facilement à des réactions de dérivation, offrant ainsi des possibilités pour introduire d'autres liaisons hydrogène, des sites d'interactions électrostatique ou hydrophobe ou des charges supplémentaires.



*Figure 21. Structure chimique semi-développée des cyclodextrines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (de haut en bas et de gauche à droite).*

La cavité interne des cyclodextrines, qui est entourée d'atomes d'hydrogène et de ponts glycosidiques (oxygène) est hydrophobe, ce qui favorise les interactions hydrophobes entre l'analyte et la molécule hôte.

Comme certains calculs d'orbitales moléculaires l'ont démontré, même des cyclodextrines neutres sont capables de présenter des couples de dipôle étonnement élevés. Plusieurs études indiquent aussi une contribution significative des interactions type Van der Waals dans le complexe analyte-hôte. Par conséquent, de nombreux types de forces sont impliqués dans l'interaction considérée. Cette multiplicité, combinée aux différentes dimensions des cavités (selon qu'il s'agisse de cyclodextrines  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$  ou de leurs dérivés), contribuent à faire des cyclodextrines des sélecteurs très appréciés en électrophorèse capillaire.

L'aptitude des cyclodextrines à former des complexes intermoléculaires avec d'autres molécules organiques ou inorganiques a été mise en évidence par Schardinger (Schardinger, 1911), qui utilisa les propriétés de complexation des cyclodextrines avec le chloroforme et les alcools afin de les faire précipiter et introduisit la distinction entre cyclodextrines  $\alpha$  et  $\beta$  suite à une réaction de complexation avec de l'iode. Freudenberg *et al.* (1939) furent les premiers à affirmer que ces complexes étaient de type inclusifs.

La propriété la plus intéressante des cyclodextrines, à savoir leur aptitude à former des complexes de manière stéréosélective, a été découverte par Cramer (Cramer, 1952). Ceci fut plus tard confirmé par l'enrichissement optique des acides mandélique, chlorophénylacétique et bromophénylacétique. Cramer et Dietsche (1959), Mikolajczyk *et al.* (1971) et plusieurs autres groupes de travail utilisèrent les propriétés de complexation des cyclodextrines pour obtenir des composés chiraux « enrichis ». Ces propriétés sont habilement mises à profit dans des techniques analytiques séparatives telles que la CCM, la CPG, la CLHP, la CPS et plus récemment l'électrophorèse capillaire.

En électrophorèse capillaire, le fait qu'il y ait une reconnaissance entre sélecteur et soluté n'implique pas nécessairement l'obtention d'une séparation effective. Des phénomènes de transport interviennent également dans ce mécanisme, et doivent être pris en considération.

Pour conclure, ajoutons un seul chiffre qui permet de se rendre compte de la place qu'occupent les cyclodextrines dans le monde analytique moderne : plus de 65 % de toutes les séparations chirales en électrophorèse capillaire sont basées sur l'usage de cyclodextrines en tant que sélecteurs (Chankvetadze, 1997).

## 6. Travail expérimental

La Pharmacopée Européenne impose actuellement une méthode de séparation et de quantification des isomères - entre autres composés - du citrate de clomifène, du chlorhydrate de doxépine et du dichlorhydrate de flupentixol. Les méthodes existantes imposent des critères de résolution limités (respectivement 1,0 ; 1,5 et 3,0), et utilisent des phases stationnaires non adaptées aux séparations de molécules présentant un encombrement stérique différent (annexe).

Nous nous proposons dans cette étude expérimentale de mettre au point des méthodes séparatives plus efficaces, en utilisant le CGP (CLHP) et l'électrophorèse capillaire avec sélecteur, puis de réaliser une comparaison claire et objective des avantages et inconvénients de chacune d'elles.

### 6.1 *Matériel et méthodes*

Ce paragraphe résume la nature et la provenance des produits utilisés dans le développement des méthodes chromatographique et électrophorétique.

#### 6.1.1 Analytes

- Clomifène (citrate de), SIGMA-ALDRICH, Saint Louis, USA.
- Doxépine (chlorhydrate de), PLANTEX, Sainte-Geneviève des Bois, France.
- Flupentixol (dichlorhydrate de), SCR Ph. Eur., EDQM, Strasbourg, France.

#### 6.1.2 Réactifs et solvants

- Acétate d'éthyle, RIEDEL DE HAEN LABORCHEMIKALIEN, Seelze, Allemagne.
- Acide chlorhydrique (solution à 37 %), CARLO ERBA REAGENTI, Milano, Italie.
- Acide chlorhydrique (solution Titrinorm à 1 M), PROLABO, Fontenay sous Bois, France.
- Acide orthophosphorique (solution à 85 %), PROLABO, Fontenay sous bois, France.

- Ammoniaque (solution à 25 % v/v), RIEDEL DE HAEN LABORCHEMIKALIEN, Seelze, Allemagne.
- Chloroforme exempt d'éthanol, CARLO ERBA REAGENTI, Milano, Italie.
- Diazote (Alphagaz<sup>TM</sup> N<sub>2</sub>), AIR LIQUIDE, Paris, France.
- Eau de qualité CLHP (type Milli-Q), qualité ultra-pure.
- Helium Alphagaz<sup>TM</sup> He, AIR LIQUIDE, Paris, France.
- Heptakis (2,3,6-tri-O-méthyl)-β-cyclodextrine, FLUKA, Buchs, Suisse.
- Hexane, qualité HiPerSolv, BDH (actuellement MERCK), Australie.
- Hydroxyde de sodium (solution à 0,1 M), FLUKA, Buchs, Suisse.
- Hydroxyde de sodium (solution à 1 M), FLUKA, Buchs, Suisse.
- Méthanol, CARLO ERBA REAGENTI, Milano, Italie.
- Phosphate monosodique dihydraté (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 H<sub>2</sub>O), ACROS ORGANICS, Geel, Belgique.
- Phosphate disodique dihydraté (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 H<sub>2</sub>O), RP NORMAPUR<sup>®</sup> AR, PROLABO, Paris, France.
- Sulfate de sodium anhydre, FLUKA, Buchs, Suisse.
- Triéthylamine (solution à 38 %), FLUKA, Buchs, Suisse.

### 6.1.3 Matériel

#### Chromatographie Liquide

- Pompe P 1000, THERMO SEPARATION PRODUCTS, San Jose, USA.
- Injecteur / passeur automatique d'échantillons AS100, THERMO SEPARATION PRODUCTS.
- Colonnes :
  - LiChrospher RP 18<sup>e</sup>, 125 x 4 mm, 5 μm, MACHERY-NAGEL, Düren, Allemagne.
  - LiChrospher Si 100, 250 x 4 mm, 5 μm, MERCK, Darmstadt, Allemagne.
  - Hypercarb, 100 x 4,6 mm, 5 μm, THERMO HYPERSIL – KEYSTONE, Runcorn, Angleterre.
- Four : Croco-Cil, CIL CLUZEAU, Sainte-Foy-la-Grande, France.
- Détecteur : Spectra series UV 100, THERMO SEPARATION PRODUCTS.

- Traitement informatique des données : intégrateur Chromjet, THERMO SEPARATION PRODUCTS ; système de collecte des données Labnet, THERMO SEPARATION PRODUCTS ; logiciel Azur, DATALYS, Saint-Martin d'Heres, France ; plans d'expériences : logiciel MODDE 5.0, SIGMA PLUS, Toulouse, France.

### Electrophorèse capillaire

- Electrophorèse capillaire P/ACE 5500, BECKMAN, Fullerton, Etats-Unis.

Cet appareil dispose d'un injecteur automatique (fonctionnant en mode hydrodynamique ou électrocinétique), d'un dispositif de régulation thermique (liquide réfrigérant, 15-50 +/- 0,1 °C), d'un détecteur à barrette de diodes (DAD, 190-600 nm), et d'un système informatique d'acquisition / traitement des données (P/ACE Station, BECKMAN). La procédure de rinçage du capillaire est décrite dans le tableau IV ci-dessous.

- Capillaires en silice fondue, dimensions 47 cm X 50 µm (ultérieurement 75 µm), THERMO ELECTRO CORPORATION, Courtabeuf, France.

<i>Etape n°</i>	1	2	3
<i>Durée</i>	2 min	2 min	2 min
<i>Liquide de rinçage</i>	NaOH (0,1 M)	H <sub>2</sub> O	Tampon de migration
<i>Type de rinçage</i>	HP, forward	HP, forward	HP, forward

*Tableau IV. Descriptif détaillé des étapes de rinçages ayant lieu avant et entre deux injections.*

*HP = « high pressure » (rinçage haute pression) ; « forward » = inlet vers outlet.*

### Autres

- pH-mètre équipé d'une électrode combinée, RADIOMETER, Copenhague, Danemark.

#### 6.1.4 Paramètres chromatographiques et électrophorétiques optimisés

- *Citrate de clomifène.*

##### *CLHP*

Phase mobile : acétate d'éthyle / méthanol / ammoniac à 3 % (75/30/1, v/v/v)

Débit de phase mobile / mode d'élution : 2,0 mL/min / isocratique

Solvant / concentration de l'échantillon / volume injecté : acétate d'éthyle / 0,05 g/L / 20 µL

Colonne : Hypercarb, 100 x 4,6 mm, 5 µm

Température de la colonne : 25 °C

Longueur d'onde de détection : 302 nm

##### *Electrophorèse capillaire*

Capillaire : silice fondue, 47 cm x 75 µm

Durée / mode d'injection : 1 seconde / mode hydrodynamique

Solvant / concentration de l'échantillon : méthanol / eau (50/50, v/v) / 0,1 g/L

pH / molarité du tampon  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{H}_3\text{PO}_4$  / concentration en sélecteur : 2,0 / 25 mM / 0,2 mM

Température : 25°C

Tension appliquée : 25 kV

- *Chlorhydrate de doxépine.*

##### *CLHP*

Phase mobile : acétate d'éthyle / méthanol / ammoniac à 3 % (75/30/1, v/v/v)

Débit de phase mobile / mode d'élution : 1,0 mL/min / isocratique

Solvant / concentration de l'échantillon / volume injecté : phase mobile / 0,05 g/L / 20 µL

Colonne : Hypercarb, 100 x 4,6 mm, 5 µm

Température de la colonne : 25 °C

Longueur d'onde de détection : 254 nm

*Electrophorèse capillaire*

Capillaire : silice fondue, 47 cm x 75 µm

Durée / mode d'injection : 1 seconde / mode hydrodynamique

Solvant / concentration de l'échantillon : méthanol / eau (50/50, v/v) / 0,1 g/L

pH / tampon NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> / concentration en sélecteur : 2,0 / 25 mM / 15,0 mM

Température : 25°C

Tension appliquée : 25 kV

- *Dichlorhydrate de flupentixol.*

*CLHP*

Phase mobile : méthanol / dichlorométhane (60/40, v/v), pH ajusté à 11,0 avec NH<sub>4</sub>OH

Débit de phase mobile / mode d'élution : 1,5 mL/min / isocratique

Solvant / concentration de l'échantillon / volume injecté : méthanol (pH ajusté à 11,0) / 0,02 g/L / 10 µL

Colonne : Hypercarb, 100 x 4,6 mm, 5 µm

Température de la colonne : 60°C

Longueur d'onde de détection : 254 nm

*Electrophorèse capillaire*

Capillaire : silice fondue, 47 cm x 75 µm

Durée / mode d'injection : 1 seconde / mode hydrodynamique

Solvant / concentration de l'échantillon : méthanol / eau (50/50, v/v) / 0,1 g/L

pH / tampon NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> / concentration en sélecteur : 2,0 / 25 mM / 0,2 mM

Température : 25°C

Tension appliquée : 25 kV

## 6.2 Développement de la méthode chromatographique : cas du flupentixol

Des travaux préliminaires effectués au laboratoire (Clarot *et al.*, 2005) ont permis d'obtenir une séparation optimisée des isomères *Z* et *E* de deux des analytes considérés (le citrate de clomifène et le chlorhydrate de doxépine), et ce à l'aide de paramètres séparatifs proches (seul le débit employé était différent selon la molécule). L'idée de départ était donc d'appliquer ces conditions chromatographiques optimisées à la troisième molécule, à savoir le dichlorhydrate de flupentixol (fig. 22).

Phase mobile : acétate d'éthyle / méthanol / ammoniac à 3 % (75/30/1, v/v/v)

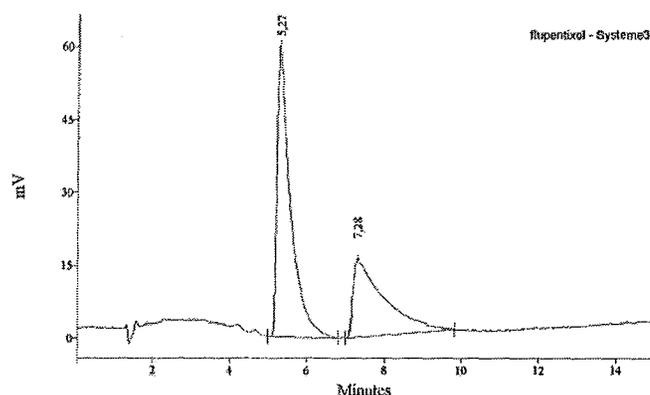
Débit de phase mobile / mode d'élution : 1,0 mL/min / isocratique

Solvant / concentration de l'échantillon / volume injecté : phase mobile / 0,1 g/L / 10  $\mu$ L

Colonne : Hypercarb, 100 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m

Température de la colonne : 35 °C

Longueur d'onde de détection : 254 nm



*Figure 22. Chromatogramme obtenu avec le dichlorhydrate de flupentixol dans les conditions expérimentales précitées.*

Ces conditions nous permirent effectivement d'obtenir la séparation des 2 isomères du dichlorhydrate de flupentixol ( $R_s = 2,1$ ), mais la traînée des pics, en particulier celle du second, était conséquente. Dans l'objectif d'améliorer la forme des 2 pics, 3 voies de développement différentes s'offraient à nous :

- 1<sup>ère</sup> option : modifier la force d'éluion du mélange de solvants, soit par l'introduction d'un gradient, soit par l'utilisation de solvants de force éluante proche, mais pouvant posséder une sélectivité différente. En général, les méthodes chromatographiques sur support CGP font intervenir un mélange binaire de solvants, à savoir un solvant de force éluante élevée (type acétate d'éthyle) et un solvant de force éluante faible (type méthanol ou isopropanol).
- 2<sup>ème</sup> option : ajouter des modificateurs électroniques (type diéthylamine ou acide trifluoroacétique) à la phase mobile afin de modifier, par un mécanisme de compétition, les paramètres de rétention des analytes et d'améliorer la symétrie des pics obtenus.
- 3<sup>ème</sup> option : augmenter la température de la colonne. Tout comme en CLHP de partage, une augmentation de température conduit généralement à l'obtention de pics plus fins et à des temps de rétention plus courts.

Dans le cadre de la première option, nous avons testé plusieurs solvants de force éluante forte sur CGP : acétate d'éthyle, dichlorométhane et tétrahydrofurane. Parmi ces trois solvants, le dichlorométhane peut être considéré, quelle que soit la nature de l'analyte, comme étant le solvant le plus fort. Nous avons pu confirmer expérimentalement qu'il permet de limiter au maximum la traînée des pics.

La deuxième option s'est révélée peu concluante (concentrations employées de l'ordre de 0,1 à 1,0 % v/v), occasionnant uniquement une variation des temps de rétention, voire une dégradation de la séparation des 2 pics.

La troisième et dernière solution a quant à elle effectivement permis d'améliorer la symétrie des pics. Il est à noter que l'utilisation d'un support CGP permet de bénéficier non seulement d'une phase stationnaire résistante aux principaux agents chimiques (stabilité sur toute la gamme de pH), mais également à d'intenses contraintes physiques ou mécaniques (pression, température).

L'utilisation d'un mélange binaire dichlorométhane / méthanol, combinée à une augmentation de la température de la colonne (passage de 35 à 60°C) et à une augmentation du débit de phase mobile (1,5 mL / min), nous a permis d'obtenir les meilleurs résultats :  $R_s = 2,6$  et symétrie améliorée.

### 6.3 Développement de la méthode électrophorétique

Le point de départ du développement de la méthode électrophorétique s'est inspiré des travaux de Bempong et Honigberg (1996), qui décrivent la séparation des isomères *Z-E* du clomifène par électrophorèse capillaire en présence d'un sélecteur chiral (heptakis(2,3,6-tri-*o*-methyl)  $\beta$ -cyclodextrine). Les conditions de séparation optimisées étaient les suivantes :

Capillaire : silice fondue, 72 cm x 50  $\mu$ m

Durée / mode d'injection : 1,7 seconde / mode hydrodynamique

Milieu de dilution : MeOH / H<sub>2</sub>O (50/50 ; v/v)

pH / molarité du tampon / concentration en sélecteur : 2,3 / 100 mM / 5,0 mM

Température : 30°C

Tension appliquée : 30 kV

Parmi les facteurs ayant une influence sur la séparation d'isomères *Z-E* en électrophorèse capillaire, il convient de citer :

- *le pH* : l'ionisation de l'analyte, mais également des CD, est contrôlée par la valeur de pH choisie. Il a également une influence sur la mobilité électrophorétique de l'analyte, et par conséquent sur le temps de migration de ce dernier.
- *le type ainsi que la concentration des cyclodextrines (sélecteurs) utilisées* : les groupements des CD natives peuvent être modifiés chimiquement pour donner naissance à diverses CD dérivées. Le degré de séparation dépend du degré de substitution du dérivé CD. Le mécanisme de reconnaissance étant fondé sur la complexation, une augmentation de la concentration en CD augmente la probabilité des interactions. Cependant, il existe une concentration optimale en sélecteur pour chaque analyse de ce type, au-dessus de laquelle toute augmentation supplémentaire de concentration conduit à une diminution de la résolution.

Après avoir effectué quelques essais préliminaires en utilisant la méthode de Bempong et Honigberg modifiée et adaptée par nos soins, nous nous sommes donc attachés à définir des paramètres que nous estimons être « critiques » pour la qualité de la séparation.

Les 4 paramètres pris en compte sont le pH du tampon de migration (molarité : environ 100 mM ; valeurs extrêmes : 2,0-6,0), la concentration en CD (valeurs extrêmes : 5-20 mM), la température du capillaire (valeurs extrêmes : 25-35 °C) et la tension appliquée (valeurs extrêmes : 15-25 kV). A l'aide de cette liste de facteurs, nous avons conçu, à l'aide du logiciel MODDE 5.0, un plan d'expérience type Plackett-Burman pour optimiser la séparation des isomères *Z-E* du chlorhydrate de doxépine.

Les conditions expérimentales utilisées ainsi que les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux V et VI ci-dessous.

<i>Exp n°</i>	<i>Ordre de passage</i>	<i>pH</i>	<i>[CD] (mM)</i>	<i>θ (°C)</i>	<i>U (kV)</i>
<b>1</b>	11	6,0	5	25	25
<b>2</b>	2	6,0	20	25	15
<b>3</b>	10	6,0	20	35	15
<b>4</b>	3	2,0	20	35	25
<b>5</b>	1	6,0	5	35	25
<b>6</b>	6	2,0	20	25	25
<b>7</b>	8	2,0	5	35	15
<b>8</b>	4	2,0	5	25	15
<b>9</b>	5	4,0	12,5	30	20
<b>10</b>	7	4,0	12,5	30	20
<b>11</b>	9	4,0	12,5	30	20

*Tableau V. Plan d'expérience type PLACKETT-BURMANN utilisé pour optimiser la méthode électrophorétique (logiciel MODDE 5.0).*

*Toutes les analyses ont été effectuées en utilisant un capillaire de 47 cm x 50 μm, avec une durée d'injection de 2 sec (mode hydrodynamique). Pour chaque expérience, la migration est effectuée à deux reprises (Runs ½).*

<i>Exp n°</i>	<i>Ordre de passage</i>	<i>Run</i>	<i>R<sub>s</sub></i>	<i>As (pic 1)</i>	<i>As (pic 2)</i>	<i>T<sub>m</sub> (pic 2) (min)</i>
5	1	1	2,26	1,65	3,28	5,48
		2	1,96	1,41	3,17	5,21
2	2	1	3,49	2,13	5,81	9,82
		2	3,15	1,83	4,91	7,44
4	3	1	*****	*****	*****	*****
		2	*****	*****	*****	*****
8	4	1	1,97	2,62	7,83	13,30
		2	2,06	2,75	8,07	13,66
9	5	1	0,95	*****	*****	5,45
		2	1,21	4,43	11,02	6,70
6	6	1	4,78	2,12	6,50	9,10
		2	7,13	*****	5,00	9,36
10	7	1	1,30	5,38	14,82	7,23
		2	1,30	5,77	12,51	7,23
7	8	1	1,92	2,58	7,12	12,25
		2	1,87	3,67	9,28	12,13
11	9	1	2,27	3,10	10,46	7,69
		2	2,19	3,80	9,35	8,32
3	10	1	2,37	2,11	6,01	7,35
		2	2,00	2,07	5,65	6,76
1	11	1	0,62	5,00	7,00	2,76
		2	0,66	*****	5,56	2,78

*Tableau VI. Récapitulatif des résultats du plan d'expérience précédemment décrit. Les valeurs de résolution ( $R_s$ ), de facteur d'asymétrie ( $As$ ) et de temps de migration ( $t_m$ ) ont été déterminées par voie informatique sur les électrophérogrammes obtenus à 200 nm. Les étoiles désignent des résultats inexploitable. Dans le cas où une seule valeur était disponible, seule celle-ci a été prise en compte pour la détermination des valeurs moyennes de chaque paramètre.*

Nous nous sommes aperçu que les 4 paramètres supposés à priori être « critiques » pour la qualité et l'efficacité de la séparation (pH, [CD], température et tension appliquée) n'avaient en fait aucune incidence sur celles-ci. Le logiciel nous a permis de déterminer les conditions optimales de séparation (c'est-à-dire conduisant à des valeurs de  $R_s$  maximale, et des valeurs d' $A_s$  et de  $t_m$  minimales) pour le chlorhydrate de doxépine, soit pH = 6,0, [CD] = 15 mM,  $\theta = 25^\circ\text{C}$  et  $U = 25$  kV. Cependant, afin de travailler dans des conditions optimales de répétabilité de la méthode, une valeur de pH plus faible (2,0) a été préférée.

Des essais ultérieurs permirent de déterminer la concentration optimale en sélecteur à utiliser pour les deux autres analytes (à savoir 0,2 mM), en utilisant le même type de raisonnement.

Dans tous les cas, et afin de contourner l'obstacle de la limitation d'intensité du courant électrique, et d'améliorer encore la résolution et la symétrie des pics, nous avons procédé à une série de tests dans des conditions de molarité plus faible (à savoir 25 ou 50 mM au lieu des 100 mM initialement utilisés) et avec 2 durées d'injection différentes (1 ou 2 secondes). Les résultats obtenus lors de cette étude sont résumés dans le tableau VII. Des durées d'injection faibles, combinées à une molarité faibles, ont conduit de manière répétable à l'obtention des meilleures performances séparatives.

Critère.... Analyte	25 mM, pH = 2,0			50 mM, pH = 2,0			100 mM, pH = 2,0		
	$A_s$	$t_m$ (min)	$R_s$	$A_s$	$t_m$ (min)	$R_s$	$A_s$	$t_m$ (min)	$R_s$
Clomifène pic 1	1,31	5,92	7,67	1,62	6,26	8,83	1,38	8,68	9,18
	1,71	6,40		1,34	6,21		*****	*****	
	1,71	6,67	5,01	1,56	7,11	7,44	1,96	9,85	
pic 2	2,87	7,20	5,01	2,20	7,03	7,44	*****	*****	*****
Flupentixol pic 1	1,18	3,92	2,13	1,66	3,97	2,81	1,28	5,74	3,63
	1,39	3,97		1,15	3,95		*****	*****	
	1,31	4,02	1,97	1,29	4,10	2,60	1,23	5,95	
pic 2	1,58	4,07		1,38	4,07		*****	*****	

Tableau VII. Récapitulatif de l'étude force ionique / durée d'injection pour le citrate de clomifène et le dichlorhydrate de flupentixol. Pour tous les essais considérés : [CD] = 0,2

*mM, échantillons à 0,1 mg/mL dans MeOH / H<sub>2</sub>O (50/50, v/v), tension fixée à 25 kV, détection UV à 210 nm.*

*\*\*\*\*\* = absence de données expérimentales*

**3,63** = valeur optimale sur chacun des pics pour les paramètres considérés (*A<sub>s</sub>* et *t<sub>m</sub>* minimaux, *R<sub>s</sub>* maximale)

**Chiffres rouges** : durée d'injection de 1 sec

**Chiffres verts** : durée d'injection de 2 sec

## 6.4 Comparaison des résultats Ph. Eur. / CLHP sur CGP / Electrophorèse capillaire

Le tableau VIII récapitule les temps de rétention (migration) ainsi que les valeurs de résolution obtenus par chacune des méthodes. Les résultats obtenus par application des méthodes Ph. Eur. sont conformes aux spécifications imposées en termes de résolution minimum. La méthode la moins efficace est celle relative à la doxépine (résolution la plus faible avec temps de rétention les plus longs). L'utilisation du support CGP a permis d'obtenir des résolutions satisfaisantes et nettement améliorées dans le cas du chlorhydrate de doxépine et du citrate de clomifène. Une particularité à signaler est l'inversion d'élution du couple d'isomères dans deux cas sur trois (chlorhydrate de doxépine et dichlorhydrate de flupentixol).

En l'absence de substances de référence de chacun des isomères, l'attribution respective des pics s'est faite en se basant sur leur importance relative. Cette inversion est particulièrement intéressante dans le cas de la doxépine puisque l'isomère en plus faible concentration (pic très large et mal résolu) est désormais élué en premier avec une résolution qui permet aisément sa quantification.

L'électrophorèse capillaire présente les mêmes performances que la méthode CLHP sur CGP, aussi bien en termes de séparation qu'en temps d'analyse. Elle n'apporte donc pas de réel bénéfice, et nécessite l'achat d'un équipement particulier dans le cadre d'un laboratoire de contrôle analytique.

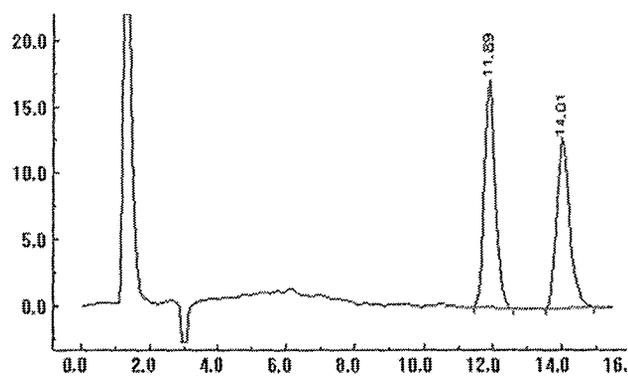
Dans tous les cas, le rapport isomère *Z* / isomère *E* est conforme quelle que soit la technique employée.

ANALYTE	Paramètre	Selon Ph. Eur. (CLHP)	Méthode CGP (CLHP)	Méthode EC
Clomifène (citrate)	R <sub>s</sub>	3,5*	7,2*	7,6
	t <sub>m</sub> Z / t <sub>m</sub> E (min)	14,0 / 11,9*	3,2 / 1,9*	<b>5,9 / 6,7</b>
	% Z/E	47,4 / 52,6	43,5 / 56,5	44,2 / 55,8
	Spécification CLHP	R <sub>s</sub> minimum : 1,0 Isomère Z : 30,0 – 50,0 %		
Doxépine (HCl)	R <sub>s</sub>	1,7*	4,3*	5,7
	t <sub>m</sub> Z / t <sub>m</sub> E (min)	22,0 / 17,7*	<b>2,4 / 3,2*</b>	<b>6,2 / 6,7</b>
	% Z/E	15,4 / 84,6	15,7 / 84,3	15,3 / 84,7
	Spécification CLHP	R <sub>s</sub> minimum : 1,5 Isomère Z : 13,0 – 18,5 %		
Flupentixol (diHCl)	R <sub>s</sub>	3,0	2,6	2,1
	t <sub>m</sub> Z / t <sub>m</sub> E (min)	4,4 / 5,0	<b>5,5 / 4,0</b>	3,9 / 4,0
	% Z/E	45,0 / 55,0	41,6 / 58,4	46,0 / 54,0
	Spécification CLHP	R <sub>s</sub> minimum : 3,0 Isomère Z : 41,7 – 52,6 %		

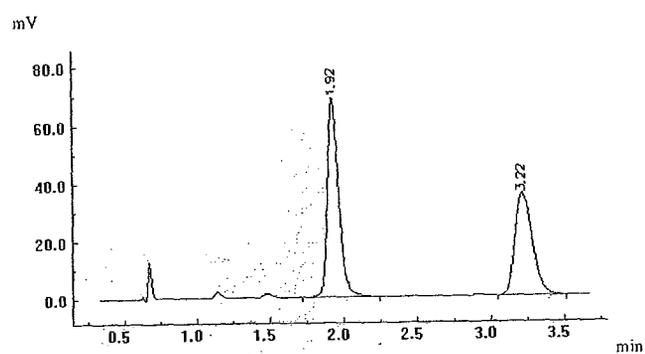
*Tableau VIII. Récapitulatif des résultats obtenus avec les 2 techniques analytiques envisagées ainsi qu'avec les méthodes Ph. Eur. correspondantes pour le citrate de clomifène, le chlorhydrate de doxépine et le dichlorhydrate de flupentixol.*

(\*) Données issues de Clarot *et al.*, 2005.

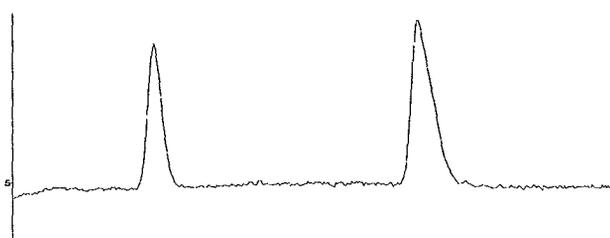
Sont présentés en gras les cas d'inversions d'ordre d'élution par rapport à la méthode de référence (Ph. Eur.).



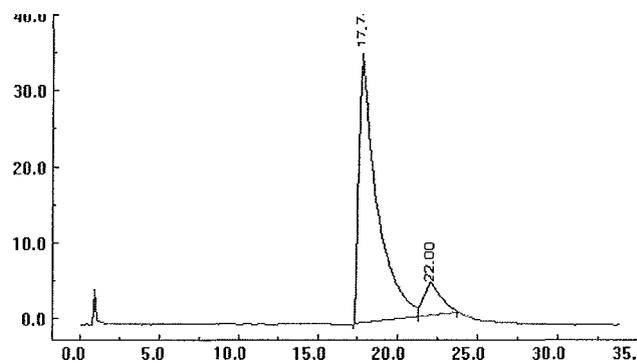
*Figure 23. Chromatogramme obtenu avec le citrate de clomifène avec la méthode Ph. Eur.*



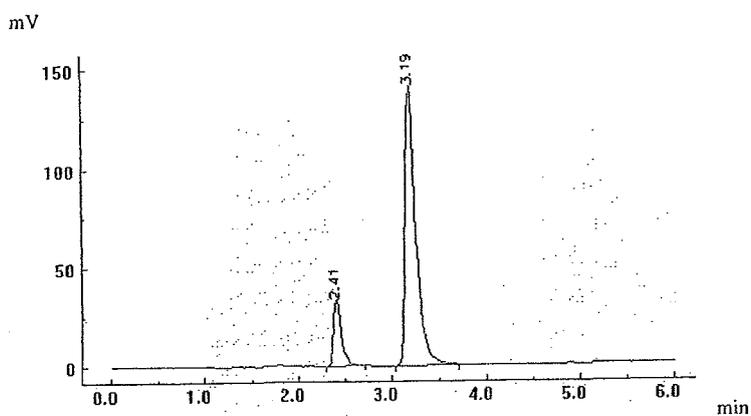
*Figure 24. Chromatogramme obtenu avec le citrate de clomifène sur colonne CGP dans les conditions optimisées.*



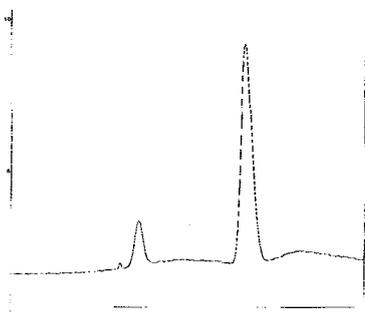
*Figure 25. Electrophérogramme obtenu avec le citrate de clomifène dans les conditions optimisées.*



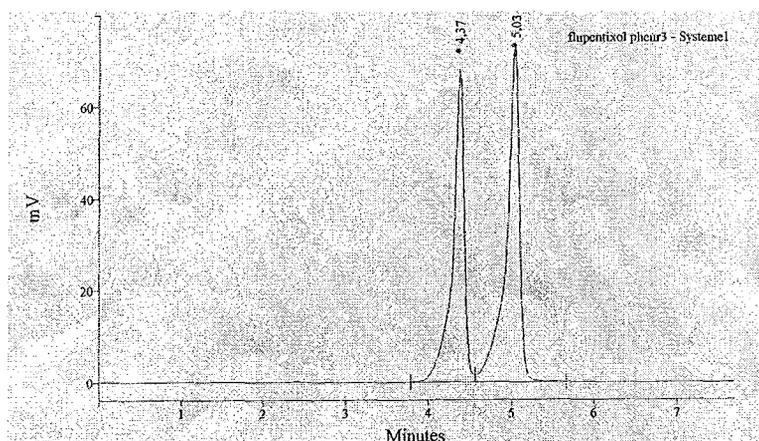
*Figure 26. Chromatogramme obtenu avec le chlorhydrate de doxépine avec la méthode Ph. Eur.*



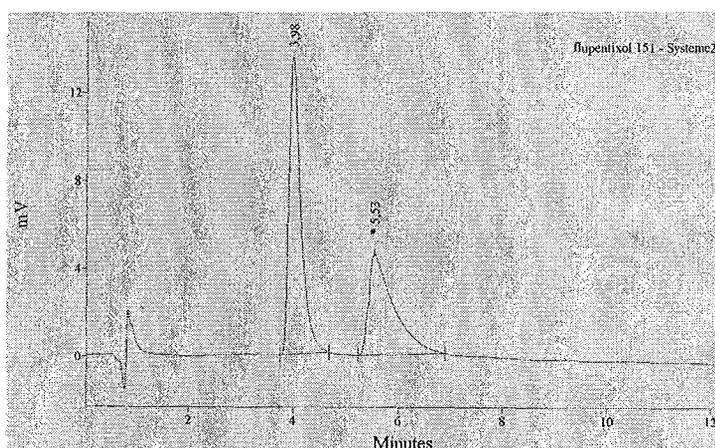
*Figure 27. Chromatogramme obtenu avec le chlorhydrate de doxépine sur colonne CGP dans les conditions optimisées.*



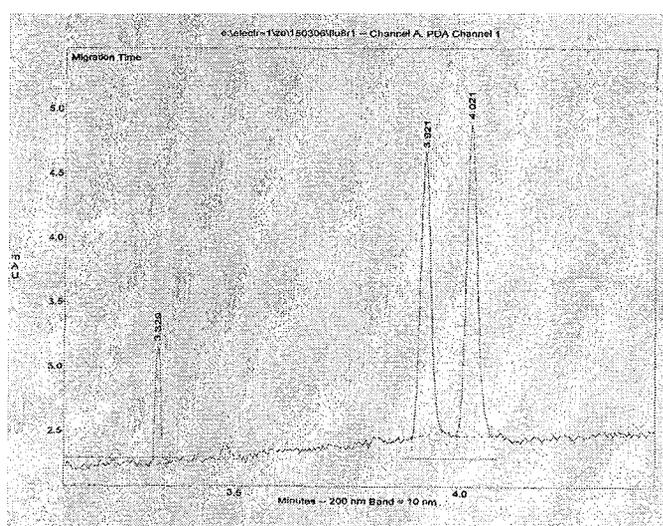
*Figure 28. Electrophérogramme obtenu avec le chlorhydrate de doxépine dans les conditions optimisées.*



*Figure 29. Chromatogramme obtenu avec le dichlorhydrate de flupentixol avec la méthode Ph. Eur.*



*Figure 30. Chromatogramme obtenu avec le dichlorhydrate de flupentixol sur colonne CGP dans les conditions optimisées.*



*Figure 31. Electrophérogramme obtenu avec le dichlorhydrate de flupentixol dans les conditions optimisées.*

## 7. Conclusion

L'objectif de ce travail consacré à la séparation d'isomères *Z-E* était, dans un premier temps, d'effectuer un recensement précis des diverses techniques analytiques déjà employées dans ce domaine, puis d'utiliser deux méthodologies différentes pour parvenir à la séparation des 2 isomères de 3 analytes distincts, et enfin de comparer les résultats, avantages et inconvénients respectifs de celles-ci. Les méthodes imposées par la Pharmacopée Européenne ont également été mises en œuvre dans cette optique.

A l'inverse des techniques « classiques » de CLHP de partage, où la théorie gouvernant la séparation est bien connue, les méthodes chromatographiques basées sur des phases stationnaires au CGP apparaissent, du fait de la dualité du mécanisme de rétention, relativement complexes à développer. Cependant, il ne faut pas occulter les nombreuses qualités de ce type particulier de support, notamment sa gamme étendue de pH d'utilisation (0-14) et sa grande résistance mécanique et chimique. Ses propriétés structurales particulières expliquent pourquoi l'usage de ce type de matériau devrait tendre à se généraliser de plus en plus dans l'avenir, surtout dans le domaine de la séparation d'isomères, bien que la tendance actuelle est d'essayer de ne développer qu'une méthode unique pour l'identification et la quantification des substances apparentées et du couple d'isomères *Z-E*.

Nos 3 entités, bien que présentant des structures chimiques différentes, ont été analysées en utilisant des paramètres électrophorétiques très similaires. Seule la concentration en sélecteur (en l'occurrence la TRIMEB) doit être changée dans certains cas. Comme c'est bien souvent le cas en électrophorèse capillaire, le développement fut relativement aisé, surtout en comparaison avec la méthode CGP.

Les méthodes analytiques envisagées avec succès pour le citrate de clomifène, le chlorhydrate de doxépine et le dichlorhydrate de flupentixol semblent, sous réserve d'éventuelles modifications mineures, transposables à d'autres analytes possédant des caractéristiques structurales voisines. Elles permettent pour les 3 molécules envisagées de réduire considérablement le temps nécessaire à l'analyse, tout en obtenant une séparation de

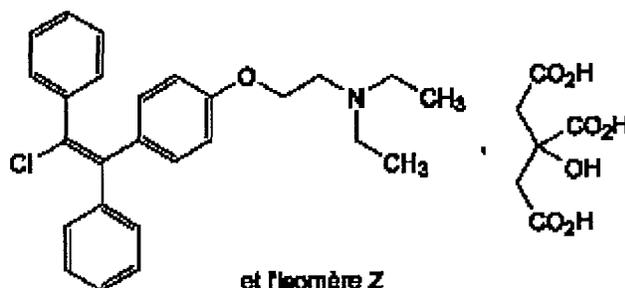
qualité ( $R_s$  supérieures ou comparables à celles des méthodes Ph. Eur.). Dans le cas du clomifène, un autre avantage peut être mis en exergue : la préparation de l'échantillon est beaucoup plus facile (simple dissolution) que selon la méthode Ph. Eur., qui nécessite 3 extractions suivies d'un séchage.

Des essais sont actuellement en cours sur un autre neuroleptique de structure voisine du flupentixol, le clopenthixol (LUNDBECK), afin de confirmer les enseignements tirés de ce travail. La réflexion pourra également être prolongée par une analyse des interactions soluté – surface du CGP par modélisation moléculaire, afin de pouvoir expliquer l'ordre d'élution des analytes.

# Annexe

## Clomifène (CITRATE DE)

Clomifeni citras



$C_{32}H_{36}ClNO_8$   
 $M_r$  598,1

### DÉFINITION

Le citrate de clomifène contient au minimum 98,0 pour cent et au maximum l'équivalent de 101,0 pour cent d'un mélange des isomères *E* et *Z* du dihydrogénocitrate de 2-[4-(2-chloro-1,2-diphényléthényl)phénoxy]-*N,N*-diéthyléthanamine, calculé par rapport à la substance anhydre.

### CARACTÈRES

Poudre cristalline, blanche à jaune pâle, peu soluble dans l'eau, assez soluble dans l'alcool.

### IDENTIFICATION

- A. Examinez le citrate de clomifène par spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (2.2.24), en comparant avec le spectre obtenu avec le citrate de clomifène SCR. Examinez les substances sous forme de pastilles à base de bromure de potassium R.
- B. Dissolvez 5 mg environ de citrate de clomifène dans 5 ml d'un mélange de 1 volume d'anhydride acétique R et de 5 volumes de pyridine R, puis chauffez au bain-marie. Il apparaît une coloration rouge intense.

### ESSAI

Préparez les solutions à l'abri de la lumière, dans des flacons de verre brun. Veillez à réduire au minimum l'exposition à la lumière du jour jusqu'au moment de l'analyse chromatographique.

**Substances apparentées.** Opérez par chromatographie liquide (2.2.29).

**Solution à examiner.** Dissolvez 12,5 mg de citrate de clomifène dans la phase mobile et complétez à 10,0 ml avec la phase mobile.

**Solution témoin (a).** Dissolvez 12,5 mg de citrate de clomifène pour essai de validité SCR dans la phase mobile et complétez à 10,0 ml avec la phase mobile.

**Solution témoin (b).** Prélevez 1,0 ml de solution à examiner et complétez à 50,0 ml avec la phase mobile.

La chromatographie peut être réalisée en utilisant :

- une colonne d'acier inoxydable, d'une longueur de 0,25 m et d'un diamètre intérieur de 4,6 mm, remplie de gel de silice butylsilylé pour chromatographie R (5 µm),
- comme phase mobile, à un débit de 1,2 ml/min, un mélange préparé comme suit : mélangez 400 ml d'acétonitrile R avec 600 ml d'eau R et ajoutez 8,0 ml de diéthylamine R ; ajustez à pH 6,2 à l'aide de 1 ml à 2 ml environ d'acide

phosphorique R, en réduisant progressivement les volumes ajoutés lorsque l'on approche du pH recherché,

- comme détecteur, un spectrophotomètre réglé à 233 nm.

Equilibrez la colonne avec la phase mobile à un débit de 1,2 ml/min pendant 1 h environ.

Ajustez la sensibilité du système de façon que la hauteur du pic principal du chromatogramme obtenu avec 10 µl de solution témoin (b) représente 50 pour cent au minimum de l'échelle totale de l'enregistreur.

Injectez 10 µl de solution témoin (a). Continuez la chromatographie pendant 2 fois le temps de rétention du pic principal. Mesurez la hauteur (A) au-dessus de la ligne de base du pic dû à l'impureté A et la hauteur (B) au-dessus de la ligne de base du point le plus bas du tracé entre ce pic et celui correspondant au clomifène. L'essai n'est valable que si le rapport A/B est supérieur à 15 et si le chromatogramme obtenu est semblable au chromatogramme de référence. Si nécessaire, ajustez la concentration de la phase mobile en acétonitrile.

Injectez séparément 10 µl de solution à examiner et 10 µl de solution témoin (b). Continuez la chromatographie pendant 4 fois le temps de rétention du pic principal. S'il apparaît, dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, un pic dû à l'impureté A, sa surface n'est pas supérieure à la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (2,0 pour cent). S'il apparaît d'autres pics que le pic principal dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, la surface d'aucun d'entre eux n'est supérieure à la moitié de la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (1,0 pour cent) et la somme de leur surface n'est pas supérieure à 1,25 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (2,5 pour cent). Ne tenez pas compte des pics dont le temps de rétention relatif, par rapport au pic principal, est inférieur à 0,2 ni des pics dont la surface est inférieure à 0,025 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b).

**Isomère Z.** Opérez par chromatographie liquide (2.2.29).

*Solution à examiner.* Dissolvez 25 mg de citrate de clomifène dans 25 ml d'acide chlorhydrique 0,1 M, ajoutez 5 ml d'hydroxyde de sodium 1 M et agitez avec 3 fois 25 ml de chloroforme exempt d'éthanol R. Réunissez les extraits et lavez avec 10 ml d'eau R, puis séchez sur du sulfate de sodium anhydre R et complétez à 100 ml avec du chloroforme exempt d'éthanol R. A 20 ml de cette solution, ajoutez 0,1 ml de triéthylamine R et complétez à 100 ml avec de l'hexane R.

*Solution témoin.* Dissolvez 25 mg de citrate de clomifène SCR dans 25 ml d'acide chlorhydrique 0,1 M, ajoutez 5 ml d'hydroxyde de sodium 1 M et agitez avec 3 fois 25 ml de chloroforme exempt d'éthanol R. Réunissez les extraits et lavez avec 10 ml d'eau R, puis séchez sur du sulfate de sodium anhydre R et complétez à 100 ml avec du chloroforme exempt d'éthanol R. A 20 ml de cette solution, ajoutez 0,1 ml de triéthylamine R et complétez à 100 ml avec de l'hexane R.

La chromatographie peut être réalisée en utilisant :

- une colonne d'acier inoxydable, d'une longueur de 0,3 m et d'un diamètre intérieur de 4 mm, remplie de gel de silice pour chromatographie R (10 µm),
- comme phase mobile, à un débit de 2 ml/min, un mélange de 1 volume de triéthylamine R, de 200 volumes de chloroforme exempt d'éthanol R et de 800 volumes d'hexane R,
- comme détecteur, un spectrophotomètre réglé à 302 nm.

Equilibrez la colonne avec la phase mobile pendant 2 h environ. Injectez 50 µl de solution témoin. Le chromatogramme obtenu présente un pic dû à l'isomère *E* immédiatement suivi d'un pic dû à l'isomère *Z*. L'essai n'est valable que si la résolution entre les pics correspondant aux isomères *E* et *Z* n'est pas inférieure à 1,0. Si nécessaire, ajustez les proportions relatives de chloroforme exempt d'éthanol et d'hexane dans la phase mobile. Mesurez la surface du pic correspondant à l'isomère *Z* dans les chromatogrammes obtenus respectivement avec la solution à examiner et la solution témoin. Calculez la teneur en isomère *Z*, exprimée en teneur pour cent de la quantité totale de citrate de clomifène, d'après la teneur déclarée du citrate de clomifène SCR. La teneur en isomère *Z* du citrate de clomifène est de 30,0 pour cent à 50,0 pour cent.

**Eau (2.5.12).** Déterminée par semi-microdosage sur 1,000 g de citrate de clomifène, la teneur en eau n'est pas supérieure à 1,0 pour cent.

#### DOSAGE

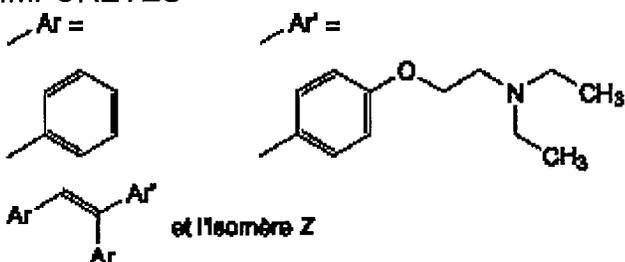
Dissolvez 0,500 g de citrate de clomifène dans 50 ml d'acide acétique anhydre R. Titrez par l'acide perchlorique 0,1 M. Déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie (2.2.20).

1 ml d'acide perchlorique 0,1 M correspond à 59,81 mg de  $C_{32}H_{36}ClNO_8$ .

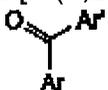
#### CONSERVATION

A l'abri de la lumière.

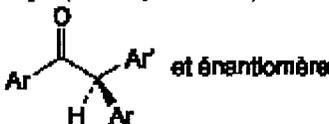
#### IMPURETÉS



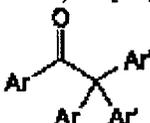
A. 2-[4-(1,2-diphényléthényl)phénoxy]-*N,N*-diéthyléthanamine,



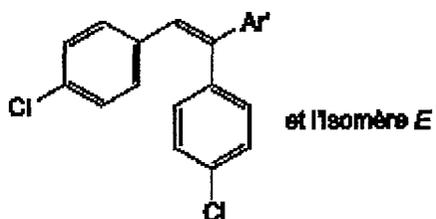
B. [4-[2-(diéthylamino)éthoxy]phényl]phénylméthanone,



C. (2*RS*)-2-[4-[2-(diéthylamino)éthoxy]phényl]-1,2-diphényléthanone,

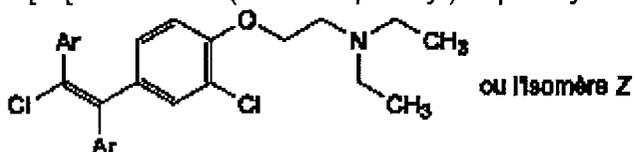


D. 2,2-bis[4-[2-(diéthylamino)éthoxy]phényl]-1,2-diphényléthanone,



E. 2-[4-[1,2-bis(4-chlorophényl)éthényl]phénoxy]-*N,N*-diéthyléthanamine,

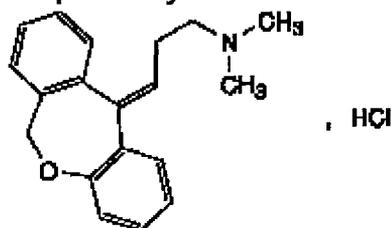
F. 2-[4-[2-chloro-2-(4-chlorophényl)-1-phényléthényl]phénoxy]-*N,N*-diéthyléthanamine,



GH. 2-[2-chloro-4-(2-chloro-1,2-diphényléthényl)phénoxy]-*N,N*-diéthyléthanamine (G. isomère à point de fusion supérieur ; H. isomère à point de fusion inférieur).

## Doxépine (CHLORHYDRATE DE)

### Doxepini hydrochloridum



$C_{19}H_{22}ClNO$   
 $M_r$  315,8

#### DÉFINITION

Le chlorhydrate de doxépine est le chlorhydrate de (*E*)-3-(dibenzo[*b,e*]oxépin-11(6*H*)-ylidène)-*N,N*-diméthylpropan-1-amine. Il contient au minimum 98,0 pour cent et au maximum l'équivalent de 101,0 pour cent de  $C_{19}H_{22}ClNO$ , calculé par rapport à la substance desséchée.

#### CARACTÈRES

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, facilement soluble dans l'eau, dans l'alcool et dans le chlorure de méthylène.

#### IDENTIFICATION

Première identification : C, E.

Seconde identification : A, B, D, E.

- Le point de fusion (2.2.14) du chlorhydrate de doxépine est de 185 °C à 191 °C.
- Dissolvez 50,0 mg de chlorhydrate de doxépine dans une solution d'acide chlorhydrique R à 1 g/l dans le méthanol R et complétez à 100,0 ml avec la même solution acide. Prélevez 5,0 ml de solution et complétez à 50,0 ml avec une solution d'acide chlorhydrique R à 1 g/l dans le méthanol R. Examinée de 230 nm à 350 nm (2.2.25), la solution présente un maximum d'absorption à 297 nm. L'absorbance spécifique au maximum est de 128 à 142.
- Examinez le chlorhydrate de doxépine par spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (2.2.24), en comparant avec le spectre de référence du chlorhydrate de doxépine de la Ph. Eur.
- Dissolvez environ 5 mg de chlorhydrate de doxépine dans 2 ml d'acide sulfurique R. Il apparaît une coloration rouge foncé.
- La solution S (voir Essai) donne la réaction (a) des chlorures (2.3.1).

#### ESSAI

**Solution S.** Dissolvez 1,5 g de chlorhydrate de doxépine dans de l'eau exempte de dioxyde de carbone R et complétez à 30 ml avec le même solvant.

**Aspect de la solution.** Prélevez 10 ml de solution S et complétez à 25 ml avec de l'eau R. La solution est limpide (2.2.1) et incolore (2.2.2, Procédé II).

**Acidité.** A 10 ml de solution S, ajoutez 0,1 ml de solution de rouge de méthyle R. Le virage de l'indicateur au jaune ne nécessite pas plus de 0,1 ml d'hydroxyde de sodium 0,1 M.

**Substances apparentées.** Opérez par chromatographie sur couche mince (2.2.27) en utilisant une plaque au gel de silice F<sub>254</sub> pour CCM R (2-10 µm) avec une zone de concentration.

*Solution à examiner.* Dissolvez 0,10 g de chlorhydrate de doxépine dans du méthanol R et complétez à 10 ml avec le même solvant.

*Solution témoin (a).* Dissolvez 10,0 mg d'impureté A de doxépine SCR dans du méthanol R, ajoutez 1 ml de solution à examiner et complétez à 10 ml avec du méthanol R. Prélevez 1,0 ml de solution et complétez à 50 ml avec du méthanol R.

*Solution témoin (b).* Dissolvez 10,0 mg d'impureté B de doxépine SCR dans du méthanol R, ajoutez 1 ml de solution à examiner et complétez à 10 ml avec du méthanol R. Prélevez 1,0 ml de solution et complétez à 50 ml avec du méthanol R.

*Solution témoin (c).* Dissolvez 10,0 mg d'impureté B de doxépine SCR dans du méthanol R et complétez à 200 ml avec le même solvant.

Déposez sur une première plaque (plaque A) 2 µl de solution à examiner et 2 µl de solution témoin (a). Développez sur un parcours de 5 cm en utilisant un mélange de 30 volumes de méthyléthylcétone R et de 60 volumes d'heptane R. Dans ce système chromatographique, la doxépine ne migre pas.

Déposez sur une seconde plaque (plaque B) 2 µl de solution à examiner et 2 µl des solutions témoins (b) et (c). Développez sur un parcours de 5 cm en utilisant un mélange de 10 volumes de méthanol R et de 90 volumes de chlorure de méthylène R.

Faites sécher les plaques à l'air. Pulvérisez une solution préparée de la façon suivante : dissolvez 20 g de chlorure de zinc R dans 30 ml d'acide acétique glacial R, ajoutez 3 ml d'acide phosphorique R et 0,80 ml de solution concentrée de peroxyde d'hydrogène R et complétez à 60 ml avec de l'eau R. Chauffez les plaques à 120 °C pendant 15 min et examinez-les immédiatement en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Plaque A.* S'il apparaît une tache correspondant à l'impureté A dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, elle n'est pas plus intense que la tache correspondante du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,2 pour cent). S'il apparaît d'autres taches que la tache principale et la tache correspondant à l'impureté A dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, aucune d'entre elles n'est plus intense que les taches du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,2 pour cent).

*Plaque B.* S'il apparaît une tache correspondant à l'impureté C ( $R_f$  d'environ 0,12) dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, elle n'est pas plus intense que la tache du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) (0,5 pour cent). S'il apparaît une tache correspondant à l'impureté B dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, elle n'est pas plus intense que la tache correspondante du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,2 pour cent) ; s'il apparaît d'autres taches que la tache principale ou la tache correspondant à l'impureté B ou la tache correspondant à l'impureté C, dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, aucune d'entre elles n'est plus intense que les taches du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,2 pour cent).

L'essai n'est valable que si les chromatogrammes obtenus avec les solutions témoins (a) et (b) présentent des taches principales nettement visibles et nettement séparées.

**Isomère Z.** Opérez par chromatographie liquide (2.2.29).

**Solution à examiner.** Dissolvez 20,0 mg de chlorhydrate de doxépine dans la phase mobile et complétez à 20,0 ml avec la phase mobile. Prélevez 1,0 ml de solution et complétez à 10,0 ml avec la phase mobile.

La chromatographie peut être réalisée en utilisant :

- une colonne d'acier inoxydable, d'une longueur de 0,12 m et d'un diamètre intérieur de 4 mm, remplie de gel de silice octylsilylé pour chromatographie R (5 µm) à particules sphériques présentant une surface spécifique de 220 m<sup>2</sup>/g et un diamètre de pores de 80 nm,
- comme phase mobile, à un débit de 1 ml/min, un mélange de 30 volumes de méthanol R et de 70 volumes d'une solution de phosphate monosodique R à 30 g/l préalablement ajustée à pH 2,5 avec de l'acide phosphorique R,
- comme détecteur, un spectrophotomètre réglé à 254 nm, en maintenant la température de la colonne à 50 °C.

Injectez 20 µl de solution à examiner. Ajustez la sensibilité du système de façon que la hauteur du pic principal représente au moins 50 pour cent de l'échelle totale de l'enregistreur. L'essai n'est valable que si la résolution entre le premier pic (isomère *E*) et le second pic (isomère *Z*) n'est pas inférieure à 1,5.

Calculez le rapport entre la surface du pic dû à l'isomère *E* et la surface du pic dû à l'isomère *Z*. Ce rapport est de 4,4 à 6,7 (13,0 pour cent à 18,5 pour cent d'isomère *Z*).

**Métaux lourds (2.4.8).** 1,0 g de chlorhydrate de doxépine satisfait à l'essai limite D (20 ppm). Préparez le témoin avec 2 ml de solution à 10 ppm de plomb (Pb) R.

**Perte à la dessiccation (2.2.32).** Déterminée à l'étuve à 100-105 °C sur 1,000 g de chlorhydrate de doxépine, la perte à la dessiccation n'est pas supérieure à 0,5 pour cent.

**Cendres sulfuriques (2.4.14).** Déterminé sur 1,0 g de chlorhydrate de doxépine, le taux des cendres sulfuriques n'est pas supérieur à 0,1 pour cent.

#### DOSAGE

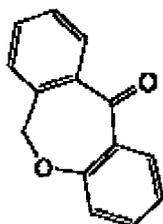
Dissolvez 0,250 g de chlorhydrate de doxépine dans un mélange de 5 ml d'acide acétique anhydre R et de 35 ml d'anhydride acétique R. Titrez par l'acide perchlorique 0,1 M en présence de 0,2 ml de solution de violet cristallisé R jusqu'à virage du bleu au vert.

1 ml d'acide perchlorique 0,1 M correspond à 31,58 mg de C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>ClNO.

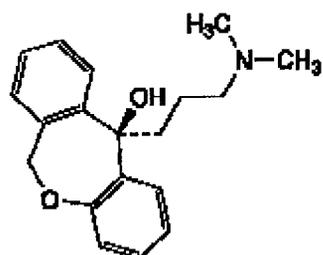
#### CONSERVATION

A l'abri de la lumière.

#### IMPURETÉS

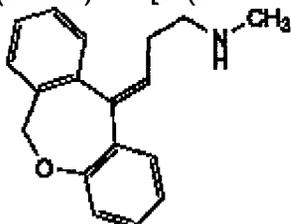


A. dibenzo[b,e]oxépin-11(6H)-one,

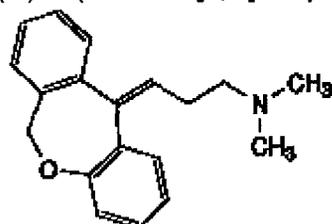


et énantiomère.

B. (11*RS*)-11-[3-(diméthylamino)propyl]-6,11-dihydrodibenzo[*b,e*]oxépin-11-ol,



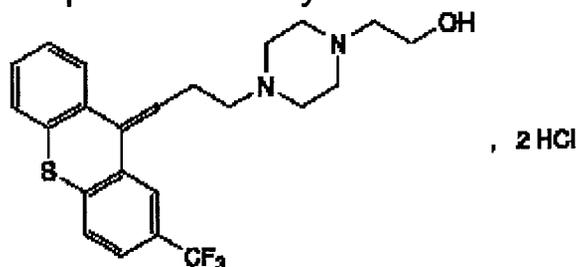
C. (*E*)-3-(dibenzo[*b,e*]oxépin-11(6*H*)-ylidène)-*N*-méthylpropan-1-amine,



D. (*Z*)-3-(dibenzo[*b,e*]oxépin-11(6*H*)-ylidène)-*N,N*-diméthylpropan-1-amine.

## Flupentixol (DICHLORHYDRATE DE)

Flupentixoli dihydrochloridum



$C_{23}H_{27}Cl_2F_3N_2OS$   
 $M_r$  507,4

### DÉFINITION

Dichlorhydrate de 2-[4-[3-[(*EZ*)-2-(trifluorométhyl)-9*H*-thioxanthén-9-ylidène]propyl]pipérazin-1-yl]éthanol.

*Teneur* :

- dichlorhydrate de flupentixol : 98,0 pour cent à 101,5 pour cent (substance desséchée),
- isomère *Z* : 42,0 pour cent à 52,0 pour cent.

### CARACTÈRES

*Aspect* : poudre blanche ou sensiblement blanche.

*Solubilité* : très soluble dans l'eau, soluble dans l'alcool, pratiquement insoluble dans le chlorure de méthylène.

### IDENTIFICATION

*Première identification* : A, D.

*Seconde identification* : B, C, D.

A. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (2.2.24).

*Comparaison* : dichlorhydrate de flupentixol SCR.

B. Chromatographie sur couche mince (2.2.27).

*Solution à examiner*. Dissolvez 20 mg de dichlorhydrate de flupentixol dans du méthanol R et complétez à 10 ml avec le même solvant.

*Solution témoin*. Dissolvez 20 mg de dichlorhydrate de flupentixol SCR dans du méthanol R et complétez à 10 ml avec le même solvant.

*Plaque* : plaque au gel de silice F<sub>254</sub> pour CCM R.

*Phase mobile* : eau R, diéthylamine R, méthyléthylcétone R (1:4:95 V/V/V).

*Dépôt* : 2 µl.

*Développement* : 2 fois sur un parcours de 15 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection A* : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.

*Résultats A* : la tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à sa position et ses dimensions à la tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Un dédoublement de cette tache peut être observé dans les 2 chromatogrammes.

*Détection B* : pulvérisez de la solution alcoolique d'acide sulfurique R ; chauffez à 110 °C pendant 5 min et laissez refroidir ; examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

*Résultats B* : la tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à sa position et ses dimensions à la tache principale

du chromatogramme obtenu avec la solution témoin. Un dédoublement de cette tache peut être observé dans les 2 chromatogrammes.

- C. Mélangez environ 5 mg de dichlorhydrate de flupentixol et 45 mg d'oxyde de magnésium lourd R et calcinez dans un creuset jusqu'à obtention d'un résidu pratiquement blanc (normalement moins de 5 min). Laissez refroidir, ajoutez 1 ml d'eau R, puis 0,05 ml de solution de phénolphtaléine R1 et environ 1 ml d'acide chlorhydrique dilué R pour rendre la solution incolore. Filtrez. Au filtrat, ajoutez un mélange récemment préparé de 0,1 ml de solution d'alizarine S R et de 0,1 ml de solution de nitrate de zirconyle R. Mélangez, laissez reposer pendant 5 min et comparez la coloration de la solution à celle d'une solution à blanc préparée de la même manière. La solution à examiner est jaune. La solution à blanc est rouge.
- D. Le dichlorhydrate de flupentixol donne la réaction (a) des chlorures (2.3.1).

### ESSAI

**Aspect de la solution.** La solution est limpide (2.2.1) et n'est pas plus fortement colorée que la solution témoin JV<sub>6</sub> (2.2.2, Procédé II).

Dissolvez 2,0 g de dichlorhydrate de flupentixol dans de l'eau R et complétez à 20 ml avec le même solvant.

**pH (2.2.3) :** 2,0 à 3,0.

Dissolvez 0,5 g de dichlorhydrate de flupentixol dans de l'eau exempte de dioxyde de carbone R et complétez à 50 ml avec le même solvant.

**Substances apparentées.** Chromatographie sur couche mince (2.2.27). Effectuez l'essai à l'abri de la lumière et préparez les solutions immédiatement avant l'emploi.

**Solution à examiner (a).** Dissolvez 0,40 g de dichlorhydrate de flupentixol dans de l'alcool R et complétez à 20 ml avec le même solvant.

**Solution à examiner (b).** Prélevez 2,0 ml de solution à examiner (a) et complétez à 20,0 ml avec de l'alcool R.

**Solution témoin (a).** Prélevez 1,0 ml de solution à examiner (b) et complétez à 50,0 ml avec de l'alcool R.

**Solution témoin (b).** Prélevez 2,0 ml de solution témoin (a) et complétez à 20,0 ml avec de l'alcool R.

**Solution témoin (c).** Dissolvez 10 mg d'impureté D de flupentixol SCR dans de l'alcool R, ajoutez 0,5 ml de solution à examiner (a) et complétez à 20,0 ml avec de l'alcool R.

**Plaque :** plaque au gel de silice F<sub>254</sub> pour CCM R.

**Phase mobile :** diéthylamine R, toluène R, acétate d'éthyle R (10:20:70 V/V/V).

**Dépôt :** 5 µl.

**Développement :** dans une chambre non saturée, sur un parcours de 10 cm.

**Séchage :** à l'air.

**Détection :** pulvérisez de la solution alcoolique d'acide sulfurique R, chauffez à 110 °C pendant 5 min et laissez refroidir ; examinez en lumière ultraviolette à 365 nm. Un dédoublement de la tache due au flupentixol peut être observé.

**Conformité du système :** le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) présente 2 taches nettement séparées.

**Limites :**

- dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (a) : s'il apparaît d'autres taches que la tache principale, aucune d'entre elles n'est plus intense que la

(ou les) tache(s) du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,2 pour cent),

- dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (b) : s'il apparaît d'autres taches que la tache principale, aucune d'entre elles n'est plus intense que la (ou les) tache(s) du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,2 pour cent).

**Impureté F.** Chromatographie liquide (2.2.29). Effectuez l'essai à l'abri de la lumière et préparez les solutions immédiatement avant l'emploi.

*Solution à examiner.* Dissolvez 20,0 mg de dichlorhydrate de flupentixol dans la phase mobile et complétez à 20,0 ml avec la phase mobile.

*Solution témoin.* Dissolvez 10,0 mg de dichlorhydrate de flupentixol SCR et 10,0 mg d'impureté F de flupentixol SCR dans la phase mobile et complétez à 100,0 ml avec la phase mobile. Prélevez 1,0 ml de solution et complétez à 20,0 ml avec la phase mobile.

*Colonne :*

- *dimensions :*  $l = 0,125$  m,  $\varnothing = 4,6$  mm,
  - *phase stationnaire :* gel de silice octylsilylé pour chromatographie R (3  $\mu$ m).
- Phase mobile :* mélangez 10 volumes d'acétonitrile R, 55 volumes de méthanol R et 35 volumes d'une solution contenant 8,72 g/l de phosphate monopotassique R, 0,37 g/l de phosphate disodique anhydre R et 0,77 g/l de bromure de dodécyltriméthylammonium R.

*Débit :* 1,0 ml/min.

*Détection :* spectrophotomètre à 270 nm.

*Injection :* 20  $\mu$ l.

*Conformité du système :* solution témoin :

- *résolution :* au minimum 2,0 entre le 2<sup>nd</sup> des pics dus à l'impureté F et le 1<sup>er</sup> des pics dus au flupentixol. Un dédoublement des pics n'est pas toujours observé.

*Limite :*

- *impureté F :* au maximum la surface du (ou des) pic(s) correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (0,5 pour cent).

**Métaux lourds** (2.4.8) : au maximum 20 ppm.

1,0 g de dichlorhydrate de flupentixol satisfait à l'essai limite C. Préparez le témoin avec 2 ml de solution à 10 ppm de plomb (Pb) R.

**Perte à la dessiccation** (2.2.32) : au maximum 2,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 100-105 °C sur 1,000 g de dichlorhydrate de flupentixol.

**Cendres sulfuriques** (2.4.14) : au maximum 0,1 pour cent, déterminé sur 1,0 g de dichlorhydrate de flupentixol dans un creuset de platine.

## DOSAGE

**Dichlorhydrate de flupentixol.** Dissolvez 0,200 g de dichlorhydrate de flupentixol dans 30 ml d'alcool R. Titrez par l'hydroxyde de sodium 0,1 M et tracez la courbe potentiométrique (2.2.20). Mesurez le volume d'hydroxyde de sodium 0,1 M utilisé entre les 2 points d'inflexion.

1 ml d'hydroxyde de sodium 0,1 M correspond à 50,74 mg de  $C_{23}H_{27}Cl_2F_3N_2OS$ .

**Isomère Z.** Chromatographie liquide (2.2.29).

*Solution à examiner.* Dissolvez 20,0 mg de dichlorhydrate de flupentixol dans la phase mobile et complétez à 50,0 ml avec la phase mobile.

*Solution témoin.* Dissolvez 20,0 mg de dichlorhydrate de flupentixol SCR dans la phase mobile et complétez à 50,0 ml avec la phase mobile.

*Colonne :*

— *dimensions :*  $l = 0,25$  m,  $\varnothing = 4,0$  mm,

— *phase stationnaire :* gel de silice pour chromatographie R (5  $\mu$ m).

*Phase mobile :* eau R, ammoniaque concentrée R, 2-propanol R, heptane R (2:4:150:850 V/V/V).

*Débit :* 1,5 ml/min.

*Détection :* spectrophotomètre à 254 nm.

*Injection :* 20  $\mu$ l.

*Conformité du système :* solution témoin :

— *résolution :* au minimum 3,0 entre les pics dus à l'isomère Z (1<sup>er</sup> pic) et à l'isomère E (2<sup>e</sup> pic).

*Résultats :*

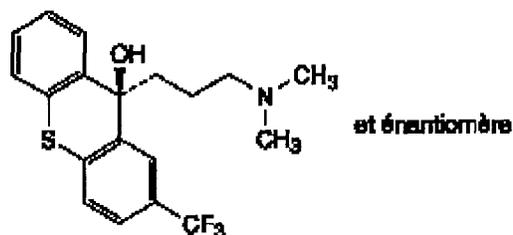
— calculez la teneur pour cent de l'isomère Z en tenant compte de la teneur déclarée en isomère Z dans le dichlorhydrate de flupentixol SCR,

— calculez le rapport entre la surface du pic dû à l'isomère E et celle du pic dû à l'isomère Z : ce rapport est de 0,9 à 1,4.

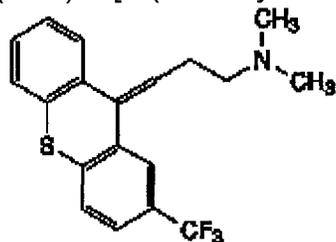
## CONSERVATION

A l'abri de la lumière.

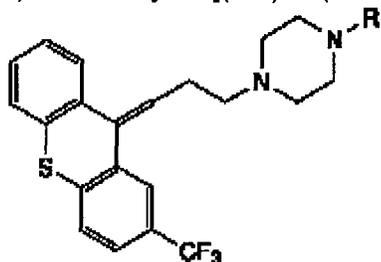
## IMPURETÉS



A. (9RS)-9-[3-(diméthylamino)propyl]-2-(trifluorométhyl)-9H-thioxanthén-9-ol,



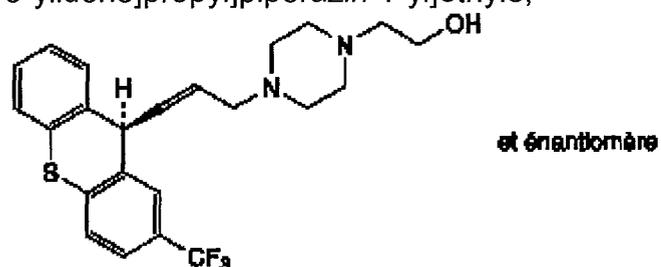
B. N,N-diméthyl-3-[(EZ)-2-(trifluorométhyl)-9H-thioxanthén-9-ylidène]propan-1-amine,



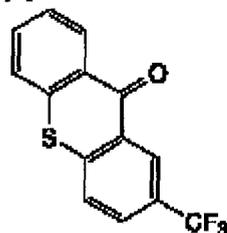
C. R = H : 1-[3-[(EZ)-2-(trifluorométhyl)-9H-thioxanthén-9-ylidène]propyl]pipérazine,

D. R = CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH : 2-[2-[4-[3-[(EZ)-2-(trifluorométhyl)-9H-thioxanthén-9-ylidène]propyl]pipérazin-1-yl]éthoxy]éthanol,

E. R = CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CO-CH<sub>3</sub> : acétate de 2-[4-[3-[(*EZ*)-2-(trifluorométhyl)-9*H*-thioxanthén-9-ylidène]propyl]pipérazin-1-yl]éthyle,



F. 2-[4-[(*EZ*)-3-[(9*RS*)-2-(trifluorométhyl)-9*H*-thioxanthén-9-yl]prop-2-ényl]pipérazin-1-yl]éthanol,



G. 2-(trifluorométhyl)-9*H*-thioxanthén-9-one.

# Bibliographie

Adam, W. ; Halasz, J. ; Jambor, Z. ; Levai, A. ; Nemes, C. ; Patonay, T. ; Toth, G. Synthesis and stereochemistry of the epoxides of 2-arylmethylidene-1-tetralones. *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1*. 1996, 4, 395-400.

Adoubel, A.A. ; Guenu, S. ; Elfakir, C. ; Dreux, M. Separation of underivatized small peptides on a PGC column by ion-pair chromatography and evaporative light scattering detection. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* 2000, 23, 2433-2466.

Allen, R.E. ; Palopoli, F.P. ; Schumann, E.L. ; Van Campen, M.G. Jr. US Patent 2,914,563.

Armstrong, R.D. ; Ward, T.J. ; Pattabiraman, N. ; Benz, C. ; Armstrong, D.W. Separation of tamoxifen geometric isomers and metabolites by bonded-phase- $\beta$ -cyclodextrin chromatography. *J. Chromatogr.* 1987, 414, 192-196.

Bamba, T. ; Fukusaki, E. ; Nakazawa, Y. ; Kobayashi, A. Rapid and high-resolution analysis of geometric polyprenol homologues by connected octadecylsilylated monolithic silica columns in high-performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 293-296.

Bassler, B.J. ; Kaliszan, R. ; Hartwick, R.A. Retention mechanisms on metallic stationary phases. *J. Chromatogr.* 1989, 461, 139-147.

Baustian, C.L. ; Mikkelsen, T.J. Analysis of clomiphene isomers in human plasma and detection of metabolites using reversed-phase chromatography and fluorescence detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1986, 4, 237-246.

Bell, C. ; Tsai, E.W. ; Ip, D.P. ; Mathre, D.J. Direct isomeric separation of a 3-hydroxyproline-containing prodrug, L-693 989 by high-performance liquid chromatography with a porous graphitic carbon column. *J. Chromatogr. A*. 1994, 675, 248-252.

Bempong, D.K. ; Honigberg, I.L. ; Meltzer, N.M. Normal phase LC-MS determination of retinoic acid degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1995, 13, 285-291.

Bempong, D.K. ; Honigberg, I.L. Multivariate analysis of capillary electrophoresis separation conditions for *Z-E* isomers of clomiphene. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1996, 15, 233-239.

Berthod, A. ; Li, W. ; Armstrong, D.W. Multiple enantioselective retention mechanisms on derivatized cyclodextrin gas chromatographic chiral stationary phases. *Anal. Chem.* 1992, 64, 873-879.

Bloom, B.M. ; Tretter, J.R. US Patent 3,420,851.

Braumann, U. ; Handel, H. ; Strohschein, S. ; Spraul, M. ; Krack, G. ; Ecker, R. ; Albert, K. Separation and identification of vitamin A acetate isomers by supercritical fluid chromatography-<sup>1</sup>H NMR coupling. *J. Chromatogr. A* 1997, 761, 336-340.

Cahn, R.S. ; Ingold, C.K. ; Prelog, V. Specification of molecular chirality. *Angew. Chem.* 1966, 78, 413-447.

Caude, M. ; Jardy, A. Chromatographie en phase liquide. Théorie et méthodes de séparation. *In* : Techniques de l'ingénieur, P 1455-7.

Chankvetadze, B. Capillary electrophoresis in chiral analysis. John Wiley & Sons, 1997.

Chen, Y. ; Wang, Y. ; Wang, Z. Reversed ion-pair chromatography for tamoxifen citrate. *Sepu.* 1987, 5, 388-393.

Christie, W.W. ; Dobson, G. ; Gunstone, F.D. Isomers in commercial samples of conjugated linoleic acid. *Lipids.* 1997, 32, 1231.

Ciccioli, P. ; Tappa, R. ; Di Corcia, A. ; Liberti, A. Graphitized carbon black column for high performance chromatography. *J. Chromatogr.* 1981, 206, 35-42.

Clarot, I. ; Duroch, A. ; Netter, P. ; Nicolas, A. Separation of geometrical isomers of doxepin hydrochloride and clomiphene citrate in HPLC with a porous graphite carbon stationary phase. Congrès SFC-EuroChem Nancy 2005 – UHP.

Colin, H. ; Eeon, C. ; Guiochon, G. Modified carbon black in high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1976, 119, 41-54.

Colin, H. ; Guiochon, G. The solvent eluotropic strength on carbon adsorbents. *Chromatographia.* 1982, 15, 133-139.

Coudore, F. ; Ardid, D. ; Eschalier, A. ; Lavarenne, J. ; Fialip, J. High-performance liquid chromatographic determination of amitriptyline and its main metabolites using a silica column with reversed-phase eluent. Application in mice. *J. Chromatogr. B.* 1992, 584, 249-255.

Craig, P.N. ; Zirkle, C.L. US Patent 3,282,930.

Cramer, F. Einschlussverbindungen der Cyclodextrine. *Angew. Chem.* 1952, 64, 136.

Cramer, F. ; Dietsche, W. Über Einschlussverbindungen, XV. Spaltung von Racematen mit Cyclodextrinen. *Chem. Ber.* 1959, 92, 2, 378-394.

Davies, M. ; Smith, K.D. ; Harbin, A.M. ; Hounsell, E.F. High-performance liquid chromatography of oligosaccharide alditols and glycopeptides on a graphitized carbon column. *J. Chromatogr.* 1992, 609, 125-131.

Demarco, P.V. ; Thakkar, A.L. Cycloheptaamylose inclusion complexes. Proton magnetic resonance study. *Chem. Commun.* 1970, 2-4.

Desportes, C. ; Charpentier, M. ; Duteurtre, B. ; Maujean, A. ; Duchiron, F. Liquid chromatographic fractionation of small peptides from wine. *J. Chromatogr. A.* 2000, 893, 281-291.

Dilger, C. ; Salama, Z. ; Jaeger, H. Improved high-performance liquid-chromatographic method for the determination of thiothixene in human serum. *Arzneimittelforsch.* 1988, 38, 1522-1555.

Drotleff, A.M. ; Ternes, W. Separation and characterization of *cis-trans* isomers of  $\alpha$ -tocotrienol by HPLC using a permethylated  $\beta$ -cyclodextrin phase. *Z Lebensm. Unters. Forsch.* 1998, 206, 9-13.

Dutton, J.K. ; Knox, J.H. ; Radisson, X. ; Ritchie, H.J. ; Ramage, R. Synthesis of 17H-tetrabenzoa,c,g,ifluorene derivatives as chiral selectors for enantiomeric separation by HPLC on porous graphitised carbon. *J. Chem. Soc. – Perkin Trans. 1.* 1995, 2581-2587.

Elfakir, C. ; Chaimbault, P. ; Dreux, M. Determination of inorganic anions on porous graphitic carbon using evaporative light scattering detection. Use of carboxylic acids as electronic competitors. *J. Chromatogr. A.* 1998, 829, 193-199.

FDA's policy statement for the development of new stereoisomeric drugs, U.S. Food and Drug Administration / CDER, published may 5<sup>th</sup> 1992, updated july 6<sup>th</sup> 2005.

Fell, A.F. ; Noctor, T.A.G. ; Mama, J.E. ; Clark, B. Computer-aided optimisation of drug enantiomer separation in chiral high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1988, 434, 377-384.

Fernandez Garcia-Borregon, P. ; Lores, M. ; Cela, R. Analysis of barbiturates by micro-high-performance liquid chromatography with post-column photochemical derivatization. *J. Chromatogr. A.* 2000, 870, 39-44.

Fish, B.J. Use of a porous graphite carbon column to separate *cis* and *trans* isomers in a novel antiasthma compound. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1993, 11, 517-521.

Forgacs, E. ; Cserhati, T. ; Valko, K. Retention behaviour of some ring-substituted phenol derivatives on a porous graphitised carbon column. *J. Chromatogr.* 1992, 592, 75-83.

Forgacs, E. ; Cserhati, T. Dependence of the retention of some barbituric acid derivatives on a porous graphitised carbon column and their physicochemical parameters. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1992, 10, 861-865.

Forgacs, E. ; Cserhati, T. Retention behaviour of some commercial pesticides on a porous graphitised carbon column. *Analyst.* 1995, 120, 1941-1944.

Freudenberg, K. ; Schaaf, E. ; Dumpert, G. ; Ploetz, T. New views on starch. *Naturwissenschaften.* 1939, 27, 850-853.

Gaudin, K. ; Chaminade, P. ; Baillet, A. Structure-retention diagrams of ceramides established for their identification. *J. Chromatogr. A.* 2002, 973, 69-83.

Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. 11<sup>th</sup> Edition, 2006.

Guenu, S. ; Hennion, M.C. Prediction from liquid chromatographic data of obligatory backflush desorption from solid-phase extraction cartridges packed with porous graphitic carbon. *J. Chromatogr. A.* 1996, 725, 57-66.

Hansen, B.B. ; Hansen, S.H. Determination of zuclopenthixol and its main N-dealkylated metabolite in biological fluids using high-performance liquid chromatography with post-column photochemical derivatization and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B.* 1994, 658, 319-25.

Hansen, S.H. ; Bjornsdottir, I. ; Tjornelund, J. Separation of cationic *cis-trans* (*Z-E*) isomers and diastereoisomers using non-aqueous capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* 1997, 792, 49-55.

Haritos, V.S. ; Ghabrial, H. ; Ahokas, J.T. ; Ching, M.S. *J. Chromatogr. B* 1999, 736, 210-208.

Hennion, M.C. ; Coquart, V. ; Guenu, S. ; Sella, C. Retention behaviour of polar compounds using porous graphitic carbon with water-rich mobile phases. *J. Chromatogr. A.* 1995, 712, 287-301.

Horak, J. ; Lindner, W. Investigations on the chromatographic behavior of hybrid reversed-phase materials containing electron donor-acceptor systems. I. Contribution of sulfur-aromatic interactions. *J. Chromatogr. A.* 2004, 1043, 177-194.

Horvath, C. ; Melander, W. ; Molnar, I. Solvophobic interactions in liquid chromatography with non polar stationary phases. *J. Chromatogr.* 1976, 125, 129-156.

Hrdina, P.D. ; Bakish, D. ; Swenson, S. ; Lapierre, Y.D. *Cis-* and *trans-*isomers of doxepin and desmethyldoxepin in the plasma of depressed patients treated with doxepin. *Ther. Drug Monit.* 1990, 12, 129-133.

Hu, Q. ; Tian, S. ; Che, B. ; Zhang, L. Determination of doxepine hydrochloride by capillary electrophoresis. *Zhongguo Yaoxue Zazhi.* 2001, 36, 842-844.

Hu, Q. ; Tian, S. ; Xu, M. Determination of doxepin hydrochloride by capillary electrophoresis. *Zhongguo Yaoxue Zazhi.* 2002, 37, 620-622.

Husain, S. ; Alvi, S.N. ; Rao, R.N. Separation and determination of *E* and *Z*-isomers of tamoxifen by ion-pair high-performance liquid chromatography. *Anal. Lett.* 1994, 27, 2485-2497.

Hybl, A. ; Rundle, R.E. ; Williams, D.E. The crystal and molecular structure of the cyclohexaamylose potassium acetate complex. *J. Am. Chem. Soc.* 1965, 87, 2779-2788.

Hypersil S.A., Application notes, Chadwick Road, Astmoor, Runcorn, Cheshire WA71PR, England.

IUPAC Compendium of Chemical terminology, 2<sup>nd</sup> edition, 1997.

Jakubowski, A. ; Pilat, K. ; Grzeskiewicz, S. ; Braczko, M. Geometric and positional isomerization during hydrogenation of soybean oil in Poland. *Tłuszcze Jadalne.* 1997, 32, 25-44.

Josefsson, M. ; Carlson, B. ; Norlander, B. Fast chromatographic separation of (-)-menthyl chloroformiate derivatives of some chiral drugs, with special reference to amlodipine, on porous graphitic carbon. *Chromatographia*. 1993, 37, 129-132.

Juvancz, Z. ; Urmos, I. ; Klebovich, I. Capillary electrophoretic separation of clomiphene isomers using various cyclodextrins as adiitives. *J. Capillary Electroph.* 1996, 3, 181-189.

Kaliszan, R. ; Osmialowski, K. ; Bassler, B. ; Hartwick, R.A. Mechanism of retention in high performance liquid chromatography on porous graphitic carbon as revealed by principal component analysis of descriptors of solutes. *J. Chromatogr. A*. 1990, 499, 333-344.

Kamiusuki, T. ; Monde, T. ; Yano, K. ; Yoko, T. ; Konakahara, T. Separation behavior of various organic compounds on branched-polyfluoroalkylsilane coated silica gel columns. *J. Chromatogr. Sci.* 1999, 37, 388-394.

Karger, B.L. ; Snyder, L.R. ; Horvath, C. An introduction to separation science. Wiley Interscience, New-York, 1973.

Karlsson, A. ; Pettersson, C. Enantiomeric separation of amines using N-benzoxycarbonylglycyl-L-proline as chiral additive and porous graphitic carbon as solid phase. *J. Chromatogr.* 1991, 543, 287-297.

Karpas, Z. ; Stimac, R.M. ; Rappoport, Z. Differentiating between large isomers and derivation of structural information by ion mobility spectrometry/mass spectrometry techniques. *Int. J. Mass Spectrom.* 1988, 83, 163-175.

Kaur, B. Thèse de PhD, University of Edinburgh, UK, 1986.

Kaur, B. The use of porous graphitic carbon in high performance liquid chromatography. *LC-GC Int.* 1989, 3,41-48.

Kiselev, A.V. ; Yashin, Y.I. Activated carbon as adsorbent in gas chromatography. *Zh. Fiz. Khim.* 1966, 40, 603-608.

Kiselev, A.V. ; Nikitin, Y.S. ; Frolov, I.I. ; Yashin, Y.I. Problems of selectivity and efficiency in liquid-solid chromatography. *J. Chromatogr.* 1974, 91, 187-200.

Kitayama, Y. ; Takahashi, M. ; Sugiyama, H. ; Kodama, T. ; Okamura, M. Gas-liquid chromatographic analysis of geometrical and positional octadecenoic and octadecadienoic acid isomers produced by catalytic hydrogenation of linoleic acid on Ir/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1998, 75, 27-32.

Knox, J.H. ; Gilbert, M.T. UK patent 7939449; US patent 4,263,268 ; FRG patent P294 6688-4.

Knox, J.H. ; Kaur, B. ; Millard, G.R. Structure and performance of porous graphitic carbon in liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1986, 352, 3-25.

Knox, J.H. ; Wan, Q.H. Chromatography of amino- and hydroxy-acids on surface modified porous graphite. *Chromatographia.* 1995, 40, 9-14.

Knox, J.H. ; Ross, P. Carbon-based packing materials for liquid chromatography : applications. *Adv.Chromatogr.* 1997, 37, 121-162. Marcel Dekker Inc.

Koizumi, K. High-performance liquid chromatography separation of carbohydrates on graphitised carbon columns. *J. Chromatogr. A.* 1996, 720, 119-126.

Kriz, J. ; Adamcova, E. ; Knox, J.A. ; Hora, J. Characterization of adsorbents by high-performance liquid chromatography using aromatic hydrocarbons. Porous graphite and its comparison with silica gel, alumina, octadecylsilica and phenylsilica. *J. Chromatogr. A.* 1994, 663, 151-161.

Lane, J.R. ; Webb, L.W. ; Acuff, R.V. Concurrent liquid chromatographic separation and photodiode array detection of retinal, tocopherols, all-*trans*- $\alpha$ -carotene, all-*trans*- $\beta$ -carotene and the mono-*cis* isomers of  $\beta$ -carotene in extracts of human plasma. *J. Chromatogr. A.* 1997, 787, 111-118.

Lange, F.J. ; Leuze, M. ; Hanack, M. *Z/E* isomerization of poly-para-phenylenevinylene model compounds. *J. Phys. Org. Chem.* 2001, 14, 474-480.

Lesellier, E. ; Gurdale, K. ; Tchaplal, A. Separation of *cis/trans* isomers of  $\beta$ -carotene by supercritical fluid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1999, 844, 307-320.

Lesellier, E. ; West, C. ; Tchaplal, A. Advantages of the use of monolithic stationary phases for modelling the retention in sub/supercritical chromatography. Application to *cis/trans*- $\beta$ -carotene separation. *J. Chromatogr. A.* 2003, 1018, 225-232.

Lim, C.K. Electronic interactions chromatography on porous graphitic carbon separation of [ $^{99m}\text{Te}$ ] pertechnetate and perhenate anions. *Biomed. Chromatogr.* 1989, 3, 92-93.

Lurie, I.S. ; Klein, R.F.X. ; Dal Cason, T.A. ; Lebel, M.J. ; Brenneisen, R. ; Weinberger, R.E. Chiral resolution of cationic drugs of forensic interest by capillary electrophoresis with mixtures of neutral and anionic cyclodextrins. *Anal. Chem.* 1994, 66, 4019-26.

Mahuzier, G. ; Hamon, M. ; Ferrier, D. ; Prognon, P. *In* : Chimie analytique, tome 2, méthodes de séparation. Masson, 3<sup>ème</sup> édition (1999).

Manns, J.E. ; Hanks, S. ; Brown, J.E. Optimised separation of *E*- and *Z*-isomers of tamoxifen, and its principal metabolites using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, 16, 847-852.

Mercier, J.P. ; Morin, P. ; Dreux, M. ; Tambute, A. Liquid chromatography analysis of phosphonic acids on porous graphitic carbon stationary phase with evaporative light-scattering and mass spectrometry detection. *J. Chromatogr. A.* 1999, 849, 197-207.

Merck Index, thirteenth edition, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA. 2001.

Mikkelsen, T.J. ; Kroboth, P.D. ; Cameron, W.J. ; Dittert, L.W. ; Chungi, V. ; Manberg, P.J. Single-dose pharmacokinetics of clomiphene citrate in normal volunteers. *Fertil. Steril.* 1986, 46, 392-396.

Mikolajczyk, M. ; Drabovich, J. ; Cramer, F. Partial resolution of sulphoxides via cyclodextrin inclusion compounds. *J. Chem. Soc. D.* 1971, 317-318.

Nakanishi, K. ; Soga, N. Phase separation in gelling silica-organic polymer solution : systems containing poly(sodium styrenesulfonate). *J. Am. Ceram. Soc.* 1991, 74, 2518-2530.

Nakanishi, K. ; Soga, N. Phase separation in silica sol-gel system containing polyacrylic acid. I. Gel formation behavior and effect of solvent composition. *J. Non-Cryst. Solids.* 1992, 139, 1-13.

Nishi, H. ; Terabe, S. Optical resolution of drugs by capillary electrophoresis techniques. *J. Chromatogr.* 1995, 694A, 245-276.

Pan, C.X. ; Xu, X.Z. ; He, H.M. ; Cai, X.J. ; Zhang, X.J. Separation and identification of *cis* and *trans* isomers of 2-butene-1,4-diol and lafutidine by HPLC and LC-MS. *J. Zhejiang. Univ. SCI.* 2005, 6B, 74-78.

Pawlak, K. ; Kay, D. ; Clark, B.J. Assay of dothiepin hydrochloride and its isomers by liquid chromatography. *Anal. Proc.* 1990, 27, 16-18.

Petersen, P.V. ; Lassen, N.O. ; Holm, T.O. US Patent 3,116,291.

Petritis, K. ; Chaimbault, P. ; Elfakir, C. ; Dreux, M. Parameter optimization for the analysis of underivatized protein amino acids by liquid chromatography and ionspray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2000, 896, 253-263.

Petro, M. ; Belliaro, F. ; Novak, I. ; Berek, D. Use of porous pyrolytic carbon for analytical and microscale high-performance liquid chromatographic bioseparations. *J. Chromatogr. B.* 1998, 718, 187-192.

Pharmacopée Européenne, 5<sup>ème</sup> Edition, EDQM, Strasbourg, France, 2005.

Piperaki, S. ; Parissi-Poulou, M. ; Koupparis, M. A separation study of tricyclic antidepressant drugs by HPLC with  $\beta$ -cyclodextrin-bonded stationary phase. *J. Liq. Chromatogr.* 1993, 16, 3487-3508.

Precht, D. ; Molkentin, J. *Trans*-geometrical and positional isomers of linoleic acid including conjugated linoleic acid (CLA) in German milk and vegetable fats. *Fett/Lipid.* 1997, 99, 319-326.

Pursch, M. ; Strohschein, S. ; Handel, H. ; Albert, K. Temperature-dependent behavior of C30 interphases. A solid-state NMR and LC-NMR study. *Anal. Chem.* 1996, 68, 386-393.

Rohrschneider, L. Solvent characterisation by gas-liquid partition coefficients of selected solutes. *Anal. Chem.* 1973, 45, 1241-1247.

Ross, P. The role of porous graphitic carbon in HPLC. *LC-GC Int.* 2000, 13, 310.

Schardinger, F. The formation of crystallin polysaccharides (dextrins) from starch paste by microorganisms. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Abt. 2.* 1911, 29, 188-197.

Schmid, R. ; Antoulas, S. ; Ruettimann, A. ; Schmid, M. ; Vecchi, M. ; Weiser, H. Synthesis of all four stereoisomers of (*E*)-vitamin K<sub>1</sub> (phylloquinone), analysis of their diastereoisomeric and enantiomeric purities and determination of their biopotencies. *Helv. Chim. Acta.* 1990, 73, 1276-1299.

Schmidt, T. ; Engelhardt, H. Charged and uncharged cyclodextrins as chiral selectors in capillary electrophoresis. *Chromatographia.* 1993, 37, 475-481.

Schmitz, H.H. ; Artz, W.E. ; Poor, C.L. ; Dietz, J.M. ; Erdman, J.W. Jr. High-performance liquid chromatography and capillary supercritical-fluid chromatography separation of vegetable carotenoids and carotenoid isomers. *J. Chromatogr.* 1989, 479, 261-268.

Schmitz, H.H. ; Emenhiser, C. ; Schwartz, S.J. HPLC separation of geometric carotene isomers using a calcium hydroxide stationary phase. *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 1212-1218.

Schmitz, H.H. ; Schwartz, S.J. ; Catignani, G.L. Resolution and quantitation of the predominant geometric  $\beta$ -carotene isomers present in human serum using normal-phase HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 1995, 45, 2746-2750.

Severin, G. Comprehensive high-performance liquid-chromatography methodology for the determination of thiothixene in bulk drug, finished product, and dissolution testing samples. *J. Pharm. Sci.* 1987, 76, 231-234.

Snyder, L.R. Classification of the solvent properties of common liquids. *J. Chrom. Sci.* 1978, 16, 223-224.

Sokoliess, T. ; Menyess, U. ; Roth, U. ; Jira, T. Cup-type structures separate *cis/trans* isomers. *Laborpraxis.* 2001, 25, 28-30.

Sokoliess, T. ; Menyess, U. ; Roth, U. ; Jira, T. Separation of *cis*- and *trans*-isomers of thioxanthene and dibenz[b,e]oxepin derivatives on calixarene- and resorcinarene-bonded high-performance liquid chromatography stationary phases. *J. Chromatogr. A.* 2002, 948, 309-319.

Sokoliess, T. ; Gronau, M. ; Menyess, U. ; Roth, U. ; Jira, T. Separation of (*Z*)- and (*E*)-isomers of thioxanthene and dibenz[b,e]oxepin derivatives with calixarenes and resorcinarenes and resorcinarenes as additives in nonaqueous capillary electrophoresis. *Electrophoresis.* 2003, 24, 1648-1657.

Solar, O.H.J. ; Brown, R.S. ; Loung, T.S.H. Separation of PAH by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection using mixtures of neutral and anionic  $\beta$ -cyclodextrins. *Anal. Chem.* 1995, 67, 3004-3010.

Stach, K. US Patent 3,438,981.

Strand, A. ; Kvernberg, K. ; Karlsen, A.M. ; Liaaen-Jensen, S. Carotenoids in higher plants. 15. Geometrical *E/Z* isomers of (6R)- and (6S)-neoxanthin and biological implications. *Biochem. Syst. Ecol.* 2000, 28, 443-455.

Street, K.W. Jr. Cyclodextrin cavity polarity and chromatographic implications. *J. Liq. Chromatogr.* 1987, 10, 655-662.

Strohschein, S. ; Schlotterbeck, G. ; Richter, J. ; Pursh, M. ; Tseng, L.H. ; Händel, H. ; Albert, K. Comparison of the separation of *cis/trans* isomers of tretinoin with different stationary phases by liquid chromatography-nuclear magnetic resonance coupling. *J. Chromatogr. A.* 1997, 765, 207-214.

Szejtli, J. Cyclodextrins and their inclusion complexes. Akademiai Kiado, Budapest. 1982.

Tanaka, N. ; Tanigawa, T. ; Kimata, K. ; Hosota, K. ; Araki, T. Selectivity of carbon materials in comparison with octadecylsilyl- and pyrenylethylsilylsilica gels in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1991, 549, 29-41.

Terabe, S. ; Miyashita, Y. ; Ishihama, Y. ; Shibata, O. Cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography : separation of hydrophobic and enantiomeric compounds. *J. Chromatogr.* 1993, 636, 47-55.

Unger, K.K. Porous carbon packings for liquid chromatography. *Anal. Chem.* 1983, 55, 361-375A.

Urmos, I. ; Benko, S.M. ; Klebovich, I. Simple and rapid determination of clomiphene *cis* and *trans* isomers in human plasma by high-performance liquid chromatography using on-line post-column photochemical derivatization and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B.* 1993, 617, 168-172.

Valko, I.E. ; Billiet, H.A.H. ; Frank, J. ; Luyben, K.C.A.M. Effect of the degree of substitution of (2-hydroxy)propyl- $\beta$ -cyclodextrin on the enantioseparation of organic acids by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 1994, 678, 139-144.

Van den Hauwe, O. ; Perez, J.C. ; Claereboudt, J. ; Van Peteghem, C. Simultaneous determination of betamethasone and dexamethasone residues in bovine liver by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001, 15, 857-861.

Van den Hauwe, O. ; Dumoulin, F. ; Antignac, J.P. ; Bouche, M.P. ; Elliot, C. ; Van Peteghem, C. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of 11 glucocorticoids residues and an optimization of enzymatic hydrolysis conditions in bovine liver. *Anal. Chim. Acta.* 2002, 473, 127-134.

Vian, M.A. ; Tomao, V. ; Gallet, S. ; Coulomb, P.O. ; Lacombe, J.M. Simple and rapid method for *cis*- and *trans*-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using Chromolith columns. *J. Chromatogr. A.* 2005, 1085, 224-229.

Villiers, A. Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. *Compt. Rend.* 1891, 112, 536-538.

Viron, C. ; Andre, M. ; Dreux, M. ; Lafosse, M. Evaluation of porous graphitic carbon as stationary phase for the analysis of fatty acid methyl esters by liquid chromatography. *Chromatographia.* 1999, 49, 137-141.

Walter, S. ; Bauer, S. ; Roots, I. ; Brockmoller, J. Quantitation of the antipsychotics flupentixol and haloperidol in human serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B.* 1998, 720, 231-237.

Wan, Q.H. ; Shaw, P.N. ; Davies, M.C. ; Barrett, D.A. Chromatographic behaviour of positional isomers on porous graphitic carbon. *J. Chromatogr. A.* 1995, 697, 219-27.

Wren, A.C. ; Rowe, R.C. Theoretical aspects of chiral separation in capillary electrophoresis. I. Initial evaluation model. *J. Chromatogr.* 1992, 603, 235-241.

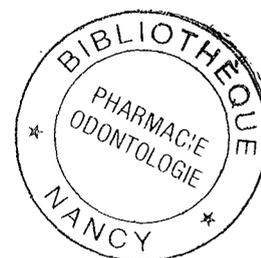
Yan, J.H. ; Hubbard, J.W. ; McKay, G. ; Midha, K.K. Stereoselective and simultaneous measurement of *cis*- and *trans*-isomers of doxepin and N-desmethyldoxepin in plasma or

urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* 1997, 691, 131-138.

Yang, L. ; Huang, Y. ; James, A.E. ; Lam, L.W. ; Chen, Z.Y. Differential incorporation of conjugated linoleic acid isomers into egg yolk lipids. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 4941-4946.

Zawisza, I. ; Bilewicz, R. ; Luboch, E. ; Biernat, J.F. Voltammetric recognition of *cis* (*Z*) and *trans* (*E*) isomers of azobenzene and azo-crown ethers. *Supramol. Chem.* 1998, 9, 277-287.

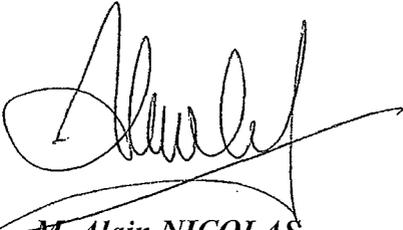
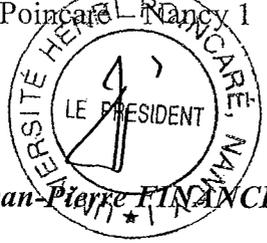
Zhu, S. ; Niu, C. ; Liu, Q. Separation and determination of *Z, E* isomers of toremifen by high-performance capillary electrophoresis. *Yaowu Fenxi Zazhi.* 1998, 18, 250-252.





## DEMANDE D'IMPRIMATUR

*Date de soutenance : 25 septembre 2006*

<p><b>DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</b></p> <p>présenté par <b>Frédéric HASDENTEUFEL</b></p> <p><u>Sujet :</u></p> <p><b>Séparation d'isomères Z-E par CLHP et électrophorèse capillaire</b></p> <p><u>Jury :</u></p> <p>Président : M. Alain NICOLAS, Professeur</p> <p>Juges : M. Jean-Luc COLIN, Docteur M. Alain MARSURA, Professeur</p>	<p>Vu,</p> <p>Nancy, le 28 Août 2005</p> <p>Le Président du Jury et Directeur de Thèse</p> <p> M. Alain NICOLAS Professeur</p>
<p>Vu et approuvé,</p> <p>Nancy, le 30 août 2006</p> <p>Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université Henri Poincaré – Nancy 1,</p> <p> Chantal FINANCE</p>	<p>Vu,</p> <p>Nancy, le -1 SEP. 2006</p> <p>Le Président de l'Université Henri Poincaré – Nancy 1</p> <p> Jean-Pierre FINANCE</p> <p>N° d'enregistrement : 2577.</p>

N° d'identification : PH Nancy 06 n° 52

**TITRE**

Séparation d'isomères *Z-E* par CLHP et électrophorèse capillaire

Thèse soutenue le 25 septembre 2006

Par Frédéric HASDENTEUFEL

**RESUME :**

La séparation et la quantification des isomères *Z-E* constituent des objectifs importants pour l'analyste, en particulier lorsqu'il s'agit de composés d'intérêt pharmaceutique. A l'instar du cas du tamoxifène, ces isomères peuvent posséder des caractéristiques biologiques, pharmacologiques ou toxicologiques fondamentalement différentes.

A travers l'exemple de trois molécules actuellement utilisées en thérapeutique, deux approches séparatives différentes sont envisagées : CLHP sur support carbone graphite poreux et électrophorèse capillaire en présence d'un sélecteur (dérivé cyclodextrine). Après avoir décrit les étapes intervenues au cours du développement, les deux procédures sont comparées aux méthodes de référence décrites dans la Pharmacopée Européenne. Quel que soit l'analyte considéré, les deux approches testées permettent d'obtenir des temps d'analyse réduits combinés à une qualité de séparation au moins équivalente à celle des méthodologies officielles.

**MOTS CLES :** chimie analytique ; isomérisation ; chromatographie liquide ; électrophorèse capillaire

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Alain NICOLAS Professeur	Chimie analytique et bioanalyse du médicament UMR UHP – CNRS 7561	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/> Bibliographique Thèmes 1 et 3

**Thèmes**

1 – Sciences fondamentales  
3 – Médicament  
5 – Biologie

2 – Hygiène/Environnement  
4 – Alimentation - Nutrition  
6 – Pratique professionnelle