

Devoir en temps libre n° 19

Séparation des énantiomères du métoprolol

Les β -bloquants sont des molécules utilisées en cardiologie. Ils sont utilisés comme traitement des maladies coronariennes, dont ils diminuent significativement le risque de récurrence. On les utilise aussi contre l'hypertension artérielle. De nombreux β -bloquants ont été synthétisés et mis sur le marché. On s'intéresse ici au métoprolol¹.

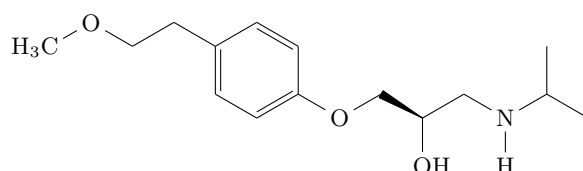


FIGURE 1 – Structure du (+)-métoprolol.

La commercialisation du métoprolol se fait sous forme d'un mélange des deux énantiomères en même quantité (mélange racémique). Une méthode de détection des énantiomères du métoprolol dans les urines de patients traités par cette molécule a été mise au point par une équipe sud-coréenne². La technique utilisée est la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) décrite dans le document 1.

Les auteurs ont d'abord fait réagir un mélange racémique de métoprolol selon une suite de deux réactions présentées dans le document 2. Le mélange est injecté dans la colonne ; le chromatogramme obtenu est présenté sur la figure 4 du document 3.

Dans un second temps, ils ont prélevé de l'urine d'un patient traité au métoprolol. Après traitement de l'urine selon le protocole du document 2, celle-ci est injectée dans la colonne ; le chromatogramme obtenu est présenté sur la figure 5 du document 3.

1. Comment les auteurs ont-ils pu attribuer les pics [1] et [2] du chromatogramme de la figure 5 au métoprolol plutôt qu'à ses métabolites ?
2. Discuter qualitativement des quantités des deux énantiomères du métoprolol présents dans l'urine du patient.
3. D'un point de vue stéréochimique, que peut-on dire du (-)-MTPA-Cl utilisé dans la préparation des échantillons de métoprolol (document 2) ?
4. Comment la séparation des deux énantiomères du métoprolol est-elle rendue possible dans ce processus ? La séparation est-elle très importante ? Est-ce prévisible ? Une réponse s'appuyant sur les documents présentés est attendue.

1. C'est le principe actif d'un des médicaments les plus vendus au monde, le Lopressor®

2. K.H. KIM, J.H. LEE, M.Y. YO, K.S. SHIN, J.S. KANG, W.C. MAR, J.R. YOUM, *Chromatographica*, **2002**, 55, january (n° 1/2), p 81-85.

Document 1 : la technique de GC-MS

La méthode GC-MS (*Gas phase Chromatography - Mass Spectroscopy*) est une méthode d'usage dorénavant courant qui permet de réaliser, en une même opération, la séparation des constituants d'un mélange et la détermination de leur masse moléculaire. Elle consiste à coupler deux dispositifs différents : une colonne de chromatographie (partie séparative) et un spectromètre de masse (partie analytique).

La partie chromatographie se déroule dans une « colonne » de chromatographie, consistant en un très long tube très fin, soigneusement rempli d'un matériau solide poreux, constituant la phase stationnaire. Une pompe assure la circulation permanente d'un gaz inerte (diazote, hélium) à travers la colonne ; ce gaz constitue la phase mobile.

À la date $t = 0$, on injecte à l'entrée de la colonne l'échantillon à analyser. Celui-ci se vaporise et migre dans le tube du fait de l'entraînement par la phase mobile. Si la colonne joue son rôle, les différentes substances présentes dans le mélange migrent à des vitesses différentes, en fonction de leurs interactions avec la phase stationnaire. Elles arrivent donc à des dates différentes à la sortie de la colonne. Le temps qui s'écoule entre l'injection de l'échantillon à l'entrée de la colonne et la sortie d'une substance à l'autre bout de la colonne s'appelle le temps d'élution de cette substance ; sa valeur est caractéristique de la molécule (pour une colonne et une phase stationnaire données).

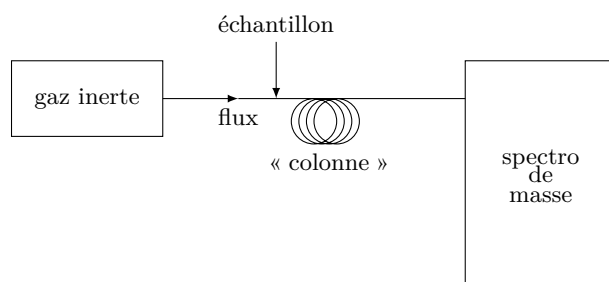


FIGURE 2 – Schéma de principe de la GC-MS.

À la sortie de la colonne, et au fur et à mesure de leur arrivée, les molécules sont introduites dans un spectromètre de masse qui réalise simultanément leur identification et leur comptage.

Document 2 : préparation des échantillons de métoprolol

Avant injection dans la colonne de chromatographie, le mélange des deux énantiomères de métoprolol est soumis à deux réactions chimiques successives, dont il n'est pas nécessaire de comprendre le mécanisme (seul le résultat est important ici).

- La première convertit le groupe hydroxyle OH du métoprolol en groupe triméthylsilyle $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$ par action du MSTFA.
- La seconde effectue une addition sur le groupe amine du composé précédent, par action du $(-)$ -MTPA-Cl (chlorure de $(-)$ - α -trifluométhyl- α -méthoxyphénylacétyl).

La figure 3 précise les deux énantiomères du métoprolol, ainsi que les composés en lesquels chacun d'entre eux est converti. La représentation spatiale du $(-)$ -MTPA-Cl est également précisée fournie.

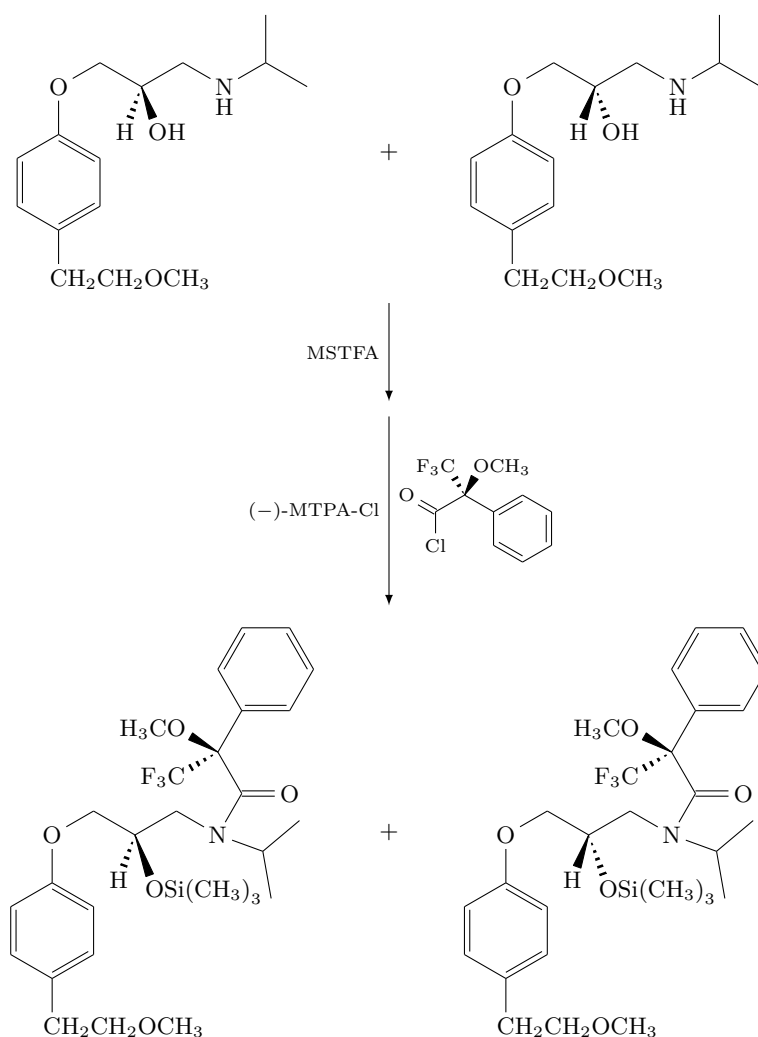


FIGURE 3 – Préparation des échantillons de métoprolol.

Document 3 : chromatogrammes

Les différentes chromatographies ont été réalisées dans la même colonne, de longueur égale à 30 m, de section $0,25\text{ mm} \times 0,25\text{ }\mu\text{m}$. La phase stationnaire est constituée de méthylphénylsilicone, une substance hydrophobe achirale. Le gaz porteur est l'hélium. Le chromatogramme est l'enregistrement, au cours du temps (en minutes), des substances qui sortent de la colonne. Chaque substance y apparaît sous forme d'un pic positionné à sa date d'élution, dont l'aire est proportionnelle à sa quantité.

La figure 4 correspond à l'élution d'un mélange racémique de métoprolol préparé selon le protocole présenté dans le document 2. Les pics ⑤ et ⑥ correspondent à des composés de référence ajoutés à l'échantillon, et permettant de calibrer la colonne. Les pics ① et ② correspondent respectivement au (+)-métoprolol et au (-)-métoprolol.

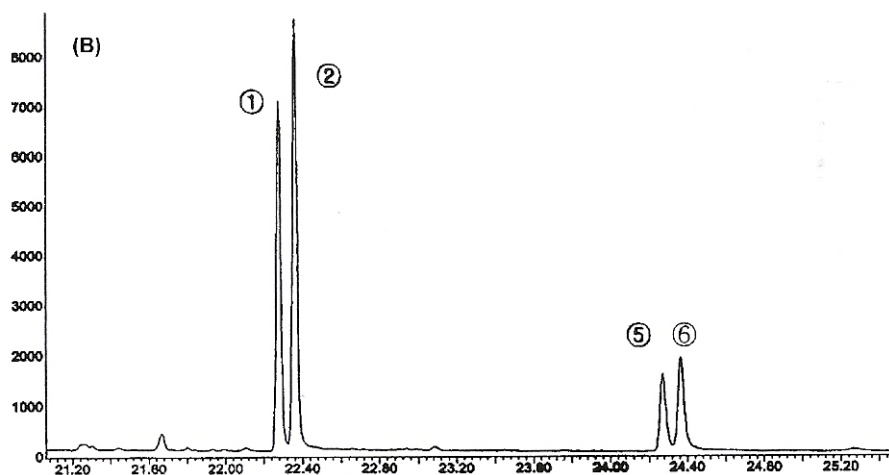


FIGURE 4 – Chromatogramme d'un échantillon de métoprolol racémique.

La figure 5 correspond à l'élution d'un échantillon d'urine d'un patient traité au métoprolol, et préparé selon le protocole présenté dans le document 2. La légende est identique à la figure précédente. Les pics ③ et ④ correspondent à des métabolites du métoprolol, c'est-à-dire des composés issus du métoprolol lors de sa dégradation dans l'organisme.

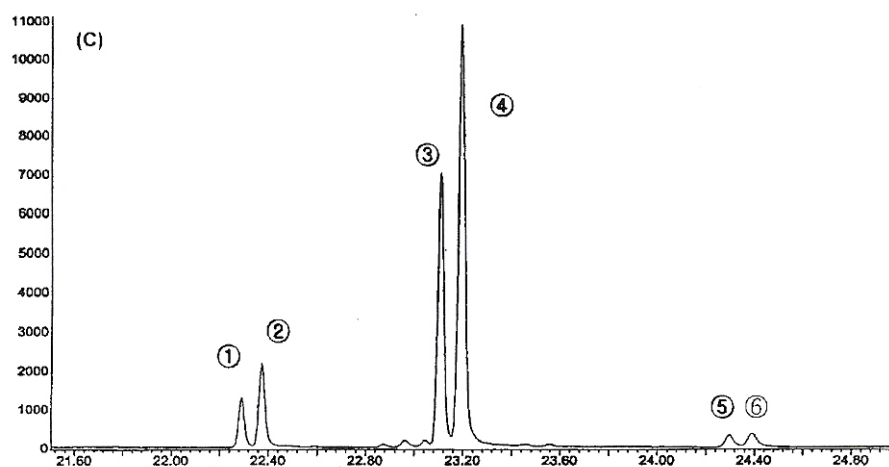


FIGURE 5 – Chromatogramme d'un échantillon d'urine de patient traité au métoprolol.

Corrigé du devoir en temps libre n° 19

éléments de correction

1. Pour une colonne donnée, le temps d'élution d'un composé donné est caractéristique. La figure 4 est le chromatogramme obtenu suite à l'élution d'une solution comportant les deux énantiomères du métoprolol ; il permet de déterminer leur temps d'élution : autour de 22,40 min. La figure 5 est le chromatogramme d'un échantillon d'urine ; il présente deux pics autour de 22,40 min et deux pics autour de 23,20 min. Pour une colonne identique, les temps d'élution identiques autour de 22,40 min correspondent aux mêmes composés.

On peut également remarquer que les métabolites du métoprolol ont un temps d'élution plus long, ce qui signifie qu'ils sont davantage retenus sur la phase stationnaire.

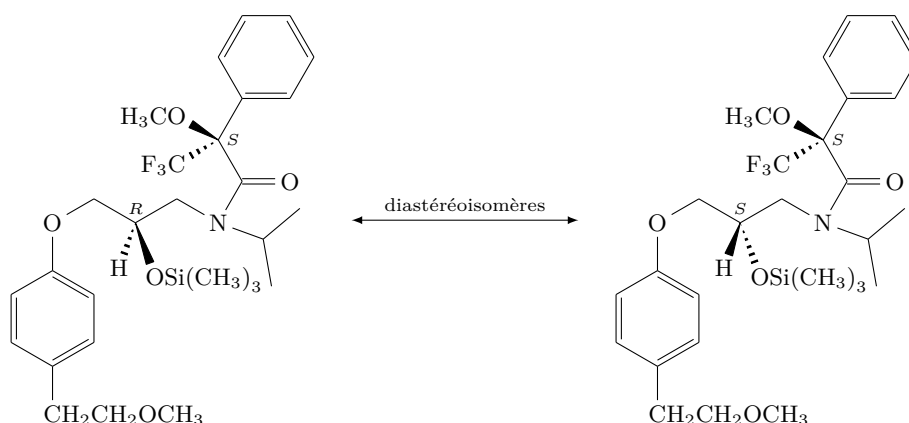
2. L'aire sous les deux pics [1] et [2] sont du même ordre de grandeur. On peut donc conclure que les deux énantiomères du métoprolol sont présents en quantité comparable dans l'urine du patient. Sachant que le médicament est un mélange racémique, on peut en conclure que les deux énantiomères sont métabolisés avec des vitesses comparables dans le corps du patient.

3. Le (–)-MTPA-Cl utilisé dans le protocole de préparation des échantillons est une molécule chirale énantiomériquement pure (elle présente un seul atome de carbone asymétrique de descripteur stéréochimique *R*).

4. Commençons par remarquer que la phase stationnaire présente dans la colonne est achirale (document 3). En conséquence, les deux énantiomères du métoprolol migrent à la même vitesse dans cette colonne, et ont donc le même temps d'élution. La colonne utilisée ne permet donc pas d'effectuer la séparation directe des deux énantiomères.

Lors de la préparation de l'échantillon, on réalise l'addition du (*R*)-MTPA-Cl sur le métoprolol, ce qui conduit à un composé comportant deux atomes de carbone asymétriques. Comme on peut facilement le vérifier, l'ordre de priorité des substituants est inchangé autour du carbone asymétrique issu du métoprolol, mais il change autour du carbone asymétrique issu du MTPA-Cl (du fait de la disparition de l'atome de chlore). On en déduit que :

- partant du (*R*)-métoprolol, l'action du (*R*)-MTPA-Cl conduit à un composé ayant deux atomes de carbone asymétriques de descripteurs stéréochimiques (*R*) et (*S*),
- partant du (*S*)-métoprolol, l'action du (*R*)-MTPA-Cl conduit à un composé ayant deux atomes de carbone asymétriques de descripteurs stéréochimiques (*S*) et (*S*).



Autrement dit, la préparation décrite dans le document 2 consiste à convertir le mélange des deux énantiomères du métoprolol en un mélange de deux diastéréoisomères. Deux diastéréoisomères n'ayant pas les mêmes propriétés physiques et chimiques, ils n'ont aucune raison d'avoir des temps d'élution égaux. Ils sont donc séparés lors de la chromatographie. Notons cependant que si la séparation est indéniable, elle est néanmoins faible, ce qui est logique car les groupes fonctionnels sont les mêmes sur les deux diastéréoisomères et les différences d'interaction entre eux et la phase stationnaire sont certainement ténues. Il est indispensable d'utiliser une très longue colonne de chromatographie pour que l'effet soit visible.