

UNIVERSITE PARIS - SUD

UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE
"FACULTE DE PHARMACIE DE CHATENAY - MALABRY"

GRUPE DE FORMATION DOCTORALE PHARMACOCHEMIE

ANNEE 1993 - 1994

SERIE DOCTORAT N°342

03/193

THESE

présentée

A L'UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE
UNIVERSITE DE PARIS - SUD

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS - SUD
MENTION SCIENCES PHARMACEUTIQUES

par

Mr. Falaye TRAORE

Titre de la thèse :

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES NOUVEAUX LUMINOPHORES :
LES LUMINARINES.

APPLICATION A LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE DE COMPOSES
CARBONYLES ET PERSPECTIVES DE DEVELOPPEMENT EN IMMUNOLOGIE.

Soutenu le : 29 Mars 1994

Jury :	Président	Mr. le Professeur G.MAHUZIER	
	Membres	Mr. le Professeur J.J.AARON	Rapporteur
		Mr. le Professeur P.LEVILLAIN	Rapporteur
		Mr. le Professeur M.HAMON	
		Mr. le Professeur R.FARINOTTI	
		Mr. le Docteur P.PROGNON	
		Mr. le Docteur M.PESEZ	

Cette thèse est dédiée à mon père, à ma mère, à mes frères, à mes soeurs et à Abdoulaye, en témoignage de ma profonde affection et de ma tendresse.

Cette thèse a été réalisée au laboratoire de Chimie Analytique II, de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Paris - Sud (Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry), sous la direction de Monsieur le Professeur Georges Mahuzier.

Ce travail a bénéficié d'une aide à la recherche (Bourse Aguire Basualdo) de la Chancellerie des Universités de Paris. Je tiens ici à exprimer toute ma reconnaissance à Madame le Chancelier Gendreau-Massaloux, recteur des Universités de Paris.

Je tiens également à remercier :

Monsieur le Professeur Michel Hamon, professeur de Chimie Analytique à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (Université Paris - Sud), qui m'a fait l'honneur de m'accueillir pour la première fois au sein de son laboratoire, et m'a aidé à trouver un directeur de thèse. C'est aussi grâce à son enseignement sur les méthodes d'analyse que ce travail a pu être réalisé. Avec ma grande admiration et mes remerciements les plus sincères.

Monsieur le Professeur Georges Mahuzier, professeur de Chimie Analytique à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (Université Paris - Sud), qui a dirigé ce travail tout au long de ces années avec compétence et enthousiasme et qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Avec ma sincère gratitude et mon profond respect.

Monsieur le Professeur Robert Farinotti, professeur de Pharmacie Clinique à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (Université Paris - Sud), qui m'a fait partager ses remarquables connaissances et d'avoir accepté de juger ce travail. Avec toute ma reconnaissance et mes remerciements.

Monsieur le Docteur Patrice Prognon, maître de conférence de Chimie Analytique à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (Université Paris - Sud), qui par sa disponibilité et pour avoir suivi une partie de mes recherches et m'avoir fait part de son expérience. Il a aussi participé à la rédaction de cette thèse. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance

Monsieur le Professeur Pierre Levillain, professeur de Chimie Analytique à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (Université François Rabelais de Tours), qui a bien voulu accepter de juger ce travail. Avec mes remerciements les plus sincères.

Monsieur le Professeur Jean Jacques Aaron, professeur de Chimie Analytique à l'Institut de Topologie et des Systèmes Dynamiques (Université Paris VII), qui a bien voulu accepter de juger ce travail. Avec mes remerciements les plus sincères.

Monsieur le Docteur Maurice Pesez, ancien directeur des Services Analytiques de Roussel-Uclaf, pour avoir accepté de juger ce travail. C'est lui qui a été le premier à m'accueillir en France (avec une chaleur de circonstance!). Je tiens à lui rendre particulièrement hommage pour ses qualités humaines et sa très grande valeur scientifique. Enfin comment ne pas le remercier d'avoir bien voulu palier mes lacunes dans le domaine de la nomenclature chimique.

Monsieur le Docteur Joseph Chalom, directeur du Laboratoire Seratec, pour avoir été toujours présent tout au long de ce travail en m'apportant son assistance tant sur le plan scientifique que sur le plan financier. C'est grâce à lui que j'ai pu avoir à temps tous les produits et petits matériels qu'il me fallait. De plus, je le remercie de m'avoir permis de participer à différents congrès et symposium pendant ces années de thèse. Avec toute ma reconnaissance et mon profond respect. Je remercie également toute l'équipe du Laboratoire Seratec pour leur accueil chaleureux.

Monsieur le Docteur Michel Tod, Pharmacien-adjoint à l'Hôpital Avicenne de Bobigny, qui a participé à la réalisation de cette thèse. C'est grâce à ses travaux sur les "Luminarines" que ce sujet a pu voir le jour. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Les Docteurs Laurence Dallery (Responsable du Laboratoire de RMN au Conservatoire National des Arts et Métiers), Marc Vuilhorgne (Directeur de recherche associé au département Analyse, Recherche et Développement du Centre de Recherche de Vitry-Alfortville, Rhône-Poulenc Rorer), Frédéric Troalen (Service d'Immunologie Moléculaire et Unité de Microchimie de l'Institut Gustave Roussy), Jean-Michel Bidart (Unité de Biochimie Clinique de l'Institut Gustave Roussy), Daniel Biou (Pharmacien des Hôpitaux en Service de Biochimie de l'Hôpital Robert Debré de

Paris), pour m'avoir ouvert leur service, pour leur accueil chaleureux, leurs conseils et m'avoir permis de réaliser certaines parties de cette thèse.

Monsieur le Docteur Gabriel Maillard, alors qu'il était vice président du Syndicat National de l'Industrie Pharmaceutique Française (SNIP), a eu l'initiative des stages de formation à l'assurance de qualité des médicaments destinés aux pharmaciens de l'Afrique francophone et il a organisé ces stages. Tous ceux qui en ont bénéficié ont apprécié chez lui l'efficacité et la qualité de son accueil. C'est bien son initiative qui est à l'origine du travail que je présente ici, c'est dire la gratitude que je tiens à lui exprimer.

Madame Kresmann et Madame Chemineau qui ont montré toutes leurs qualités dans l'organisation des stages de formation à l'assurance de qualité des médicaments. Elles ont à maintes reprises apporté avec efficacité et gentillesse l'aide dont j'avais besoin. Qu'elles soient assurées de mon souvenir reconnaissant.

Monsieur le Docteur Jean-Pierre Billon, ancien directeur des Services Analytiques de Rhône-Poulenc, pour m'avoir fait confiance, pour m'avoir sans cesse guidé et épaulé. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance. Je remercie également sa famille pour sa gentillesse et son amitié.

Monsieur Gérard Gernez, Chef de service au Département Analyse, Recherche et Développement du Centre de Recherche de Vitry-Alfortville, Rhône-Poulenc Rorer, qui m'a chaleureusement accueilli dans son laboratoire, et pour son assistance tout au long de ce travail. Avec toute ma reconnaissance et mes remerciements.

Monsieur le Docteur Martin Zchoř, maître de conférence de Chimie Analytique à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (Université Paris - Sud), pour sa précieuse collaboration lors de la réalisation de cette thèse. Avec ma sincère reconnaissance et mes remerciements.

Monsieur Simon et Monsieur Bécu (Service d'Analyse des Médicaments et Métabolites de la Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry), le Docteur Ligia Moréira De Campos et le Docteur Ricardo Alvès (Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brésil), pour leur accueil et fructueuse en Spectrométrie de Masse.

Madame le Docteur Françoise Brion, maître de conférence de Pharmacie Clinique à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (Université Paris V), pour m'avoir témoigné de sa confiance en m'accordant un poste de Faisant Fonction d'Interne et un poste d'Attaché en Pharmacie Hospitalière à l'Hôpital Robert Debré de Paris. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Docteur Philippe Arnaud, maître de conférence de Pharmacotechnie et de Biopharmacie à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (Université Paris V), pour m'avoir témoigné de sa confiance pendant mon séjour à l'Hôpital Robert Debré de Paris. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Madame le Professeur Danielle Ferrier-Baylocq, professeur de Chimie Analytique à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (Université Paris - Sud), qui par son enseignement sur les méthodes d'analyse m'a permis d'aborder certaines parties de cette thèse. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Mes collègues et amis du laboratoire de Chimie Analytique II de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (Université Paris -Sud), Ligia, Pianetti, Saer, Zhou, qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance pour l'attention qu'ils m'ont témoignés.

Toute l'équipe de la Pharmacie de l'Hôpital Robert Debré de Paris, ainsi que Monsieur Tossou Celestin du Service Cuisine de l'Hôpital Robert Debré de Paris, pour l'attention qu'ils m'ont témoignés. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Tous ceux qui ont participé, de près ou de loin, à l'élaboration de ce travail.

TABLE DES MATIERES

	Page
LISTE DES ABREVIATIONS.....	12
INTRODUCTION GENERALE.....	17

PREMIERE PARTIE :

**ETUDE DES PROPRIETES SPECTRALES D'ABSORBANCE ET DE
FLUORESCENCE DES LUMINARINES**

I- RAPPEL SUR LA NOTION DE DETECTION PAR LUMINESCENCE.....	23
II- PRESENTATION DES LUMINARINES.....	33
II-1 Introduction.....	33
II-2 Synthèse de réactifs de greffage, dérivés du noyau quinolizinocoumarine, à fonction hydrazide.....	39
II-2-1 Synthèse de la luminarine 3.....	40
II-2-2 Synthèse de la luminarine 12.....	45
II-2-3 Synthèse de la luminarine 11.....	49
III- ETABLISSEMENT DES SPECTRES D'ABSORBANCE ET DE FLUORESCENCE DES LUMINARINES.....	53
III-1 Approche simplifiée de l'interaction fluorophore-solvant : effets généraux (modèle de Lippert).....	54
III-1-1 Introduction.....	54
III-1-2 Effets généraux (modèle de Lippert).....	55
III-1-3 Travaux personnels.....	58
III-2 Modélisation de l'interaction fluorophore-solvant par une échelle de solvatochromie : effets généraux et effets spécifiques (modèle de Taft).....	66

III-3 Article 1 : Solvent study on the 9-substitued quinolizinocoumarins used as precolumn fluorescent and chemiluminescent reagents in high-performance liquid chromatography.....	69
---	----

DEUXIEME PARTIE :

ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE, DES DERIVES DE LA LUMINARINE 3, 11 ET 12

I- RAPPEL SUR LA REACTIVITE DES HYDRAZIDES.....	102
I-1 Réactions générales.....	102
I-2 Autres réactions.....	107
II- DETECTION SPECTROPHOTOMETRIQUE ET SPECTROFLUORIMETRIQUE DES COMPOSES CARBONYLES, NUCLEOSIDES ET NUCLEOTIDES EN CLHP APRES DERIVATION : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	111
III- TRAVAUX PERSONNELS.....	114
III-1 Etude de la dérivation.....	114
III-2 Analyse structurale des dérivés de la luminarine 3, luminarine 11 et luminarine 12.....	132
III-3 Article 2 : Determination of picomole amounts of carbonyls as luminarin hydrazones by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection.....	133
III-4 Article 3 : 1H, 5H, 11H-[1] Benzopyrano [6,7,8-ij] quinolizine-9-acetic acid 2,3,6,7-tetrahydro-11-oxohydrazide fluorogenic reagent for liquid chromatographic determination of aldehydes and ketones.....	145
III-5 Détermination par chromatographie liquide du malonaldéhyde dans les milieux biologiques après dérivation par la luminarine 3.....	158
III-5-1 Rappel sur la lipoperoxydation.....	159
III-5-2 Méthodes de dosage du malonaldéhyde.....	161
III-5-3 Matériel et méthodes.....	165
III-5-4 Résultats et discussion.....	168

III-6 Article 4 : Determination of malonaldehyde by coupled high-performance liquid chromatography-spectrofluorimetry after derivatization with luminarin 3.....	181
III-7 Condensation, des bases pyrimidiniques des acides nucléiques avec la luminarine 3, par transamination.....	190
III-7-1 Introduction.....	190
III-7-2 Réaction de transamination.....	193
III-7-3 Matériel et méthodes.....	200
III-7-4 Résultats et discussion.....	201
III-8 Article 5 : Luminarin 3 as a derivatization reagent for the liquid chromatographic determination of cytidine adenosine and related nucleotides with fluorimetric detection.....	207

TROISIEME PARTIE :

ETUDE DU MARQUAGE D'ANTICORPS OU D'ANTIGENES PAR LA LUMINARINE 3, 11 ET 12

I- RAPPEL DE CERTAINS ASPECTS DES IMMUNODOSAGES.....	220
I-1 Caractéristiques des anticorps, des antigènes, du complexe immun ainsi que des mécanismes qui régissent la réaction immunologique.....	220
I-1-1 Les anticorps.....	220
I-1-2 Les antigènes.....	224
I-1-3 Le complexe immun.....	224
I-2 Classification des méthodes immunologiques.....	225
I-2-1 Méthodes compétitives.....	225
I-2-2 Méthodes immunométriques.....	226
I-2-3 Schéma réactionnel.....	226
I-3 Critères de choix d'une méthode immunologique.....	227
I-3-1 Spécificité.....	227

I-3-2 Sensibilité.....	227
I-3-3 Choix du marqueur.....	228
II- TRAVAUX PERSONNELS.....	232
II-1 Matériel et méthodes.....	234
II-1-1 Réactifs et matériel.....	234
II-1-2 Méthodes.....	236
II-2 Résultats et discussion.....	241
II-3 Essais de détermination de l'hormone chorionique gonadotrope humaine.....	253
 CONCLUSION GENERALE.....	 256
 BIBLIOGRAPHIE GENERALE.....	 261
 ANNEXES.....	 288
ANNEXE I.....	289
ANNEXE II.....	309
ANNEXE III.....	314
ANNEXE IV.....	326
ANNEXE V.....	343

LISTE DES ABREVIATIONS

³H :	tritérium
¹⁴C :	carbone 14
¹²⁵I :	iode 125
A :	extinction, absorbance ou densité optique
a :	rayon de la cavité du solvant dans laquelle le fluorophore prend place (la "cage")
A.U. :	unité arbitraire
Ac :	anticorps
ACCN :	acétonitrile
ADN :	acides désoxyribonucléiques
Ado :	adénosine
ADP :	adénosine 5-diphosphate
Ag :	antigène
Ag* :	antigène marqué
Ag*-Ac :	complexe antigène marqué-anticorps
Ag-Ac :	complexe antigène-anticorps
AMP :	adénosine 5-monophosphate
ARN :	acides ribonucléiques
ATP :	adénosine 5-triphosphate
BEA :	β-éthoxyacroléine
BMA :	β-méthoxyacroléine
BSA :	bovine serum albumine
C :	concentration molaire
c :	vitesse de la lumière dans le vide (3×10^{10} cm/sec.)
C.102 :	coumarine 102
C.102HS :	coumarine 102 hydrosoluble
CCM :	chromatographie sur couche mince
CDP :	cytidine 5-diphosphate

ChlorF :	chloroforme
CI :	transitions par conversions internes
CIS :	transitions par croisement intersystème
CMP :	cytidine 5-monophosphate
CTP :	cytidine 5-triphosphate
CycloH :	cyclohexane
Cyd :	cytidine
D :	constante diélectrique du solvant
DCCI :	dicyclohexylcarbodiimide
Dichlorm :	dichlorométhane
DiisopE :	diisopropyléther
DMAP :	diméthylamino pyridine
DMF :	diméthylformamide
DMSO :	diméthylsulfoxyde
EDC :	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
ELISA :	enzyme-linked immunosorbent assay
EMIT :	enzyme-monitored immunoassay technique
Eth.Ac. :	acétate d'éthyle
ETOH :	éthanol
F :	intensité du signal de fluorescence exprimée en einstein/sec. (1 einstein = 6×10^{23} photons)
FAB :	fast atomic bombardment
Fab :	fragment antigen binding
Fc :	fragment cristallisable de l'anticorps
FITC :	fluorescein isothiocyanate
FUR :	furfural
H :	largeur de la bande d'émission de fluorescence à mi-hauteur
h :	constante de Planck ($6,62 \times 10^{27}$ erg-sec.)

H₂O :	eau
HCG :	hormone chorionique gonadotrope
HFSH :	hormone folliculotrope
HLS :	hormone lutéinisante
HMF :	5-hydroxyméthylfurfural
HPLC ou CLHP :	chromatographie liquide haute performance
HTSH :	hormone thyroïdienne
I₀ :	intensité de l'énergie d'excitation
I_a :	intensité de la radiation excitatrice absorbée
IC :	ionisation chimique
ICT :	transfert de charge intramoléculaire plane
IE :	impact électronique
I_F et I_P :	intensités de la fluorescence et de la phosphorescence
IFS :	sensibilité intrinsèque de fluorescence
Ig :	immunoglobuline
IGR :	institut gustave roussy
IRMA :	immunoradiométric assay
I_t :	intensité de la lumière transmise
k_f :	constante de vitesse pour les phénomènes radiatifs
k_{nr} :	constante de vitesse pour les phénomènes non radiatif
L :	chaîne légère
LOD :	limite de détection
LSERs :	linear solvation energy relationships
Lu. :	luminarine
MDA :	malonaldéhyde
MeMDA :	méthylmalonaldéhyde
MEOH :	méthanol
MLRA :	analyse par regression linéaire multiple

n :	indice de réfraction du solvant
NHS :	normal human serum
OMS :	organisation mondiale de la santé
OPLC :	over pressured layer chromatography
PAGE :	polyacrylamide gel
PBS :	phosphate buffer saline
PBS-BSA :	sérum albumine bovine à 1% (m/v) dans le tampon phosphate 0,1 M pH 7,4
PEG :	polyéthylène glycol
PM :	poids moléculaire ou masse moléculaire
R_e et R_e* :	polarisabilité électronique à l'état fondamental et excité
R_f :	distance de rétention
RIA :	radioimmunoassay
RMN :	résonance magnétique nucléaire
R_r et R_r* :	polarisabilité moléculaire à l'état fondamental et excité
S₀, S₁, S_n :	niveaux de l'état fondamental singulet et des états excités
SDS :	sodium dodecyl sulfate
SM :	spectrométrie de masse
T₁, T_n :	niveaux des états triplets
TBA :	acide 2-thiobarbiturique ou 4,6-dihydroxy-2-thiopyrimidine
TBA-MDA :	dérivé acide 2-thiobarbiturique-malonaldéhyde
TEP :	1,1,3,3-tétraéthoxypropane
THF :	tétrahydrofurane
TICT :	transfert de charge intramoléculaire non plane de torsion
TMP :	1,1,3,3-tétraméthoxypropane
UV :	ultra-violet

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Aujourd'hui la plupart des problèmes analytiques concernent la détermination de traces de composés organiques, dans les échantillons biologiques, les substances alimentaires ou les agents polluants de l'environnement. Les solutions analytiques à ces problèmes impliquent assez généralement la mise en oeuvre de techniques chromatographiques.

Dans l'analyse des traces, l'efficacité de ces techniques est parfois limitée, non par la séparation chromatographique proprement dite mais par la sensibilité des systèmes de détection.

Au cours de notre travail, nous nous sommes attachés à développer pour cela des systèmes de détection basés sur la fluorescence. Comme la plupart des molécules à détecter ne sont pas naturellement fluorescentes, nous avons mis au point des méthodes de dérivation chimique au moyen de luminarines, substances qui confèrent une fluorescence aux molécules avec lesquelles elles se conjugent.

Ces recherches ont pris naturellement naissance dans le laboratoire de Chimie Analytique II de la Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry (Université Paris XI) qui s'attache depuis plusieurs années à développer de nouveaux systèmes de détection en chromatographie liquide particulièrement par fluorescence, phosphorescence et chimiluminescence.

Notre travail a consisté d'une part à synthétiser et à étudier les propriétés spectrales d'absorbance et de fluorescence des réactifs de dérivation possédant le noyau quinolizinocoumarine les "luminarines", d'autre part à déterminer les conditions de leurs réactions avec certaines molécules, d'intérêt pharmaceutique ou biologique possédant dans leur structure un groupement fonctionnel carbonyle et enfin à proposer un système chromatographique permettant la séparation des dérivés ainsi formés.

L'étude des effets de solvants classiquement utilisés en chromatographie liquide, sur les propriétés d'absorbance et de fluorescence de 11 luminarines, nous a permis de proposer des solvants relativement polaires accepteurs de liaisons hydrogène pour améliorer la sensibilité de détection des dérivés formés en chromatographie liquide.

Après avoir envisagé l'influence spécifique de certains paramètres (solvant, température, pH, temps de réaction, rapport molaire substrat/réactif) sur la dérivation, nous décrivons des possibilités de dosage par chromatographie liquide d'acides carbonylés, d'esters carbonylés, hydroxycarbonyles, d'aldéhydes et cétones aliphatiques et aromatiques, α et β dicarbonylés, après couplage précolonne à une luminarine possédant un groupement fonctionnel hydrazide, et détection fluorimétrique. En chromatographie liquide, nous rapportons également l'utilisation des luminarines hydrazides pour la dérivation de nucléosides et nucléotides. Ces composés ont fait l'objet d'un développement analytique. En effet, dans certaines conditions bien définies ils peuvent, après traitement, fixer des luminarines ce qui leur confèrent une fluorescence permettant de les détecter avec une grande sensibilité.

Enfin, le développement des dosages immunologiques nous a incité à utiliser les propriétés de fluorescence des luminarines après greffage des immunoglobulines G. Les performances de marquage sont comparées à celle de la fluoresceïne, réactif couramment utilisé pour le marquage des protéines. Nous envisageons ensuite les possibilités de détection de l'hormone chorionique gonadotrope (HCG), après transformation chimique avec une luminarine hydrazide.

La présentation de notre travail comporte donc trois parties :

- l'étude des propriétés spectrales d'absorbance et de fluorescence des luminarines dans les principaux solvants utilisés en chromatographie liquide.
- différents exemples de mises au point de chromatographie comportant une détection par fluorescence après dérivation en précolonne.
- l'étude du marquage d'anticorps et d'antigènes par les luminarines hydrazides.

PREMIERE PARTIE :

*ETUDE DES PROPRIETES SPECTRALES
D'ABSORBANCE ET DE
FLUORESCENCE DES LUMINARINES*

Après un bref rappel des différents modes de détection par luminescence et de quelques notions élémentaires sur la luminescence abordées tout au long de ce travail, nous présentons les méthodes de synthèse et d'identification des luminarines ayant un groupement fonctionnel hydrazide en position 9 du noyau quinolizinocoumarine.

L'effet des solvants classiquement utilisés en chromatographie liquide, sur les propriétés d'absorbance et de fluorescence de 11 luminarines a été étudiée. Dans un premier temps, nous avons utilisé une démarche simple dans laquelle les effets de solvants sont arbitrairement classés en effets généraux et spécifiques (modèle de Lippert). Dans un deuxième temps, la modélisation par une échelle linéaire de solvatochromie (modèle de Taft), nous a permis une approche du type d'interactions spécifiques soluté-solvant.

A partir de ces derniers résultats, nous avons pu démontrer l'intérêt des solvants relativement polaires accepteurs de liaisons hydrogène, pour améliorer la sensibilité de détection des dérivés obtenus après greffage avec une luminarine.

Les conséquences de cette étude sont importantes sur le plan chromatographique notamment lors de l'emploi de gradient d'élution, ou lorsqu'on souhaite exalter la fluorescence des analytes sans pour autant modifier les conditions de la séparation (ajout postcolonne).

I. RAPPEL SUR LA NOTION DE DETECTION PAR LUMINESCENCE

Le phénomène de luminescence est une propriété qu'ont certaines molécules d'émettre de la lumière à la température ambiante après accumulation d'énergie (excitation). Cette propriété est souvent mise à profit dans les techniques de détection en chromatographie liquide.

Selon le mode d'excitation, on distingue plusieurs types de luminescence [GOLDBERG et WEINER (1989); GUILBAULT (1990)] :

- l'électroluminescence : lorsque l'excitation est produite par un champ électrique;
- la triboluminescence ou piezoluminescence: lorsque l'excitation est ici produite par frottement ou broyage de certains cristaux, rupture de la déformation mécanique, l'émission de la lumière résulte alors de la séparation de charge par frottement à la surface des cristaux;
- la thermoluminescence : lorsque la chaleur seule est mise en jeu pour l'excitation des molécules, l'émission de la lumière survenant à la suite de la recombinaison des ions activés thermiquement;
- la bioluminescence : lorsque l'énergie d'excitation est fournie par un organisme à partir d'une réaction enzymatique;
- la chimiluminescence : lorsque l'énergie d'excitation est produite par une réaction chimique;
- la galvanoluminescence : lorsque l'excitation est produite par le passage d'un courant électrique à travers une solution aqueuse, l'émission de la lumière provient alors des réactions chimiques d'espèces chimiluminescentes formées durant le phénomène d'électrolyse;
- la cristaoluminescence : lorsque l'excitation est produite par la cristallisation de certains cristaux en solution, l'émission qui suit résulte

probablement des clivages se produisant au moment de la conception de chaque cristal (c'est une forme de la triboluminescence);

- la tyoluminescence : contrairement à la crystaloluminescence, c'est la luminescence qui apparaît lorsque les cristaux sont dissous dans un liquide;
- la sonoluminescence : lorsque l'excitation est réalisée par le passage d'un intense son d'ondes à travers un liquide, l'émission qui en résulte provient des décharges électriques dans la couche de gaz résiduelle des cavités formées par l'énergie acoustique dans le liquide;
- la photoluminescence : lorsque l'excitation est réalisée par une source lumineuse. Selon la durée de vie et la nature des états excités mis en jeu, on distingue la fluorescence et la phosphorescence;
- et d'autres types de luminescence plus spécialisés tels que la cathodoluminescence, anodoluminescence, radioluminescence et la fluorescence par les rayons X.

Les aspects théoriques et pratiques de l'analyse par luminescence des composés organiques et inorganiques ont été largement décrits dans la littérature [BECKER (1969); PESEZ et BARTOS (1974); LAKOWICZ (1983); GOLDBERG et WEINER (1989); GUILBAULT (1990)].

Dans ce mémoire, il ne sera fait rappel qu'aux notions de photoluminescence, particulièrement de la fluorescence, les possibilités de détection par phosphorescence et chimiluminescence faisant l'objet d'autres travaux du laboratoire.

Une molécule excitée peut revenir à l'état fondamental par diverses voies (Figure 1) et notamment :

- par transition énergétique lumineuse
- par transition énergétique thermique non radiative (collision)
- par croisement inter-système (passage à l'état triplet)

les phénomènes non radiatifs et radiatifs sont chacun caractérisés par une constante de vitesse : k_{nr} pour les phénomènes non radiatifs; k_f pour les phénomènes radiatifs. Ces constantes interviennent dans l'expression des paramètres physiques mesurables.

La fluorescence est émise dans toutes les directions, et toutes les longueurs d'onde du spectre de fluorescence sont émises simultanément. Cependant, l'appareil ne recueille qu'une partie de la fluorescence, sous un petit angle solide, et à une seule longueur d'onde sélectionnée par le monochromateur d'émission.

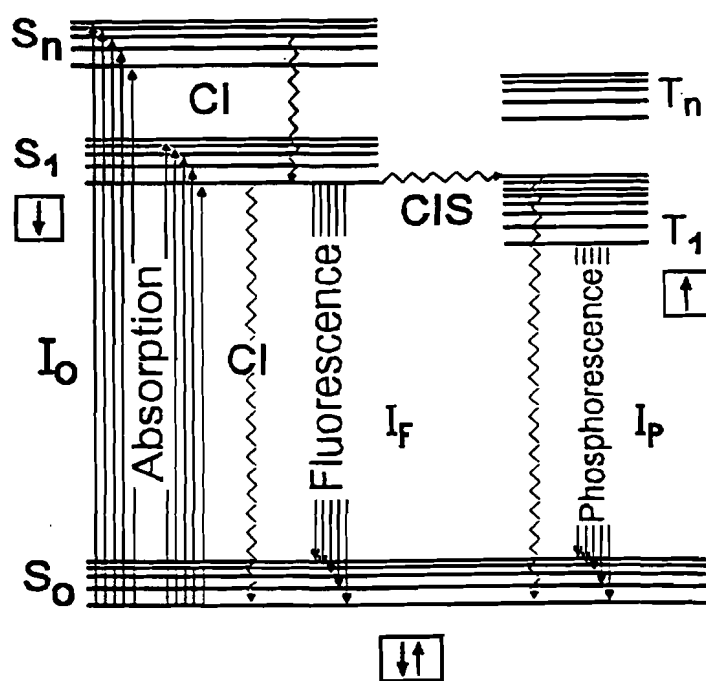


Figure 1 : Diagramme simplifiée de Jablonski

S_0, S_1, S_n : niveaux de l'état fondamental singulet et des états excités

T_1, T_n : niveaux des états triplet

CI : transitions par conversions internes

CIS : transitions par croisement intersystème

I_0 : intensité de l'énergie d'excitation

I_F et I_P : intensités de la fluorescence et de la phosphorescence

La relation fondamentale qui lie la fluorescence à la concentration est donnée par l'équation :

$$F = \phi_f I_0 (1 - e^{-\varepsilon l C})$$

avec F intensité du signal de fluorescence exprimée en Einstein par seconde (où 1 Einstein = N photons = 6×10^{23} photons)

ϕ_f rendement quantique de fluorescence

I_0 intensité de la radiation excitatrice

ε coefficient d'absorption molaire de la substance

l épaisseur de la cuve

C concentration molaire de la substance

Il ressort de cette équation que l'intensité de fluorescence est fonction de 3 grands facteurs (autre que la concentration) :

- le rendement quantique de fluorescence
- l'intensité de la radiation excitatrice
- le coefficient d'absorption molaire de la substance

Pour les solutions, on définit le rendement quantique de fluorescence ϕ_f , paramètre indépendant de l'intensité lumineuse de la source, comme la fraction de la radiation incidente réémise sous forme de fluorescence.

$\phi_f = \text{nombre de photons émis} / \text{nombre de photons absorbés} :$

$$\phi_f = F/I_a$$

Ce rapport varie entre 0 (pas de fluorescence) et 1 (fluorescence maximale) et il est sans dimension. ϕ_f est caractéristique de la substance fluorescente et défini pour une température donnée et dans un solvant donné. ϕ_f diminue lorsque la température augmente (environ 1% par degré), car la conversion interne et les désactivations par chocs intermoléculaires sont favorisées. ϕ_f peut varier considérablement d'un solvant à l'autre, (d'un facteur 10 à 100). En revanche, il est indépendant de la longueur d'onde d'excitation, car seuls les photons absorbés sont pris en compte. Il existe également une relation, entre le rendement de fluorescence et le temps de vie de fluorescence, exprimée par l'équation : $\phi_f = \tau/\tau_0$; lorsque τ est le temps de vie de fluorescence qui reflète la durée de vie moyenne du fluorophore à l'état excité singulet $\tau = 1/(k_f + k_{nr})$; τ_0 , temps de vie intrinsèque de fluorescence, est définie comme étant le temps de vie de fluorescence du fluorophore en l'absence de tout processus non radiatifs $\tau_0 = 1/\tau$.

Sachant que $I_a = I_0 - I_t$ (I_t désignant l'intensité de la lumière transmise), la relation ci-dessus conduit aux expressions suivantes :

$$F = \phi_f (I_0 - I_t)$$

$$\text{soit } F = \phi_f I_0 (1 - I_t/I_0)$$

$$\text{sachant que } \log I_0/I_t = A$$

$$\text{soit } I_t/I_0 = 10^{-A}$$

$$\text{on aboutit à la relation } F = \phi_f I_0 (1 - 10^{-A})$$

si la solution est diluée, le terme A , qui est égal à $\epsilon l C$, est faible ($< 0,05$); l'expression entre parenthèses se simplifie en devenant pratiquement égale à A et la dernière relation s'écrit alors :

$$F = \phi f I_0 \varepsilon l C$$

A est nommé extinction, absorbance, ou densité optique; le rapport I_t / I_0 est la transmission (transmittance), il est souvent exprimé en transmission pour cent $100 I_t / I_0$.

Ainsi, pour des mesures faites dans des conditions semblables, on peut réunir dans un même facteur K l'ensemble des paramètres, hormis les termes de concentration C et d'intensité incidente I_0 , et écrire, pour les faibles concentrations ($\varepsilon l C < 0,05$),

$$F = K I_0 C$$

Il apparaît donc que F peut être augmentée soit en agissant sur la source lumineuse (c'est à dire en augmentant I_0), soit en modifiant les caractéristiques photophysiques de la molécule étudiée (ϕf et ε).

L'équation ci-dessus montre que l'intensité du signal de fluorescence F est proportionnelle à l'intensité de la radiation excitatrice, d'où l'idée d'accroître l'énergie de la source lumineuse pour augmenter F . Une meilleure détection n'est toutefois pas nécessairement obtenue. Il en résulte, très souvent, une diminution du rapport signal/bruit due au rôle important de la diffusion de la lumière et des fluctuations d'énergie de la lampe.

L'emploi actuel de sources lasers apparaît très prometteur [HULSHOFF et LINGEMAN (1985); SEPANIAK (1985)], tout comme le remplacement de l'excitation photonique par une excitation chimique [TOD (1990)] qui permet d'éviter les phénomènes de diffusion de la lumière et de réduire considérablement le bruit de fond, tout en excitant fortement les fluorophores.

Inversement on peut tenter d'améliorer le rendement quantique ϕ_f du fluorophore afin d'en améliorer la détection. Parmi les approches possibles, on peut convertir les composés peu ou non fluorescents en composés fortement fluorescents, en pré ou post colonne, soit par transformation chimique [LINGEMAN et coll., (1985)], soit par l'utilisation de réacteurs photochimiques [AARON (1993)]. Dans le cas du réacteur photochimique, les photons jouent le rôle de réactif. Les composés non fluorescents sont irradiés en post-colonne par une lumière UV pour donner des produits de réaction généralement très fluorescents.

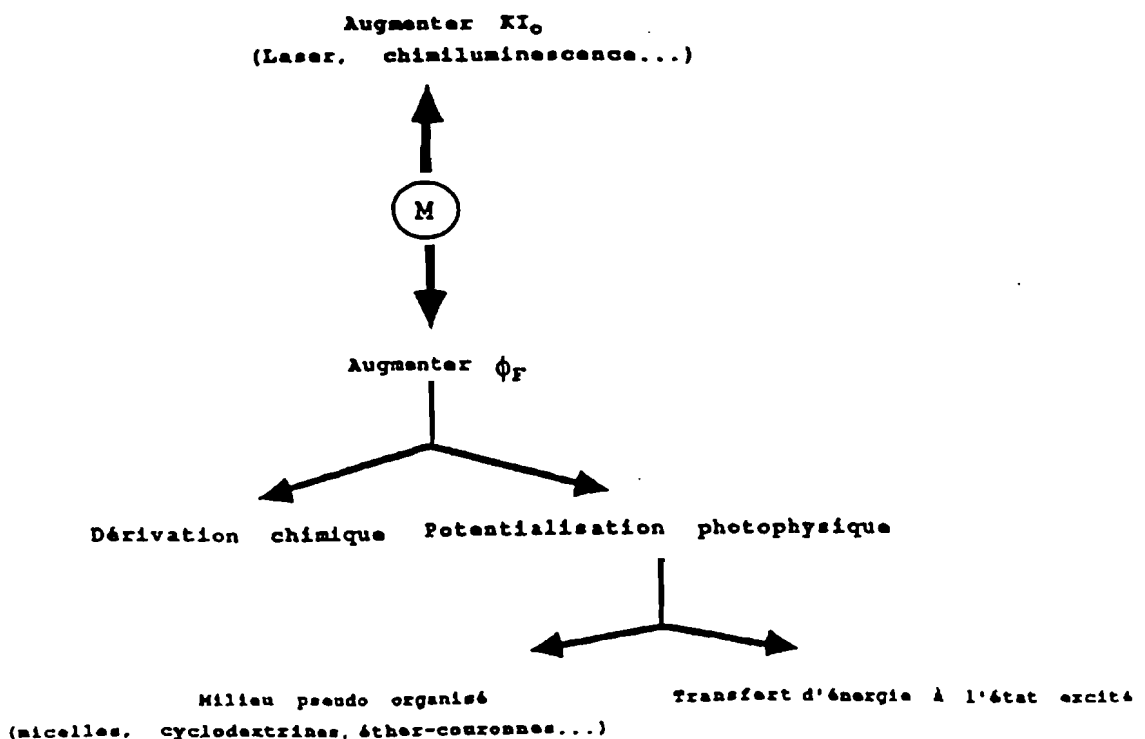
La modification de l'environnement direct de la molécule est également susceptible de modifier ses caractéristiques photophysiques. L'utilisation des micelles crée autour du fluorophore un environnement organisé et de viscosité locale augmentée le protégeant des phénomènes de relaxation vibrationnelle, d'où une potentialisation du rendement quantique de fluorescence. Il en est de même lors de l'inclusion de certains fluorophores dans la cavité de molécules types cyclodextrines [SARGI (1992)]. De tels effets sont exploités aussi bien en fluorescence qu'en phosphorescence à température ambiante. Ils s'inscrivent dans le cadre des méthodes de potentialisation directe, c'est à dire que l'on agit directement sur la molécule faiblement luminescente en modifiant ses propres caractéristiques de luminescence. Le phénomène de transfert d'énergie est également utilisé comme méthode de potentialisation directe. Dans ce cas, la molécule à doser est accepteur d'énergie et voit sa luminescence augmenter en présence du donneur [SARGI (1992)].

Une autre possibilité réside dans l'utilisation de méthodes de potentialisation indirecte. Dans ce cas, le transfert d'énergie est utilisé pour doser la molécule peu luminescente. Le dosage se fait alors par l'intermédiaire d'une autre molécule beaucoup plus luminescente dont on

enregistre les variations de luminescence en présence de la molécule à doser. Lorsque cette dernière est donneur, la variation se fait dans le sens de l'augmentation. A l'inverse, elle se fait dans le sens de l'inhibition lorsqu'elle est accepteur. Dans les deux cas, il s'agit de potentialisation indirecte de luminescence, c'est à dire qu'elle ne modifie pas les caractéristiques photophysiques propres de la molécule dosée [SARGI (1992)].

Toutefois, les applications du transfert d'énergie singulet-singulet comme méthode de potentialisation de luminescence (ici fluorescence) sont rares [GOOIJER et coll., (1986)] car peu avantageuses par rapport à la fluorescence directe généralement plus aisée à mettre en oeuvre. La mise au point de telles méthodes nécessiteraient par ailleurs de fortes concentrations en donneur entraînant une émission de bruit de fond importante. De plus, le donneur doit être caractérisé par une longue durée de vie de fluorescence (de l'ordre de microseconde) et un rendement quantique de fluorescence élevé.

Le schéma suivant résume de façon synthétique les différents aspects évoqués ci-dessus.



D'un point de vue chromatographique, il sera de plus fait appel à la notion de sensibilité intrinsèque de fluorescence (IFS) d'une molécule. En effet, dans les études de l'absorption de la lumière, le coefficient d'absorption molaire (ϵ) d'un composé est un très bon paramètre de prédiction du degré d'absorption et, donc de la sensibilité de détection. A l'inverse dans les modes de détection par luminescence, et en particulier par fluorescence, le rendement quantique seul ne permet pas d'apprécier quantitativement la sensibilité de fluorescence d'un composé après chromatographie liquide. Ceci parcequ'il ne donne pas d'information sur le nombre de photons absorbés. Le produit $\epsilon \phi_f$ est caractéristique d'un composé pour la longueur d'onde considérée. PARKER (1968), définit ce produit comme la sensibilité absolue de fluorescence pour s'affranchir des paramètres spécifiques à l'emploi d'un appareil particulier. Par la suite LLOYD (1979), introduit la notion de sensibilité intrinsèque de fluorescence pour montrer que la sensibilité de fluorescence ne dépend pas seulement du produit $\epsilon \phi_f$ mais aussi de la largeur de la bande d'émission à mi-hauteur (H). Cette dernière (exprimée en cm^{-1}) contrôle la distribution de l'intensité de fluorescence sur la partie du spectre d'émission apprécié par le détecteur et est toutefois important pour la sensibilité de la cellule du détecteur. Pour la détection fluorimétrique après chromatographie, seule une bande centrée sur le maximum d'émission est sélectionnée lorsque le fluorimètre est équipé d'un monochromateur et non de filtres. Dans ces conditions on peut comparer les sensibilités intrinsèques de fluorescence de différentes molécules en utilisant la relation suivante :

$$IFS = \epsilon \phi_f / H$$

Pour pouvoir détecter des quantités de l'ordre de 1 ng d'un composé à analyser, il est nécessaire que la valeur de IFS soit $\geq 0,5$ [LINGEMAN et coll., (1985)].

Enfin, une constante physique qui caractérise les molécules fluorescentes est la différence entre les longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Cette constante, appelée déplacement de Stokes, indique l'énergie dissipée durant le temps de vie de fluorescence de l'état excité avant son retour à l'état fondamental :

$$\text{Déplacement de Stokes } (\Delta\nu \text{ en cm}^{-1}) = 10^7 (1/\lambda_{ex} - 1/\lambda_{em})$$

lorsque λ_{ex} et λ_{em} sont respectivement les longueurs d'onde d'excitation et d'émission exprimées en nanomètres des spectres corrigés. Le déplacement de Stokes est d'un grand intérêt sur le plan analytique puisque la longueur d'onde d'émission peut être très dépendante des nouvelles contraintes stériques de l'état excité.

II. PRESENTATION DES LUMINARINES

II-1 INTRODUCTION

Les luminarines sont des dérivés de la 1H, 5H, 11H-[1] benzopyrano [6,7,8-ij] -2,3,6,7-tétrahydro -11-oxo-quinolizine, qui possèdent des propriétés de fluorescence ou de chimiluminescence. On les utilise comme réactifs marqueurs : par greffage sur des composés organiques, elle confèrent à ceux ci leurs propriétés.

Ce type de structure est caractéristique de nombreux colorants fluorescents, dans lesquels l'azote aminé peut être soit libre, soit bloqué dans un cycle : on peut citer, entre autres dans ce domaine, les aminophénoxazones [BASTINGS et coll., (1976)], les aminopyridines et aminopyrones [HAMMOND et coll., (1976); KHAN et GEMAL (1976)], les naphtyridines [HENRY et coll., (1977)] et les benzoxazinones [Le BRIS et coll., (1984; Le BRIS 1984, 1985 et 1989)].

Le terme marqueur de fluorescence ou de chimiluminescence désigne les molécules qui ont un groupement fluorophore et une fonction réactive qui peut être attachée à d'autres molécules par des liaisons covalentes. On considère d'ailleurs la possibilité d'autres types de liaisons basées sur des interactions dipôle-dipôle, hydrophobiques et ioniques.

Le dosage par chromatographie liquide d'amines, d'aldéhydes, de cétones, d'acides carboxyliques dépourvus de propriétés spectrales nécessite, pour atteindre une grande sensibilité, de transformer ces composés à l'aide de réactifs marqueurs pour leur conférer des propriétés d'absorption, de fluorescence ou de chimiluminescence.

L'utilisation des marqueurs de fluorescence à noyau aminocoumarine a été pour la première fois explorée dans le laboratoire en vue du dosage

des acides carboxyliques à courtes chaînes dans les milieux biologiques [FARINOTTI et coll., (1983a et 1983b)]. Il ressort de cette étude, que les molécules les plus intéressantes pour une application chromatographique sont les dérivés de la 7-diméthylamino coumarine; 6,7-diméthoxy coumarine; 5,7-diméthoxy coumarine, substitués en 4.

Les performances fluorimétriques de ces marqueurs dépendent fortement des propriétés physico-chimiques des solvants utilisés (polarité, viscosité, température); leur rendement quantique diminue, souvent d'un facteur significatif, lorsque la température et/ou la polarité du solvant augmente, mais il est amélioré, par exemple, dans les solvants visqueux ou à basse température. Ces résultats sont expliqués, dans le cas des coumarines, par le fort caractère polaire de ces molécules à l'état excité. En effet, la présence d'un groupement donneur (fonction amine : amine primaire ou dialkylamine) et d'un groupement accepteur (fonction carbonyle ou atomes d'oxygène du groupement lactone) conduisent à un état de dipôle. Le transfert de charge intramoléculaire plane (ICT : Intramolecular Charge Transfert), qui en résulte conduit à une large augmentation du moment dipolaire et en conséquence un important effet de solvant, se traduisant en général par une diminution de l'intensité de fluorescence dans les solvants polaires.

Il a été démontré que ces phénomènes photophysiques sont fortement atténués, lorsque la rigidité des aminocoumarines est améliorée, par inclusion de l'atome d'azote dans un cycle [REYNOLDS et DREXHAGE (1975); JONES II et coll., (1980 et 1985)]. C'est pourquoi, par exemple, le rendement quantique dans l'eau de la coumarine 1 (Figure 2), qui possède un groupement amine libre, est de 0,055; alors que la coumarine 102, avec la fonction aminée incluse dans une structure rigide, voit son rendement quantique s'élever à 0.66 dans le même solvant [JONES II et coll., (1985)].

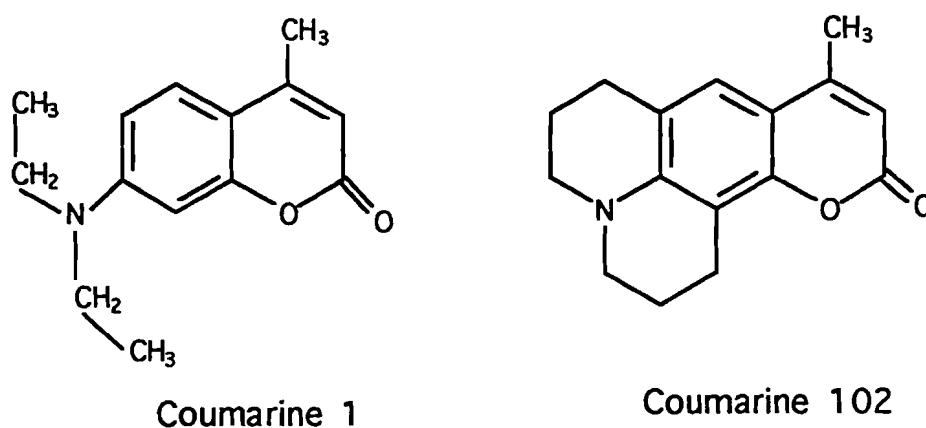


Figure 2 : Structure de la coumarine 1 et coumarine 102

Ces effets peuvent être interprétés par la mobilité du groupement amine dans le cas de la coumarine 1, dont la rotation, provoque une dissipation de l'énergie, suivie dans quelques cas de la formation d'un état de transfert de charge intramoléculaire non plane de torsion vers la fonction amine (liaison C-N) aboutissant à une diminution de la planéité de la molécule (TICT : Twisted Intramolecular Charge Transfert) (Figure 3) [REYNOLDS et DREXHAGE (1975); JONES II et coll., (1980 et 1985); DECLEMY et coll., (1983)]. Tous ces états sont stabilisés par les interactions dipôle-dipôle. Ainsi donc, comme la coumarine 102 a son atome d'azote impliqué dans un cycle, ce phénomène de rotation est empêché et par conséquent, la fluorescence est sensiblement améliorée.

Notons cependant que le concept de TICT a été décrit pour la première fois pour les p-cyanodialkylanilines, et alors étendu à une gamme variée de composés [GRABOWSKI et coll., (1979 et 1983); ROTKIEWICZ et KÖHLER (1987)]. Ces composés émettent une double fluorescence, une, à énergie très faible, qui prédomine dans la plupart des solvants polaires, l'autre, à haute énergie dans les solvants faiblement polaires. Dans le cas

des coumarines, la diminution de leurs propriétés d'émission en fonction de la polarité du solvant peut être expliquée par une désactivation par l'intermédiaire de l'état de transfert de charge de torsion sans émission de fluorescence. Dans ce cas, à l'inverse des p-cyanodialkylanilines, une double fluorescence n'est pas observée.

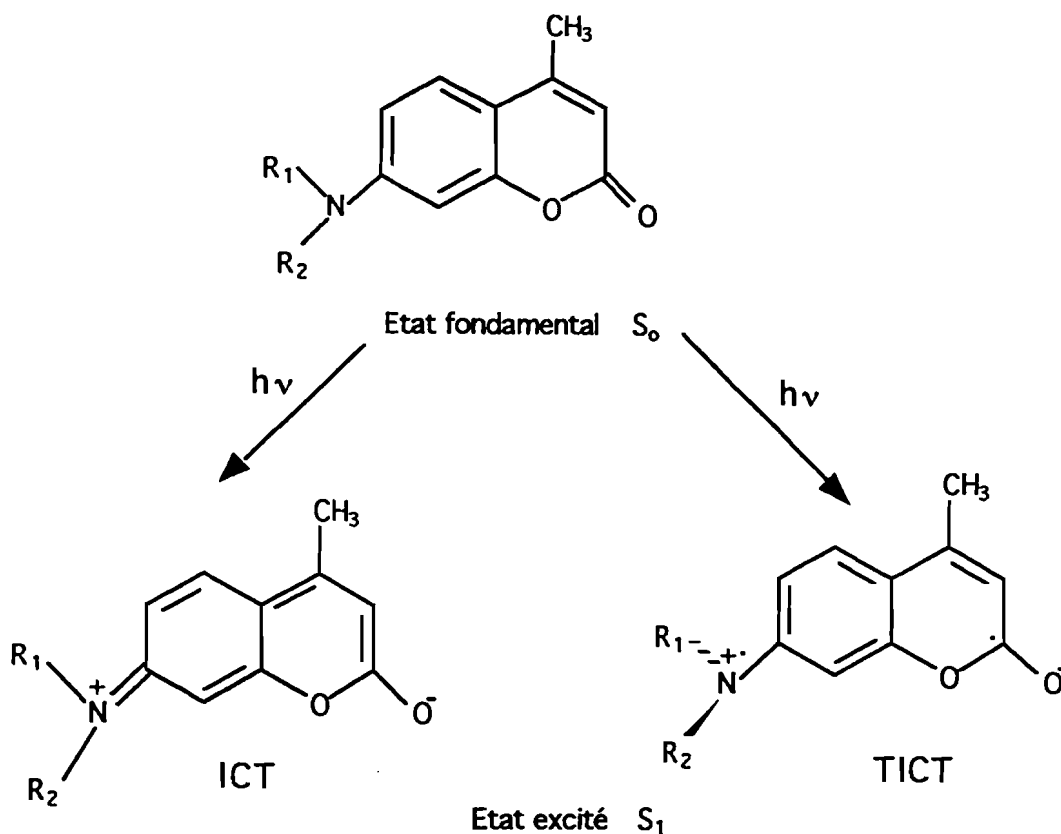


Figure 3 : Etats d'ionisations possibles des aminocoumarines après excitation

Compte tenu des propriétés de fluorescence intéressantes que peuvent présenter les composés dérivés de la coumarine 102 (rendement quantique et coefficient d'absorption molaire élevés), nous avons tenté d'introduire, en position 9 du noyau quinolizinocoumarine, à la place du

méthyl de la coumarine 102 (1H, 5H, 11H-[1] benzopyrano [6,7,8-ij] - 2,3,6,7-tétrahydro - 9-méthyl - 11-oxo-quinolizine), des groupements réactionnels, faisant ainsi de ces molécules des marqueurs de fluorescence ou de chimiluminescence.

Depuis quelques années, le laboratoire s'intéresse à la synthèse de marqueurs fluorescents ou chimiluminescents (de polarités moyennes) dérivés du noyau quinolizinocoumarine. Les critères de choix du meilleur marqueur sont :

- la rapidité de la réaction
- la possibilité d'opérer dans les conditions douces de température et de pH
- l'obtention d'un rendement de transformation élevé
- la sélectivité de la réaction vis à vis de diverses fonctions chimiques
- la possibilité de greffer de très petites quantités de substance

Ainsi, une série de réactifs de dérivation (Figure 4) des amines primaires et secondaires (Lu.1 et Lu.2) , des aldéhydes et cétones (Lu.3), des acides carboxyliques et anhydrides d'acides (Lu.4) a d'abord été synthétisée au laboratoire, avec la collaboration de la société EUROBIOSERATEC. Plus récemment, d'autres réactifs de dérivation des fonctions thiol et hydroxyle (Lu.5), carbonyle (Lu.11 et Lu.12) et de nouveaux réactifs de dérivation pour les amines primaires et secondaires (Lu.8, Lu.9 et Lu.10) ont été synthétisés.

Pour notre part, nous avons synthétisés la Lu.3, Lu.11 et Lu.12, qui sont des luminarines-hydrazides, en vue de la dérivation et détection des aldéhydes et cétones d'une part , des nucléosides, nucléotides et anticorps ou antigènes d'autre part.

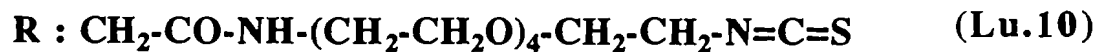
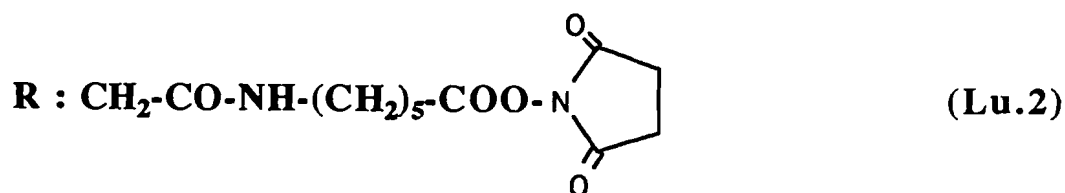
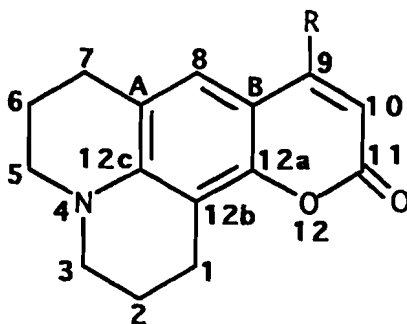


Figure 4 : Structure des luminarines utilisées actuellement comme marqueurs de fluorescence ou de chimiluminescence

Les voies de l'introduction sur le noyau coumarinique des différentes fonction réactives décrites dans la littérature [DEY (1915); BAKER et coll., (1950); SCHIAVELLO et CINGOLANI (1951); SECRIST et coll., (1971); GOYA et coll., (1980); JOSHI et USGAONKAR (1982); TAKADATE et coll., (1982); LJUNGGREN et coll., (1983); AMIR et HAAS, (1986)] vont nous servir de base à la mise au point de la synthèse des réactifs de dérivation que nous proposons de développer.

Cependant, il faut souligner que la plupart de ces travaux concerne des méthoxycoumarines et non des aminocoumarines. La présence de cette fonction amine, beaucoup plus réactive que le groupement méthoxy, introduit une modification du comportement chimique du noyau et une difficulté supplémentaire à la réalisation des synthèses. TOD (1990) a démontré que certaines des voies décrites ne s'appliquent pas aux aminocoumarines

II-2 SYNTHÈSE DE REACTIFS DE GREFFAGE, DERIVES DU NOYAU QUINOLIZINOCOUMARINE, A FONCTION HYDRAZIDE

Par analogie au noyau coumarinique, nous avons synthétisé le noyau quinolizino-coumarinique par condensation de Pechman. Les différentes luminarines-hydrazides seront synthétisées en référence aux méthodes décrites par BAKER et coll., (1950) et GOYA et coll., (1980) pour la synthèse de la 7-méthoxy 4-acétylhydrazide coumarine et de la 7-méthoxy 4-carbohydrazide coumarine, respectivement.

Les détails sur les protocoles opératoires de synthèse, ainsi que les contrôles et identités des différents réactifs sont présentés dans les annexes I-1 à I-3 (pages 290-298).

II-2-1 Synthèse de la luminarine 3

Deux méthodes ont été utilisées :

- l'une faisant intervenir l'ester méthylique de la coumarine 102 - acide, ester méthylique de l'acide quinolizinocoumarinyl 9-acétique (Méthode A)
- l'autre, la luminarine 1 (Lu.1), ester N-hydroxysuccinimide de la coumarine 102 - acide (Méthode B).

Elles consistent toutes à faire réagir un ester de la coumarine 102 - acide avec une solution aqueuse d'hydrazine à froid.

*** Méthode A**

La synthèse comporte deux étapes-clef résumées ci-dessous (Figure 5) :

- formation de l'ester méthylique de l'acide quinolizinocoumarinyl 9-acétique par condensation de Pechman.
- réaction de condensation de cet ester avec l'hydrazine pour obtenir la Lu.3.

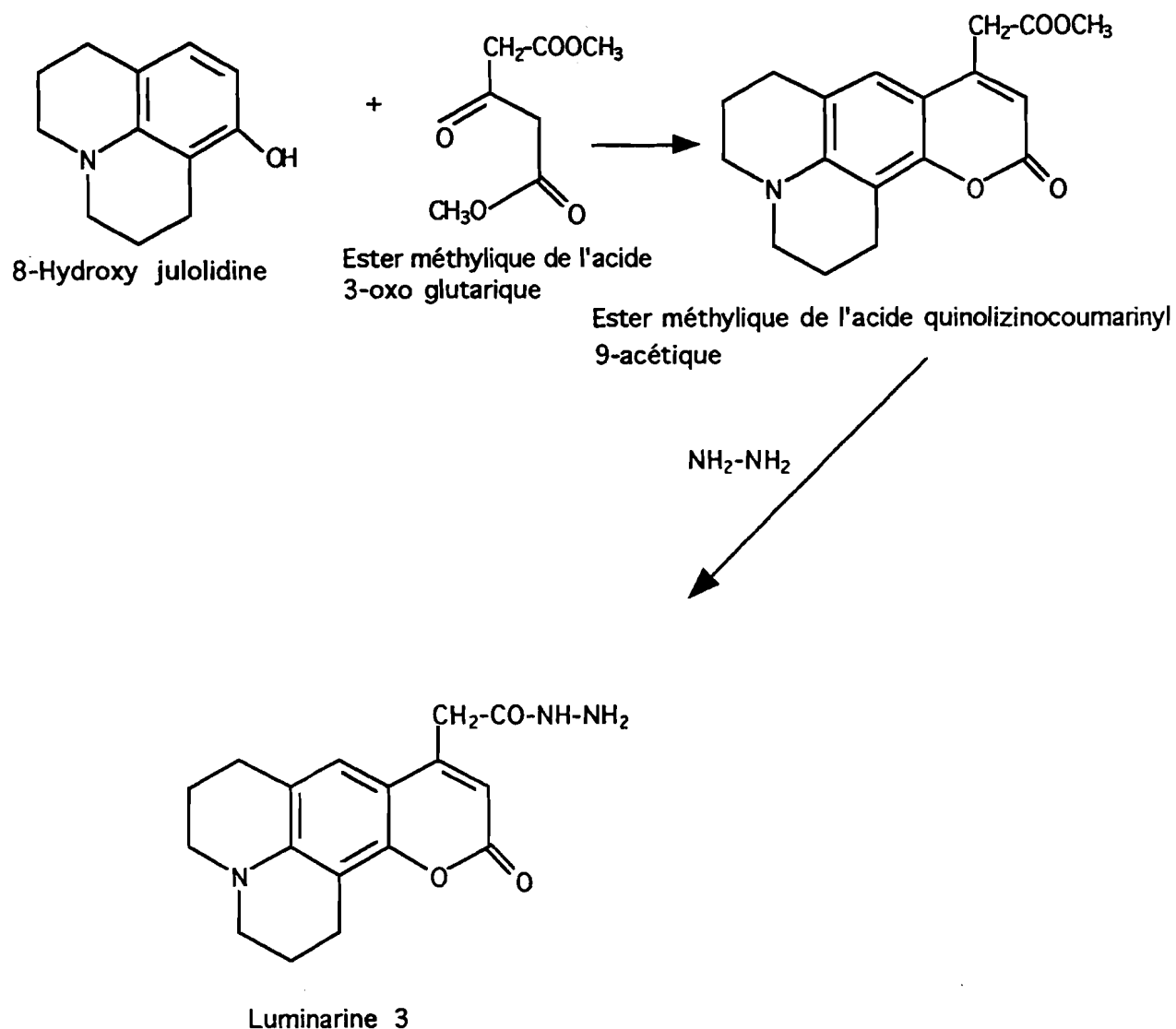


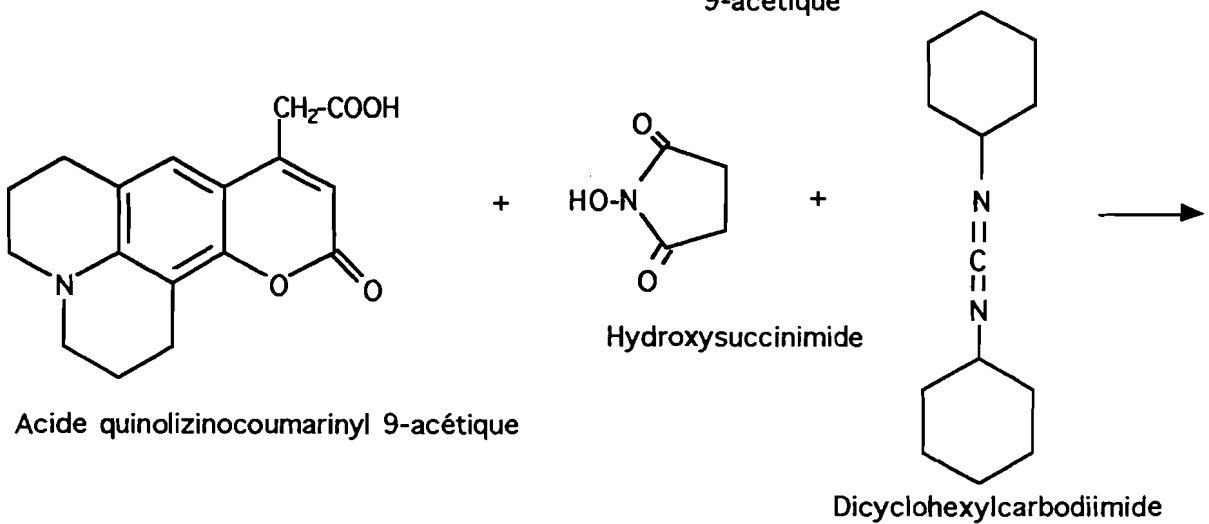
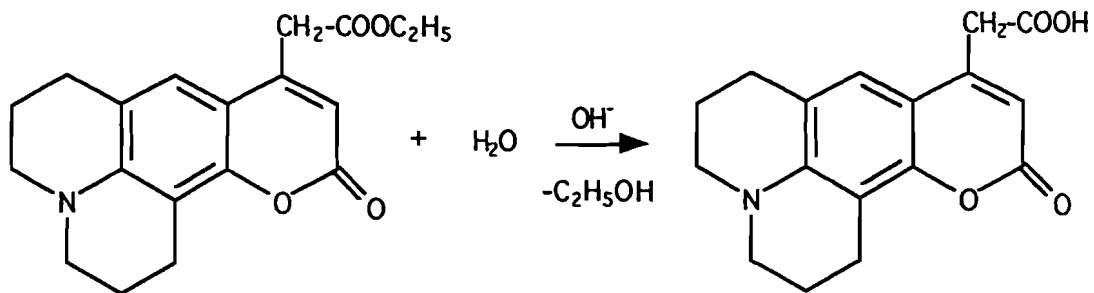
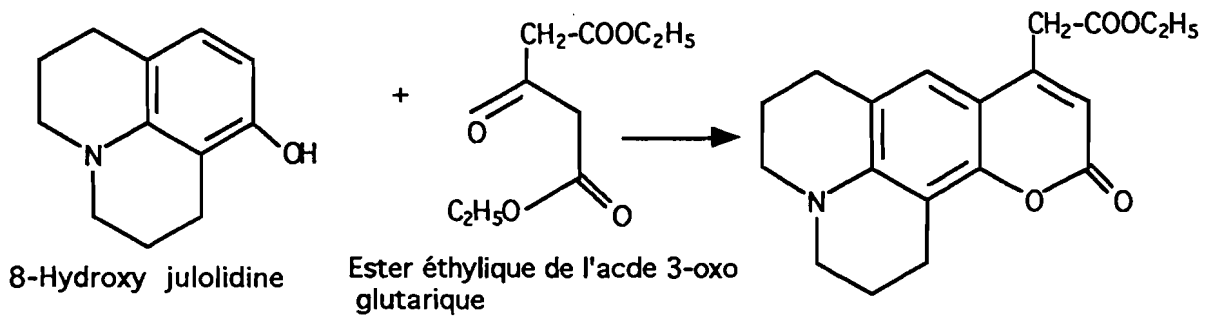
Figure 5 : Synthèse de la luminarine 3 (Méthode A)

*** Méthode B**

La synthèse est réalisée en une seule étape avec la luminarine 1 (Lu.1) et l'hydrate d'hydrazine. Cependant, il convient de rappeler par principe les différentes étapes conduisant à la Lu.1 (Figure 6) :

- formation de l'ester éthylique de l'acide quinolizinocoumarinyl 9-acétique
- formation de l'acide quinolizinocoumarinyl 9-acétique par hydrolyse alcaline de l'ester éthylique correspondant.
- formation de la luminarine 1 par la réaction d'esterification de l'acide quinolizinocoumarinyl 9-acétique avec le N-hydroxysuccinimide.

La synthèse de la luminarine 3 à partir de la luminarine 1 est présentée dans la Figure 7.



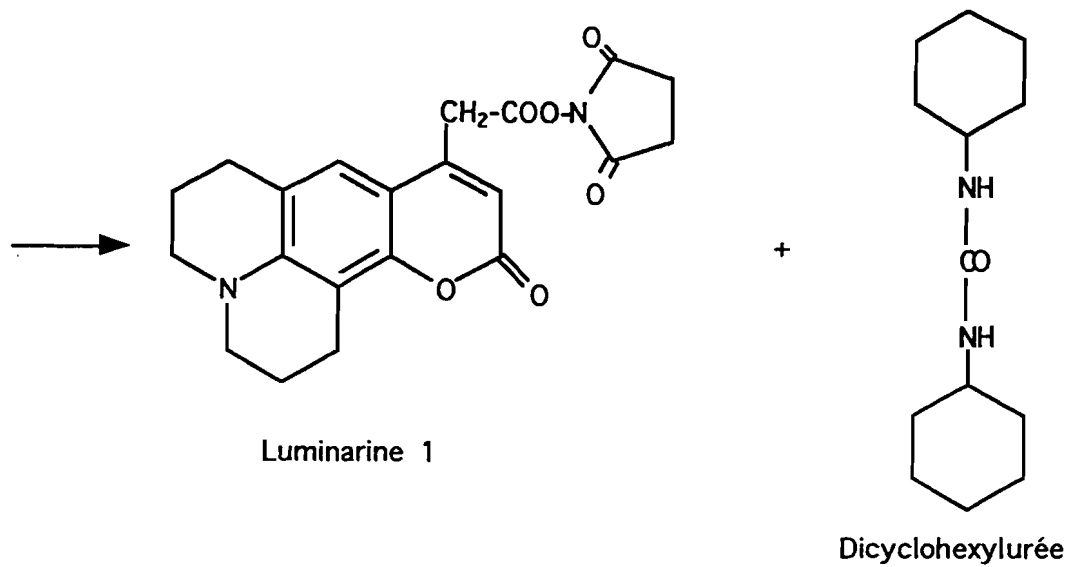
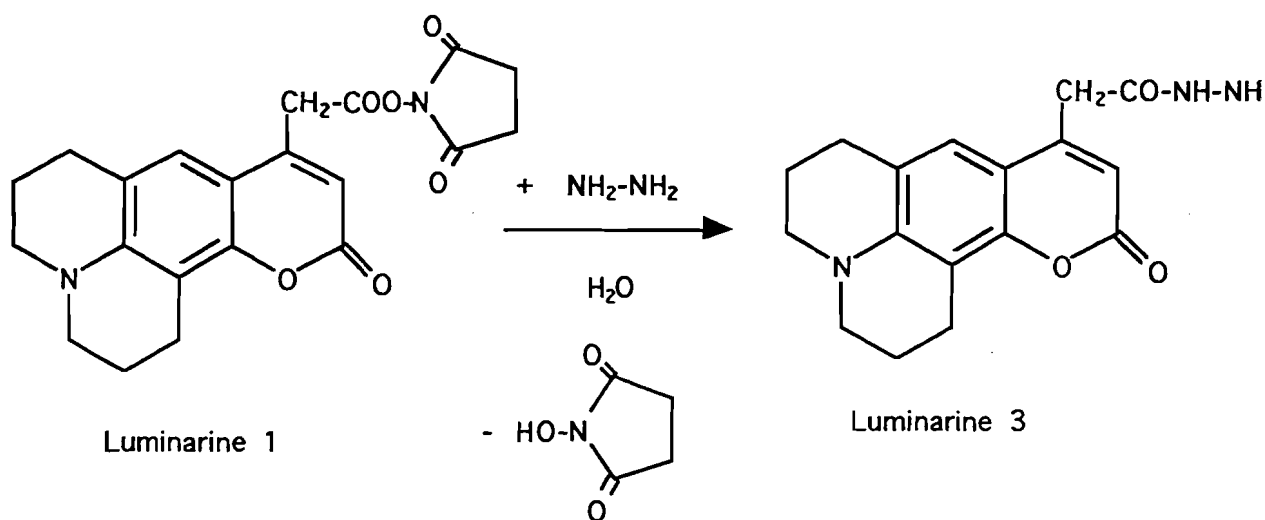


Figure 6 : Synthèse de la luminaire 1

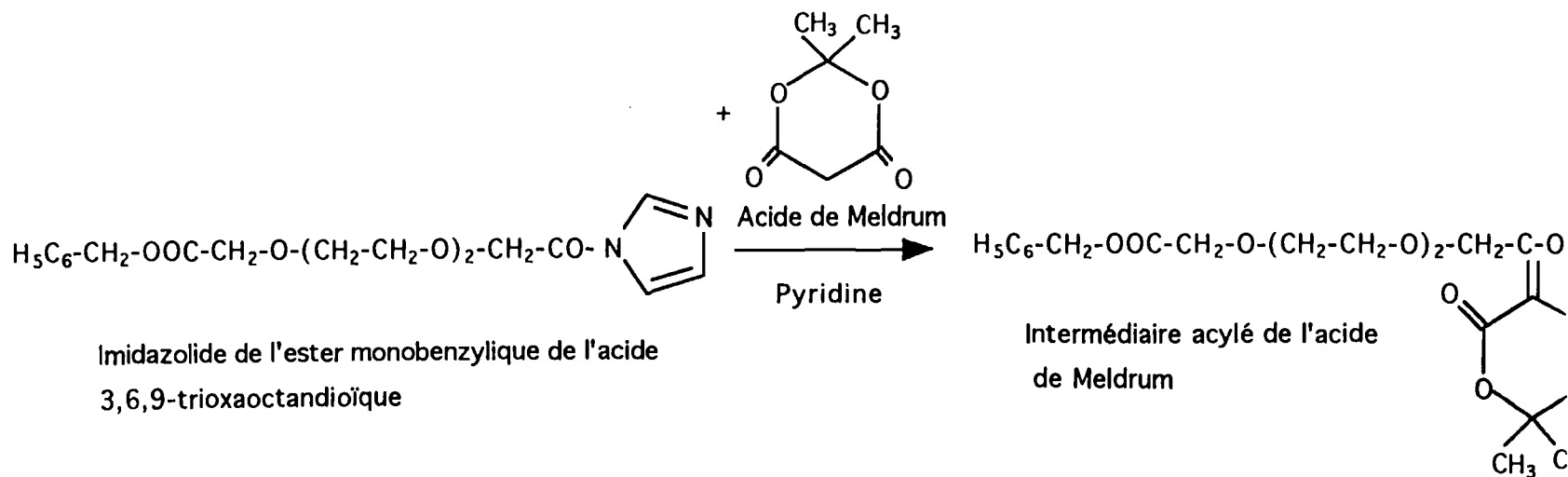
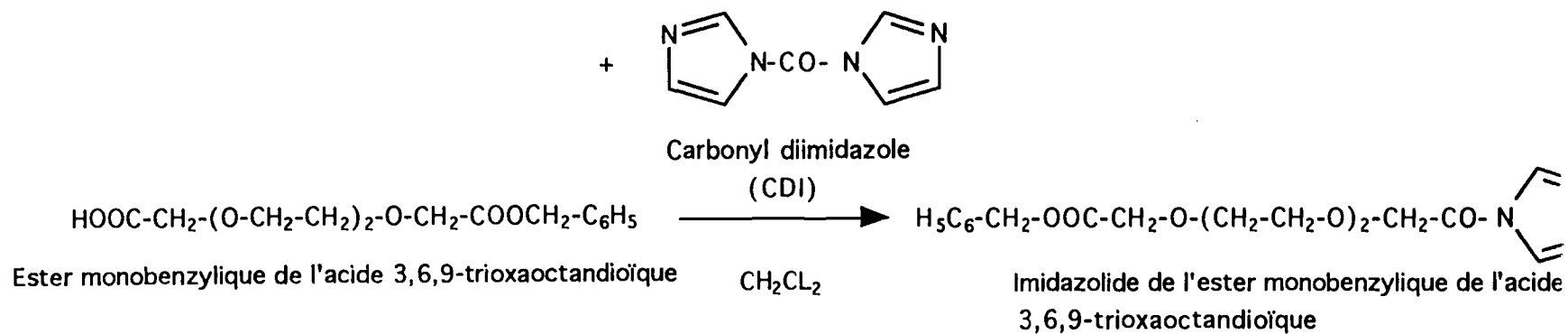
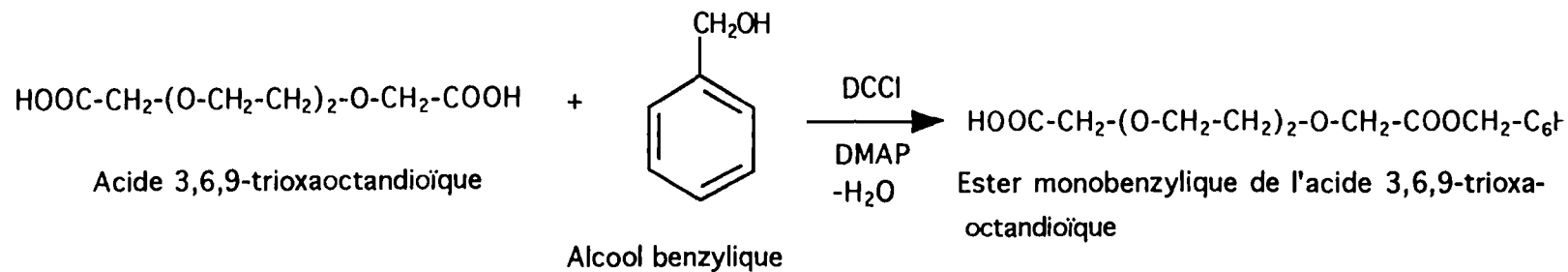


**Figure 7 : Synthèse de la luminaire 3 à partir de la luminaire 1
(Méthode B)**

II-2-2 Synthèse de la luminarine 12

La méthode de synthèse que nous avons choisie comporte cinq grandes étapes (Figure 8):

- formation de l'ester monobenzylique de l'acide 3,6,9-trioxa octandioïque, par esterification de l'acide par l'alcool benzylique sous l'action du dicyclohexylcarbodiimide (DCCI) et de la diméthylamino pyridine (DMAP).
- formation de l'imidazolide de l'ester monobenzylique de l'acide 3,6,9-trioxa octandioïque.
- formation de l'ester benzylique du 3,6,9-trioxa octandioyl acétate d'éthyle.
- formation de l'ester éthylique de la luminarine 12 par condensation de Pechman.
- condensation de l'ester éthylique de la luminarine 12 avec l'hydrazine pour former la luminarine 12.



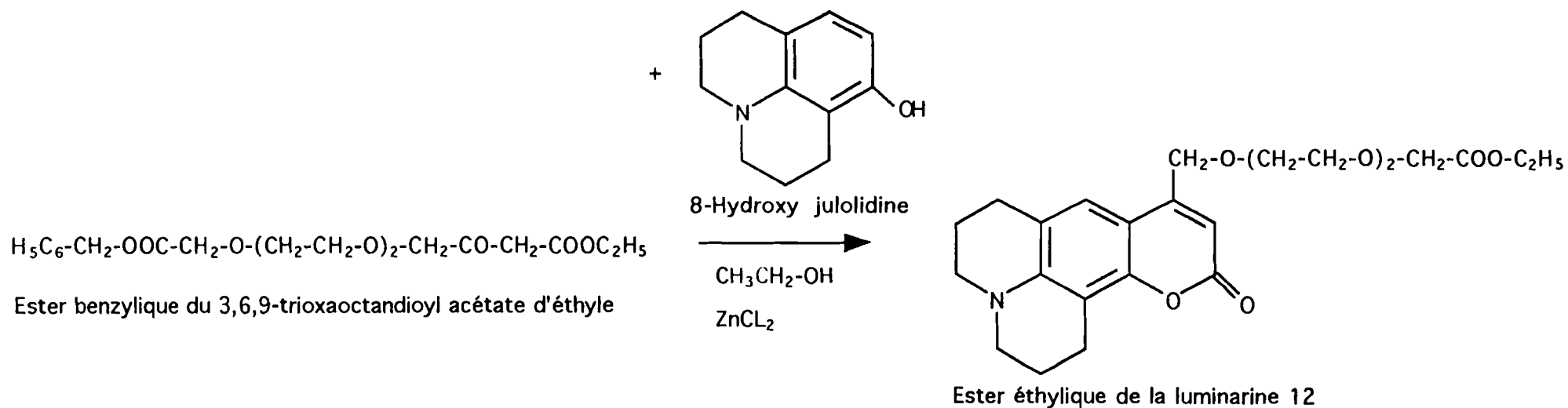
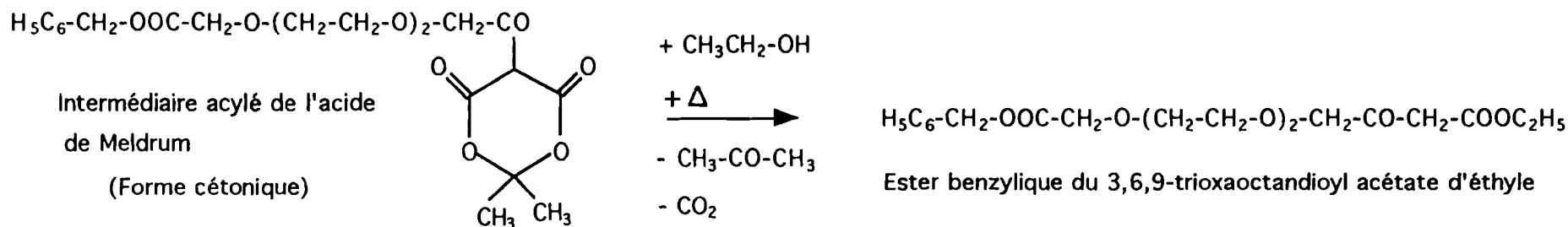
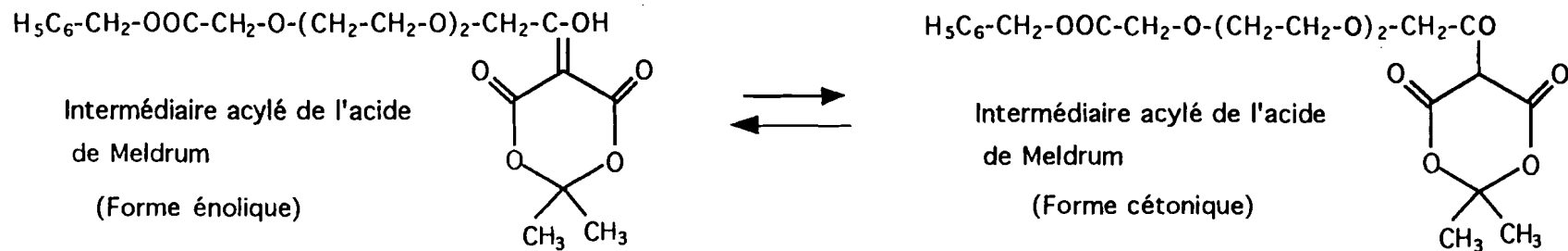


Figure 8: Synthèse de la luminarine 12 (suite 1)

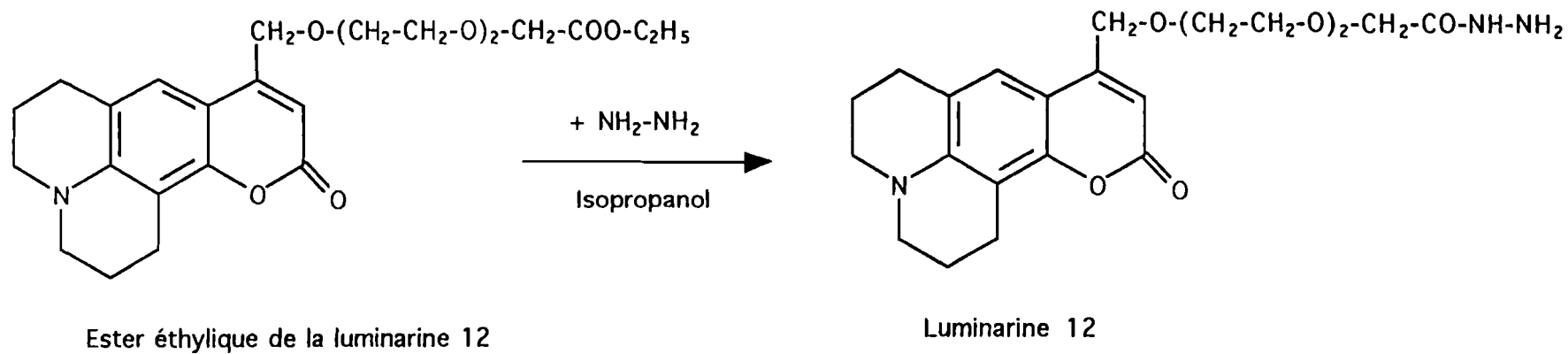


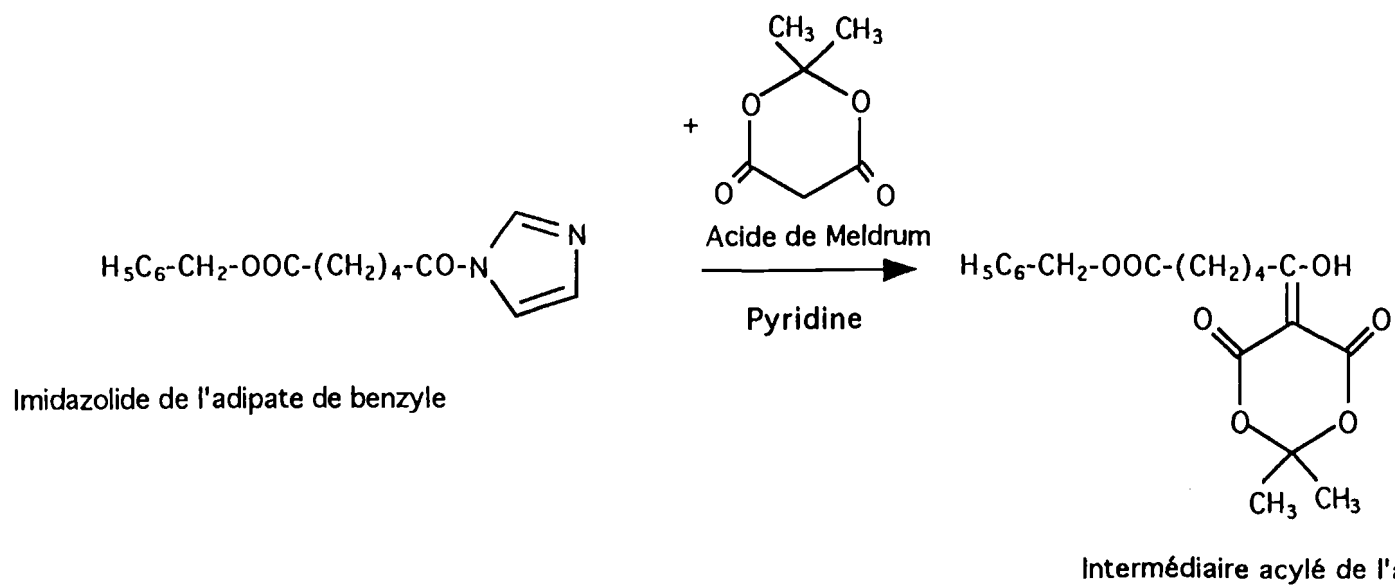
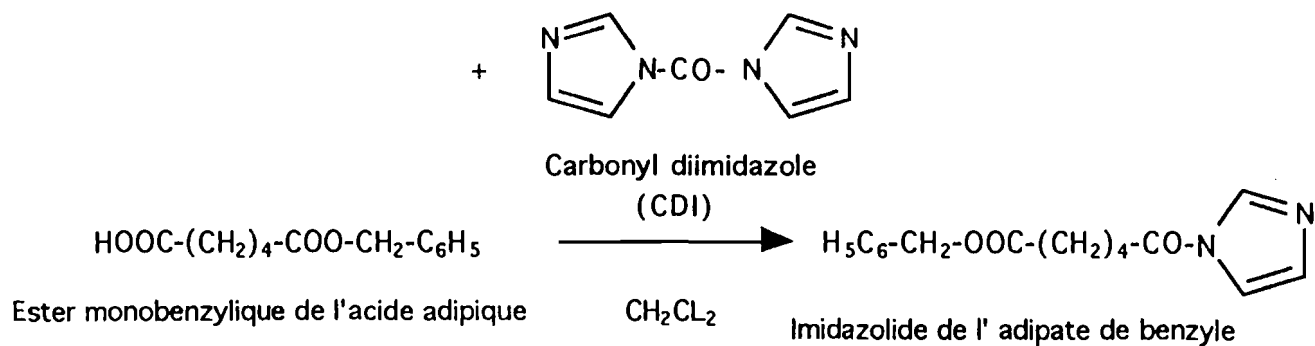
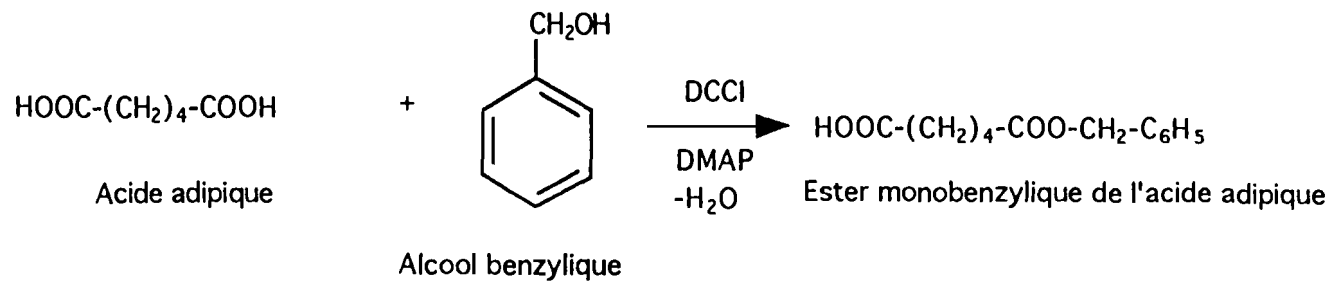
Figure 8: Synthèse de la luminarine 12 (suite 2)

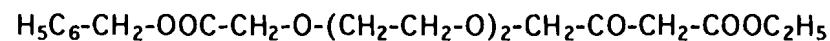
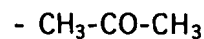
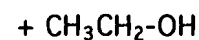
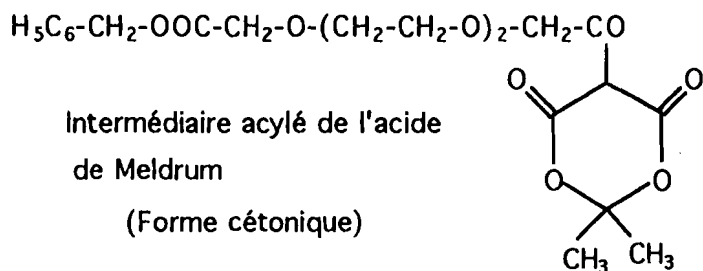
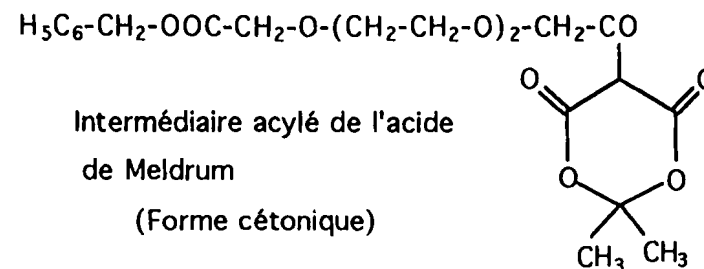
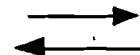
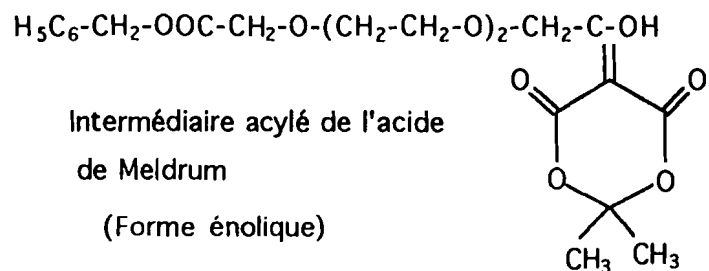
II-2-3 Synthèse de la luminarine 11

La synthèse se déroule comme pour la luminarine 12, en remplaçant l'acide 3,6,9-trioxaoctandioïque par l'acide adipique (Figure 9).

Les principales étapes sont :

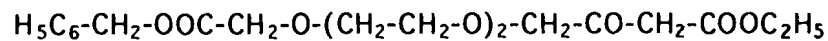
- formation de l'ester monobenzyle de l'acide adipique.
- formation de l'imidazolide de l'adipate de benzyle.
- formation de l'ester benzylique de l'hexanedioyl acétate d'éthyle.
- formation de l'ester éthylique de la luminarine 11.
- accès à la luminarine 11 (Lu.11).



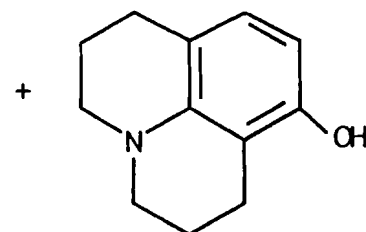


Ester benzylique du 3,6,9-trioxaoctandioyl acétate d'éthyle

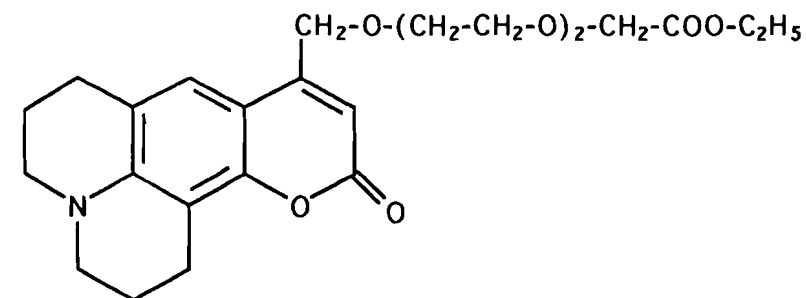
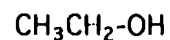
51



Ester benzylique du 3,6,9-trioxaoctandioyl acétate d'éthyle



8-Hydroxy julolidine



Ester éthylique de la luminarine 12

Figure 9 : Synthèse de la luminarine 11 (suite 1)

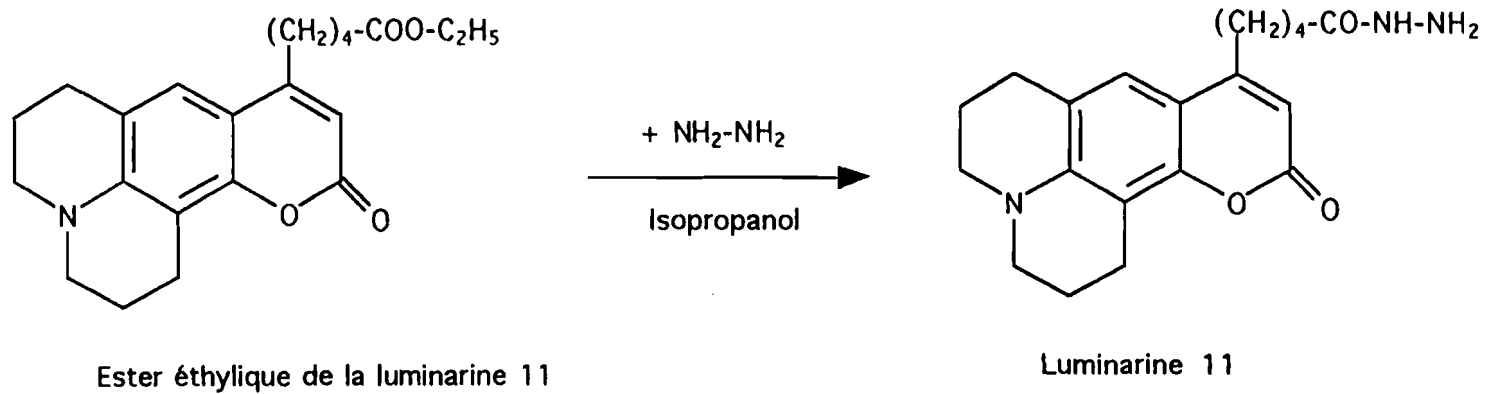


Figure 9 : Synthèse de la luminarine 11 (suite 2)

III. ETABLISSEMENT DES SPECTRES D'ABSORBANCE ET DE FLUORESCENCE DES LUMINARINES

Le but de cette étude a été de déterminer l'influence du solvant sur les propriétés spectrales d'absorbance et de fluorescence des luminarines, en raison de leur utilisation comme réactifs de dérivation en chromatographie liquide.

L'influence du solvant sur les spectres d'excitation et d'émission résulte, d'une part des interactions du moment dipolaire du fluorophore avec les champs induits par l'entourage du solvant, d'autre part des interactions d'ordre chimique spécifiques entre le fluorophore et une ou plusieurs molécules de solvants. Ce phénomène nécessite une réorganisation de la cage, formée par les molécules de solvant, entourant le fluorophore. Il est fonction du temps.

Le déplacement de Stokes, perte d'énergie entre l'absorption et l'émission de la lumière, est le résultat de plusieurs processus dynamiques :

- pertes d'énergies dues à la dissipation de l'énergie vibrationnelle.
- redistribution des électrons dans l'entourage des molécules du solvant induite par le changement (généralement une augmentation) du moment dipolaire du fluorophore à l'état excité.
- réorientation des molécules de solvant autour du dipôle de l'état excité.
- interactions spécifiques entre le fluorophore et le solvant ou les solutés (formation de liaison hydrogène et les phénomènes de transfert de charge).

Une description quantitative générale de tous ces processus et de leurs effets sur les propriétés spectrales des fluorophores n'est pratiquement pas possible en raison de la diversité structurale de ces fluorophores. Une interprétation précise de la sensibilité des fluorophores aux effets de solvant nécessiterait une connaissance détaillée des effets de solvant sur les

niveaux d'énergie des fluorophores à l'état fondamental et à l'état excité.

Dans un premier temps, nous nous limiterons aux théories simplifiées d'interaction soluté-solvant pour évaluer les effets du milieu environnant sur les propriétés spectrales d'absorbance et de fluorescence d'une molécule.

III-1 APPROCHE SIMPLIFIEE DE L'INTERACTION FLUOROPHORE-SOLVANT : effets généraux (modèle de Lippert)

III-1-1 Introduction

Généralement dans les états électroniques excités, les composés aromatiques possèdent des moments dipolaires (μ^*) plus importants que dans les états fondamentaux (μ) avec $\mu < \mu^*$. L'absorption d'un photon par le fluorophore aboutit donc à la formation instantanée d'un dipôle qui perturbe le milieu entourant le fluorophore. La "cage" constituée par le solvant qui entoure le fluorophore subit à son tour une réorganisation. Ce processus est connu sous le nom de relaxation du solvant, sa durée est fonction des propriétés physiques et chimiques du solvant. Il en résulte une interaction sur les propriétés spectrales du fluorophore qui explique que celles-ci sont très sensibles aux propriétés physiques et chimiques du solvant.

Les effets de solvant sont généralement classés en effets généraux et en effets spécifiques. Par effets généraux de solvant, nous entendons ceux qui sont liés à l'indice de réfraction (n) et à la constante diélectrique (D). Ces constantes physiques sont fonction du mouvement des électrons des molécules du solvant et du moment dipolaire de ces molécules. Quant aux effets spécifiques de solvant, ils sont dus aux interactions chimiques du fluorophore avec les molécules du solvant (formation de liaison hydrogène

et de complexes). Ces deux effets peuvent conduire à des déplacements spectraux importants.

III-1-2 Effets généraux (modèle de Lippert)

Les interactions physiques et chimiques entre fluorophore et molécules de solvant, qui sont dues aux effets généraux de solvant, sont généralement illustrées par l'équation de Lippert [LIPPERT (1957)] qui est à la base des différentes interprétations de l'interaction soluté-solvant :

$$\nu'_a - \nu'_f = (2/hc) \left[\left[\frac{(D-1)}{(2D+1)} \right] - \left[\frac{(n^2-1)}{(2n^2+1)} \right] \right] (\mu^* - \mu)^2 / a^3$$

avec $\nu'_a - \nu'_f$: déplacement de Stokes

ν'_a : nombre d'onde (cm^{-1}) du maximum d'excitation ou d'absorption

ν'_f : nombre d'onde (cm^{-1}) du maximum d'émission de fluorescence

h : constante de Planck ($6,62 \times 10^{-27}$ erg-sec.)

c : vitesse de la lumière dans le vide (3×10^{10} cm/sec.)

D : constante diélectrique du solvant

n : indice de réfraction du solvant

μ^* et μ sont respectivement les moments dipolaires du fluorophore à l'état excité et fondamental

a : rayon de la cavité du solvant dans laquelle le fluorophore prend place (la "cage")

le terme $\left[\frac{(D-1)}{(2D+1)} \right] - \left[\frac{(n^2-1)}{(2n^2+1)} \right]$ est appelé polarisabilité orientationnelle (Δf) du solvant

Dans cette équation, l'indice de réfraction (n) du solvant et sa constante diélectrique (D) ont des effets opposés sur la valeur de $\nu'_a - \nu'_f$.

En principe, une augmentation de l'indice de réfraction diminue cette différence d'énergie (perte d'énergie), alors qu'une valeur plus grande de la constante diélectrique conduit à une différence d'énergie plus importante.

La polarisabilité d'un solvant est le résultat de la mobilité des électrons dans le solvant et des moments dipolaires des molécules du solvant. La réorientation des électrons dans le solvant est instantanée; cette polarisabilité à haute fréquence est fonction de l'indice de réfraction représenté par le terme : $f(n) = (n^2 - 1) / (2n^2 + 1)$

Quant à la constante diélectrique, elle détermine la polarisabilité du solvant qui inclut l'effet de la réorientation des molécules du solvant. A cause de l'échelle de temps trop court de l'orientation moléculaire, cette polarisabilité est dite à petite fréquence et est exprimée par le terme : $f(D) = (D - 1) / (2D + 1)$

Ce dernier terme tient compte des déplacements spectraux dûs à la réorientation des dipôles de solvant et la redistribution des électrons dans les molécules de solvant. Une augmentation de la constante diélectrique doit aussi conduire à la stabilisation des états excité et fondamental. Cependant, la diminution de l'énergie de l'état excité se produit seulement après réorientation des dipôles du solvant. Ce processus nécessite le mouvement de toutes les molécules du solvant et non de ses électrons. Comme résultat, la stabilisation des états excité et fondamental du fluorophore qui dépend de la constante diélectrique est fonction du temps, tandis que la vitesse de stabilisation dépend de la température et de la viscosité du solvant. Ainsi, l'état excité est déplacé vers les faibles énergies à une échelle de temps comparable au temps nécessaire à la réorientation du solvant.

Le premier terme $f(n) = (n^2 - 1) / (2n^2 + 1)$ tient compte seulement de la redistribution des électrons. Une augmentation de l'indice de

réfraction du solvant permet aux états excité et fondamental d'être stabilisés instantanément grâce aux mouvements des électrons à l'intérieur des molécules du solvant. Il résulte de cette redistribution des électrons, une diminution de la différence d'énergie entre les états excité et fondamental.

La différence des deux termes pré-cités rend donc compte du déplacement spectral dû à la réorientation des molécules du solvant. Ainsi, seule la réorientation des molécules du solvant peut conduire à un déplacement de Stokes important. La redistribution des électrons ayant lieu de façon instantannée, l'état excité comme l'état fondamental sont approximativement stabilisés de la même manière par ce processus. Comme conséquence, la redistribution électronique a un effet relativement mineur sur le déplacement de Stokes.

Ainsi, les interactions du fluorophore avec le solvant peuvent être décrites en terme de moments dipolaires à l'état fondamental et à l'état excité et les champs induits entourant ces dipôles. L'ensemble de ces phénomènes peut être divisé en facteurs électroniques (polarisabilité électronique, R_e et R_{e^*}) et facteurs dûs à la réorientation des molécules du solvant (polarisabilité moléculaire, R_r et R_{r^*}).

$$R_e = (2\mu/a^3) f(n)$$

$$R_{e^*} = (2\mu^*/a^3) f(n)$$

$$R_r = (2\mu/a^3) \Delta f$$

$$R_{r^*} = (2\mu^*/a^3) \Delta f$$

lorsque R représente le champ induit par le dipôle dans le milieu diélectrique. Ce champ est parallèle et opposé à la direction du dipôle et est proportionnel à la grandeur du moment dipolaire.

Notons cependant que l'équation de Lippert n'est pas une expression complète des effets généraux de solvant. BAKHSHIEV (1962), présente une alternative représentée par l'équation :

$$hc \Delta\nu' = \Delta b \left[\frac{(D-1)}{(D+2)} - \frac{(n^2-1)}{(n^2+2)} \right] \frac{(2n^2+1)^2}{(n^2+2)^2} + \text{constante}$$

$$\text{avec : } \Delta b = \frac{2}{hca^3} (\mu^2 - \mu^{*2} - 2\mu\mu^* \cos \alpha)$$

α représente l'angle formé entre μ et μ^*

D'après cette équation, les effets généraux de solvant doivent dépendre de l'angle (α) formé entre les moments dipolaires de l'état excité et de l'état fondamental.

III-1-3 Travaux personnels

Pour des raisons d'ordre pratique, nous avons préféré utiliser l'équation de Lippert, expression générale décrivant le déplacement de Stokes obtenu pour un fluorophore donné en faisant varier la polarité du milieu. Dans ce cas, la sensibilité d'une luminarine à la polarité du solvant doit être proportionnelle au terme $(\mu^* - \mu)$; ce dernier serait alors constant pour une luminarine donnée et de là, on peut construire des courbes de calibrage des différents déplacements de Stokes en fonction de la polarisabilité orientationnelle.

Ainsi, les variations des propriétés spectrales d'absorbance et de fluorescence des luminarines en fonction du solvant seront discutées en vue d'évaluer les effets de solvant sur les niveaux d'énergie des luminarines à l'état fondamental et à l'état excité. Les différences entre les maximums d'absorption et d'émission dans les solvants apolaires et polaires expliquent que l'état excité des luminarines est plus sensible aux effets de solvant que

l'état fondamental. Les spectres d'émission des luminarines dans différents solvants montrent tous le même déplacement spectral, mais avec des distributions qui suggèrent que le déplacement vers les grandes longueurs d'onde est dû à première vue aux effets généraux de solvant.

Pour évaluer l'importance des effets de solvant sur la différence d'énergie entre l'état excité et l'état fondamental des luminarines, les données relatives au déplacement de Stokes ont été analysées d'après la théorie de l'interaction dipôle décrit par Lippert.

En première intention, nous avons classé les solvants étudiés en solvants protiques, solvants avec des groupements hydroxyles capables de former des liaisons hydrogènes (éthanol (ETOH), méthanol (MEOH) et eau (H₂O)), et solvants aprotiques (cyclohexane (CycloH), diisopropyléther (DiisopE), chloroforme (ChlorF), acétate d'éthyle (Eth.Ac.), tétrahydrofurane (THF), dichlorométhane (Dichlorm), diméthylsulfoxyde (DMSO), diméthylformamide (DMF) et acétonitrile (ACCN)).

Nous avons constaté que les solvants aprotiques donnent des déplacements de Stokes plus petits que ceux obtenus avec les solvants protiques. Ceci suggère que dans ces derniers solvants, à côté des effets dipolaires généraux, l'interaction soluté-solvant par liaison hydrogène contribue également à ce déplacement de Stokes (Figure 10).

En effet, le déplacement des électrons pendant le processus d'excitation produit des structures de résonance dipolaire du noyau luminarine; par conséquent, la formation de liaisons hydrogène entre les solvants protiques et les luminarines à l'état excité est plus importante qu'à l'état fondamental.

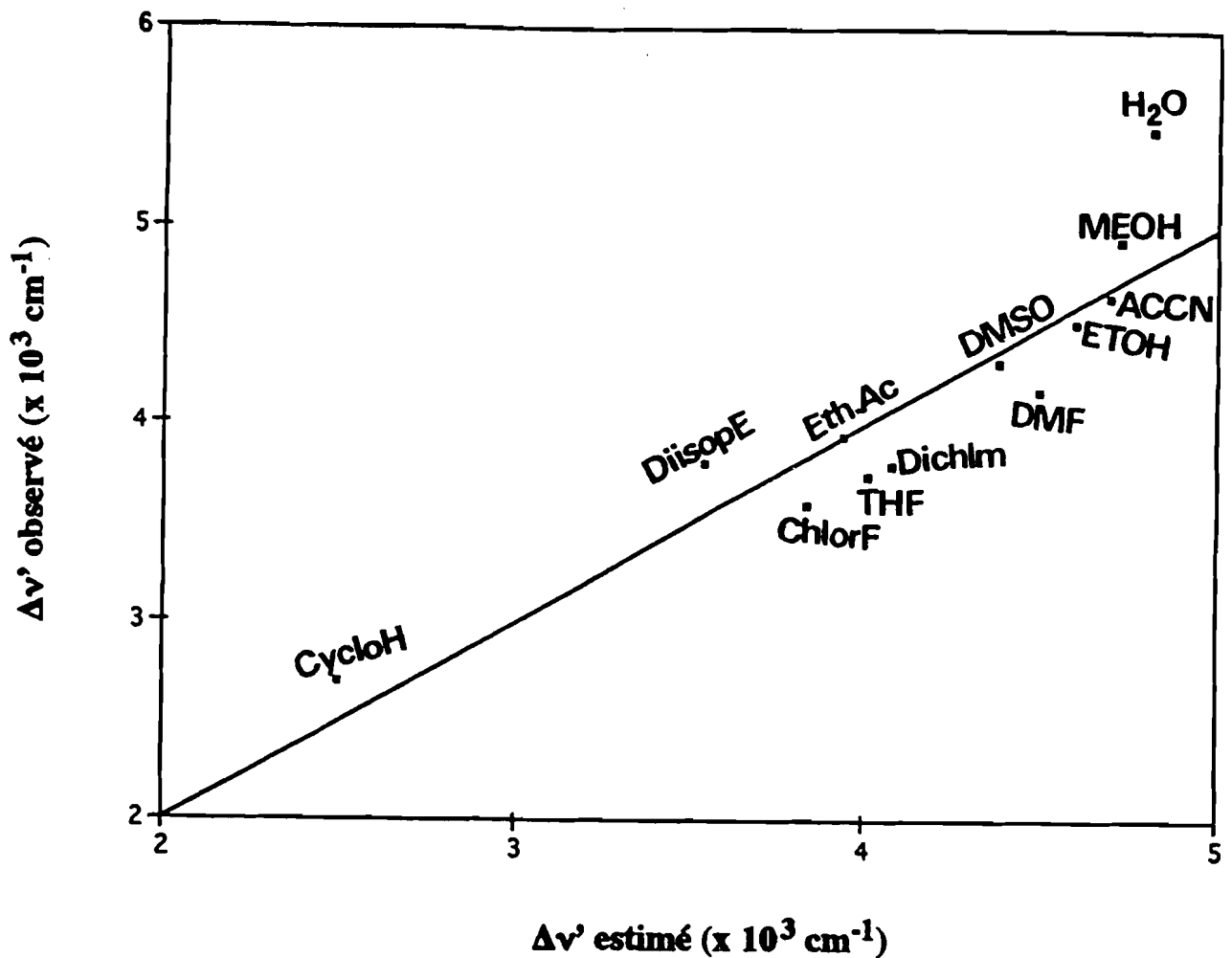


Figure 10 : Variation du déplacement de Stokes des solutions de Lu.OH en fonction de la polarisabilité orientationnelle des solvants

Lorsque l'on classe maintenant ces mêmes solvants en :

- solvants apolaires ne formant pas de liaisons hydrogène (cyclohexane) :,
groupe A
- solvants polaires ne formant pas de liaisons hydrogène (diisopropyléther, chloroforme, acétate d'éthyle, tétrahydrofurane, dichlorométhane, diméthylsulfoxyde, diméthylformamide et acétonitrile) : groupe B

- solvants polaires formant les liaisons hydrogène (éthanol, méthanol et eau) : groupe C

nous remarquons que les luminarines fluorescent à plus courtes longueurs d'onde dans les solvants du groupe A, que dans les solvants des groupes B et C.

En résumé, les luminarines sont des molécules plus ou moins polaires capables de former des liaisons hydrogène et subir des interactions dipôle-dipôle. Cette interaction est probablement faible dans les solvants du groupe A et, c'est pourquoi les bandes d'émission sont faiblement déplacées vers les grandes longueurs d'onde. Dans les solvants polaires (groupe B et C), les luminarines subissent une interaction dipôle-dipôle plus importante qui abaisse le niveau d'énergie; comme elles sont plus polaires à l'état excité qu'à l'état fondamental, le déplacement de Stokes augmente par conséquent avec l'augmentation de la polarité du solvant.

D'une façon générale, à l'état fondamental et à l'état excité, la molécule fluorescente est solvatée par une interaction du type dipôle-dipôle, soit en raison de l'existence de dipôles permanents du solvant et du soluté, soit de dipôles induits. Comme la répartition électronique de l'état excité est différente de celle de l'état fondamental, le moment dipolaire et/ou la polarisabilité de la molécule sera différente dans l'état excité et par suite son degré de solvation. Quand la molécule à l'état fondamental absorbe un photon, elle se trouve dans un état excité métastable tandis que la géométrie moléculaire et la configuration du solvant sont celles de l'état fondamental. La réorientation du solvant en fonction du nouveau moment dipolaire de la molécule excitée a lieu 10^{-11} à 10^{-12} sec après l'excitation. Il se produit ainsi un état d'équilibre excité dans lequel le couple fluorophore-solvant a une configuration optimale. Après émission, la molécule retourne à l'état fondamental en conservant sa configuration de

l'état excité. Une deuxième relaxation lui permet de revenir à sa configuration initiale (Figure 11). Ces phénomènes se caractérisent ainsi par une diminution de l'énergie lumineuse émise et par un déplacement des longueurs d'onde d'émission vers le rouge.

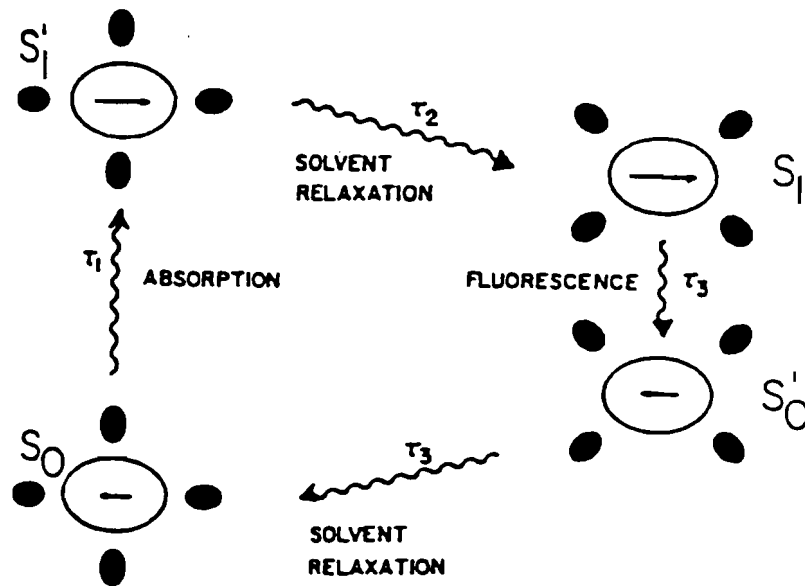


Figure 11 : Schéma de la relaxation du solvant suivant

l'excitation et l'émission d'une molécule en solution

Pour les solvants du groupe A et B, l'effet de polarisation a été prédominant. La valeur positive de la pente de la droite de régression observée pour chaque luminarine indique que les luminarines sont plus polaires à l'état excité qu'à l'état fondamental. L'interaction soluté-solvant par polarisation a été plus importante pour les luminarines étudiées selon l'ordre : Lu.OH \geq Lu.12 > Lu.8 \geq Lu.A134 \geq C.102HS > Lu.NNACR > Lu.NPROH > Lu.3 > Lu.4 > C.102 > Lu.11; comme en témoigne les

différentes valeurs des coefficients de corrélation qui sont respectivement de : 0,915; 0,912; 0,893; 0,890; 0,889; 0,860; 0,840; 0,814; 0,786; 0,668; 0,646. Dans l'eau, beaucoup plus que les alcools, le déplacement de Stokes observé à été très différent de celui attendu si l'on se basait uniquement sur les seuls effets de polarisation (Figure 10). Les luminarines semblent donc subir d'autres types d'interactions (formation de liaisons hydrogène) avec ces solvants. La comparaison des maximums d'émission des luminarines dans le diméthylformamide (DMF) et l'éthanol (ETOH) permet également de confirmer cette observation. En effet, ces deux solvants ont des constantes diélectriques de 36,70 et 24,60 avec des moments dipolaires de 3,82 et 1,69 respectivement. La longueur d'onde d'émission des luminarines est plus petite dans le DMF que dans ETOH. L'effet bathochrome du spectre d'émission des luminarines dans l'éthanol ne peut être attribué qu'à la formation de liaisons hydrogène entre les luminarines et l'éthanol, liaisons qui n'existent pas dans le DMF.

Du point de vue structural, les luminarines possèdent, au niveau du noyau quinolizinocoumarine, trois sites potentiellement accepteurs d'hydrogène : l'azote (en position 4), l'oxygène (en position 12) et le carbonyle de la lactone (en position 11). Parmi ces trois sites, le carbonyle semble être le plus probablement concerné. L'oxygène étant moins basique que le carbonyle, le déplacement du spectre d'émission vers le rouge serait alors dû à la formation de liaison hydrogène entre l'oxygène du carbonyle en position 11 et les groupements hydroxyles des solvants protiques. Il s'en suit que le transfert de charge intramoléculaire est facilité, ce qui entraîne vraisemblablement un déplacement de Stokes plus important et une diminution du rendement de fluorescence (à titre d'exemple, voir Annexe III-1 à III-4, pages 315-318). La méthode de mesure du rendement

quantique utilisée, ainsi que d'autres propriétés d'absorbance des luminarines sont présentées dans l'annexe II-1 et II-2 (pages 310-313).

Le phénomène de transfert de charge intramoléculaire dans les luminarines est donc plus important dans les solvants polaires que dans les solvants apolaires. Si l'élargissement croissant des spectres d'absorption en fonction de la polarité du solvant permet de s'en rendre compte, il n'en a pas été de même pour les différentes valeurs de coefficient d'absorption molaire (ϵ) obtenues. Par exemple dans l'eau les valeurs de ϵ pour la Lu.12 et C.102HS ont été respectivement de $2,04 \times 10^4 \text{ l mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ et $1,63 \times 10^4 \text{ l mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, ce qui explique les différences de transfert de charge intramoléculaire entre les luminarines dans un solvant donné. Le coefficient d'absorption molaire très élevé de la Lu.12 dans l'eau compense sa très faible émission dans le même solvant. Dans les alcools et l'eau, le rendement de fluorescence varie considérablement en fonction des luminarines. Ceci pourrait s'expliquer par la différence de polarité entre ces solvants et leur capacité relative à former des liaisons hydrogène ainsi que les pertes d'énergie par relaxation vibrationnelle liées au couple soluté-solvant. Il ne nous a pas été possible d'accéder aux différentes valeurs de capacité relative à former des liaisons hydrogène; néanmoins, de notre étude il apparaît clairement que la capacité relative de l'éthanol et du méthanol à former des liaisons hydrogène avec les luminarines diminue du méthanol à l'éthanol. Ainsi comme le rendement de fluorescence doit diminuer avec l'augmentation de la polarité et de la capacité relative à former des liaisons hydrogène, on devrait s'attendre à ce que les rendements de fluorescence de toutes les luminarines dans l'éthanol soient supérieurs à ceux dans le méthanol. Toutefois ceci n'a pas été toujours le cas, d'où l'idée de l'existence d'autres facteurs qui influenceraient le rendement. Lorsqu'un fluorophore et le solvant dans lequel il se trouve sont

capables de former des liaisons hydrogène, le fluorophore et les molécules du solvant dissipent une partie de l'énergie de l'état excité à travers les vibrations. Cette dissipation de l'énergie par relaxation vibrationnelle diminue avec l'augmentation de la masse moléculaire du solvant. Le faible rendement de fluorescence des luminarines dans l'eau comparé à celui dans l'éthanol et le méthanol pourrait donc s'expliquer par une prédominance de l'effet de relaxation vibrationnelle sur les effets dûs à la formation de liaisons hydrogène et la polarité du solvant.

En conclusion il ressort de cette première étude que les propriétés spectrales des luminarines sont influencées par les facteurs suivants dus au solvant :

- les forces de dispersion (solvants apolaires et polaires) fonction de l'indice de refraction.
- les forces électrostatiques (solvants polaires protiques ou aprotiques) fonction de la constante diélectrique du solvant et du moment dipolaire du soluté.
- l'aptitude à former des liaisons hydrogène entre les molécules du soluté et celles du solvant.

Conformément à ce que laissait prévoir l'équation de Lippert nous avons pu constater que les luminarines qui sont le plus sensibles à la polarité du solvant sont celles qui subissent le plus grand changement de leur moment dipolaire pendant l'excitation. D'une manière générale, la présence des atomes d'oxygène et des groupements donneurs d'hydrogène (carboxyle et hydroxyle) en position 9 du noyau quinolizinocoumarine augmente la sensibilité des luminarines à la polarité du solvant. En toute rigueur pour vérifier complètement l'équation de Lippert, nous aurions dû déterminer le terme $\mu - \mu^*$ de cette équation; mais cela nous aurait entraîné

à faire des mesures de moments dipolaires, ce qui nous éloignait de notre propos.

Enfin, il est intéressant de noter que lorsque l'on connaît la polarisabilité orientationnelle d'un solvant, on peut prédire le déplacement de Stokes d'une luminarine donnée dans ce solvant en utilisant le modèle de la droite de régression (Figure 10) à condition de vérifier l'existence et la linéarité de la relation. La démarche inverse permet de prédire la polarité à partir des valeurs du déplacement de Stokes.

III-2 MODELISATION DE L'INTERACTION FLUOROPHORE-SOLVANT PAR UNE ECHELLE DE SOLVATOCHROMIE : effets généraux et effets spécifiques (modèle de Taft)

Du fait des limitations du modèle de Lippert, pour mieux élucider les interactions entre les luminarines et les solvants, nous avons fait appel à la notion de modélisation par une échelle linéaire de solvatochromie (modèle de Taft) [KAMLET et TAFT (1976); TAFT et KAMLET (1976); KAMLET et coll., (1977, 1981, 1983 et 1985); TAFT et coll., (1984)] dont le but est de relier énergie et solvation d'un système (LSERs : Linear Solvation Energy Relationships) du type :

$$Y = \text{constante} + s(\pi^* + d\delta) + a\alpha + b\beta + e\xi + h\delta H$$

lorsque : Y est le paramètre photophysique d'absorbance ou de fluorescence, mesuré ou calculé (ν'_{ex} , ν'_{em} , ν'_{0-0} ...) par exemple, d'un composé dans le solvant défini par π^* , α , β , δ et ξ .

s, d, a, b, e et h sont les coefficients qui reflètent la susceptibilité de Y vis à vis de chacune des propriétés intrinsèques d'un solvant.

π^* est le paramètre traduisant la polarité ainsi que la polarisabilité du solvant.

α est le paramètre traduisant le caractère donneur de liaisons hydrogène du solvant (acidité).

β est le paramètre traduisant le caractère accepteur de liaisons hydrogène du solvant (basicité).

ξ est le paramètre qui définit un coefficient de coordinence propre aux solvants basiques.

δ_H est le paramètre de solubilité de Hildebrand, une mesure des interactions solvant-solvant qui sont interrompues pendant le processus de formation des cages autour du soluté.

δ est le paramètre de correction de polarisabilité. Les valeurs de δ reflètent le fait que les différences dans la polarisabilité (exprimée en terme d'indice de réfraction $(n^2 - 1)/(2n^2 + 1)$) sont significativement plus grandes, entre les solvants aliphatiques non chlorés, les solvants aliphatiques chlorés et les solvants aromatiques, qu'à l'intérieur d'une même classe de solvant. Le coefficient d affecté à δ est égale à zéro pour tous les spectres électroniques qui subissent un effet bathochrome avec l'augmentation de la polarité du solvant. Par contre, pour les spectres subissant un déplacement hypsochrome en fonction de la polarité du solvant, le terme d est nul seulement lorsque l'on utilise les classes de solvant séparément.

De nombreuses autres classifications des solvants existent (modèle de Kosower, modèle de Dimroth et Reichardt...) [REICHARDT (1990)], mais

notre attention s'est portée sur le modèle de Taft qui définit pour chaque solvant les paramètres cités ci-dessus.

Ce modèle mathématique semble intéressant et plus complet pour mettre en évidence le type d'interaction soluté-solvant.

Les relations linéaires reliant énergie et solvation sont basées sur le fait que les différences d'énergie (fréquence, constante d'équilibre ...) pour de nombreuses réactions notées par i peuvent être exprimées comme une fonction linéaire $(a_i x_j + b_j)$ mettant en jeu un vecteur commun (x_j) lorsque les modifications structurales communes notées par j sont faites dans un mélange réactionnel ou un solvant donné. Les premières applications de cette théorie furent les lois de Brønsted pour les catalyses acides $[\alpha_i (pK_a)_j + c_i]$ et basiques $[\beta_i (pK_b)_j + d_i]$ [BRÖNSTED et GUGGENHEIM (1927)]. SWAIN et SCOTT (1953), furent les premiers à suggérer l'utilisation d'une régression linéaire multiple $(a_i x_j + b_j y_j + c_i)$ lorsque les changements dans la structure influencent l'effet global des vecteurs en régression multiple, mais sont presque indépendants lorsque ces vecteurs sont utilisés séparément. A titre d'exemple, les propriétés de nucléophilie (x_i) et d'électrophilie (y_j) d'un solvant affectent les logarithmes des valeurs des constantes de solvolysse [SWAIN et SCOTT (1953)]. La régression linéaire multiple a été par la suite utilisée par plusieurs autres auteurs. Une étude comparative détaillée de telles applications est fournie par la littérature [SWAIN et coll., (1983a et 1983b); SWAIN (1984)].

Pour étudier les effets de solvant et des substituants (en position 9 du noyau quinolizinocoumarine) sur les propriétés d'absorbance et de fluorescence des luminarines, nous avons utilisé un test d'analyse de variance appliqué au modèle dit de Taft, à partir des $n = 11$ ensembles d'observations de la variable dépendante Y (λ_{max} , λ_{ex} , λ_{em} , λ_{0-0} ,

$v'_a - v'_f$, ϵ et ϕ_f), pour laquelle les longueurs d'onde sont transformées en nombre d'onde, et des $p = 3$ régresseurs (π^* , α et β).

Ces études ont fait l'objet d'un article soumis à *Analytica Chimica Acta* (accepté pour publication avec révision mineure), intitulé **"Solvent study on the 9-substitued quinolizinocoumarins used as precolumn fluorescent and chemiluminescent reagents in high-performance liquid chromatography"** inséré ci-après et d'une communication par affiche, intitulée **"Use of 9-substitued quinolizinocoumarins in solution as polarity sensors"** qui a été présentée au Vth International Symposium on Quantitative Luminescence Spectrometry in Biomedical Sciences (University of Ghent, May 25-27, 1993).

III-3 ARTICLE 1

"Solvent study on the 9-substitued quinolizinocoumarins used as precolumn fluorescent and chemiluminescent reagents in high-performance liquid chromatography"

Anal.Chim.Acta, (1993), soumis pour publication.

La luminescence des molécules est étroitement dépendante de leur microenvironnement. La modification de cet environnement est mise à profit en chromatographie liquide pour exalter ou inhiber la fluorescence des analytes. Cette modification porte ainsi sur la composition de la phase mobile. Elle concerne alors la nature et les proportions des solvants (effets solvant), des tampons, le pH, la force ionique ou l'addition de composés non fluorescents par eux-même mais qui interagissent avec les solutés. En ce qui concerne le premier point, il est bien connu que par leur polarité, leur constante diélectrique, leur indice de réfraction, leur viscosité et leur

éventuelle possibilité de former des liaisons hydrogène, les solvants interagissent avec les solutés modifiant ainsi leurs niveaux énergétiques aussi bien à l'état fondamental qu'à l'état excité. Leurs propriétés spectrales s'en trouvent transformées. Le déplacement des longueurs d'onde des maximums d'excitation ou d'émission se répercutent sur les coefficients d'absorption molaire, les rendements quantiques et sur les intensités de fluorescence.

Les molécules, sièges de transition $\pi \longrightarrow \pi^*$, subissent un effet bathochrome lorsque la polarité du milieu augmente en raison de la formation d'interactions dipôle-dipôle ou de liaisons hydrogène à l'état excité diminuant ainsi l'énergie de la transition $S_1 \longrightarrow S_0$. Les molécules sièges de transition $n \longrightarrow \pi^*$ subissent à l'inverse un effet hypsochrome lorsque la polarité du milieu augmente. Lorsque les molécules présentent simultanément les deux types de transition, les propriétés spectrales observées sont la résultante de ces deux phénomènes.

Dans les mélanges de solvants, une étude expérimentale permet de déterminer les conditions les mieux adaptées. Cependant, la nature de la molécule doit également être prise en compte.

Ainsi, dans ce travail, les luminarines ont été étudiées d'un point de vue spectroscopique, en raison des variations de leurs propriétés émissives observées dans les différentes phases mobiles utilisées en chromatographie liquide. Les paramètres photophysiques (λ_{ex} , λ_{em} , λ_{max} , $\nu'_a - \nu'_f$, ϕ_f , λ_{0-0} et ϵ), mesurés à la température ambiante et dans 12 solvants, ont été analysés en terme de modification du microenvironnement des luminarines. Un modèle de regression linéaire multiple nous a permis d'une part d'établir la relation entre énergie et solvation, et d'autre part de démontrer la corrélation entre la structure du substituant en position 9 du noyau

quinolizinocoumarine, et les modifications spectrales observées exprimées en terme d'énergie.

Les résultats obtenus peuvent orienter le choix du type de chromatographie (phase inverse, phase normale) à mettre en oeuvre pour avoir la meilleure sensibilité de détection.

**SOLVENT STUDY ON THE 9-SUBSTITUED
QUINOLIZINOCOUMARINS USED AS PRECOLUMN
FLUORESCENT AND CHEMILUMINESCENT REAGENTS IN
HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

Falaye Traoré^{1, 2*}, Patrice Prognon¹ and Georges Mahuzier¹

¹Laboratoire de Chimie Analytique II, Faculté de Pharmacie, 5 rue
J.B.Clément 92290 Châtenay-Malabry/France.

²Faculté de Médecine et de Pharmacie de l'Université de Conakry,
B.P.1147 Conakry/Guinée

***To whom correspondence should be addressed**

Key-words : luminarin, fluorescence, solvent study.

Abstract

9-substitued fluorescent quinolizinocoumarin derivatives, named luminarins, were extensively studied from a spectroscopic point of view, due to the wide variation of the emissions observed with HPLC in different mobile phase. Thus, photophysical parameters measured at room temperature (λ_{ex} ; λ_{em} , λ_{max} , $\nu'_a - \nu'_f$: Stokes shift, relative quantum yield of fluorescence ϕ_f , singlet level energy as λ_{0-0} , molar absorptivity : ϵ ...) were collected for eleven quinolizinocoumarin derivatives in twelve solvents. The observed spectroscopic variations associated with the change in solvents, were analysed in terms of modification in the microenvironment of the luminarin derivatives. For this, a multiple linear regression analysis (MLRA) was performed in the Linear Solvation Energy Relationships model (LSERs). Moreover, the same regression model was used to describe and demonstrate the correlation between the structure of 9 sided chains with the observed spectral modifications. Finally, the practical consequences of such a study allowed to demonstrated the influence of the microenvironment on the fluorescence detection of luminarin derivatives after normal and reverse phase HPLC.

Luminarins are quinolizinocoumarin compounds synthesized as fluorescent and chemiluminescent reagents especially for liquid chromatography [1-8]. Among the eleven luminarins commercially available eight shown their interest as precolumn fluorescent and chemiluminescent reagents, i.e. : luminarins 3, 11 and 12 for aldehydes and ketones [6-8], luminarin 4 for carboxylic acids [3], luminarins 1 and 2 for amines [2,4,5], and recently luminarins 8 and 9 were developed for amines [data not published]. Thus, the structural variations of the 9-sided chain rules the reactivity of the probes, and the important emission properties were due to the highly conjugated quinolizinocoumarin nucleus (Figure 1).

On the other hand, as all fluorophore, luminarins have a relative fluorescence quantum yield (ϕ_f) highly influenced by the microenvironment. The selection of mobile phase, when luminarin compounds are used as derivatization reagents is of great importance. Since these reagents have been successfully used both with normal and reverse phase eluents, a practical and analytical consequence was the important variation in the limit of detection (LOD) of the labelled compounds in function to the chemical composition of the eluent. Since, in all the studied applications [3,5,6-8], the emission of fluorescence is strictly due to the quinolizinocoumarin moiety in absence of the conjugation with the labelled compounds (i.e. : prostaglandin E_2 , histamine, proline, tyramine, malonaldehyde, acroleine, pyrrolidine, hydroxymethylfurfural...). The observed variation in LOD must be related to the influence of various mobile phases (chloroform, hexane, methyl and ethyl acetate, diisopropyl ether for normal chromatography [2,6,7], acetonitrile, water [2-7] for reverse phase chromatography) on the ϕ_f and ϵ of the fluorophore part of the probe. As a consequence, we tried to obtain a

deeper knowledge of the absorption and emission properties of these quinolizinocoumarin reagents at room temperature. This, in order to establish a correlation between absorption and emission data, the microenvironment and especially with respect to the dipolarity/polarizability, donors and acceptors hydrogen character of the solvent. In a second instance, the possible relation between the structure and the solvent-solute interaction and the importance of the linking 9-sided chain will be discussed.

EXPERIMENTAL

Chemicals

9 sided quinolizinocoumarins (luminarins) were synthesized and purchased from Eurobio (Les Ulis, France). The structure of the eleven compounds are depicted in Figure 1.

All the solvents used in this study were of spectroscopic grade, and were carefully checked for the absence of fluorescent impurities; the water used was purified and distilled twice.

Methods

- Absorbance spectra were recorded on a Model 2100 uv - visible spectrometer (Shimadzu) at 25°C using a 10 mm optical path quartz cuvette. All emission measurements were made at 25°C on a LS 50 luminometer (Perkin - Elmer) using a 10 mm optical path quartz cuvette. The emission and excitation slits were set at 2.5 nm. The relative fluorescence quantum yield was considered as the ratio of the total fluorescence intensity to the absorbance (I_F/A) at the maximum of excitation of the corresponding luminarin solutions, in arbitrary units,

according to Parker and Rees [9]. The Stokes shift, $\nu'_a - \nu'_f$, was calculated as : $\nu'_a - \nu'_f$ (cm^{-1}) = $10^7(1/\lambda_{ex} - 1/\lambda_{em})$ where λ_{ex} and λ_{em} are the corrected maximum wavelengths for excitation and emission and are expressed in nanometers. The first singlet - state energy level (E_{s1}) was noted as the corresponding measured wavelength of the 0-0 transition λ_{0-0} . No statistical difference was found ($p < 0.05$) between measured λ_{0-0} and calculated λ_{0-0} according to the following equation :

$$1/\lambda_{0-0} = 1/2 (1/\lambda_{em} + 1/\lambda_{ex}) [10].$$

For LSERs model, transformation in wavenumber (ν') was systematically performed.

- Multiple linear regression analysis (MLRA) was performed with a STATWORKS™ Software. In each run, the regression coefficient (r) and the probability (p) related to the regression were systematically calculated. A p value less than 0.05 was considered significant.

Attempts to correlate the photophysical data with the microenvironment as well as the structure of the 9-sided chain of the eleven studied luminarins were achieved with the Linear Solvation Energy Relationships (LSERs) of Kamlet and co-workers [11-14].

Thus, twelve solvents were chosen in order to study different chemical interactions with the luminarin derivatives. Moreover, the choice of the solvent was influenced by their possible use as eluent in normal or reverse phase HPLC. The selected solvent-solute interactions were : π^* , α and β according to LSERs model [14] for which corresponding values for the selected solvents are shown in Table 1. π^* , being the dipolarity/polarizability parameters which measure the ability of the solvent to stabilize a charge or a dipole by dielectric effect; α , the parameter describing the ability of the solvent to donate a proton (acidity); and β , the parameter which represents the ability of accepting a proton

(basicity character of the solvent). In order to simplify the whole LSERs model, no other solvent-solute parameters were taken into account. Therefore, the multiple linear regression analysis between the measured spectroscopic parameters Y (ν'_{em} , ν'_{0-0} ...) and the three main regressors describing the solvent-solute interactions leads to the general equation :

$$Y = a\pi^* + b\alpha + c\beta + e$$

where e is the constant term, and a , b , c are the coefficients respectively affected to π^* , α , β and calculated by the multiple linear regression analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Room temperature photophysical data

In order to correlate the spectroscopic data with the microenvironment and the structure, six sets of the data were measured or calculated for the eleven luminarins in the twelve chosen solvents i.e. : λ_{max} (Table 2), ϵ (Table 3), λ_{ex} and λ_{em} (Table 4), ν'_a - ν'_f (Table 5), I_F/A (Table 6) and λ_{0-0} (Table 7).

Such a large collection of run data is difficult to interpret; nevertheless, some general trends can be defined. As can be seen the emission band (Table 4) is almost constantly affected by the global polarity of the solvent with a shift depending on the compound. The general observed bathochromic shift appears consistent with the $\pi \rightarrow \pi^*$ nature of the lowest transition of luminarins. Moreover, the change in polarity has no effect on the shape of the excitation and the emission band.

On the other hand the $\pi \rightarrow \pi^*$ nature of the S_1 state is well supported by the increase in the Stokes shift (Table 5), λ_{em} (Table 4) and λ_{0-0} (Table 7) with the solvent polarity. Moreover, this strongly suggests

that dipole-dipole interaction and hydrogen bonding can contribute to lower the S_1 state energy level and consequently increase the Stokes shift. This latter point is in agreement with the decreased fluorescence emission (IF/A) associated with the increase in polarity. In addition, such a behaviour has already been reported with other coumarinic derivatives [15].

LSERs model and 9-substitued quinolizinocoumarins

The above considerations, although of general interest, do not lead to a precise insight into the solvent-solute interactions as we wanted. In this matter, numerous attempts of correlation between spectroscopic data and the polarity of a solvent with respect to the structure of the solute were described in the literature (see for review [11-14, 16-19]). Although none of them perfectly describes the complexity of the solvent-solute interactions, we chose the Linear Solvation Energy Relationships (LSERs) model due to numerous reports indicating its relative versatility in different areas of chemistry. On the other hand, valid results, related to the Dimroth and Reichardt's ($E_T(30)$), the dipole factor (Δf) and Hildebrand solubility (δ_H) parameters, were clearly established with some coumarinic fluorescent probes derivated from the 7-amino coumarin [20-22]. These coumarinic derivatives, as luminarins, appear of interest with respect to the LSERs approach. Therefore, the described multi-linear regression analysis was performed for all the above mentioned spectroscopic parameters. The correlations were, then, analysed according to the classical statistical methodology of the analysis of variance. For spectroscopically significance of the LSERs model, the dependent parameter (Y) must be directly correlated to solvation energy, thus, wavenumbers (ν') and frequencies

(ν) must be selected [23]. The obtained correlations were not identical for all the tested photophysical parameters and follow the order :

$\nu'_{0-0} > \nu'_{em} > \nu'_{a-\nu'f} > \nu'_{ex}$ with ν'_{0-0} , ν'_{em} , ν'_{ex} the wavenumbers (in cm^{-1}) corresponding to λ_{0-0} , λ_{em} and λ_{ex} respectively.

As an example, Tables 8,9,10 and 11 report the LSERs multi-linear regression analysis for ν'_{em} (average $r = 0.978$), ν'_{ex} (average $r = 0.830$), ν'_{0-0} (average $r = 0.987$) and $\nu'_{a-\nu'f}$ (average $r = 0.925$). The emission wavenumbers (ν'_{em}) and 0-0 transition wavenumbers (ν'_{0-0}) appear as the most correctly correlated dependent parameters with respect to the variation of polarity of the twelve tested solvents and this for the eleven luminarins. This suggests that the excited luminarins (S_1 state) appear as extremely sensitive to the modification of the microenvironment, especially when dipole-dipole or / and hydrogen bondings occur. Moreover, as shown in Table 8 to 11, the coefficients a, b and c follow a common trend : the contribution of a and b coefficients appears generally more important that of c. This suggests that the spectroscopic observed variations of luminarins in function of the polarity of the solvent is mainly ruled by the dipole-dipole interaction and the ability of the solvent to donate protons (acidic character).

It should be pointed out that these two points are in agreement with structural considerations concerning quinolizinocoumarinic compounds in which the presence of amino and carbonyl groups are susceptible of dipole-dipole formation and capable of accepting protons, due to the available pairs of electrons.

Therefore, luminarin derivatives should act as sensors of the variation of the dipolar character as well as the acidity character of the microenvironment. As a direct consequence, luminarin derivatives should be less sensitive to the variation of the basicity character of the solvent.

These latter considerations are in agreement with the measured signals in HPLC of labelled luminarin derivatives [1,2,6,7]. The best fluorescence performances in HPLC, defined in term of intrinsic fluorescence sensitivity (IFS), were observed in moderately polar, hydrogen-bond acceptor and non-hydrogen bonding, solvents (i.e. : dimethylsulfoxide and methylene chloride). These results suggests the selection of ethyl acetate, tetrahydrofuran, methylene chloride, dimethylsulfoxide and dimethylformamide to sensitize the fluorescence of the luminarin derivatives. These solvents have the further advantage of dissolving high concentrations of luminarin derivatives, and can be used in postcolumn reactions enhancement after normal or reverse phase HPLC [2-8].

Relationship between the structure of the 9-sided chain and the selected dependent parameters

Because of the common quinolizinocoumarin nucleus, the observed spectroscopic variations in function to the solvent must be due to the structural difference of the 9-sided chain only. To validate this assumption, an attempt to correlate the structural variation of the chain with the observed ν'_{0-0} , ν'_{ex} , $\nu'_a-\nu'_f$, and ν'_{em} were performed in each solvent. As in the former case, the multiple linear regression analysis (MLRA) tool was used to achieve this goal. First of all, it was necessary to define the regressors involved in MLRA. Due to the number of studied luminarins ($n = 11$), no more than five regressors could be chosen (the $2n$ rule) [24]. After careful analysis of the structure of the eleven 9-sided chains, four groups of regressors (R_i) were selected and in each group a weight (w_i) was attributed for each selected regressor in function of its estimated contribution to the solvent-solute interactions according to the LSERs model (Table 12). Using this approach, one can define : the chemical

solvent-solute interactions involved, the chemical nature of the regressor and the number of regressors involved in a 9-sided chain.

Table 13 reports the regression coefficient (r) and the associated probability (p) corresponding to the MLRA performed with ν'_{0-0} , ν'_{em} , $\nu'_a-\nu'_f$ and ν'_{ex} . As can be seen, the best dependent parameters (Y) appeared to be ν'_{0-0} and ν'_{em} which globally show the best average correlation (0.855 and 0.888, respectively), and among all the tested solvents, the best correlations were obtained in DMF (0.964 and 0.975, respectively). This latter observation agrees with the importance of the dipole-dipole interaction and thus underlines the importance of the oxygen atom in the 9-sided chain. On the other hand, it should be pointed out that, as reported in Table 8 to 11, the coefficient a of the π^* index is always predominant in comparison with the b and c coefficients. This, indirectly corroborates the choice of the structural regressors (R_i) as well as their affected weights (w_i).

Lastly, Table 13 shows clearly that the spectroscopic data related to the absorption (ν'_{ex}) and Stokes shift ($\nu'_a-\nu'_f$) are poorly correlated with the structure of the side chain on the contrary of ν'_{0-0} and ν'_{em} . Thus, the structure of the excited molecule appears to be essentially involved in the solvent-solute interactions, and the oxygen atoms located in the side chain, to play a crucial role. As an example, the regression analysis performed for the luminarin derivatives studied in DMF is depicted in Figure 2.

In conclusion, the interest of the statistical tool of multiple linear regression analysis (MLRA) was to correlate the photophysical data of luminarins and their solvent-solute interactions via the LSERs model, as well as to stress the role of the side chain structure in this interaction. In such a way, the drastic difference in the fluorescence signals of the luminarin labelled derivatives analysed in HPLC, can now be more clearly

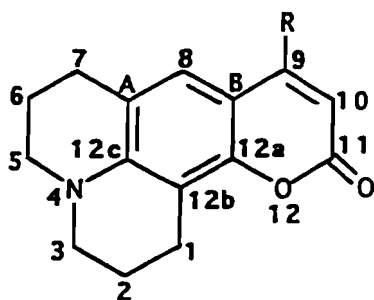
understood. More precisely, the very low LODs observed with moderately polar, non-hydrogen-bonding and hydrogen-bond acceptor, solvents (i.e. : dimethylsulfoxide and methylene chloride) used as coeluent in HPLC can be related to the limited solvent-solute interaction between the oxygen(s) of the 9-sided chain and the mobile phase during the excited S_1 state of the luminarin derivatives. Consequently, an important emission of fluorescence can be observed in such conditions.

This work was supported by grant-in-aid (Aguire Basualdo) for scientific research from the Chancellery of the University (Paris, France). We thank Dr. Joseph Chalom, Eurobio-Seratec Laboratory (Les Ulis, France) for supplying luminarin compounds.

REFERENCES

- 1 M.Tod, R.Farinotti, I.Gaury and G.Mahuzier, *Anal.Chim.Acta*, **217** (1989) 11.
- 2 M.Tod, M.Prevot, M.Poulou, R.Farinotti, J.Chalom and G.Mahuzier, *Anal.Chim.Acta*, **223** (1989) 309.
- 3 M.Tod, M.Prevot, J.Chalom, R.Farinotti and G.Mahuzier, *J.Chromatogr.*, **542** (1991) 295.
- 4 M.Tod, J.Y.Legendre, J.Chalom, H.Kouwatli, M.Poulou, R.Farinotti and G.Mahuzier, *J.Chromatogr.*, **594** (1992) 386.
- 5 H.Kouwatli, J.Chalom, M.Tod, R.Farinotti and G.Mahuzier, *Anal.Chim.Acta*, **266** (1992) 243.
- 6 F.Traoré, M.Tod, J.Chalom, R.Farinotti and G.Mahuzier, *Anal.Chim.Acta*, **269** (1992) 211.
- 7 F.Traoré, G.A.Pianetti, L.Dallery, M.Tod, J.Chalom, R.Farinotti and G.Mahuzier, *Chromatographia*, **36** (1993) 96.
- 8 F.Traoré, R.Farinotti and G.Mahuzier, *J.Chromatogr.*, **648** (1993) 111.
- 9 C.A.Parker and W.T.Rees, *Analyst*, **85** (1960) 587.
- 10 R.S.Becker, in *Theory and interpretation of fluorescence and phosphorescence*, Wiley-Interscience, New York, (1969).
- 11 M.J.Kamlet, J.L.M.Abboud and R.W.Taft, *J.Am.Chem.Soc.*, **99** (1977) 6027.
- 12 R.W.Taft and M.J.Kamlet, *J.Am.Chem.Soc.*, **98** (1976) 2886.
- 13 M.J.Kamlet and R.W.Taft, *J.Am.Chem.Soc.*, **98** (1976) 377.
- 14 M.J.Kamlet, J.L.M.Abboud, M.H.Abraham and R.W.Taft, *J.Org.Chem.*, **48** (1983) 2877.
- 15 M.L.Vazquez, A.Cepeda, P.Prognon, J.Blais and G.Mahuzier, *Anal.Chim.Acta*, **255** (1991) 343.

- 16 H.F.Herbrandson and F.R.Neufeld, *J.Org.Chem.*, **31** (1966) 1140.
- 17 R.L.Reeves, M.S.Maggio and L.F.Costa, *J.Am.Che.Soc.*, **96** (1974) 5917.
- 18 C.J.Seliskar and L.Brand, *J.Am.Chem.Soc.*, **93** (1971) 5405, 5414.
- 19 E.M.Kosower and H.Dodiuk, *J.Am.Chem.Soc.*, **100** (1978) 4173.
- 20 L.Coosemans, F.C.De Schryver and A. Van Dormael, *Chem.Phys.Letters* , **65** (1979) 95.
- 21 V.Masilamani and B.M.Sivaram, *J.Lumin.*, **27** (1982) 147.
- 22 M.J.Kamlet, C.Dickinson and R.W.Taft, *Chem.Phys.Letters*, **77** (1981) 69.
- 23 C.Reichardt, in *Solvents and solvent effects in organic chemistry*, 1 st reprint of the 2 nd Ed., Weinheim; Basel (Switzerland); Cambridge; New York (1990), p.339.
- 24 R.Tomassone, E.Lesquoy and C.Millier, in *la Régression Masson* Paris, (1983).



1	R : CH ₃	(C.102)
2	R : CH ₂ O(CH ₂ -CH ₂ O) ₂ -CH ₃	(C.102 HS)
3	R : CH ₂ -OH	(Lu. OH)
4	R : CH ₂ -COOH	(Lu.A134)
5	R : CH ₂ -CO-NH-NH ₂	(Lu. 3)
6	R : CH ₂ -CO-NH-(CH ₂) ₄ -NH ₂	(Lu.4)
7	R : CH ₂ -CO-NH-(CH ₂) ₅ -COOH	(Lu.8)
8	R : (CH ₂) ₄ -CO-NH-NH ₂	(Lu. 11)
9	R : CH ₂ O(CH ₂ -CH ₂ O) ₂ -CH ₂ -CO-NH-NH ₂	(Lu.12)
10	R : CH ₂ -CO-NH-(CH ₂) ₂ -CH ₂ OH	(Lu.NPROH)
11	R : CH ₂ -CO-NH-N=CH-CH=CH ₂	(Lu.NNACR)

Figure 1. Structure of luminarins studied.

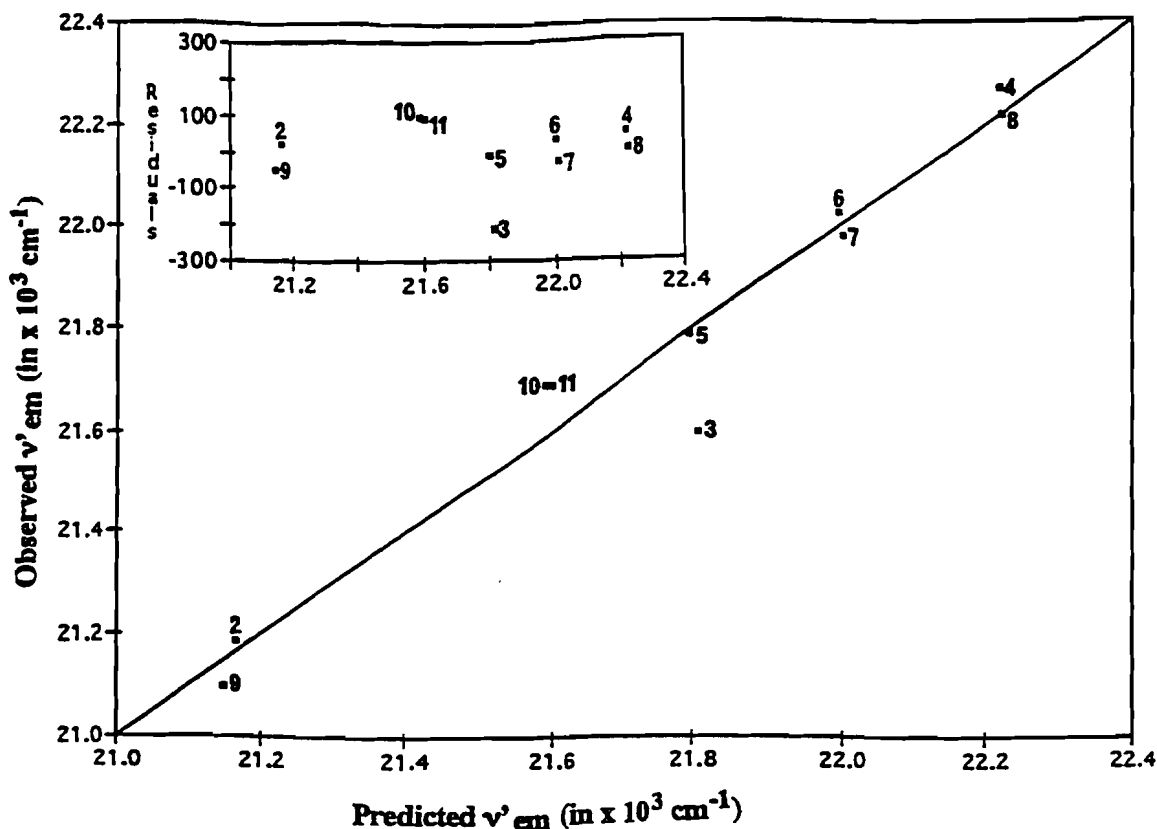


Figure 2. Results of a multiple linear regression analysis (MLRA) using the weights of the selected regressors to predict the luminarin ν'_{em} in DMF. The predict ν'_{em} was calculated from the regression equation :

$$\begin{aligned} \nu'_{em} = & 21676.04 (\pm 118.68) + 209.30 (\pm 28.06) R_1 + 198.14 \\ & (\pm 64.82) R_2 + 141.37 (\pm 44.48) R_3 - 108.72 (\pm 19.16) R_4. \\ r^2 = & 0.9498, p = 0.002 \end{aligned}$$

The numbers in parentheses represent the standard deviations of the coefficients, and r^2 the square of the correlation coefficient, indicating the fraction of the variance of the dependent variable (ν'_{em}) predicted by the regression model. In the present case, 95% of the variance associated with ν'_{em} of derivatives is accounted by the multiple regression model. In the box : the corresponding residual analysis. For other details, see conditions in text.

Compounds : 2, C.102 HS; 3, Lu.OH; 4, Lu.A134; 5, Lu.3; 6, Lu.4; 7, Lu.8; 8, Lu.11; 9, Lu.12; 10, Lu.NPROH; 11, Lu.NNACR.

Table 1. Solvatochromic parameters (π^* , α , β) according to Kamlet and co-workers [14].

Solvent	Type solvent ^a	π^* ^b	α ^c	β ^d
Cyclohexane (CycH.)	NHB	0.00	0.00	0.00
Diisopropyl ether (DiisopE.)	HBA	0.27	0.00	0.49
Chloroform (Chlorf.)	NHB-HBD	0.58	0.44	0.00
Ethyl acetate (Eth.Ac.)	HBA	0.55	0.00	0.45
Tetrahydrofuran (THF)	HBA	0.58	0.00	0.55
Methylene chloride (Dichlorm.)	NHB	0.82	0.30	0.00
Dimethylsulfoxide (DMSO)	HBA	1.00	0.00	0.76
Dimethylformamide (DMF)	HBA	0.88	0.00	0.69
Ethanol (ETOH)	HBA-D	0.54	0.83	0.77
Acetonitrile (ACCN)	HBA-HBD	0.75	0.19	0.31
Methanol (MEOH)	HBA-D	0.60	0.93	0.62
Water	HBA-D	1.09	1.17	0.18

^aNHB (non-hydrogen-bonding solvent); HBA (hydrogen-bond acceptor); HBD (hydrogen-bond donor); HBA-D (amphiprotic hydrogen bond acceptor-donor); NHB-HBD (usually act as non-hydrogen-bonding solvents, but have shown weak HBD properties with strong HBA indicator solutes).

^bThe π^* scale is an index of solvent dipolarity/polarizability, which measures the ability of the solvent to stabilize a charge or a dipole by virtue of its dielectric effect.

^cThe α scale of solvent HBD acidities describes the ability of the solvent to donate a proton in a solvent-to-solute hydrogen bond.

^dThe β scale of solvent HBA basicities provides a measure of the solvent's ability to accept a proton (donate a electron pair) in a solute-to-solvent hydrogen bond.

Table 2. Wavelengths of absorbance maxima (λ_{max} , in nm), for the luminarins studied in various solvents.

Compounds Solvents	C.102	C.102HS	Lu.OH	Lu.A134	Lu.3	Lu.4	Lu.8	Lu.11	Lu.12	Lu.NPROH	Lu.NNACR
CycH.	363	373	364	364	374	363	355	365	-	371	389
DiisopE.	366	375	367	373	377	376	379	368	376	377	373
Chlorf.	372	392	390	395	403	401	404	392	394	403	399
Eth.Ac.	365	379	374	380	382	384	384	377	380	384	382
THF	368	380	376	382	383	385	384	378	381	383	383
Dichlm.	374	391	388	392	399	397	400	389	391	400	396
DMSO	374	393	389	388	396	394	395	391	392	395	397
DMF	372	389	385	384	392	392	391	388	389	391	392
ETOH	376	392	388	386	398	395	394	395	395	396	-
ACCN	370	387	384	382	391	391	391	385	387	392	393
MEOH	375	394	392	391	399	399	397	393	394	398	399
Water	386	404	398	393	408	408	408	399	404	408	408

Table 3. Molar absorptivity (ϵ , x 10^4 l mol⁻¹cm⁻¹) for the luminarins studied in various solvents.

Compounds Solvents	C.102	C.102HS	Lu.OH	Lu.A134	Lu.3	Lu.4	Lu.8	Lu.11	Lu.12	Lu.NPROH	Lu.NNACR
CycH.	2.78	2.03	-	-	1.52	-	-	-	-	-	2.83
DiisopE.	2.69	2.30	2.15	1.59	2.15	-	-	3.05	3.26	0.85	2.74
Chlorf.	1.91	2.59	2.57	2.42	2.83	1.85	2.57	3.09	3.15	2.38	2.97
Eth.Ac.	2.13	2.20	2.10	2.08	2.58	1.51	2.05	3.19	2.70	1.90	2.69
THF	2.36	2.81	2.71	2.76	2.71	2.00	2.68	3.07	2.80	2.52	2.61
Dichlm.	2.48	2.96	2.98	2.86	3.06	2.23	2.82	3.49	3.33	2.85	3.40
DMSO	1.91	2.27	2.25	2.24	2.46	1.78	2.18	2.81	2.82	1.99	2.66
DMF	1.94	2.29	2.21	2.23	2.47	1.77	2.12	2.82	2.56	1.99	2.56
ETOH	2.01	2.25	2.27	2.28	2.45	1.73	2.15	3.06	2.50	2.07	-
ACCN	1.93	2.39	2.26	2.19	2.56	1.64	2.12	2.72	2.62	2.06	2.67
MEOH	1.98	2.38	2.26	2.44	2.69	1.92	2.28	3.03	2.77	2.21	2.77
Water	-	1.63	1.14	0.74	1.96	1.17	1.21	2.07	2.04	1.52	1.98

Table 4. Excitation and emission wavelengths ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$, in nm) of the studied luminarins in various solvents.

Compounds Solvents	C.102	C.102HS	Lu.OH	Lu.A134	Lu.3	Lu.4	Lu.8	Lu.11	Lu.12	Lu.NPROH	Lu.NNACR
CycH.	363/409	380/424	378/421	380/412	375/420	377/419	386/423	365/412	-/-	383/423	381/421
DiisopE.	366/418	381/428	365/424	373/419	377/424	384/425	383/423	368/416	381/441	385/424	379/423
Chlorf.	383/435	395/453	391/455	392/443	394/450	400/452	399/454	392/442	390/458	401/451	398/453
Eth.Ac.	376/427	385/448	380/447	386/443	387/444	387/444	388/448	384/429	384/451	391/447	389/444
THF	380/428	384/448	383/447	388/441	388/443	392/446	389/444	382/428	382/451	389/446	389/444
Dichlm.	388/442	393/460	393/462	391/440	399/456	399/452	397/462	389/443	393/459	400/455	395/454
DMSO	389/452	393/473	392/472	392/454	394/464	394/464	393/461	391/455	392/474	394/464	394/465
DMF	384/447	393/472	388/463	388/449	393/459	392/454	394/455	388/450	392/474	393/461	394/461
ETOH	389/463	393/483	391/475	392/461	397/475	395/474	395/476	394/468	393/490	393/472	-/-
ACCN	384/445	383/473	385/469	389/448	394/464	394/462	392/468	387/448	390/473	393/465	394/466
MEOH	390/465	396/489	392/486	393/470	399/481	395/479	394/481	393/471	394/498	397/476	397/480
Water	386/475	397/511	396/506	397/484	403/502	400/505	403/503	399/489	404/512	398/503	397/499

Table 5. Stokes shifts ($\nu'_a - \nu'_f$, in cm^{-1}) for the luminarins studied in various solvents.

Compounds Solvents	C.102	C.102HS	Lu.OH	Lu.A134	Lu.3	Lu.4	Lu.8	Lu.11	Lu.12	Lu.NPROH	Lu.NNACR
CycH.	3098	2731	2702	2044	2857	2659	2266	3125	-	2469	2494
DiisopE.	3399	2882	3812	2943	2940	2512	2469	3135	3571	2389	2745
Chlorf.	3121	3241	3597	2937	3158	2876	3036	2886	3807	2765	3051
Eth.Ac.	3177	3653	3944	3333	3317	3317	3452	2732	3869	3204	3184
THF	2951	3720	3738	3097	3200	3089	3184	2814	4005	3285	3184
Dichlm.	3149	3706	3800	2848	3133	2939	3544	3134	3659	3022	3290
DMSO	3583	4304	4324	3484	3829	3829	3753	3597	4413	3829	3875
DMF	3670	4259	4175	3501	3659	3484	3403	3551	4413	3753	3689
ETOH	4109	4741	4523	3818	4136	4219	4308	4013	5037	4259	-
ACCN	3570	4968	4652	3386	3829	3736	4143	3518	4499	3940	3921
MEOH	4136	4803	4934	4169	4273	4440	4591	4214	5300	4181	4356
Water	4854	5619	5490	4528	4894	5198	4933	4613	5221	5245	5149

Table 6. Relative fluorescence quantum yields (I_F/A , in A.U.) for the luminarins studied in various solvents. I_F/A was calculated as the ratio of fluorescence intensity by corresponding absorbance in arbitrary units according to Parker and Rees [9].

Compounds Solvents	C.102	C.102HS	Lu.OH	Lu.A134	Lu.3	Lu.4	Lu.8	Lu.11	Lu.12	Lu.NPROH	Lu.NNACR
CycH.	3.87	2.96	-	-	0.65	-	-	-	-	-	0.70
DiisopE.	3.04	2.46	2.36	0.25	0.71	-	-	1.50	0.97	3.13	3.07
Chlorf.	2.24	2.70	2.42	0.73	0.78	2.26	1.21	1.15	1.64	2.83	2.54
Eth.Ac.	2.06	2.27	2.33	1.73	3.29	2.22	2.19	3.52	2.30	2.92	2.96
THF	2.58	2.58	2.58	2.58	2.97	3.08	2.73	3.25	2.11	3.00	3.16
Dichlm.	3.81	3.64	3.08	1.26	2.62	2.44	0.28	3.50	1.69	3.43	3.38
DMSO	2.60	2.33	2.47	3.23	3.73	2.77	2.96	4.18	4.24	2.91	3.51
DMF	2.11	2.02	2.09	2.78	2.52	2.47	2.51	3.31	2.04	2.56	2.68
ETOH	2.18	1.67	1.72	2.49	2.25	1.94	2.14	2.90	1.56	2.14	-
ACCN	2.25	1.89	1.93	2.66	2.41	2.29	0.56	3.12	1.80	2.38	2.24
MEOH	2.04	1.45	1.53	2.29	2.53	1.82	1.98	2.62	1.38	2.00	2.13
Water	-	0.72	0.80	1.59	1.26	1.03	1.32	1.93	0.79	1.23	1.18

Table 7. 0-0 transition wavelengths (λ_{0-0} , in nm) for the luminarins studied in various solvents.

Compounds Solvents	C.102	C.102HS	Lu.OH	Lu.A134	Lu.3	Lu.4	Lu.8	Lu.11	Lu.12	Lu.NPROH	Lu.NNACR
CycH.	386	397	397	388	395	394	397	388	-	399	400
DiisopE.	394	405	400	394	402	402	403	395	408	405	400
Chlorf.	412	427	426	417	428	429	431	415	428	430	424
Eth.Ac.	402	417	412	412	413	415	417	406	417	416	415
THF	403	416	411	412	414	414	415	405	417	415	415
Dichlm.	414	428	427	414	429	428	430	417	429	429	422
DMSO	419	435	428	422	429	429	429	423	435	429	427
DMF	414	429	424	418	425	425	424	420	431	425	425
ETOH	423	439	435	426	439	436	435	430	442	436	-
ACCN	415	431	426	417	427	427	428	418	431	427	427
MEOH	425	444	440	430	441	441	440	433	445	441	434
Water	429	465	462	446	462	460	461	448	466	462	442

Table 8. Equation between solvatochromic parameters (π^* , α and β) and ν'_{em} values for the luminarins studied in various solvents.

Compounds	$Y (\nu'_{em}, \text{in cm}^{-1}) = a\pi^* + b\alpha + c\beta + e$	r^a/p^b
C.102	$Y = -1714.16 \pi^* - 1498.02 \alpha - 902.17 \beta + 24596.22$	0.984/< 0.001
C.102HS	$Y = -2213.10 \pi^* - 1591.78 \alpha - 792.18 \beta + 23876.20$	0.975/< 0.001
Lu.OH	$Y = -2335.45 \pi^* - 1513.02 \alpha - 482.17 \beta + 23937.98$	0.979/< 0.001
Lu.A134	$Y = -1736.76 \pi^* - 1401.36 \alpha - 818.23 \beta + 24299.50$	0.974/< 0.001
Lu.3	$Y = -2029.57 \pi^* - 1613.43 \alpha - 576.65 \beta + 23987.42$	0.982/< 0.001
Lu.4	$Y = -1967.14 \pi^* - 1688.18 \alpha - 559.04 \beta + 23982.39$	0.985/< 0.001
Lu.8	$Y = -1963.01 \pi^* - 1636.11 \alpha - 217.14 \beta + 23742.67$	0.971/< 0.001
Lu.11	$Y = -1863.86 \pi^* - 1791.50 \alpha - 734.79 \beta + 24540.59$	0.983/< 0.001
Lu.12	$Y = -1841.93 \pi^* - 1742.45 \alpha - 1161.59 \beta + 23675.60$	0.980/< 0.001
Lu.NPROH	$Y = -2072.43 \pi^* - 1424.48 \alpha - 429.72 \beta + 23869.88$	0.976/< 0.001
Lu.NNACR	$Y = -2078.18 \pi^* - 1468.74 \alpha - 509.10 \beta + 23943.53$	0.973/< 0.001

^aCorrelation coefficient .

^bThe value of p indicated the probability that correlation would occur by chance sampling fluctuation. The smaller the value of p, the greater the probability that the correlation was due to the influence of the independent variable(s) on the dependent variable. A p value of less than 0.05 was considered significant in this study.

Table 9. Equation between solvatochromic parameters (π^* , α and β) and ν'_{ex} values for the luminarins studied in various solvents.

Compounds	$Y (\nu'_{ex}, \text{ in cm}^{-1}) = a\pi^* + b\alpha + c\beta + e$	r/p
C.102	$Y = -1350.82 \pi^* - 340.62 \alpha - 544.97 \beta + 27338.65$	0.783/0.046
C.102HS	$Y = -193.87 \pi^* - 465.71 \alpha + 233.18 \beta + 25787.55$	0.629/0.236
Lu.OH	$Y = -1189.19 \pi^* - 410.82 \alpha + 208.59 \beta + 26637.38$	0.739/0.084
Lu.A134	$Y = -378.80 \pi^* - 406.41 \alpha + 376.87 \beta + 25895.38$	0.626/0.241
Lu.3	$Y = -1279.25 \pi^* - 624.80 \alpha + 19.96 \beta + 26552.91$	0.940/< 0.001
Lu.4	$Y = -1051.33 \pi^* - 373.08 \alpha + 203.12 \beta + 26199.86$	0.874/0.007
Lu.8	$Y = -764.41 \pi^* - 420.99 \alpha + 380.25 \beta + 25936.91$	0.935/0.001
Lu.11	$Y = -1539.91 \pi^* - 734.07 \alpha - 196.19 \beta + 27221.66$	0.924/0.001
Lu.12	$Y = -1093.06 \pi^* - 608.18 \alpha + 22.42 \beta + 26582.27$	0.977/< 0.001
Lu.NPROH	$Y = -787.87 \pi^* - 289.95 \alpha + 353.75 \beta + 25898.67$	0.845/0.014
Lu.NNACR	$Y = -966.62 \pi^* - 282.69 \alpha + 189.83 \beta + 26179.81$	0.853/0.022

Table 10. Equation between solvatochromic parameters (π^* , α and β) and ν'_{0-0} values for the luminarins studied in various solvents.

Compounds	$Y (\nu'_{0-0}, \text{in cm}^{-1}) = a\pi^* + b\alpha + c\beta + e$	r/p
C.102	$Y = -1523.99 \pi^* - 987.82 \alpha - 513.50 \beta + 25830.22$	0.968/< 0.001
C.102HS	$Y = -1945.11 \pi^* - 1386.36 \alpha - 331.39 \beta + 25236.56$	0.995/< 0.001
Lu.OH	$Y = -1843.19 \pi^* - 1488.64 \alpha - 28.96 \beta + 25289.50$	0.994/< 0.001
Lu.A134	$Y = -1767.15 \pi^* - 1171.50 \alpha - 453.58 \beta + 25735.84$	0.979/< 0.001
Lu.3	$Y = -1860.69 \pi^* - 1504.24 \alpha - 152.42 \beta + 25282.22$	0.994/< 0.001
Lu.4	$Y = -1898.24 \pi^* - 1410.59 \alpha - 132.54 \beta + 25284.61$	0.991/< 0.001
Lu.8	$Y = -1845.38 \pi^* - 1348.83 \alpha - 73.70 \beta + 25099.31$	0.991/< 0.001
Lu.11	$Y = -1798.77 \pi^* - 1387.82 \alpha - 506.67 \beta + 25842.66$	0.992/< 0.001
Lu.12	$Y = -1865.73 \pi^* - 1425.74 \alpha - 415.88 \beta + 25172.10$	0.995/< 0.001
Lu.NPROH	$Y = -1703.73 \pi^* - 1394.29 \alpha - 2.87 \beta + 25034.69$	0.996/< 0.001
Lu.NNACR	$Y = -1529.81 \pi^* - 846.14 \alpha - 167.00 \beta + 25058.22$	0.957/< 0.001

Table 11. Equation between solvatochromic parameters (π^* , α and β) and $\nu'_a-\nu'_f$ values for the luminarins studied in various solvents.

Compounds	$Y (\nu'_a-\nu'_f, \text{ in cm}^{-1}) = a\pi^* + b\alpha + c\beta + e$	r/p
C.102	$Y = 346.04 \pi^* + 1015.73 \alpha + 494.72 \beta + 2821.76$	0.895/0.004
C.102HS	$Y = 1799.27 \pi^* + 863.42 \alpha + 964.67 \beta + 2321.84$	0.880/0.006
Lu.OH	$Y = 1121.44 \pi^* + 959.25 \alpha + 733.37 \beta + 2821.94$	0.926/0.001
Lu.A134	$Y = 841.54 \pi^* + 954.83 \alpha + 914.01 \beta + 2129.22$	0.958/< 0.001
Lu.3	$Y = 750.78 \pi^* + 988.76 \alpha + 596.64 \beta + 2565.13$	0.938/< 0.001
Lu.4	$Y = 916.07 \pi^* + 1294.97 \alpha + 761.97 \beta + 2217.47$	0.925/0.001
Lu.8	$Y = 1198.56 \pi^* + 1215.14 \alpha + 597.47 \beta + 2194.23$	0.935/0.001
Lu.11	$Y = 324.35 \pi^* + 1057.53 \alpha + 538.26 \beta + 2680.92$	0.876/0.007
Lu.12	$Y = 748.66 \pi^* + 1134.05 \alpha + 1183.68 \beta + 2906.95$	0.958/< 0.001
Lu.NPROH	$Y = 1284.39 \pi^* + 1134.95 \alpha + 783.37 \beta + 2028.82$	0.921/0.001
Lu.NNACR	$Y = 1110.91 \pi^* + 1186.59 \alpha + 699.00 \beta + 2236.55$	0.959/< 0.001

Table 12. Regressors (R_i), chemical functions and corresponding weights (w_i) describing the structure of the sided chain for multiple linear regression analysis (MLRA). General equation : $Y = e + aR_1 + bR_2 + cR_3 + dR_4$

Regressor (R_i)	Chemical function	Weight (w_i)
R₁ 1st group : hydrogen donating donor	-COOH	4
	-OH	1
R₂ 2nd group : hydrogen acceptor	-NH ₂	2
	-NHNH ₂	1
R₃ spacer	-(CH ₂) _n	1
R₄ hydrogen acceptor and dipole center	-O-	2

Table 13. Correlation coefficient (r) and probability (p) corresponding to the multiple linear regression analysis (MLRA) between the effects of the donor (COOH, OH), the acceptor (NH₂, NHNH₂), the spacer (CH₂) and the oxygen atom, of the 9-sided chains of the studied luminarins, and the ν'_{O-O} , ν'_{em} , ν'_{ex} and $\nu'_{a-\nu'f}$ values in various solvents.

Solvents	ν'_{O-O}		ν'_{em}		ν'_{ex}		$\nu'_{a-\nu'f}$	
	r	p	r	p	r	p	r	p
CycH.	0.825	0.241	0.850	0.189	0.911	0.076	0.927	0.054
DiisopE.	0.895	0.053	0.954	0.008	0.675	0.468	0.325	0.956
Chlorf.	0.765	0.272	0.819	0.167	0.376	0.924	0.600	0.624
Eth.Ac.	0.931	0.021	0.979	0.001	0.785	0.231	0.755	0.294
THF	0.960	0.006	0.975	0.002	0.773	0.257	0.848	0.117
Dichlm.	0.700	0.413	0.693	0.430	0.695	0.424	0.665	0.490
DMSO	0.942	0.013	0.894	0.055	0.764	0.274	0.830	0.146
DMF	0.964	0.004	0.975	0.002	0.609	0.606	0.843	0.125
ETOH	0.903	0.089	0.915	0.072	0.561	0.765	0.908	0.082
ACCN	0.881	0.070	0.868	0.087	0.590	0.642	0.800	0.202
MEOH	0.824	0.157	0.877	0.075	0.599	0.625	0.734	0.338
Water	0.672	0.474	0.853	0.109	0.743	0.319	0.823	0.159

DEUXIEME PARTIE :

*ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE DES
DERIVES DE LA LUMINARINE 3, 11 et
12*

Deux rappels bibliographiques généraux sur la réactivité des hydrazides d'une part et sur l'analyse par chromatographie en phase liquide des aldéhydes, cétones, nucléosides et nucléotides d'autre part sont exposés dans cette partie.

Après avoir cité les caractéristiques des différentes méthodes existantes, nous explorons les possibilités offertes par une dérivation des aldéhydes, cétones, nucléosides et nucléotides, avec les luminarines hydrazides, préalablement à leur séparation par chromatographie liquide de partage en phase normale et à polarité de phases inversée. Cette transformation outre qu'elle améliore le comportement chromatographique du composé initial, permet de le détecter en spectrophotométrie UV, fluorimétrie ou en chimiluminescence.

L'essentiel des travaux présentés dans cette partie porte sur le développement de nouvelles méthodes d'analyse des aldéhydes, cétones, nucléosides et nucléotides, d'en établir les avantages et les limites et de comparer leurs performances par rapport aux méthodes proposées précédemment. Dans cette optique, cinq composés (malonaldéhyde, acétylacétone, cytidine, cytidine et adénosine monophosphates) ont été sélectionnés comme modèle de base pour appréhender les paramètres mis en jeu dans la dérivation et la séparation et pour mesurer leur influence sur la qualité de l'analyse. Parallèlement à ces études, a été envisagée l'application des méthodes mises au point, à l'analyse du malonaldéhyde libre, à celle du malonaldéhyde total dans le plasma ou le sérum, à celle de l'hydroxyméthylfurfural dans le jus d'orange concentré et pasteurisé.

I. RAPPEL SUR LA REACTIVITE DES HYDRAZIDES

[WAGNER et ZOOK (1965); MATHIEU et ALLAIS (1966); NORMANT et NORMANT (1968); GAUTIER et MIOCQUE (1968)]

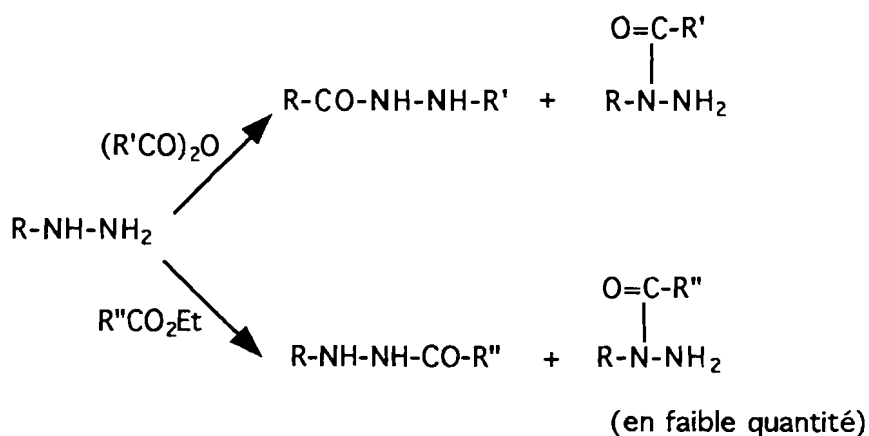
I-1 REACTIONS GENERALES

Les hydrazides de formule générale $R-CO-NH-NH-R'$ correspondent aux amides $R-CO-NH-R'$ qui leur ressemblent à bien des égards.

Ils sont obtenus par des réactions semblables à celles qui permettent la préparation des amides en remplaçant toutefois l'ammoniaque par l'hydrazine ou ses dérivés substitués (le plus souvent monosubstitués). Parmi ces réactions dites d'acylation on peut citer :

- l'action des sels d'hydrazine (NH_2-NH_2) sur les acides carboxyliques
- l'action de l'hydrazine sur les chlorures ou anhydrides d'acides
- l'action de l'hydrazine sur les esters d'acides.

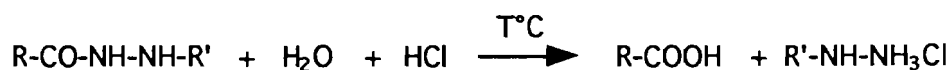
L'acylation des hydrazines est plus facile que leur alkylation. Il est possible d'obtenir des produits de réaction purs en faisant un bon choix du réactif acylant. Parmi les réactifs les plus usités, l'anhydride acétique et l'ester éthylique de l'acide acétique substitué semblent être les plus actifs.



Comme agents acylants, on peut également citer le diméthyl carbonate et le diéthyl carbonate. La condensation se fait à chaud et l'hydrazide précipite par refroidissement.

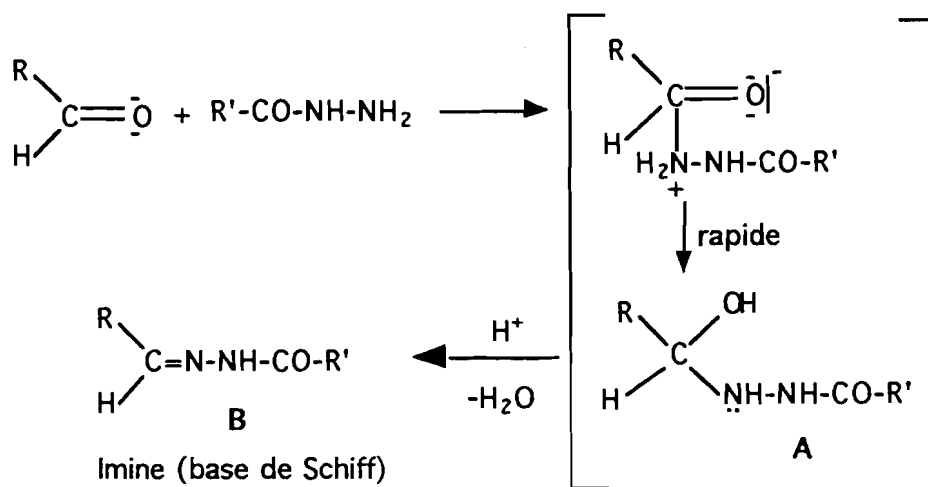
Les hydrazides s'obtiennent également en chauffant un amide avec l'hydrazine, et par action de l'hypochlorite de sodium sur l'acétylurée. Cette dernière réaction est similaire à celle de Hofmann avec les amides.

D'une manière générale, les hydrazides ne ressemblent aux amides que par leurs propriétés physiques dont la solubilité. Ils sont plus résistants à l'hydrolyse. L'hydrolyse s'effectue, à ébullition et sous reflux en présence de l'acide chlorhydrique concentré ou de la potasse alcoolique, avec formation des acides et hydrazines correspondants :



Du point de vue de la réactivité, les hydrazides les plus actifs sont ceux qui renferment le groupe -NH-NH_2 . Ce groupe leur confère un pouvoir réducteur (réduction de la liqueur de Fehling et de la solution ammoniacale de nitrate d'argent). Mais la condensation avec les aldéhydes et les cétones constitue la propriété la plus remarquable des hydrazides.

En effet, les hydrazides attaquent les aldéhydes ou les cétones par un processus nucléophile qui conduit aux imines.



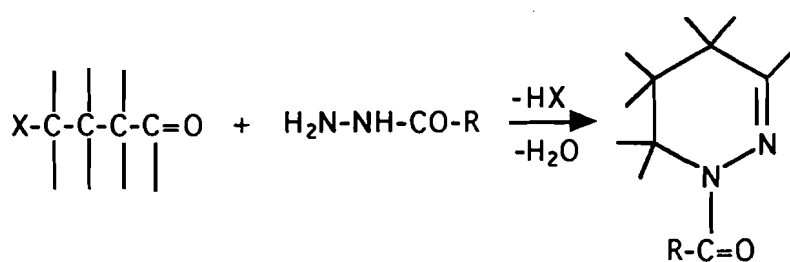
La réaction emprunte les étapes suivantes :

- attaque nucléophile du carbonyle
- formation d'un composé d'addition
- déshydratation de ce composé en imines.

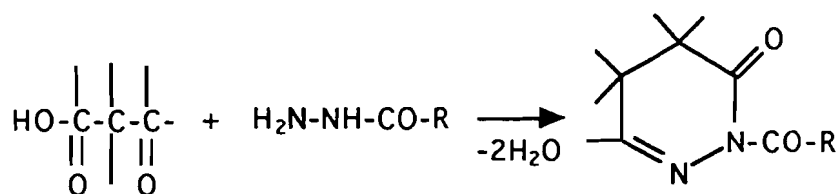
Ces réactions de condensation sont utilisées classiquement pour caractériser les aldéhydes et les cétones. L'attaque du réactif nucléophile R-CO-NH-NH_2 sur le composé carbonyle conduisant au composé d'addition **A** est rapide et est suivie d'une déshydratation, en milieu acide, qui aboutit finalement au dérivé **B**. Cette dernière étape détermine la vitesse de réaction.

Cependant si l'acidité du milieu augmente, la vitesse de déshydratation est accélérée et la formation initiale de **A** ralentie, à cause de la conversion croissante du réactif nucléophile en R-CO-NH-NH_3^+ non actif. L'attaque initiale du réactif nucléophile sur le carbonyle peut alors devenir l'étape limitante de la réaction.

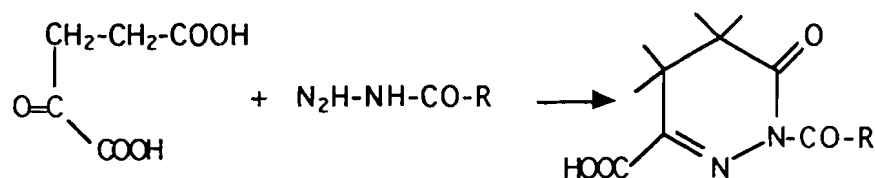
La condensation des hydrazides avec les composés acycliques pour former des dérivés pyridaziniques constitue une autre réaction importante. Avec un dérivé dihalogéné, ou dihydroxylé en 1-4 sur une chaîne



- Avec les acides γ -cétoniques et leurs esters on aboutit à une pyridazinone (ou 3-céto hydroypyridazine) :

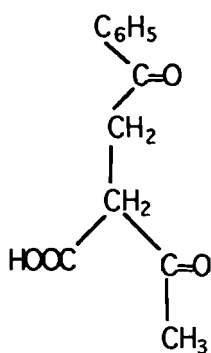


C'est la méthode la plus employée pour construire l'enchaînement pyridazinique et pour préparer les dérivés de la pyridazine. Ce sont les acides γ -cétoniques saturés qui sont utilisés de la manière la plus large. Ils permettent d'aboutir aux pyridazinones-3. Si l'on utilise des acides γ -cétoniques éthyléniques on aboutit aux pyridazines-3. La réaction est la même avec les diacides γ -cétoniques mais, dans ce cas, une seule fonction acide participe à la réaction, on obtient alors des acides 3-pyridazinones carboxyliques. Ainsi avec l'acide α -cétoglutarique on obtient les acides 3-pyridazinone 6-carboxyliques N-acylés.

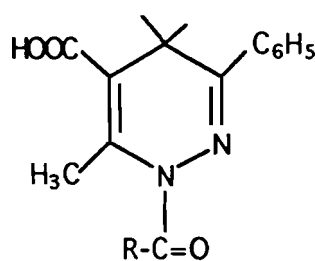


- Avec les γ -dicétones ou γ -dialdéhydes, il semble que l'on puisse obtenir plutôt des dérivés pyrroliques que des dérivés pyridaziniques, certains auteurs ayant, semble-t-il, confondus les premiers pour les seconds.

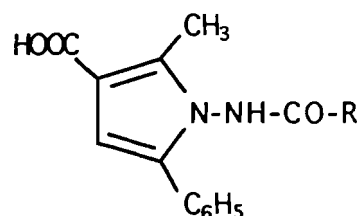
Ainsi avec l'acide α -phényl α -acétylacétique (I) (voir formules ci-dessous)) on n'obtiendrait pas l'acide 6-méthyl 3-phényl hydropyridazine carboxylique (II) mais l'acide 1-amido 2-méthyl 5-phényl pyrrole 3-carboxylique (III)



(I)



(II)

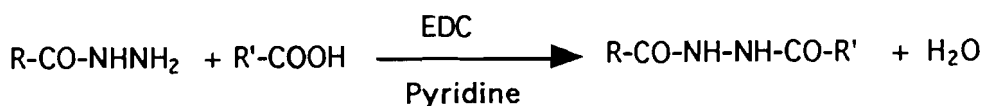


(III)

I-2 AUTRES REACTIONS

Parmi les autres réactions des hydrazides on peut citer :

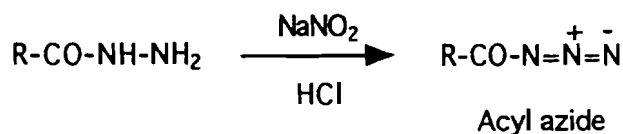
- la réaction avec les acides carboxyliques :



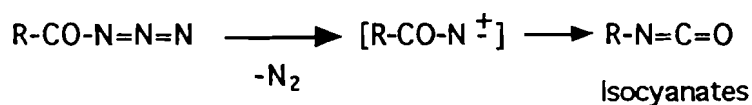
Cette réaction est réalisée en milieu aqueux en présence d'un agent de couplage comme le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC)

par exemple, qui est hydrosoluble. Elle est de plus en plus exploitée dans le domaine analytique [MIWA et coll., (1985); YAMAGUCHI et coll., (1990)].

- la réaction avec l'acide nitreux :

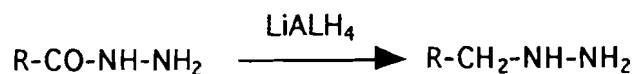


cette réaction s'effectue de la même manière qu'une diazotation des amines primaires. Les azides formés sont relativement instables et explosent à chaud. En milieu anhydre, les azides se décomposent avec perte d'azote en donnant des isocyanates :



En solution alcoolique ou aqueuse, on obtient respectivement des uréthanes ou l'urée.

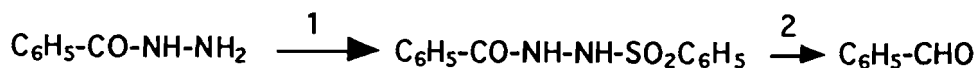
- la réaction avec les hydrures, on obtient l'amine correspondante :



- la réaction avec les sels de diazonium, on obtient des tétrazoles ou dans des conditions spéciales les azides.

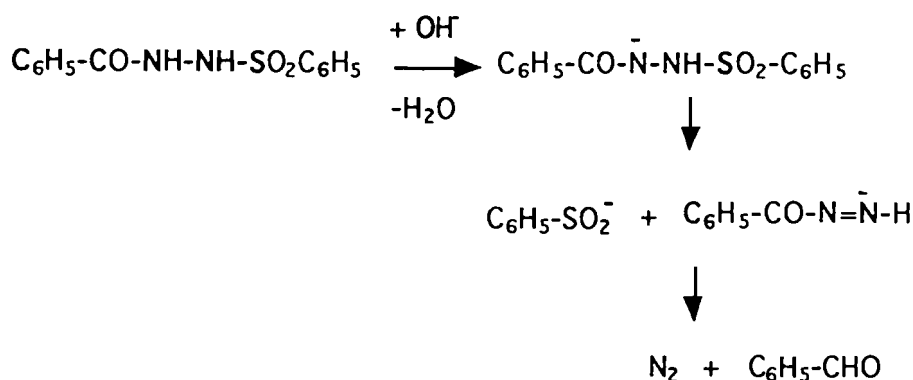
- la réaction avec le ferricyanure en solution ammoniacale, on obtient des aldéhydes. Cette réaction est couramment utilisée pour préparer les aldéhydes des séries du benzène, phénanthrène et quelques aldéhydes

hétérocycliques. Cependant, la méthode n'est pas applicable aux hydrazides des acides aliphatiques.

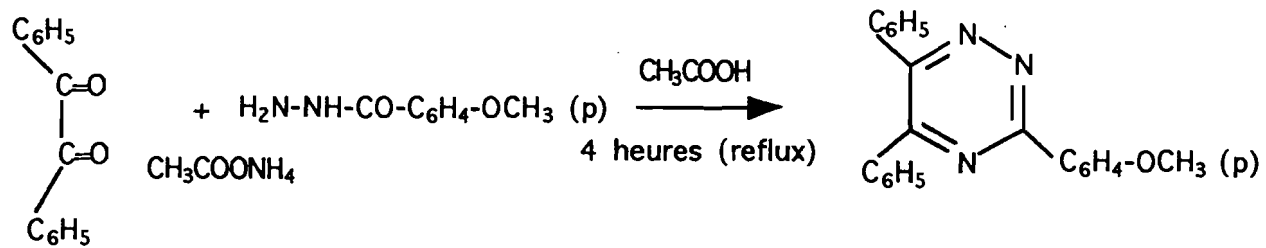


1 : en présence de $\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_2\text{Cl}$, pyridine, température 0°C pendant 2 heures

2 : en présence du glycérol, carbonate disodique, température 160°C pendant 75 secondes



- dans le domaine des cycles hexagonaux 1,2,4-trihétéroatomiques, quelques 1,2,4-triazines ont pu être obtenues en chauffant, en milieu acétique, des composés α -dicarbonylés avec des hydrazides et de l'acétate d'ammonium. La réaction suivante est un exemple de synthèse de la 3-(4-méthoxy phényl) 2,5-diphényl 1,2,4-triazine.



II. DETECTION SPECTROPHOTOMETRIQUE ET SPECTROFLUORIMETRIQUE DES COMPOSES CARBONYLES, NUCLEOSIDES ET NUCLEOTIDES EN CLHP APRES DERIVATION : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

L'analyse des composés carbonylés, nucléosides et nucléotides a connu au cours de ces dernières décennies un développement important. Son application dans différents domaines (biomédical, alimentaire, pharmaceutique, environnemental...) exige des méthodes analytiques de plus en plus performantes.

Actuellement, les méthodes chromatographiques constituent les techniques les plus utilisées. La chromatographie liquide sur couche mince et la chromatographie liquide sur papier sont utilisées depuis fort longtemps pour le dosage des composés carbonylés [AVIGAD (1977); PRAKASH and VIJAY (1983); GÜBITZ and WINTERSTEIGER (1984)]; elles sont certes spécifiques mais ne permettent qu'une détermination semi-quantitative. Cependant, avec l'avènement de la chromatographie liquide sur couche mince pressurisée (OPLC : Over Pressured Layer Chromatography) [SNINI et coll., (1992)], il est possible d'atteindre les sensibilités, sélectivités et précision des meilleures méthodes de séparation. La chromatographie en phase gazeuse est utilisée avec succès [OESTERHELT et coll., (1985); YASUHARA and SHIBAMOTO (1991)], quand on peut préparer des dérivés volatils de bonne stabilité thermique. Enfin, la chromatographie en phase liquide sur colonne représente de nos jours la technique la plus utilisée dans l'analyse des composés carbonylés. Son succès tient à sa grande sélectivité, à sa spécificité et à sa sensibilité. Avec cette technique, le choix et la composition de la phase mobile permettent d'optimiser le temps

d'analyse et la qualité de la séparation. La dérivation pré-colonne et post-colonne permet également d'améliorer la séparation et surtout la détection.

Ce dernier mode de chromatographie s'avère également une méthode de choix pour l'analyse des nucléosides et nucléotides. Dans ce cas l'emploi d'un contre ion dans les différents systèmes chromatographiques permet de résoudre de façon satisfaisante la séparation de ces composés et de leurs bases correspondantes [PERRONE et BROWN (1985); LAZZARINO et coll., (1991); BOOS (1991)].

Dans l'annexe IV-1 à IV-7 (pages 327-333) sont rassemblées les caractéristiques résumées de différentes techniques de chromatographie liquide avec dérivation pré-colonne appliquées à l'analyse de composés carbonylés, de nucléosides ou de nucléotides difficilement détectables, afin d'améliorer leur seuil de détection.

De ces tableaux se dégagent différents points :

- la diversité du réactif de dérivation mis en oeuvre
- le gain de sensibilité de la fluorescence et de la chimiluminescence par rapport à la détection directe en spectrophotométrie UV
- Les dérivations conduisent en général à un déplacement du maximum d'absorption des dérivés formés vers les grandes longueur d'onde où les interférences sont minimisées (absorption des solvants, des composés endogènes)
- amélioration de la sensibilité (les sensibilités ainsi que les limites de détection des molécules dérivées sont plus basses que celles des molécules non dérivées)

Cette grande diversification de méthodes d'analyse traduit bien la recherche tendant à améliorer la détection des aldéhydes, cétones, nucléosides et nucléotides en chromatographie liquide. Bien que les meilleures limites de détection soient obtenues par spectrofluorimétrie ou

par chimiluminescence, d'autres modes de détection comme la détection électrochimique [UENO et UMEDA (1991)] et la détection par spectrométrie de masse [OLSON et SWARIN (1985)] sont également utilisées mais avec très peu d'applications à notre connaissance.

Pour notre part, nous nous sommes proposés de développer l'application de nouveaux réactifs de dérivation pré-colonne (Luminarine 3, Luminarine 11 et Luminarine 12), actuellement disponibles dans le commerce, qui se prêtent à trois différents modes de détection : spectrophotométrie UV-visible, fluorimétrie et chimiluminescence.

Seule la détection fluorimétrique sera développée dans ce travail. La détection par chimiluminescence, qui semble apporter plus de sensibilité que la fluorimétrie, n'a pu être abordée. Il convient cependant de souligner que la plupart des phases mobiles utilisées ont été choisies pour permettre aussi la détection par chimiluminescence après excitation par la réaction du peroxyoxalate. En effet, comme l'a démontré TOD (1990), les luminarines par rapport aux autres réactifs de dérivation de la fonction carbonyle (dansylhydrazine par exemple) offrent la possibilité d'exciter les dérivés formés par chimiluminescence dans de nombreux solvants polaires ou apolaires.

Les paramètres de la dérivation pré-colonne seront décrits et optimisés en vue d'augmenter la sensibilité (par l'obtention d'un pic chromatographique important pour le dérivé formé) et la sélectivité par réduction du nombre des produits secondaires.

La méthodologie de travail, ainsi que les résultats, discussion et conclusion seront abordés dans le chapitre suivant.

III. TRAVAUX PERSONNELS

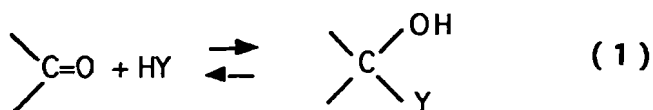
III-1 ETUDE DE LA DERIVATION

Lorsqu'une espèce chimique réactive, présentant une affinité pour les électrons ou pour les noyaux s'approche d'une molécule considérée comme substrat, le déclenchement de la réaction chimique sera conditionné par l'aptitude du substrat à se polariser dans les conditions données, à un degré suffisant, et dans le sens exigé par le réactif.

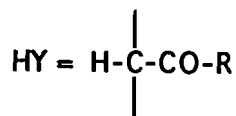
La différence entre les électronégativités de l'oxygène et du carbone, d'une part, et la mobilité des électrons π , d'autre part, font que le groupe carbonyle est fortement polarisé. Cette polarité jointe à la grande polarisabilité de la liaison π est à l'origine de l'ensemble des réactions dites "hétérolytiques" dont la fonction carbonyle est le siège. Le sens de la polarisation du groupe C=O est indépendant de la nature des substituants portés sur le carbone, de sorte que l'orientation de l'addition des réactifs polaires sur la double liaison carbone-oxygène est toujours la même : le pôle négatif du réactif se fixe sur le carbone (centre électrophile) et le pôle positif du réactif sur l'oxygène (centre nucléophile).

Un grand nombre de réactions, impliquant le groupement carbonyle, sont catalysées soit par les acides, soit par les bases, soit par les deux espèces à la fois. Ces réactions appartiennent à trois groupes, à savoir :

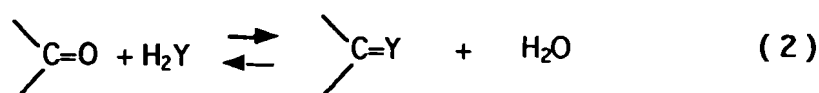
- les réactions d'addition correspondant au schéma général suivant :



dont un exemple typique est l'aldolisation :

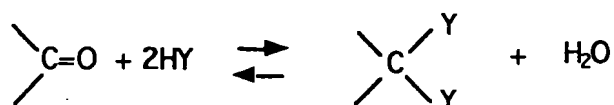


- les réactions de condensation du type :

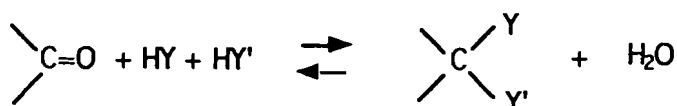


par exemple, la réaction de formation des hydrazones ($\text{H}_2\text{Y} = \text{H}_2\text{N}-\text{NH}-\text{CO}-\text{R}$)

- les réactions de condensation aboutissant au remplacement de l'oxygène par deux groupements monovalents :



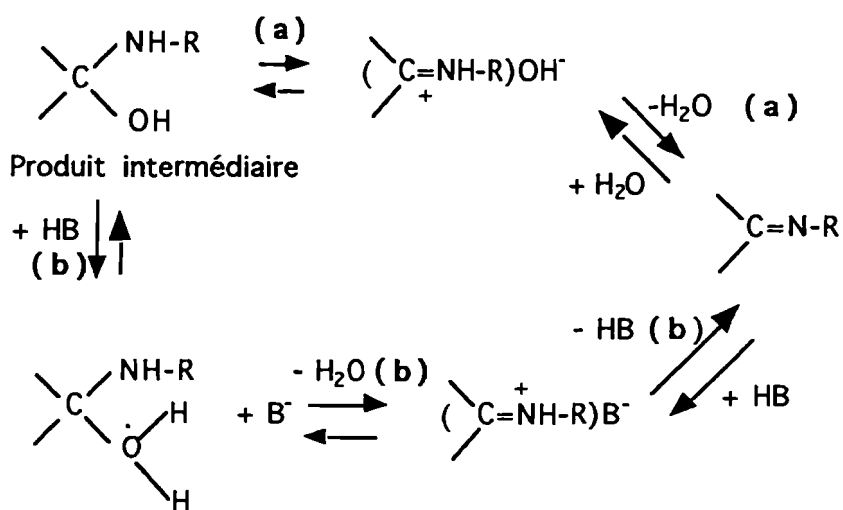
ou



par exemple, la formation d'acétals ($\text{HY} = \text{H}-\text{OR}$).

Dans ce travail, nous nous intéresserons uniquement aux deux premiers groupes de réactions pré-cités. Les premiers étant appliqués à la dérivation des nucléosides et nucléotides; les seconds à la dérivation des aldéhydes et cétones d'une manière générale.

Du point de vue de leurs mécanismes, les réactions du second groupe se distinguent de celles du premier groupe uniquement par les derniers stades, ceux qui concernent l'élimination d'une molécule d'eau. Ainsi, la formation d'une hydrazone par réaction d'un aldéhyde ou d'une cétone avec la Lu.3, Lu.11 ou Lu.12 résulte de la déshydratation d'un produit intermédiaire provenant de la réaction d'addition de ces réactifs sur la double liaison de la fonction carbonyle. On suppose que cette déshydratation peut s'effectuer, selon le schéma suivant, soit par la voie (a), soit par la voie (b) :

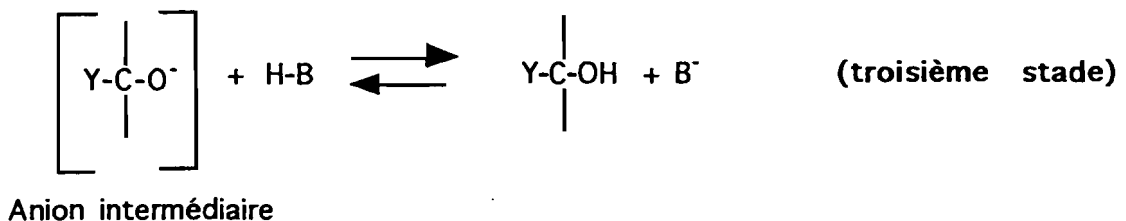
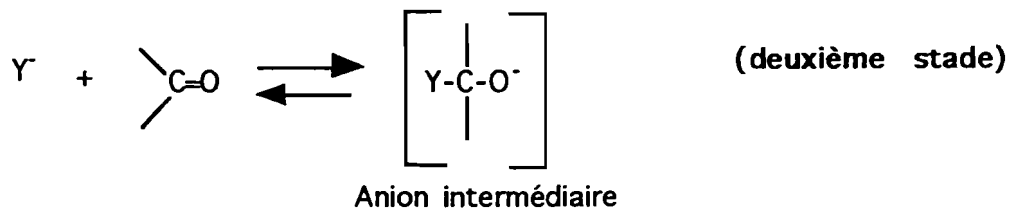


B = base/ HB = acide conjugué correspondant

Toutes ces réactions, lorsqu'elles se déroulent dans un solvant hydroxylé, comportent toujours les mêmes transferts de protons et d'électrons. Seul l'ordre de succession de ces transferts varie suivant qu'il s'agit d'une catalyse par les bases ou par les acides. Rappelons cependant, que les effets catalytiques des acides et des bases sont liés à leurs propriétés électroniques (affinité pour les électrons des premiers et pour les noyaux des seconds).

- Catalyse basique

Le rôle du catalyseur basique (B) consiste à transformer la molécule HY, lorsque celle-ci est constituée par un acide faible, en un anion (Y^-) plus nucléophile (premier stade). Dans un deuxième stade, l'anion Y^- attaque le carbone électrophile de la fonction carbonyle et conduit ainsi à un anion intermédiaire (carbanion). Puis, dans un troisième et dernier stade, le produit de la réaction (produit intermédiaire) résulte d'un second transfert de proton, avec régénération simultanée du catalyseur.



Tous ces stades, de part leur nature, sont réversibles; de ce fait, la réaction globale est un équilibre.

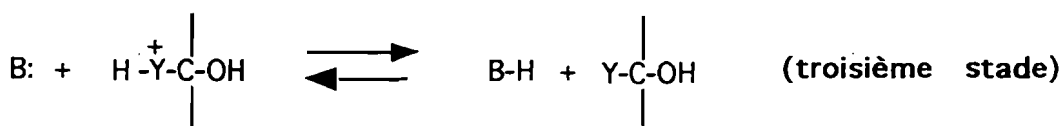
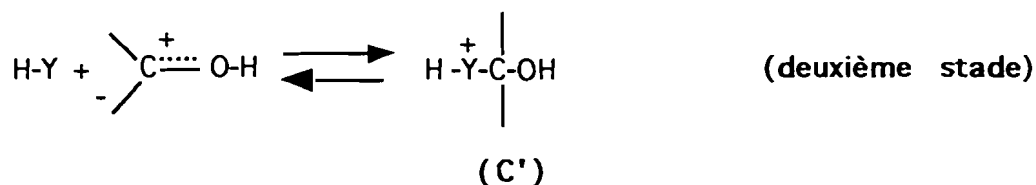
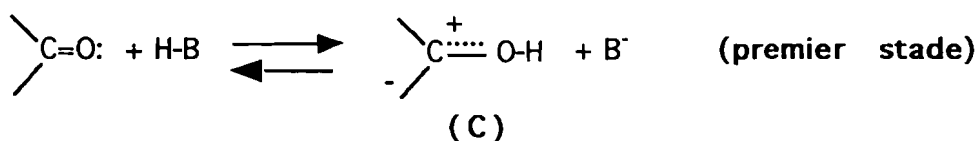
Compte tenu de l'équation cinétique de cette réaction

$$v = k (HY) \left(\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C=O} \\ \diagdown \end{array} \right)$$

et du fait que le troisième stade est certainement rapide, puisqu'il s'agit d'un simple équilibre acide-base, il devient évident que le stade limitant est le second, c'est à dire celui correspondant à l'attaque du carbonyle par l'anion nucléophile.

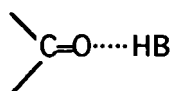
- Catalyse acide

Dans le cas de la catalyse acide, la grandeur de la charge positive du carbone du carbonyle est un des facteurs importants dont dépend la réactivité électrophile de cet atome.



Le transfert protonique qui constitue le premier stade de la catalyse acide a pour effet d'augmenter cette réactivité, puisque l'oxygène à l'état d'oxonium est plus attracteur d'électrons que l'oxygène neutre.

Il faut noter à ce sujet, que l'activation de la fonction carbonyle ne nécessite pas obligatoirement un tel transfert de proton, mais peut résulter de la formation entre l'acide et le composé carbonylé d'un complexe d'association, assuré par une liaison hydrogène :



L'étude de la cinétique permet de faire la distinction entre ces deux processus d'activation. Dans le premier cas, la constance de vitesse de la réaction d'addition ne dépend pas directement de la nature de l'acide HB mis en jeu ni de sa concentration mais dépend uniquement du pH du milieu réactionnel. Un tel mode d'activation s'appelle catalyse spécifique puisqu'elle est due aux ions H_3O^+ , alors que l'activation par l'intermédiaire d'un complexe d'association se nomme catalyse générale. Ce dernier mode d'activation se manifeste notamment par le fait que la constante de vitesse dépend non seulement du pH mais aussi de la nature et de la concentration de l'acide HB qui joue le rôle de catalyseur [FELKIN (1956)]

Dans un deuxième stade, le cation intermédiaire (C) se combine avec une molécule du réactif HY et conduit à un nouveau cation intermédiaire (C'). La transformation de celui-ci en produit final de la réaction résulte d'un deuxième transfert de proton aboutissant en même temps à la régénération du catalyseur (troisième stade).

L'équation de vitesse de la catalyse acide est la même que celle de la catalyse basique. Il s'ensuit que le stade lent de ce mécanisme correspond à l'attaque du carbone électrophile par le réactif HY (deuxième stade).

Etant donné qu'en milieu acide l'entité réactive intervenant au cours de l'étape limitante est constituée par les molécules HY et non pas par les anions Y^- , il est évident que la catalyse acide sera ainsi inopérante si ces molécules sont dénuées d'aptitude nucléophile. Ainsi, l'addition de toutes les molécules, même faiblement nucléophiles, est catalysée par les acides.

C'est donc cette catalyse acide qui sera utilisée tout au long de ce travail, pour permettre la dérivation des aldéhydes, cétones, nucléosides et nucléotides avec les luminarines-hydrazides.

Pour appliquer cette catalyse acide, il faut définir les paramètres qui jouent un rôle important dans la dérivation : la température, la durée de dérivation et le rapport molaire substrat/réactif.

Il est incontestable que le solvant joue aussi un rôle important dans la majorité des réactions de dérivation. Comme il est utilisé en large excès, sa participation dans la réaction ne peut être estimée par une étude classique de la cinétique.

En effet, notre étude sur la dérivation des composés carbonylés par les luminarines hydrazides fait apparaître que les vitesses des réactions peuvent varier considérablement en fonction de la nature du solvant. Ainsi, à la température du laboratoire, la formation du dérivé Lu.3 - acétylacétone est environ 10 fois plus importante dans l'eau que dans l'éthanol ou le méthanol, et quasiment nulle (absence de pic du dérivé Lu.3 - acétylacétone) dans le toluène en milieu acide acétique. L'influence du solvant est telle qu'on pourrait rapprocher son rôle de celui d'un catalyseur ou d'un anti-catalyseur. L'influence particulièrement grande du solvant sur les réactions de dérivation des aldéhydes, cétones, nucléosides et nucléotides par les luminarines hydrazides constitue un des aspects importants de l'étude de la dérivation. Malheureusement, il n'existe que peu de données sur le rôle du solvant sur ces réactions. On suppose cependant que c'est le caractère polaire de ces réactions, caractère impliquant la création ou la disparition de charges au cours de la transformation chimique, qui est à l'origine de cette participation. En effet, la solvation, c'est à dire l'association des espèces en solution avec les molécules du solvant, peut atteindre des degrés très élevés lorsque ces espèces sont des

dipôles ou des ions. De plus, la solvataion des particules chargées pouvant être due, soit à des forces électrostatiques, soit à des liaisons hydrogène, est caractérisée par une énergie qui varie de façon considérable en fonction de la nature du solvant.

Une des conséquence de la solvataion est l'orientation des molécules du solvant polaire autour des particules comportant une charge électrique. La stabilisation des ions par solvataion résulte du fait qu'en orientant les molécules du solvant, les ions accomplissent un travail électrostatique. Or, l'accomplissement d'un travail correspond à une perte d'énergie interne, c'est à dire à une stabilisation du système qui accomplit le travail. Plus cette stabilisation sera grande, plus grande sera l'énergie de solvataion.

L'énergie de solvataion dépend de trois facteurs qui sont la grandeur de la charge, son degré de localisation et la polarité du solvant. Pour un solvant donné, l'énergie de solvataion sera d'autant plus grande que la charge globale de la molécule sera élevée.

Ainsi, la plus ou moins grande solvataion, soit des réactants, soit des produits intermédiaires ou des produits finaux, peut être selon les cas plus ou moins favorable pour une réaction donnée.

En ce qui nous concerne, les conditions optimales de dérivation par addition et condensation seront déterminées, sur le malonaldéhyde, l'acétylacétone, la cytidine 5-monophosphate et l'adénosine 5-monophosphate, et appliquées à divers aldéhydes, cétones, nucléosides et nucléotides.

De plus pour la cytidine, nous envisageons également la réaction de condensation des bases pyrimidiniques avec les luminarines hydrazides, par transamination.

Pour cela, nous avons entrepris l'optimisation de chacun des paramètres suivants étudiés séparément :

- étude de la dérivation en fonction de la température avec les valeurs de durée (temps de réaction) et rapport molaire (composés à dériver/réactif) fixées initialement, ce qui permet d'avoir la température optimale.
- étude de la dérivation en fonction de la durée avec les valeurs de température et rapport molaire fixes (température optimale et rapport molaire initial).
- étude de la dérivation en fonction du rapport molaire (composés à dériver/réactif) avec les valeurs de température et de durée fixes (température optimale et durée optimale).

Nous avons optimisé la température en faisant varier ce paramètre de 25°C à 50°C ± 2°C dans un bain-marie classique. Les dérivations en milieu aqueux aux températures supérieures à 50°C n'ont pas été tentées en raison de la dégradation du réactif et des dérivés formés à partir de cette température seuil (formation du dérivé acide correspondant de la luminarine hydrazide utilisée). Comme la température de 25°C a été finalement adoptée, toutes les réactions ont été effectuées à la température du laboratoire, exceptées celles qui nécessitent des conditions particulières (condensation des bases pyrimidiniques des acides nucléiques avec la Lu 3, par transamination).

En général, la durée de la dérivation s'échelonne entre 15 et 420 minutes. Des valeurs supérieures (12 à 24 heures) ont été essayées, dans le but de vérifier la stabilité des dérivés formés dans le milieu réactionnel. Elles sont incompatibles avec la mise en oeuvre d'un dosage de routine. Un temps de contact de 30 à 240 minutes a été souvent nécessaire néanmoins.

Les variations du rapport molaire ont été étudiées entre 1/25 et 1/500. A l'exception de la Lu.12, une forte concentration de Lu.3 ou de Lu.11 ($> 5 \times 10^{-3}$ M) dans le milieu réactionnel (milieu aqueux acide) provoque la formation d'un précipité. Nous n'avons pu observer aucune

différence entre les différents rapports molaires utilisés à partir du rapport 1/50. Le choix du rapport molaire optimal a été surtout conditionné par l'aspect du chromatogramme. Les paramètres optimaux de dérivation obtenus au cours de cette étude, appliqués au malonaldéhyde, l'acétylacétone, la cytidine, la cytidine 5-monophosphate (CMP) et l'adénosine 5-monophosphate (AMP), devraient être facilement adaptés à d'autres composés carbonylés, nucléosides et nucléotides de nature chimique différente.

Les résultats de ces travaux ont été présentés dans leur grande majorité dans les quatre articles suivants : le premier publié dans la revue *Chromatographia* intitulé "**Determination of picomole amounts of carbonyls as luminarin hydrazones by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection**", le deuxième publié dans la revue *Analytica Chimica Acta* intitulé "**1H, 5H,11H-[1] Benzopyrano [6,7,8-ij] quinolizine-9-acetic acid 2,3,6,7-tetrahydro-11-oxohydrazide fluorogenic reagent for liquid chromatographic determination of aldehydes and ketones**", le troisième publié dans la revue *Journal of Chromatography* intitulé "**Determination of malonaldehyde by coupled high-performance liquid chromatography-spectrofluorimetry after derivatization with luminarin 3**" et le quatrième sous presse dans la revue *Analytica Chimica Acta* intitulé "**Luminarin 3 as a derivatization reagent for the liquid chromatographic determination of cytidine, adenosine and related nucleotides with fluorimetric detection**".

Les valeurs des paramètres de dérivation qui ont été décrits sont celles qui dans tous les cas ont permis une analyse chromatographique des dérivés formés jugée satisfaisante. A titre d'exemple, les chromatogrammes suivants (Figure 12-18) correspondent à la séparation de quelques

composés carbonylés. Les quantités détectables sont de l'ordre de dizaines de femtomoles à la picomole pour les composés analysés.

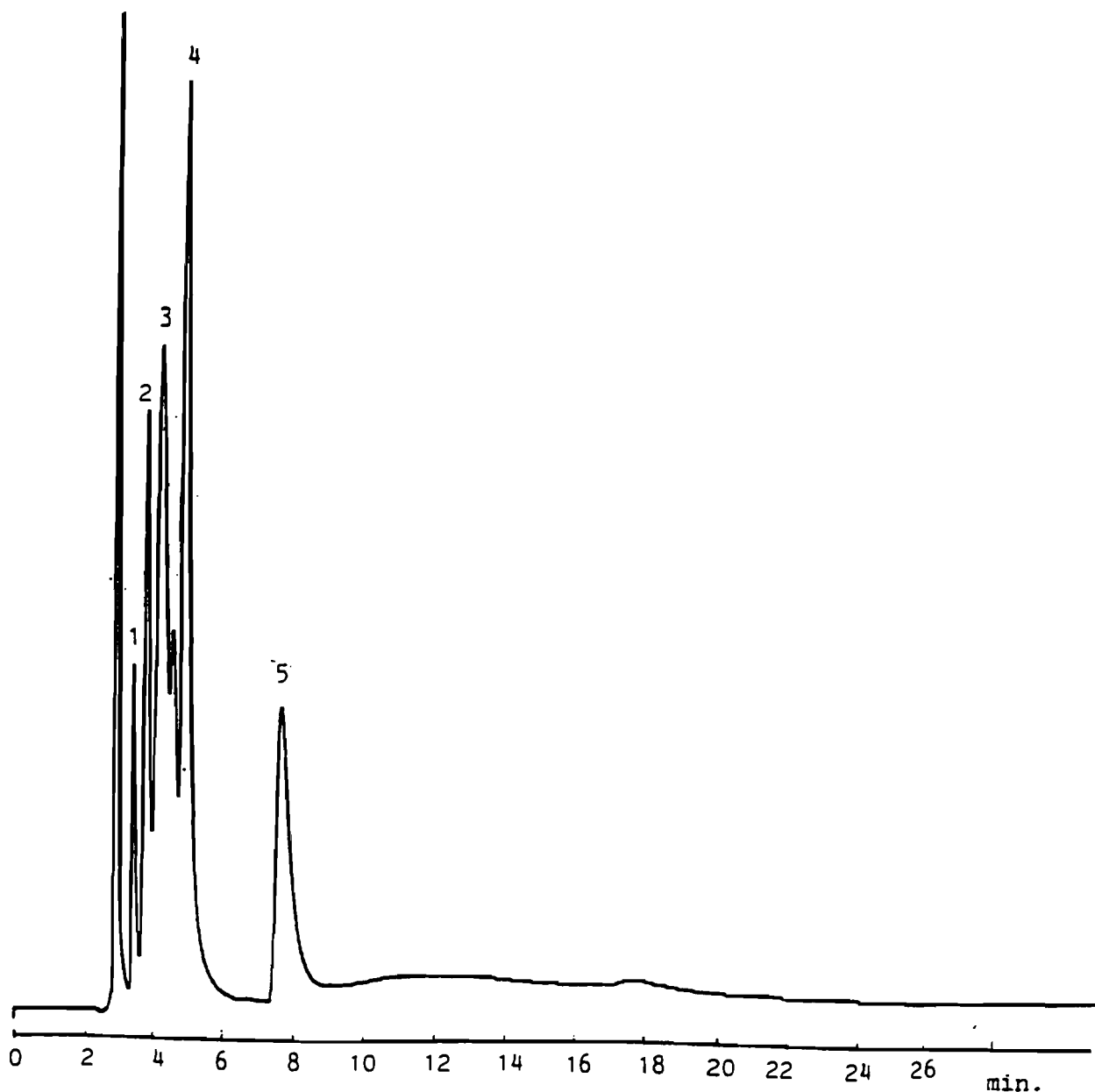


Figure 12 : Séparation des dérivés aldéhydiques et cétoniques de la luminarine 3 avec détection fluorimétrique.

Colonne : Nucleosil-5 μm , silice vierge

Phase mobile : Acétate d'éthyle/diisopropyléther
(90/10, v/v)

Débit : 1,5 ml/min

Détection fluorimétrique : λ_{ex} 389 nm; λ_{em} 445 nm

Composés : 1 = diacétyl; 2 = furfural; 3 = acroléine;
4 = méthylmalonaldéhyde;
5 = malonaldéhyde

Quantités injectées comprises entre 6,25 et 31,25
 μmoles

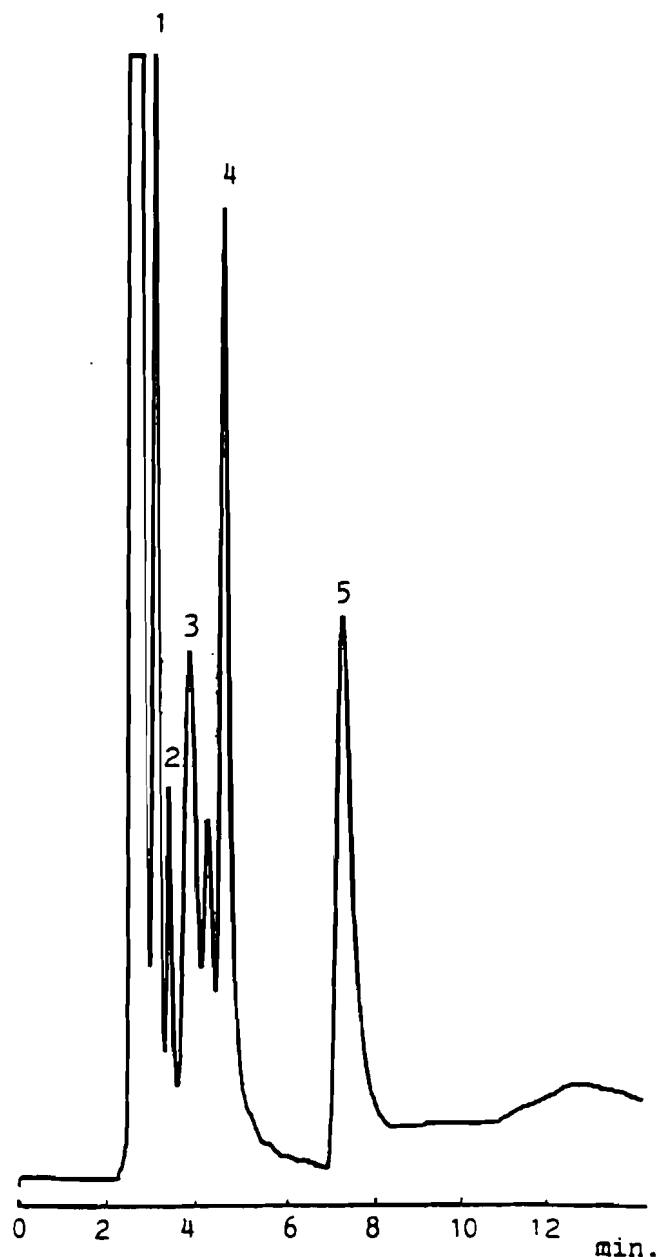


Figure 13 : Séparation des dérivés aldéhydiques et cétoniques de la luminarine 3 avec détection fluorimétrique.

Colonne : Nucleosil-5 μm , silice vierge

Phase mobile : Acétate d'éthyle/diisopropyléther
(90/10, v/v)

Débit : 1,5 ml/min

Détection fluorimétrique : λ_{ex} 389 nm; λ_{em} 445 nm

Composés : 1 = acétylacétone; 2 = furfural;

3 = acroléine; 4 = méthylmalonaldéhyde;

5 = malonaldéhyde

Quantités injectées comprises entre 3,125 et 46,88

pmoles

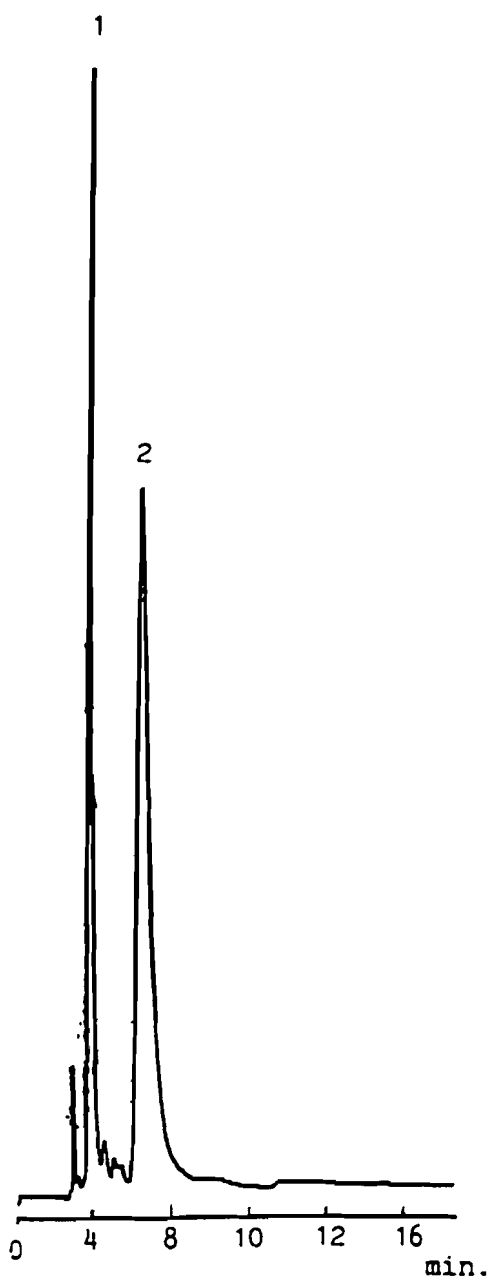


Figure 14 : Séparation des dérivés aldéhydiques et cétoniques de la luminarine 3 avec détection fluorimétrique.

Colonne : Nucleosil-5 μm , silice vierge

Phase mobile : Acétate d'éthyle/diisopropyléther
(90/10, v/v)

Débit : 1,5 ml/min

Détection fluorimétrique : λ_{ex} 389 nm; λ_{em} 445 nm

Composés : 1 = Furfural; 2 = hydroxyméthylfurfural

Quantités injectées comprises entre 12,5 et 31,25
pmoles

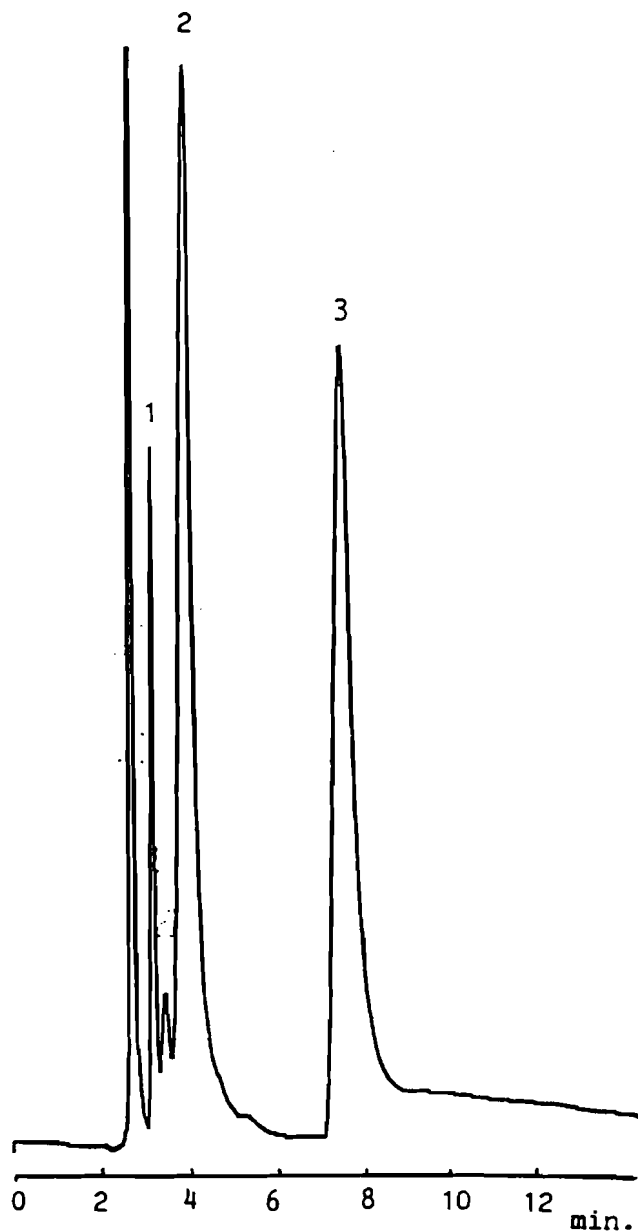


Figure 15 : Séparation des dérivés aldéhydiques et cétoniques de la luminarine 3 avec détection fluorimétrique.

Colonne : Nucleosil-5 μm , silice vierge

Phase mobile : Acétate d'éthyle/diisopropyléther
(90/10, v/v)

Débit : 1,5 ml/min

Détection fluorimétrique : λ_{ex} 389 nm; λ_{em} 445 nm

Composés : 1 = diacétyl; 3 = acroléine;
5 = malonaldéhyde

Quantités injectées comprises entre 4,75 et 6,25
pmoles

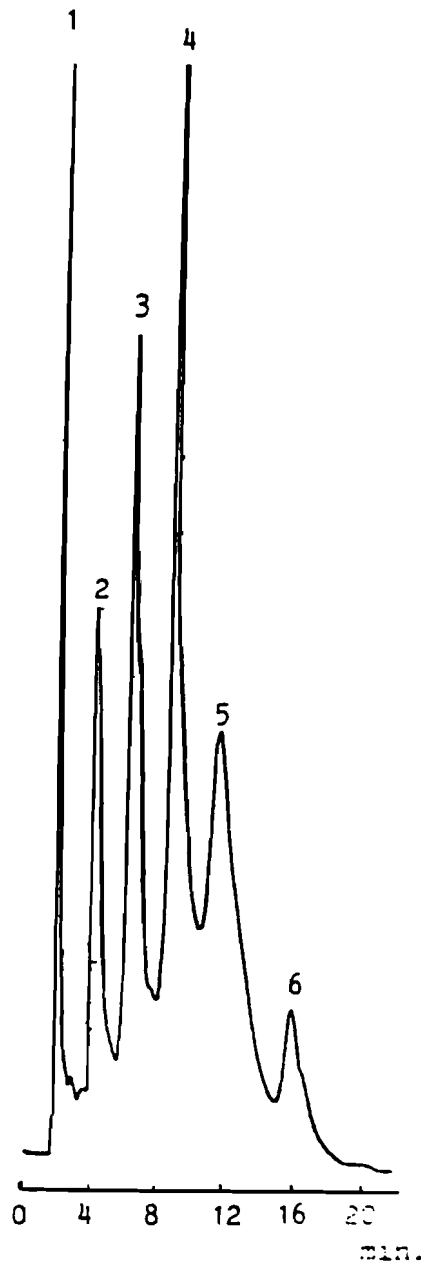


Figure 16 : Séparation des dérivés aldéhydiques et cétoniques de la luminarine 3 avec détection fluorimétrique.

Colonne : Nucleosil-5 μm , C-18

Phase mobile : Acétonitrile/tampon imidazole nitrate
0,01 M, pH 7,5 (40/60, v/v)

Débit : 1,5 ml/min

Détection fluorimétrique : λ_{ex} 399 nm; λ_{em} 485 nm

Composés : 1 = luminarine 3 acide; 2 = luminarine 3;
3 = malonaldéhyde; 4 = succinaldéhyde;
5 = furfural; 6 = acétoacétaldéhyde

Quantités injectées comprises entre 39 et 95 pmoles

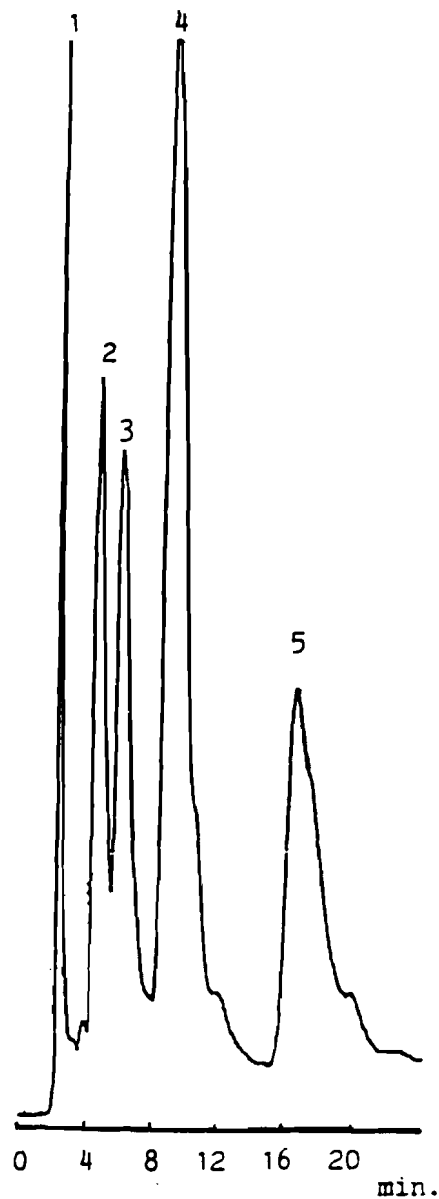


Figure 17 : Séparation des dérivés aldéhydiques et cétoniques de la luminarine 3 avec détection fluorimétrique.

Colonne : Nucleosil-5 μm , C-18

Phase mobile : Acétonitrile/tampon imidazole nitrate
0,01 M, pH 7,5 (40/60, v/v)

Débit : 1,5 ml/min

Détection fluorimétrique : λ_{ex} 399 nm; λ_{em} 485 nm

Composés : 1 = luminarine 3 acide; 2 = luminarine 3;

3 = hydroxyméthylfurfural;

4 = méthylmalonaldéhyde;

5 = acétylacétone

Quantités injectées comprises entre 39 et 78 pmoles

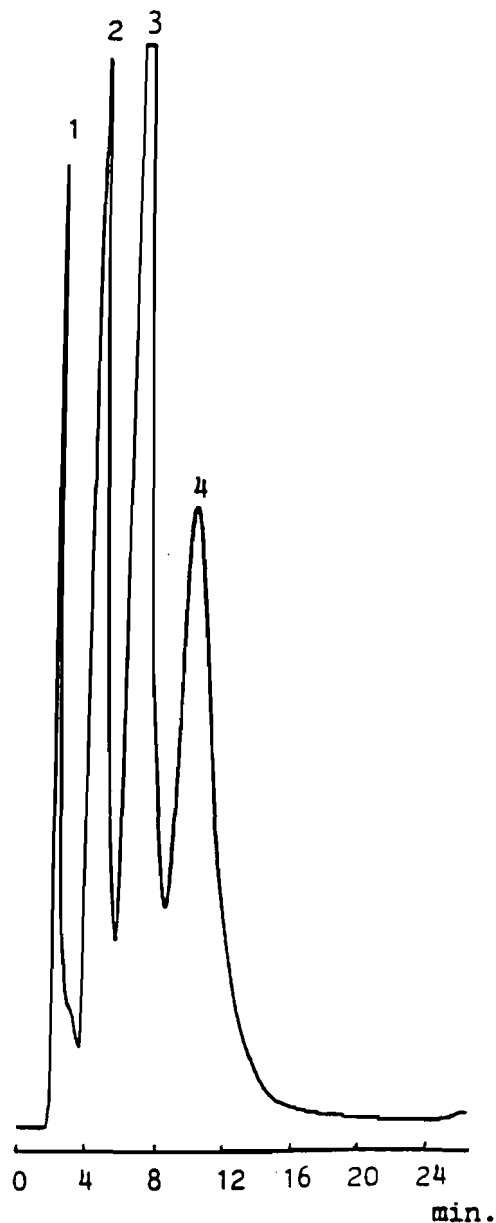


Figure 18 : Séparation des dérivés aldéhydiques et cétoniques de la luminarine 3 avec détection fluorimétrique.

Colonne : Nucleosil-5 μm , C-18

Phase mobile : Acétonitrile/tampon imidazole nitrate
0,01 M, pH 7,5 (40/60, v/v)

Débit : 1,5 ml/min

Détection fluorimétrique : λ_{ex} 399 nm; λ_{em} 485 nm

Composés : 1 = luminarine 3 acide; 2 = luminarine 3;
3 = malonaldéhyde; 4 = acroléine;

Quantités injectées comprises entre 39 et 78 pmoles

III-2 ANALYSE STRUCTURALE DES DERIVES DE LA LUMINARINE 3, LUMINARINE 11 ET LUMINARINE 12

Cette étude avait pour but de vérifier que la substitution sur les composés à dériver s'effectue convenablement dans les conditions de dérivation que nous avons retenues, conditions beaucoup moins sévères que celles de la plupart des réactions proposées dans la littérature (température du laboratoire, faible quantité de réactif) et milieu réactionnel différent (eau au lieu de l'éthanol ou du méthanol).

Elle a comportée essentiellement le recours à la spectrométrie de masse (ionisation chimique, impact électronique, couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse (thermospray), le FAB (Fast Atomic Bombardment)) et à la RMN (200 MHz) afin de déterminer les masses moléculaires des hydrazones formés, pour en vérifier le degré de substitution et en confirmer la structure. Les résultats obtenus sont présentés dans l'annexe I-4 (pages 299-308) et dans les articles 2 à 5 présentés ci-après.

III-3 ARTICLE 2**"Determination of picomole amounts of carbonyls as luminarin hydrazones by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection"**

Chromatographia, (1993), 36 , 96-104.

L'idée qui consiste à modifier une molécule pour l'adapter à un système d'analyse n'est pas nouvelle. Elle a été appliquée aux composés possédant dans leur structure un groupement fonctionnel carbonyle à des fins analytiques.

Le dosage des composés carbonylés, en chromatographie liquide, après dérivation avec une luminarine permet d'améliorer la sensibilité de leur détection et ainsi que la qualité de leur séparation chromatographique.

Dans un premier temps l'étude a porté sur la comparaison des trois luminarines hydrazides (Lu.3, Lu.11 et Lu.12). Le choix du meilleur réactif de dérivation a été fonction de sa réactivité propre, les caractéristiques fluorimétriques dans les solvants les plus couramment utilisés en CLHP, de sa stabilité, polarité et solubilité. En raison de leur structure et des résultats des effets de solvants sur leur propriétés d'absorbance et de fluorescence (voir première partie), les possibilités d'utilisation de deux systèmes chromatographiques (phase normale sur silice vierge et polarité de phase inversée sur silice greffée octadécylsilane) seront décrites. Par ordre de décroissance de polarité, les réactifs peuvent être classés comme suit : Lu.12, Lu.3 et Lu.11. Pour les dérivés de la Lu.12 qui sont caractérisés par leur plus grande polarité, nous avons utilisé seulement le système chromatographique en polarité de phase inversée. Cependant, la phase mobile a été choisie dans le but d'obtenir une bonne résolution et la meilleure sensibilité possible. Pour la chromatographie liquide en phase

normale, l'acétate d'éthyle et le diisopropyléther ont été choisis, alors que, pour la chromatographie liquide en polarité de phases inversée, le mélange acétonitrile - eau ou tampon imidazole nitrate a été souvent préféré. La Lu.12, à l'inverse des luminarines 3 et 11, s'est révélée la plus intéressante du point de vue de la réactivité. La Lu 12 serait donc le réactif le plus nucléophile, probablement à cause de son fort caractère basique (pouvoir accepteur de proton) et de sa polarisabilité (voir chapitre III de la première partie). Elle a cependant le désavantage de donner des dérivés moins stables dans le milieu réactionnel utilisé (solution d'acide sulfurique 0,1 M) que les deux autres. La stabilité des dérivés de Lu.3 et Lu.11 dans ce même milieu a été par contre satisfaisante, avec la meilleure stabilité pour les dérivés de la Lu.11. Ce dernier réactif offre en outre des rendements quantiques et des sensibilités intrinsèques de fluorescence supérieurs. Malheureusement, la Lu.11 est le réactif qui réagit le moins vite sur la fonction carbonyle.

Compte tenu de ces observations, la Lu.3 a été choisie comme le réactif présentant le meilleur compromis. Nous présentons donc ici son emploi pour le dosage du 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) dans le jus d'orange concentré et pasteurisé.

On sait en effet, depuis longtemps que des dérivés furfuraliques se forment au cours de la dégradation des sucres, par la chaleur, en milieu acide. L'analyse du 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) et du furfural (FUR) est donc un indicateur important du degré de détérioration des denrées alimentaires au cours de leur préparation (concentration, pasteurisation) ou de leur stockage.

Différents dosages de HMF et FUR sont d'ailleurs décrits dans la littérature : dans les jus d'orange [MARCY et ROUSEFF (1984); MIJARES et coll., (1986); GOMIS et coll., (1991); MANSILLA et coll., (1992)], jus de citron

[DINSMORE et NAGY (1974); LEE et coll., (1986); LI et coll., (1988)] jus d'ananas [CILLIERS et VAN NIEKERK (1984)], jus de tomate [KIN et RICHARDSON (1992)], lait [MORALES et coll., (1992)], miel et spiritueux [WHITE (1979a et 1979b); JEURING et KUPPERS (1980)], solution de caramel [ALFONSO et coll., (1980)]. Ces méthodes font en général appel à la détection spectrophotométrique avec ou sans dérivation préalable.

Dans cette étude, le dosage du 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) a été possible en utilisant une détection fluorimétrique après chromatographie liquide en phase normale. La limite de détection est de 294 femtomoles injectés, mais seulement des quantités supérieures à 65 picomoles de HMF ont pu être dérivés. Ainsi, le facteur limitant de la méthode a été non pas la détection, mais la dérivation. La reproductibilité a été respectivement de 12,8% et 2,6% pour 0,1 nmole et 1 nmole de HMF. Ces résultats montrent que cette méthode est suffisamment sensible pour la détermination de HMF dans les jus d'orange concentré et pasteurisé.

Determination of Picomole Amounts of Carbonyls as Luminarin Hydrazones by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection

F. Traoré^{1*} / G. A. Pianetti¹ / L. Dallery² / M. Tod¹ / J. Chalom³ / R. Farinotti¹ / G. Mahuzier¹

¹Laboratoire de Chimie Analytique II, Faculté de Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Paris-Sud, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92290 Chatenay-Malabry, France

²Laboratoire d'Analyses Physico-Chimiques, Conservatoire National des Arts et Métiers, 292 rue Saint-Martin, 75141 Paris Cedex 03, France

³Eurobio, Zone Artisanale de Courtaboeuf, 7 avenue de Scandinavie, 91953 Les Ulis, France

Key Words

Column liquid chromatography
Carbonyl compounds
Luminarin hydrazides
Fluorescence detection

Summary

Fluorogenic reagents (luminarin 3, luminarin 11 and luminarin 12), having a quinolizinocoumarin moiety as fluorophore and a carboxylic acid hydrazide function as reacting group, have been developed. These reagents were found to be highly sensitive fluorescence derivatization reagents for aldehydes and ketones in high-performance liquid chromatography. The reagents readily react with carbonyl compounds in aqueous sulphuric acid solution (0.1 M) at room temperature to produce the corresponding hydrazone derivatives, which can be separated on both reversed or normal-phase column. The structures of the derivatives were studied, together with their properties in reversed and normal-phase chromatographic systems. UV absorbance, corrected fluorescence spectral data and quantum yields of luminarin 3, luminarin 11 and luminarin 12 are presented. The detection limits (signal to noise ratio = 3) for aldehydes and ketones were in the sub-pmol range. Luminarin 3 was also applied to the determination of hydroxymethylfurfural (HMF) in orange juices and concentrates. The method for HMF involves the solid-liquid extraction of the juice by using a C-18 cartridge prior to derivatization and normal-phase separation of the derivative with fluorimetric detection at 387 nm ex., 444 nm em. The calibration curve was linear for amounts of HMF ranging from 0.1 to 10 nmol. Intra-run relative standard deviation was 12.8 % for 0.1 nmol and 2.6 % for 1 nmol. Recovery studies indicated an average of 98.7 ± 1.9 % for juice concentrate and 99.8 ± 3.2 % for pasteurized juice.

Introduction

High-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection is useful for the determination of trace amounts of carbonyl compounds.

Considerable effort, therefore, has recently been directed to the development of various sensitive and selective pre-column derivatization reagents having a fluorophore [1-5].

In a previous paper we described the development of luminarin 3, which is a labelling reagent derived from quinolizinocoumarin [6]. This nucleus offers the advantage of high fluorescence and chemiluminescence yields in various solvents [6-10], which results in a low limit of detection (LOD) in normal- or reversed-phase chromatography.

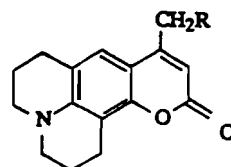
In order to study the feasibility of using arylhydrazides having a quinolizinocoumarin skeleton, such as luminarin 3 (reagent I, Table I), for the sensitive detection of aldehydes and ketones, two analogous compounds, luminarin 11 (reagent II) and luminarin 12 (reagent III) have been synthesized. Their physicochemical properties, fluorescence characteristics and reactivities towards aldehydes and ketones were examined as part of a survey of effective fluorescence derivatization reagents for carbonyl compounds. It was found that the reagent readily react with carbonyl compounds in aqueous solution at room temperature to produce highly fluorescent luminarin hydrazones or derivatives. The liquid chromatographic detection of these derivatives was investigated. β -dicarbonyls were studied as model compounds, and the derivatization reaction was also applied to the determination of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in orange juice and concentrates.

Experimental

Materials and Reagents

All chemicals were of analytical-reagent grade. Acetylacetone (AcAc) was purchased from Sigma (St. Louis,

Table I. Reagent and product structures



	Luminarin 3	Luminarin 11	Luminarin 12
Malonaldehyde derivatives	I: R = CONHNH ₂ IV: R = CO-N	II: R = (CH ₂) ₃ CONHNH ₂ VII: R = (CH ₂) ₃ CO-N	III: R = O(CH ₂ CH ₂ O) ₂ CH ₂ CONHNH ₂ IX: R = O(CH ₂ CH ₂ O) ₂ CH ₂ CO-N
Acetylacetonone derivatives	V: R = CONHN=C(CH ₃)CH ₂ COCH ₃ VI: R = CO-N	VIII: R = (CH ₂) ₃ CO-N	X: R = O(CH ₂ CH ₂ O) ₂ CH ₂ CO-N
Corresponding acids	XI: R = COOH	XII: R = (CH ₂) ₃ COOH	XIII: R = O(CH ₂ CH ₂ O) ₂ CH ₂ COOH

MO, USA), imidazole and 1,1,3,3-tetraethoxypropane from Aldrich-Chemie (Steinheim, Germany). Malonaldehyde (MDA) was prepared as described previously [6] by hydrolysis of 1,1,3,3-tetraethoxypropane in aqueous 1 % sulphuric acid.

1 mM standard solutions of AcAc and MDA in 1 % sulphuric acid were prepared fresh on the day of use. HMF was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Standard solutions of HMF were prepared by dissolution in water. Reagents I, II, and III were purchased from Eurobio (Les Ulis, France). Stock solutions of the luminarins were prepared in dimethylsulfoxide and diluted with the same solvent to the required concentrations. The solvents (HPLC and fluorimetric grade), were obtained from FSA Laboratory Supplies /UK). Extraction cartridges were Extrasep C₁₈ (500 mg, 2.8 ml) from Interchim (Montluçon, France).

Apparatus

Corrected fluorescence and absorbance spectra were measured with a Perkin Elmer Luminescence Spectrometer Model LS 50 (Perkin Elmer, St Quentin en Yvelines, France) and a Shimadzu UV-Visible Recording Spectrophotometer Model UV-2100 (Touzart et Matignon, Vitry sur Seine, France), in 1 cm quartz cells. Spectral bandwidths of 2.5 nm were used in both the excitation and emission monochromators.

Proton and carbon 13 nuclear magnetic resonance spectra (¹H-NMR and ¹³C-NMR) were recorded on a Bruker AC 200-MHZ NMR Spectrometer (Bruker, Wissous, France) using (²H₆) dimethylsulfoxide as solvent and tetramethylsilane (TMS) as reference.

Electron impact-mass spectrometry (EI-MS) was performed with a Nermag R-1010-C Mass Spectrometer (Delsi-Nermag, Argenteuil, France).

HPLC Apparatus and Conditions

Analysis was performed with a Chromatem 380 pump (Touzart et Matignon, Vitry sur Seine, France) equipped with a Rheodyne injector Model 7125 (Cotati, CA, USA), a 20 µl sample loop and a Shimadzu Fluorescence HPLC Monitor RF-530 (Touzart et Matignon, Vitry sur Seine, France). The data were processed in a Shimadzu C-R5A integrator (Touzart et Matignon, Vitry sur Seine, France).

Three different columns were used: one normal-phase (NP) column 5 µm Nucleosil silica (250 × 4.6 mm I.D.) (Interchim, Montluçon, France) and two reversed-phase (RP) columns 5 µm Nucleosil ODS (250 and 150 × 4.6 mm I.D.) (Interchim, Montluçon, France). The mobile phases for normal-phase chromatography mode

Table II. Chromatographic conditions for separations of reagents and products.

Reversed phase:			
eluent: Acetonitrile (solvent A)/10 mM imidazole nitrate buffer pH 7.5 (solvent B)			
column: 5 µm Nucleosil ODS (250×4.6 mm I.D., except system 4: 150×4.6 mm i.D.).			
System	Eluent (A/B, v/v)	Wavelength λ _{ex} /λ _{em} (nm)	Compounds separated
1	60/40	399/500	III, X and XIII
2	52/48	399/500	III, IX, X and XIII
3	60/40	399/491	I, IV, V, VI and XI
4	60/40	387/450	II, VII, VIII and XII
Normal phase:			
eluent: Diisopropylether (solvent C)/ethyl acetate (solvent D).			
column: 5 µm Nucleosil silica (250×4.6 mm I.D.).			
System	Eluent C/D, v/v)	Wavelength λ _{ex} /λ _{em} (nm)	Compounds separated
5	95/5	368/416	II, VII, VIII and XII
6	10/90	387/444	I, IV, V, VI and XI

were mixtures of diisopropylether and ethyl acetate. In the reversed-phase mode mixtures of acetonitrile and aqueous imidazole-nitrate buffer pH 7.5 were used. The flow-rates were chosen between 1 and 2 ml/min to permit a fast separation at reasonable back-pressures. Excitation and emission wavelengths were chosen for maximum fluorescence yield of the reagent in the respective solvent system. The details for the different separation systems are given in Table II.

For liquid chromatographic determination of HMF in orange juice and concentrates, a 5 μm Nucleosil silica column (250 \times 4.6 mm I.D.) was used with a mobile phase of diisopropylether-ethyl acetate (10/90, v/v) at flow-rate of 1.5 ml/min. Fluorimetric detection was performed with the excitation and emission wavelengths at 387 nm and 444 nm.

Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) was carried out with a Waters Model 600 MS solvent delivery system, a Waters Model U6K injector (Waters, Division of Millipore, Trappes, France) equipped with a 50 μl loop, a Vestec thermospray interface (Vestec, Houston, TX, USA) and a Nermag R-1010-L quadrupole mass spectrometer (Delsi-Nermag, Argenteuil, France) using positive ion chemical ionization with ammonia as reagent.

Liquid chromatography separation was obtained using a 5 μm Novapack ODS column (150 \times 3.9 mm I.D.) (Waters, Division of Millipore, Trappes, France). Two mobile phases, degassed prior to use and kept under a stream of helium, were used at a flow-rate of 1.5 ml/min:

- Acetonitrile-0.1 M ammonium acetate (30/70, v/v) for separation of products IV and IX.
- Acetonitrile-0.1 M ammonium acetate (60/40, v/v) for separation of products V, VI, VII, VIII and X.

These chromatographic conditions were chosen because they gave the most satisfactory separation.

The conditions of use of the thermospray interface, optimized by a direct injection of luminarin-hydrazides (250 nmol in 200 μl of the mobile phase) through the injector shunt, were as follows: control temperature: 131 $^{\circ}\text{C}$; vaporizer tip temperature: 223 $^{\circ}\text{C}$; source temperature: 242 $^{\circ}\text{C}$ and tension of repeller: + 273 V. Mass spectra were scanned from 110 a.m.u. to 810 a.m.u.

Fluorescence and Absorbance Measurements

The spectra were fully corrected. Fluorescence quantum yields were determined with reference to quinine bisulphate in 0.05 M sulphuric acid, according to the method of Parker and Rees [11], and Demas and Crosby [12]. Measurements of quantum yields were done at room temperature without deoxygenation. The intrinsic fluorescence sensitivity was expressed by the equation: $\text{IFS} = \phi \times \epsilon / H$, where ϕ is the quantum yield,

H is the half band-width (cm^{-1}) and ϵ is the molar absorptivity ($1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [13].

Derivatization Procedure

200 μl aqueous sulphuric acid (0.1 M) containing carbonyl compounds was mixed with 10 μl luminarin hydrazide solution (50 mM) in a 75 \times 12 mm brown glass test tube. The tubes containing the test samples were capped and allowed to stand at room temperature for 30 min for the optimal formation of products IV and IX, 120 min for products V, VI, VII and VIII, and 60 min for product X and Luminarin 3-HMF derivative. The blank reagents (without carbonyl) were treated in the same manner as the carbonyl samples to aid the detection of reagents I, II and III, as well as their main degradation products namely luminarin 3 acid (product XI), luminarin 11 acid (product XII) and luminarin 12 acid (product XIII), respectively. One hundred microliters of sodium hydrogencarbonate (0.6 M) were carefully added to adjust the pH to 7.0, and the tube was agitated gently until gas evolution ceased. Dichloromethane (2 ml) was then added, and the mixture was vortexed for 2 min. The layers were separated by centrifugation and the upper aspirated and discarded. The remaining dichloromethane layer was evaporated under a stream of nitrogen at room temperature. The resulting residue was dissolved in acetonitrile (reversed-phase chromatography) or dichloromethane (normal-phase chromatography), and diluted when necessary with the same solvent, and then an aliquot was injected into the chromatograph.

HMF was derivatized by reagent I by mixing 10 μl of standard solution containing 0.1–10 nmol of HMF with 190 μl of aqueous sulphuric acid (0.1 M) and 10 μl of reagent I (50 mM). Derivatization was carried out as described above.

Determination of Hydroxymethylfurfural in Orange Juices and Concentrates

Preparation of the samples. Sample preparation followed a modified version of the procedure reported by Blanco Gomis et al. [14].

The octadecyl extraction cartridges were conditioned by washing with 10 ml of methanol and then 10 ml of distilled and deionized water. This was achieved with a vacuum apparatus (Vac-ElutTM). Two milliliters of either pasteurized orange juice or orange juice concentrate were passed through the column under vacuum. The column was then centrifuged at 3500 \times g for 10 min to remove excess water. Next, the HMF was eluted into glass tubes with 2 \times 2 ml of acetonitrile. The eluate was taken to dryness in a brown glass tube (75 \times 12 mm) under a stream of nitrogen at room temperature. After drying, 200 μl of aqueous sulphuric acid (0.1 M) and 10 μl reagent I solution were added to the tube, and the derivatization procedure was carried out as described above.

Recovery studies. Orange juice sample, spiked with 1, 2 and 3 $\mu\text{mol/l}$ of HMF, were processed as described

under sample preparation. An unspiked juice sample was used as the blank. The peak areas obtained were compared with the peak area obtained when equal amounts of HMF were derivatized without prior extraction.

Results and Discussion

For the purposes of this study an appropriate derivatization reagent must have the following structural features: (i) a reactive functional group with respect to the carbonyl function, (ii) a fluorophore responsive to a fluorescence detector. Therefore a project was directed to the synthesis of quinolizinocoumarin 9-carboxylic acid hydrazides (reagents I, II and III in Table I). The physicochemical properties of each reagent were as indicated in Table III.

Evaluation of Reagents I, II and III as Fluorescence Derivatization Reagents

The reactivities of these reagents were tested with MDA and AcAc. Reaction of MDA and AcAc with luminarin hydrazides involves nucleophilic attack by the basic nitrogen atom on the carbonyl carbon. Protonation of the carbonyl oxygen makes the carbonyl carbon more susceptible to nucleophilic attack. However, the nitrogen atom can also undergo protonation. The optimum conditions depend on the basicity of the

reagent and on the reactivity of the carbonyl compound. The condensation reaction here proceeded readily in an acidic medium (0.05–0.1 M H₂SO₄) at room temperature. Higher temperatures allowed the reaction to proceed more rapidly; however, at 50 °C the peak heights decreased because of the degradation of the reagents and products to the corresponding acids. The effect of luminarin hydrazide concentration was also examined until there was no further increase in the amount of luminarin derivatives generated in the reaction. The optimum conditions finally adopted are those described under derivatization procedure.

Figures 1 and 2 show the kinetic of the reaction for the derivatization of MDA and AcAc with reagents I, II and III. MDA and AcAc (50 nmol) were added to an excess of the luminarin reagents (500 nmol). Each carbonyl compound was treated by the derivatization procedure as described above with various reaction times. The blank reagents without MDA and AcAc were treated similarly.

The yields of the derivatization reaction were determined by measuring the peak heights of luminarin derivatives and comparing them with those of solutions of each product IV, VI, VII, VIII, IX and X (50 nmol), which were formed by the reaction of twice as much MDA or AcAc with the different reagents. Kinetics of MDA reaction with reagents I, II and III showed that the reaction was complete in 30 min with reagents I and III and 120 min with reagent II. Kinetics of AcAc reaction with the same reagents showed that the

Table III. Physico-chemical properties of reagents.

Reagents	EI-MS m/z (relative abundance %)	¹ H NMR	¹³ C NMR	Elemental Analysis
I	313 (4.51), 282 (1.14), 255 (4.24), 254 (1.77), 226 (2.11), 224 (28.23), 143 (31.38), 111 (1.70), 99 (38.55), 83 (49.07), 70 (19.20), 57 (28.04), 56 (100.00).	(DMSO D ₆) δ ppm 9.28 (1H, s, H-3'), 7.15 (1H, s, H-8), 5.90 (1H, s, H-10), 4.28 (2H, s, H-4'), 3.47 (2H, s, H-1'), 3.22 (4H, m, H-3 and H-5), 2.70 (4H, m, H-1 and H-7), 1.87 (4H, m, H-2 and H-6).	(DMSO D ₆) δ ppm 167.3 (C ₂ '), 160.7 (C ₁₁), 150.9 (C _{12a}), 150.5 (C _{12c}), 145.4 (C ₉), 122.1 (C ₈), 117.5 (C _A), 107.9 (C ₁₀), 107.3 (C _B), 105.5 (C _{12b}), 49.1 and 48.5 (C ₃ or C ₅), 36.7 (C ₁ '), 27.0 (C ₇), 20.9 (C ₆), 20.0 (C ₂), 19.9 (C ₁).	Calculated for C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₃ : C, 65.2; H, 6.1; N, 13.4 %; found: C, 65.1; H, 6.1; N, 13.4 %.
II	355 (86.15), 324 (1.25), 296 (5.04), 282 (12.85), 268 (63.48), 255 (100.00), 254 (20.91), 242 (31.99), 240 (13.60), 227 (17.88), 226 (16.12).	(DMSO D ₆) δ ppm 8.94 (1H, s, H-6'), 7.13 (1H, s, H-8), 5.82 (1H, s, H-10), 4.15 (2H, s, H-7'), 3.22 (4H, m, H-3 and H-5), 2.70 (6H, m, H-1, H-7 and H-1'), 2.05 (2H, m, H-4'), 1.87 (4H, m, H-2 and H-6), 1.55 (4H, m, H-2' and H-3').	(DMSO D ₆) δ ppm 171.3 (C ₅ '), 160.8 (C ₁₁), 157.0 (C _{12a}), 150.6 (C _{12c}), 145.4 (C ₉), 121.7 (C ₈), 117.7 (C _A), 107.1 (C _B), 105.9 (C ₁₀), 105.6 (C _{12b}), 49.1 and 48.5 (C ₃ or C ₅), 33.0 and 30.4 (C ₁ ' or C ₄ '), 27.8 and 24.9 (C ₂ ' or C ₃ '), 26.9 (C ₇), 20.9 (C ₆), 20.0 (C ₂), 19.9 (C ₁).	Calculated for C ₂₀ H ₂₅ N ₃ O ₃ : C, 67.6; H, 7.1; N, 11.8 %; found: C, 67.5; H, 7.1; N, 11.7 %.
III*	431 (96.42), 400 (1.73), 359 (5.11), 270 (45.99), 255 (100.00), 254 (40.15), 242 (43.07), 226 (33.58), 210 (2.92), 198 (10.95), 196 (10.22), 98 (2.92), 73 (10.22), 58 (10.22), 44 (8.03).			

* Commercially supplied as solution in DMSO

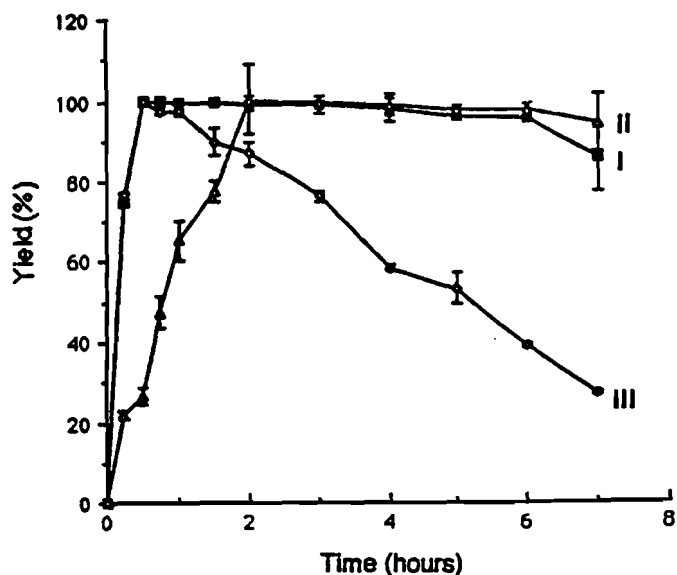


Figure 1
Time course of the reaction of malonaldehyde with reagents I, II and III.

reaction was complete in 60 min with reagent III, whereas 120 min were needed to approach completion with the other two reagents. Hence the kinetics of the reaction were slower for ketones than aldehydes. The other factor important for an analytical application is the stability of the products. Reagent III appeared to be the most interesting reagent from the point of view of reactivity (time of reaction) but, unlike reagents I and II, it has the disadvantage that its derivatives are less stable in the aqueous sulphuric acid solution. The stability of the products of reagents I and II in aqueous sulphuric acid solution is satisfactory, with the higher stability for reagent II (over 72 hours). Unfortunately, reagent II reacts much more slowly with MDA than reagents I and III. Based on these results, reagent I was selected as the optimal reagent with respect to reaction time, stability of reagent and products, and yield of reaction product.

In contrast to the situation in aqueous sulphuric acid solution, all the luminarin derivatives were stable for at least one week in organic solvents such as acetonitrile, dichloromethane, chloroform, dimethylsulfoxide and dimethylformamide, when the solution was allowed to stand at + 4 °C.

Confirmation of the Structure of the Reaction Products

The products of the reaction of MDA and AcAc with reagents I, II and III were confirmed as the corresponding luminarin derivatives by LC-MS and by EI-MS.

One of the most important methods of pyrazole synthesis involves the reaction of 1,3-dicarbonyls with hydrazine derivatives. Practically all linear 1,3-dicarbonyls give the corresponding pyrazoles with hydrazine and its derivatives. The reaction proceeds via the formation of the monohydrazone, which may be isolated conditionally. It is not known, however, whether the monohydrazone is cyclic or not.

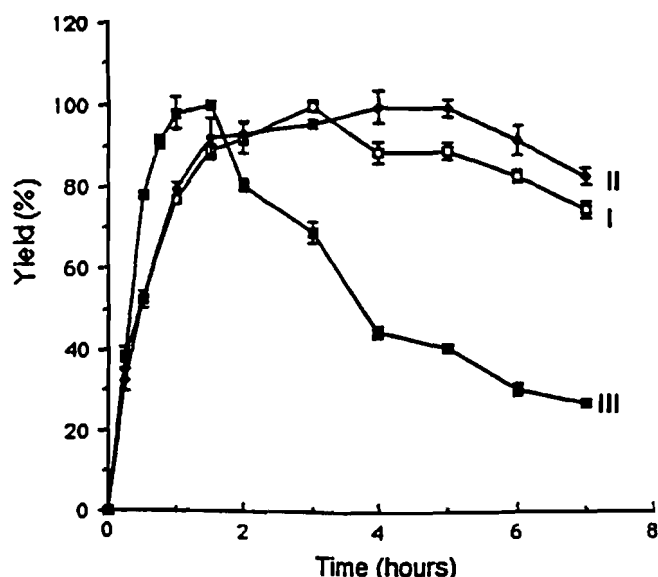


Figure 2
Time course of the reaction of acetylacetone with reagents I, II and III.

We confirmed the presence of products IV, V, VI, VII, VIII, IX and X in the reaction mixtures by LC-MS. The total ion current, obtained after injection into the chromatographic column of an extract of the reaction mixtures dissolved in the mobile phase, showed the presence of the expected products. All the reaction mixtures exhibited a single product represented by one peak in LC-MS, except the AcAc reaction mixture with reagent I, which showed two peaks (Figure 3). These two peaks represent the monohydrazone (product V) and pyrazole (product VI) form of the derivative, as indicated by LC-MS spectral data (Table IV). The data shown in Table IV represent a summary of the characteristic ions found for each hydrazone derivative. It can be concluded from these data that 1,3-dicarbonyls derivatize with luminarin hydrazides at one carbonyl functionality.

The fragmentation patterns obtained with EI-MS (data not shown) were consistent with the proposed structures.

The EI-MS data of luminarin malonaldehyde derivatives are consistent with products IV, VII and IX being present in the 5-hydroxy-2-pyrazoline form. The evidence for this latter form was that the products VI, VII and IX showed a parent ion at m/z 367, 409 and 485, respectively, with additional ions at m/z 349, 391 and 467, respectively, corresponding to $(M-18)^+$. These ions result from loss of hydroxyl and hydrogen from the 5 and 4 positions of the pyrazoline ring. The ion at m/z 68 corresponds to a loss of a pyrazole ring plus one proton from ions at m/z $(M-18)^+$. The remainder of the molecule appears in the form of carboxyl fragments at m/z 282, 324 and 399.

The EI-MS data of luminarin acetylacetone derivatives showed a parent ion at m/z 377, 419 and 495 for products VI, VIII and X, respectively. The base peak for product VI at m/z 281 is the result of cleavage of the carboxyl fragment, less one proton, and the loss of the

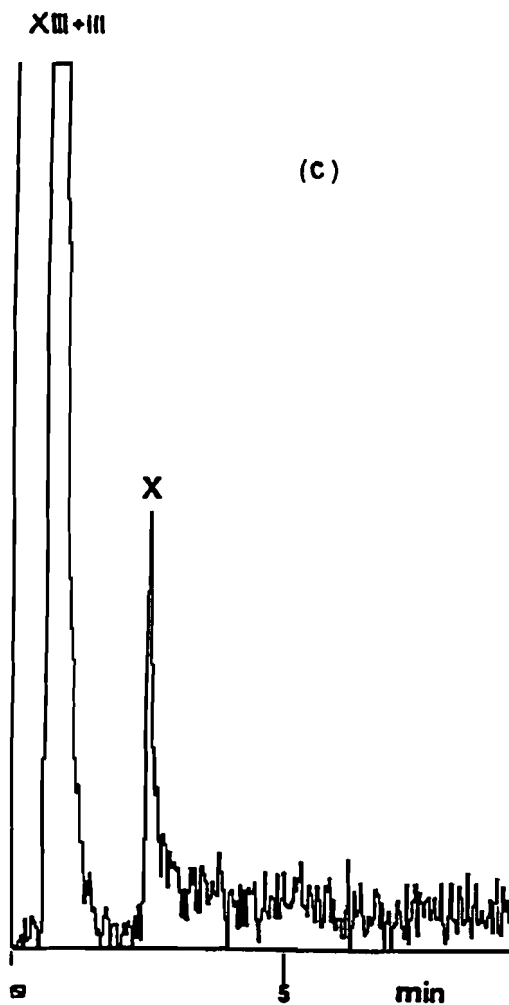
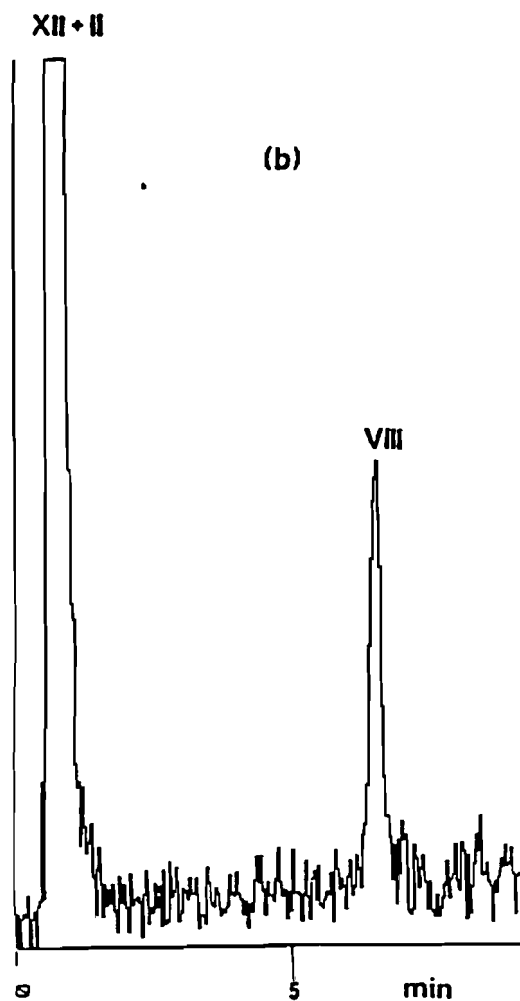
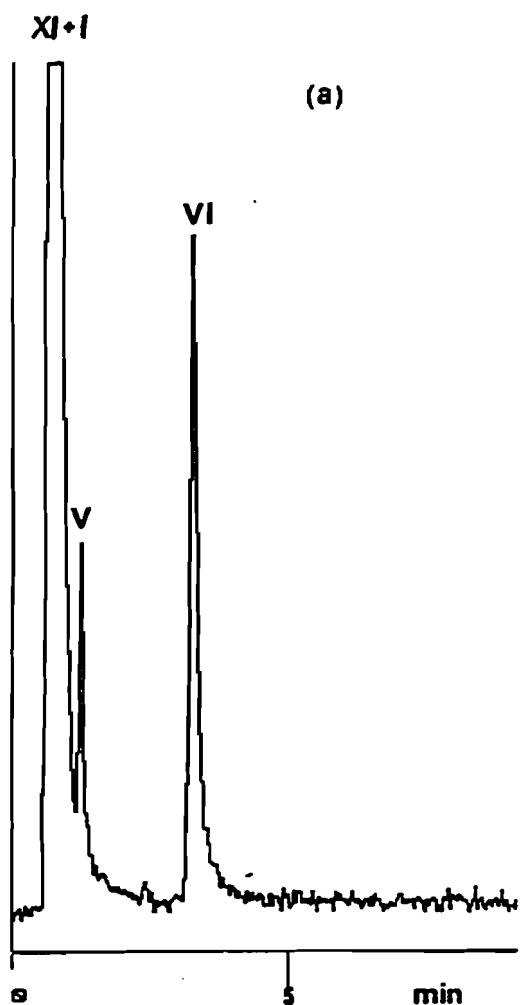


Figure 3

Separation of luminarin acetylacetone derivatives by LC-MS, with a thermospray interface, mode: positive ions. For other details, see Experimental.

Table IV. Liquid chromatography-mass spectrometry data for luminarin derivatives.

Products	Retention time ^a (min)	Characteristic ions (m/z)	Relative abundance (% of Base peak)
IV	5.52	368	100.00
		350	6.67
		256	60.00
V	1.21	396	41.46
		339	6.10
		256	92.68
		225	100.00
VI	3.30	378	7.31
		299	100.00
		256	63.90
VII	2.01	410	1.35
		392	100.00
		324	9.87
VII	6.55	420	100.00
		342	10.50
		420	100.00
IX	4.73	486	3.85
		468	36.54
		417	100.00
X	2.44	496	100.00
		418	58.75
		417	52.50
		400	68.75
		400	68.75

^a See text for experimental conditions

Table V. UV absorption and fluorescence data for reagents I, II and III in various solvents.

Solvent	Reagent I				Reagent II				Reagent III			
	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)	ϵ^*	ϕ^{**}	IFS ^{***}	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)	ϵ^*	ϕ^{**}	IFS ^{***}	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)	ϵ^*	ϕ^{**}	IFS ^{***}
Cyclohexane	375/420	1.52	0.20	1.06	-	-	-	-	-	-	-	-
Diisopropylether	377/424	2.15	0.20	1.50	368/416	3.05	0.35	3.70	381/441	3.26	0.34	3.15
Chloroform	384/450	2.83	0.22	2.53	382/442	3.09	0.32	3.93	390/458	3.15	0.50	5.67
Ethyl acetate	387/444	2.58	0.98	8.85	384/429	3.19	0.98	10.37	384/451	2.70	0.80	7.24
Tetrahydrofurane	388/443	2.71	0.92	8.57	382/428	3.07	0.98	10.47	382/451	2.80	0.75	6.53
Dichloromethane	399/456	3.06	0.84	9.74	389/443	3.49	0.98	14.17	393/459	3.33	0.55	6.47
Dimethylsulfoxide	394/464	2.46	0.98	9.41	391/455	2.81	0.98	10.17	392/474	2.82	0.98	9.78
Dimethylformamide	393/459	2.47	0.75	6.56	388/450	2.82	0.96	10.16	392/474	2.56	0.66	5.75
Ethanol	397/475	2.45	0.70	6.00	394/468	3.06	0.89	9.26	393/490	2.50	0.54	4.87
Acetonitrile	394/464	2.56	0.74	6.61	387/448	2.72	0.93	9.17	390/473	2.62	0.59	5.30
Methanol	399/481	2.69	0.60	6.65	393/471	3.03	0.82	8.45	394/498	2.77	0.47	4.68
Water	403/502	1.96	0.45	3.81	399/489	2.07	0.67	5.06	404/512	2.04	0.27	2.74

* Molar absorptivity ($10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

** Quantum yield

*** Intrinsic fluorescence sensitivity

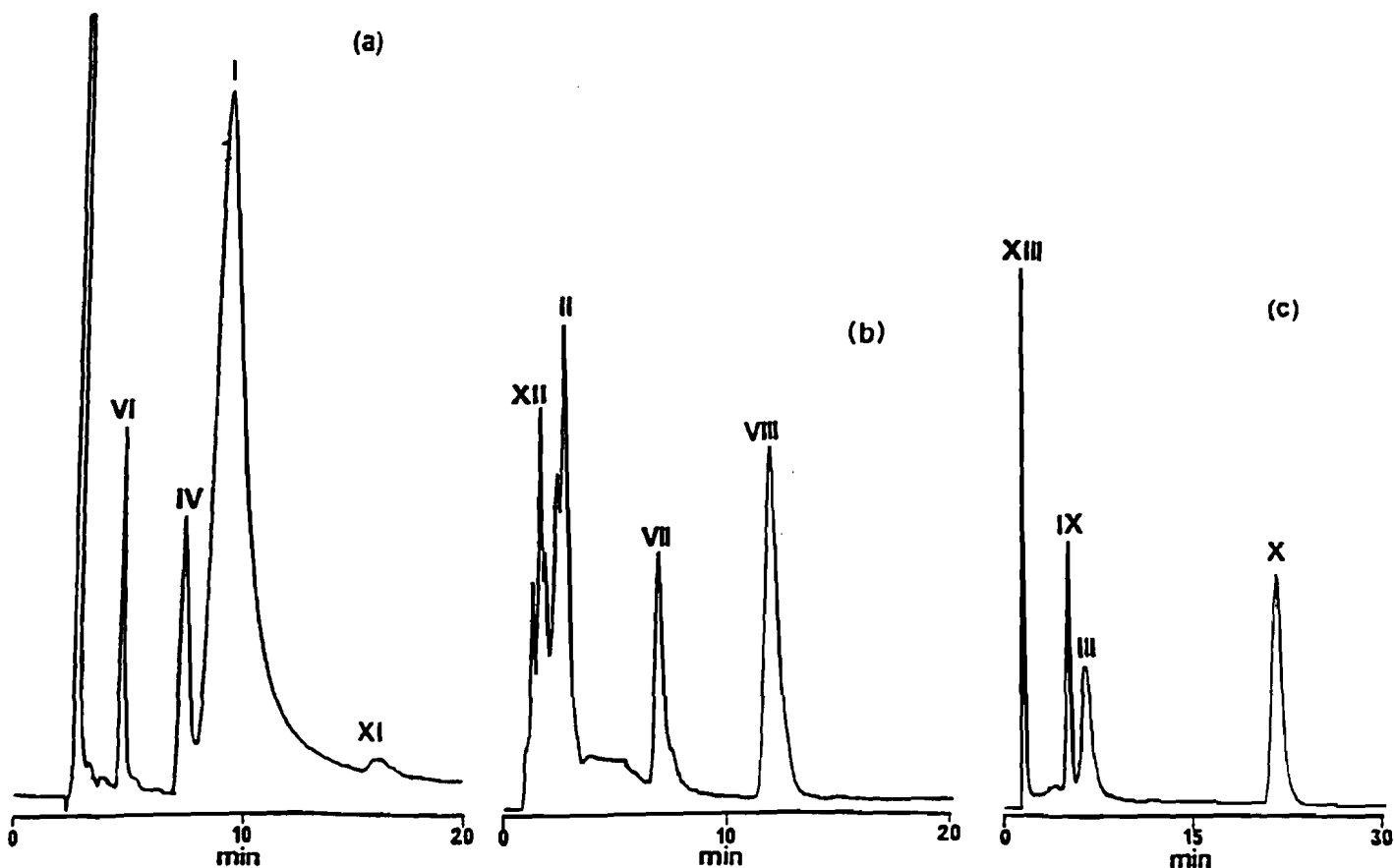


Figure 4

Chromatograms of derivatives of malonaldehyde and acetylacetone with reagents I (a) system 6, II (b) system 4 and III (c) system 2. Two picomol of each derivative were injected on to the column. For other details, see Experimental.

3,5-dimethylpyrazole ring from the parent ion. For products VIII and X, the base peak was the parent ion peak. The occurrence and the relative intensity of the fragment at m/z 96, corresponding to the 3,5-dimethylpyrazole ring plus one proton, has been correlated with the presence of the pyrazole form.

High-performance Liquid Chromatographic Separation and Detection of Luminarin Derivatives

As indicated in Table V, more sensitive detection could be achieved in less polar solvents. This means that the separation of luminarin derivatives should be carried out using normal-phase chromatography. However, in

this work reversed-phase chromatography was used, as well as it is more popular and easy to use. The chromatograms of the MDA and AcAc reactions product with reagents I, II and III are shown in Figure 4 (a), (b) and (c), respectively. They were obtained after complete reaction under the conditions described above. In general, a complete resolution between the peaks of luminarin derivatives could be obtained. For example, the resolution between products IV and VI was 2.96 (System 6). Other carbonyls, such as formaldehyde, acetaldehyde, diacetyl, acrolein, acetone and glyceraldehyde were also successfully derivatized with reagent I and separated [6]. Table VI shows the capacity factors and detection limits of reagents and products. A good separation was obtained for products and reagents. In reversed-phase mode, derivatives with reagent I and III were less retained than those with reagent II. The products XI, XII and XIII, which are the main byproducts of the derivatization, did not interfere in this system, because they were eluted before the reagents and other products, and appeared practically at the front of the chromatograms. As only small quantities of products XI, XII and XIII were formed under optimal derivatization conditions, it thus appears to be possible to detect trace amounts of derivatives of aldehydes and ketones with reagents I, II and III.

MDA was detected at similar sensitivity with the reagents I and II and at about twice the detection limit with reagent III. The derivative of AcAc with reagent II fluoresced about twice as much as those with reagent I and III.

Application to the Determination of Hydroxymethylfurfural in Orange Juices and Concentrates

Both hydroxymethylfurfural and furfural are useful indicators of quality deterioration of fruit juices during heating processes like concentration, pasteurization or storage. HMF has been correlated with browning in orange juice [15], while furfural levels have been shown to increase as flavor deteriorates in commercially processed fruit juices [16–19].

The classical methods for determining these compounds in fruit juices are spectrophotometry [15, 18, 19] and HPLC [14, 20–24]. Spectrophotometry is sensitive but suffers from several problems, i.e., toxicity of reagents used, instability of the color complex formed, and interferences of many other compounds present in the fruit juice or concentrate. HPLC methods are more precise than spectrophotometric methods, and specific for HMF. Several authors have demonstrated that the concentration of HMF determined by spectrophotometric methods is much higher than that found by HPLC [20–22].

The low molar absorptivity of HMF led us to develop an HPLC method with fluorimetric detection for determining HMF in orange juice and concentrates.

Table VI. Liquid chromatography-fluorimetric detection data for luminarin derivatives.

Reagents and Products	Capacity factor (k')	System used*	Detection limits (fmol)**
I	6.00	6	–
II	1.15	3	254
	4.04	5	280
III	1.07	4	223
	1.57	1	325
IV	3.48	2	625
	4.51	6	159
V	1.50	3	160
	1.26	6	–
VI	3.31	3	–
	2.17	6	90
VII	5.48	3	251
	7.63	5	192
VIII	4.31	4	164
	4.87	5	68
IX	8.85	4	114
	2.58	2	425
X	5.01	1	250
	14.48	2	340
XI	10.76	6	–
XII	10.65	5	–

* HPLC conditions as described in the experimental section

** Lower detection limit (signal to noise ratio = 3)

This method offers improved sensitivity as compared to HPLC with UV detection.

We have investigated the possibility of a normal-phase separation and determination of HMF as its luminarin 3 derivative. As can be seen in Figure 5, the normal-phase chromatography mode was adequate for the aim of our work. The retention time of the luminarin 3-HMF derivative was 7.26 ± 0.47 min, while the peak of excess luminarin 3 appears at $10.5 \text{ min} \pm 1.56$ min. Confirmation of peak identity and purity was established by mass spectrometry. A sample clean-up prior to derivatization was necessary in order to avoid the interferences caused by other carbonyl compounds present in the sample and also able to react with luminarin 3. Therefore, a modified version of the procedure reported by Blanco et al [14] using solid-liquid extraction with C18 cartridges was used. The overall efficiency of the extraction step was found to be greater than 96 % for amounts of HMF up to 50 $\mu\text{mol/l}$. However, at HMF concentrations greater than this, the amount retained by the column decreased, and therefore a sample dilution was necessary. The quantification of HMF was achieved by an external standard method. The calibration graphs were linear for HMF amounts derivatized in each tube in the range 0.1–10 nmol ($r^2 = 0.991$). The detection limit was 294 fmol injected in this system; but only amounts up above 65 pmol of HMF could be derivatized and quantified. When this latter amount was used, the reproducibility and linearity were poor. Hence, the limiting factor in the sensitivity of the method was not detection but derivatization. The intrarun relative standard deviation was 12.8 % for the 0.1 nmol and 2.6 % for the 1 nmol HMF standard.

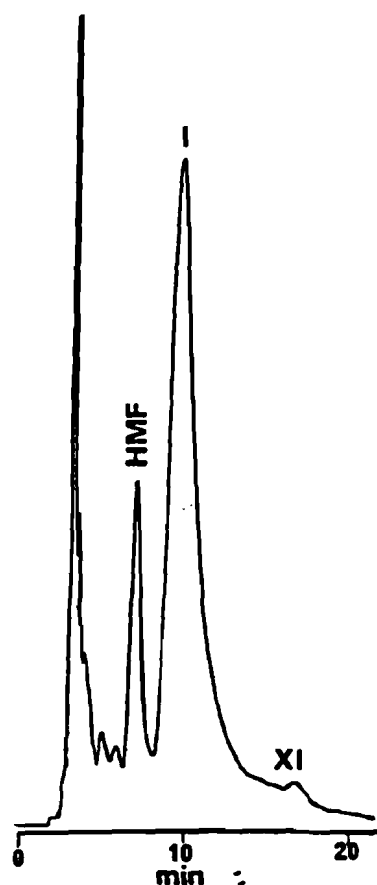


Figure 5
Typical chromatograms of hydroxymethylfurfural in juice concentrate. Chromatographic conditions in text.

Table VII. Recovery studies of hydroxymethylfurfural (HMF) added to pasteurized juice and juice concentrate. Mean of triplicate samples.

Sample	HMF present ($\mu\text{mol/l}$)	HMF added ($\mu\text{mol/l}$)	Recovery (%)
Juice concentrate	0.49	1.00	96.6
		2.00	99.2
		3.00	100.3
Pasteurized juice	8.53	1.00	103.4
		2.00	97.1
		3.00	99.0

($n = 6$). Recovery studies were done by the addition of different amounts of standard HMF to pasteurized juices and concentrates and the results are shown in Table VII. These results indicated a significant difference in the HMF contents in juice concentrate and pasteurized juice. The recovery of HMF in juice concentrate and pasteurized juice, ranges from 96.6 to 100.3 % with an average of 98.7 % and 97.1 to 103.4 % with an average of 99.8 %, respectively. Little difference in the limit of quantification was found between our method and that described by Mijares et al [21], but the detection limit obtained by our method was better. These results indicate that our method has an adequate degree of specificity, sensitivity and accuracy for the determination of HMF in orange juices and concentrates.

Conclusion

The newly developed derivatization reagents for the HPLC separation of carbonyl compounds followed by fluorescence detection proved satisfactory with respect to reactivity, resolution, analysis time and sensitivity. The application of the method to the determination of HMF in orange juices and concentrates is suitable for the study of browning changes during storage and processing.

Acknowledgement

This work was supported in part by a grant-in-aid (AGUIRE BASUALDO) for scientific research from the Chancellery of University (Paris, France).

References

- [1] L. A. Sternson, in "Chemical Derivatization in Analytical Chemistry", R. W. Frei, J. F. Lawrence, (ed.), Plenum Press, New York/London, 1981; p. 127.
- [2] J. F. Lawrence, in "Chemical Derivatization in Analytical Chemistry", R. W. Frei, J. F. Lawrence, (ed.), Plenum Press, New York/London, 1982; p. 191.
- [3] H. Lingeman, W. J. M. Underberg, A. Takadate, A. Hulshoff, *J. Liq. Chromatogr.* 8, 789 (1985).
- [4] G. G. Guilbault, "Practical Fluorescence", Marcel Dekker, INC, New York/Basel/Hong Kong, 1990; p. 231.
- [5] N. Seiller, L. Demisch, in "Handbook of Derivatives for Chromatography", K. Blau, G. S. King, (ed.), Heyden and Sons, London/Philadelphia, PA/Rheine, 1978; p. 346.
- [6] F. Traoré, M. Tod, J. Chalom, R. Farinotti, G. Mahuzier, *Anal. Chim. Acta* in press.
- [7] M. Tod, J. Y. Legendre, J. Chalom, H. Kouwati, M. Poulou, R. Farinotti, G. Mahuzier, *J. Chromatogr.* 594, 386 (1992).
- [8] M. Tod, M. Prevot, J. Chalom, R. Farinotti, G. Mahuzier, *J. Chromatogr.* 542, 295 (1991).
- [9] M. Tod, M. Prevot, M. Poulou, R. Farinotti, J. Chalom, G. Mahuzier, *Anal. Chim. Acta* 223, 309 (1989).
- [10] M. Tod, R. Farinotti, I. Gaury, G. Mahuzier, *Anal. Chim. Acta* 217, 11 (1989).
- [11] C. A. Parker, W. T. Rees, *Analyst* 85, 587 (1960).
- [12] J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem.* 75, 991 (1971).
- [13] J. B. Lloyd, *Chromatogr.* 178, 249 (1979).
- [14] D. Blanco Gomis, M. D. Gutiérrez Alvarez, L. Sopena Naredo, J. J. Mangas Alonso, *Chromatographia* 32, 45 (1991).
- [15] S. Meydav, Z. Berk, *J. Agric. Food Chem.* 26, 282 (1978).
- [16] S. Nagy, V. Randall, *J. Agric. Food Chem.* 21, 272 (1973).
- [17] S. Nagy, H. L. Dinsmore, *J. Food Sci.* 39, 116 (1974).
- [18] H. L. Dinsmore, S. Nagy, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 57, 332 (1974).
- [19] H. L. Dinsmore, S. Nagy, *J. Food Sci.* 37, 768 (1972).
- [20] Z. F. Li, M. Sawamura, H. Kusunose, *Agric. Biol. Chem. Chem.* 52, 2231 (1988).
- [21] R. M. Mijares, G. L. Park, D. B. Nelson, R. C. McIver, *J. Food Sci.* 51, 843 (1986).
- [22] J. J. L. Cilliers, P. J. Van Niekerk, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67, 1037 (1984).
- [23] H. S. Lee, R. L. Rouseff, S. Nagy, *J. Food Sci.* 51, 1075 (1986).
- [24] J. E. Marey, R. L. Rouseff, *J. Agric. Food Chem.* 32, 979 (1984).

Received: Sep 15, 1992
Accepted: Oct 16, 1992

III-4 ARTICLE 3

**"1H, 5H, 11H-[11 Benzopyrano [6,7,8-ij] quinolizine-9-acetic acid
2,3,6,7-tetrahydro-11-oxohydrazide fluorogenic reagent for
liquid chromatographic determination of aldehydes and
ketones"**

Analytica Chimica Acta, (1992), 269 , 211-222.

En conclusion des travaux précédents, nous rapportons dans cet article les possibilités offertes par la Lu.3 comme marqueur de fluorescence des composés carbonylés à structure variée. La réactivité des aldéhydes et cétones est discutée ainsi que la structure et les propriétés spectrales d'absorbance et de fluorescence, de quelques dérivés (luminarine 3 - malonaldéhyde, luminarine 3 - méthylmalonaldéhyde et luminarine 3 - acroléine) que nous avons synthétisés, dans différents solvants. La chromatographie en phase normale et de polarité de phase inversée sont également développées pour permettre la séparation et le dosage des aldéhydes et cétones aliphatiques et aromatiques, des dialdéhydes et dicétones, des cétoacides, cétoesters et les aldéhydes comportant dans leur structure un groupement hydroxyle. La linéarité de la réponse du détecteur pour les différents aldéhydes et cétones analysés s'est révélée satisfaisante avec des coefficients de régression compris entre 0,984 et 0,999. La sensibilité atteinte est de l'ordre de 60 - 1950 femtomoles injectés, avec une reproductibilité d'environ 1,8% pour 100 picomoles injectés.

1*H*,5*H*,11*H*-[1]Benzopyrano[6,7,8-*ij*]quinolizine-9-acetic acid 2,3,6,7-tetrahydro-11-oxohydrazide fluorogenic reagent for liquid chromatographic determination of aldehydes and ketones

F. Traoré

*Laboratoire de Chimie Analytique II et Service d'Analyse de Médicaments et Métabolites,
Faculté de Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Paris-Sud, 5 rue J.B. Clément, 92290 Chatenay-Malabry (France)*

M. Tod

Département de Toxicopharmacologie, Hôpital Avicenne, 125 Route de Stalingrad, 93000 Bobigny (France)

J. Chalom

Eurobio, Z.A. Courtaboeuf, 7 Avenue de Scandinavie, 91953 Les Ulis (France)

R. Farinotti and G. Mahuzier

*Laboratoire de Chimie Analytique II et Service d'Analyse de Médicaments et Métabolites,
Faculté de Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Paris-Sud, 5 rue J.B. Clément, 92290 Chatenay-Malabry (France)*

(Received 6th March 1992; revised manuscript received 5th June 1992)

Abstract

Carbonyls are widely occurring environmental compounds. Various aldehydes and ketones are major constituents of food aromas, and a large number of pharmaceuticals and biological compounds contain carbonyl groups. Therefore, the determination of traces of carbonyls is of major importance. Methods for the determination of carbonyl compounds by means of liquid chromatography have been improved by the use of fluorescent derivatizing reagents. This paper describes the use of a highly reactive reagent with a 7-aminocoumarin moiety as the fluorophore and carboxylic hydrazide as the group reacting with the carbonyl function. Aliphatic, unsaturated and aromatic carbonyls, dicarbonyls and other difunctional carbonyls react with this reagent and chromatographic separation in both normal- and reversed-phase systems with fluorescence detection can be easily performed. The labelling reaction and the structure of the derivatives are discussed, together with the properties of these derivatives in both normal- and reversed-phase chromatographic systems. UV absorbance, corrected fluorescence spectra data and quantum yields from luminarin 3 and representative luminarin 3 derivatives of carbonyl compounds are presented. The results show that luminarin 3 derivatives of carbonyl compounds give high fluorescence quantum yields ($\phi_f \approx 0.71$) and good intrinsic fluorescence sensitivities ($IFS \approx 5.68$). Fluorimetric detection limits for most compounds range between 60 and 1950 fmol injected. The method is suitable for quantitative analysis, with a reproducibility of about 1.8% (relative standard deviation) for 100 pmol injected.

Keywords: Fluorimetry; Liquid chromatography; Aldehydes; Carbonyl compounds; Ketones

Correspondence to: G. Mahuzier, Laboratoire de Chimie Analytique II et Service d'Analyse de Médicaments et Métabolites, Faculté de Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Paris-Sud, 5 rue J.B. Clément, 92290 Chatenay-Malabry (France).

In recent years there has been increasing interest in the development of liquid chromatography (LC) for analyses for biological compounds with a carbonyl moiety in their skeleton (e.g.

sugars and oxosteroids). However, the low molar absorptivities of most of these compounds hinder sensitive detection. Derivatization has therefore been proposed, with various fluorogenic reagents, as follows.

Dansylhydrazine (DNS-H) has been used for both thin-layer chromatographic (TLC) and LC separations of sugars [1–3], ketosteroids [4–8] and various carbonyl compounds [9,10]. This reagent has been reported to give a high fluorescent background, and its degradation products can interfere with the determination of some compounds. During the derivatization reaction between dansylhydrazine and carbonyl compounds, a series of contaminants are also formed [11]. Normally, these contaminants are at such low concentrations that they present no major problems, but a large excess of dansylhydrazine must be added to some materials in order to obtain complete derivatization. Therefore, the sensitivity can be lost if a contaminant peak cannot be separated from the test compounds. High-performance gel-permeation chromatography has been used [12,13] to remove the excess of reagent.

4-Hydrazino-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-H), 4-hydrazino-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole hydrazine (NBD-H · NH₂NH₂), 4-aminosulphonyl-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazole (ABD-H) and 4-(*N,N*-dimethylaminosulphonyl)-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-H) have also been used to good advantage for fluorogenic labelling of aldehydes and ketones [1,3,6,7,12–16]. These reagents are not naturally fluorescent but their reaction products with aldehydes and ketones fluoresce at wavelengths from 548 to 580 nm with excitation from 450 to 470 nm. ABD-H and DBD-H have similar reactivities and are more reactive than NBD-H · NH₂NH₂.

More recently, anthracene-1- and -2-carboxylic acid hydrazides and *O*-(1-, 2- and 9-anthrylmethyl)hydroxylamines have been used as fluorogenic labelling reagents for carbonyl compounds [17].

As the quinolizinocoumarin nucleus is a useful fluorescent and chemiluminescent label [18–20], and taking advantage of the specific reaction between carbonyl compounds and nucleophiles (in-

cluding hydrazine derivatives), it was considered that substitution of the amino group of luminarin 4 [19] by the hydrazine group would convert the molecule into a good reagent for carbonyl compounds. The appropriate reagent, luminarin 3 (1*H*,5*H*,11*H*-[1]benzopyrano[6,7,8-*ij*]quinolizine-9-acetic acid 2,3,6,7-tetrahydro-11-oxohydrazide), was synthesized and proved to be suitable in practice.

This paper describes the use of luminarin 3 (see Fig. 1) as a fluorescence-based labelling reagent for carbonyl assays. Reactivity towards aldehydes and ketones, UV and fluorescence spectral properties and quantum yields of the reagent and of derivatives in various solvents are reported. A simple LC method (both normal- and reversed-phase) for the separation and determination of a variety of carbonyls, including keto esters, keto acids and aliphatic, aromatic and unsaturated hydroxycarbonyl and dicarbonyl compounds was also developed.

EXPERIMENTAL

Apparatus

Mass spectrometry (MS) was performed with a Nermag R-1010-C instrument. For fluorescence measurements a Perkin-Elmer Model LS 50 luminescence spectrometer was used. A microcomputer coupled to the spectrofluorimeter calculated corrected spectra and quantum yields. A Shimadzu Model UV-2100 UV-visible recording spectrophotometer with a 1-cm quartz cell was used for all absorbance measurements.

LC analyses were performed with a Chromatem 380 pump (Touzart–Matignon, France) equipped with a Model 7125 injector (Rheodyne, Cotati, CA) with a 20- μ l sample loop and a Shimadzu RF-530 fluorescence LC monitor (Touzart–Matignon) equipped with a xenon lamp and a micro flow cell. The data were processed with a C-R5A Chromatopac (Shimadzu, Kyoto).

Two LC systems were studied as follows.

System 1. Adsorption chromatography was carried out on a 250 \times 4.6 mm i.d. 5- μ m Nucleosil silica column (Interchim, France) using ethyl acetate–diisopropyl ether (90 + 10, v/v) as the mo-

bile phase at a flow-rate of 1.5 ml min^{-1} . The eluate was monitored at an excitation wavelength of 389 nm and an emission wavelength of 445 nm.

System II. Reversed-phase chromatography was performed on a $250 \times 4.6 \text{ mm}$ i.d. $5\text{-}\mu\text{m}$ ODS Nucleosil column (Beckman, Les Ulis, France) using acetonitrile–0.01 M imidazole buffer (pH 7.5) (40 + 60, v/v) as the mobile phase at a flow-rate of 1.5 ml min^{-1} . The detector wavelengths were set at 399 and 485 nm for excitation and emission, respectively.

Reagents

All reagents were purchased from Aldrich-Chemie (Steinheim, Germany) or Sigma (St. Louis, MO), except methylmalonaldehyde bisdiethyl acetal and luminarin 3 and its hydrolysis product (luminarin acid), which were manufactured by Eurobio (Les Ulis, France). Stock solutions of luminarin 3 and luminarin acid were prepared in dimethyl sulphoxide and diluted further with the same solvent to the required concentrations. The solvents (LC and fluorimetric grade) were obtained from FSA Laboratory Supplies (UK).

Malonaldehyde (MDA) and methylmalonaldehyde (MeMDA). These were prepared according to Esterbauer and Slater [21]. Stock solutions (10 mM) were prepared by hydrolysis of 1,1,3,3-tetraethoxypropane (0.25 ml) or 2-methyl-1,1,3,3-tetraethoxypropane (0.25 ml), respectively, in 100 ml of 1% sulphuric acid for 2 h at room temperature.

Acetoacetaldehyde. A 10 mM stock solution was prepared by hydrolysis of 1,1-dimethoxybutan-3-one (0.14 ml) in 100 ml of 1% sulphuric acid for 1 h at room temperature.

Succinaldehyde. This was best prepared with an excellent yield during or just before analysis through complete hydrolysis within 30 min of pure 2,5-dimethoxytetrahydrofuran according to the method of Sawicki and Sawicki [22]. A 10 mM stock solution was prepared by hydrolysis of 2,5-dimethoxytetrahydrofuran (0.136 ml) in 100 ml of 1% sulphuric acid for 1 h at room temperature.

Acidified acetylacetone solution. A 1 M solution of acetylacetone in 1% sulphuric acid was pre-

pared and when necessary diluted with the same solvent to the desired concentration.

Acidified acrolein solution. A 0.1 mM solution of acrolein (prop-2-enal) in 1% sulphuric acid was prepared and diluted when necessary with the same solvent to the desired concentration.

Synthesis of luminarin 3 derivatives for the fluorescence study

Luminarin 3 derivatives of malonaldehyde, 2-methylmalonaldehyde and acrolein were prepared as follows. Luminarin 3 (313 mg, 1 mmol) in 10 ml of dimethyl sulphoxide was added to malonaldehyde (72 mg, 1 mmol), 2-methylmalonaldehyde (86 mg, 1 mmol) or acrolein (56 mg, 1 mmol) in 100 ml of 1% sulphuric acid. The reaction was carried out in the dark for 60 min. Sodium hydrogencarbonate (2.5 g) was added to adjust the pH of reaction mixture to 7.0. The required luminarin 3 derivatives were extracted twice with 50 ml of dichloromethane. After separation and drying by the addition of 10 g of anhydrous Mg_2SO_4 , the dichloromethane layer was evaporated to dryness under vacuum. The dried extract, dissolved in 5 ml of dichloromethane, was purified by means of column chromatography ($25 \times 3.5 \text{ cm}$ i.d. column) on silica gel 60 (0.04–0.063 mm; Merck, Darmstadt) with a dichloromethane–tetrahydrofuran gradient as eluent to give luminarin 3–malonaldehyde (199 mg, 72.3%), luminarin 3–methylmalonaldehyde (151 mg, 53%) and luminarin 3–acrolein (189 mg, 66%).

The physico-chemical properties of these derivatives were as follows. Luminarin 3–malonaldehyde (yellow powder): EI-MS, m/z 367; elemental analysis, calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4$, C 65.40, H 5.72, N 11.44; found, C 65.41, C 5.81, N 11.40%. Luminarin 3–methylmalonaldehyde (yellowish brown needles): EI-MS, m/z 381; elemental analysis, calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4$, C 66.14, H. 6.04, N 11.02; found, C 66.06, H 6.18, N 10.97%. Luminarin 3–acrolein (pale yellow powder): EI-MS, m/z 351; elemental analysis, calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3$, C 68.38, H 5.98, N 11.97; found, C 68.30, H 6.11, N 11.89%.

Stock solutions (25 mM) in dimethyl sulphoxide were kept frozen at -20°C . The absence of

coumarinic contaminants in the luminarin 3 derivatives was checked by means of LC with fluorescence detection under the conditions described above and by LC-MS with total ionic current monitoring on a Nermag R-1010-L instrument, using positive-ion chemical ionization with ammonia reagent. LC separation was obtained using a 150 × 4.6 mm i.d. 5- μ m ODS Nucleosil column (Interchim) and acetonitrile–0.1 M ammonium acetate (30 + 70, v/v) as the mobile phase at a flow-rate of 1.5 ml min⁻¹.

Fluorescence and absorbance measurements

The spectra were fully corrected. Fluorescence quantum yields were determined with reference to quinine hydrogensulphate in 0.05 M sulphuric acid according to Parker and Rees [23]. Measurements of quantum yields were done at room temperature without deoxygenation. The orientational polarizability, a factor used to characterize solvent polarity, was calculated as follows [24]: $\Delta f = (D - 1/2D + 1) - (n^2 - 1/2n^2 + 1)$, where n and D are the refractive index and the dielectric constant of the solvent, respectively. The intrinsic fluorescence sensitivity expressed by the equation $IFS = \phi\epsilon/H$, where H is the half band-width (cm⁻¹) and ϵ is the molar absorptivity (l mol⁻¹ cm⁻¹), controls the intensity distribution over the part of the emission spectrum detected and is therefore important for the sensitivity of the detector cell [25].

Derivatization procedure

A 100- μ l sample containing 0.5–50 nmol of carbonyl compounds in 0.1 M sulphuric acid was mixed with 100 μ l of the latter and 10 μ l of 10 mM luminarin 3 solution. The mixture was kept at room temperature for 60 min (aldehydes) or 240 min (ketones) in the dark. A clean control tube was used as a reference system to aid the detection of luminarin 3 and its degradation product. A 100- μ l volume of 0.6 M sodium hydrogencarbonate solution was carefully added to adjust the pH to 7.0 and the tube was agitated gently until evolution of gas ceased. Dichloromethane (1 ml) was then added and the mixture was vortex mixed for 2 min. The layers were separated by centrifugation and the upper layer

was aspirated and discarded. The remaining dichloromethane layer was evaporated under a stream of nitrogen at room temperature. The resulting residue was dissolved in 100 μ l of acetonitrile (system II) or ethyl acetate (system I), and an aliquot was injected into the chromatograph.

RESULTS AND DISCUSSION

Confirmation of reagent structure

The structure of luminarin 3 was confirmed [26] by IR, ¹H NMR, mass spectrometry and elemental analysis. Salient characteristics were as follows: IR (KBr) showed the bands of the quinolinocoumarin nucleus and the hydrazide function (1100, 1640, 1670, 3060, 3250, 3320 cm⁻¹); ¹H NMR [C₆D₆-CD₃OD (50 + 50, v/v)] gave δ_{H} 7.10 (1H, s, CH), 6.04 (1H, s, CH), 3.48 (2H, s, CH₂), 2.90 (4H, m, CH₂NCH₂), 2.65 (4H, m, CH₂ and CH₂), 1.70 (4H, m, CH₂ and CH₂); EI-MS showed a fragmentation pattern consistent with the proposed structure, with the molecular ion peak (m/z 313) and fragmentation of the side-chain (m/z 296, 282, 254) and of the lactone ring (m/z 226); elemental analysis, calculated for C₁₇H₁₉N₃O₃, C 65.2, H 6.1, N 13.4; found, C 65.1, H 6.1, N 13.4%.

Structure of reaction products

The proposed method for the determination of carbonyls takes advantage of the possible general equation for the labelling reaction of carbonyl compounds with luminarin 3, which proceeds by nucleophilic addition to the carbonyl followed by 1,2-elimination of water and the formation of the luminarin 3 derivatives. Because luminarin 3 is a weak nucleophile, the coupling reaction is carried out in the presence of acid, which promotes protonation of the carbonyl.

The structure of the reaction products of the carbonyl compounds with luminarin 3 was confirmed as luminarin 3 hydrazone by MS. The mass spectra provided particularly convincing data. In all instances, the molecular ion peak was present in the mass spectra of each luminarin 3 derivative. The suggested reaction mechanism is

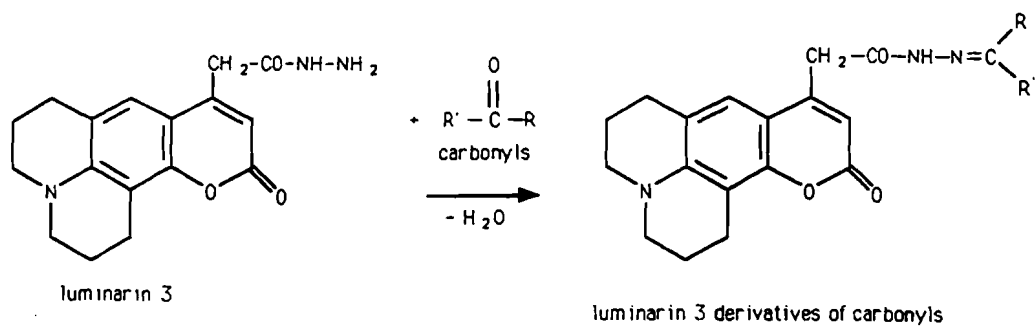


Fig. 1. Reaction of carbonyl compounds with luminarin 3 to give luminarin 3 hydrazone.

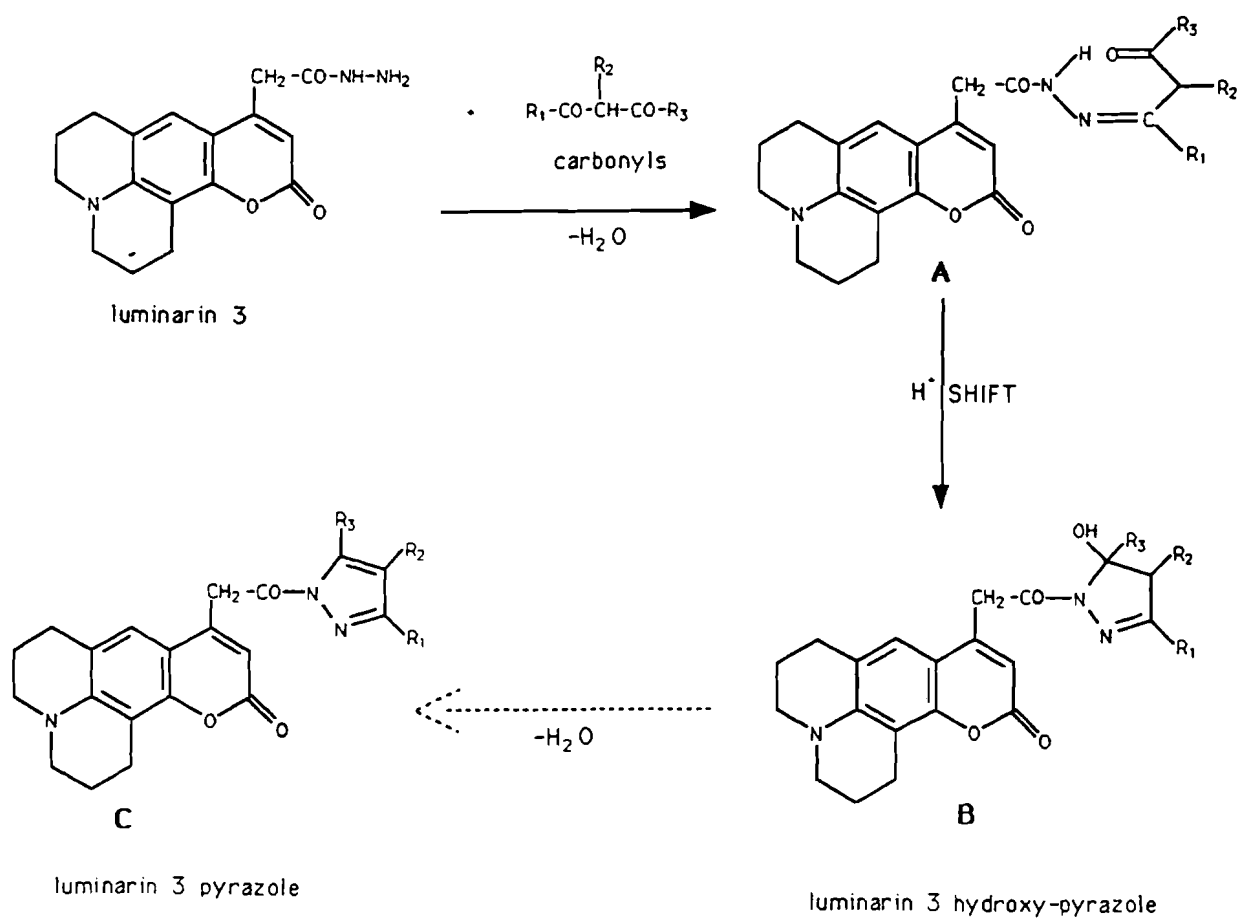


Fig. 2. Probable mechanism of formation of luminarin 3 derivatives of acetylacetone, malonaldehyde and methylmalonaldehyde.

shown in Fig. 1. Unambiguous evidence for the formation and purity of the luminarin 3 derivatives of malonaldehyde, methylmalonaldehyde and acrolein was provided by LC, spectral data and elemental analysis. Elemental analysis of the luminarin 3 derivatives (malonaldehyde, methylmalonaldehyde and acrolein) conformed with the theoretical values. The luminarin 3 derivative of acrolein showed two peaks in LC (system I), the second (at 4.02 min) being much higher than the first (at 3.57 min). These two peaks were proved to be the *syn* and *anti* isomers of the hydrazone by ^1H and ^{13}C NMR (data not shown). The luminarin 3 derivative of methylmalonaldehyde also showed two peaks in LC (System I), the second (at 4.88 min) being much higher than the first (at 4.42 min). These two peaks were proved to be the *threo* and *erythro* isomers. The luminarin 3 derivative of malonaldehyde showed a single peak in both chromatographic systems. LC-MS, EI-MS, ^1H NMR and ^{13}C NMR studies proved that the luminarin 3 derivative of malonaldehyde and methylmalonaldehyde had the hydroxypyrazole form (Fig. 2B) (data not shown).

The luminarin 3 derivative of acetylacetone was also analysed with mass spectrometry under chemical ionization and electron impact conditions. The mass spectra clearly showed that the derivative is luminarin 3-pyrazole (molecular mass 377), which is probably obtained by cyclization of the luminarin 3 hydrazone initially formed (molecular mass 395), followed by elimination of water (Fig. 2C).

The occurrence of the hydroxypyrazole and pyrazole structure of β -dicarbonyl compounds has been observed with other hydrazine-based reagents, as described by Kost and Grandberg [27].

Reaction conditions

The reaction conditions were investigated with malonaldehyde and acetylacetone, chosen as representative aldehydes and ketones, respectively.

To ensure maximum derivatization of the carbonyl compounds, the reaction between malonaldehyde, acetylacetone and luminarin 3 was studied on a microscale at room temperature. When the reaction is carried out with micromolar amounts, the luminarin 3 derivatives of malon-

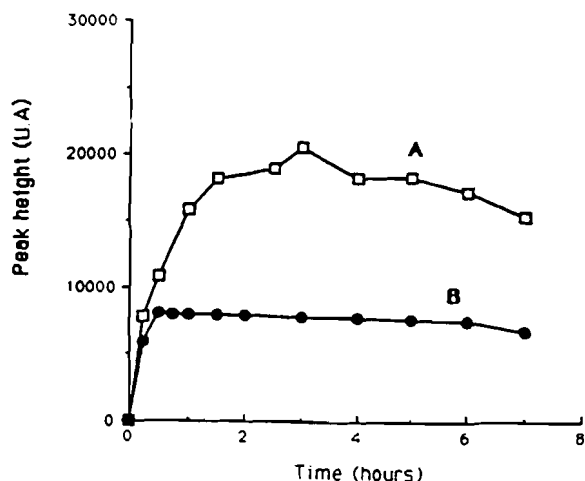


Fig. 3. Effect of reaction time on formation of luminarin 3 derivatives of (A) acetylacetone and (B) malonaldehyde at room temperature.

aldehyde and acetylacetone precipitate immediately owing to their low solubility in the aqueous phase. This precipitation shifts the equilibrium toward the almost quantitative formation of the derivative. The insolubility of the luminarin 3 derivatives of malonaldehyde and acetylacetone in water indicates that the reaction can be made quantitative on the microscale.

Malonaldehyde and acetylacetone were added to an excess of the luminarin 3 reagent. Each carbonyl compound ($0.02 \mu\text{mol}$) was treated in the derivatization procedure for various reaction times. The time-dependent increase in the peak heights of the luminarin 3 derivatives was monitored by LC (Fig. 3).

The peak heights of luminarin 3-malonaldehyde became constant after about 30 min, which suggests that the derivatization yield was maximum within this period. Using an optimum reaction time of 60 min, the other aldehyde compounds were also converted into luminarin 3 derivatives. The reactivities of ketones with this reagent were lower than those of aldehydes, as shown in Fig. 3. Hence, 240 min was necessary for the reaction.

The peak heights of the luminarin 3 derivatives decreased with increased sulphuric acid concentration. Each carbonyl compound ($0.02 \mu\text{mol}$) was treated in the derivatization procedure using

TABLE 1

UV absorption and fluorescence data for luminarin 3 in various solvents

Solvent	Δf^a	UV λ_{\max} (nm)	ϵ^b	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	H^c (cm^{-1})	ϕ^d	IFS^e	$\nu_A - \nu_F^f$ (cm^{-1})
Cyclohexane	0.001	381	1.27	380	423	3129	0.16	0.65	2606
Diisopropyl ether	0.145	376	2.33	376	423	3278	0.36	2.56	2955
Chloroform	0.185	403	2.68	403	455	2722	0.61	6.00	2867
Ethyl acetate	0.199	383	2.57	383	445	2907	0.93	8.23	3638
Tetrahydrofuran	0.209	384	2.66	384	442	2990	0.85	7.56	3451
Dichloromethane	0.218	400	3.09	400	456	2652	0.53	6.18	3101
Dimethyl sulphoxide	0.260	395	2.60	395	463	2843	0.95	8.68	3718
Dimethylformamide	0.276	391	2.50	391	458	2722	0.89	8.17	3741
Acetonitrile	0.304	391	2.55	391	462	2739	0.65	6.05	3963
Methanol	0.308	399	2.58	399	480	2747	0.57	5.35	4261
Water	0.320	408	1.94	408	503	2465	0.42	3.30	4629

^a Δf = Orientational polarizability. ^b ϵ = Molar absorptivity ($10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). ^c H = Width at half band-height (cm^{-1}) of the emission band. ^d ϕ = Quantum yield. ^e IFS = Intrinsic fluorescence sensitivity. ^f $\nu_A - \nu_F$ (Absorption maximum – emission maximum), or Stokes shift, expressed in cm^{-1} .

various concentrations of sulphuric acid; 0.1 M H_2SO_4 was preferred for LC analysis because more concentrated acid gave an unknown sub-peak on the chromatogram, which was identified by (system II) combined with MS and by comparison with an authentic sample ($M^+ = M - 44 = 255$), as 2,3,6,7-tetrahydro-11-oxo-1*H*,5*H*,11*H*-[1]benzopyrano[6,7,8-*ij*]quinolizine-9-acetic acid (luminarin acid). To avoid the formation of this fluorescent degradation product, the reaction temperature should not exceed 30°C and acid catalysts (H_2SO_4 concentration $> 0.1 \text{ M}$) should

not be used. Greater peak heights were obtained in the concentration range 0.05–0.1 M H_2SO_4 , without affecting the formation of this byproduct.

The influence of the amount of luminarin 3 on the peak heights of the malonaldehyde and acetylaceton derivatives was studied. Each carbonyl compound (0.02 μmol) was treated in the derivatization procedure using various amounts of luminarin 3. The peak heights were almost constant over the range of luminarin 3 concentrations investigated (0.05–0.5 μmol). These experiments indicated that the optimum conditions were

TABLE 2

UV absorption and fluorescence data for luminarin 3-malonaldehyde derivative in various solvents

Solvent	Δf	UV λ_{\max} (nm)	ϵ	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	H (cm^{-1})	ϕ	IFS	$\nu_A - \nu_F$ (cm^{-1})
Cyclohexane	0.001	372	2.22	388	438	3501	0.79	5.01	4051
Diisopropyl ether	0.145	373	2.82	379	423	3075	0.67	6.15	3169
Chloroform	0.185	398	3.30	395	449	2370	0.94	13.09	2854
Ethyl acetate	0.199	381	3.19	389	449	2940	0.70	7.59	3975
Tetrahydrofuran	0.209	381	3.25	387	441	2902	0.98	10.99	3571
Dichloromethane	0.218	396	4.19	395	460	2495	0.95	15.94	3513
Dimethyl sulphoxide	0.260	396	2.96	394	464	2763	0.98	10.48	3701
Dimethylformamide	0.276	392	2.96	393	460	2763	0.71	7.60	3771
Acetonitrile	0.304	391	3.21	394	464	2670	0.71	8.55	4024
Methanol	0.308	399	2.93	397	480	2673	0.58	6.36	4229
Water	0.320	406	2.30	401	502	2326	0.39	3.85	4710

TABLE 3

UV absorption and fluorescence data for luminarin 3–methylmalonaldehyde derivative in various solvents

Solvent	Δf	UV λ_{\max} (nm)	ϵ	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	H (cm^{-1})	ϕ	IFS	$\nu_A - \nu_F$ (cm^{-1})
Cyclohexane	0.001	388	2.81	386	444	3595	0.43	3.36	3251
Diisopropyl ether	0.145	373	2.53	380	424	2568	0.94	9.27	3225
Chloroform	0.185	399	2.71	394	450	2649	0.97	9.92	2840
Ethyl acetate	0.199	381	2.25	388	443	2933	0.92	7.07	3673
Tetrahydrofuran	0.209	384	2.67	391	449	3009	0.89	7.89	3770
Dichloromethane	0.218	396	3.15	394	453	2835	0.93	10.35	3177
Dimethyl sulphoxide	0.260	396	2.53	393	464	2843	0.91	8.10	3701
Dimethylformamide	0.276	393	2.58	392	458	2786	0.94	8.72	3611
Acetonitrile	0.304	391	2.46	393	462	2629	0.67	6.26	3930
Methanol	0.308	399	2.51	399	480	2506	0.98	9.81	4229
Water	0.320	408	1.87	401	501	2470	0.45	3.41	4550

those used in the derivatization procedure described above.

Fluorescence spectrum

Fluorescence spectra and quantum yields were measured in various solvents. Tables 1, 2, 3 and 4 show the UV–visible absorbance, the corrected fluorescence spectral data and quantum yields for luminarin 3 and its malonaldehyde, methylmalonaldehyde and acrolein derivatives in various solvents.

The wavelength of the fluorescence emission maxima in solvents (polar and apolar) did not vary significantly between the derivatives. However, for cyclohexane and water a red shift of the

fluorescence spectrum with increasing polarity of the solvent was observed. The spectral maxima were shifted from 423 nm in cyclohexane to 503 nm in water (Fig. 4). The difference in the Stokes shifts of the fluorescence from cyclohexane and water amounts to 3760 cm^{-1} (Table 1), while the orientational polarizability (Δf) changes by 0.32. Tables 1–4 show that aprotic solvents produce considerably smaller Stokes shifts than those which can form a hydrogen bond by acting as proton donors. Similar effects have been reported for coumarin molecules [28]. The Stokes shift (quoted for some solvents in Tables 1–4) does not follow the solvent polarity defined by orientational polarizability. The quantum yield decreases

TABLE 4

UV absorption and fluorescence data for luminarin 3–acrolein derivative in various solvents

Solvent	Δf	UV λ_{\max} (nm)	ϵ	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	H (cm^{-1})	ϕ	IFS	$\nu_A - \nu_F$ (cm^{-1})
Cyclohexane	0.001	389	2.83	381	421	3371	0.20	1.68	1954
Diisopropyl ether	0.145	373	2.74	379	423	3385	0.91	7.38	3169
Chloroform	0.185	399	2.97	398	453	2561	0.98	11.37	2988
Ethyl acetate	0.199	382	2.69	389	444	3248	0.89	7.38	3655
Tetrahydrofuran	0.209	383	2.61	389	444	3177	0.94	7.71	3587
Dichloromethane	0.218	396	3.40	395	454	2769	0.98	12.02	3226
Dimethyl sulphoxide	0.260	397	2.66	394	465	3332	0.96	7.67	3684
Dimethylformamide	0.276	392	2.56	394	461	2722	0.69	6.49	3818
Acetonitrile	0.304	393	2.67	394	466	2767	0.53	5.11	3986
Methanol	0.308	399	2.77	397	480	2736	0.50	5.05	4229
Water	0.320	408	1.98	397	499	3265	0.50	3.03	4470

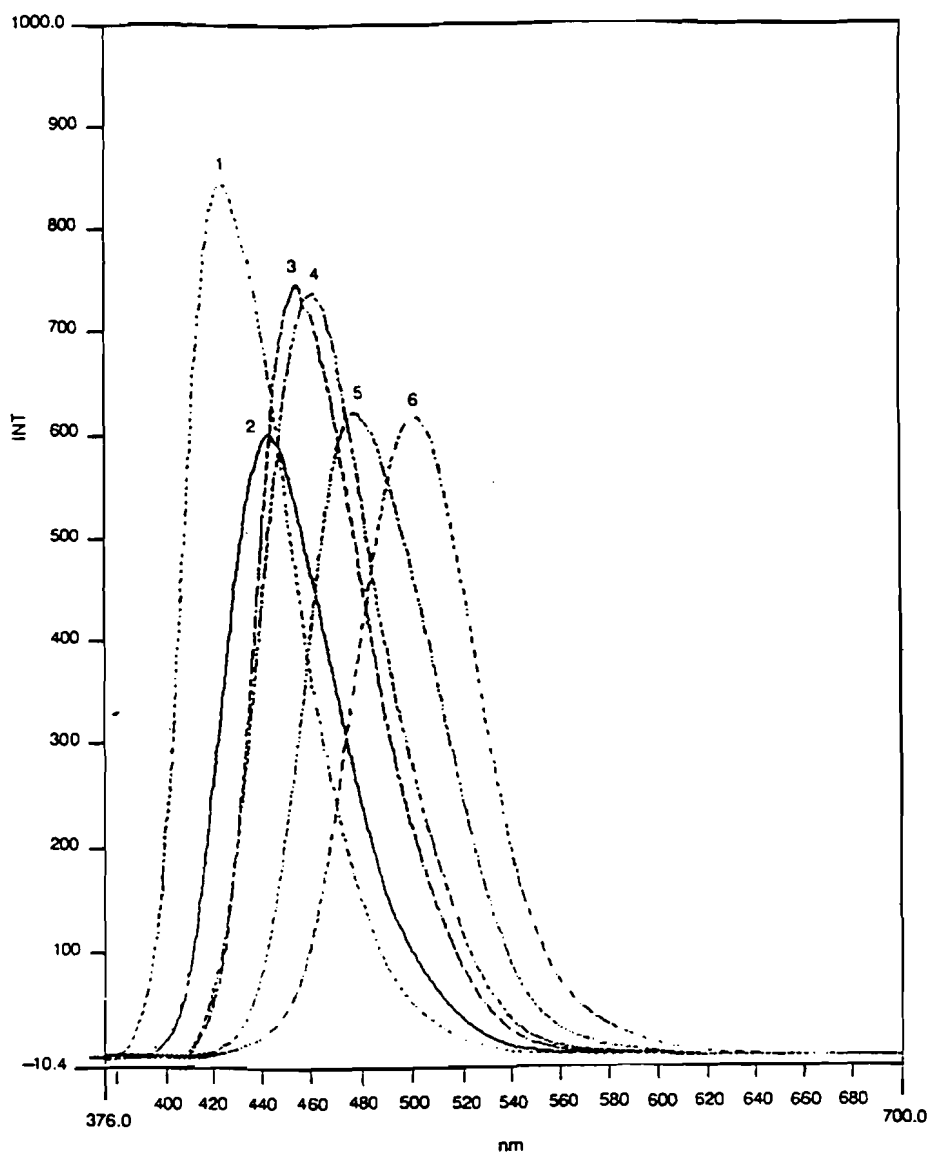


Fig. 4. Fluorescence spectra of luminarin 3 solutions. The successive maxima correspond to (1) cyclohexane, (2) ethyl acetate, (3) dichloromethane, (4) dimethyl sulphoxide, (5) methanol and (6) water. The heights do not reflect relative fluorescence yields.

when the polarity of solvents increases, but is recovered, for example, in viscous solvents. These results are explained by the strong polar character of these molecules in the excited state relative to the ground state when they are dissolved in a polar solvent: the presence of electron-donor (amino) and electron-acceptor (carbonyl) groups leads to a dipolar, planar intramolecular charge-transfer state (ICT), which results in a large increase in dipole moment and a solvatochromic

effect; a reduction in the emission spectrum and a bathochromic shift of the fluorescence spectrum are observed in polar solvents.

With luminarins, these phenomena were strongly diminished, because the rigidity of the dye molecule is increased by including the amino nitrogen atom in a planar ring. The mobility of this amino group, whose rotation causes energy dissipation, leads in some instances to the formation of a non-planar twisted intramolecular

charge-transfer state (TICT). When the molecule is rigidized, the rotation of the amino group is hindered and emission is markedly improved. This was demonstrated by the properties of luminarin 3 and its derivatives (Tables 1–4). Similar results have been obtained for coumarin 102 [29–31].

According to these results, a normal-phase system would be more suitable than a reversed-phase system for the trace analysis of luminarin 3 derivatives of carbonyl compounds.

LC separation of hydrazones

Several solvent systems were examined in order to select the most suitable eluent. An organic phase of ethyl acetate–diisopropyl ether (90 + 10, v/v) was found to be suitable when used with a Nucleosil silica column. An excess of reagent and the reaction byproduct (luminarin acid) did not interfere with the LC analysis, because they were eluted after the most of the luminarin 3 derivatives of the carbonyl compounds (Table 5). Separation of the derivatives was obtained in less than

TABLE 5

Capacity factors (k') for luminarin acid, luminarin 3 and individual carbonyl compounds tested as their luminarin 3 derivatives

Compound	k'	
	System I	System II
Luminarin acid	10.61	–
Luminarin 3	5.43	1.49
Acetaldehyde	5.31	3.05
Acetoacetaldehyde	2.13	10.28
Acetoin	5.73	1.53
Acetone	1.89	3.57
Acetoacetic acid	10.86	1.52
Acetylacetone	1.12	10.51
Acrolein	1.71	5.58
	1.38	
Diacetyl	1.17	4.33
Ethyl acetoacetate	2.22	6.51
Formaldehyde	5.70	2.93
Furfural	1.41	7.30
Glyceraldehyde	10.29	0.74
Hydroxymethylfurfural	3.57	2.62
Malonaldehyde	4.26	3.16
Methylmalonaldehyde	2.21	4.72
	1.99	
Succinaldehyde	2.20	5.33

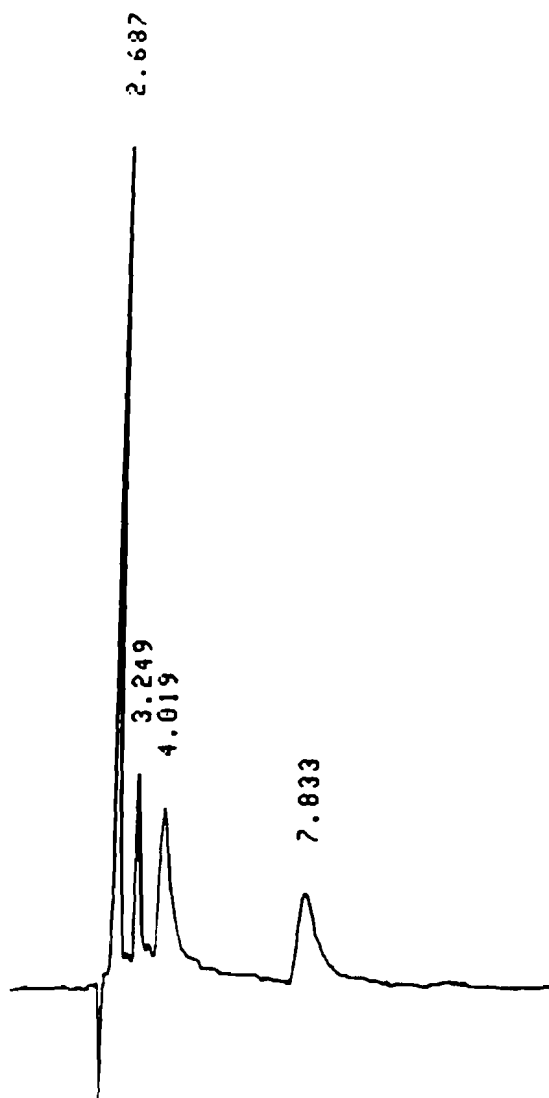


Fig. 5. Separation of luminarin 3 derivatives (system I) with fluorescence detection, 1 mV full-scale. Peaks: diacetyl (3.25 min); acrolein (4.02 min); malonaldehyde (7.83 min). 250 fmol of each derivative were injected on to the column.

20 min. The separation of diacetyl, acetylacetone, methylmalonaldehyde, malonaldehyde, acrolein, succinaldehyde, acetoacetaldehyde, acetone, ethyl acetoacetate, furfural and hydroxymethyl furfural can be achieved in less than 10 min. The analysis of subsets of the carbonyl compounds listed in Table 5 can be optimized by changing the analytical conditions (e.g., gradient elution, C_{18} instead of silica column for low-molecular-weight carbonyls).

TABLE 6

Detection limits of luminarin acid, luminarin 3 and luminarin 3 derivatives of carbonyl compounds in LC with fluorescence detection.

Compound	Detection limit ^a (fmol)	
	System I	System II
Luminarin acid	–	133
Luminarin 3	–	356
Acetaldehyde	–	158
Acetoacetic acid	–	163
Acetoacetaldehyde	175	1950
Acetoin	–	156
Acetone	136	372
Acetylacetone	90	1570
Acrolein	140	650
Diacetyl	83	1950
Ethyl acetoacetate	160	325
Formaldehyde	–	261
Furfural	132	780
Glyceraldehyde	–	473
Hydroxymethylfurfural	294	487
Malonaldehyde	159	163
Methylmalonaldehyde	134	210
Succinaldehyde	65	392

^a Signal-to-noise ratio = 3.

The effect of carbonyl structure on retention time in normal-phase separation is apparent from the data shown in Table 5. The retention times increased with decreasing chain length for the saturated luminarin 3 derivatives. The retention times for aromatic aldehydes (e.g., furfural and hydroxymethylfurfural) were consistent with polarity considerations and substituent effects.

Although no attempt is made here to discuss the relationships between retention times and other physico-chemical properties, the data in Table 5 may serve as a guide for optimizing LC conditions for a given mixture of carbonyl compounds.

The octadecyl and silica gel columns were compared for selectivity; although a larger capacity factor ratio was obtained for carbonyl compounds with the octadecyl support, the overall resolution was diminished because of broader peaks.

The octadecyl column with solvents such as methanol, ethanol, propan-2-ol and tetrahydrofu-

ran, either alone or with water, gave lower selectivities than the acetonitrile–water mixture. The mobile phase components (acetonitrile–imidazole buffer) were chosen for their ability to promote peroxyoxalate chemiluminescence (CL) detection, as reported by Tod and co-workers [15,20] for other luminarin derivatives.

The reversed-phase mode was used in this work as it is more popular and easier to use. The reaction byproduct (luminarin acid) peak appeared at the front of the chromatograms. Luminarin 3 derivatives of aliphatic aldehydes (C₃–C₁₀ range) and benzaldehyde were separated on the same column using acetonitrile–imidazole buffer (55 + 45, v/v) and with baseline resolution [26]. Luminarin 3 derivatives of even higher aldehydes and ketones should not be difficult to separate but would probably require a higher percentage of acetonitrile. Shorter columns could also be used effectively.

The capacity factors for the carbonyls tested are given in Table 5. Most produced single peaks in the middle of the chromatogram; two peaks for the luminarin 3 derivative of acrolein and methylmalonaldehyde were observed (Table 5, system I), because *anti* and *syn*, *threo* and *erythro* conformers, respectively, were recognized and separated on the silica column, as explained above. How-

TABLE 7

Equations for calibration graphs (defined as $y = ax + b$, where y is the peak area (arbitrary units) and x is the injected amount of sample injected (pmol)) and correlation coefficients (r) for fluorescence detection

Carbonyl compound	Equation ^a	r
Acetoacetaldehyde	$y = 15385x - 1396$	0.993
Acetone	$y = 11741x - 915$	0.999
Acetylacetone	$y = 9979x + 1680$	0.999
Acrolein	$y = 12623x + 1039$	0.996
Diacetyl	$y = 10136x + 1162$	0.991
Ethyl acetoacetate	$y = 8942x + 6104$	0.998
Furfural	$y = 9884x + 2162$	0.999
Hydroxymethylfurfural	$y = 15928x + 7932$	0.998
Malonaldehyde	$y = 28775x - 24650$	0.998
Methylmalonaldehyde	$y = 11462x + 6783$	0.984
Succinaldehyde	$y = 10765x + 176$	0.999

^a The linear range is 3.125–800 pmol in all instances.

ever, when a reversed-phase system with acetonitrile was used, only a single peak was obtained.

Performance of fluorescence detection

The detection limits of the LC methods are of the order of a few femtomoles. Figure 5 shows the reliability of the detectability of the method. The detection limit (DL) was obtained for 20- μ l aliquots of samples using a peak-height integrator signal-to-noise ratio of 3 (Table 6), calculated as $DL = 3 \sigma b / \bar{a}$, where σb and \bar{a} are respectively the standard deviation of the intercept and the mean of the slope of six calibration graphs determined by linear regression.

To construct calibration graphs for quantification, increasing amounts of carbonyl compounds were derivatized and analysed as described above. From the chromatograms obtained (fluorescence detection) the relationships between peak area and concentration of the carbonyls were calculated using the calibration graph.

Table 7 gives the equations and correlation coefficients obtained with fluorescence detection (system I). The calibration graphs for the carbonyl compounds used were linear over the range 3.125–800 pmol per injection and the relative standard deviations were less than 1.8% ($n = 6$) for 100 pmol per injection.

Conclusion

Derivatization of carbonyl compounds improves the sensitivity of their assay. The luminarin 3 derivatization reagent for carbonyl compounds in LC with fluorescence detection proved satisfactory with respect to reactivity, resolution, analysis time and sensitivity. The method may be of value for carbonyl determinations at trace levels in biological, pharmaceutical and environmental research.

This work was supported in part by a grant-in-aid (Aguire Basualdo) for scientific research from the Chancellery of the University (Paris, France).

REFERENCES

- 1 G. Avigad, *J. Chromatogr.*, 139 (1977) 347.
- 2 W.F. Alpenfels, *Anal. Biochem.*, 114 (1981) 153.
- 3 M. Takeda, M. Maeda and A. Tsuji, *J. Chromatogr.*, 244 (1982) 347.
- 4 V. Graef, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 8 (1970) 320.
- 5 R. Chayen, R. Dvir, S. Gould and A. Harrel, *Anal. Biochem.*, 42 (1971) 283.
- 6 T. Kawasaki, M. Maeda and A. Tsuji, *J. Chromatogr.*, 232 (1982) 1.
- 7 T. Kawasaki, M. Maeda and A. Tsuji, *J. Chromatogr.*, 226 (1981) 1.
- 8 T. Kawasaki, M. Maeda and A. Tsuji, *J. Chromatogr.*, 163 (1979) 143.
- 9 A.D. Reid and P.R. Barker, *J. Chromatogr.*, 260 (1983) 115.
- 10 R.W. Frei and J.F. Lawrence, *J. Chromatogr.*, 83 (1973) 321.
- 11 J.M. Anderson, *J. Chromatogr.*, 330 (1985) 347.
- 12 K. Imai, S. Higashidate, Y. Tsukamoto, S. Uzu and S. Kanda, *Anal. Chim. Acta*, 225 (1989) 421.
- 13 K. Imai, S. Higashidate, A. Nishitani and Y. Tsukamoto, *Anal. Chim. Acta*, 227 (1989) 21.
- 14 G. Gübitz, R. Wintersteiger and R.W. Frei, *J. Chromatogr.*, 7 (1984) 839.
- 15 S. Uzu, S. Kanda, K. Imai, K. Nakashima and S. Akiyama, *Analyst*, 115 (1990) 1477.
- 16 R. Weinberger, T. Koziol and G. Millington, *Chromatographia*, 19 (1984) 452.
- 17 J. Goto, Y. Saisho and T. Nambara, *Anal. Sci.*, 5 (1989) 399.
- 18 M. Tod, R. Farinotti, I. Gaury and G. Mahuzier, *Anal. Chim. Acta*, 217 (1989) 11.
- 19 M. Tod, M. Prevot, R. Farinotti and G. Mahuzier, *J. Chromatogr.*, 542 (1991) 295.
- 20 M. Tod, M. Prevot, M. Poulou, R. Farinotti, J. Chalom and G. Mahuzier, *Anal. Chim. Acta*, 223 (1989) 309.
- 21 H. Esterbauer and T.F. Slater, *IRCS Med. Sci.*, 9 (1981) 749.
- 22 E. Sawicki and C.R. Sawicki, *Aldehydes: Photometric Analysis*, Vol. 2, Academic, London, 1975, p. 264.
- 23 C.A. Parker and W.T. Rees, *Analyst*, 85 (1960) 587.
- 24 G. Weber and F.J. Farris, *Biochemistry*, 18 (1979) 3075.
- 25 J.B.F. Lloyd, *J. Chromatogr.*, 178 (1979) 249.
- 26 M. Tod, PhD Thesis, Université Paris-Sud, 1990, No. 138.
- 27 A.N. Kost and I.I. Grandberg, *Adv. Heterocycl. Chem.*, 6 (1966) 347.
- 28 R. Farinotti, Ph. Siard, S. Kirkiacharian, B. Valeur and G. Mahuzier, *J. Chromatogr.*, 269 (1983) 81.
- 29 G.A. Reynolds and K.H. Drexhage, *Opt. Commun.*, 13 (1975) 222.
- 30 G. Jones, II, W.R. Jackson and A.M. Halpern, *Chem. Phys. Lett.*, 72 (1980) 391.
- 31 G. Jones, II, W.R. Jackson, C. Choi and W.R. Bergmark, *J. Phys. Chem.*, 89 (1985) 294.

III-5 DETERMINATION PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE DU MALONALDEHYDE DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES APRES DERIVATION PAR LA LUMINARINE 3

La peroxydation lipidique (lipoperoxydation) induite par les enzymes ou par la présence de radicaux libres est impliquée dans de nombreuses pathologies (infarctus du myocarde, athéroscléroses, diabète, hépatopathies, vieillissement cellulaire, rhumatisme, pathologies malignes, rejet de greffe) et toxicité due à certains solvants, pesticides et médicaments [CROSS et coll., (1987); LAZZARINO et coll., (1987); EKSTRÖM et coll., (1988a); LUNEC (1990); TOMITA et coll., (1990b); NOBERASCO et coll., (1991); SHARA et coll., (1992)].

Les acides gras polyinsaturés constituent la principale cible des radicaux libres et des enzymes. Leur attaque se traduit par la formation de plusieurs produits de dégradation dont le malonaldéhyde [BENEDETTI et coll., (1980); ESTERBAUER et coll., (1982); RECKNAGEL et GLENDE (1984); WADE et VAN RIJ (1985); CORONGIU et coll., (1986); HUNTER et MOHAMED (1986); PITKÄNEN et coll., (1989); WEBER (1990); TAMURA et SHIBAMOTO (1991); THOMAS et coll., (1991)]. L'expérience a prouvé que le malonaldéhyde, produit du métabolisme et de la dégradation des acides gras polyinsaturés, principalement l'acide arachidonique (acide eicosatétraoïque) [TAMURA et SHIBAMOTO (1991)], était l'un des produits formés au cours de ce processus et pouvant servir de marqueurs de lipoperoxydation dans les domaines médical et alimentaire [OHKAWA et coll., (1979); UMANO et coll., (1988); GUTTERIDGE et HALLIWELL (1990)]. Le malonaldéhyde est aussi formé à partir de différents lipoxides, hydroperoxydes, endoperoxydes et peroxydes d'acides gras polyinsaturés, on le retrouve également à différents stades de métabolisme dans

l'organisme en tant que produit secondaire, particulièrement lors de la biosynthèse des prostaglandines, des thromboxanes et de la prostacycline [PRYOR et STANLEY (1975); WADE et coll., (1985)].

III-5-1 Rappel sur la lipoperoxydation [PRE (1991, 1992, 1993)]

La lipoperoxydation est un processus permanent et ubiquitaire se développant simultanément à l'aide d'enzymes (dioxygénases, lipoxygénases) ainsi que spontanément (auto-lipoperoxydation) sous forme d'un enchaînement de réactions particulières dites "radicalaires". Indispensable à l'organisme, la lipoperoxydation enzymatique conduit à la formation d'eicosanoïdes très divers biologiquement très actifs et d'espèces radicalaires oxygénées exerçant leur pouvoir bactéricide dans les foyers infectieux. A l'inverse, la lipoperoxydation spontanée s'avère toujours néfaste. Dans les conditions physiologiques normales, elle reflète la toxicité de l'oxygène. Elle est en effet fonction de l'activité métabolique et par là même, de la consommation de ce gaz à partir duquel sont inexorablement produites des formes très réactives (états singulet, anion superoxyde, radical hydroxyl) fortement impliquées dans l'initiation de ce processus délétère qui, lors de défaillances et/ou de débordements des systèmes de défense, est un élément majeur de la désorganisation cellulaire. Pouvant être aussi induite par des espèces chimiques de type radicalaire ou des intermédiaires radicalaires issus du métabolisme de certains xénobiotiques, la lipoperoxydation concerne essentiellement les acides gras polyinsaturés libres ou intégrés dans les structures lipidiques des lécithines des membranes cellulaires par exemple.

Volet lipidique des agressions radicalaires, la lipoperoxydation amplifie ce type d'agression par les radicaux qu'elle génère au cours de sa

phase de propagation. Elle exerce par ailleurs une toxicité propre liée aux aldéhydes issus de la dégradation des formes lipoperoxydées instables.

En effet, les produits ultimes de la lipoperoxydation sont essentiellement constitués d'aldéhydes, d'acides et de traces d'hydrocarbures tous issus de la coupure d'hydroperoxydes dont l'instabilité est grande en présence de fer ionisé et hémique [ESTERBAUER et coll., (1982)]. Ainsi, l'acide linoléique qui renferme 2 doubles liaisons dans un enchaînement malonique (-CH=CH-CH₂-CH=CH-) conduit à la formation de 4 monohydroperoxydes différents dont les plus importants au plan quantitatif sont les acides 13-hydroperoxy octadéca 9,11-diénoïque (13 LOOH) et 9-hydroxyperoxy octadéca 10,12-diénoïque (9 LOOH). Ces monohydroperoxydes (13 LOOH et 9 LOOH) sont l'objet de 2 types de scissions s'accompagnant d'une production de \bullet OH et aboutissant à la formation de pentane, d'hexenal, de 2,4-nonadiénal, de 2,4-décadiénal ainsi que d'autres composés (acides, aldéhydes acides) qui, eux aussi, sont l'objet de transformations complexes encore mal élucidées.

L'acide arachidonique (C₂₀) présentant 4 doubles liaisons en position malonique conduit par ce jeu complexe de réactions à 6 formes majeures de monohydroperoxydes. Selon que la soustraction de l'H \bullet s'effectue sur le C7 ou le C10 ou le C13 (-¹C O O H), on obtient essentiellement et respectivement les couples suivants : 5 LOOH et 9 LOOH, 8 LOOH et 12 LOOH, 11 LOOH et 15 LOOH à partir desquels sont obtenus de nombreux composés de coupure.

Certains radicaux monoperoxyde généralement minoritaires et présentant au moins 3 doubles liaisons en position malonique (le 12 LOO \bullet de l'acide linoléique par exemple) sont, après transformation en hydroperoxyl-épidioxyde par fixation d'une nouvelle molécule d'O₂ et

soustraction d'un H[•], à l'origine d'un dialdéhyde tricarboné, le malonaldéhyde (MDA) qui apparaît donc comme un produit très minoritaire de la lipoperoxydation.

Les principaux aldéhydes issus des réactions de coupure sont des 4-hydroxyalkénals dont le plus abondant est le 4-hydroxy-2-trans nonéal, issu de l'oxydation disruptive des acides gras polyinsaturés ω 6. Le 4-hydroxy-2-trans hexéal provient de la peroxydation des acides gras polyinsaturés ω 3. D'autres structures de même type ont été identifiées tels que le 4,5-dihydroxydécenal, le 4,5-hydroperoxynéal, le 4-hydroxyundécenal.

Les divers alcanes formés comportent de 2 à 8 atomes de carbone et sont présents à l'état de traces dans l'air expiré. L'éthane et le pentane proviennent respectivement des acides gras polyinsaturés ω 3 et ω 6. Dans le cas de la formation d'éthane, l'avant dernière étape consiste en une scission d'un radical alkoxy (16 LOOH de l'acide linoléique) aboutissant à un radical éthyl. Pour le pentane, la scission (du 13 LOOH de l'acide linoléique par exemple) aboutit à un radical pentyl.

Les produits aldéhydiques de coupure ainsi que les hydrolipoperoxydes sont à l'origine de structures complexes fluorescentes, correspondant aux chromolipoïdes (lipofuscines et céroïdes) s'accumulant dans les tissus au cours du vieillissement ainsi que lors de stress oxydants ou de déficits en antioxydants (carence en tocophérol par exemple).

III-5-2 Méthodes de dosage du malonaldéhyde

L'évaluation de la lipoperoxydation s'avère relativement difficile du fait de difficultés d'ordre métabolique et analytique. La grande diversité des espèces formées (radicaux libres à très courte durée de vie,

hydroperoxydes lipidiques labiles, aldéhydes et alcanes issus de la réaction de coupure de certains dérivés, chromolipides de condensation fluorescents), ainsi que l'inégalité tissulaire des systèmes de défense rend très difficile le choix d'un marqueur du processus global. De nombreuses techniques d'évaluation ont été proposées. Certaines, très délicates d'emploi, et nécessitant un appareillage très onéreux ne sont pas adaptables aux exigences de la routine biomédicale. Nous porterons plus particulièrement notre attention sur les méthodes de dosage du malonaldéhyde les plus usuelles en biologie clinique et en industrie alimentaire (Annexe IV-8 à IV-16, pages 334-342).

La méthode la plus couramment utilisée pour doser le malonaldéhyde est basée sur la mesure spectrophotométrique (530-532 nm ou 535 nm selon qu'il se trouve en milieu aqueux ou butanolique) ou spectrofluorimétrique (λ_{ex} 532 nm, λ_{em} 550 nm) du produit de condensation formé entre le malonaldéhyde et l'acide 2-thiobarbiturique ou le 4,6-dihydroxy-2-thiopyrimidine (TBA). Du fait des circonstances de sa découverte et des premières études qui lui ont été consacrées, la réaction thiobarbiturique, souvent considérée, et ce, excessivement, comme le reflet du seul malonaldéhyde, apparaît comme le test de lipoperoxydation le plus ancien et de beaucoup le plus utilisé.

Cette réaction a fait l'objet de très nombreux protocoles. Elle consiste généralement en une incubation à 95-100°C de durée variable (10 à 60 min) en milieu acide, ce qui permet notamment de libérer le malonaldéhyde des combinaisons (bases de Schiff) dans lesquelles il est engagé.

Il est bien établi que de nombreux aldéhydes (alkanals, alkénals, 2,4 alka diénals, 4-hydroxyalkénals) sont produits lors de la lipoperoxydation. En plus du malonaldéhyde, le 4-hydroxynonéal, l'hexanal, le propanal et

le propenal sont parmi les plus abondants [ESTERBAUER et coll., (1982); HIRAYAMA et coll., (1990)]. Ces aldéhydes dans différentes conditions produisent avec le TBA des chromogènes jaunes, oranges et rouges dont les maximums d'absorption sont respectivement à 455, 495 et 532 nm.

De plus, de fortes valeurs d'absorbance ou de fluorescence ont été signalées lorsque les échantillons renferment des ions métalliques tels que le Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Cr^{2+} , Ce^{2+} , Fe^{2+} et Fe^{3+} [ASAKAWA et MATSUSHITA (1980); BIRD et DRAPER (1984)]. En milieu acide (pH 2,7) et en présence de Fe^{3+} , le 2-hexenal et le 2,4-hexadienal forment avec le TBA plus rapidement qu'avec le malonaldéhyde un complexe rose dont le maximum d'absorption est à 532 nm [BIGWOOD et READ (1989)].

Il apparaît donc que, dans certaines conditions analytiques, la réaction à l'acide thiobarbiturique reflète non seulement la présence de malonaldéhyde mais aussi celle des aldéhydes issus de la dégradation des hydroperoxydes lipidiques.

De plus, de nombreuses molécules non issues de la lipoperoxydation peuvent également, dans certaines conditions, produire un chromogène rose ayant les mêmes caractéristiques spectrophotométriques que le composé d'addition acide thiobarbiturique-malonaldéhyde (TBA-MDA). C'est notamment le cas de pyrimidines substituées, de la sulfadiazine, la bilirubine, la biliverdine et des sérums hémolysés [KNIGHT et coll., (1988)]. Certains oses tels le fructose et avec un moindre effet le glucose amplifient la formation du pigment rouge à partir d'aldéhydes insaturés (2,4-hexadienal, 2,4-decadienal). La bilirubine, la biliverdine et les sérums hémolysés conduisent à une coloration rose orangé présentant une absorption marquée à 450 nm et 532 nm. Ces réactions parasites perturbent parfois les lectures spectrophotométriques et spectrofluorimétriques et ce même si elles sont pratiquées sur un extrait butanolique.

C'est pourquoi, certains auteurs ont proposé des méthodes plus sélectives basées sur la séparation chromatographique (Annexe IV-8 à IV-16, pages 334-342).

Pour notre part, nous proposons une technique simple de dérivation du malonaldéhyde par la luminarine 3. L'étude de la réaction de dérivation (cinétique, influence du pH, concentrations des réactifs), la détermination des propriétés spectrales du dérivé formé dans le mélange acétonitrile-tampon imidazole nitrate et l'étude des conditions chromatographiques permettent de proposer une méthode en chromatographie liquide sur colonne à polarité de phases inversée suivie d'une détection fluorimétrique.

Le but essentiel de ce travail était de rechercher les conditions permettant de doser le malonaldéhyde dans le plasma. Par ailleurs, les possibilités de séparation et de détection de l'acroléine ont été abordées en vue d'un éventuel dosage simultané du malonaldéhyde et de l'acroléine dans les produits alimentaires particulièrement lors de la dégradation oxydative des acides gras [HIRAYAMA et coll., (1990)]. Cette dernière partie n'a fait l'objet d'aucune application.

Les conditions optimales de dérivation (effet du pH, cinétique de la réaction de dérivation, rendement de la réaction et stabilité des dérivés formés) utilisées sont celles précédemment décrites dans les articles 2 et 3. Bien que, en milieu fortement acide, la basicité de l'azote terminal de la luminarine 3 soit réduite par fixation d'un proton diminuant ainsi son caractère nucléophile, il a été montré que le pH acide semble néanmoins le mieux indiqué pour dériver des quantités faibles de malonaldéhyde. Le milieu aqueux et la température du laboratoire semblent être également les meilleures conditions.

III-5-3 Matériel et méthodes

- Réactifs

1,1,3,3-tetraéthoxypropane TEP (ALDRICH); acétonitrile pur pour C.L.H.P (FSA LABORATORY); acétylacétone ou 2,4-pentanedione (SIGMA); acide nitrique concentré (PROLABO); acide sulfurique concentré (TOUZART-MATIGNON); acroléine ou 2-propenal (ALDRICH); dichlorométhane "pour fluorimétrie" (FSA LABORATORY); diméthylsulfoxyde" pour fluorimétrie " (PROLABO); hydrogénocarbonate de sodium (JANSEN); hydroxyde de sodium (PROLABO); imidazole (ALDRICH); luminarine 3 (EUROBIO-SERATEC, FRANCE); sulfate de quinine (MERCK).

- Préparation des solutions

Solution standard de malonaldéhyde

Le malonaldéhyde (MDA) est préparé par hydrolyse acide du 1,1,3,3-tetraéthoxypropane (TEP), tout en considérant que la conversion du 1,1,3,3-tetraéthoxypropane en malonaldéhyde est de 100 % [EKSTRÖM et coll., (1988a)]. Dans une fiole jaugée colorée en brun de 100 ml, introduire 0,245 ml de 1,1,3,3 tetraéthoxypropane et compléter le volume avec de l'acide sulfurique à 1% m/v. Bien mélanger et laisser reposer à l'abri de la lumière et à la température du laboratoire pendant deux heures. Cette solution contient 10 mM de malonaldéhyde et est stable à -20°C pendant plusieurs mois. Son titre est déterminé en UV à 245 nm.

Les différentes solutions standards filles sont obtenues par dilution de la solution mère (10 mM) avec de l'acide sulfurique 1%, m/v.

Solution standard de luminarine 3

La luminarine 3 est préparée en solution 10 mM dans le diméthylsulfoxyde. Cette solution se conserve pendant plusieurs mois à -20°C.

Solution standard de l'étalon interne (luminarine 3-méthylmalonaldéhyde)

Préparer une solution à 0,25 mM de luminarine 3-méthylmalonaldéhyde (Lu3-MeMDA); pour cela introduire dans un tube à essai 19,05 mg exactement pesés de Lu3-MeMDA et ajouter 4 ml de diméthylsulfoxyde (solution mère à 25 mM). Diluer cette solution par le dichlorométhane pour avoir la concentration désirée.

Solution tampon imidazole nitrate 10 mM pH 7,5

Ajuster le pH de la solution avec de l'acide nitrique concentré.

Solution acide d'acétylacétone

Préparer extemporanément une solution d'acétylacétone 1M dans l'acide sulfurique 1% (m/v).

Solution acide d'acroléine

Préparer extemporanément une solution d'acroléine 0,1 mM dans l'acide sulfurique 1% (m/v). Diluer si nécessaire avec le même solvant pour avoir la concentration désirée.

- Instrumentation

Le système chromatographique utilisé est un modèle de CLHP équipé d'une pompe chromatem 380 (TOUZART-MATIGNON), un injecteur RHEODYNE® 7125 avec une boucle de 20 µl, un détecteur

spectrofluorimétrie (WATERS-MODEL 420-C,SERIE N°01804), et un intégrateur (SHIMADZU-C-R5A CHROMATOPAC). Les mesures d'absorbance ont été réalisées en utilisant un spectrophotomètre UV-VISIBLE (SHIMADZU-UV-2100 SERIE N°1255239). Pour la détermination du rendement quantique relatif de fluorescence, un spectrofluorimètre (PERKIN ELMER MODEL LS 50 SERIE N°28244) a été utilisé.

- Conditions chromatographiques

La séparation chromatographique est réalisée sur une colonne nucléosil C18-5 μm (150 x 4,6 mm de diamètre interne) (BECKMANN), avec pour phase mobile un mélange isocratique acétonitrile-tampon imidazole nitrate pH 7,5 (30/70, v/v) à un débit de 1,5 ml/mn à la température du laboratoire.

En détection spectrofluorimétrie, on utilise, respectivement pour l'excitation et l'émission, les filtres à 395 et 500 nm.

- Procédure de dérivation

La procédure de dérivation a été appliquée sur des solutions aqueuses de malonaldéhyde et d'acroléine et à des sérums surchargés d'une quantité connue de malonaldéhyde.

Solution aqueuse de malonaldéhyde et d'acroleine

Dans un tube à essai de 5 ml, introduire 200 μl de solution acide de malonaldéhyde et d'acroléine puis 10 μl de solution de luminarine 3 (10 mM). Mélanger, protéger de la lumière et laisser à la température du laboratoire pendant 1 heure. Ajouter 10 μl de solution acide d'acétylacétone 1M. Mélanger de nouveau et laisser en contact pendant 5 min. Ajouter 100 μl de solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de

sodium à 5%. Bien mélanger jusqu'à disparition complète des bulles. Au contenu du tube, ajouter 20 μl de solution chloroformique de $\text{Lu}_3\text{-MeMDA}$ 0,25 mM (étalon interne) et 680 μl de dichlorométhane. Agiter au vortex pendant 2 min puis centrifuger à 3000 tours/mn pendant 5 min. Eliminer la phase aqueuse supérieure, évaporer à sec la phase organique sous un courant d'azote. Le résidu sec est dilué avec 100 μl ou plus d'acétonitrile pour que la quantité de dérivé injectée soit comprise entre 5-20 pmoles.

La concentration en malonalaldéhyde et en acroléine est calculée à partir d'une droite d'étalonnage obtenue en utilisant des mélanges de quantités connues de malonalaldéhyde et d'acroléine.

Sérum ou plasma

Dans un tube à essai de 5 ml, introduire 400 μl de sérum ou plasma puis 100 μl de solution d'hydroxyde de sodium à 1% et 500 μl d'acétonitrile. Agiter au vortex pendant 1 min et incuber au bain-marie à 60°C pendant 30 min. Après centrifugation à 5000 tours/mn pendant 20 min, 300 μl de surnageant sont traités avec 200 μl de solution d'acide sulfurique à 1%. Bien mélanger, et procéder comme décrit ci-dessus en ajoutant 10 μl de solution de luminarine 3 (10 mM) et en poursuivant le protocole opératoire.

III-5-4 Résultats et discussion

- Condensation de la luminarine 3 avec le malonalaldéhyde

La réaction de condensation de la luminarine 3 avec les composés dicarbonylés peut avoir lieu en mettant en jeu 1 ou 2 molécules de luminarine. Dans ce premier cas, une réaction de cyclisation est possible donnant lieu à la formation d'un dérivé pyrazolé.

Le malonaldéhyde, le méthylmalonaldéhyde et l'acroléine réagissent avec la luminarine 3, réactif nucléophile, en milieu acide pour former des dérivés comme il est montré dans les articles 2 et 3. Les dérivés luminarine 3 -malonaldéhyde, -méthylmalonaldéhyde et acroléine ont été confirmés quant à leur structure par spectrométrie de masse en ionisation chimique à l'ammoniac, impact électronique et RMN (voir Annexe I-4, pages 299-308).

Le spectre de masse en impact électronique du dérivé luminarine 3-malonaldéhyde donne un modèle de fragmentation compatible avec la structure proposée dans l'article 2.

La masse ($M+1= 368$) de l'ion moléculaire obtenu par ionisation chimique prouve, que la réaction de condensation entre la luminarine 3 et le malonaldéhyde est bien une réaction équimolaire.

- Préparation du malonaldéhyde

Le malonaldéhyde peut être préparé par hydrolyse acide du TMP ou du TEP; il est instable et ne peut être trouvé à l'état pur. On préfère quelquefois le synthétiser soit par voie enzymatique par l'action de l'alcool déshydrogénase sur le 1,3-propanediol [SUMMERFIELD et TAPPEL (1978)], soit l'isoler à l'état de sel sodique en faisant suivre l'hydrolyse acide d'une neutralisation à pH 8 par la soude 5N, puis évaporation à sec sous vide à 40°C et purification en milieu éthanol anhydre [LACOMBE et coll, (1990)]. Ces dernières techniques étant plus longues, nous avons préféré celle se limitant à une simple hydrolyse acide.

L'hydrolyse acide du tétraéthoxypropane (TEP) ou du tétraméthoxypropane (TMP) peut s'accompagner de la production d'une légère coloration jaune due probablement à la polymérisation des molécules de malonaldéhyde [GUTTERIDGE (1975)]. Pour éviter la formation de ces polymères, il est conseillé de travailler sur des solutions

très diluées de TEP ou TMP. La littérature rapporte par ailleurs que le mélange à volume égale de TEP et de solution acide ne donne pratiquement qu'un seul produit d'hydrolyse, la β -éthoxyacroléine [MARNETT et TUTTLE (1980)] (Figure 19), ce qui dénote une hydrolyse incomplète, et justifie de travailler en solution fortement diluée.

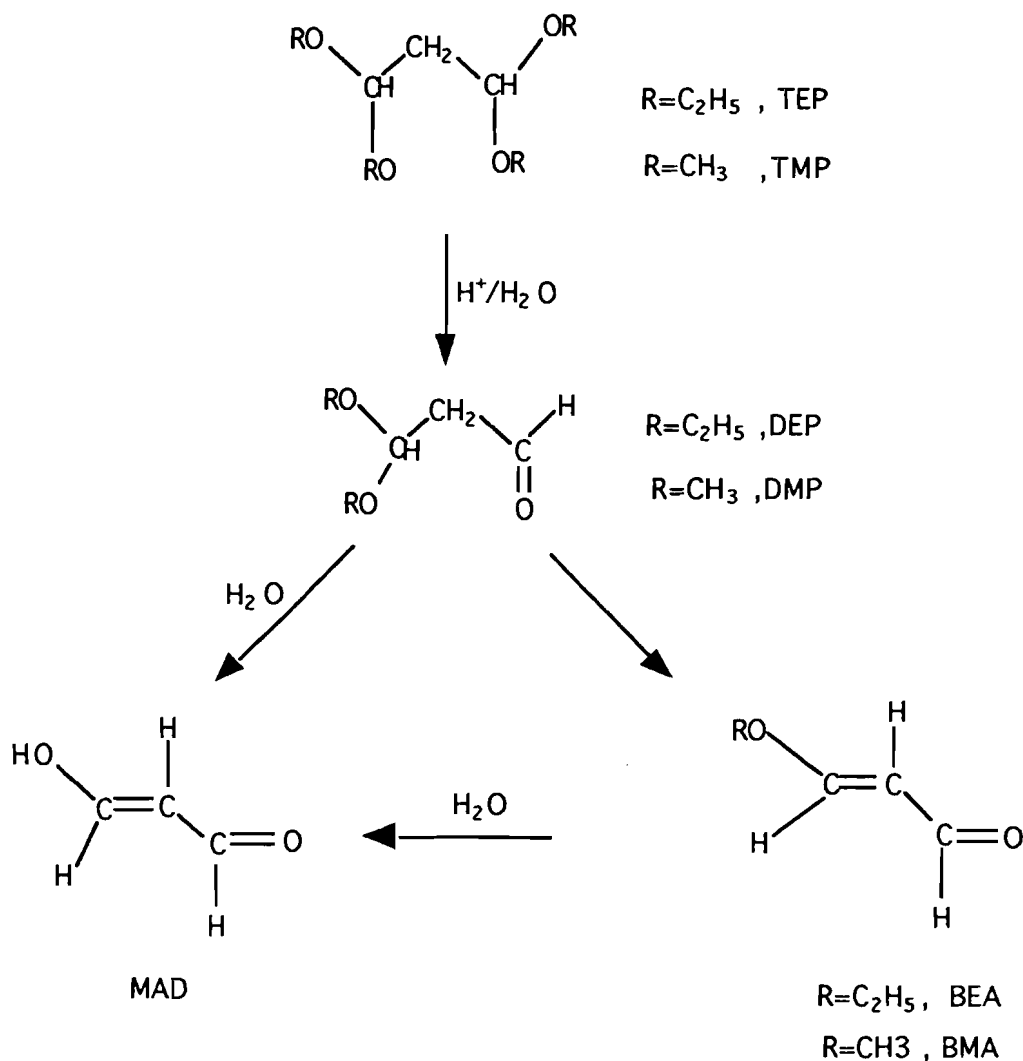
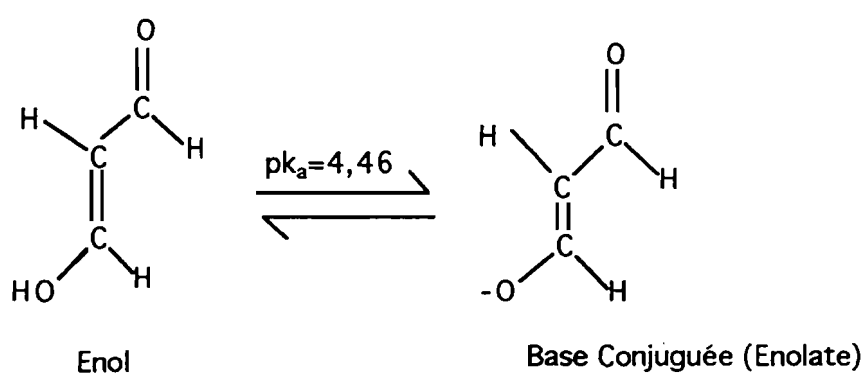


Figure 19 : Schéma probable de l'hydrolyse du TEP ou TMP en MDA

Les produits secondaires formés (β -éthoxy (BEA) ou méthoxyacroléine (BMA)) au cours de l'hydrolyse acide du TEP ou du TMP

ne peuvent exister dans les conditions physiologiques où le malonaldéhyde se trouve exclusivement sous forme de base conjuguée [MARNETT et TUTTLE (1980)].

En effet, le malonaldéhyde sous sa forme énol peut être considéré comme un acide faible ($pK_a=4,46$) [MARNETT et TUTTLE (1980)] dont l'énolate, sa base conjuguée, semble être moins réactive vis à vis des réactifs nucléophiles et ne participent pas aux réactions de condensation.



La cinétique de formation du malonaldéhyde est fortement influencée par le pH du milieu et la température. Cette étude réalisée en quantifiant le malonaldéhyde formé par spectrophotométrie UV à 245 nm (λ_{max} de la forme énol) montre que les meilleurs rendements de conversion du TEP en MDA sont obtenus par incubation à 50°C .

A $pH \leq 1$, quelque soit la température, il y a 100% de transformation du TEP en MAD. A pH 3, seulement 60% de MAD sont formés à 50°C; alors qu'à 20-25°C, on ne note aucune présence de malonaldéhyde en solution. Il nous semble donc que les conditions retenues ci-dessus soient les plus favorables.

- Séparation chromatographique

Les conditions chromatographiques choisies permettent de séparer la luminarine 3 des dérivés formés avec le malonaldéhyde, méthylmalonaldéhyde, acroléine et acétylacétone. Les différents temps de rétention et sélectivités sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau I : Temps de rétention et sélectivité de la luminarine 3 et de ses principaux dérivés

Molécules séparées	Temps de rétention (minutes)	Sélectivité (α)
luminarine 3	4,8	-
luminarine 3 - malonaldéhyde	11,0	2,78
luminarine3- méthylmalonaldéhyde	17,8	1,70
luminarine 3 - acroléine	21,5	1,22
luminarine 3- acétylacétone linéaire	26,2	1,23
luminarine3- acétylacétone cyclique	39,1	1,52

La figure 20 représente les chromatogrammes correspondants à un mélange de solutions standards de luminarine 3, luminarine 3 - malonaldéhyde, luminarine 3 - méthylmalonaldéhyde et luminarine 3 - acroléine.

La figure 21 représente les chromatogrammes obtenus, à partir d'une d'un plasma témoin et surchargé (20 nmoles/ml), en utilisant la procédure de dérivation décrite ci-dessus.

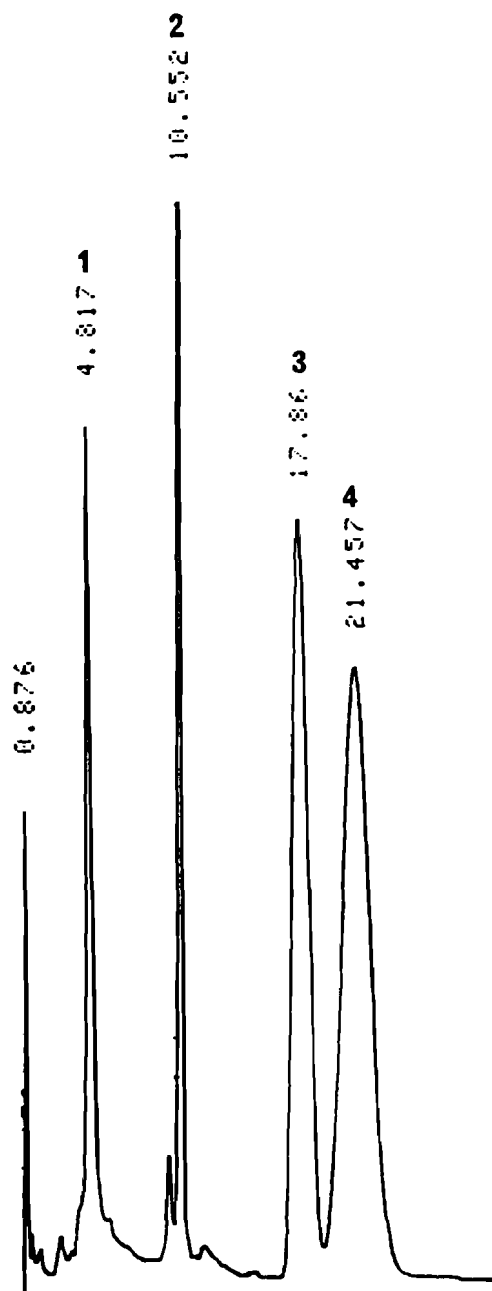


Figure 20 : Profil d'élution d'un mélange de solutions standards de luminarine 3 (50 pmoles), Lu.3-MDA (25 pmoles), Lu.3-MeMDA (50 pmoles) et Lu.3-ACRO (250 pmoles)

1 = luminarine 3 (4,82 min);
2 = Lu.3-MDA (10,55 min);
3 = Lu.3-MeMDA (17,86 min);
4 = Lu.3-ACRO (21,46 min)

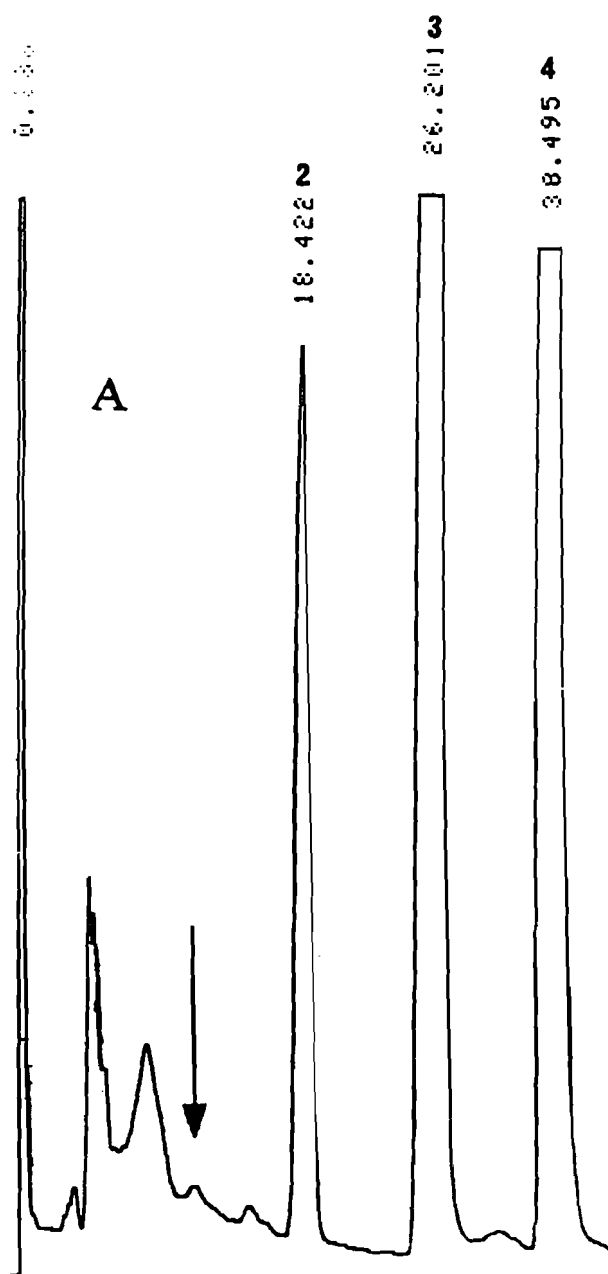


Figure 21 : (A) Profil d'éluion d'un plasma humain de contrôle, la flèche indique la position du dérivé luminarine 3 - malonaldéhyde

2 = luminarine 3 - méthylmalonaldéhyde (18,42 min)

3 = luminarine 3 - acétylacétone linéaire (26,20 min)

4 = luminarine 3 - acétylacétone cyclique (38,50 min)

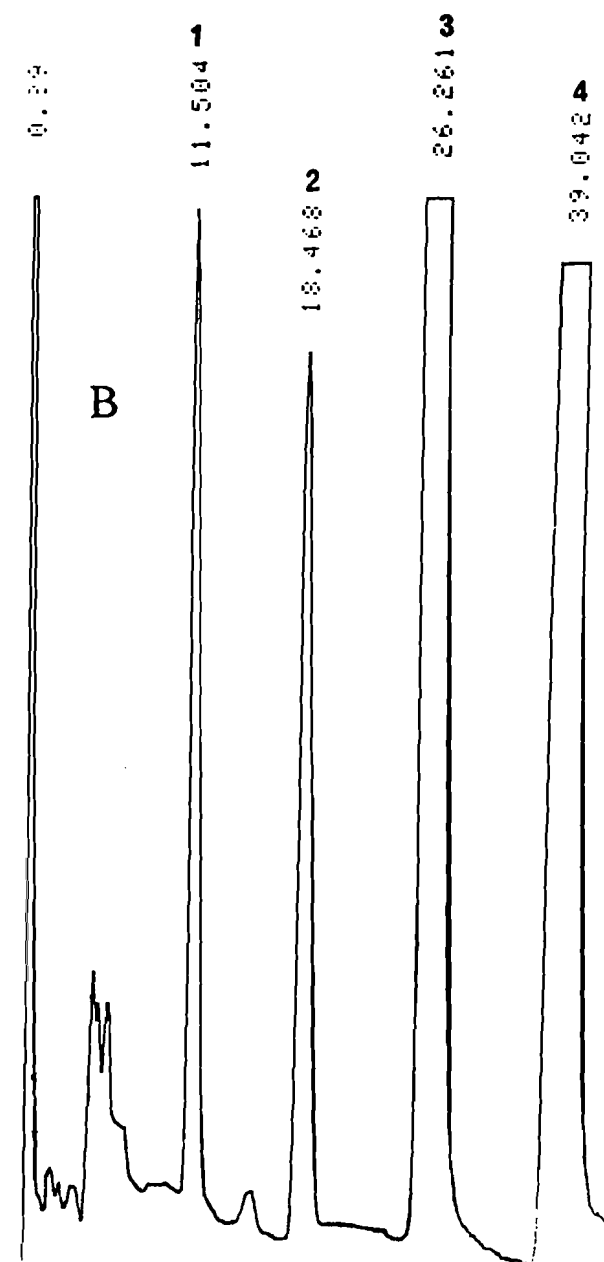


Figure 21 : (B) Profil d'éluion du même plasma auquel on a rajouté 20 nmoles de MDA/ml (quantité injectée équivalente à 20 pmoles du dérivé luminarine 3 - malonaldéhyde)

1 = luminarine 3 - malonaldéhyde (11,50 min)

2 = luminarine 3 - méthylmalonaldéhyde (18,47 min)

3 = luminarine 3 - acétylacétone linéaire (26,26 min)

4 = luminarine 3 - acétylacétone cyclique (39,04 min)

- *Propriétés spectrales*

Les propriétés d'absorbance et de fluorescence présentées par les dérivés luminarine 3 - malonaldéhyde, luminarine 3 - acroléine et luminarine 3 - méthylmalonaldéhyde ont été mises à profit pour leur détection en chromatographie liquide.

En effet, on peut voir (Annexe III-7 à III-11, pages 321-325) que si la position des maximums d'excitation varie peu en fonction de la composition du solvant constituant la phase mobile, les maximums d'émission subissent un effet bathochrome marqué avec l'augmentation de la polarité du mélange acétonitrile-tampon imidazole nitrate. Ceci traduit l'augmentation de l'interaction dipôle-dipôle entre l'état excité légèrement polarisé de la molécule et le solvant, ce qui caractérise une émission de fluorescence de type $\pi^* \rightarrow \pi$.

Les variations d'intensité de fluorescence de la luminarine 3 et des dérivés luminarine 3-malonaldéhyde, luminarine 3 - méthylmalonaldéhyde, luminarine 3 - acroléine en fonction de la teneur en acétonitrile de la phase mobile ont été étudiées en déterminant les rendements quantiques relatifs et la sensibilité intrinsèque de fluorescence de ces molécules, selon la méthode proposée par PARKER et REES (1960).

Les sensibilités intrinsèques de fluorescence ($\epsilon \cdot \phi_f / H$) des différentes molécules pré-citées permettent donc de prévoir des limites de détection assez basses.

Les rendements quantiques présentés à l'annexe III-7 à III-11, pages 321-325) ont été calculés par rapport au sulfate de quinine en solution sulfurique 0,05 M en se plaçant à une longueur d'onde d'excitation de 399 nm. Les rendements quantiques des dérivés luminarine 3 - malonaldéhyde, luminarine 3 - méthylmalonaldéhyde et luminarine 3 - acroléine sont maximum dans l'acétonitrile pur.

Cependant, un mélange acétonitrile-tampon imidazole nitrate (30/70, v/v) permet d'atteindre une sensibilité amplifiée par le processus d'extraction (évaporation à sec de l'extrait dichlorométhanique).

- Caractéristiques de la méthode

Dans le domaine de concentrations étudiées, la droite d'étalonnage établie à partir d'une solution standard de malonaldéhyde est linéaire ($y = 19,14 x - 4,07$; $r = 0,997$) entre 1 - 20 nmoles/ml. La limite de détection, du dérivé luminarine 3 - malonaldéhyde, pour un signal correspondant à 3 fois le bruit de fond est d'environ 100 fmoles injectées (Tableau II).

Les méthodes spectrophotométriques fournissent des valeurs de sensibilité s'échelonnant de 1 à 2 nmoles de MDA : 1 nmole [OHKAWA et coll., (1979)], 2 nmoles [KWON et WATTS (1963)]. Des valeurs inférieures, sont obtenues avec les méthodes spectrofluorimétriques : 5 pmoles [CONTI et coll., (1991)], 100 pmoles [YAGI (1976)], 110 pmoles [RICHARD et coll., (1992a)], exceptée la méthode spectrofluorimétrique basée sur la réaction de Hantzsch [KIKUGAWA et coll., (1988)] où l'on estime la limite de détection à 5 nmoles. La méthode par spectrofluorimétrie synchrone, décrite par CONTI et coll., (1991), présente l'avantage de réduire les interférences, lors des mesures de l'intensité de fluorescence, particulièrement celles dues à la diffusion Rayleigh à cause de la proximité des maximums d'excitation et d'émission.

Les méthodes chromatographiques permettent d'évaluer spécifiquement le MDA et d'établir par là-même des valeurs de référence sériques et plasmatiques à partir desquelles la fiabilité des méthodes usuelles peut être appréciée. Elles sont très sensibles (Annexe IV-8 à IV-16, pages 334-342) et indiquent les valeurs normales de MDA/ml de

plasma (0,41-1,37) plus petites que celles fournies par les méthodes spectrofluorimétriques ou spectrophotométriques (1-4 nmoles de MDA/ml de plasma). A titre d'exemple, avec le protocole de WONG et coll., (1987), les valeurs normales sont de $0,60 \pm 0,13$ nmoles de MDA/ml de plasma.

La sensibilité obtenue par notre méthode peut être donc suffisante pour la détermination du MDA dans le plasma.

Le coefficient de variation de la méthode déterminé sur le malonaldéhyde ($n = 6$) en solution aqueuse (20 nmoles/ml) est de 2,6%, alors que celui dans le plasma de contrôle (20 nmoles/ml) est de 4,8%. Le taux de recouvrement du malonaldéhyde ajouté au plasma est $\geq 97\%$. Ceci nous permet de dire que le recouvrement du malonaldéhyde n'est pas affecté par la technique de déprotéinisation décrite ci-dessus.

Tableau II : Limite de détection de la luminarine 3 et de ses principaux dérivés

Molécules	Limite de détection (fmoles injectées)
Luminarine 3	356
Luminarine 3 - malonaldéhyde	125
Luminarine3-méthylmalonaldéhyde	208
Luminarine 3 - acroléine	650

En conclusion, la présente méthode peut être facilement adaptée aux déterminations spécifiques du malonaldéhyde. L'utilisation de la luminarine 3 comme réactif de dérivation et l'addition de l'acétylacétone,

du dérivé luminarine 3 - méthylmalonaldéhyde dans le mélange réactionnel contribuent à la bonne sensibilité et reproductibilité de cette méthode. Elle pourrait se prêter éventuellement à des applications telles que le dosage du malonaldéhyde dans le plasma ou sérum et celui de l'acroléine et du malonaldéhyde dans les produits alimentaires d'origine animale ou végétale.

III.6 ARTICLE 4

"Determination of malonaldehyde by coupled high-performance liquid chromatography-spectrofluorimetry after derivatization with luminarin 3"

J.Chromatogr., (1993), 648, 111-118.

De part sa structure dialdéhydrique, le MDA est très réactif et forme très facilement des bases de Schiff avec les groupements aminés libres, quelles que soient les structures aux-quelles ils appartiennent. Ainsi, il se combine aux protéines, aux phosphoaminolipides, aux oses aminés, aux acides nucléiques [NAIR et coll., (1986); STONE et coll., (1990a, 1990b); GODA et MARNETT (1991); SETO et OHKUBO (1991)]. Des composés de ce type ont d'ailleurs été mis en évidence dans les urines [SETO et OHKUBO (1991)].

Les produits de condensation du MDA avec les groupements amines libres produisent du MDA du fait de la chaleur et de l'acidité du milieu réactionnel. Il en est de même pour de nombreux dérivés d'acides gras polyinsaturés non peroxydés présents dans le milieu qui peuvent, sous l'action conjuguée de la chaleur, de l'acidité du milieu réactionnel, présence de traces de fer ionisé, des radicaux libres et de l'oxygène dissous, se peroxyder et générer du MDA.

Il apparait donc que certains auteurs parlent de "MDA totale, MDA libre et MDA liée" dans les milieux complexes. Enfin, le MDA libre n'est présent qu'à l'état de trace (de l'ordre du nanogramme par millilitre).

Dans ce travail, nous nous proposons de discuter le bien fondé du dosage du MDA libre dans les conditions douces de température et de pH et séparation par CLHP et détection fluorimétrique. Une bonne linéarité a été obtenue entre 7,2 et 90 ng/ml ($r = 0,999$) avec une précision de 11% à 7,2 ng/ml et 2% à 90 ng/ml.

CHROM. 25 272

Determination of malonaldehyde by coupled high-performance liquid chromatography–spectrofluorimetry after derivatization with luminarin 3

Falaye Traoré*, Robert Farinotti and Georges Mahuzier

Laboratoire de Chimie Analytique II, Méthodologie Bioanalytique, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Paris-Sud, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92290 Chatenay-Malabry (France)

(First received December 14th, 1992; revised manuscript received May 6th, 1993)

ABSTRACT

A high-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection is described for the specific determination of free malonaldehyde (MDA). Malonaldehyde was labelled with luminarin 3 in acetate buffer (pH 4.0) at room temperature in the dark. An aliquot of the reaction mixture was injected on to an octadecyl-bonded column using acetonitrile–imidazole buffer (30:70, v/v) as the mobile phase. The eluate was monitored with a fluorescence detector at 395 nm (excitation) and 500 nm (emission). A linear calibration graph was established between 7.2 and 90 ng/ml of MDA and the limit of quantification (LOQ) was lower than 7 ng/ml of MDA. The precision was characterized by R.S.D.s of 11% at 7.2 ng/ml and 2% at 90 ng/ml. The structure of the derivative was confirmed as the 5-hydroxy-2-pyrazoline form. UV absorbance and corrected fluorescence spectral data and quantum yields of the luminarin 3 derivative of malonaldehyde are presented.

INTRODUCTION

Several methods have been developed to determine the amount of malonaldehyde (MDA) formed by lipid peroxidation either *in vivo* or *in vitro*. The most common method MDA is based on spectrophotometric or spectrofluorimetric measurement of the condensation product formed from MDA and 2-thiobarbituric acid (4,6-dihydroxy-2-thiopyrimidine) (TBA) [1,2]. This method is not specific for MDA and often overestimates MDA levels [2–10]. Some workers have proposed more selective methods based on the chromatographic separation of MDA: in its free form [3,4]; derivatized with TBA [5,11,12] or its derivatives such as 1,3-diethyl- [6,7] or 1,3-dimethyl-, 1-methyl-, 1,3-diphenyl- and 1-

phenyl-TBA [6]; derivatized with dansylhydrazine (DNSH) [8], 2-hydrazinobenzothiazole (HBT) [9], 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) [13–15], pentafluorophenylhydrazine (PFPH) [16], *p*-nitrophenylhydrazine (NPH) [17] or *N*-methylhydrazine (NMH) [18]; and based on the formation of a fluorescent compound derived from 1,4-dihydropyridine 3,5-dicarbaldehydes, produced by a condensation reaction of malonaldehyde, aliphatic amines and aliphatic aldehydes in neutral medium (Hantzsch reaction) [10].

Reactions of MDA with TBA, DNSH, HBT or DNPH require hot and/or acidic conditions. A major drawback of these methods from a biochemical point of view is the artifactual generation of MDA from the biological materials that can be induced under the strongly acidic conditions and elevated temperatures required for the formation of the derivatives. It is therefore

* Corresponding author.

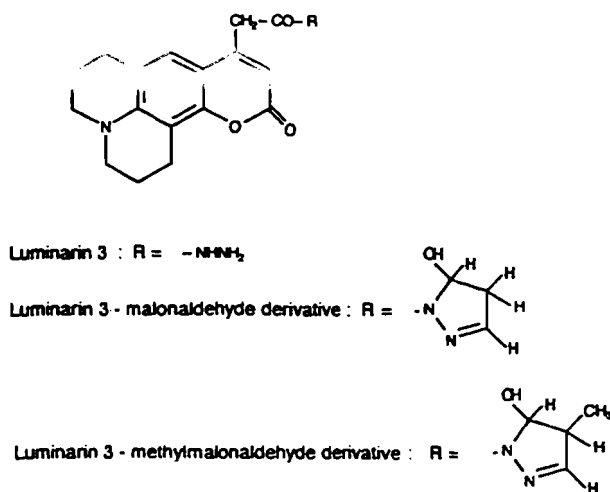


Fig. 1. Structures of luminarin 3 and its derivatives.

uncertain what proportion of the determined MDA was originally present in the sample in the free state and what proportion might have been bound or generated from precursors. Therefore, mild derivatization conditions are required for the reliable determination of free MDA.

We used the derivatizing agent luminarin 3 (Fig. 1) for the determination of low concentrations of MDA under mild conditions. Owing to its quinolizinocoumarin nucleus, luminarin 3 is a useful fluorescent and chemiluminescent label [19–21], and its hydrazine group reacts easily with carbonyl compounds, permitting the derivatization of MDA at room temperature in acetate buffer (pH 4.0).

As chemiluminescence detection requires a postcolumn reaction system with one or two additional pumps, fluorescence detection was preferred. This method is sensitive and specific for the determination of free MDA.

EXPERIMENTAL

Reagents

All reagents and solvents were of analytical-reagent grade. Luminarin 3 and 2-methyl-1,1,3,3-tetraethoxypropane (MeTEP) were obtained from Eurobio-Seratec (Les Ulis, France) and 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP), imidazole and 2,4-pentanedione (acetylacetone) from

Aldrich-Chemie (Steinheim, Germany). Quinine sulphate and silica gel (0.04–0.063 mm) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Standard malonaldehyde solution

A stock standard solution of MDA was prepared by acidic hydrolysis of TEP, assuming 100% conversion of TEP into MDA [15]. A 0.245-ml volume of TEP was placed into a brown 100-ml graduated flask, diluted to volume with 1% (w/v) sulphuric acid, mixed thoroughly and kept in the dark at room temperature for 2 h. This solution contains 10 mM MDA and can be stored at -20°C for several months. It was used to prepare a calibration graph in the range 7.2–90 ng/ml after dilution with 100 mM acetate buffer (pH 4.0). The calibration graph was constructed by plotting the peak-height ratio of the luminarin 3 derivative of MDA to standard luminarin 3-methylmalonaldehyde against MDA concentration.

The absorbance of 100 μM MDA solution in 1% sulphuric acid at λ_{max} (245 nm) was measured to verify the molar absorption coefficient and hence the purity of the solution.

Standard luminarin 3 solution

A 10 mM solution of luminarin 3 in dimethyl sulphoxide (DMSO) was prepared. This solution can be stored for several months at -20°C .

Standard luminarin 3-malonaldehyde solution

A standard solution of luminarin 3-malonaldehyde (L3-MDA) was obtained from the reaction of MDA and luminarin 3. When incubated at room temperature and stirred for 30 min, the reaction mixture was composed of 100 ml of a standard solution of MDA (72 mg, 1 mmol) and 10 ml of 100 mM luminarin 3 solution in DMSO (313 mg, 1 mmol). Sodium hydrogencarbonate (2.5 g) was added and the mixture was stirred gently until the acid had been neutralized (pH 7.0). The mixture was then extracted with 200 ml of dichloromethane. The extract was dried with anhydrous magnesium sulphate, filtered and evaporated to dryness under vacuum.

The residue was dissolved in 5 ml of dichloro-

methane and purified chromatographically on silica gel 60 (0.04–0.063 mm) using an elution gradient of 0 to 40% tetrahydrofuran in dichloromethane. The eluate was evaporated under vacuum and the residue was dried in a desiccator to give a yellow powder, yield 72.3%. Elemental analysis: calculated for $C_{20}H_{21}N_3O_4$, C 65.40, H 5.72, N 11.44; found, C 65.41, H 5.81, N 11.40%.

The structure of L3-MDA was also confirmed by 1H and ^{13}C NMR spectroscopy (data not shown). The electron impact mass spectrum was characterized by ions at m/z (relative abundance, %) 367 (19.09), 349 (5.54), 282 (8.77), 281 (8.72), 256 (9.02), 255 (48.96), 254 (20.53), 227 (10.87), 226 (17.13), 68 (100.00), 67 (13.05) and 44 (34.98).

L3-MDA was prepared as a 10 mM solution in DMSO. This solution can be stored for several months at $-20^\circ C$.

Standard solution of luminarin 3-methylmalonaldehyde (internal standard)

Luminarin 3-methylmalonaldehyde (L3-MeMDA) was synthesized as described above from MeMDA prepared by hydrolysis of 2-methyl-1,1,3,3-tetraethoxypropane in 1% sulphuric acid for 2 h at room temperature.

L3-MeMDA was obtained in the form of yellowish brown needles, yield 53%. Elemental analysis: calculated for $C_{21}H_{23}N_3O_4$, C 66.14, H 6.04, N 11.02; found, C 66.06, H 6.18, N 10.97%.

The structure of this compound was confirmed by 1H and ^{13}C NMR spectroscopy (data not shown) and its electron impact mass spectrum was characterized by ions at m/z (relative abundance, %) 381 (29.74), 363 (11.42), 282 (17.49), 281 (20.52), 256 (11.75), 255 (65.34), 254 (28.84), 227 (14.42), 226 (23.09), 82 (85.99), 81 (100.00), 57 (26.76), 56 (5.99), 55 (17.25), 54 (36.92), 44 (30.62) and 43 (12.02).

A 17 μM solution of L3-MeMDA was prepared: 38.1 mg of L3-MeMDA were placed in a test-tube and 4 ml of DMSO were added to obtain a 25 mM stock solution. This solution was diluted with the same solvent to obtain the desired concentration.

10 mM imidazole buffer solution (pH 7.0)

The pH of the solution was adjusted with concentrated nitric acid.

Acidified acetylacetone solution

A 1 M solution of acetylacetone in 1% sulphuric acid was prepared extemporaneously.

Apparatus

High-performance liquid chromatographic (HPLC) analysis was performed with a Chromatem 380 pump (Touzart-Matignon, Vitry sur Seine, France), equipped with a Rheodyne (Cotati, CA, USA) Model 7125 injector with a 20- μl sample loop and a Waters (Milford, MA, USA) Model 420-C fluorescence HPLC monitor. The data were processed in a Shimadzu C-R5A integrator (Touzart et Matignon). For the verification of the purity of L3-MDA and L3-MeMDA standards, a Shimadzu SPD-6A UV detector was connected to the outlet of fluorescence detector. The signal from each detector was recorded on a double-trace integrator. Corrected fluorescence and absorbance spectra were measured with a Perkin-Elmer (St. Quentin en Yvelines, France) Model LS 50 luminescence spectrometer and a Shimadzu Model UV-2100 UV-Vis recording spectrophotometer (Touzart et Matignon), respectively, in 1-cm quartz cells. Spectral band widths of 5 and 10 nm were used for the excitation and emission monochromators, respectively. Electron impact and chemical ionization mass spectra were measured on a Nermag R-1010-C mass spectrometer (Delsi-Nermag, Argenteuil, France). 1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker (Bruker, Wissous, France) AC 200-MHz NMR spectrometer using [2H_6]dimethyl sulphoxide as solvent and tetramethylsilane (TMS) as reference.

Chromatographic conditions

Chromatographic separation was performed using a 5- μm Nucleosil C_{18} column (150 \times 4.6 mm I.D.) (Beckman, Les Ulis, France). The mobile phase was an isocratic mixture of acetonitrile and 10 mM imidazole buffer (pH 7.0) (30:70, v/v) at a flow-rate of 1.5 ml/min at room temperature. Filters of 395 and 500 nm were used for excitation and emission, respectively.

The absence of coumarinic contaminants in L3-MDA and L3-MeMDA standards was checked by means of liquid chromatography with fluorescence and UV detection on a 5- μ m Nucleosil silica column (250 \times 4.6 mm I.D.) (Interchim, Montluçon, France) using ethyl acetate-diisopropyl ether (90:10, v/v) as the mobile phase at a flow-rate of 1.5 ml/min. The UV detector wavelength was set at 360 nm; 360- and 440-nm filters were used for excitation and emission, respectively, in fluorimetric detection.

Fluorescence and absorbance measurements

Fluorescence quantum yields were determined with reference to quinine hydrogen sulphate in 0.05 M sulphuric acid, according to Parker and Rees [22]. Quantum yields were measured at room temperature without deoxygenation. The intrinsic fluorescence sensitivity was expressed by the equation $IFS = \phi\epsilon/H$, where ϕ is the quantum yield, H is the half band width (cm^{-1}) and ϵ is the molar absorptivity ($1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [23].

Derivatization procedure

A 200- μ l volume of 100 mM acetate buffer solution (pH 4.0) containing malonaldehyde was mixed with 10 μ l of 10 mM luminarin 3 solution and 10 μ l of 17 μ M L3-MeMDA (internal standard) in a glass test-tube. The mixture was protected from light and kept at room temperature for 30 min for the optimum formation of the luminarin 3-MDA derivative. Then 10 μ l of acidified 1 M acetylacetone solution were added to the mixture to react with excess reagent. After 5 min, an aliquot of the reaction mixture was injected on to the HPLC column.

RESULTS AND DISCUSSION

Condensation of luminarin 3 with malonaldehyde and methylmalonaldehyde. Characterization of the derivatives

The condensation reaction of luminarin 3 with dicarbonyl compounds may involve one or two luminarin 3 molecules. When one molecule is involved, a ring formation reaction may take place, producing a pyrazole or 5-hydroxy-2-pyrazoline derivative.

MDA and MeMDA react with luminarin 3, a

nucleophilic reagent, in acidic medium to form the derivatives shown in Fig. 1. The identity and purity of the luminarin 3 derivatives of malonaldehyde and methylmalonaldehyde were confirmed by elemental analysis, mass spectrometry (MS), ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy and HPLC analysis. The results demonstrated that the condensation reaction between luminarin 3, MDA and MeMDA is equimolar and that 5-hydroxy-2-pyrazoline derivatives are formed.

The purity of the L3-MDA and L3-MeMDA standards was determined to be >99% by HPLC on Nucleosil silica (normal-phase) and Nucleosil ODS (reversed-phase) columns with both UV and fluorescence detection. The luminarin 3 derivative of MDA showed a single peak in both chromatographic systems. The luminarin 3 derivative of MeMDA showed two peaks in normal-phase chromatography. However, when a reversed-phase system with acetonitrile was used, only a single peak was obtained. These two peaks were confirmed to be the *threo* (70%) and *erythro* (30%) isomers by NMR spectroscopy.

The electronic impact mass spectra of L3-MDA and L3-MeMDA show fragmentation patterns consistent with the proposed structures. The evidence for the 5-hydroxy-2-pyrazoline form was that L3-MDA and L3-MeMDA showed a parent ion at m/z 367 and 381, respectively, with additional ions at m/z 349 and 363, respectively, corresponding to $[\text{M} - 18]^+$. These ions result from the loss of hydroxyl and hydrogen from the 5- and 4-positions of the pyrazoline ring, respectively. The most abundant ions were at m/z 68 and 81, respectively. These ions correspond to the loss of a pyrazole ring, which appears, with the gain of a hydrogen atom and itself, respectively, from ions at m/z $[\text{M} - 18]^+$. The remainder of the molecule appears in the form of carboxyl fragments (at m/z 282 or 281) which lose CO to give the fragment at m/z 255. This latter species fragments further, by the ejection of CO from the lactone ring and a hydrogen atom, to give the fragment at m/z 226.

Choice of optimum conditions for derivatization

The reaction of MDA ($\text{p}K = 4.46$) with luminarin 3 proceeded at room temperature under weakly acidic conditions (pH 4.0). In

order to confirm that the present procedure is specific for free MDA, 100 μM of TEP, a precursor of MDA, was treated at pH 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 and 6.0 and at temperatures of 25 and 50°C. The amount of MDA formed was determined from the absorbance at 245 nm. This study showed (Fig. 2) that the best yields for conversion of TEP to MDA were obtained by incubation at 50°C. At pH 1.0, whatever the temperature, we observed 100% transformation of TEP into MDA. At pH 3.0, 60% of MDA was formed at 50°C in 60 min, whereas at 25°C and pH 3.0 or 4.0 no MDA was formed after 120 min. This phenomenon has been observed previously by Kawai *et al.* [17]. These results demonstrate that the present procedure is specific for free (genuine) MDA.

The procedure reported in a previous paper [19] required strongly acidic conditions (0.1 M H_2SO_4) for the formation of luminarin 3 derivatives. Under these conditions MDA precursors are hydrolysed to give MDA. Accordingly, the determination of free MDA and that generated from its precursors could be obtained from the difference between MDA levels prior to and after acid hydrolysis.

Concerning the derivatization of MDA by luminarin 3, the influence of the reaction time

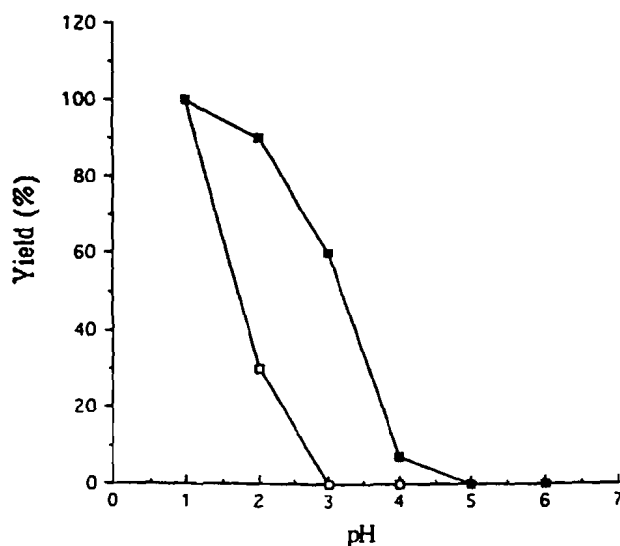


Fig. 2. Effect of pH on hydrolysis of TEP (0.1 $\mu\text{mol/ml}$). (\square) at 25°C for 120 min and (\blacksquare) at 50°C for 60 min. Formation of MDA was determined by UV spectrophotometry at 245 nm.

and luminarin 3 concentration on the peak-height ratio of L3-MDA to L3-MeMDA was also studied. The peak-height ratios were almost constant after about 30 min and over the range of luminarin 3 concentrations investigated (0.05–0.5 μmol). The other important factor for analytical application is the thermal stability of the luminarin 3-MDA derivative. To prevent degradation of the product, the reaction temperature should not exceed room temperature (25°C) [19]. Under these conditions the luminarin 3-MDA derivative was stable for at least 24 h. These experiments indicated that the optimum conditions were those used in the derivatization procedure described above.

Liquid chromatography

The selected chromatographic conditions were used to separate luminarin 3 from its derivatives with MDA, MeMDA and acetylacetone. The mobile phase components, acetonitrile and imidazole buffer, were chosen for their ability to

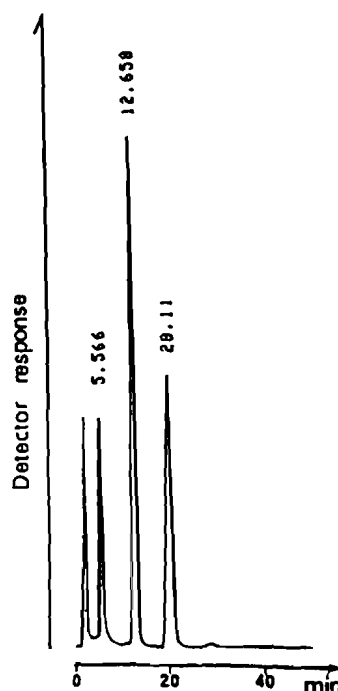


Fig. 3. Elution profile of a mixture of standard solutions of luminarin 3 (at 5.6 min) and luminarin 3 derivatives of MDA (at 12.7 min) and MeMDA (at 20.1 min) in reaction mixture (8 mV full-scale). A 15-pmol amount of each derivative was injected on to the column. For other details, see text.

promote peroxyoxalate chemiluminescence detection as reported by Tod and co-workers [20,21] for other luminarin derivatives. Fig. 3 shows typical chromatograms of a mixture of standard solutions of luminarin 3, luminarin 3-MDA and MeMDA derivatives. Their retention times were 5.6, 12.5 and 20.1 min, respectively. The luminarin 3-MDA derivative was well separated from the reagent and internal standard. For this separation of pure standards, the limit of detection was evaluated as the concentration that gave a signal-to-noise ratio of 3. A limit of detection of 0.45 ng/ml (0.125 pmol per injection) was found for L3-MDA, which is lower than values given in the literature for other HPLC methods [3–6,10,13,14]. It should be noted that derivatization with DNSH [8] and NMH [18] can give similar detection limits.

Beljean-Leymarie and Bruna [9] used a gas chromatographic (GC) method after derivatization of MDA with HBT and reported a detection limit of 0.04 pmol per injection. Although the method is highly sensitive for MDA, it requires hot and acidic conditions for more efficient formation of the derivative. To our knowledge, only the GC method developed by Tomita *et al.* [16] gives a higher sensitivity than the present method.

In practice, when the derivatization was performed on smaller amounts of MDA, the unreacted reagent seriously interfered with the detection of the luminarin 3-MDA derivative. To reduce this interference we added an excess of acetylacetone which, under these conditions, reacts with most of the excess of luminarin 3. This reaction gives two (additional) products,

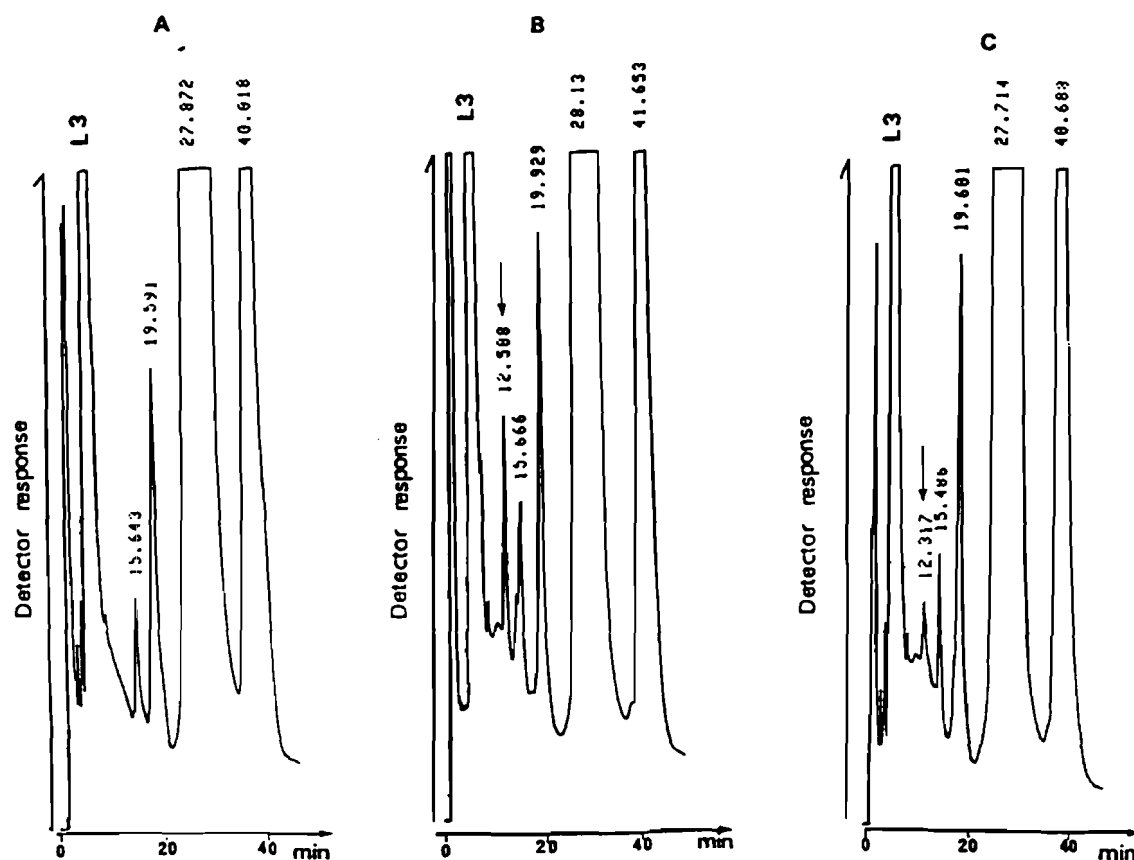


Fig. 4. Separation of luminarin 3-MDA derivative with fluorescence detection. (A) Blank; (B) chromatogram of the reaction mixture when 36 ng/ml of MDA were derivatized (4 mV full-scale); (C) chromatogram of the reaction mixture when 7.2 ng/ml of MDA were derivatized (4 mV full-scale). Numbers on peaks indicate retention times in minutes. For other details, see text.

TABLE I

UV ABSORPTION AND FLUORESCENCE DATA FOR LUMINARIN 3-MDA IN ACETONITRILE AND ACETONITRILE-10 mM IMIDAZOLE BUFFER (pH 7.0)

Acetonitrile concentration (%)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	ϵ^a ($l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	ϕ^b	IFS ^c
0	401	502	22 952	0.39	3.85
30	402	495	28 072	0.39	4.34
50	399	491	28 682	0.51	5.63
70	399	485	28 976	0.51	5.60
100	394	464	32 139	0.71	8.55

^a Molar absorptivity.^b Quantum yield.^c Intrinsic fluorescence sensitivity.

with peaks at 28.4 and 40.7 min, which were proved to be the pyrazole and monohydrazone forms of the luminarin 3-acetylacetone derivative, respectively (by liquid chromatography-mass spectrometry; data not shown). Fig. 4 shows the chromatograms of the reaction mixture obtained with (A) a blank acetate buffer solution and (B and C) standard solutions of MDA [(B) 36 and (C) 7.2 ng/ml]. Although these chromatograms are complex, experiments with spiked plasma samples displayed no additional peaks (different reaction conditions; data not shown). Therefore, owing to the good selectivity of the reagent, further inferences are not be expected.

Calibration graphs constructed for MDA with L3-MeMDA as internal standard ($n = 6$) were linear in the range 7.2–90 ng/ml, corresponding to 1.74–21.74 pmol of injected MDA derivative. The regression line was described by the following equation:

$$\text{ratio of peak heights} = 0.0129 \cdot \text{concentration (ng/ml)} + 0.0270 \quad (r^2 = 0.999)$$

The intra-run relative standard deviations were 10.6% for 7.2 ng/ml, 7.3% for 18 ng/ml, 5.6% for 36 ng/ml, 2.4% for 72 ng/ml and 1.8% for 90 ng/ml of MDA ($n = 6$). Hence the limit of quantification, *i.e.*, the lowest concentration that can be determined with an R.S.D. of less than 15%, was lower than 7 ng/ml (Fig. 4C).

Spectral properties

The influence of mobile phase composition on the absorbance and fluorescence properties of the luminarin 3-MDA derivative was studied.

As shown in Table I, whereas the position of the excitation maxima varied little with the composition of the solvent, the emission maxima showed a marked bathochromic effect with increased polarity of the acetonitrile-imidazole buffer mixture. This is due to the effect of the increased dipole-dipole interaction between the slightly polarized state of the molecule and the solvent characteristic of a $\pi \rightarrow \pi^*$ fluorescence emission.

Variations in the intensity of fluorescence of the luminarin 3-MDA derivative with the acetonitrile content of the mobile phase were studied by determining the relative quantum yields and intrinsic fluorescence sensitivity. These parameters doubled when the acetonitrile content in the mobile phase increased from 0 to 100%. Hence the whole composition range of mobile phases is compatible with highly sensitive detection.

CONCLUSIONS

Owing to its nucleophilic and fluorescence properties and the stability of its derivatives, luminarin 3 is a suitable derivatization reagent for the sensitive and selective HPLC with fluorescence detection of MDA. The method allows

the determination of small amounts of MDA with mild conditions of derivatization, without the formation of interfering by-products. In addition, the derivatization reagent and chromatographic conditions permit chemiluminescence detection.

The limiting factor with respect to the sensitivity of the present method was not detection but derivatization. In future work, acetylacetone could be replaced with a more efficient scavenger to remove all remaining luminarin 3. Even so, the limit of detection was well below that of other HPLC methods and its limit of quantification should allow the precise determination of free MDA in biological fluids. One example given in the literature is the concentration of MDA in normal human urine, which is in the range 10–60 ng/ml [16]. In several instances, the MDA concentration in urine has been shown to be correlated with lipid peroxidation processes following exposure to certain xenobiotics [14,15].

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Dr. Martin Czok, Laboratoire de Chimie Analytique I et d'Electrochimie Organique, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France, for helpful discussions and assistance with the manuscript.

REFERENCES

- 1 T. Hirayama, S. Miura, M. Araki, Y. Takeo and T. Watanabe, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 73 (1990) 590.
- 2 M.J. Richard, B. Portal, J. Meo, C. Coudray, A. Hadjian and A. Favier, *Clin. Chem.*, 38 (1992) 704.
- 3 W.A. Behrens and R. Madère, *Lipids*, 26 (1991) 232.
- 4 C. Largillière and S.B. Mélançon, *Anal. Biochem.*, 170 (1988) 123.
- 5 M.J. Richard, P. Guiraud, J. Meo and A. Favier, *J. Chromatogr.*, 577 (1992) 9.
- 6 K. Nakashima, T. Ando, T. Nakamizo and S. Akiyama, *Chem. Pharm. Bull.*, 33 (1985) 5380.
- 7 J. Therasse and F. Lemonnier, *J. Chromatogr.*, 413 (1987) 237.
- 8 T. Hirayama, N. Yamada, M. Noharaa and S. Fukui, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66 (1983) 304.
- 9 M. Beljean-Leymarie and E. Bruna, *Anal. Biochem.*, 173 (1988) 174.
- 10 K. Kikugawa, T. Kato and A. Iwata, *Anal. Biochem.*, 174 (1988) 512.
- 11 G. Lepage, G. Munoz, J. Champagne and C.C. Roy, *Anal. Biochem.*, 197 (1991) 277.
- 12 M.A. Carbonneau, E. Peuchant, D. Sess, P. Canioni and M. Clerc, *Clin. Chem.*, 37 (1991) 1423.
- 13 S. Kawai, M. Tomita and K. Kasashima, *J. Chromatogr.*, 495 (1989) 235.
- 14 M.A. Shara, P.H. Dickson, D. Bagchi and S.J. Stohs, *J. Chromatogr.*, 576 (1992) 221.
- 15 T. Ekström, P. Garberg, B. Egestad and J. Högborg, *Chem.-Biol. Interact.*, 66 (1988) 177.
- 16 M. Tomita, T. Okuyama, Y. Hatta and S. Kawai, *J. Chromatogr.*, 526 (1990) 174.
- 17 S. Kawai, T. Fuchiwaki, M. Tomita and T. Higashi, *J. Chromatogr.*, 514 (1990) 29.
- 18 H. Tamura and T. Shibamoto, *Lipids*, 26 (1991) 170.
- 19 F. Traoré, M. Tod, J. Chalom, R. Farinotti and G. Mahuzier, *Anal. Chim. Acta*, 269 (1992) 211.
- 20 M. Tod, J.-Y. Legendre, J. Chalom, H. Kouwatli, M. Poulou, R. Farinotti and G. Mahuzier, *J. Chromatogr.*, 594 (1992) 386.
- 21 M. Tod, M. Prevot, J. Chalom, R. Farinotti and G. Mahuzier, *J. Chromatogr.*, 542 (1991) 295.
- 22 C.A. Parker and W.T. Rees, *Analyst*, 85 (1960) 587.
- 23 J.B.F. Lloyd, *J. Chromatogr.*, 178 (1979) 249.

III-7 CONDENSATION, DES BASES PYRIMIDINIQUES DES ACIDES NUCLEIQUES AVEC LA LUMINARINE 3, PAR TRANSAMINATION

III-7-1 Introduction

La réaction de transamination de la cytidine ou de la cytosine, par les réactifs à fonction amine primaire, hydrazine ou analogues (hydrazides et semicarbazides) est très abondamment reportée dans la littérature; citons entre autre :

- la réaction de la cytidine avec le semicarbazide [HAYATSU (1976)]
- la réaction des hydrazides avec la cytidine et la cytosine [GAL-OR et coll., (1967); SCHULMAN et coll., (1981); REISFELD et coll., (1987)]
- la réaction de la cytidine avec les amines [SCHULMAN (1981); DRAPER (1984); AVIGNOLO et coll., (1991)]
- la réaction de la cytidine avec l'hydrazine [GAL-OR (1967); NEGISHI et coll., (1983)].

Cette réaction a été longtemps utilisée pour localiser les résidus de cytidine dans les chaînes d'acides nucléiques.

Le but de ce travail a été d'utiliser la réaction de transamination, d'une part pour doser la cytidine ou molécules dérivées ayant une fonction amine primaire en position 4 du noyau pyrimidine par chromatographie liquide; d'autre part pour marquer les acides nucléiques à l'aide de la luminarine 3, afin d'obtenir des produits d'hybridation (sondes froides) permettant de détecter l'acide nucléique cible.

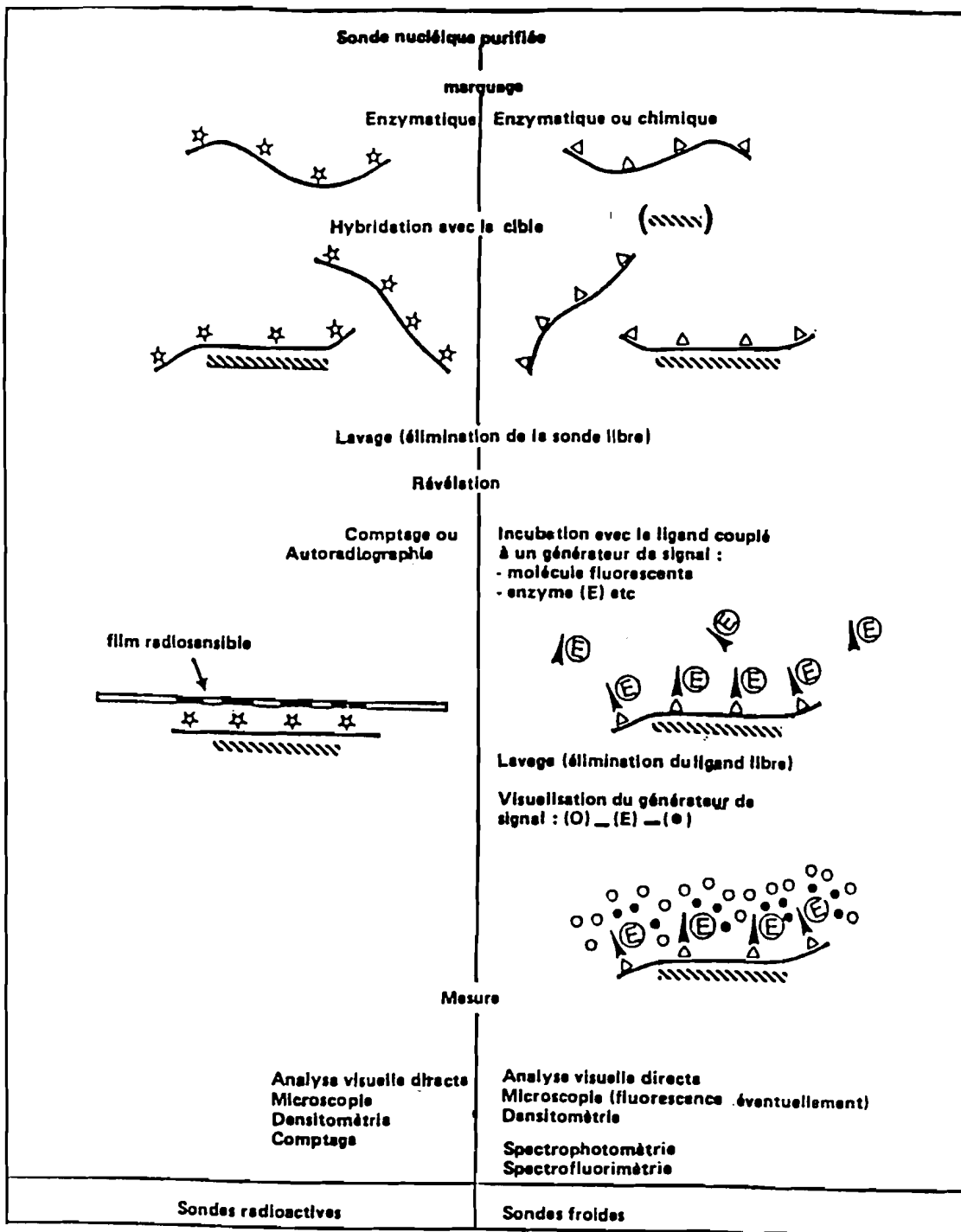
En effet, l'hybridation moléculaire entre acides nucléiques, est une technique de plus en plus pratiquée en biologie moléculaire.

Les microorganismes responsables de certaines maladies infectieuses, certaines anomalies génétiques responsables de maladies héréditaires, des anomalies somatiques pouvant être mises en cause dans

l'expression de certains cancers ou encore les agents responsables d'une prédisposition à l'expression de maladies, les cultures cellulaires (à des fins de typage) sont les principaux champs d'application de ces techniques.

La complémentarité avec les tests immunologiques et les meilleures performances comparées (sensibilité, spécificité) de l'hybridation entre acides nucléiques, en font certainement une des voies technologiques de diagnostic du futur.

La méthode usuelle, pour localiser les résidus de cytidine ou cytosine libres dans les acides nucléiques, a toujours été le marquage par les radioisotopes. L'utilisation des marqueurs non radioactifs étant d'un développement récent; les plus actifs de ces derniers sont des réactifs à base de biotine, dont plusieurs existent déjà dans le commerce. Le processus d'hybridation peut être schématisé comme décrit par TRAINCARD (1988) : voir page suivante



- Réalisation comparée des techniques utilisant des sondes radioactives et froides (non-radioactives).

☆ = molécule radioactive incorporée dans la sonde ;

▲ = molécule non-radioactive incorporée ou fixée sur la sonde ;

((|||||)) = ligand capable de se fixer spécifiquement sur (▲) et couplé à un générateur de signal tel une enzyme (E) ;

○ = substrat de l'enzyme (E) transformé par celui-ci en produit (●) mesurable.

Plusieurs études ont démontré que le marquage par les dérivés de la biotine ou d'autres marqueurs non radioactifs, reste encore moins sensible que la méthode radioactive, mais est beaucoup plus rapide. Il a surtout l'avantage de diminuer les risques inhérents au marquage radioactif.

III-7-2 Réaction de transamination

D'une manière générale, elle est catalysée par l'hydrogénosulfite de sodium. L'addition de ce sel modifie la structure chimique de la cytidine, en donnant le dérivé 5,6-dihydro-6-sulfonate. Alternativement, la désamination de la cytidine en uridine peut être catalysée par l'hydrogénosulfite de sodium en milieu aqueux (Figure 22).

Le 5,6-dihydrocytidine-6-sulfonate peut subir également une transformation quantitative en dérivé N-4 substitué par transamination avec une molécule à fonction amine appropriée (Figure 23). C'est une réaction de type S_N (attaque initiale par une particule nucléophile) et d'ordre 2. Elle est toutefois facilitée par la présence de groupements attracteurs (HSO_3^-) qui, convenablement placés, diminuent la densité électronique du carbone porteur du groupement $-NH_2$ de la base pyrimidinique.

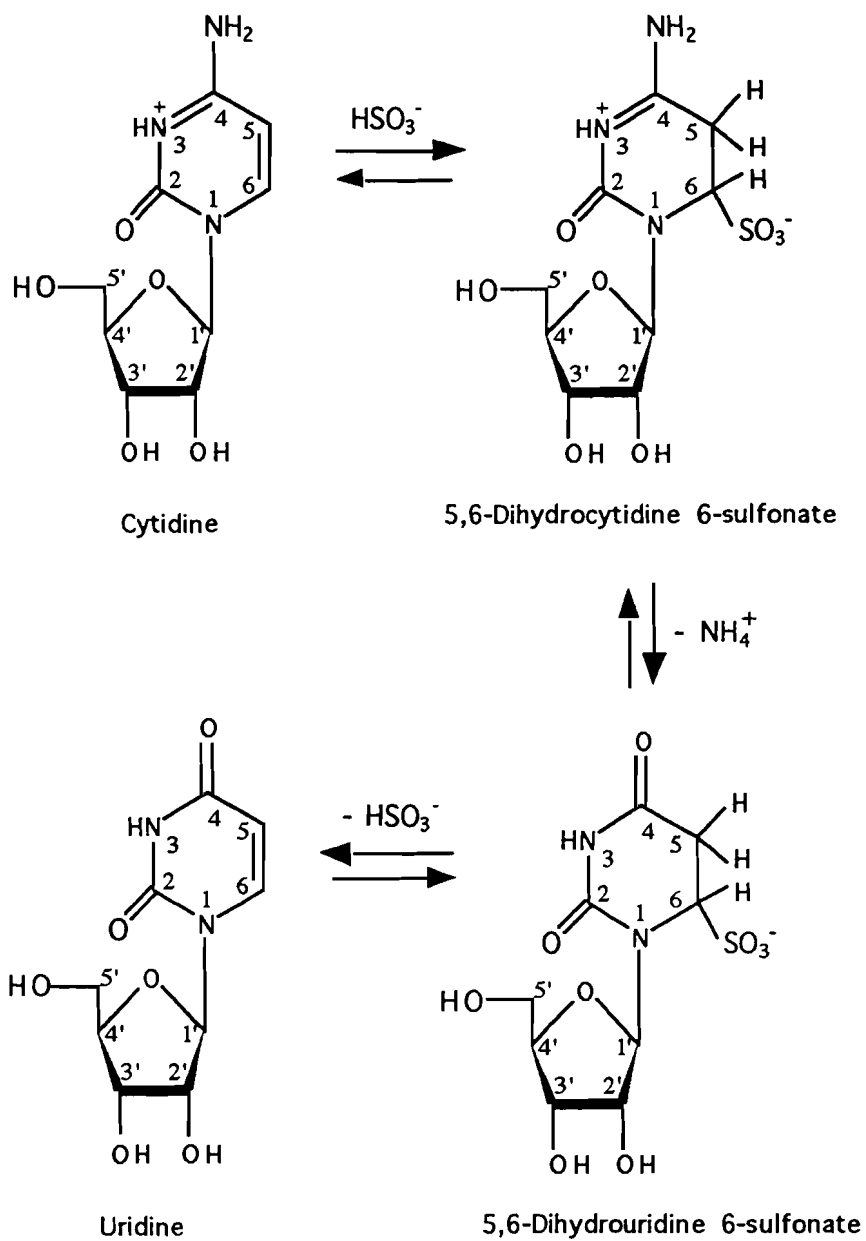


Figure 22 : Réaction d'addition de l'hydrogénosulfite sur la double liaison 5,6 des bases pyrimidiniques et désamination de la cytidine en uridine

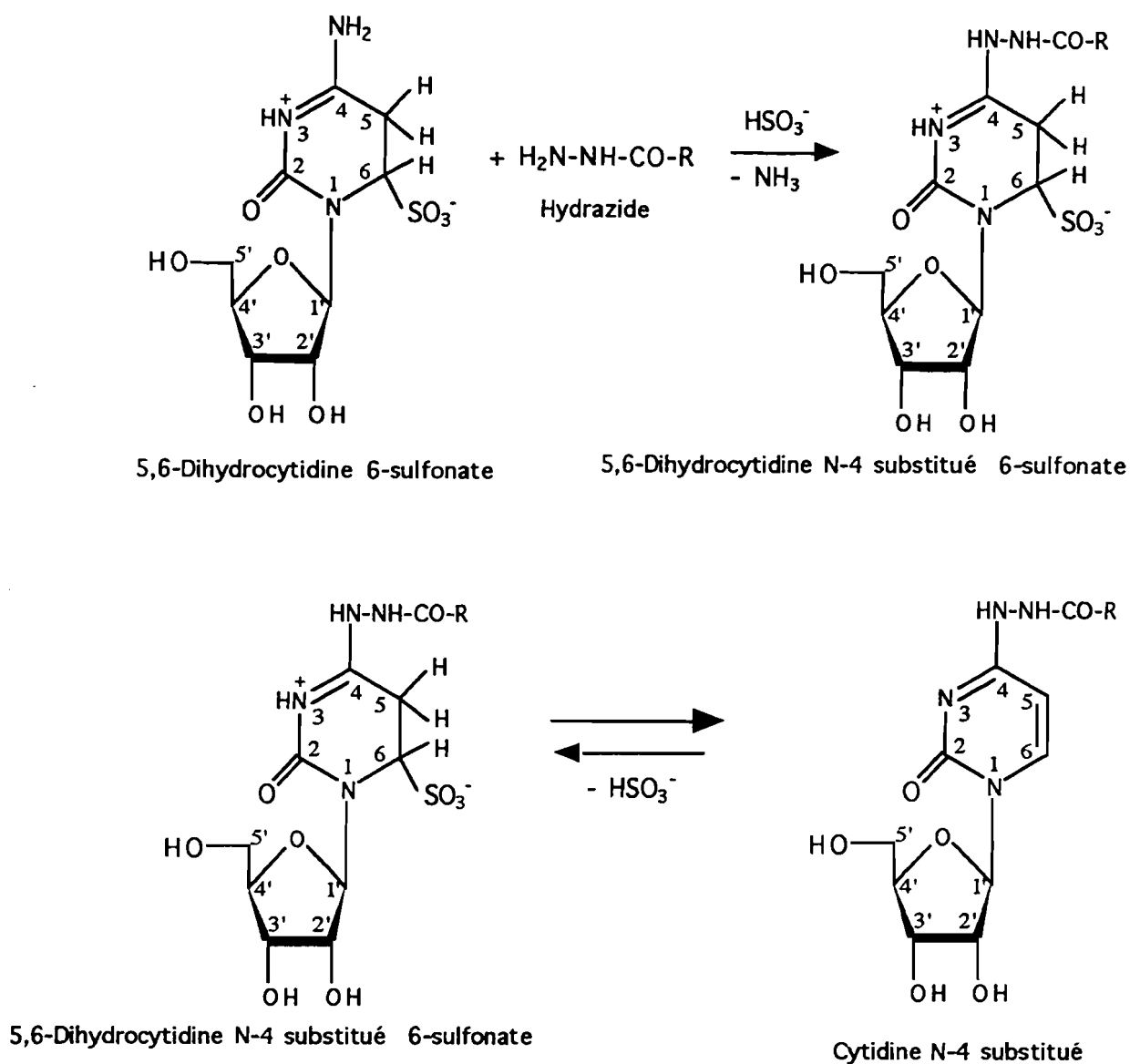


Figure 23 : Formation du dérivé N-4 substitué

L'addition nucléophile semble être rapidement suivie de la formation d'un intermédiaire peu stable qui a perdu le caractère aromatique. L'élimination du groupement -NH_2 rétablit, de nouveau, ce caractère aromatique.

L'addition de l'hydrogénosulfite au niveau de la double liaison 5,6 de la cytidine prédispose donc ce dernier à une attaque nucléophile de l'amine en position 4. L'équilibre de formation du produit d'addition, est vite atteint; mais il est fortement influencé par le pH du milieu déterminé par le couple $\text{HSO}_3^-/\text{SO}_3^{2-}$ ($\text{pK}_a = 6,2$).

Les pH élevés favorisent la désamination (Figure 22), qui en effet est catalysée en grande partie par les ions sulfites. Il semble bien que cette désamination, bien que difficile à éviter, soit faible aux $\text{pH} \leq 5$. L'élévation du pH entraînerait également une augmentation du pouvoir du réactif nucléophile (R-NH_2) et par conséquent favoriserait la transamination.

La réaction de transamination dépend donc également du pK_a du nucléophile puisque c'est ce dernier qui détermine la concentration de la forme réactive. Il existe donc un pH optimum pour lequel l'équilibre serait fortement déplacé en faveur de la transamination.

La spécificité de cette réaction réside dans le fait que ni l'adénosine, ni la guanosine (Figure 24) ne donnent des dérivés de transamination; ces produits restent inchangés, alors que la thymidine et l'uridine donnent respectivement le 5,6-dihydrothymidine 6-sulfonate et le 5,6-dihydrouridine 6-sulfonate (produits d'addition avec l'hydrogénosulfite).

Pour éliminer l'hydrogénosulfite du produit de transamination, on préconise soit l'élévation du pH de 7 à 9 [HAYATSU (1976); SCHULMAN et coll., (1981)]; soit l'incubation du mélange réactionnel (après transamination) à 37°C pendant 2 heures dans du tampon phosphate 1 M, pH 7; soit enfin l'addition de l'éthanol [NEGISHI et coll., (1983)] au mélange réactionnel. La vitesse de cette réaction, en présence du tampon phosphate, augmente proportionnellement à la concentration du phosphate. Une complète élimination est obtenue par traitement avec du phosphate de sodium 1 M;

mais le mécanisme de l'élimination de l'hydrogénosulfite par le phosphate reste encore mal connu.

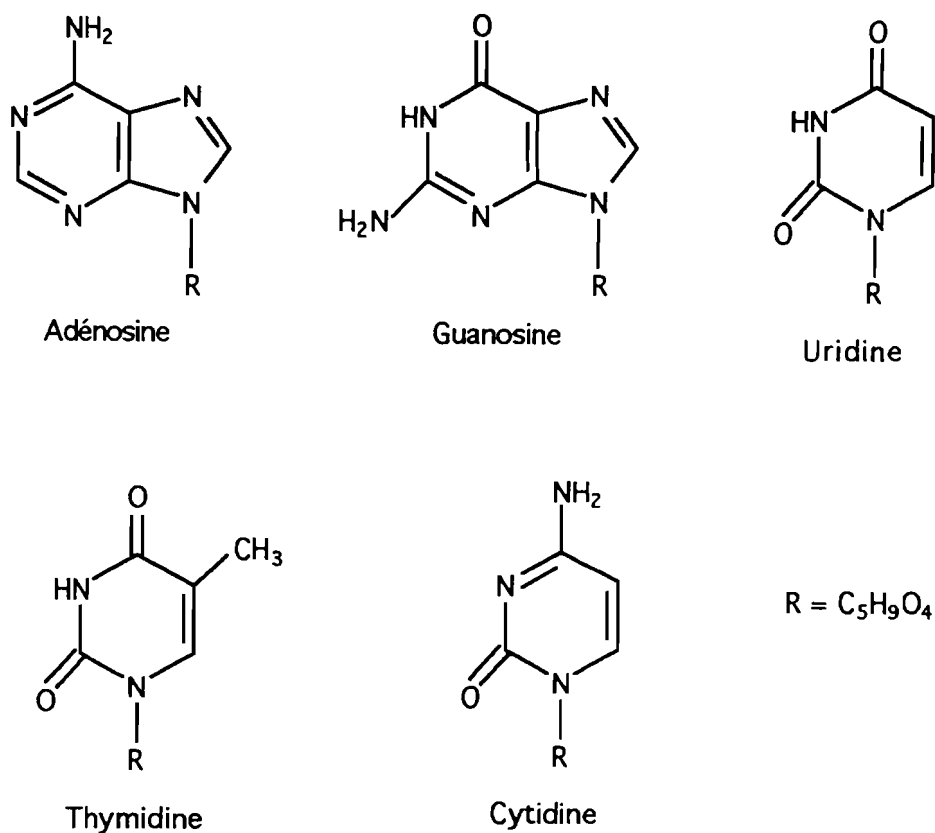


Figure 24 : Structure des cinq principaux nucléosides

La mise en évidence des dérivés de transamination s'effectue par différentes méthodes :

- *chromatographie liquide sur couche mince* [GAL-OR et coll., (1967); HAYATSU (1976); SCHULMAN et coll., (1981); DRAPER (1984)] pour les 4-semicarbazido 2-cétopyrimidine ribofuranoside et N-4-carbohydrazido 2-cétopyrimidine, après hydrolyse des différentes fractions d'acides désoxyribonucléiques (ADN) et ribonucléiques (ARN) par l'acide perchlorique.

- *absorptiométrie* [HAYATSU (1976); NEGISHI et coll., (1983); DRAPER (1984)]; le produit de transamination donne une forte absorbance en milieu alcalin (NaOH 0,1-0,2 N) à 310 nm (acides ribonucléiques et désoxyribonucléiques), 275 nm (cytidine), 265 nm (cytosine) avec un coefficient d'absorption molaire sensiblement égal à $23000 \text{ litre mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Pour déterminer les quantités de bases pyrimidiniques dans les acides nucléiques par cette méthode, on suggère l'utilisation d'une ribonucléase pancréatique et d'une phosphodiesterase des venins de serpent qui provoquent le clivage des liaisons phosphodiester des résidus de dérivés transaminés dans les acides ribonucléiques [HAYATSU (1976)]. Certains auteurs préconisent une digestion des nucléotides par la phosphatase alcaline bactérienne [DRAPER (1984)].

- *colorimétrie* en présence d'une enzyme (streptavidine conjuguée avec la phosphatase alcaline) qui sert de médiateur [REISFELD et coll., (1987); AVIGNOLO et coll., (1991)]. Le substrat utilisé est le 5-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate avec le bleu de tétrazolium nitré pour augmenter le signal de détection.

- *fluorimétrie* [SCHULMAN et coll., (1981); DRAPER (1984), HAUGLAND (1992)] pour les produits de transamination ayant une fonction amine terminale susceptible de réagir avec un marqueur fluorescent (isothiocyanate de fluoresceïne, dérivé N-hydroxysuccimide de nitrobenzofurazane (NBF)).

- *chromatographie liquide* [SCHULMAN et coll., (1981); NEGISHI et coll., (1983); DRAPER (1984)] avec détection UV du dérivé N-4-carbohydrazido-cytidine sur colonne dihydroxyboryl cellulose équilibrée avec de l'hydrogencarbonate de sodium pH 8,5. L'élution est faite par le même tampon avec un débit de 0,1 ml/min. Les dérivés N-4-alkylaminés de la cytidine sont mis en évidence et isolés par la même méthode (CLHP) en

utilisant une colonne Dowex 50 équilibrée avec de l'acétate d'ammonium 10 mM, pH 5. La phase mobile utilisée est une solution d'acétate d'ammonium 1 M, pH 5. L'adénosine est choisie, dans tous les cas, comme étalon interne.

Une autre possibilité, pour analyser les échantillons contenant les dérivés N-4-carbohydrazido et N-4-alkylaminés des bases pyrimidiniques, consiste à utiliser la technique par chromatographie d'échanges d'ions sur colonne Aminex A-25 portée à 50°C. Dans ce cas, on utilise comme phase mobile une solution de formiate d'ammonium 10 mM, pH 4,65 à un débit de 0,6 ml/min. La détection des produits élués est réalisée à 254 nm. Par la même technique, on peut également séparer les produits d'addition, en utilisant une colonne Aminex A-6 à 50°C et comme phase mobile du formiate d'ammonium 0,4 M, pH 4,7. La N-4-aminocytidine, reconnu pour ses propriétés mutagéniques sur *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et certains microphages, est par contre purifié par CLHP (détection UV 254 nm) en utilisant une colonne lichrosorb® RP-18 (Merck). L'éluant utilisé est une solution d'acétate d'ammonium 0,05 M, pH 4,1 avec un débit de 1 ml/min.

- *électrophorèse* [GAL-OR et coll., (1967)] pour les produits de transamination avec les acylhydrazides (malonyl hydrazide ou acétyl hydrazide), sur papier Whatman® en utilisant soit du tampon phosphate 0,02 M, pH 6,8 ou soit un tampon acétate à pH 3,5.

Le procédé que nous décrivons ci-dessous permet la dérivation de la cytidine par la luminarine 3.

III-7-3 Matériel et méthodes

- Réaction chimique

Elle met en jeu : la luminarine 3 (EUROBIO-SERATEC), la cytidine (ALDRICH) et le bisulfite de sodium ou hydrogénosulfite de sodium (JANSEN).

- Procédure de dérivation

Introduire, dans un tube à réaction (Reactivial®) de 2 ml, un millilitre de solution de cytidine dans de l'hydrogénosulfite de sodium 0,1 M, pH 4,8. Ajouter 20 µl de solution de luminarine 3 (0,05 M) dans le DMSO. Mélanger par agitation douce et incuber au bain-marie à 70°C et à l'abri de la lumière pendant 24 heures. Diluer dans l'acétonitrile et injecter une quantité de dérivé correspondant à 20 pmoles de luminarine 3.

- Conditions opératoires

La phase mobile est un mélange tétrahydrofurane-tampon imidazole nitrate 0,01 M, pH 7,5 (25/75, v/v), et le débit est de 1 ml/min.

La colonne est une nucléosil C-18 (250 x 4,6 mm), 5µm de la société française de chromatographie sur colonne (SFCC).

Le système chromatographique utilisé est un modèle de CLHP équipé d'une pompe chromatem 380 (TOUZART-MATIGNON), un injecteur rhéodyne 7125 avec une boucle de 20 µl, un détecteur de fluorescence (KRATOS FS970) équipé d'un filtre passe-haut 470 nm à l'émission et réglé à 370 nm à l'excitation, un enregistreur type BD40 04/06 (TOUZART-MATIGNON).

III-7-4 Résultats et discussion

- *Dérivation*

Molarité des réactifs

La luminarine 3 est une molécule relativement peu soluble ou très peu soluble dans la plupart des solvants utilisés. C'est pourquoi nous avons préféré le diméthylsulfoxyde (DMSO) en raison de son pouvoir solvant très étendu; d'ailleurs, c'est le seul solvant qui nous a permis de dissoudre des concentrations très élevées de luminarine 3 (0,1 M).

Il faut souligner cependant que compte tenu de la basicité du DMSO (base de Lewis), ce dernier aurait tendance à réagir de façon instantanée avec l'hydrogénosulfite de sodium avec dégagement d'un gaz que nous n'avons pas pu identifier. La luminarine 3 (3,13 mg) serait soluble dans 1 ml de mélange hydrogénosulfite de sodium 0,1 M-diméthylsulfoxyde (3/7, v/v). Toutefois, cette condition n'a pas été choisie pour la dérivation, pour les mêmes raisons que celles évoquées ci-dessus; ce qui par conséquent limitait la dérivation.

Aux concentrations de l'hydrogénosulfite de sodium (0,5 M, 1 M et 2 M), la luminarine 3 est quantitativement transformée en un produit très polaire correspondant au premier pic du chromatogramme. Ce phénomène pourrait s'expliquer probablement par une réaction de Michaël [MIOCQUE et coll., (1982)]. En effet, l'hydrogénosulfite de sodium peut réagir avec les esters α,β éthyléniques par addition 1,2 ou 3,4. La luminarine 3, comme toutes les autres luminarines, est une lactone α,β éthylénique qui peut donc réagir avec l'hydrogénosulfite de sodium (Figure 25).

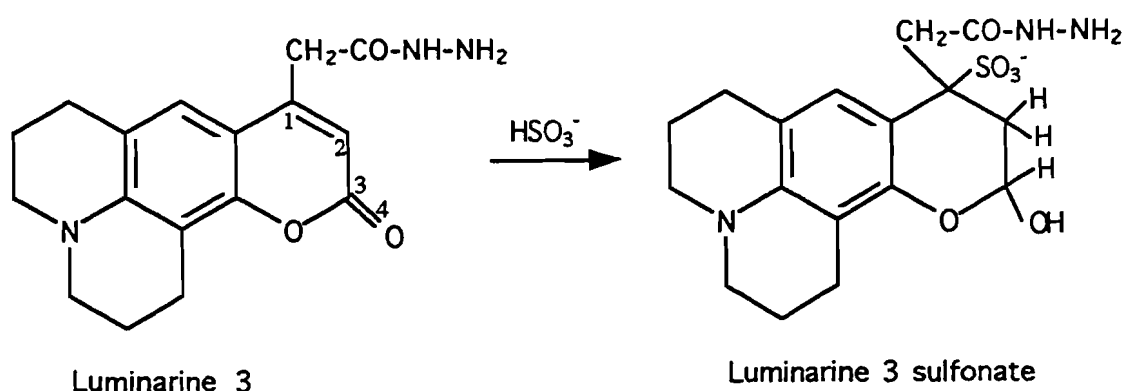


Figure 25 : Mécanisme probable de la réaction d'addition de l'hydrogénosulfite sur la luminarine 3

Cette réaction est d'autant plus importante que la concentration de l'hydrogénosulfite de sodium est élevée, et la quantité de cytidine à dériver est faible.

Les conditions optimales de dérivation consistent à faire réagir 1 μ mole de luminarine 3 avec 100 μ moles de cytidine. La limite de dérivation est de 5 μ moles de cytidine. Toutefois, pour dériver des quantités plus faibles de cytidine, il faudrait augmenter la concentration de luminarine 3, mais cela n'a pas été possible en raison de la solubilité très faible de ce produit dans le milieu réactionnel.

pH de la réaction de dérivation et concentration de l'hydrogénosulfite

La dérivation a été testée à différents pH en présence d'une concentration fixe de l'hydrogénosulfite de sodium (0,1 M). Les pH des solutions ont été ajustés, soit à l'aide d'acide chlorhydrique concentré, soit d'hydroxyde de sodium.

La réaction de dérivation n'ayant pas un meilleur rendement à $\text{pH} > 5$, le pH optimum a été fixé à 4,8. En effet, si la réaction dépend du pH , elle est surtout influencée par la concentration de l'hydrogénosulfite. Le tableau III montre les résultats obtenus à partir d'une solution de cytidine 0,1 M. On constate que la vitesse de formation du dérivé est diminuée lorsque le pH augmente de 5 à 6.

Tableau III : Influence du pH et de la concentration de l'hydrogénosulfite de sodium sur le rendement de la dérivation

Concentration de HSO_3^- (M)	pH	Hauteur de pic du dérivé (mm)
0,05	4,40	82
0,1	4,80	184
0,2	4,86	172
0,1	5,00	70,5
0,1	6,00	ND*
0,1	7,00	ND*

*ND = non détectable

Cinétique de la réaction de dérivation

La réaction de dérivation de la cytidine par la luminarine 3 est une réaction lente, mais fortement influencée par la température du milieu réactionnel et par d'autres facteurs évoqués ci-dessus.

Plusieurs cinétiques ont été réalisées dans le but de déterminer les conditions expérimentales optimales. En présence de 1 μmole de

luminarine 3 et de concentration stoechiométrique de l'hydrogénosulfite de sodium et de cytidine, nous avons réalisé la réaction à différentes températures dont la température du laboratoire, 37°C, 70°C et 80°C.

Ces essais montrent que les meilleurs rendements de dérivation sont obtenus entre 65-70°C. A la température du laboratoire et à 37°C, pendant 72 heures, aucune réaction de dérivation n'a été observée. Le temps de réaction optimal pour la dérivation est de 24 heures (Figure 26). Les temps plus courts (1, 3, 6 et 12 heures) et plus longs (30 et 38 heures) ont été essayés dans l'espoir de déterminer le temps où la réaction se déroule complètement. En fait, allonger le temps de réaction ou augmenter la température ne permet pas d'obtenir un signal plus important pour une même concentration de cytidine, mais plutôt une réduction de la hauteur des pics avec en plus des pics parasites qui témoignent de la dégradation des produits en solution dans le milieu réactionnel.

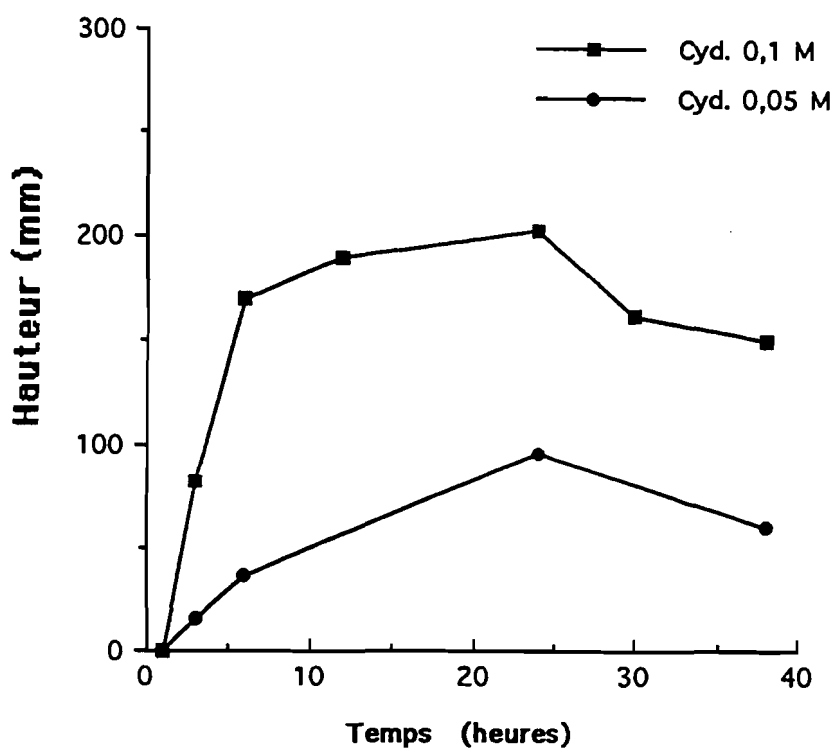


Figure 26 : Cinétique de la réaction de dérivation

Rétention chromatographique

Dans les conditions décrites ci-dessus, la luminarine 3 est éluée avec un temps de rétention de 7,4 min. Le dérivé N-4 substitué de la luminarine 3 avec la cytidine a un temps de rétention de 5,8 min. Quant au premier pic majoritaire, il est détecté à 2,2 min.

Limite de détection en fluorimétrie

Par dilution successive du mélange réactionnel dans de l'acétonitrile, la limite de détection du dérivé luminarine 3 - cytidine a été de 100 pmoles soit 24,3 ng de cytidine.

- Conclusion

Le couplage de la luminarine 3 avec la cytidine, par transamination, est une réaction qui semble être envisageable, bien que la structure chimique du dérivé formé n'ait pas encore pu être vérifiée.

L'utilisation de la luminarine 3 comme réactif de dérivation de la cytidine ou des molécules dérivées avec une fonction amine primaire en position 4 du noyau pyrimidine, par cette méthode, en vue d'un dosage par chromatographie liquide, n'a pas été possible à cause de la faible solubilité de la luminarine 3 dans le milieu réactionnel ainsi que la possibilité d'une réaction prédominante avec l'hydrogénosulfite de sodium. Ces raisons ne nous ont pas permis d'améliorer la limite de dérivation. Il semble néanmoins que les propriétés d'absorbance et probablement de luminescence permettraient d'atteindre des limites de détection assez faibles.

C'est pourquoi, il nous semble que la réaction de transamination avec la luminarine 3 ne pourrait être une voie intéressante qu'à condition d'être utilisée dans le cadre du marquage des acides nucléiques (préparation des sondes froides), mais ceci restant encore à vérifier.

III-8 ARTICLE 5**"Luminarin 3 as a derivatization reagent for the liquid chromatographic determination of cytidine, adenosine and related nucleotides with fluorimetric detection"**

Anal.Chim.Acta, sous presse , (Réf.AT 93192)

Une des caractéristiques communes aux sucres, polysaccharides, glycoprotéines et l'acide ribonucléique est de comporter le groupement glycol vicinal, qui est oxydé par le periodate à pH légèrement acide ou neutre pour donner des aldéhydes, cétones ou un mélange des deux.

Le periodate peut aussi oxyder certaines molécules dérivés du β -aminoéthanol comme la méthionine et certains thiols. Ces dernières réactions se déroulent beaucoup plus lentement que l'oxydation des glycols vicinaux.

Après destruction de l'excès de periodate, le composé carbonyle formé peut être dosé, par fixation de groupements fluorophores tels que la luminarine 3.

Une autre méthode plus spécifique de formation de groupements carbonyle dans les molécules biologiques consiste à utiliser une enzyme qui oxyde spécifiquement un sucre donné.

Dans cette partie, nous présentons la dérivation, avant chromatographie, des aldéhydes issus de l'oxydation periodique des nucléosides et nucléotides avec la luminarine 3, comme une autre solution pour doser les nucléosides et nucléotides.

Les limites de dérivation dans ce cas sont de l'ordre de 125 pmoles pour la cytidine (Cyd), 25 pmoles pour la cytidine 5-monophosphate (CMP), 50 pmoles pour la cytidine 5-diphosphate (CDP), 50 pmoles pour la cytidine 5-triphosphate (CTP), 250 pmoles pour l'adénosine (Ado),

50 pmoles pour l'adénosine 5-monophosphate (AMP), 50 pmoles pour l'adénosine 5-diphosphate (ADP) et 50 pmoles pour l'adénosine 5-triphosphate (ATP).

Les dérivés de la morpholine obtenus sont séparés par CLHP en polarité de phases inversée; ces séparations sont rapides, simples et reproductibles, et permettent l'analyse de très petites quantités de produits. En détection fluorimétrique, l'analyse par CLHP des nucléosides et nucléotides permet d'atteindre des limites de détection de 28 à 667 fmoles injectées.

La méthode par CLHP décrite ici, associée à une technique de préparation du dérivé aldéhydique, est un moyen fiable et sensible de doser les nucléosides et nucléotides dans les fluides biologiques. La précision, la répétabilité et les limites de détection bien en dessous des niveaux normalement rencontrés dans les fluides biologiques rendent cette méthode intéressante pour un grand nombre d'études telles les études cliniques.



ELSEVIER

Analytica Chimica Acta 00 (1994) ACA15994 C

**ANALYTICA
CHIMICA
ACTA**

Luminarin 3 as a derivatization reagent for the liquid chromatographic determination of cytidine adenosine and related nucleotides with fluorimetric detection

F. Traoré ^{a,b,*}, C. Fente ^c, P. Prognon ^a, G. Mahuzier ^a

^a *Laboratoire de Chimie Analytique II, UPS / CEP, 92290 Châtenay-Malabry, France,* ^b *Faculté de Médecine et de Pharmacie de l'Université de Conakry, Conakry, Guinée,* ^c *Facultad de Veterinaria, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, 27002 Lugo, Spain*

(Received 25th May 1993; revised manuscript received 3rd December 1993)

Abstract

Luminarin 3 is a quinolizinocoumarine labelling reagent for carbonyl compounds, reacting via its hydrazide function. It was found to be a highly sensitive fluorescence reactive probe for nucleosides and nucleotides in liquid chromatography. Luminarin 3 reacts with the dialdehyde induced by preliminary periodate oxidation of the ribose moiety of nucleosides and nucleotides in 100 mM acetate buffer (at pH 3.0 or 4.0, depending on the derivative), to give highly fluorescent morpholino derivatives. The luminarin 3 derivatives of cytidine (Cyd), adenosine (Ado) and corresponding nucleotides were separated by chromatography on a Spherisorb cyano 5- μ m column (300 \times 4.6 mm i.d.), with a mixture of methanol and 100 mM phosphate buffer pH 6.0 (30/70, v/v), followed by fluorescence detection. In such a way the separation can easily be optimized for the eight nucleotides by variation of the methanol content of the mobile phase. Typical detection limits (in amount injected with signal/noise ratio of 3) were 40 fmol for Cyd; 52 fmol for CMP; 71 fmol for CDP; 36 fmol for CTP; 667 fmol for Ado, 70 fmol for AMP, 28 fmol for ADP and 39 fmol for ATP.

Key words: Liquid chromatography; Fluorimetry; Luminarin 3; Nucleosides; Nucleotides

1. Introduction

Nucleic acids are essential constituent of cells and tissues and are found in biological fluids. Because of their obvious importance in many fields of the biosciences, much attention has been paid in their monitoring because of their possible

use as markers in various diseases [1–3]. Many quantitative methods, including direct UV-visible spectrophotometry [4] and fluorimetry [5]; liquid chromatography (LC) combined with UV spectrophotometric [1,6–9] or fluorimetric detection [2,3,10–14] were reported.

The spectrophotometric methods mainly suffer from the lack of specificity and sensitivity. LC measurements with UV spectrometric detection lack of the required high sensitivity. As an alternative to these methods, the fluorimetric LC

* Corresponding author.

methods with haloacetaldehydes [2,3,10,12–14] for adenine-containing compounds, or 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin [11] for pyrimidine compounds, appear to be the most sensitive.

The common drawback of these derivatization methods is that they are not universally useful for both purine and pyrimidine compounds. However, if the target of the derivatization is the saccharide moiety covalently linked to the nucleobase, all nucleosides and nucleotides become accessible. An analogous approach has been used for the labelling of other glycoconjugates such as glycoproteins. In this case, the oligosaccharide moiety, in many instances, is not involved in the biological activity, which is thus preserved during analytical work. This non-involvement of the oligosaccharide in ligand binding forms the basis of the methodology for the specific and site-directed labelling of the oligosaccharide moieties of glycoproteins with fluorescent dyes [15,16]. In a first stage aldehyde groups are generated on the

oligosaccharide moieties by chemical oxidation of vicinal diols using sodium metaperiodate. The dialdehyde thus generated may then be condensed with nucleophiles such as primary amines or hydrazine derivatives to introduce a marker.

The mechanism of the derivatization of nucleosides and nucleotides by oxidation and subsequent reaction with model hydrazides has been investigated in a fundamental study [17]. Under suitably mild conditions, periodate oxidation is reported to be specific for the generation of a dialdehyde on a nucleoside or nucleotide. The yield of the periodate oxidation reaction product is reported as 90% for adenosine (Ado) [17].

In previous work, we developed 1*H*,5*H*,11*H*-[1]benzopyrano[6,7,8-*ij*]quinolizine-9-acetic acid 2,3,6,7-tetrahydro-11-oxohydrazide (luminarin 3 = Lu.3) [18,19] as a fluorescent reagent for carbonyl compounds. Indeed, it was found that dialdehyde generated by periodate oxidation of the ribose moiety of nucleosides or nucleotides re-

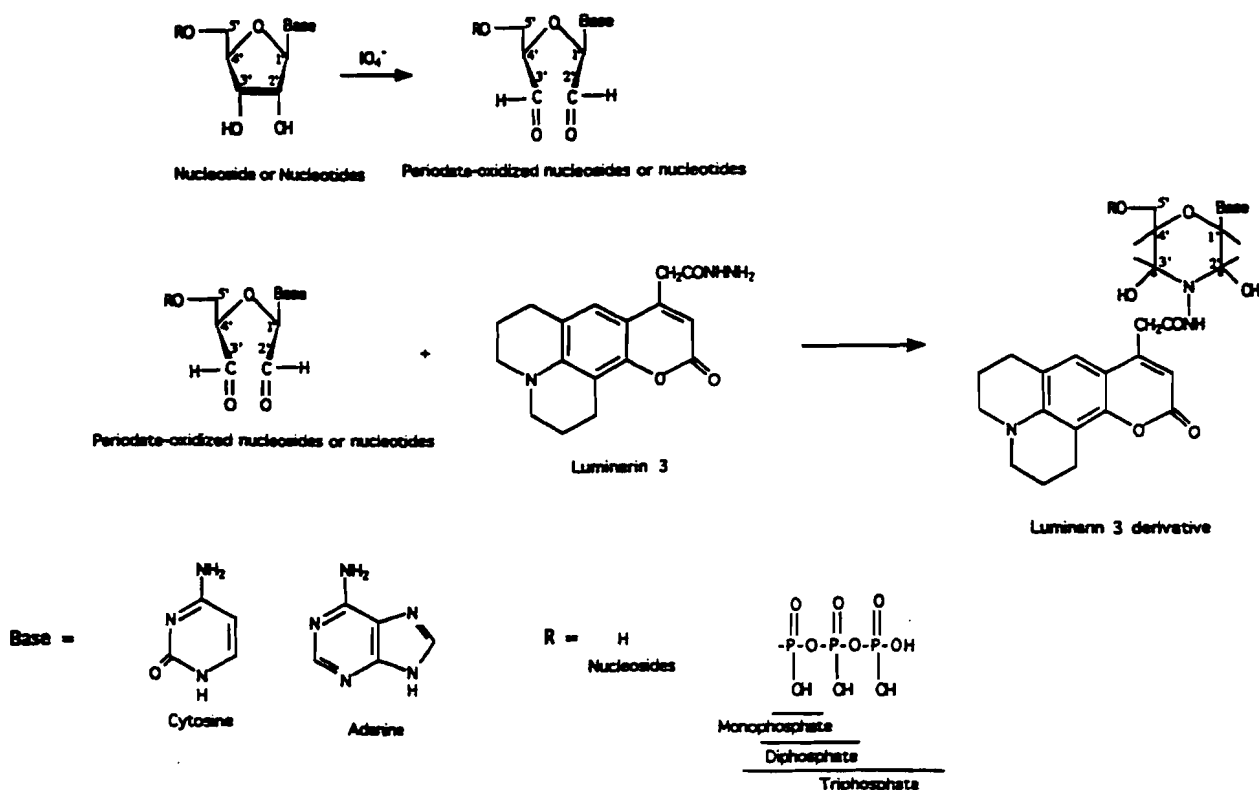


Fig. 1. Derivatization reaction scheme of purine and pyrimidine ribonucleosides and their nucleotides with luminarin 3.

acted with Lu.3 to give morpholino derivatives (Fig. 1).

The aim of this paper is to demonstrate the applicability of the Lu.3 labelling in trace analysis of purine and pyrimidine nucleosides and corresponding nucleotides. In this work, attempts were made, to elucidate the structure of the morpholino derivatives of two of the studied nucleosides, and then, to establish the optimum derivatization conditions. Thus, a sensitive and selective method based on LC with fluorimetric detection is proposed for the determination of cytidine (Cyd); cytidine-5'-monophosphate (CMP); cytidine-5'-diphosphate (CDP); cytidine-5'-triphosphate (CTP); adenosine (Ado); adenosine-5'-monophosphate (AMP); adenosine-5'-diphosphate (ADP) and adenosine-5'-triphosphate (ATP) using luminarin 3.

2. Experimental

2.1. Chemicals

All chemicals were of analytical grade unless stated otherwise, and all solvents used in chromatography were of HPLC grade. Cytidine, adenosine and related periodate-oxidized nucleotides were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Tetrabutylammonium hydrogen phosphate (TBAHP) was purchased from Aldrich (Steinheim). Luminarin 3 was manufactured by Eurobio (Les Ulis).

2.2. Solutions

Standard solutions of periodate-oxidized nucleosides and nucleotides (25 mM) were freshly prepared by dissolving the carefully weighed adenine and cytosine compounds in 100 mM acetate buffer (pH 4.0 and 3.0, respectively) and stored at -20°C . Stock solution of luminarin 3 (50 mM) was prepared in dimethylsulfoxide and kept for one year, protected from light at -20°C . Working solutions were prepared by appropriate dilution of the corresponding standard solution in the selected solvent.

2.3. Instrumentation

The LC system consisted of a Spectra System Model P.1000 solvent-delivery pump (Spectra Physics) equipped with a Rheodyne® injector Model 7125 (Cotati, CA), a 20- μl sample loop and a Shimadzu Model RF-530 fluorescence LC monitor, excitation and emission wavelengths were set at 402 and 501 nm, respectively. Chromatograms were recorded on a Shimadzu C-R5A integrator. Excitation and emission spectra of luminarin 3 were recorded on a Perkin Elmer Model LS 50 luminescence spectrometer (Perkin Elmer, St. Quentin en Yvelines) with the excitation and emission slits adjusted at 2.5 nm. Absorbance spectra was recorded on a Model UV-2100 Shimadzu UV-visible spectrophotometer (Touzart et Matignon, Vitry sur Seine). The relative fluorescence quantum yield was estimated as the ratio of the total fluorescence intensity to the absorbance at the maximum of excitation of the corresponding luminarin 3 solution, in arbitrary units, according to Parker and Rees [20]. The liquid secondary ion mass spectrometry (LSIMS) apparatus was a VG AutospecE model.

2.4. Chromatographic conditions

In this study three eluting conditions were used, the support and the flow rate remaining the same in all instances (a Spherisorb Cyano-5 μm column (300 \times 4.6 mm i.d., SFCC/Shandon, Eragny, France) flushed by the selected eluent at 1 ml/min).

Eluent I: methanol–100 mM dipotassium hydrogenphosphate, pH 6.0 (30/70, v/v).

Eluent II: methanol–100 mM dipotassium hydrogenphosphate containing 10 mM tetrabutylammonium hydrogenphosphate adjusted to pH 6.0 with phosphoric acid (30/70, v/v).

Eluent III: methanol–100 mM dipotassium hydrogenphosphate containing 10 mM ammonium acetate adjusted to pH 6.0 with phosphoric acid (30/70, v/v).

Excitation and emission wavelengths were chosen to obtain the maximum fluorescence signal of the fluorogenic reagent in the selected mobile phase. No spectroscopic shift was observed when

changing the eluent from mobile phase I to II and III. The best separation of Lu.3 derivatives of Cyd and Ado and related nucleotides was achieved by using eluent III. In all instances the mobile phases were carefully degassed by sonication and filtration (Waters-Millipore 0.45- μ m filter) before use.

2.5. Derivatization procedure

200 μ l aliquots of a test solution of Cyd, Ado and related periodate-oxidized nucleotide compounds, were placed in a brown glass test tube (75 \times 12 mm i.d.), and 10 μ l of the luminarin 3 solution (10 mM) was added. The tubes were then capped and allowed to stand at room temperature for 2 h. A 20 μ l aliquot of the final reaction mixture was directly injected into the chromatograph.

3. Results and discussion

3.1. Formation of the fluorescent derivatives

The reaction of periodate-oxidized nucleosides and nucleotides with luminarin 3 has a 1:1 stoichiometry (Fig. 1). The structures proposed for the reaction products of Ado and Cyd with luminarin 3 are based on the interpretation of the corresponding mass spectra (LSIMS). The data shown in Table 1 report the main ions found for each dialdehyde derivative. The mass spectrum for the Cyd and Ado luminarin 3 derivatives show a $(M + H)^+$ ion at m/z 555.2 and 579.2, respectively, indicating that only one carbonyl of periodate-oxidized Cyd and Ado was derivatized with

luminarin 3. Additionally, an adduct ion was observed in each case at m/z 577.2 and 601.2 for $(M + Na)^+$. The fragmentation that follows yields fragments (at m/z 282.1) by loss of a luminarin 3 nucleus, then an m/z 255.1 ion is obtained by loss of CO. This last species fragments further, by ejection of CO from the lactone ring and a hydrogen atom, to give the fragment at m/z 226.

It can be concluded from these data that only one carbonyl functionality of periodate-oxidized nucleosides and nucleotides reacts with Lu.3. Nevertheless, the mass spectral data give no indication of the absence of a free aldehyde group, this was clear from the presence of two chromatographic peaks for luminarin 3 Ado and Cyd derivatives (data not shown) due to the presence of two new asymmetric centres (C2'), (C3') and the fact that two positions of the nitrogen atom are possible in the formed morpholine ring (see Fig. 1). The occurrence of the morpholine structure of the dialdehyde generated by periodate oxidation of the ribose moiety in Ado or AMP has been observed with other hydrazide-based reagents, as described by Hansske et al. [17].

3.2. Choice of optimal conditions for derivatization

Periodate-oxidized AMP and CMP were selected as model compounds to establish reaction conditions suitable for a more general method.

Nucleosides and nucleotide dialdehyde compounds reacted with luminarin 3 only in acidic solution (pH < 6.0). The use of acetate buffer at 50–200 mM gave the highest signals. 100 mM was selected for the fastest reactions. Because luminarin 3 is a hydrazide, its nucleophilic character is sufficient for a rapid reaction and its limited

Table 1
LSIMS fragmentation data for luminarin 3 derivatives of adenosine and cytidine

Cyd-luminarin 3 derivative			Ado-luminarin 3 derivative		
m/z	Ion	Relative abundance (% of base peak)	m/z	Ion	Relative abundance (% of base peak)
1073.5	$[(MH - H_2O) \times 2 - H]^+$	3.3	1121.5	$[(MH - H_2O) \times 2 - H]^+$	1.0
577.2	$[M + Na]^+$	7.5	601.2	$[M + Na]^+$	8.6
555.2	$[M + H]^+$	6.1	579.2	$[M + H]^+$	32.4
537.2	$[MH - H_2O]^+$	20.0	561.2	$[MH - H_2O]^+$	48.2

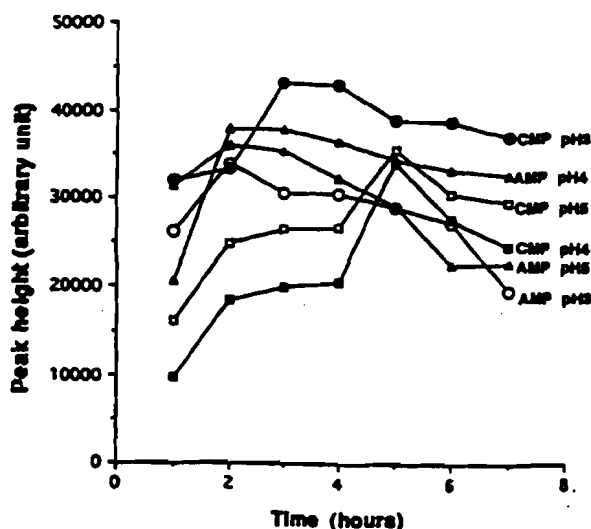


Fig. 2. Effect of reaction time and pH on the derivatization reaction of AMP and CMP with luminarin 3.

basicity tends to prevent labialization and release of the phosphate group by β -elimination. The strong basicity of amines and hydrazines and their ability to accept a proton is the main reason for β -elimination of the 5'-phosphate from the intermediate Schiff base [21].

Effect of pH and duration of the reaction on the derivatization yield

The effect of the pH and the duration of the reaction on the reaction yield, were examined with standard samples containing 1 nmol of each compound to be derivatized by varying the pH of the 100 mM acetate buffers from pH 3.0 to 5.0 and using various reaction times. As shown in Fig. 2, the pH optima of the reactions of AMP and CMP were found to be 4.0 and 3.0, respectively. The reactivity of AMP was the strongest, as shown in Fig. 2. The reaction of AMP reached a plateau at 25°C after 120 min, whereas the plateau was obtained after 180 min in the same conditions for CMP. Both AMP and CMP showed decreased peak heights for longer reactions. This decrease, which is much more important with AMP than with CMP, is due to the hydrolysis of the derivatized product yielding the corresponding 9-carboxyluminarin. For this, the reaction mixture was immediately injected after the reac-

tion or, if the injection is to be postponed, the mixture was stored at -20°C . These observations clearly indicate that for simultaneous determination of adenosine and cytidine and related nucleotides, the derivatization could be performed at room temperature for 120 min.

Effect of luminarin 3 concentration on quantitation analysis

The molar ratio of luminarin 3 to AMP and CMP was varied from 25 to 500. The total amount of AMP and CMP involved was always 1 nmol. The luminarin 3 gave the most intense and constant peaks for amounts > 50 nmol corresponding to a minimum molar ratio of luminarin 3 to cytosine and adenine compounds of 50. When the ratio fell below this value, the assay response always became non-linear. Thus 100 nmol luminarin 3 was adopted and samples containing high concentrations (> 20 nmol/ml) of adenine and cytosine compounds had to be diluted prior to derivatization in order to ensure a linear response.

3.3. Chromatographic separation

The simultaneous separation in reversed-phase LC of all the studied nucleosides and nucleotides is extremely difficult even using gradient elution.

Because the nucleotides exist as negatively charged compounds at pH values > 3.0 [22], ion-pair chromatography is generally performed. As a consequence, quaternary amines are generally used as counterions.

To establish the optimum conditions for the separation, the changes in composition of the mobile phase were tested. Three mobile phases, differing from each other by the presence or absence of TBAHP and ammonium acetate, were investigated. In all cases, the pH was set at 6.0 to obtain the nucleotides mainly in their ionized forms. 100 mM phosphate buffer was chosen because it exhibited a good buffer capacity at pH 6.0 and it led to a better separation due to its ionic strength. The performances of the different mobile phases were compared in terms of retention times, capacity factors and selectivity. As shown in Table 2, in the presence or absence of

TBAHP, the retention order of luminarin 3 derivatives remains constant (the greater the number of phosphate groups, the more hydrophilic the derivative). At constant ionic strength (100 mM dipotassium hydrogenphosphate) and fixed pH of the mobile phase and gradually increasing concentrations of TBAHP from 5 to 50 mM, the retention times of luminarin 3 derivatives did not change. On the other hand gradual increases in pH of the mobile phase (3.0 to 7.0), for a TBAHP level which was kept constant, decreased the retention time of derivatives and improved the resolution. The separation of di- and triphosphate derivatives of the same parent base was not as good as for the other derivatives (monophosphates and related nucleo-

sides). The selectivity was not significantly modified with the three tested chromatographic systems suggesting that the selectivity depends mainly on the pH of the buffer. The retention times of luminarin 3 nucleotide derivatives increased when ammonium acetate or TBAHP was added to the phosphate buffer (Table 2). Depending on the compound, a 12 to 25% increase in retention time was observed when 10 mM of ammonium acetate was added to the mobile phase (eluent III), and a 12 to 35% increase in retention times when ammonium acetate was replaced by 10 mM TBAHP (eluent II). This seems to suggest that ion pairing formation should have a minor effect in comparison with the simple ionic strength effect. A downward trend was observed

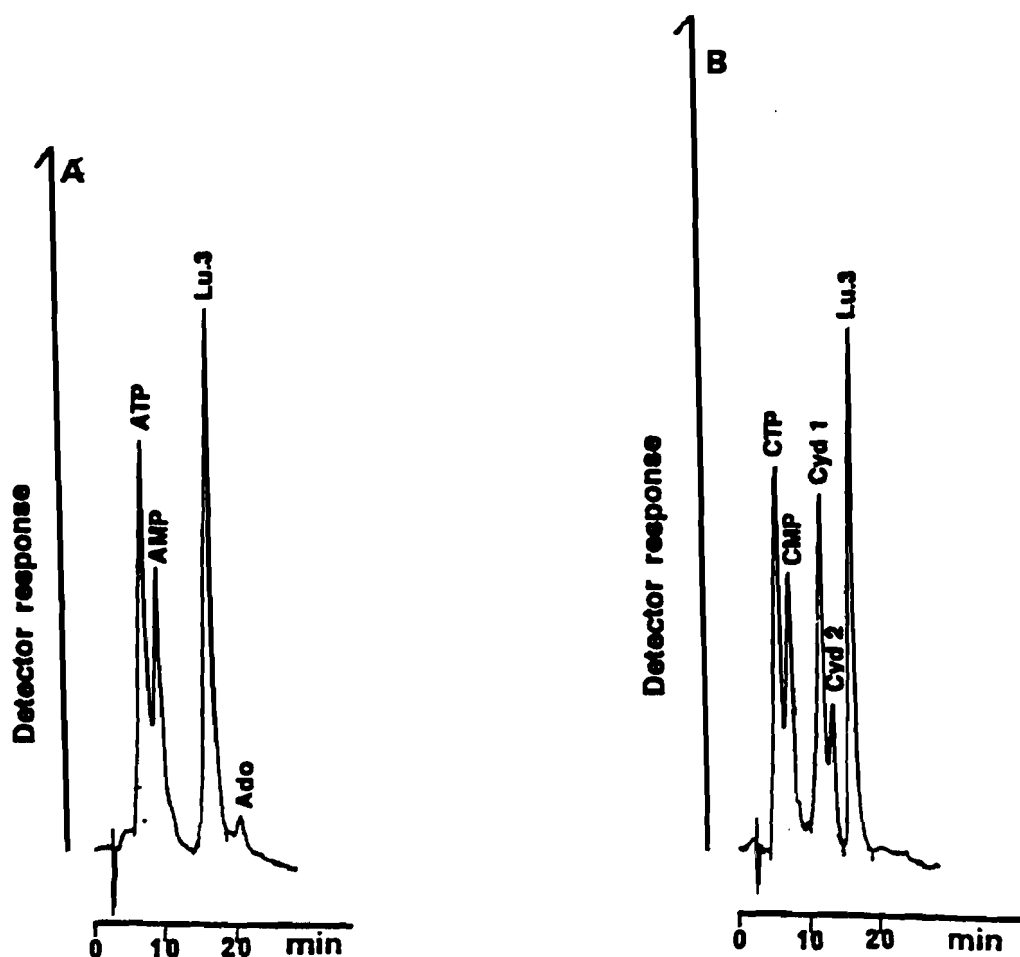


Fig. 3. Chromatographic separation of luminarin 3 and luminarin 3 derivatives of adenine (A) and cytosine (B) compounds with fluorescence detection, 2 mV full-scale. 2 pmol of each derivative were injected on to column. For LC conditions see the text.

Table 2

Comparison of the chromatographic performances of the three mobile phases

$$\Delta t_r\%_1 = \frac{100(t_{r,II} - t_{r,I})}{1/2(t_{r,II} + t_{r,I})}$$

$$\Delta t_r\%_2 = \frac{100(t_{r,III} - t_{r,I})}{1/2(t_{r,III} + t_{r,I})}$$

Com- pounds	Eluent I		Eluent II		Eluent III			
	<i>k'</i>	α	<i>k'</i>	$\Delta t_r\%_1$	α	<i>k'</i>	$\Delta t_r\%_2$	α
CTP	0.65		1.02	19.97		0.92	15.17	
CDP	0.86	1.32	1.12	12.63	1.10	1.18	15.65	1.28
ATP	0.97	1.13	1.82	35.47	1.63	1.23	12.66	1.04
ADP	1.15	1.19	1.97	32.38	1.08	1.44	12.92	1.17
CMP	1.24	1.08	1.76	20.93	1.12	1.53	12.43	1.06
AMP	1.64	1.32	2.50	28.15	1.42	2.00	12.83	1.31
Cyd	2.25	1.37	1.90	-11.11	1.32	2.77	14.90	1.39
Lu3	2.92	1.30	2.52	-10.81	1.33	4.02	24.62	1.45
Ado	3.99	1.37	3.14	-18.82	1.25	5.21	21.78	1.30

for the retention times of luminarin 3 Ado and Cyd derivatives. (11–19%) when TBAHP was added to the mobile phase (eluent II). The reason for this diminution remains unclear. Finally based on all these observations, a satisfactory separation of the luminarin 3 derivatives of adenine and cytosine compounds listed in Table 2 was achieved using eluent III. This mobile phase was finally chosen for quantitative studies. A typical chromatogram obtained with a standard mixture of adenine and cytidine compounds is shown in Fig. 3A and B. It should be noted that under these chromatographic conditions, the luminarin 3 derivative of Cyd showed two peaks, the first (at

Table 3

Overall calibration graphs in acetate buffer, and detection limits for luminarin 3 derivatives in liquid chromatography with fluorescence detection. *y* represents the peak height (arbitrary units), and *x* is the amount of the analyte (nmol) in the reaction mixture

Com- pounds	Equation ^a coefficient	Correlation (<i>r</i>) ^b	Detection limits (fmol)
Ado	$y = 356x + 167$	0.966	6617
AMP	$y = 6880x - 1216$	0.960	69.2
ADP	$y = 2078x - 232$	0.964	27.7
ATP	$y = 2705x - 819$	0.981	39.1
Cyd	$y = 3658x - 679$	0.998	40.1
CMP	$y = 5953x - 2821$	0.992	51.5
CDP	$y = 1216x - 146$	0.998	71.2
CTP	$y = 1164x + 663$	0.975	35.8

^a The linear range is 0.5–5 nmol in all instances.

^b *n* = 6.

12.1 min, 73% of single peak height) being much higher than the second (at 13.9 min, 27%). These two peaks are probably the *threo* and *erythro* isomers involved by the derivatization process (see Fig. 1 and as described above).

3.4. Analytical characteristics

With the chromatographic conditions chosen as described above, calibration plots of peak height, versus amounts of nucleosides and nucleotides labelled with luminarin 3, were linear over the range 0.5–5 nmol as shown on Table 3. The correlation coefficients varied between 0.960 and 0.998 for all eight compounds.

Table 4

Reproducibility of the proposed method

Compounds	Intra-assay precision (%) ^a			Inter-assay precision (%) ^a		
	1.9 pmol	5.7 pmol	9.5 pmol	1.9 pmol	5.7 pmol	9.5 pmol
Ado	5.19	2.34	4.34	4.89	4.77	4.28
AMP	2.62	4.12	3.53	6.24	3.45	2.99
ADP	4.12	3.13	3.51	6.16	4.35	4.44
ATP	4.51	2.74	2.86	7.42	2.72	3.36
Cyd	5.97	2.86	2.55	6.05	2.99	3.25
CMP	3.13	2.45	3.32	4.62	3.28	4.52
CDP	3.83	4.69	3.04	3.10	4.45	3.81
CTP	3.78	3.47	2.23	3.78	1.76	2.07

^a *n* = 6, for details see text.

Repeated derivatizations ($n = 6$) of nucleoside and nucleotide solutions gave peak heights with relative standard deviations ranging from 1.8–7.4% in the range 1.9–9.5 pmol of derivatives injected, as shown in Table 4. The intra- and inter-assay precision were determined using the acetate buffer. To determine the intra-assay precision, six samples with a concentration located at the middle of the range of the calibration graph and measured on the same day were compared. Concerning the inter-assay precision, test samples with a concentration in the middle of each calibration plot were quantified on six consecutive days.

The detection limit was obtained by derivatization of 1 nmol of analyte, and taking 20 μ l aliquots of diluted samples using an integrated peak area signal-to-noise ratio of 3 (Table 3). All the compounds tested can be detected at the femtomol level, except the luminarin 3-Ado derivative which has a detection limit of 667 fmol (see later). The low detection limits of most Lu.3 derivatives could be explained by relatively high fluorescence quantum yields of luminarin 3 which was similar in all eluent used in this study.

4. Discussion

Methods involving the use of hydrazide fluorescent derivatizing agents have received little attention in liquid chromatography. Hydrazine derivatives are strong nucleophiles and will react with a number of functional groups including the aldehydes generated on the oligosaccharide moieties of glycoconjugates by specific oxidation reactions. The susceptibility of glycoconjugates to oxidation by periodate has frequently been used in biochemical and immunological studies and has been reviewed recently [16,17,23–26]. Surprisingly, however, LC of periodate-oxidized ribonucleosides and ribonucleotides has not been widely reported.

In studies on nucleic acid metabolism, the trace analysis of nucleic acid components with high sensitivity and selectivity is required. In the

present study, we attempted to optimize the luminarin 3 derivatization and the chromatographic separation of derivatized adenine and cytosine periodate-oxidized nucleosides and nucleotides. The results obtained show that these compounds can be readily derivatized by use of luminarin 3 after periodate oxidation. The reaction is rapid and quantitative, making this derivatizing agent an attractive choice for trace analysis. Disadvantages of the method are that the unreacted luminarin 3 appears in the chromatogram requiring an efficient separation of derivatives to avoid interference, because luminarin 3 may tend to overlap the low amount of the Ado-luminarin 3 derivative making separation difficult. Thus, the detection limit of this derivative (ca. 667 fmol) is ca. 9–24 times higher than those other derivatives (ranging between 28 to 71 fmol).

For use in the determination of nucleosides and nucleotides, the derivatization with luminarin 3 has to be preceded by an oxidation with periodate, a reaction which is widely used for labelling of glycoproteins. This reaction is known for its very high selectivity and yield (98.7% for glycopeptides) [25]. In its application to nucleosides and nucleotides, a yield of 90% for Ado is reported [17].

Derivatization with luminarin 3 combined with LC with fluorescence detection is an alternative to the aforementioned methods currently exploited in nucleoside and nucleotide detection [1–14]. It is expected that the method presented here will be suitable for the derivatization and separation of nucleosides and nucleotides, and its high sensitivity may permit determination of nucleosides and nucleotides in body fluids. Further studies are in progress to test the applicability of the proposed technique.

5. Acknowledgements

This work was supported in part by a grant-in-aid (Aguiré Basualdo) for scientific research from the Chancellery of the University (Paris, France).

6. References

- [1] O.C. Ingebretsen, A.M. Bakken and M. Farstad, *Clin. Chem.*, 31 (1985) 695.
- [2] Y. Zhang, J.D. Geiger and W.W. Lault, *Am. J. Physiol.*, (*Gastrointest-Liver Physiol.* 23), 260 (1991) G658.
- [3] B. Levitt, R.J. Head and D.P. Westfall, *Anal. Biochem.*, 137 (1984) 93.
- [4] D.H. Namm and J.P. Leader, *Anal. Biochem.*, 58 (1974) 511.
- [5] D.G. Gardiner, *Anal. Biochem.*, 95 (1979) 377.
- [6] P.R. Brown, S. Bobick and F.L. Hanley, *J. Chromatogr.*, 99 (1974) 587.
- [7] A.M. Krstulovic, P.R. Brown and D.M. Rosiè, *Anal. Chem.*, 49 (1977) 2237.
- [8] M.C. Capogrossi, M.R. Holdiness and Z.H. Israili, *J. Chromatogr.*, 227 (1982) 168.
- [9] J. Ontyd and J. Schrader, *J. Chromatogr.*, 307 (1984) 404.
- [10] M. Yoshioka, K. Nishidate, H. Iizuka, A. Nakamura, M.M. El-Merzabani, Z. Tamura and T. Miyazaki, *J. Chromatogr.*, 309 (1984) 63.
- [11] S. Yoshida, S. Hirose and M. Iwamoto, *J. Chromatogr.*, 383 (1986) 61.
- [12] H. Fujimori, T. Sasaki, K. Hibi, M. Senda and M. Yoshioka, *J. Chromatogr.*, 515 (1990) 363.
- [13] A. Ramos-Salazar and A.D. Baines, *Anal. Biochem.*, 145 (1985) 9.
- [14] S. Soniki, J. Tanaka, S. Hisamatsu and T. Kobayashi, *J. Chromatogr.*, 475 (1989) 311.
- [15] M. Wilchek and E.A. Bayer, *Methods Enzymol.*, 138 (1987) 429.
- [16] D.J. O'Shannessy and R.H. Quarles, *J. Appl. Biochem.*, 7 (1985) 347.
- [17] F. Häfsske, M. Sprinzi and F. Cramer, *Biorganic Chemistry*, 3 (1974) 367.
- [18] F. Traoré, M. Tod, J. Chalom, R. Farinotti and G. Mahuzier, *Anal. Chim. Acta*, 269 (1992) 211.
- [19] F. Traoré, G.A. Pianetti, L. Dallery, M. Tod, J. Chalom, R. Farinotti and G. Mahuzier, *Chromatographia*, 36 (1993) 96.
- [20] C.A. Parker and W.T. Rees, *Analyst*, 85 (1960) 587.
- [21] A. Steinschneider, *Biochemistry*, 10 (1971) 173.
- [22] P.A. Perrone and P.R. Brown, in M.T. Hearn and M. Dekker (Ed.), *Chromatographic Science: Ion-Pair Chromatography*, Vol. 32, New York, 1985, p. 259.
- [23] D.J. O'Shannessy, P.J. Voorstad and R.H. Quarles, *Anal. Biochem.*, 163 (1987) 204.
- [24] E.A. Bayer, H. Ben-Hur and M. Wilchek, *Anal. Biochem.*, 170 (1988) 271.
- [25] J.A. Rothfus and E.L. Smith, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 1402.
- [26] D.J. O'Shannessy and R.H. Quarles, *J. Immunol. Methods*, 99 (1987) 153.

TROISIEME PARTIE :

*ETUDE DU MARQUAGE D'ANTICORPS
OU D'ANTIGENES PAR LA LUMINARINE
3, 11 et 12*

Après un rappel de quelques notions concernant les immunodosages et l'exposé des différents types de marqueurs déjà utilisés dans ce domaine, nous décrivons, dans un premier temps, une méthode permettant l'utilisation des luminarines hydrazides (Luminarine 3, 11 et 12) comme marqueurs luminescents des immunoglobulines.

La γ -globuline bovine (IgG) a été utilisée comme modèle, pour étudier les conditions de la réaction de marquage, les conditions de purification des protéines marquées, le taux de greffage en fonction de l'excès de la luminarine hydrazide, et l'intensité de fluorescence des protéines marquées en fonction du taux de greffage.

Dans un deuxième temps, nous présentons les résultats des essais de marquage de l'hormone chorionique gonadotrope (HCG) humaine en vue d'une application analytique (Immunodosage).

I. RAPPEL DE CERTAINS ASPECTS DES IMMUNODOSAGES

Les immunodosages regroupent l'ensemble des méthodes analytiques mettant en jeu la réaction antigène-anticorps. Pour la plupart de ces dosages on fait intervenir un troisième élément, le traceur. Celui-ci résulte de l'association de l'antigène ou de l'anticorps avec un "marqueur" [BARBIER (1989)].

I-1 CARACTERISTIQUES DES ANTICORPS, DES ANTIGENES, DU COMPLEXE IMMUN AINSI QUE DES MÉCANISMES QUI RÉGISSENT LA RÉACTION IMMUNOLOGIQUE

I-1-1 Les anticorps

les anticorps (Ac) sont définis par deux propriétés :

- ce sont des immunoglobulines, glycoprotéines produites par les lymphocytes **B** activés en plasmocytes en réponse à l'introduction dans l'organisme d'un élément étranger (antigène : Ag);
- ils sont capables de reconnaître spécifiquement l'antigène qui a suscité leur production et de former par l'intermédiaire de sites complémentaires un complexe immun.

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a défini les immunoglobulines de façon officielle comme «des protéines animales douées d'activités anticorps, auxquelles s'ajoutent des protéines apparentées aux anticorps par leur structure chimique».

Les immunoglobulines sont toujours constituées de 4 chaînes identiques deux à deux :

2 chaînes légères, L (light)

2 chaînes lourdes, H (heavy)

et l'étude de ces chaînes a révélé l'existence de plusieurs types différents :

- 2 types de chaînes légères, κ (kappa) et λ (lambda), comportant 214 acides aminés (masse moléculaire (PM) de 20000 à 23000);
- 5 types de chaînes lourdes : γ , α , μ , δ et ϵ , composées de 446 acides aminés (PM de 50000 à 70000).

La nature des chaînes lourdes sert à définir les 5 classes d'immunoglobulines, dont l'abréviation générale est Ig :

- les immunoglobulines G (IgG) contenant 2 chaînes lourdes γ ;
- les immunoglobulines A (IgA) contenant 2 chaînes lourdes α ;
- les immunoglobulines M (IgM) contenant 2 chaînes lourdes μ ;
- les immunoglobulines D (IgD) contenant 2 chaînes lourdes δ ;
- les immunoglobulines E (IgE) contenant 2 chaînes lourdes ϵ .

Chaque type de chaîne lourde pouvant être combiné à des chaînes légères de type κ ou λ qui diffèrent par leur antigénicité.

Les caractéristiques principales des 5 groupes d'immunoglobulines sont rassemblées sur le tableau IV.

Les immunoglobulines G constituent les trois quarts des immunoglobulines circulantes. La majorité des tests immunologiques mettent en oeuvre cette classe d'immunoglobuline.

L'hydrolyse enzymatique par la papaïne scinde la molécule d'immunoglobuline en trois fragments :

- un fragment cristallisable, Fc, comportant environ la moitié de chacune des chaînes lourdes, du côté C-terminal, reliées par un pont disulfure;
- deux fragments identiques, appelés Fab (antigen binding) car ils sont capables de se lier à l'antigène correspondant; chacun est constitué d'une chaîne légère et de la moitié N-terminale d'une chaîne lourde, reliées par un pont disulfure.

Tableau IV : Principales caractéristiques des immunoglobulines

[PERCHERON et coll., (1985)]

Classes d'Ig	Teneur dans le sérum	Constante de sédimentation	Teneur en glucides (%)	P.M ^a	Classes de chaînes lourdes
IgG	12 g/l	7 S	3	160000	γ (avec sous-classes)
IgA	3 g/l	7 S	8	160000	α (avec sous-classes)
IgM	1 g/l	19 S	12	1000000	μ
IgD	0,1 g/l	7 S	12	180000	δ
IgE	0,001 g/l	8 S	11	200000	ε

^aMasse moléculaire

Dans les chaînes légères, comme dans les chaînes lourdes, la partie N-terminale comporte, une zone variable (V) de 109 acides aminés, où les séquences varient suivant les immunoglobulines, et une zone de structure primaire constante (C) semblable dans une classe d'immunoglobuline donnée. Dans la zone variable, trois régions où la structure primaire est l'objet des variations les plus fréquentes sont appelées hypervariables (site anticorps).

Chacune des chaînes porte plusieurs ponts disulfures, dits intercaténaux, et chaque chaîne lourde est porteuse d'un groupe glucidique au niveau de la fraction Fc.

L'ensemble de ces données structurales est schématisé sur la Figure 27.

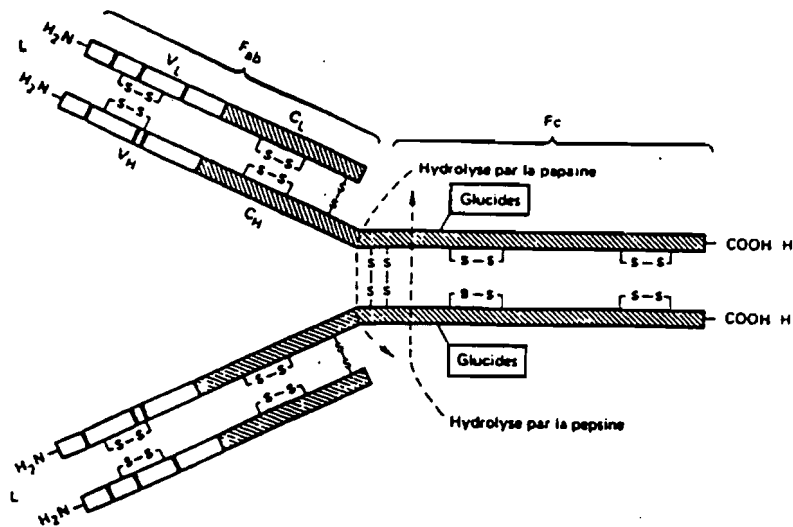


Figure 27 : Schéma structural d'une immunoglobuline

: zones hypervariables

Fab : site de liaison à l'antigène ("antigen binding")

Fc : fragment cristallisable

L : chaîne légère ("Light")

H : chaîne lourde ("Heavy")

V : zone variable

C : zone constante

La structure globale d'une immunoglobuline révèle donc l'existence de deux zones actives, capables de fixer chacune une molécule d'antigène. Quand les antigènes sont eux-mêmes divalents, il se forme des complexes de structure fermée, comportant par exemple 3 antigènes et 3 anticorps.

I-1-2 Les antigènes

Ce sont les agents responsables du déclenchement de la réaction immunitaire. Parmi les antigènes, on distingue ceux qui sont spontanément immunogènes et les haptènes. Les haptènes sont de petites molécules (P.M < 2000) qui ne deviennent immunogènes qu'après couplage à un porteur de masse moléculaire élevé (albumine bovine ou thyroglobuline par exemple). Le nombre de déterminants antigéniques (entité antigénique qui reconnaît l'anticorps) ou épitopes dépend surtout de la taille de l'antigène : la limite inférieure est de un pour de petites molécules hapténiques, alors que certains virus peuvent porter des centaines d'épitopes.

I-1-3 Le complexe immunitaire

La formation et la stabilité du complexe Ag-Ac ne sont possibles que par la mise en jeu simultanée d'un nombre suffisant d'interactions élémentaires. ces interactions sont de quatre types :

- liaison ionique
- liaison de Van der Waals
- liaison hydrogène
- liaison hydrophobe.

L'énergie moyenne de ces liaisons varie de 4 à 30 kJ/mole. Les interactions hydrophobes représentent jusqu'à 50% des forces de liaison. L'affinité du site anticorps pour l'antigène est le reflet du nombre d'interactions et de leur répartitions spatiales (modèle de la clef et de la serrure). La complémentarité stéréochimique entre les épitopes et anticorps définit la spécificité. La spécificité d'un anticorps pour un antigène est rarement absolue. La possibilité de reconnaître des analogues chimiquement voisins est connue sous le nom de réaction croisée.

I-2 CLASSIFICATION DES METHODES IMMUNOLOGIQUES

Nous nous limiterons ici aux méthodes faisant appel à un marqueur.

Un marqueur pour immunodosage est une entité liée chimiquement à une molécule d'antigène ou d'anticorps et délivrant un signal (direct ou indirect) quantitativement mesurable.

Devant les nombreuses variantes méthodologiques, plusieurs critères de classifications peuvent être envisagés selon les proportions relatives d'anticorps et d'antigènes dans le milieu réactionnel. On distingue ainsi :

- les méthodes dites "en défaut d'anticorps" ou méthodes compétitives
- les méthodes dites "en excès d'anticorps" parmi lesquelles les méthodes immunométriques.

I-2-1 Méthodes compétitives

Lorsqu'on met en présence un antigène (Ag), ce même antigène préalablement marqué (Ag*) et un anticorps (Ac) dirigé contre cet antigène on a, si la concentration en anticorps est inférieure à la concentration totale en antigène, compétition vis à vis des sites anticorps, avec formation simultanée des complexes antigène-anticorps (Ag-Ac) et antigène marqué-anticorps (Ag*-Ac). En maintenant fixe la concentration en anticorps et en molécules marquées, l'augmentation de la concentration en antigène entraîne l'augmentation de la concentration en complexe Ag-Ac, au détriment du complexe Ag*-Ac.

Si on dispose d'une méthode permettant de séparer, sans modifier l'équilibre de la réaction, les composés libres des complexes Ag-Ac et Ag*-Ac, on peut déterminer, grâce au signal délivré par le marqueur, la concentration en antigène marqué libre (Ag*) et du complexe antigène marqué-anticorps (Ag*-Ac), pour chaque concentration de l'antigène.

I-2-2 Méthodes immunométriques

- Méthodes à deux sites ou méthodes "sandwich"

Ces méthodes se distinguent des précédentes par la présence d'un excès d'anticorps et par l'utilisation d'un deuxième anticorps comme révélateur de la réaction de l'antigène avec le premier anticorps. Le premier anticorps (anticorps liant) est fixé sur un support solide. Le nombre de sites de liaison doit être supérieur au nombre de molécules d'antigènes qui vont être ainsi capturées du milieu réactionnel. L'anticorps marqué est additionné simultanément dans les méthodes en un temps ou après une première incubation et un lavage dans les méthodes en deux temps. Il vient prendre en sandwich l'antigène déjà engagé dans une réaction avec le premier anticorps. Cela implique que les deux anticorps réagissent avec deux épitopes différents de l'antigène.

- Méthodes à un site

L'antigène est mis en présence d'un excès modéré d'anticorps marqué. Lorsque l'équilibre est atteint, on met ce mélange en contact avec une phase solide tapissée d'antigène en excès. La phase solide est précipitée par centrifugation et on mesure le signal sur le surnageant ou sur le précipité. Cette méthode est en fait hybride entre la capture et la compétition car il s'opère un échange entre les molécules d'anticorps liées à l'analyte et celles liées à l'antigène en phase solide.

I-2-3 Schéma réactionnel

Selon l'existence ou non d'une étape de séparation on distingue les dosages par mesure de la distribution du réactif marqué (dosages en phase hétérogène) et les dosages par modulation de l'activité du marqueur (dosages en phase homogène).

Seules les méthodes par compétition permettent de travailler en phase homogène d'où un gain de temps.

I-3 CRITERES DE CHOIX D'UNE METHODE IMMUNOLOGIQUE

Plusieurs aspects peuvent être envisagés.

I-3-1 Spécificité

Les méthodes par compétition s'appliquent à tous les antigènes quelle que soit leur taille. C'est la seule méthode utilisable pour doser les haptènes ne possédant qu'un seul épitope. Mais des fragments ou des métabolites de l'antigène peuvent être reconnus s'ils sont du même épitope entraînant une erreur par excès. L'utilisation de deux anticorps dans les méthodes immunométriques améliore la spécificité du test mais nécessite la présence de deux épitopes différents. Cependant des interférences restent possibles avec une molécule possédant l'un des deux épitopes ou par la présence dans le sérum d'un autoanticorps dirigé contre l'antigène. Un autre danger est l'effet "crochet" ou effet "cloche" lorsque la concentration en antigène est très élevée et que l'antigène se comporte en antigène monovalent (méthodes en un temps) [BARBIER (1989)].

I-3-2 Sensibilité

La limite de détection est abaissée dans les méthodes immunométriques car toute molécule d'antigène peut être fixée par l'anticorps. Il est possible également d'élargir les gammes de concentrations mesurables [BOURDON et BOURDON-RANISTEANO (1983)].

I-3-3 Choix du marqueur

Depuis le développement historique du dosage de l'insuline par radioimmunologie, d'autres marqueurs ont été proposés comme substitution à l'utilisation des radioéléments : marqueurs enzymatiques, luminescents, métalliques et marqueurs de spin [SCHALL et TENOSO (1981); GOSLING (1990)].

Les performances du dosage dépendront des caractéristiques et des qualités du marqueur [GOSLING (1990); MIYAI et PRICE (1992)] :

- facilité de marquage;
- rendement de marquage élevé;
- stabilité;
- immunoréactivité, c'est à dire reconnaissance par les anticorps spécifiques;
- pureté du signal émis;
- activité spécifique liée également au mode de détection et aux possibilités d'amplification du signal;
- coût modéré.

- Marqueurs radioactifs

Classiquement, le marquage est réalisé par un radioélément ^3H ou ^{125}I , car ^{14}C conduit à des activités spécifiques trop faibles. Le radioisotope choisi est incorporé ou greffé sur le substrat à marquer. Ses caractéristiques (période, mode de désintégration) et la praticabilité du marquage conditionne le choix. Le marquage par ^3H ne modifie pas la valeur de la constante d'équilibre en comparaison de celle du produit non marqué. Par contre la taille de l'atome d'iode et la modification structurale que sa fixation nécessite peut modifier l'affinité des anticorps pour son antigène [BOURDON et BOURDON-RANISTEANO (1983)].

Les dosages avec marqueurs radioactifs peuvent être réalisés selon le principe de la compétition (RIA : Radioimmunoassay) ou selon le principe de la double capture (IRMA : Immunoradiometric assay).

- Marqueurs enzymatiques

Il est possible de lier de façon covalente des enzymes à des antigènes ou à des anticorps sans faire perdre aux premières leur activité catalytique et aux seconds leur pouvoir immunologique. Au cours d'un enzymoimmunodosage, après réaction immunologique, une réaction enzymatique sur un substrat approprié donne naissance à une espèce chimique dosable par les méthodes spectrophotométriques d'absorption ou d'émission ou par des méthodes électrochimiques. La variation de l'activité (augmentation ou diminution selon les cas) d'un marqueur enzymatique selon que le traceur est impliqué ou non dans un complexe antigène-anticorps est mise à profit dans les méthodes en phase homogène (EMIT : Enzyme-monitored immunoassay technique) et en phase hétérogène (ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay). Plusieurs possibilités sont offertes :

- utilisation d'un substrat chromogène dont la modification chimique entraîne une modification du spectre d'absorption lumineuse;
- utilisation d'un substrat et d'un chromogène associé;
- utilisation d'un cosubstrat chromogène;
- utilisation d'un substrat luminogène dont la transformation chimique produit une émission de lumière;
- utilisation d'un substrat fluorigène dont le produit de transformation est une molécule fluorescente.

Les principales enzymes utilisées sont : la peroxydase, la phosphatase alcaline, la β -D galactosidase, la glucose oxydase, la glucose-

6-phosphate déshydrogénase, la β -lactamase et l'uréase [BARBIER (1989); GOSLING (1990)].

- Marqueurs luminescents

Selon la nature de l'énergie d'excitation, lumineuse ou chimique, on peut faire la distinction entre photoluminescence qui englobe la fluorescence, la phosphorescence et la chimiluminescence [KARNES et coll., (1985)].

L'utilisation d'un marqueur fluorescent classique (du type fluorescéine) est limitée par des phénomènes parasites qui augmentent le bruit de fond. Il peut s'agir de la fluorescence parasite de certains composés endogènes (bilirubine, porphyrine), de phénomènes de dispersion de la lumière ou d'affaiblissement de la fluorescence (quenching). La spécificité de la détection peut être améliorée par la sélection d'une longueur d'onde d'émission élevée et par la lecture retardée de la fluorescence (fluorescence impulsionnelle à temps résolu) [HEMMILA et coll., (1988)]. La sélection en fonction du temps est devenue possible grâce à l'utilisation de certains fluorophores à temps de déclin de fluorescence élevé (chélates de lanthanides : europium, terbium, samarium) [BADOR et coll (1987); GOSLING (1990)].

Deux types de chimiluminescence sont utilisées selon que la réaction est ou non catalysée par une enzyme : bioluminescence et chimiluminescence. Les principaux marqueurs chimiluminescents sont le luminol et les esters d'acridinium. Parmi les systèmes bioluminescents, le plus utilisé est le système luciférine-luciférase. La principale qualité de ces marqueurs est la très grande spécificité de leur signal mais ils posent souvent un problème de reproductibilité dans la détection de leur émission

en raison de la variation de l'intensité lumineuse au cours de la réaction chimique.

- *Autres marqueurs*

Les bactériophages, les marqueurs de spin et les marqueurs métalliques existent mais ne sont pas entrées dans la pratique quotidienne [SCHALL et TENOSO (1981)].

II. TRAVAUX PERSONNELS

Le dosage des molécules d'intérêt biologique et thérapeutique s'avère important dans le diagnostic de certaines pathologies, les études pharmacocinétiques et toxicologiques ainsi que dans le suivi thérapeutique de nombreux médicaments.

Les méthodes analytiques courantes, telles que la chromatographie liquide et gazeuse, sont malgré tout concurrencées par les méthodes immunologiques qui présentent deux qualités intrinsèques : sensibilité et sélectivité. De plus, elles sont en général plus rapides et plus faciles à mettre en oeuvre pour le dosage d'une grande série d'échantillons.

Parmi les méthodes immunologiques, la radioimmunologie basée sur l'utilisation d'un traceur radioactif a longtemps prédominé en raison de sa limite de sensibilité très basse et des qualités du signal (insensibilité aux modifications physicochimiques du milieu, absence d'interférences radioactives dans les échantillons biologiques). Malgré ses avantages, les inconvénients de la radioimmunologie liés principalement à la manipulation de radioisotopes ont favorisé le développement des méthodes non isotopiques et la recherche de nouveaux modes de greffage. Ainsi, les traceurs enzymatiques et luminescents ont connu une très large expansion.

Cependant, la plupart des techniques de marquage des anticorps ou d'antigène, basées sur la formation de liaison covalente entre le marqueur et l'anticorps, comportent une modification des chaînes secondaires des acides aminés présents dans ces molécules.

Dans le cas particulier des anticorps, cette modification intervient au niveau des restes de tyrosine, le groupement ϵ -aminé de lysines, le groupement carboxylique des acides aspartique et glutamique, et les groupements sulfhydryles générés par réduction des restes cystines. Un

facteur commun à toutes ces approches est le manque de spécificité de ces réactions dans lesquelles le marqueur ne peut être dirigé sur un acide aminé spécifique à un site particulier de l'anticorps. Il en résulte un marquage assez hétérogène et par conséquent une diminution ou une perte complète de l'activité immunologique (affinité de l'anticorps vis à vis de l'antigène).

Ainsi, le fait que les immunoglobulines soient des glycoprotéines et qu'il existe des méthodes spécifiques de modification des oligosaccharides présents dans les glycoprotéines, il est possible d'obtenir des anticorps marqués dont les sites actifs ne sont pas affectés et dont l'activité immunologique est par conséquent conservée.

L'oxydation des oligosaccharides présents au niveau du fragment Fc de l'immunoglobuline, en aldéhydes, par le periodate de sodium, constitue la méthode la plus utilisée. Dans des conditions douces, le periodate de sodium oxyde les fonctions hydroxyles pour former des aldéhydes sans affecter l'activité de l'anticorps. A pH 4 à 5, ces aldéhydes réagissent avec les marqueurs à propriétés nucléophiles (amines ou hydrazides par exemple) pour former des liaisons hydrazones reliant le marqueur à la région Fc de l'immunoglobuline [O'SHANNESSEY et coll., (1984); O'SHANNESSEY et QUARLES (1985, 1987); WILCHEK et BAYER (1987)].

Au cours de notre travail, nous avons donc étudié le marquage des anticorps de type IgG, par les luminarines hydrazides (luminarine 3, 11 et 12), après oxydation par le periodate de sodium. Nous avons ensuite envisagé les possibilités de dosage de l'hormone chorionique gonadotrope humaine en utilisant une méthode par compétition.

II-1 MATÉRIEL ET MÉTHODES

II-1-1 Réactifs et matériel

Tous les réactifs utilisés sont de qualité analytique.

*Le tampon acétate a été préparé selon la formule de Walpole [TABLES SCIENTIFIQUES CIBA GEIGY (1962)] :

- solution A : 0,2 M d'acide acétique (12 g/l)

- solution B : 0,2 M d'acétate de sodium (16,4 g/l de CH_3COONa ou 27,2 g/l de $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$).

Dans une fiole jaugée de 100 ml, introduire successivement 8,8 ml de solution A, puis 41,2 ml de solution B et compléter le volume à 100 ml. On obtient ainsi une solution tampon acétate à pH 5,4. Diluer cette dernière au demi pour avoir une solution 100 mM.

*La gamma globuline bovine (Cohn fraction II) a été obtenue chez SIGMA (St.Louis, MO, USA). Préparer une solution contenant approximativement 2 à 2,5 mg de γ -globuline bovine par millilitre de tampon acétate (100 mM, pH 5,4). Dans ce travail, nous avons préparé des solutions à 2,4 mg/ml soit 37,5 nmoles de γ -globuline par tube.

*L'hormone chorionique gonadotrope (HCG CR 123; 100 μg) a été fournie par l'institut Gustave Roussy (Villejuif, France).

*Les luminarines sont obtenues chez EUROBIO-SERATEC (Les Ulis, France). Préparer une solution $2,5 \times 10^{-2}$ M dans le DMSO.

*Periodate de sodium (JANSEN CHIMICA, Belgique); préparer une solution 0,5 M soit 107 mg/ml d'eau.

*Glycérol (PROLABO, France); préparer une solution aqueuse 1,5 M soit 138,14 mg/ml d'eau. Procéder systématiquement par pesée car le glycérol est un solvant très visqueux ($d = 1,26$).

*Les colonnes de purification des protéines sont de type colonne PD-10 contenant du Sephadex 25-M gonflé dans de l'eau distillée contenant 0,15 % de Kathon[®] CG comme conservateur (PHARMACIA, St.Quentin Les Yvelines, France). Ces colonnes ont un volume et une hauteur de 9,1 ml et 5 cm respectivement.

*Les mesures d'absorbance et de fluorescence ont été réalisées en utilisant respectivement un spectrophotomètre UV-visible (SHIMADZU Modèle UV-2100) et un spectrofluorimètre (PERKIN ELMER Modèle LS 50).

*Concentrateur d'échantillons cliniques de type Minicon[™]_B (AMICON SARL, France).

*Gel de polyacrylamide (PAGE : Polyacrylamide Gel Electrophoresis).

*Mélange étalon de protéine de masse moléculaire connue (solution LMW : Low Molecular Weight, de PHARMACIA) pour l'électrophorèse contenant :

- la α -lactalbumine (PM = 14400)
- l'inhibiteur de la trypsine du soja (PM = 20100)
- l'anhydrase carbonique (PM = 30000)
- l'ovalbumine (PM = 43000)
- l'albumine (PM = 67000)
- la phosphorylase b (PM = 94000)

*Colorant au Bleu de Coomassie composé de 0,1% de Phast Gel[™] Blue R (PHARMACIA, St.Quentin enYvelines, France) en solution aqueuse contenant 30% de méthanol et 10% d'acide acétique. Pour préparer ce colorant, dissoudre 1 tablette de Phast Gel[™] Blue R dans 80 ml d'eau distillée et agiter pendant 5 à 10 min environ. Ajouter 120 ml de méthanol et mélanger pendant 2 à 3 min. Cette solution est à 0,2% (solution mère).

Cette solution est stable pendant 3 semaines à 4°C. Mélanger une partie de la solution mère préalablement filtrée avec une partie d'une solution aqueuse d'acide acétique à 20% (solution fille à 0,1%). Cette dernière solution doit être préparée de façon extemporanée.

*Appareil automatique pour électrophorèse du type Phast System® (PHARMACIA, St Quentin Les Yvelines, France).

*Silice normale (K 6F, Whatman).

*Tubes en plastique de 3 ml.

*Tampon phosphate (PBS : Phosphate Buffer Saline) 0,1 M pH 7,4.

*Sérum albumine bovine (BSA : Bovine Serum Albumine)

*Sérum albumine bovine 1% (m/v) dans le tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 (PBS-BSA).

*Solution de polyéthylène glycol 6000 (PEG 6000) à 20% (m/v) dans le mélange PBS-BSA.

*Solution de sérum humain normal (NHS : Normal Human Serum) à 33% (m/v) dans le mélange PBS-BSA.

*HCG marquée avec la luminarine 3 (~ 22,2 µg/ml de tampon phosphate pH 6,9).

*Anticorps FBT 10 ou anticorps anti-HCG (Institut Gustave Roussy, Villejuif, France)

II-1-2 Méthodes

- Réaction de marquage et purification des immunoglobulines marquées

1- Equilibrer la colonne PD-10 par 25 ml de tampon acétate 100 mM (pH 5,4). Bien boucher la colonne par le bas et introduire 2,5 ml du même tampon.

2- Dans un tube réactivial® (5 ml), introduire 2,5 ml de solution de γ -globuline. Ajouter 50 µl de solution de periodate de sodium 0,5 M, ce qui

correspond à 10 mM de periodate de sodium par tube. Bien boucher le tube, l'incuber dans un bain de glace (0°C environ) à l'obscurité et sous agitation magnétique pendant 30 min.

3- Eliminer l'excès du periodate par addition de 37,5 µl de solution de glycérol 1,5 M, ce qui correspond à 15 mM de glycérol par tube. Le periodate de sodium doit être éliminé rapidement pour éviter l'oxydation de l'immunoglobuline elle même. Bien boucher le tube et laisser sous agitation magnétique à température ambiante pendant 5 à 10 min environ.

4- Homogénéiser le mélange réactionnel par agitation, puis le passer entièrement sur la colonne PD-10 préalablement équilibrée. Si le volume de l'échantillon est inférieur à 2,5 ml, le compléter par du tampon acétate 100 mM (pH 5,4). En revanche, si le volume est supérieure à 2,5 ml, procéder par des étapes successives de purification à raison de 2,5 ml par étape. En effet, sur recommandation du fabricant de la colonne, les meilleurs rendements et puretés sont obtenus avec les échantillons de faible volume.

5- Laisser couler 2,5 ml et jeter l'éluat.

6- Eluer les composés à poids moléculaire supérieure à 5000 (IgG par exemple) par 3,5 ml de tampon acétate 100 mM, pH 5,4. Récupérer la totalité de cet éluat dans un tube à essai de 10 ml. Homogénéiser au vortex.

7- Ajouter la solution de luminarine hydrazide.

Différents rapports molaires (luminarine hydrazide/ γ -globuline) ont été utilisés au cours de cette étude :

- rapport molaire théorique = 5; soit 7,5 µl de solution de luminarine hydrazide (187,5 nmoles) pour 37,5 nmoles de γ -globuline.
- rapport molaire théorique = 10; soit 15 µl de solution de luminarine hydrazide (375 nmoles) pour 37,5 nmoles de γ -globuline.

- rapport molaire théorique = 20; soit 30 μ l de solution de luminarine hydrazide (750 nmoles) pour 37,5 nmoles de γ -globuline.
- rapport molaire = 40; soit 60 μ l de solution de luminarine hydrazide (1500 nmoles) pour 37,5 nmoles de γ -globuline.

8- Homogénéiser au vortex, puis incuber à la température ambiante et à l'obscurité pendant 120 min.

9- Purifier la γ -globuline marquée en procédant de la même manière comme décrit aux paragraphes 1, 4, 5 et 6.

10- Procéder aux différentes déterminations.

Pour le marquage de l'hormone chorionique gonadotrope (HCG CR 123), nous avons utilisé la luminarine 3. Le protocole opératoire décrit ci dessus a été utilisé avec quelques légères modifications :

- volume du milieu réactionnel (1 ml)
- solution de periodate de sodium 0,5 M (20 μ l)
- solution de glycérol 1,5 M (15 μ l)
- solution de luminarine 3 à $2,5 \times 10^{-2}$ M (20 μ l).

- Détermination du taux de greffage

La méthode utilisée s'inspire des travaux réalisés par GRIFFOUL et coll., (1991).

Le taux de greffage des anticorps par la luminarine hydrazide est déterminé par le rapport de leurs concentrations molaires, mesurées par leur absorbance.

$$\text{Taux de greffage} = \frac{\text{Concentration molaire en luminarine}}{\text{Concentration molaire en protéine}}$$

Dans le cas de la γ -globuline bovine, une gamme d'étalonnage dans le tampon acétate 100 mM (pH 5,4) est réalisée pour les concentrations suivantes : 0; 0,5; 1; 2; 4 et 5 μ M. L'absorbance est mesurée à 280 nm. Le coefficient d'absorption molaire est de $352790 \pm 2,86\%$ ($l \text{ mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Pour chacune des trois luminarines hydrazides étudiées (luminarine 3, 11 et 12), une gamme d'étalonnage dans le tampon acétate 100 mM (pH 5,4) comportant les points 0; 10; 20; 40; 60; 80 et 100 μ M est réalisée. L'absorbance est mesurée à 280 nm et à la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption de la luminarine hydrazide dans le tampon acétate 100 mM, pH 5,4 :

- luminarine 3 ($\lambda_{ex} = 409 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 501 \text{ nm}$)
- luminarine 11 ($\lambda_{ex} = 399 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 482 \text{ nm}$)
- luminarine 12 ($\lambda_{ex} = 404 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 510$).

Pour la mesure de la concentration molaire en protéine et en luminarine de l'immunoglobuline marquée, procéder à une dilution dans le tampon acétate 100 mM (pH 5,4) pour avoir une concentration de l'ordre de la micromolaire. Mesurer les absorbances de cette solution à λ_{280} et à λ_{max} de la luminarine hydrazide fixée sur la protéine.

L'absorbance à λ_{max} , comparée à la gamme d'étalonnage correspondante, fournit la concentration de la luminarine hydrazide.

L'absorbance à λ_{280} est d'abord corrigée pour tenir compte de l'absorbance de la luminarine hydrazide à cette longueur d'onde . La correction d'absorbance à λ_{280} a été établie à partir du rapport des pentes des deux gammes d'étalonnages de luminarine hydrazide mesurés à λ_{280} et λ_{max} (en nm) :

$$A_{\lambda_{280} \text{ corrigée}} = A_{\lambda_{280} \text{ lue}} - (B/B') \times A_{\lambda_{max} \text{ lue}}$$

où

$A_{\lambda_{280}}$ corrigée : absorbance à λ_{280} corrigée

$A_{\lambda_{280}}$ lue : absorbance à λ_{280} lue au spectrophotomètre

$A_{\lambda_{\max}}$ lue : absorbance à λ_{\max} lue au spectrophotomètre

B : pente de la droite de régression de la solution de luminarine hydrazide à λ_{280}

B' : pente de la droite de régression de la solution de luminarine hydrazide à λ_{\max}

Dans le cas des trois luminarines hydrazides utilisées, on obtient respectivement :

$A_{\lambda_{280}} \text{ corrigée} = A_{\lambda_{280}} \text{ lue} - 0,29 \times A_{\lambda_{409}} \text{ lue}$ (pour la γ -globuline marquée avec la luminarine 3)

$A_{\lambda_{280}} \text{ corrigée} = A_{\lambda_{280}} \text{ lue} - 0,26 \times A_{\lambda_{399}} \text{ lue}$ (pour la γ -globuline marquée avec la luminarine 11)

$A_{\lambda_{280}} \text{ corrigée} = A_{\lambda_{280}} \text{ lue} - 0,31 \times A_{\lambda_{409}} \text{ lue}$ (pour la γ -globuline marquée avec la luminarine 12)

En se rapportant à la courbe d'étalonnage de la protéine, l'absorbance corrigée donne la concentration correspondante. Le taux de greffage est calculé par le rapport de la concentration molaire en luminarine hydrazide sur la concentration molaire en protéine, comme nous le soulignons précédemment.

- Méthode d'évaluation de l'hormone chorionique gonadotrope (HCG)

La méthode employée est une modification de la technique de radioimmunoessais (RIA) utilisée pour doser l'HCG à l'Institut Gustave Roussy (IGR). Le protocole opératoire est le suivant :

1 - Préparation des tubes

- préparer : 2 tubes contenant 100 μ l de PBS-BSA (B_0 = réaction non spécifique)
- 2 tubes contenant 100 μ l d'une dilution de l'anticorps FBT 10 dans le PBS-BSA (B = réaction spécifique)
- 2 tubes vides pour la détermination de l'activité totale (B_T : solution pure de l'antigène marqué)

2 - Dosage proprement dit

Dans chacun des tubes, ajouter 100 μ l de la solution de HCG marqué dilué dans le PBS-BSA pour contenir au maximum 100 μ g de ce dernier. Mélanger par agitation au vortex, incuber à 4°C pendant 18 heures. Ajouter dans tous les tubes (excepté les tubes pour la détermination de l'activité totale) 100 μ l de NHS puis 1 ml de PEG 6000. Bien mélanger au vortex, centrifuger à 3000 tours/min pendant 15 min et aspirer le surnageant qui servira pour la mesure spectrofluorimétrique.

II-2 RESULTATS ET DISCUSSION

Initialement le but de cette étude a été essentiellement de présenter une méthode de marquage des anticorps par les luminarines hydrazides.

Une des méthodes couramment utilisées pour analyser les glycoprotéines et les polysaccharides emploie l'oxydation, par voie chimique (periodate de sodium) ou enzymatique (galactose oxidase) des sucres, suivie par la réaction des aldéhydes formés avec un marqueur approprié possédant des propriétés nucléophiles (hydrazides, amines) [O'SHANNESY et coll., (1987); WILCHEK et BAYER (1987); BAYER et coll., (1988)].

Dans la pratique, les marqueurs à groupement fonctionnel hydrazide sont préférés aux marqueurs à groupement fonctionnel amine pour deux raisons principales :

- les groupements amines primaires des restes de lysine (groupement ϵ -amino) présent dans la molécule d'Ig sont capables de réagir avec les aldéhydes formés au niveau du fragment Fc après oxydation par le periodate. Il en résulte une compétition entre le marqueur à fonction amine et ces groupements amines primaires des restes de lysine.
- le groupement imine (base de Schiff), formé à la suite de la réaction entre une amine et un aldéhyde, est instable et doit être réduit de préférence avec le cyanoborohydrure de sodium, en amine secondaire plus stable.

Ainsi, l'utilisation des marqueurs à fonction amine peut avoir un effet de suppression de l'activité biologique de l'anticorps. Une meilleure façon de préserver cette activité biologique consiste donc à utiliser les marqueurs à groupement fonctionnel hydrazide qui semble être plus spécifiques que ceux à groupement fonctionnel amine [O'SHANNESY et coll., (1984); O'SHANNESY et QUARLES (1985); O'SHANNESY et QUARLES (1987)].

Ceci pourrait s'expliquer d'une part, par les valeurs de pK plus basses des hydrazides ($pK \approx 3$) comparées à celles des amines ($pK \approx 9-10$). D'autre part, les amines et les hydrazides ne réagissent avec les aldéhydes que lorsqu'ils ne sont pas sous la forme protonée; la grande différence des valeurs de pK entre ces groupes de composés montre que la formation de bases de Schiff entre les aldéhydes formés, après oxydation par le periodate de l'IgG, et les groupements amines primaires des restes de lysine de ces mêmes IgG ne peut avoir lieu en milieu acide. De plus, l'hydrazone formée, comme produit de la réaction entre aldéhyde et hydrazide, est plus stable.

- Formation des aldéhydes par oxydation avec le periodate

L'oxydation des hydrates de carbone par le periodate de sodium est une réaction qui dépend de plusieurs facteurs dont : la concentration de l'oxydant, le pH, la température et le temps de réaction.

L'un des risques majeurs de l'oxydation des sucres des glycoprotéines par le periodate est d'oxyder conjointement certains acides aminés de la partie protéinique, particulièrement la cystéine, la cystine, la méthionine, le tryptophane, la tyrosine et l'histidine. La sérine et la thréonine peuvent également être oxydées lorsqu'elles sont placées en position latérale des chaînes [O'SHANNESY et QUARLES (1987)]. Toutefois, les études sur les glycoprotéines s'accordent sur le fait que les acides aminés sont moins sensibles à l'oxydation par le periodate lorsqu'ils sont présents dans une chaîne peptidique.

Les conditions optimales retenues par la plupart des auteurs en vue d'une application en routine sont :

- periodate de sodium 5-10 mM
- pH 5,5
- température 0°C
- temps de réaction (30 min)

Dans ces conditions, l'oxydation des acides aminés, même si elle se produit, reste minime. Quoiqu'il en soit le marquage des oligosaccharides, du fragment Fc de l'immunoglobuline, n'a pas d'effet mesurable sur l'affinité de l'anticorps pour l'antigène [O'SHANNESY et coll., (1984); O'SHANNESY et QUARLES (1985); O'SHANNESY et QUARLES (1987)].

C'est donc ces conditions que nous avons utilisées au cours de ce travail.

- Influence de l'excès de luminarine hydrazide

Pour chaque luminarine hydrazide, un essai a été réalisé avec la γ -globuline bovine, dans les conditions décrites ci-dessus, en présence de différents excès molaire de luminarine hydrazide : 5, 10, 20 et 40. Les résultats présentés dans l'annexe V-1 à V-3 (pages 344-346) montrent que plus l'excès de luminarine hydrazide est important, plus grand est le taux de greffage de la γ -globuline. Toutefois cette relation n'est pas linéaire, comme en témoigne le pourcentage de luminarine hydrazide fixé sur la γ -globuline. Ce dernier diminue en raison inverse de l'excès de luminarine hydrazide.

D'une manière générale, le taux de greffage mesuré est légèrement inférieur au taux théorique. Des taux de marquage pratiquement similaires ont été déjà obtenus avec l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC : Fluoresceïn Isothiocyanate) en utilisant une autre technique de marquage [THE et FELTKAMP (1970)]. Avec un rapport molaire théorique (FITC/protéine) de 2 et 24, des taux de marquage (de 1,3 et 7,3) et pourcentage de FITC liés aux protéines (de 70 et 30%) sont rapportés.

Quant à l'intensité de fluorescence de la γ -globuline marquée, elle n'augmente pas proportionnellement au taux de greffage mais tend plutôt vers une limite.

Les résultats obtenus restent toutefois satisfaisants compte tenu de l'usage auquel ils sont destinés.

- Purification de la γ -globuline marquée par chromatographie d'exclusion

Pour étudier la purification de la γ -globuline marquée, une expérience préliminaire a été réalisée à partir d'un excès de luminarine hydrazide, par rapport à la γ -globuline, égale à 40. Les différents éluats

sont recueillis par fractions de 500 μ l, et deux microlitres de chaque fraction sont déposés sur une plaque de silice. La protéine marquée est alors visualisée à 254 nm et à 366 nm. Il en résulte que quelque soit la luminarine hydrazide utilisée, la γ -globuline marquée se retrouve concentrée dans les fractions 6, 7 et 8. La première fraction contient probablement de la γ -globuline non ou faiblement marquée par les luminarines hydrazides. A partir de la deuxième fraction, on observe une augmentation de l'intensité du dépôt et ceci de façon croissante jusqu'à la huitième fraction. Puis, cette intensité diminue jusqu'à la douzième et dernière fraction. Ceci nous amène à supposer que les molécules de γ -globuline ne sont pas marquées au même degré. C'est pourquoi, nous avons préféré effectuer les différentes déterminations sur la totalité des fractions. Ainsi, les taux de greffage obtenus représentent un taux moyen de greffage.

L'emploi des colonnes d'extraction du type Sephadex 25-M, pour la purification de la γ -globuline oxydée et marquée respectivement par le periodate de sodium et les luminarines hydrazides, montre que ce taux de recouvrement est fonction du taux de greffage. Les faibles taux de greffage donnent lieu au plus haut taux de recouvrement.

- Conclusion

L'ensemble de ces travaux permet d'envisager le marquage d'un anticorps monoclonal. La spécificité de la réaction de marquage de la protéine, ainsi que la qualité de la purification et la mobilité électrophorétique de la protéine marquée ont été confirmées (Figures 28 à 33).

Il apparait clairement sur ces figures que :

- le spectre de la luminarine 3 comporte un maximum à 409 nm (Figure 28)

- le spectre d'absorption de la γ -globuline ne présente pas de bande à 409 nm (Figure 29)
- le spectre de la γ -globuline non oxydée par le periodate de sodium mais après ajout de luminarine 3 ne présente pas de bande correspondant au maximum de la luminarine 3 à 409 nm (Figure 30)
- le spectre de la γ -globuline oxydée par le periodate de sodium après ajout de la luminarine 3, en excès de 10 (Figure 31) et de 40 (Figure 32) présente un maximum à 406 et 405 nm respectivement.

Ceci prouve qu'il faut que la partie glucidique de l'immunoglobuline (fraction FC) soit oxydée pour que la luminarine se fixe dessus.

Enfin le marquage ne modifie pas les caractéristiques de migration de l'immunoglobuline en électrophorèse (Figure 33). On observe sur la figure 33 que la masse moléculaire du témoin d'IgG n'est pas différente de la masse moléculaire d'IgG après marquage. Par ailleurs, après marquage, on observe par rapport au témoin une même bande homogène, ce qui laisse suggérer l'absence d'artéfacts entraînés par le marquage. Ceci peut être intéressant pour l'application en immunoélectrophorèse.

Il reste cependant à étudier la stabilité de la protéine marquée ainsi que l'hétérogénéité du taux de greffage par chromatographie liquide par exemple, afin de parfaire la caractérisation de la protéine.

Cette méthode de marquage des immunoglobulines par les luminarines hydrazides ouvre de nouvelles perspectives d'application pour ces marqueurs, particulièrement en immunodosage et en détection par immunofluorescence.

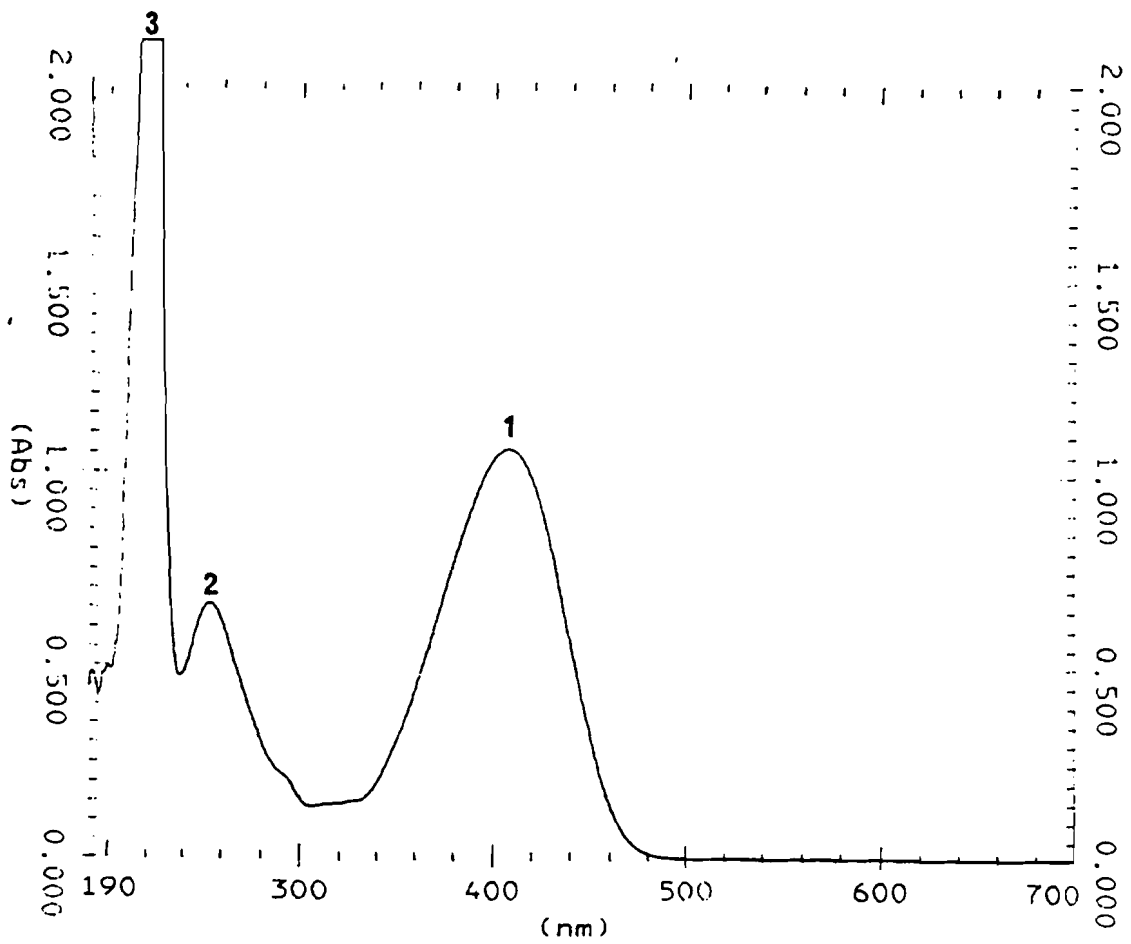


Figure 28 : Spectre d'absorption de la luminarine 3 dans le tampon acétate 100 mM, pH 5,4.

1 = λ_{409} nm

2 = λ_{254} nm

3 = λ_{224} nm

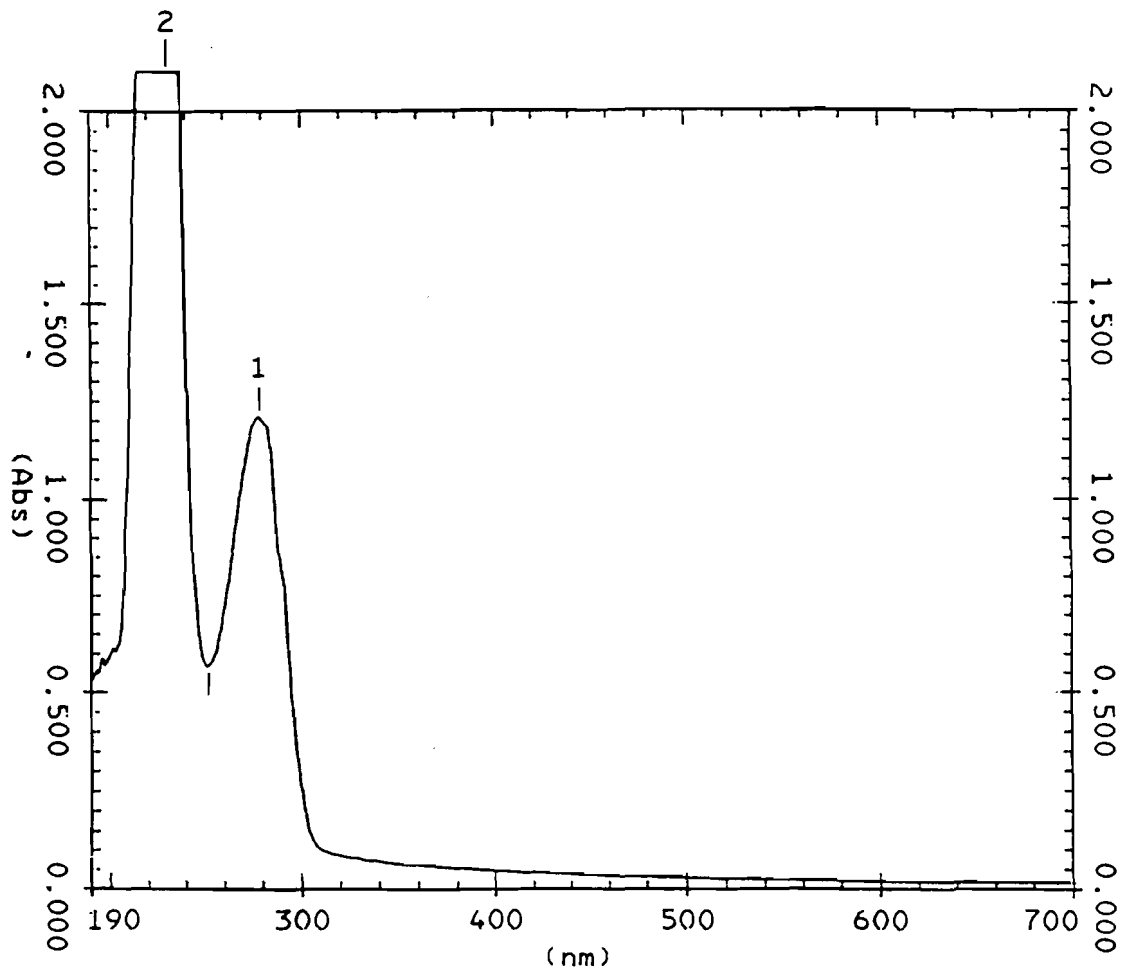


Figure 29: Spectre d'absorption de la γ -globuline pure dans le tampon acétate 100 mM, pH 5,4.

1 = λ_{279} nm

2 = λ_{231} nm

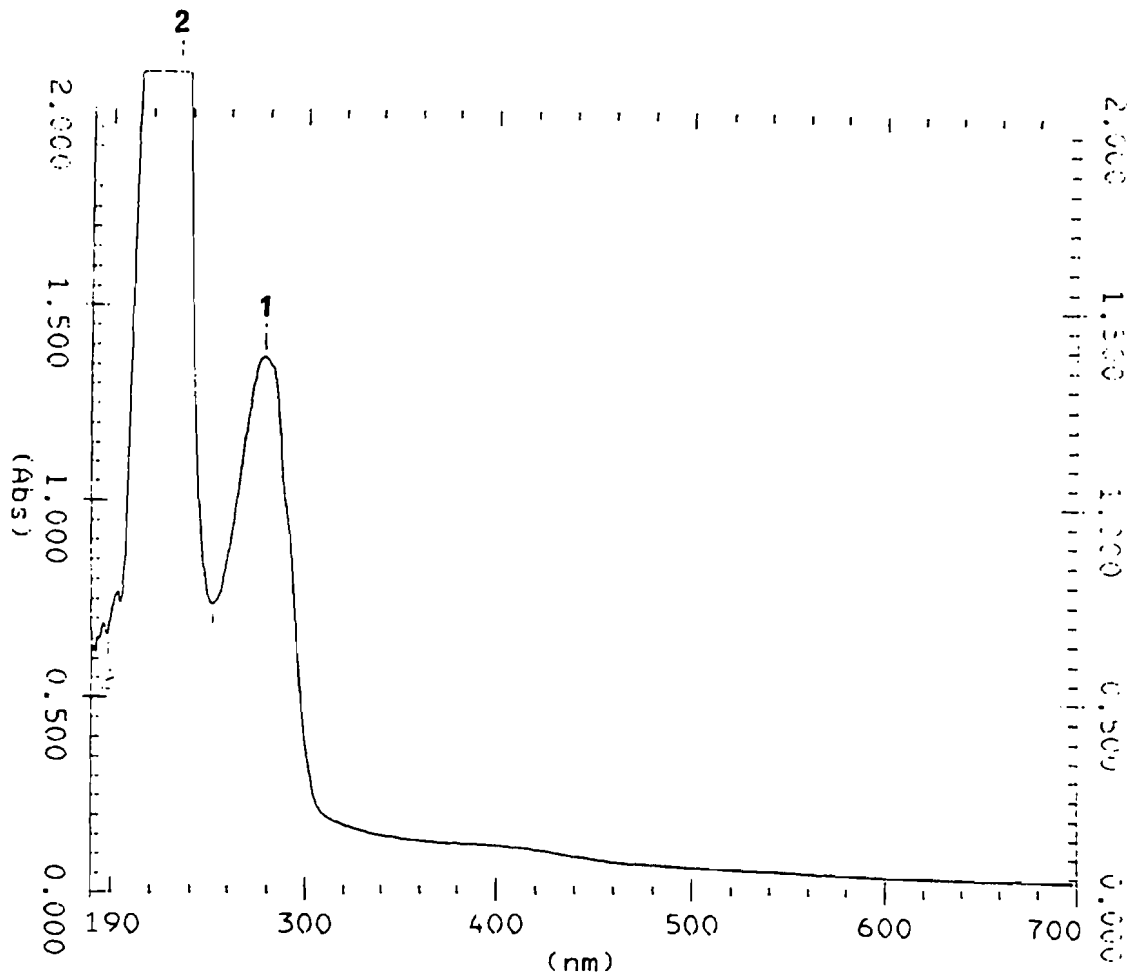


Figure 30 : Spectre d'absorption de la γ -globuline, non oxydée par le periodate de sodium, qu'on a fait réagir avec la luminarine 3 en excès de 40, dans le tampon acétate 100 mM, pH 5,4.

1 = λ_{278} nm

2 = λ_{233} nm

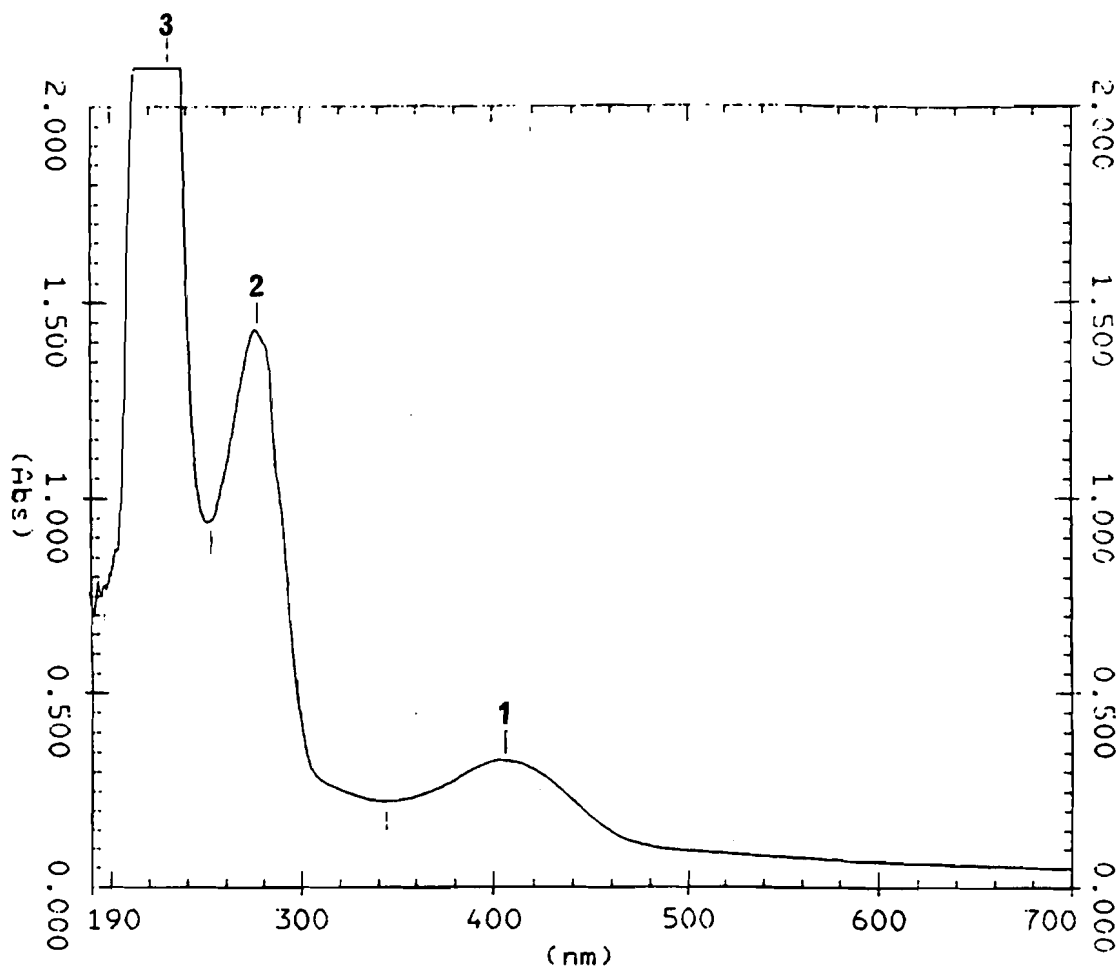


Figure 31 : Spectre d'absorption de la γ -globuline, oxydée par le periodate de sodium, qu'on a fait réagir avec la luminarine 3 en excès de 10, dans le tampon acétate 100 mM, pH 5,4.

1 = λ_{406} nm

2 = λ_{277} nm

3 = λ_{231} nm

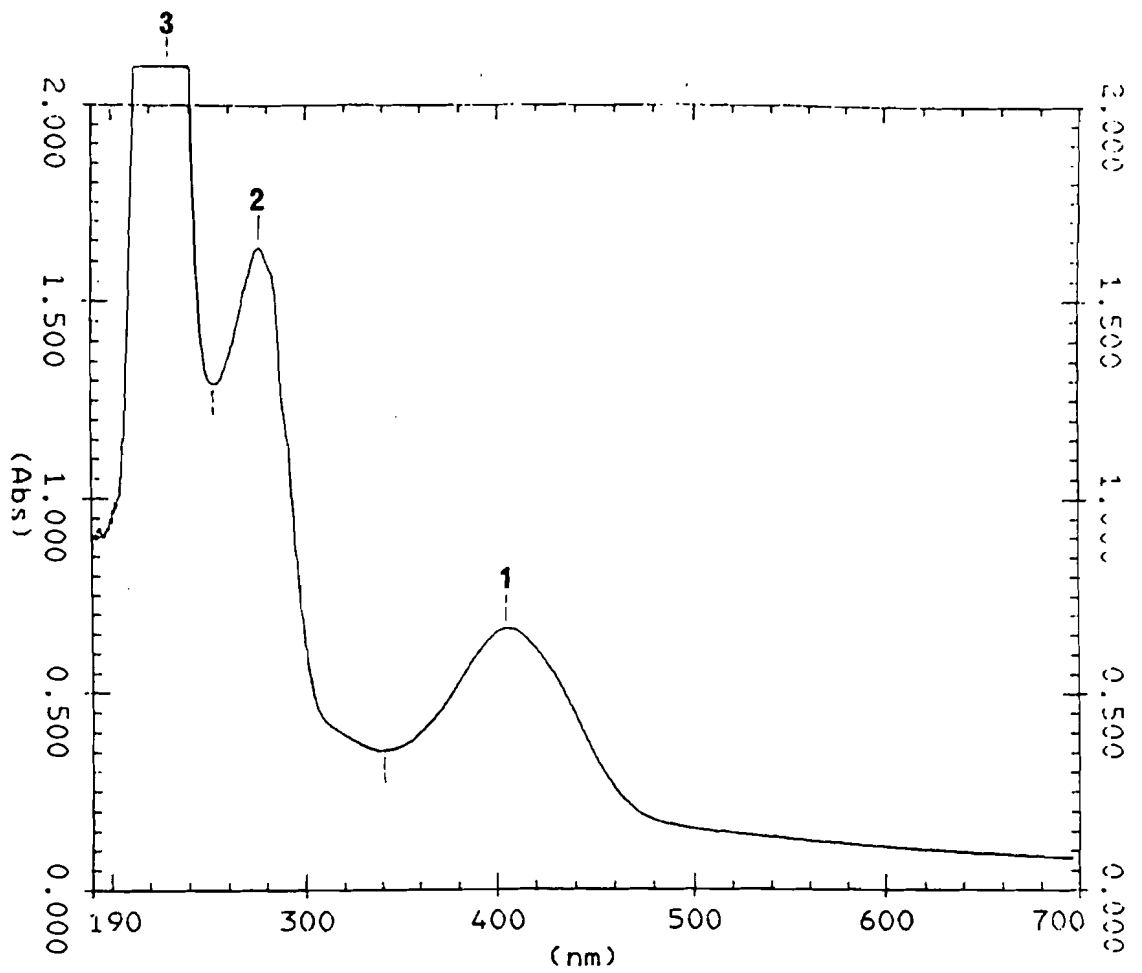


Figure 32 : Spectre d'absorption de la γ -globuline, oxydée par le periodate de sodium, qu'on a fait réagir avec la luminaire 3 en excès de 40, dans le tampon acétate 100 mM, pH 5,4.

1 = λ 405 nm

2 = λ 277 nm

3 = λ 230 nm

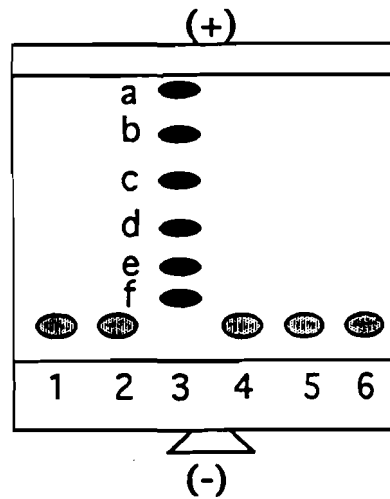


Figure 33 : Profil électrophorétique de la γ -globuline bovine marquée par la luminarine 3.

Conditions opératoires : électrophorèse native (sans dénaturation par le dodécyl sulfate de sodium (SDS)) en gel de polyacrylamide (gradient de 10 à 15%) pendant 30 min; dépôt de 4 μ l de la solution de γ -globuline bovine à 10 g/l; coloration au Bleu de Coomassie (30 min).

1 = témoin γ -globuline pure;

2, 4, 5 et 6 = γ -globuline marquée respectivement avec 5, 10, 20 et 40 fois plus de luminarine 3

3 = solution témoin pour électrophorèse

(a = α -lactalbumine; b = inhibiteur de la trypsine;

c = anhydrase carbonique; d = ovalbumine;

e = albumine; f = phosphorylase b).

II-3 ESSAIS DE DETERMINATION DE L'HORMONE CHORIONIQUE GONADOTROPE HUMAINE

L'hormone chorionique gonadotrope (HCG) est une hormone glycoprotéique utilisée comme marqueur des tumeurs testiculaires et des tumeurs placentaires (choriosarcomes).

Bien que d'autres hormones possèdent des glycosylations, le terme d'hormones glycoprotéiques est applicable exclusivement aux gonadotrophines, d'origine hypophysaire ou placentaire, et aux hormones pituitaires stimulant la thyroïde. Ces hormones glycoprotéiques sont au nombre de quatre : l'hormone chorionique gonadotrope ou HCG d'origine placentaire, l'hormone lutéinisante ou LH, l'hormone folliculotrope ou FSH et l'hormone thyroïdienne ou TSH, toutes les trois d'origine hypophysaire.

L'hormone chorionique gonadotrope, comme les autres hormones glycoprotéiques, est constituée de deux chaînes polypeptidiques ou sous-unités, maintenues en étroite association par des liaisons non covalentes. A l'intérieur d'une même espèce, la sous-unité α est commune aux quatre glycoprotéines. Les sous-unités β sont spécifiques de chaque hormone et diffèrent entre elles par leur séquence primaire tout en conservant d'importantes analogies. Chaque sous-unité est glycosylée sur des résidus spécifiques de la chaîne peptidique et fait l'objet de nombreux repliements internes dus à l'abondance des ponts disulfures.

La réponse immunitaire dirigée contre l'HCG et les autres hormones glycoprotéiques est étroitement associée au caractère dimérique de ces molécules. En effet, les anticorps obtenus sont capables de reconnaître un ou plusieurs épitopes présents sur l'une ou l'autre des sous unités ainsi que sur l'hormone entière. De la même manière, l'immunisation avec une sous-

unité conduira à la production d'anticorps reconnaissant la sous-unité liée à l'autre sous-unité, mais aussi d'anticorps capables de se lier à la sous-unité non combinée. Enfin, des anticorps capables de se lier uniquement au dimère peuvent également être engendrés.

Depuis quelques années, l'équipe du laboratoire de Biologie Clinique de l'Institut Gustave Roussy (IGR) s'attache à étudier la structure de la sous-unité β -HCG à l'aide de peptides synthétiques et d'études comparées avec les sous-unités β des hormones glycoprotéiques de différentes espèces. Ce travail a permis de mieux connaître la structure de cette protéine et les liens existant avec la sous-unité α lors de son association pour former l'hormone dimérique.

A la suite de nos travaux sur le marquage des anticorps de type IgG, nous avons entrepris avec cette équipe des essais de marquage d'antigène, en l'occurrence de l'HCG en utilisant des quantités de l'ordre de celles couramment utilisées en RIA. En effet la technique de RIA développée dans ce laboratoire fait appel à des anticorps fixés sur des supports rigides (billes). Cette technique est donc incompatible avec les dosages spectrofluorimétriques classiques qui ne peuvent s'opérer qu'en solution. Pour cette raison nous avons été obligés d'envisager une technique indirecte de dosage de l'antigène HCG par spectrofluorimétrie. La lecture au spectrofluorimètre n'a permis de détecter aucun signal correspondant à l'HCG marqué. Ceci laisse supposer soit une absence de réaction de marquage de l'HCG par la luminarine 3 (effet stérique), soit un manque de sensibilité de la méthode de détection utilisée. De plus, dans tous les tubes réactionnels, nous avons observé une bande de même intensité à 469 nm qui correspondrait plutôt à la bande de la diffusion Raman (Annexe V-4, pages 347-348).

En effet, dans les mesures de solutions à faibles concentrations, il existe souvent une possibilité d'interférence due aux effets de diffusion. La lumière diffusée par le solvant possède pour une partie la même longueur d'onde que celle du faisceau d'excitation (diffusion Rayleigh, Tyndall), et pour une autre partie une longueur d'onde différente (diffusion Raman).

En raison des interférences liées à la détection, ces résultats doivent conduire à étudier tout d'abord la structure de l'HCG marqué, puis à trouver les meilleures conditions de détection lorsque le marquage par la luminarine 3 aura été confirmée.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le point de départ de ce travail a été l'emploi des luminarines hydrazides (luminarine 3, 11 et 12) comme réactif de dérivation précolonne de composés possédant dans leur structure un groupement fonctionnel carbonyle (aldéhyde ou cétone) en vue de leur analyse en chromatographie liquide. Bien qu'il existe de nombreuses méthodes pour doser ces composés dans différents milieux, la chromatographie liquide offre à la fois simplicité et grande sélectivité, ce qui en fait une des méthodes les mieux adaptées pour les analyses de routine.

Nous avons par la suite envisagé l'étude du marquage des immunoglobulines (spécificité de la réaction de marquage, détermination du taux de greffage, confirmation de la mobilité électrophorétique) et les possibilités de dosage de l'hormone chorionique gonadotrope (HCG). Cette étude apporte des renseignements précieux pour la mise en oeuvre du marquage d'anticorps monoclonaux, ce qui ouvre de nouvelles perspectives d'utilisation des luminarines en immunologie (immunodosage, immunofluorescence ...).

Nous inspirant de nos travaux sur les immunoglobulines, en particulier l'étape d'oxydation des oligosaccharides, présents au niveau du fragment Fc de l'immunoglobuline, en aldéhydes, par le periodate, nous avons démontré les possibilités de dosage des nucléosides et nucléotides, qu'ils soient de bases purique ou pyrimidinique, en chromatographie liquide avec détection de fluorescence. Cette méthode est abordée à partir de l'étape qui consiste à coupler les luminarines hydrazides aux dialdéhydes issus de l'oxydation par le periodate.

En outre, ont été réalisées, l'identification, la confirmation de la nature et la structure des dérivés hydrazones (aldéhydes et cétones) et morpholino (nucléosides et nucléotides), ainsi que les produits secondairement formés. L'identification des produits secondaires formés

principalement par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (thermospray) a montré que ces composés sont issus de la réaction d'hydrolyse, des dérivés formés et des réactifs, en milieu acide.

En chromatographie en phase liquide, les facteurs tels que la sensibilité, la sélectivité et la spécificité de l'analyse ont été abordés et améliorés en optimisant les paramètres de la dérivation précolonne. Les conditions optimales de dérivation ont été appliquées à des aldéhydes et cétones variés, nucléosides et nucléotides puis étendues à l'analyse du 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) dans le jus d'orange concentré et pasteurisé et à celle du malonaldéhyde (MDA) total dans le plasma. Enfin, nous avons proposé les conditions permettant le dosage du malonaldéhyde libre. Cette dernière méthode, qui permet la quantification du malonaldéhyde de l'ordre de $\sim 7,0$ ng/ml, peut être considérée comme un modèle qui devrait avoir de nombreuses applications dans le domaine biomédical.

L'ensemble des aldéhydes, cétones, nucléosides et nucléotides étudiés présente des limites de quantités détectables de l'ordre de 28 à 1950 fmoles. Ces limites pourraient être améliorées soit :

- en procédant à un choix judicieux des solvants entrant dans la composition de la phase mobile, comme nous l'avions démontré après une étude spectrofluorimétrique des luminarines dans les solvants couramment utilisés en chromatographie liquide.
- en utilisant le mode de détection par chimiluminescence.
- en remplaçant la source xénon par une source laser.

En effet, Le laser présente certaines propriétés qui permettent une grande sensibilité et une bonne sélectivité [HULSHOFF et LINGEMAN (1985); SEPANIAK (1985)] :

- les lasers pulsés ont une grande puissance de crête de l'ordre de 1 MW, à comparer aux sources usuelles continues de 150 W. Le signal de fluorescence est évidemment augmenté, mais le bruit de fond également. Cette grande puissance permet de sélectionner des longueurs d'onde d'excitation et d'émission en dehors des valeurs optimales afin de gagner en sélectivité tout en conservant une grande sensibilité.

- l'utilisation d'une excitation pulsée (avec des impulsions de 1 femtoseconde à 1 milliseconde) couplée à une détection opérant à la même fréquence présente également deux avantages : les diffusions Rayleigh et Raman coïncident exactement avec la durée de l'impulsion, pratiquement 10 nanosecondes. Ainsi, un détecteur mesurant le signal pendant une période bien ajustée ne prendra en compte que la fluorescence. D'autre part, on peut distinguer des fluorophores dont la durée de vie à l'état excité est différente, ce qui permet d'augmenter la sélectivité.

- le laser émet une lumière polarisée; les diffusions Rayleigh et Raman étant elles aussi polarisées, une orientation convenable de l'optique avec un filtre permet d'atténuer la contribution de la diffusion au bruit de fond.

- enfin, le laser fournit un faisceau de lumière extrêmement cohérent et monochromatique, ce qui permet d'utiliser des fibres optiques pour le conduire, et de le focaliser sur un volume extrêmement faible. Cela est nécessaire pour travailler avec des colonnes capillaires utilisant des cellules de mesure dont le volume mort est très réduit.

Ainsi, l'emploi simultané d'une source laser et d'un système de mélangeur post-colonne approprié permettant l'ajout de solvants accepteurs d'hydrogène (solvants basiques), semblerait particulièrement intéressant pour l'analyse de molécules à fonction carbonyle se trouvant en faibles quantités dans les milieux complexes.

Les luminarines hydrazides peuvent aussi être envisagées pour les études de détection des acides carboxyliques par chromatographie en phase liquide dont le développement exige de plus en plus des réactifs de dérivation pré-colonne, en milieu aqueux, constitués de molécules douées de propriétés fluorescentes ou chimiluminescentes. La réaction de dérivation pouvant être réalisée en milieu aqueux en présence d'un agent de couplage hydrosoluble comme le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC).

La luminarine 3 s'est révélée être le réactif de dérivation optimal parmi les trois luminarines hydrazides utilisées.

En perspective de développement en immunologie, bien que nous ayons présenté dans ce mémoire les possibilités offertes par les luminarines hydrazides pour le marquage des anticorps ou antigène, la mise au point d'une nouvelle méthode immunologique de dosage nécessite le respect de plusieurs étapes dont les principales sont : la production des anticorps, la purification et la vérification de la stabilité et hétérogénéité des anticorps marqués, la sélection d'une méthode de détection sensible et reproductible, l'optimisation de la technique immunologique. Les prochaines études devront tenir compte de tous ces aspects.

Les différentes méthodes proposées semblent prometteuses pour la mise en oeuvre des dosages de routine dans les domaines de la biologie clinique, biologie moléculaire, industrie alimentaire, industrie pharmaceutique et environnement.

BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

- **AARON J.J.**, "Photochemical fluorometry, in Molecular Luminescence Spectroscopy, Methods and Applications " Part 3 (Chemical Analysis vol.77), Ed. S.G.SCHULMAN , "Wiley & Sons, New York-Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore, 1993, p.85-131.
- **ALFONSO F.C., MARTIN G.E. and DYER R.H.**, "High pressure liquid chromatographic determination of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde in caramel solution". *J.Assoc.Off.Anal.Chem.*, (1980), **63**, 1310-1313.
- **ALPENFELS W.F.**, "A rapid and sensitive method for the determination of monosaccharides as their dansyl hydrazones by high-performance liquid chromatography". *Anal.Biochem.*, (1981), **114**, 153-157.
- **AMIR D. and HAAS E.**, "A series of site specific fluorescently labelled BPTI derivatives prepared by non selective acylation and chromatographic separations". *Int.J.Peptide Protein Res.*, (1986), **27**, 7-17.
- **ANDERSON J.M.**, "Fluorescent hydrazides for the high-performance liquid chromatographic determination of biological carbonyls". *Anal.Biochem.*, (1986), **152**, 146-153.
- **ANDERSON J.M.**, "Simultaneous determination of abscisic acid and jasmonic acid in plant extracts using high-performance liquid chromatography". *J.Chromatogr.*, (1985), **330**, 347-355.
- **ASAKAWA T. and MATSUSHITA S.**, "Thiobarbituric acid test for detecting lipid peroxides". *Lipids*, (1980), **14**, 401-406.
- **AVIGAD G.**, "Dansyl hydrazine as a fluorimetric reagent for thin-layer chromatographic analysis of reducing sugars". *J.Chromatogr.*, (1977), **139**, 343-347.
- **AVIGNOLO C., RONER R., CAI S. and BIGNONE F.A.**, "Biotinylation of denaturated double-stranded DNA after transamination of cytidines : molecular biology applications". *J.Biochem.Biophys.Methods*, (1991), **23**, 193-205.
- **BADOR R., DECHAUD H., CLAUSTRAT F. and DESUZINGES C.**, "Europium and samarium as labels in time-resolved immunofluorometric assay of follitropin". *Clin.Chem.*, (1987), **33**, 48-51.

- **BAKER W., HAKSAR C.N. and MAC OMIE J.F.W.**, "Fluorescent reagents. Acylchlorides and acyl hydrazides". *J.Chem.Soc.*, (1950), **37**, 170-173.
- **BAKHSHEV N.G.**, "Universal intermolecular interactions and their effect on the position of the electronic spectra of molecules in two-component solutions". *Opt.Spectrosc.*, (1962), **13**, 24-29.
- **BARBIER Y.**, "Les immunodosages : de la théorie à la pratique". Editions de L'ACOMEN, (1989).
- **BASTINGS D., D.OUW and SCHÄFER F.P.**, "The phenoxazones : A new class of laser dyes". *Opt.Commun.*, (1976), **18**, 260-262.
- **BAYER E.A., BEN-HUR H. and WILCHEK M.**, "Biocytin hydrazide- A selective label for sialic acids, galactose, and other sugars in glycoconjugates using avidin-biotin technology". *Anal.Biochem.*, (1988), **170**, 271-281.
- **BECKER R.S.**, "In theory and interpretation of fluorescence and phosphorescence". Wiley Interscience New York-London-Sidney-Toronto, 1969.
- **BEHRENS W.A. and MADERE R.**, "Malonaldehyde determination in tissues and biological fluids by ion-pairing high-performance liquid chromatography". *Lipids*, (1991), **26**, 232-236.
- **BELJEAN-LEYMARIE M. and BRUNA E.**, "Subpicogram determination of malondialdehyde by gas-liquid chromatography with nitrogen phosphorus detector". *Anal.Biochem.*, (1988), **173**, 174-184.
- **BENEDETTI A., COMPORTI M. and ESTERBAUER H.**, "Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids". *Biochim.Biophys.Acta*, (1980), **620**, 281-296.
- **BIGWOOD T. and READ G.**, "Pseudo malonaldehyde activity in the thiobarbituric acid test". *Free Rad.Res.Comm.*, (1989), **6**, 387-392.
- **BIRD R.P. and DRAPER H.H.**, "Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination". *Methods in Enzymology*, (1984), **105**, 299-305.
- **BIRD R.P., HUNG S.S.O., HADLEY M. and DRAPER H.H.**, "Determination of malonaldehyde in biological materials by high-pressure liquid chromatography". *Anal.Biochem.*, (1983), **128**, 240-244.

- **BOOS J.**, "A simple isocratic ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine 5'-triphosphate for intracellular drug-monitoring and in vitro incubation assays". *J.Pharm.Biomed.Anal.*, (1991), **9**, 47-52.
- **BOURDON R. et BOURDON-RANISTEANO S.**, "Les fondements analytiques de l'immunologie quantitative". *Analisis*, (1983), **11**, 309-326.
- **BRÖNSTED J.N. and GUGGENHEIM E.A.**, "Contribution to the theory of acid and basic catalysis. The mutarotation of glucose". *J.Am.Chem.Soc.*, (1927), **49**, 2554-2584.
- **BROWN P.R., BOBICK S. and HANLEY F.L.**, "The analysis of purine and pyrimidine bases and their nucleosides by high-pressure liquid chromatography". *J.Chromatogr.*, (1974), **99**, 587-595.
- **BULL A.W. and MARNETT L.J.**, "Determination of malondialdehyde by ion-pairing high-performance liquid chromatography". *Anal.Biochem.*, (1985), **149**, 284-290.
- **CAPOGROSSI M.C., HOLDINESS M.R. and ISRAILI Z.H.**, "Determination of adenosine in normal human plasma and serum by high-performance liquid chromatography". *J.Chromatogr.*, (1982), **227**, 168-173.
- **CARBONNEAU M.A., PEUCHANT E., SESS D., CANIONI P. and CLERC M.**, "Free and bound malondialdehyde measured as thiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma". *Clin.Chem.*, (1991), **37**, 1423-1429.
- **CHAMPEIX J. et CATILINA P.**, "Les intoxications par l'acroléine". Collection de médecine légale et de toxicologie médicale, Masson et Cie éditeurs, 3^{ème} trimestre, (1967), p.11.
- **CHAYEN R., DVIR R., GOULD S. and HARELL A.**, "1-Dimethylaminonaphthalene-5-sulfonyl hydrazine (Dansyl hydrazine) : a fluorometric reagent for carbonyl compounds". *Anal.Biochem.*, (1971), **42**, 283-286.
- **CILLIERS J.J.L. and VAN NIEKERK P.J.**, "Liquid chromatographic determination of hydroxymethylfurfural in fruit juices and concentrates after separation on two columns". *J.Assoc.Off.Anal.Chem.*, (1984), **67**, 1037-1039.

- **CONTI M., MORAND P.C., LEVILLAIN P. and LEMONNIER A.**, "Improved fluorometric determination of malonaldehyde". *Clin.Chem.*, (1991), **37**, 1273-1275.
- **COOSEMANS L., DE SCHRYVER F.C. and VAN DORMAEL A.**, "Influence of solvent properties on fluorescence probes. 7-amino-and 7-N-dimethylamino-4-methylcoumarin". *Chem.Phys.Letters*, (1979), **65**, 95-99.
- **CORONGIU F.P., POLI G., DIANZANI M.U., CHEESEMAN K.H. and SLATER T.F.**, "Lipid peroxidation and molecular damage to polyunsaturated fatty acids in rat liver. Recognition of two classes of hydroperoxides formed under conditions in vivo". *Chem.Biol.Interactions*, (1986), **59**, 147-155.
- **CROSS C.E., HALLIWELL B., BORISH E.T., PRYOR W.A., AMES B.N., SAUL R.L., McCORD J.M. and HARMAN D.**, "Oxygen radicals and human disease". *Ann.Int.med.*, (1987), **107**, 526-545.
- **CSALLANY A.S., GUAN MD., MANWARING J.D. and ADDIS P.B.**, "Free malonaldehyde determination in tissues by high-performance liquid chromatography". *Anal.Biochem.*, (1984), **142**, 277-283.
- **DECLEMY A., RULLIERE C. and KOTTIS Ph.**, "Picosecond hydrogen-bond formation in excited states : The case of an intramolecular charge-transfer (ICT) state". *Chem.Phys.Letters* , (1983), **101**, 401-406.
- **DEMAS J.N. and CROSBY G.A.**, "The measurement of photoluminescence quantum yields". *J.Phys.Chem.*, (1971), **75**, 991-1024.
- **DEY B.B.**, "A study in the coumarin condensation". *J.Chem.Soc.*, (1915), **107**, 1606-1647.
- **DINSMORE H.L. and NAGY S.**, "Colorimetric furfural measurement as an index of deterioration in stored citrus juices". *J.Food Sci.*, (1972), **37**, 768-770.
- **DINSMORE H.L. and NAGY S.**, "Improved colorimetric determination for furfural in citrus juices". *J.Assoc.Off.Chem.*, (1974), **57**, 332-335.
- **DRAPER D.E.**, "Attachment of reporter groups to specific, selected cytidine residues in RNA using a bisulfite-catalyzed transamination reaction". *Nucleic Acids Res.*, (1984), **12**, 989-1002.

- **DRAPER H.H., POLENSEK L., HADLEY M. and McGIRR L.G.**, "Urinary malondialdehyde as an indicator of lipid peroxidation in the diet and in the tissues". *Lipids*, (1984), **19**, 836-843.
- **EKSTRÖM T., GARBERG P., EGESTAD B. and HÖGBERG J.**, "Recovery of malondialdehyde in urine as a 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative analyzed with high-performance liquid chromatography". *Chem.Biol.Interactions*, (1988b), **66**, 177-187.
- **EKSTRÖM T., WARHOLM M., KRONEVI T. and HÖGBERG J.**, "Recovery of malondialdehyde in urine as a 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative after exposure to chloroform or hydroquinone". *Chem.Biol.Interactions*, (1988a), **67**, 25-31.
- **ESTERBAUER H. and SLATER T.F.**, "The quantitative estimation by high-performance liquid chromatography of free malonaldehyde produced by peroxidizing microsomes". *IRCS Med.Sci.*, (1981), **9**, 749-750.
- **ESTERBAUER H., CHEESEMAN K.H., DIANZANI M.U. POLI G. and SLATER T.F.**, "Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes". *Biochem.J.*, (1982), **208**, 129-140.
- **ESTERBAUER H., LANG J., ZADRAVEC S. and SLATER T.F.**, "Detection of malonaldehyde by high-performance liquid chromatography". *Methods in enzymology*, (1984), **105**, 319-328.
- **FARINOTTI R.**, "Contribution à l'étude de la détection après chromatographie en phase liquide, d'acides monocarboxyliques aliphatiques à courtes chaînes, d'intérêt biologique". *Thèse d'Etat, Université Paris-Sud, Série E. N°188*, (1983a).
- **FARINOTTI R., SIARD Ph., BOURSON J., KIRKIACHARIAN S., VALEUR B. and MAHUZIER G.**, "4-bromomethyl-6,7-dimethoxycoumarin as a fluorescent label for carboxylic acids in chromatographic detection". *J.Chromatogr.*, (1983b), **269**, 81-90.
- **FELKIN H.**, "Mécanismes des réactions d'addition sur la fonction carbonyle". *Bull.Soc.Chim.*, (1956), p 1510.
- **FREI R.W. and LAWRENCE J.F.**, "Fluorogenic labelling in high-speed liquid chromatography". *J.Chromatogr.*, (1973), **83**, 321-330.

- **FUJIMORI H., SASAKI T., HIBI K., SENDA M. and YOSHIOKA M.**, "Direct injection of blood samples into a high-performance liquid chromatographic adenine analyser to measure adenine, adenosine and the adenine nucleotides with fluorescence detection". *J.Chromatogr.*, (1990), **515**, 363-373.
- **FUNG K. and GROSJEAN D.**, "Determination of nanogram amounts of carbonyls as 2,4-dinitrophenylhydrazones by high-performance liquid chromatography". *Anal.Chem.*, (1981), **53**, 168-171.
- **GAL-OR O., MELLENA J.E., MOUDRIANAKIS E.N. and BEER M.**, "Electron microscopic study of base sequence in nucleic acids. VII. Cytosine-specific addition of acyl hydrazides". *Biochemistry*, (1967), **6**, 1909-1915.
- **GARDINER D.G.**, "A rapid and sensitive fluorimetric assay for adenosine, inosine, and hypoxanthine". *Anal.Biochem.*, (1979), **95**, 377-382.
- **GAUTIER J.A. et MIOCQUE M.**, "Précis de Chimie Organique-Tome 1 : Généralités; Série acyclique". Masson et Cie, Ed., (1968).
- **GODA Y. and MARNETT L.J.**, "High-performance liquid chromatography with electrochemical detection for determination of the major malondialdehyde-guanine adduct". *Chem.Res.Toxicol.*, (1991), **4**, 520-524.
- **GOLDBERG M.C. and WEINER E.R.**, "The science of luminescence, in luminescence applications in biological, chemical, environmental and hydrological sciences". American Chemical Society, Ed. Marvin C.Goldberg, Washington, DC 1989, p 1-22.
- **GOMIS D.B., ALVAREZ M.D.G., NAREDO L.S. and ALONSO J.J.M.**, "High-performance liquid chromatographic determination of furfural and hydroxymethylfurfural in apple juices and concentrates". *Chromatographia*, (1991), **32**, 45-48.
- **GOOIJER C., BAUMANN R.A. and HOFSTRAAT J.W.**, "Sensitized fluorescence : a potentiel method to enhance the concentration sensitivity of fluorescence detection in small-bore LC". *J.Chromatogr.Sci.*, (1986), **24**, 361-363.
- **GOSLING J.P.**, "A decade of development in immunoassay methodology". *Clin.Chem.*, (1990), **36**, 1408-1427.

- **GOTO J., SAISHO Y. and NAMBARA T.**, "Sensitive fluorescence labelling reagents for high-performance liquid chromatography of carbonyl compounds". *Anal.Sci.*, (1989), **5**, 399-402.

- **GOYA S., TAKADATE A., TANAKA T. and NAKASHIMA F.**, "Synthesis and fluorescent properties of coumarin derivatives as analytical reagents". *Yakugaku Zasshi*, (1980), **100**, 289-294.

- **GRABOWSKI Z.R. and DOBKOWSKI J.**, "Twisted Intramolecular Charge Transfer (TICT) excited states : energy and molecular structure". *Pure and Appl.Chem.*, (1983), **55**, 245-252.

- **GRABOWSKI Z.R., ROTKIEWICZ K., SIEMIARCZUK A., COWLEY D.J. and BAUMANN W.**, "Twisted Intramolecular Charge Transfer state (TICT). A new class of excited states with a full charge separation". *Nouv. J. Chim.*, (1979), **3**, 443-454.

- **GRIFFOUL C., TOD M. and CHALOM J.**, "Etude du marquage d'anticorps par la luminarine 2". Travaux non publiés, (1991).

- **GÜBITZ G. and WINTERSTEIGER R.**, "Fluorogenic labelling of carbonyl compounds with 7-hydrazino-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-H)". *J.Liquid Chromatogr.*, (1984), **7**, 839-854.

- **GUIBAULT G.G.**, "General aspects of luminescence spectroscopy". In G.G.GUILBAULT (Ed), "Practical Fluorescence", Marcel Dekker, 1990, 1-39.

- **GUTTERIDGE J.M.C. and HALLIWELL B.**, "The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems". *Trends Biochem.Sci.*, (1990), **15**, 129-135.

- **GUTTERIDGE J.M.C.**, "The use of standards for malonaldehyde". *Anal.Biochem.*, (1975), **69**, 518-526.

- **HAMMOND P.R., FLETCHER A.N., BLISS D.E., HENRY R.A., ATKINS R.L. and MOORE D.W.**, "Search for efficient, near UV lasing dyes. III. Monocyclic and miscellaneous dyes". *Appl.Phys.*, (1976), **9**, 67-70.

- **HANSSKE F., SPRINZI M. and CRAMER F.**, "Reaction of the ribose moiety of adenosine and AMP with periodate and carboxylic acid hydrazides". *Bioorg.Chem.*, (1974), **3**, 367-376.

- HARA S., YAMAGUCHI M., TAKEMORI Y., NAKAMURA M. and OHKURA Y., "Highly sensitive determination of N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acids in human serum and urine and rat serum by reversed-phase liquid chromatography with fluorescence detection". *J.Chromatogr.*, (1986), **377**, 111-119.
- HAUGLAND R.P., "Molecular probes : Handbook of fluorescent probes and research chemicals". Ed., KAREN D.LARISON, 5th edition, (1992-1994), p.43.
- HAYATSU H., "Reaction of cytidine with semicarbazide in the presence of bisulfite. A rapid modification specific for single-stranded polynucleotide". *Biochemistry*, (1976), **15**, 2677-2682.
- HEMMILA I., MALMINEN O., MIKOLA H. and LOVGREN T., "Homogeneous time-resolved fluoimmunoassay of thyroxin in serum". *Clin.Chem.*, (1988), **43**, 2320-2322.
- HENRY R.A. and HAMMOND P.R., *J. Heterocyclic Chem.*, (1977), **14**, 1109-
- HERBRANDSON H.F. and NEUFELD F.R., "Organic reactions and the critical energy density of the solvent. The solubility parameter, δ , as a new solvent parameter". *J.Org.Chem.*, (1966), **31**, 1140-1143.
- HIGASHIDE S., HIBI K., SENDA M., KANDA S. and IMAI K., "Sensitive assay system for bile acids and steroids having hydroxyl groups utilizing high-performance liquid chromatography with peroxyoxalate chemiluminescence detection". *J.Chromatogr.*, (1990), **515**, 577-584.
- HIRAYAMA T., MIURA S., ARAKI M., TAKEO Y. and WATANABE T., "Fluorometric method for determination of 1,2-unsaturated aldehydes in autooxidized lipids with 2,4-diaminotoluene". *J.Assoc.Off.Anal.Chem.*, (1990), **73**, 590-594.
- HIRAYAMA T., YAMADA N., NOHARA M. and FUKUI S., "High-performance liquid chromatographic determination of malondialdehyde in vegetable oils". *J.Assoc.Off.Anal.Chem.*, (1983), **66**, 304-308.
- HORIKAWA R., TANIMURA T. and TAMURA Z., "Method for fluorescence detection in the high-performance liquid chromatography of Δ^4 -3-ketosteroids". *J.Chromatogr.*, (1979), **168**, 526-529.

- **HULSHOFF A. and LINGEMAN H.**, "Fluorescence detection in chromatography, in Molecular Luminescence Spectroscopy, Methods and Applications " Part 1 (Chemical Analysis vol.77), Ed. S.G.SCHULMAN , "Wiley & Sons, New York-Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore, 1985, p.621-715.
- **HUNTER M.I.S. and MOHAMED J.B.**, "Plasma antioxidants and lipid peroxidation products in duchenne muscular dystrophy". *Clin.Chim.Acta*, (1986), **155**, 123-132.
- **IMAI K., HIGASHIDATE S., NISHITANI A., TSUKAMOTO Y., ISHIBASHI M. SHODA J. and OSUGA T.**, "Sensitive detection of oxo-steroids and oxo-bile acids by liquid chromatography with peroxyoxalate chemiluminescence detection". *Anal.Chim.Acta*, (1989a), **227**, 21-27.
- **IMAI K., HIGASHIDATE S., TSUKAMOTO Y., UZU S. and KANDA S.**, "Effect of tetrahydrofuran on reversed-phase liquid chromatographic separation of dansyl hydrazones of oxo-steroids". *Anal.Chim.Acta*, (1989b), **225**, 421-424.
- **INGEBRETSEN O.C., BAKKEN A.M. and FARSTAD M.**, "Liquid chromatography of serotonin and adenine nucleotides in blood platelets, illustred by evaluation of functional integrity of platelet preparations". *Clin.Chem.*, (1985), **31**, 695-698.
- **ISHIDA J., SONEZAKI S. and YAMAGUCHI M.**, "4,5-Diaminophthalhydrazide as a highly sensitive chemiluminescence derivatization reagent for α -dicarbonyl compounds in high-performance liquid chromatography". *J.Chromatogr.*, (1992), **598**, 203-208.
- **JEURING H.J. and KUPPERS F.J.E.M.**, "High performance liquid chromatography of furfural and hydroxymethylfurfural in spirits and honey". *J.Assoc.Off.Anal.Chem.*, (1980), **63**, 1215-1218.
- **JONES II G., JACKSON W.R. and HALPERN A.M.**, "Medium effect on fluorecence quantum yields and lifetimes for coumarin laser dyes". *Chem.Phys.Letters*, (1980), **72**, 391-395.
- **JONES II G., JACKSON W.R., CHOI C.Y. and BERGMARK W.**, "Solvent effects on emission yield and lifetime for coumarin laser dyes. Requirements for a rotatory decay mechanism". *J. Phys.Chem.*, (1985), **89**, 294-300.

- **JOSHI S.D. and USGAONKAR R.N.**, "Synthesis of 4-substitued coumarins". *Indian J.Chem.*, (1982), **21B**, 399-402.

- **KAMLET M.J. and TAFT R.W.**, "The solvatochromic comparison method. 1. The β scale of solvent hydrogen-bond acceptor (HBA) basicities". *J.Am.Chem.Soc.*, (1976), **98**, 377-383.

- **KAMLET M.J., ABOUD J.L. and TAFT R.W.**, "The solvatochromic comparison method. 6. The π^* scale of solvent polarities". *J.Am.Chem.Soc.*, (1977), **99**, 6027-6038.

- **KAMLET M.J., ABOUD J.L., ABRAHAM M.H. and TAFT R.W.**, "Linear solvation energie relationships. 23. A comprehensive collection of the solvatochromic parameters, π^* , α , and β , and some methods for simplifying the generalized solvatochromic equation. *J.Org.Chem.*, (1983), **48**, 2877-2887.

- **KAMLET M.J., DICKINSON Ch. and TAFT R.W.**, "Linear solvation energy relationships. Solvent effects on some fluorescence probes". *Chem.Phys.Letters*, (1981), **77**, 69-72.

- **KAMLET M.J., GAL J.F, MARIA P.Ch. and TAFT R.W.**, "Linear solvation energy relationships. Part 32. A co-ordinate covalency parameter, ξ , which, in combination with the hydrogen bond acceptor basicity parameter, β , permits correlation of many properties of neutral oxygen and nitrogen bases (including aqueous pK_a)". *J.Chem.Soc.Perkin Trans.*, (1985), **II**, 1583-1589.

- **KARNES H.T., O'NEAL J.S. and SCHULMAN S.G.**, "Luminescence immunoassay, in *Molecular Luminescence Spectroscopy, Methods and Applications* " Part I (Chemical Analysis vol.77), Ed. S.G.SCHULMAN , "Wiley & Sons, New York-Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore, 1985, p.717-779.

- **KAWAI S., FUCHIWAKI T., HIGASHI T. and TOMITA M.**, "High-performance liquid chromatographic determination of malonaldehyde using p-nitrophenylhydrazine as a derivatizing reagent". *J.Chromatogr.*, (1990), **514**, 29-35.

- **KAWAI S., TOMITA M. and KASASHIMA K.**, "High-performance liquid chromatographic determination of malonaldehyde in serum". *J.Chromatogr.*, (1989), **495**, 235-238.

- **KAWASAKI T., MAEDA M. and TSUJI A.**, "Determination of 17-hydroxycorticosteroids in urine by fluorescence high-performance liquid chromatography using Dns-hydrazine as a pre-column labelling reagent". *J.Chromatogr.*, (1982), **232**, 1-11.
- **KAWASAKI T., MAEDA M. and TSUJI A.**, "Determination of 17-oxosteroids in serum and urine by fluorescence high-performance liquid chromatography using dansyl hydrazine as a pre-labelling reagent". *J.Chromatogr.*, (1981), **226**, 1-12.
- **KAWASAKI T., MAEDA M. and TSUJI A.**, "Determination of plasma and urinary cortisol by high-performance liquid chromatography using fluorescence derivatization with dansyl hydrazine". *J.Chromatogr.*, (1979), **163**, 143-150.
- **KHAN M.A. and GEMAL A.L.**, "Synthesis of 5H[1]Benzopyrano[3,4-b]pyridin-5-one and its derivatives". *J.Heterocyclic Chem.*, (1977), **14**, 1009-1012.
- **KIKUGAWA K., KATO T. and IWATA A.**, "Determination of malonaldehyde in oxidized lipids by the Hantzsch fluorometric method". *Anal.Biochem.*, (1988), **174**, 512-521.
- **KIM H.J. and RICHARDSON M.**, "Determination of 5-hydroxymethylfurfural by ion-exclusion chromatography with UV detection". *J.Chromatogr.*, (1992), **593**, 153-156.
- **KINDBERG C.G., SLAVIK M., RILEY C.M. and STOBAUGH J.F.**, "High-performance liquid chromatography of 5-fluorouracil after derivatization with 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin. Characterization of the derivative and the use of column switching for the improvement of resolution and the enhancement of sensitivity". *J.pharm. & Biomed.Analysis*, (1989), **7**, 459-469.
- **KNIGHT J., PIEPER R. and Mc CLELLAN L.**, "Specificity of the thiobarbituric acid reaction : it use in studies of lipid peroxydation". *Clin.Chem.*, (1988), **34**, 2433 - 2438.
- **KOSOWER E.M. and DODIUK H.**, "Intramolecular donor-acceptor systems. 3. A third type of emitting singlet state for N-alkyl-6-N-arylamino-2-naphthalenesulfonates. Solvent modulation of substituent effects on charge-transfer emissions". *J.Am.Chem.Soc.*, (1978), **100**, 4173-4179.

- **KOST A.N. and GRANDBERG I.I.**, "Progress in pyrazole chemistry". *Adv.Heterocycl.Chem.*, (1966), **6**, 347-429.

- **KOUWATLI H., CHALOM J., TOD M., FARINOTTI R. and MAHUZIER G.**, "Precolumn derivatization of amines in liquid chromatography using luminescent probes : comparison of several reagents with luminarin 1". *Anal.Chim.Acta*, (1992), **266**, 243-249.

- **KOZIOL T., GRAYESKI M.L. and WEINBERGER R.**, "Determination of traces levels of steroids in blood plasma by liquid chromatography with peroxyoxalate chemiluminescence detection". *J.Chromatogr.*, (1984), **317**, 355-366.

- **KRSTULOVIC A.M., BROWN P.R. and ROSIE D.M.**, "Identification of nucleosides and bases in serum and plasma samples by reverse-phase high performance liquid chromatography". *Anal.Chem.*, (1977), **49**, 2237-2241.

- **KWON T.W. and WATTS B.M.**, "Determination of malonaldehyde by ultraviolet spectrophotometry". *J.Food Sci.*, (1963), **28**, 627-630.

- **LACOMBE A., KERMASHA S., VAN DE VOORT F.R. and MILLS B.L.**, "Preparation and purification of malonaldehyde sodium salt". *J.Agric.Food Chem.*, (1990), **38**, 418-423.

- **LAKOWICZ J.R.**, "In principles of fluorescence spectroscopy". Plenum Press-New York and London, 1983.

- **LARGILLIERE C. and MELANCON S.B.**, "Free malondialdehyde determination in human plasma by high-performance liquid chromatography". *Anal.Biochem.*, (1988), **170**, 123-126.

- **LAWRENCE J.F.**, "Chemical derivatization in analytical chemistry". R.W.Frei and J.F.Lawrence (Ed), Plenum Press, New York/London, 1982, p.191.

- **LAZZARINO G., DI PIERRO D., TAVAZZI B., CERRONI L. and GIARDINA B.**, "Simultaneous separation of malonaldehyde, ascorbic acid, and adenine nucleotide derivatives from biological samples by ion-pairing high-performance liquid chromatography". *Anal.Biochem.*, (1991), **197**, 191-196.

- LAZZARINO G., VIOLA A.R., MULIERI L., ROTILIO G. and MAVELLI I., "Prevention by fructose-1,6-biphosphate of cardiac oxidative damage induced in mice by subchronic doxorubicin treatment". *Cancer Research*, (1987), **47**, 6511-6516.
- LE BRIS M.T., MUGNIER J., BOURSON J. and VALEUR B., "Spectral properties of a new fluorescent dye emitting in the red : A benzoxazinone derivative". *Chem.Phys.Letters*, (1984), **106**, 124-127.
- LE BRIS M.T., "Réaction de l'amino-2 nitro-5 phénol et du diamino-2,5 phénol avec quelques acides et esters α -cétoniques. Synthèse d'amino-7 benzoxazines-1,4 ones-2". *J. Heterocyclic Chem.*, (1984), **21**, 551-555.
- LE BRIS M.T., "Synthesis and properties of some 7-dimethylamino-1,4-benzoxazin-2-ones". *J. Heterocyclic Chem.*, (1985), **22**, 1275-1280.
- LE BRIS M.T., "Synthesis of new fluorescent dyes in the benzoxazinone series : Aminobenzoxazinones with a rigidized structure". *J. Heterocyclic Chem.*, (1989), **26**, 429-433.
- LEE H.S. and CSALLANY A.S., "Measurement of free and bound malondialdehyde in vitamin E-deficient and -supplemented rat liver tissues". *Lipids*, (1987), **22**, 104-107.
- LEE H.S., ROUSEFF R.L. and NAGY S., "HPLC determination of furfural and 5-hydroxymethylfurfural in citrus juices". *J.Food Sci.*, (1986), **51**, 1075-1076.
- LEPAGE G., MUNOZ G., CHAMPAGNE J. and ROY C.C., "Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography". *Anal.Biochem.*, (1991), **197**, 277-283.
- LEVITT B., HEAD R.J. and WESTFALL D., "High-pressure liquid chromatographic-fluorometric detection of adenosine and adenine nucleotides : Application to endogenous content and electrically induced release of adenyl purines in guinea pig vas deferens". *Anal.Biochem.*, (1984), **137**, 93-100.
- LI Z.F., SAWAMURA M. and KUSUNOSE H., "Rapid determination of furfural and 5-hydroxymethylfurfural in processed citrus juices by HPLC". *Agric.Biol.Chem.*, (1988), **52**, 2231-2234.

- LINGEMAN H., UNDERBERG W.J.M., TAKADATE A. and HULSHOFF A., "Fluorescence detection in high performance liquid chromatography". *J. of Liquid Chromatography*, (1985), **8**, 789-874.
- LIPPERT V.E., "Spektroskopische bestimmung des dipolmomentes aromatischer verbindungen im ersten angeregten singulettzustand". *Z.Elektrochem.*, (1957), **8**, 962-975.
- LJUNGGREN S., MERENUI G. and LIND J., "A plausible mechanism for the chemiexcitation of cyclic hydrazides. The double crossing model". *J.Amer.Chem.Soc.*, (1983), **105**, 7662-7666.
- LLOYD J.B.F., "Fatty acid esters of 4-hydroxymethyl-7-methoxycoumarin : fluorescence characteristics and their variation in high-performance liquid chromatographic solvents". *J.Chromatogr.*, (1979), **178**, 249-258.
- LUNEC J., "Free radicals : the involvement in disease processes". *Ann.Clin.Biochem.*, (1990), **27**, 173-182.
- MANSILLA E.A., SALINAS F. and NEVADO J.J.B., "Differential determination of furfural and hydroxymethylfurfural by derivative spectrophotometry". *J. of AOAC. International*, (1992), **75**, 678-684.
- MARCY J.E. and ROUSEFF R.L., "High-performance liquid chromatographic determination of furfural in orange juice". *J.Agric.Food Chem.*, (1984), **32**, 979-981.
- MARNETT L.J. and TUTTLE M.A., "Comparison of the mutagenicities of malonaldehyde and the side products formed during its chemical synthesis". *Cancer Research*, (1980), **40**, 276-282.
- MASILAMANI V. and SIVARAM B.M., "Solvent effects on the spectral and gain characteristics of a DAMC dye laser". *J.Lumin.*, (1982), **27**, 147-154.
- MATHIEU J. and ALLAIS A., "Cahiers de synthèse organique". Vol.XII, Masson et Cie, Ed., (1966), p.34.
- MEYDAV S. and BERK Z., "Colorimetric determination of browning precursors in orange juice products". *J.Agric.Food Chem.*, (1978), **26**, 282-285.
- MIJARES R.M., PARK G.L., NELSON D.B. and McIVER R.C., "HPLC analysis of HMF in orange juice". *J.Food Sci.*, (1986), **51**, 843-844.

- **MIOCQUE M., FARNOUT C.C. et MOSKOWITZ H.**, "Abrégé de Chimie Organique - Tome 2 : Fonctions complexes-Molécules d'intérêt biologique". 2^{ème} édition révisée et augmentée, Masson, (1982), p.124.

- **MIWA H., HIYAMA C. and YAMAMOTO M.**, "High-performance liquid chromatography of short- and long-chain fatty acids as 2-nitrophenylhydrazides". *J.Chromatogr.*, (1985), **321**, 165-174.

- **MIYAI K. and PRICE C.P.**, "Problems for improving performance in immunoassay". *JIFCC*, (1992), **4**, 154-163.

- **MORALES F.J., ROMERO C. and JIMENEZ-PEREZ S.**, "An enhanced liquid chromatographic method for 5-hydroxymethylfurfural determination in UHT milk". *Chromatographia*, (1992), **33**, 45-48.

- **NAGY S. and DINSMORE H.L.**, "Relationship of furfural to temperature abuse and flavor change in commercially canned single-strength orange juice". *J.Food Sci.*, (1974), **39**, 1116-1119.

- **NAGY S. and RANDALL V.**, "Use of furfural content as an index of storage temperature abuse in commercially processed orange juice". *J.Agric.Food Chem.*, (1973), **21**, 272-275.

- **NAIR V., COOPER S., VIETTI D. and TURNER G.**, "The chemistry of lipid peroxydation metabolites : cross linking reactions of malonaldehyde". *Lipids*, (1986), **21**, 6-10.

- **NAKAMURA M., HARA S., YAMAGUCHI M., TAKEMORI Y. and OHKURA Y.**, "1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzene as a highly sensitive fluorogenic reagent for α -keto acids". *Chem.Pharm.Bull.*, (1987), **35**, 687-692.

- **NAKASHIMA K., ANDO T. and AKIYAMA S.**, "High-performance liquid chromatographic determination of lipoperoxides in rat plasma following derivatization to 1,3-diphenyl-2-thiobarbituric acid condensate". *Chem.Pharm.Bull.*, (1984), **32**, 1654-1657.

- **NAKASHIMA K., ANDO T., NAKAMIZO T. and AKIYAMA S.**, "Development and application of organic reagents for analysis. V. : high-performance liquid chromatographic determination of lipoperoxides in biological fluids with 1,3-diphenyl 2-thiobarbituric acid". *Chem.Pharm.Bull.*, (1985), **33**, 5380-5384.

- **NAKASHIMA K., NAGATA M., TAKAHASHI M. and AKIYAMA S.**, "Peroxyoxalate chemiluminescence detection of condensates of malondialdehyde with thiobarbituric acids using a flow system". *Biomed.Chromatogr.*, (1992), **6**, 55-58.
- **NAMM D.H. and LEADER J.P.**, "A sensitive analytical method for the detection and quantification of adenosine in biological samples". *Anal.Biochem.*, (1974), **58**, 511-524.
- **NEGISHI K., HARADA C., OHARA Y., OOHARA K., NITTA N. and HAYATSU H.**, "N⁴-Aminocytidine, a nucleoside analog that has an exceptionally high mutagenic activity". *Nucleic Acids Res.*, (1983), **11**, 5223-5233.
- **NOBERASCO G., ODETTI P., BOERI D., MAIELLO M. and ADEZATI L.**, "Malonaldehyde (MDA) level in diabetic subjects. Relationship with blood glucose and glycosylated hemoglobin". *Biomed. and Pharmacother.*, (1991), **45**, 193-196.
- **NONDEK L., MILOFSKY R.E. and BIRKS J.W.**, "Determination of carbonyl compounds in air by HPLC using on-line analyzed microcartridges, fluorescence and chemiluminescence detection". *Chromatographia*, (1991), **32**, 33-39.
- **NORMANT H. et NORMANT J.F.**, "Chimie Organique" Masson et Cie, 2ème Ed., (1968)
- **O'SHANNESY D.J. and QUARLES R.H.**, "Labeling of the oligosaccharide moieties of immunoglobulins". *J.Immunol.Methods*, (1987), **99**, 153-161.
- **O'SHANNESY D.J. and QUARLES R.H.**, "Specific conjugation reactions of the oligosaccharide moieties of immunoglobulins". *J.Appl.Biochem.*, (1985), **7**, 347-355.
- **O'SHANNESY D.J., DOBERSEN M.J. and QUARLES R.H.**, "A novel procedure for labeling immunoglobulins by conjugation to oligosaccharide moieties". *Immunol.Lett.*, (1984), **8**, 273-277.
- **O'SHANNESY D.J., VOORSTAD P.J. and QUARLES R.H.**, "Quantification of glycoproteins on electroblots using the biotin-streptavidin complex". *Anal.Biochem.*, (1987), **163**, 204-209.
- **OESTERHELT G., POZEG M., BUBENDORF A. and BARTOLDUS D.**, "Analyse von hydroxypivalaldehyd als trimethylsilylderivat des oxims mittels gaschromatographie". *Fresenius Z.Anal.Chem.*, (1985), **321**, 553-555.

- **OHKAWA H., OHISHI N. and YAGI K.**, "Assay for liquid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction". *Anal.Biochem.*, (1979), **95**, 351-358.
- **OLSON K.L., and SWARIN S.J.**, "Determination of aldehydes and ketones by derivatization and liquid chromatography-mass spectrometry". *J.Chromatogr.*, (1985), **333**, 337-347.
- **ONTYD J. and SCHRADER J.**, "Measurement of adenosine, inosine, and hypoxanthine in human plasma". *J.Chromatogr.*, (1984), **307**, 404-409.
- **PARKER C.A. and REES W.T.**, "Correction of fluorescence spectra and measurement of fluorescence quantum efficiency". *Analyst*, (1960), **85**, 587-600.
- **PARKER C.A.**, "In Photoluminescence of solutions". Elsevier Publishing Company, New York, (1968).
- **PERCHERON F., PERLES R et FOGLIETTI M.-J.**, "Abrégé de Biochimie Générale - Tome 1 : Bioénergétique-Protides-Enzymologie-Acides nucléiques". 2^{ème} édition révisée et augmentée, Masson, (1985), p.79.
- **PERRONE P.A. and BROWN P.R.**, "Ion-pair chromatography of nucleic acid derivatives". In : Ion-pair chromatography. M.T.HEARN and M.DEKKER (Ed), *Chromatographic Science Series*, New York, Vol.**32**, (1985), p.259-282.
- **PESEZ M. and BARTOS J.**, "In colorimetric and fluorimetric analysis of organic compounds and drugs". *Clinical and Biochemical Analysis*, Vol.1. Ed. Marcel Dekker, INC-New York, 1974.
- **PITKÄNEN O.M., HALLMAN M. and ANDERSSON S.M.**, "Determination of ethane and pentane in free oxygen radical-induced lipid peroxidation". *Lipids*, (1989), **24**, 157-159.
- **PRAKASH C. and VIJAY I.K.**, "A new fluorescent tag for labelling of saccharides". *Anal.Biochem.*, (1983), **128**, 41-46.
- **PRE J.**, "La lipoperoxydation". *Path. Biol.*, (1991), **39**, 716-736.
- **PRE J.**, "Radicaux libres et peroxydation : aspects biologiques généraux". *Sem.Hôp.Paris*, (1992), **68**, 1430-1437.

- **PRE J.**, "Radicaux libres et peroxydation : aspects physiopathologiques". *Sem.Hôp.Paris*, (1992), **69**, 29-39.
- **PRYOR W.A. and STANLEY J.P.**, "A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autooxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autooxidation". *J.Org.Chem.*, (1975), **40**, 3615-3617.
- **RAMOS-SALAZAR A. and BAINES A.D.**, "Fluorometric determination of adenine nucleotides and adenosine by ion-paired, reverse-phase, high-performance liquid chromatography". *Anal.Biochem.*, (1985), **145**, 9-13.
- **RECKNAGEL R.O. and GLENDE Jr E.A.**, "Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes". *Methods in Enzymology*, (1984), **105**, 331-337.
- **REEVES R.L., MAGGIO M.S. and COSTA L.F.**, "Importance of the solvent cohesion and structure in solvent effects on binding site probes". *J.Am.Chem.Soc.*, (1974), **96**, 5917-5925.
- **REICHARDT C.**, "Solvents and solvent effects in organic chemistry". 1 st reprint of the 2 nd Ed., Weinheim; Basel (Switzerland); Cambridge; New York (1990).
- **REID A.D. and BAKER P.R.**, "Formation and separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography of fluorescent and UV-absorbing bile salt derivatives". *J.Chromatogr.*, (1983), **260**, 115-121.
- **REINDL B. and STAN H.J.**, "Separation of saturated, mono-unsaturated and di-unsaturated aldehydes as 2,4-dinitrophenylhydrazones using high-performance liquid chromatography at increased temperature". *J.Chromatogr.*, (1982), **235**, 481-488.
- **REISFELD A., ROTHENBERG J.M., BAYER E.A. and WILCHEK M.**, "Non radiative hybridization probes prepared by the reaction of biotin hydrazide with DNA". *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, (1987), **142**, 519-526.
- **REYNOLDS G.A. and DREXHAGE K.H.**, "New coumarin dyes with rigidized structure for flashlamp-pumped dye lasers". *Opt.Commun.*, (1975), **13**, 222-225.

- **RICHARD M.J., GUIRAUD P., MEO J. and FAVIER A.**, "High-performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent". *J.Chromatogr.*, (1992b), **577**, 9-18.
- **RICHARD M.J., PORTAL B., MEO J., COUDRAY C., HADJIAN A. and FAVIER A.**, "Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid". *Clin.Chem.*, (1992a), **38**, 704-709.
- **ROTHFUS J.A. and SMITH E.L.**, "Glycopeptides : IV. The periodate oxidation of glycopeptides from human g-globulin". *J.Biol.Chem.*, (1963), **238**, 1402-1410.
- **ROTKIEWICZ K. and KÖHLER G.**, "Intramolecular excited state charge transfer and fluorescence decay of p-cyano-N,N-dimethylaniline in mixed hydrocarbon/halocarbon solvents". *J. Lum.*, (1987), **37**, 219-225.
- **ROUESSAC F. et ROUESSAC A.**, "Analyse chimique - Méthodes et techniques instrumentales modernes". Ed.Masson Paris, Milan, Barcelone, Bonn, 1992. p 186.
- **SARGI L.**, "Contribution à l'étude de la potencialisation de photoluminescence par inclusion moléculaire et transfert d'énergie à l'état excité. Application à la détection en chromatographie liquide". *Thèse d'Etat, Université Paris-Sud, Série N°240*, (1992).
- **SAWICKI E. and SAWICKI C.R.**, "Aldéhydes : Photometric analysis". Vol.2, Academic, London, 1975, p.264.
- **SAWICKI E., STANLEY T.W. and JOHNSON H.**, "Comparison of spectrophotometric and spectrophotofluorometric methods for the determination of malonaldehyde". *Anal.Chem.*, (1963), **35**, 199-205.
- **SCHALL R. and TENOSO H.**, "Alternatives to radioimmunoassay : labels and methods". *Clin.Chem.*, (1981), **27**, 1157-1164.
- **SCHIAVELLO A. and CINGOLANI E.**, "Ricerche sui benzopironi. Sintesi e proprietà di alcune 4-formilcumarine". *Gazz.Chim.Ital.*, (1951), **81**, 717-721.
- **SCHULMAN La DONNE H., PELKA H., and REINES S.A.**, "Attachment of protein affinity-labeling reagents of variable length and amino acid specificity to E.coli tRNA^{FMet}". *Nucleic Acids Res.*, (1981), **9**, 1203-1217.

- **SECRIST J.A., BARRIO J.R. and LEONARD N.J.**, "Attachment of fluorescent label to 4-thiouracil and 4-thiouridine". *Biochem.Biophys.Res.Com.*, (1971), **45**, 1262-1270.

- **SEILLER N. and DEMISCH L.**, "Handbook of derivatives for chromatography". K.Blau and G.S.King (Ed), Heyden and Sons, London/Philadelphia, P.A./Rheine, 1978, p.346.

- **SELIM S.**, "Separation and quantitative determination of traces of carbonyl compounds as their 2,4-dinitrophenylhydrazones by high-pressure liquid chromatography". *J.Chromatogr.*, (1977), **136**, 271-277.

- **SELISKAR C.J. and BRAND L.**, "Electronic spectra of 2-aminonaphthalene-6-sulfonate and related molecules. 1. General properties and excited-state reactions". *J.Am.Chem.Soc.*, (1971a), **93**, 5405-5414.

- **SELISKAR C.J. and BRAND L.**, "Electronic spectra of 2-aminonaphthalene-6-sulfonate and related molecules. 2. Effects of solvent medium on the absorption and fluorescence spectra". *J.Am.Chem.Soc.*, (1971b), **93**, 5414-5420.

- **SEPANIAK M.J.**, "The clinical use of laser-excited fluorimetry". *Clin.Chem.*, (1985), **31**, 671-678.

- **SETO H. and OHKUBO T.**, "Determination of a guanosine-malonaldehyde adduct in urine by high-performance liquid chromatography with a thiobarbituric acid reaction detector". *J.Chromatogr.*, (1991), **570**, 301-307.

- **SHARA M.A., DICKSON P.H., BAGCHI D. and STOHS S.J.**, "Excretion of formaldehyde, malondialdehyde, acetaldehyde and acetone in the urine of rats in response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, paraquat, endrin and carbon tetrachloride". *J.Chromatogr.*, (1992), **576**, 221-233.

- **SIU G.M. and DRAPER H.H.**, "Metabolism of malonaldehyde in vivo and in vitro". *Lipids*, (1982), **17**, 349-355.

- **SNINI A., FAHIMI A., MOULOUGUI Z., DELMAS M. and GASET A.**, "Separation and preparative isolation of phenolic dialdehydes by on-line over pressured layer chromatography". *J.Chromatogr.*, (1992), **590**, 369-372.

- **SONOKI S., TANAKA Y., HISAMATSU S. and KOBAYASHI T.**, "High-performance liquid chromatographic analysis of fluorescent derivatives of adenine and adenosine and its nucleotides. Optimization of derivatization with chloroacetaldehyde and chromatographic procedures". *J.Chromatogr.*, (1989), **475**, 311-319.
- **STEINSCHNEIDER A.**, "Effect of methylamine on periodate-oxidized adenosine 5'-phosphate". *Biochemistry*, (1971), **10**, 173-178.
- **STERNSON L.A.**, "Chemical derivatization in analytical chemistry". R.W.Frei and J.F.Lawrence (Ed), Plenum Press, New York/London, 1981, p.127.
- **STONE K., KSEBATI M.B. and MARNETT L.J.**, "Investigation of the adducts formed by reaction of malondialdehyde with adenosine". *Chem.Res.Toxicol.*, (1990a), **3**, 33-38.
- **STONE K., UZIEBLO A. and MARNETT L.J.**, "Studies of the reaction of malondialdehyde with cytosine nucleosides". *Chem.Res.Toxicol.*, (1990b), **3**, 467-472.
- **SUMMERFIELD F.W. and TAPPEL AL.L.**, "Enzymatic synthesis of malonaldehyde". *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, (1978), **82**, 547-552.
- **SWAIN C.G. and SCOTT C.B.**, "Quantitative correlation of relative rates. Comparison of hydroxide ion with other nucleophilic reagents toward alkyl halides, esters, epoxides and acyl halides". *J.Am.Chem.Soc.*, (1953), **75**, 141-147.
- **SWAIN C.G.**, "Substituent and solvent effects on chemical reactivity". *J.Org.Chem.*, (1984), **49**, 2005-2010.
- **SWAIN C.G., SWAIN M.S., POWEL A.L. and ALUNNI S.**, "Solvent effects on chemical reactivity. Evaluation of anion and cation solvation components". *J.Am.Chem.Soc.*, (1983a), **105**, 502-513.
- **SWAIN C.G., UNGER S.H., ROSENQUIST N.R. and SWAIN M.S.**, "Substituent effects on chemical reactivity. Improved evaluation of field and resonance components". *J.Am.Chem.Soc.*, (1983b), **105**, 492-502.
- **TABLES SCIENTIFIQUES CIBA GEIGY (DOCUMENTA GEIGY SCIENTIFIC TABLES)** Sixth edition, Ed., KONRAD DIEM, (1962), p.314.

- **TAFT R.W. and KAMLET M.J.**, "The solvatochromic comparison method. 2. The α scale of solvent hydrogen-bond donor (HBD) acidities". *J.Am.Chem.Soc.*, (1976), **98**, 2886-2894.

- **TAFT R.W., ABOUD J.L. and KAMLET M.J.**, "Linear solvation energie relationships. 28. An analysis of Swain's solvent acidity and basicity scales". *J.Org.Chem.*, (1984), **49**, 2001-2005.

- **TAKADATE A., TAHARA T., FUJINO H. and GOYA S.**, "Synthesis and properties of 4-diazomethyl-7 methoxycoumarin as a new fluorescent labelling reagent for alcohols and carboxylic acids". *Chem.Pharm.Bull.*, (1982), **30**, 4120-4125.

- **TAKEDA M., MAEDA M. and TSUJI A.**, "Fluorescence high-performance liquid chromatography of reducing sugars using Dns-hydrazine as a pre-labelling reagent". *J.Chromatogr.*, (1982), **244**, 347-355.

- **TAMURA H. and SHIBAMOTO T.**, "Gas chromatographic analysis of malonaldehyde and 4-hydroxy-2-(E)-nonenal produced from arachidonic acid and linoleic acid in a lipid peroxidation model system". *Lipids*, (1991), **26**, 170-173.

- **THE T.H. and FELTKAMP T.E.W.**, "Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies : I. Experiments on the conditions of conjugation". *Immunology*, (1970), **18**, 865-873.

- **THERASSE J. and LEMONNIER F.**, "Determination of plasma lipoperoxides by high-performance liquid chromatography". *J.Chromatogr.*, (1987), **413**, 237-241.

- **THOMAS D.W., VAN KUIJK F.J.G.M., DRATZ E.A. and STEPHENS R.J.**, "Quantitative determination of hydroxy fatty acids as an indicator of in vivo lipid peroxidation : gas chromatography-mass spectrometry methods". *Anal.Biochem.*, (1991), **198**, 104-111.

- **TOD M., BIAREZ O., NICOLAS P. and PETITJEAN O.**, "Sensitive determination of josamycin and rokitamycin in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection". *J.Chromatogr.*, (1992), **575**, 171-176.

- **TOD M.**, "Détection par chimiluminescence en chromatographie liquide de molécules greffées par des réactifs coumariniques et excitées par des esters oxaliques". *Thèse d'Etat, Université Paris-Sud, Série N°138*, (1990).

- **TOD M., FARINOTTI R., GAURY I. and MAHUZIER G.**, "Analytical implications of luminescence parameters in liquid chromatography. Applications to aminocoumarins in the peroxyoxalate chemiluminescent reaction". *Anal.Chim.Acta*, (1989), **217**, 11-21.
- **TOD M., LEGENDRE J.Y., CHALOM J., KOUWATLI H., POULOU M., FARINOTTI R. and MAHUZIER G.**, "Primary and secondary amine derivatization with luminarins 1 and 2 : separation by liquid chromatography with peroxyoxalate chemiluminescence detection". *J.Chromatogr.*, (1992), **594**, 386-391.
- **TOD M., PREVOT M., CHALOM J., FARINOTTI R. and MAHUZIER G.**, "Luminarin 4 as a labelling reagent for carboxylic acids in liquid chromatography with peroxyoxalate chemiluminescence detection". *J.Chromatogr.*, (1991), **542**, 295-306.
- **TOD M., PREVOT M., POULOU M., FARINOTTI R., CHALOM J. and MAHUZIER G.**, "Chromatographic and luminescence properties of a 7-aminocoumarin derivative with peroxyoxalate chemiexcitation". *Anal.Chim.Acta*, (1989), **223**, 309-311.
- **TOMASSONE R., LESQUOY E. and MILLIER C.**, "In la régression". Masson Paris, (1983).
- **TOMITA M., HATTA Y., KAWAI S. and OKUYAMA T.**, "Determination of free malonaldehyde by gas chromatography with an electron-capture detector". *J.Chromatogr.*, (1990a), **526**, 174-179.
- **TOMITA M., KAWAI S. and OKUYAMA T.**, "Determination of malonaldehyde in oxidized biological materials by high-performance liquid chromatography". *J.Chromatogr.*, (1990c), **515**, 391-397.
- **TOMITA M., OKUYAMA T., WATANABE S. and KAWAI S.**, "Free malondialdehyde levels in the urine of rats intoxicated with paraquat". *Arch.Toxicol.*, (1990b), **64**, 590-593.
- **TRAINCARD F.**, "L'utilisation des sondes froides dans l'aide au diagnostic". *ISB*, (1988), **14**, 173-177.

- **TRAORE F., FARINOTTI R. and MAHUZIER G.**, "Determination of malonaldehyde by coupled high-performance liquid chromatography-spectrofluorimetry after derivatization with luminarin 3". *J.Chromatogr.*, (1993), **648**, 111-118.

- **TRAORE F., PIANETTI G.A., DALLERY L., TOD M., CHALOM J., FARINOTTI R. and MAHUZIER G.**, "Determination of picomole amounts of carbonyls as luminarin hydrazones by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection". *Chromatographia*, (1993), **36**, 96-104.

- **TRAORE F., TOD M., CHALOM J., FARINOTTI R. and MAHUZIER G.**, "¹H, ⁵H, ¹¹H-[1] benzopyrano [6,7,8-ij] quinolizine-9-acetic acid 2,3,6,7-tetrahydro-11-oxohydrazide fluorogenic reagent for liquid chromatographic determination of aldehydes and ketones". *Anal.Chim.Acta*, (1992), **269**, 211-222.

- **UCHIYAMA M. and MIHARA M.**, "Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test". *Anal.Biochem.*, (1978), **86**, 271-278.

- **UENO K. and UMEDA T.**, "Electrochemical and chromatographic properties of selected hydrazine and hydrazide derivatives of carbonyl compounds". *J.Chromatogr.*, (1991), **585**, 225-231.

- **UMANO K., DENNIS K.J. and SHIBAMOTO T.**, "Analysis of free malondialdehyde in photoirradiated corn oil and beef fat via a pyrazole derivative". *Lipids*, (1988), **23**, 811-814.

- **UZU S., KANDA S., IMAI K., NAKASHIMA K. and AKIYAMA S.**, "Fluorogenic reagents : 4-aminosulphonyl-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazole, 4-(N,N,-dimethylaminosulphonyl)-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazole and 4-hydrazino-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole hydrazine for aldehydes and ketones". *Analyst*, (1990), **115**, 1477-1482.

- **VARGA-PUCHONY V.Z., HLAVAY J., PETRÒ-TURCZA M. and SZÀRFÖLDI-SZALMA I.**, "Separation of saturated and unsaturated aldehyde and ketone 2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives by reversed-phase high-performance liquid chromatography". *J.Chromatogr.*, (1980), **193**, 432-436.

- **VAZQUEZ M.L., CEPEDA A., PROGNON P., BLAIS J. and MAHUZIER G.**, "Cyclodextrins as modifiers of the luminescence characteristics of aflatoxins". *Anal.Chim.Acta*, (1991), **255**, 343-350.

- **WADE C.R. and VAN RIJ A.M.**, "In vivo lipid peroxidation in man as measured by the respiratory excretion of ethane, pentane, and other low-molecular-weight hydrocarbons". *Anal.Biochem.*, (1985), **150**, 1-7.

- **WADE C.R., JACKSON P.G. and VAN RIJ A.M.**, "Quantitative of malonaldehyde (MDA) in plasma, by ion-pairing reverse phase high-performance liquid chromatography". *Biochem.Med.*, (1985), **33**, 291-296.

- **WAGNER R.B. and ZOOK H.D.**, "Synthetic organic chemistry". John Wiley and Sons, Inc., Ed., (1965), p.283.

- **WEBER G. and FARRIS F.J.**, "Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe : 6-propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene". *Biochemistry*, (1979), **18**, 3075-3078.

- **WEBER G.F.**, "The measurement of oxygen-derived free radicals and related substances in medicine". *J.Clin.Chem.Clin.Biochem.*, (1990), **28**, 569-603.

- **WEINBERGER R., KOZIOL T. and MILLINGTON G.**, "Improved dansylation procedure for the determination of ketosteroids by liquid chromatography". *Chromatographia*, (1984), **19**, 452-456.

- **WHITE J.W.**, "Methods for determining carbohydrates, hydroxymethylfurfural, and proline in honey : collaborative study". *J.Assoc.Off.Anal.Chem.*, (1979b), **62**, 515-526.

- **WHITE J.W.**, "Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey". *J.Assoc.Off.Anal.Chem.*, (1979a), **62**, 509-514.

- **WILCHEK M. and BAYER E.A.**, "Labeling glycoconjugates with hydrazide reagents". *Methods Enzymol.*, (1987), **138**, 429-442

- **WONG S.H.Y., KNIGHT J.A., HOPFER S.M., ZAHARIA O., LEACH Jr. C.N. and SUNDERMAN Jr. F.W.**, "Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct". *Clin.Chem.*, (1987), **33**, 214-220.

- **YAGI K.**, "A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma". *Biochem.Med.*, (1976), **15**, 212-216.

- **YAMAGUCHI M., IWATA T., INOUE K., HARA S. and NAKAMURA M.**, "6,7-Dimethoxy-1-methyl-2(1H)-quinoxalinone-3-propionylcarboxylic acid hydrazide : a highly sensitive fluorescence derivatization reagent for carboxylic acids in high-performance liquid chromatography". *Analyst*, (1990), **115**, 1363-1366.
- **YASUHARA A. and SHIBAMOTO T.**, "Determination of volatile aliphatic aldehydes in the headspace of heated food oils by derivatization with 2-aminoethanethiol". *J.Chromatogr.*, (1991), **547**, 291-298.
- **YOSHIDA S. and HIROSE S.**, "Use of 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin for derivatization of pyrimidine compounds in serum analysed by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection". *J.Chromatogr.*, (1986), **383**, 61-68.
- **YOSHIOKA M., NISHIDATE K., IIZUKA H., NAKAMURA A., ELMERZABANI M.M. and TAMURA Z.**, "Sensitive fluorimetry of adenine-containing compounds with high-performance liquid chromatography". *J.Chromatogr.*, (1984), **309**, 63-71.
- **YU L.W., LATRIANO L., DUNCAN S., HARTWICK R.A. and WITZ G.**, "High-performance liquid chromatography analysis of the thiobarbituric acid adducts of malonaldehyde and trans, trans-muconaldehyde". *Anal.Biochem.*, (1986), **156**, 326-333.
- **ZHANG Y., GEIGER J.D. and LAUTT W.W.**, "Improved high-performance liquid chromatographic-fluorometric assay for measurement of adenosine in plasma". *Am.J.Physiol.*, (*Gastrointest-Liver Physiol.* 23), (1991), **260**, G658-G664.

ANNEXES

ANNEXE I

1 - Synthèse de la luminaire 3

* Méthode A

• Synthèse de l'ester méthylique de l'acide quinolizinocoumarinyl

9-acétique

Mélanger, 2,12 g (11,66 mmoles) 8-hydroxy julolidine avec 2,03 g (11,66 mmoles) d'ester méthylique 3-oxo glutarate et 1,71 g (12,57 mmoles) de chlorure de zinc anhydre, dans 6 ml d'éthanol anhydre. Porter à reflux pendant 24 heures, sous agitation, à l'abri de l'humidité. Refroidir, verser la solution dans 200 ml d'eau. Extraire par 200 ml puis 100 ml d'acétate d'éthyle. Laver la phase organique à l'eau, dessécher sur sulfate de magnésium anhydre puis évaporer à sec sous pression réduite. Le produit est recristallisé dans 5 ml d'acétate d'éthyle. Rendement : 60%.

• Synthèse de la luminaire 3 par condensation de l'ester méthylique de l'acide quinolizinocoumarinyl 9-acétique avec l'hydrazine

Mélanger sous agitation, 5 g (15,97 mmoles) d'ester méthylique de l'acide quinolizinocoumarinyl 9-acétique, avec 8 ml (80 mmoles) d'hydrate d'hydrazine dans 100 ml de méthanol pendant 4 heures. Recueillir le précipité formé par filtration, laver par 10 ml de méthanol puis 10 ml de dichlorométhane. Dessécher sous vide. Rendement : 77%.

*** Méthode B**

• **Synthèse de l'ester éthylique de l'acide quinolizinocoumarinyl 9-acétique**

La synthèse se déroule exactement comme dans le cas de l'ester méthylique de l'acide quinolizinocoumarinyl 9-acétique, sauf que ici, on utilise 2,36 g (11,66 mmoles) de 3-oxo glutarate d'éthyle. Le rendement est de 56%.

• **Synthèse de l'acide quinolizinocoumarinyl 9-acétique**

Hydrolyser 2 g (6,12 mmoles) de l'ester quinolizinocoumarinyl 9-acétique par 42 ml de solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 1,2% (m/v) en présence de 40 ml de méthanol pour assurer la dissolution, en 1 heure à 45°C, à l'abri de la lumière. Laisser refroidir, extraire par 50 puis 40 ml de chloroforme. Acidifier la phase aqueuse par 16 ml d'acide chlorhydrique 3 N. Laisser agiter pendant 15 minutes environ. Ramener le pH à 6,5 par 13 ml d'hydroxyde de sodium 2,5 N. Filtrer le précipité jaune formé, rincer à l'eau puis sécher. Rendement : 90%.

• **Synthèse de la luminarine 1**

Dissoudre 1 g (3,34 mmoles) d'acide quinolizinocoumarinyl 9-acétique dans 8,6 ml de diméthylformamide (DMF) préalablement desséché sur tamis moléculaire 3 Å. Ajouter 384 mg (3,34 mmoles) d'hydroxysuccinimide et 823 mg (3,96 mmoles) de dicyclohexylcarbodiimide. Placer une garde de chlorure de calcium et agiter pendant 1 heure à 0°C, puis 1 heure à température ambiante, à l'abri de la lumière. Filtrer afin d'éliminer le précipité de dicyclohexylurée et laver avec 5 ml de DMF. Ajouter 35 ml d'eau glacée sur les eaux mères. Il se forme un précipité jaune marron prenant en masse. Filtrer et laver par 5 ml d'eau glacée, puis dessécher. Le produit est recristallisé dans 6 ml d'acétate d'éthyle. Rendement : 66%.

• Synthèse de la luminarine 3 à partir de la luminarine 1

Dissoudre 1 g (2,53 mmoles) de luminarine 1 dans 2 ml (20 mmoles) d'hydrate d'hydrazine à 50% minimum . Laisser agiter pendant 1 heure, puis diluer avec 4 ml d'eau. Il se forme un précipité jaune. Agiter 1 heure de plus, puis filtrer et rincer le précipité à l'eau. Rendement : 88%.

* Contrôles et identités

- CCM : silice C18 (KC 18F, Whatman)
phase éluante (ETOH/H₂O/NH₄OH, 75/25/5, v/v/v) :
R_f ≈ 0,80
- CCM : silice normale (K 6F, Whatman)
phase éluante Butanol-1/acide acétique/eau (60/20/20,
v/v/v) : R_f ≈ 0,64
- SM (IC) : m/z 314 (MH)⁺
- SM (IE) : m/z et (abondance relative en %)
313 (4,51); 282 (1,14); 255 (4,24); 254 (1,77);
226 (2,11); 224 (28,23); 143 (31,38); 111 (1,70);
99 (38,55); 83 (49,07); 70 (19,20); 57 (28,04);
56 (100,00).
- RMN du ¹H (DMSO D₆) δ ppm :
9,28 (1H, s, H-3')
7,15 (1H, s, H-8)
5,90 (1H, s, H-10)
4,28 (2H, s, H-4')
3,47 (2H, s, H-1')
3,22 (4H, m, H-3 et H-5)

2,70 (4H, m, H-1 et H-7)

1,87 (4H, m, H-2 et H-6)

- RMN du ^{13}C (DMSO D_6) δ ppm :

167,3 (C-2')

107,3 (C-B)

160,7 (C-11)

105,5 (C-12b)

150,9 (C-12a)

49,1 et 48,5 (C-3 ou C-5)

150,5 (C-12c)

36,7 (C-1)

145,4 (C-9)

27,0 (C-7)

122,1 (C-8)

20,9 (C-6)

117,5 (C-A)

20,0 (C-2)

107,9 (C-10)

19,9 (C-1)

- Analyse élémentaire pour $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$:

%Calculé : C 65,2

H 6,1

N 13,4

%Trouvé : C 65,1

H 6,1

N 13,4

2 - Synthèse de la luminarine 12

* Méthode

• Etape 1 : synthèse de l'ester monobenzylique de l'acide

3,6,9-trioxaoctandioïque

Dissoudre, 88,9 g (400 mmoles) d'acide trioxaocandioïque (préalablement séché) et 10,8 g (100 mmoles) d'alcool benzylique, dans 740 ml de dichlorométhane. Ajouter en refroidissant 20,6 g (100 mmoles) de dicyclohexylcarbodiimide (DCCI) et 0,7 g de diméthyl amino pyridine (DMAP). Agiter 2 heures à la température ambiante, filtrer le précipité formé (dicyclohexylurée), puis concentrer la phase organique sous vide. Reprendre le résidu dans 400 ml de toluène. Eliminer le précipité formé (formation de sous produit dicyclohexylurée). Laver la phase organique à l'acide chlorhydrique, puis à l'eau et à une solution aqueuse diluée de bicarbonate de sodium. L'ester monobenzylique de l'acide 3,6,9-trioxaocandioïque passe dans la phase aqueuse bicarbonatée. Acidifier cette dernière solution à pH 2,0, puis extraire par 3 fois 150 ml de dichlorométhane. Evaporer la phase organique dichloroformique à sec et sous vide. On obtient un liquide visqueux jaune. Rendement : 38%.

Ce produit a été contrôlé par CCM sur silice normale (K 6F, Whatman) en utilisant comme phase éluante un mélange de : butanol-n/acide acétique/eau (60/20/20, v/v/v). La révélation a été faite en UV 254 nm ou par pulvérisation de vapeur d'iode ($R_f \approx 0,55$).

• Etape 2 : synthèse de l'imidazolide de l'ester monobenzylique de l'acide

3,6,9-trioxaocandioïque

Dissoudre 10 g (32 mmoles) de l'ester monobenzylique de l'acide 3,6,9-trioxaocandioïque dans 18 ml de dichlorométhane. Sécher sur tamis moléculaire.

Filter, puis introduire lentement 5,71 g (35 mmoles) de carbonyl diimidazole. Laisser agiter pendant 30 minutes.

• Etape 3 : synthèse de l'ester benzylique du 3,6,9-trioxaoctandioyl acétate d'éthyle

Dissoudre 5,04 g (35 mmoles) d'acide de Meldrum dans 18 ml de dichlorométhane anhydre. Laisser refroidir à 5°C et ajouter lentement 2,54 g (32 mmoles) de pyridine. Laisser agiter pendant 15 minutes, puis faire couler lentement la solution d'imidazolide préalablement préparée. Laisser agiter 1 heure à froid (0-5°C), puis 1 heure à température ambiante. Laver le milieu réactionnel avec 24 ml d'eau, puis avec 25 ml d'acide chlorhydrique 2,5 N et 25 ml d'eau. Evaporer à sec, reprendre le résidu dans 100 ml d'éthanol et porter au reflux durant 2 heures. Evaporer sous vide. On obtient le produit sous forme d'un liquide sirupeux orange. Purifier le produit par chromatographie sur colonne de silice (CH₂CL₂/THF, 90/10, v/v). Rendement : 39%.

Ce produit a été contrôlé par CCM sur silice normale K 6F Whatman (CH₂CL₂/THF, 95/5, v/v). La révélation est faite sous lampe UV 254 nm ou par pulvérisation de vapeur d'iode ($R_f \approx 0,40$).

• Etape 4 : synthèse de l'ester éthylique de la luminarine 12

Dissoudre successivement, 4,6 g (11,77 mmoles) de 3,6,9-trioxaoctandioyl acétate d'éthyle (β -cétoester), 2,14 g (11,77 mmoles) de 8-hydroxy julolidine, et 1,85 g (13,60 mmoles) de chlorure de zinc, dans 13,5 ml d'éthanol. Portez au reflux durant 24 heures à l'abri de la lumière. Hydrolyser dans un mélange de 168 ml d'eau et 450 ml de dichlorométhane. Séparer la phase organique, laver avec 2 fois 45 ml d'eau, puis sécher et évaporer à sec. Purifier le résidu par chromatographie sur une colonne de silice (CH₂CL₂/THF, 95/5, v/v). Rendement : 60%.

Ce produit a été contrôlé par CCM sur silice normale K 6F, Whatman (CH₂CL₂/THF, 95/5, v/v), avec une révélation à l'UV 254 et 365 nms ($R_f \approx 0,35$).

. Etape 5 : synthèse de la luminarine 12

Dissoudre 2 g (4,5 mmoles) de l'ester éthylique de la luminarine 12 dans 2,52 ml (25,2 mmoles) d'hydrate d'hydrazine (50% minimum) et 40 ml d'isopropanol. Agiter 24 heures à température ambiante, à l'abri de la lumière. Reprendre par un mélange de 40 ml d'eau et 40 ml de dichlorométhane. Séparer la phase organique et concentrer à sec.

Purifier successivement par chromatographie sur 2 colonnes de silice :

- colonne 1 (gradient CH_2Cl_2 pur puis $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MEOH}$, 95/5, v/v)
- colonne 2 (gradient CH_2Cl_2 puis $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MEOH}$, 98/2, v/v suivi de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MEOH}$, 95/5, v/v).

On obtient un produit liquide jaunâtre qui est conservé en solution dans du diméthylsulphoxyde (DMSO). Rendement : 35%.

* Contrôles et identités

- CCM : silice normale (K 6F, Whatman)
phase éluante $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MEOH}$ (95/5, v/v) : $R_f \approx 0,40$
- SM (IC) : m/z 432 (MH)⁺
- SM (IE) : m/z et (abondance relative en %)
431 (39,42); 400 (1,73); 359 (5,11); 270 (45,99);
255 (100,00); 254 (40,15); 242 (43,07); 226 (33,58);
210 (2,92); 198 (10,95); 196 (10,22); 98 (2,92);
73 (10,22); 59 (10,22); 44 (8,03).

3 - Synthèse de la luminarine 11

La synthèse se déroule exactement comme pour la luminarine 12, en remplaçant l'acide 3,6,9-trioxaoctandioïque par l'acide adipique (58,5 g soit 400 μ moles). Les principales étapes sont :

- synthèse de l'ester monobenzyle de l'acide adipique.
- synthèse de l'imidazolide de l'adipate de benzyle.
- synthèse de l'ester benzyle de l'adipate d'éthyle.
- synthèse de l'ester éthylique de la luminarine 11.
- synthèse de la luminarine 11 (Lu.11).

Il faut noter que la luminarine 11 cristallise dans l'isopropanol. Il convient alors de diluer le mélange avec un volume égale d'eau, puis filtrer le précipité et le rincer à l'eau pour éliminer l'excès d'hydrate d'hydrazine. Dissoudre dans un petit volume de dichlorométhane et purifier par chromatographie sur colonne de silice (gradient : CH_2CL_2 pur suivi de $\text{CH}_2\text{CL}_2/\text{THF}$, 90/10, v/v). Rendement : 45%.

* Contrôles et identités

- SM (IC) : m/z 356 (MH)⁺
 - SM (IE) : m/z et (abondance relative en %)
 355 (86,15); 324 (1,25); 296 (5,04); 282 (12,85);
 268 (63,48); 255 (100,00); 254 (20,91); 242 (31,99);
 240 (13,60); 227 (17,88); 226 (16,12).
 - RMN du ^1H (DMSO D_6) δ ppm :
 8,94 (1H, H-6')
 7,13 (1H, s, H-8)
 5,82 (1H, s, H-10)
-

4,15 (2H, s, H-7')

3,22 (4H, m, H-3 et H-5)

2,70 (6H, m, H-1, H-7 et H-1')

2,05 (2H, m, H-4')

1,87 (4H, m, H-2 et H-6)

1,55 (4H, m, H-2' et H-3')

- RMN du ^{13}C (DMSO D_6) δ ppm :

171,3 (C-5')

105,6 (C-12b)

160,8 (C-11)

49,1 et 48,5 (C-3 ou C-5)

157,0 (C-12a)

33,0 et 30,4 (C-1' ou C-4')

150,6 (C-12c)

27,8 et 24,9 (C-2' ou C-3')

145,4 (C-9)

26,9 (C-7)

121,7 (C-8)

20,9 (C-6)

117,7 (C-A)

20,0 (C-2)

107,1 (C-B)

19,9 (C-1)

105,9 (C-10)

- Analyse élémentaire pour $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3$:

%Calculé : C 67,6

H 7,1

N 11,8

%Trouvé : C 67,5

H 7,1

N 11,7

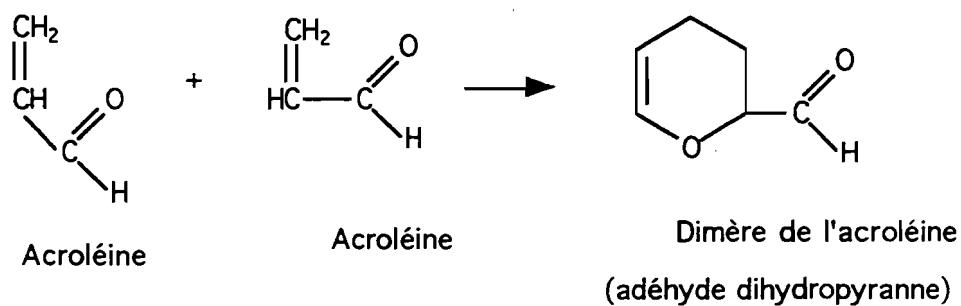
4 - Contrôles et identités des dérivés de luminarine 3, luminarine 11 et luminarine 12

Exceptés les dérivés de luminarine 3-malonaldéhyde, -méthylmalonaldéhyde et -acroléine dont les méthodes de synthèse sont décrites dans l'article 3, les autres dérivés dont nous décrivons les caractéristiques spectrales et les temps de rétention (voir Tableau ci-dessous) ont été synthétisés comme suit :

Dans un tube à hémolyse de 5 ml, introduire 200 µl de solution acide sulfurique (0,1 M) contenant 100 nmoles du produit à dériver, puis 10 µl de solution de luminarine dans le DMSO (10^{-2} M) soit 100 nmoles de luminarine. Mélanger et laisser en contact pendant 60 min (aldéhydes) ou 240 min (cétones) à l'abri de la lumière et à température ambiante. Extraire par le dichlorométhane (1 ml). Evaporer à sec la phase organique. Reprendre le résidu d'évaporation par 200 µl de dichlorométhane. Diluer si nécessaire avant de procéder à la chromatographie semi-préparative sur colonne en silice vierge Nucléosil-5 µm (250 x 4,6 mm) de la société INTERCHIM, France.

Les phases mobiles utilisées sont décrites dans le tableau II de l'article 2.

Dans le cas particulier de la réaction de l'acroléine avec la luminarine 3, il se forme un deuxième produit que nous avons appelé "acroléine dimère". En effet, l'acroléine peut être engagée dans plusieurs types de réactions en milieu aqueux dont la principale est la polymérisation [CHAMPEIX et CATILINA (1967)]. Cette réaction se manifeste spontanément et s'accélère avec l'élévation de la température, l'action de la lumière, de certains produits chimiques alcalins en tout premier lieu, acides, sels métalliques activés. La réaction de formation de ce dimère est du type :



La présence du pic moléculaire à $m/z = 408$ $(MH)^+$ en ionisation chimique à l'ammoniac, ainsi que la CCM ont permis de confirmer l'existence du dérivé luminarine 3 - acroléine dimère.

- CCM : silice normale (K 6F, Whatman)
- phase éluante CH_2Cl_2/THF (60/40, v/v) : $R_f \approx 0,60$

Luminarine 3 - malonaldéhyde

- CCM : silice normale (K 6F, Whatman)
phase éluante CH₂CL₂/THF (60/40, v/v) : R_f ≈ 0,45
- SM (IC) : m/z 368 (MH)⁺
- SM (IE) : m/z et (abondance relative en %)
367 (19,09); 349 (5,54); 282 (8,77); 281 (8,72);
256 (9,02); 255 (48,96); 254 (20,53); 227 (10,87);
226 (17,13); 68 (100,00); 67 (13,05); 44 (34,98).
- RMN du ¹H (DMSO D₆) δ ppm :
7,27 (1H, t, H-5', J_{H-5'}, H-6'a et J_{H-5'}, H-6'b = 1,4 Hz)
7,05 (1H, s, H-8)
6,67 (1H, d, OH-7', J_{OH-7',H-7'} = 5,7 Hz)
5,89 (1H, s, H-10)
5,77 (1H, m, H-7', J_{H-7'}, H-6'b = 1,6 Hz, J_{H-7'},
H-6'a = 5,8 Hz, J_{H-7'}, OH-7' = 5,7 Hz)
4,01 (2H, système AB, H-1', J_{AB} = 15,5 Hz)
3,23 (4H, m, H-3 et H-5)
3,11 (1H, qd, H-6'a, J_{H-6'a}, H-6'b = -19,1 Hz)
2,68 (4H, m, H-1 et H-7)
2,65 (1H, dt, H-6'b, J_{H-6'a}, H-6'b, J_{H-6'b}, H-5',
J_{H-6'b}, H-7')
1,87 (4H, m, H-2 et H-6)
- RMN du ¹³C (DMSO D₆) δ ppm :
166,3 (C-2') 107,4 (C-B)
160,7 (C-11) 105,5 (C-12b)
151,0 (C-12a) 76,2 (C-7')
150,5 (C-12c) 49,1 et 48,5 (C-3 ou C-5)

148,5 (C-5')	42,6 (C-6')
145,5 (C-9)	27,0 (C-7)
122,1 (C-8)	20,8 (C-6)
117,6 (C-A)	20,0 (C-2)
107,8 (C-10)	19,9 (C-1)

- Analyse élémentaire pour $C_{20}H_{21}N_3O_4$:

%Calculé : C 65,40	H 5,72	N 11,44
%Trouvé : C 65,41	H 5,81	N 11,40

Luminarine 3 - méthylmalonaldéhyde

- CCM : silice normale (K 6F, Whatman)
phase éluante CH₂CL₂/THF (60/40, v/v) : R_f ≈ 0,69
- SM (IC) : m/z 382 (MH)⁺
- SM (IE) : m/z et (abondance relative en %)
381 (29,74); 363 (11,42); 282 (17,49); 281 (20,52);
256 (11,75); 255 (65,34); 254 (28,84); 227 (14,42);
226 (23,09); 82 (85,99); 81 (100,00); 57 (26,76);
56 (5,99); 55 (17,25); 54 (36,92); 44 (30,62); 43 (12,02).
- RMN du ¹H (DMSO D₆) δ ppm :
diastéréoisomère majoritaire 70% (CH₃ et H-7' du même côté)
7,26 (1H, d, H-5', J_{H-5'}, H-6' = 1,6 Hz)
7,01 (1H, s, H-8)
6,69 (1H, d, OH-7', J_{OH-7'}, H-7' = 5,7 Hz)
5,89 (1H, s, H-10)
5,32 (1H, dd, H-7', J_{H-7'}, H-6' = 1,5 Hz)
4,01 (2H, m, H-1')
3,23 (5H, m, H-3 et H-5 et H-6')
2,69 (4H, m, H-1 et H-7)
1,87 (4H, m, H-2 et H-6)
1,03 (3H, d, CH₃-6', J_{CH₃-6'}, H-6' = 7,6 Hz)
diastéréoisomère minoritaire 30% (CH₃ et OH du même côté)
7,13 (1H, d, H-5', J_{H-5'}, H-6' = 1,2 Hz)
6,87 (1H, s, H-8)
6,56 (1H, d, OH-7', J_{OH-7'}, H-7' = 6,2 Hz)
5,89 (1H, s, H-10)
5,64 (1H, dd, H-7', J_{H-7'}, H-6' = 7,7 Hz)

4,01 (2H, m, H-1')

3,23 (5H, m, H-3, H-5 et H-6')

2,69 (4H, m, H-1 et H-7)

1,87 (4H, m, H-2 et H-6)

1,11 (3H, d, CH₃-6', J_{CH₃-6'}, H-6' = 7,6 Hz)

- RMN du ¹³C (DMSO D₆) δ ppm :

diastéréoisomère majoritaire 70% (CH₃ et H-7' du même côté)

166,7 (C-2')	105,5 (C-12b)
160,6 (C-11)	82,8 (C-7')
153,0 (C-12a)	49,3 (C-6')
151,0 (C-12c)	49,1 et 48,5 (C-3 ou C-5)
150,4 (C-5')	36,6 (C-1')
145,5 (C-9)	27,0 (C-7)
122,0 (C-8)	20,8 (C-6)
117,6 (C-A)	20,0 (C-2)
107,9 (C-10)	19,9 (C-1)
107,4 (C-B)	14,1 (C-6'-CH ₃)

- Analyse élémentaire pour C₂₁H₂₃N₃O₄ :

%Calculé : C 66,14	H 6,04	N 11,02
%Trouvé : C 66,06	H 6,18	N 10,97

Luminarine 3 - acroléine

- CCM : silice normale (K 6F, Whatman)
phase éluante CH₂CL₂/THF (60/40, v/v) : R_f ≈ 0,74
- SM (IC) : m/z 352 (MH)⁺
- RMN du ¹H (DMSO D₆) δ ppm :

diastéréoisomère majoritaire 64%

- 11,42 (1H, s, H-3')
- 7,71 (1H, d, H-5', J_{H-5', H-6'} = 9,4 Hz)
- 7,02 (1H, s, H-8')
- 6,45 (1H, m, H-6')
- 5,90 (1H, s, H-10)
- 5,70 (2H, m, H-7')
- 3,97 (2H, m, H-1')
- 3,23 (4H, m, H-3 et H-5)
- 2,70 (4H, m, H-1 et H-7)
- 1,89 (4H, m, H-2 et H-6)
- 1,87 (4H, m, H-2 et H-6)

diastéréoisomère minoritaire 36%

- 11,49 (1H, s, H-3')
- 7,85 (1H, d, H-5', H-6' = 9,4 Hz)
- 7,12 (1H, s, H-8)
- 6,45 (1H, m, H-6')
- 5,94 (1H, s, H-10)
- 5,70 (2H, m, H-7')
- 3,64 (2H, s, H-1')
- 3,23 (4H, m, H-3 et H-5)
- 2,70 (4H, m, H-1 et H-7)

1,89 (4H, m, H-2 et H-6)
 - RMN du ^{13}C (DMSO D_6) δ ppm :

diastéréoisomère majoritaire 64%

170,1 (C-2')	108,3 (C-10)
160,6 (C-11)	107,5 (C-B)
151,1 (C-12a)	105,5 (C-12b)
150,8 (C-12c)	49,0 et 48,6 (C-3 ou C-5)
145,8 (C-5')	35,1 (C-1')
145,4 (C-9)	27,0 (C-7)
133,7 (C-6')	20,8 (C-6)
124,8 (C-7')	20,0 (C-2)
122,1 (C-8)	19,9 (C-1)
117,6 (C-A)	

- Analyse élémentaire pour $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3$:

%Calculé : C 68,38	H 5,98	N 11,97
%Trouvé : C 68,30	H 6,11	N 11,89

>

**Temps de rétention et caractéristiques spectrales des différents dérivés de
la luminarine 3**

Dérivés	t _r ^a (min)	CV ^b (%)	Ion moléculaire (MH) ⁺
Luminarine 3	9,65	0,64	314
Dérivé luminarine 3 :			
acroléine (minoritaire)	3,35	0,95	
acroléine (majoritaire)	4,02	0,95	352
acroléine dimère	7,72	2,27	408
formaldéhyde	10,05	0,74	326
diacétyl	3,26	0,40	382
éthylacétoacétaldéhyde	4,83	0,28	426
furfural	3,69	0,19	392
hydroxyméthylfurfural	7,26	0,47	421
acide	17,42	1,74	300
acétaldéhyde	9,47	0,53	340
acétylacétone linéaire	3,39	0,12	396
acétylacétone cyclique	4,75	0,72	378
acétoacétaldéhyde	4,70	0,32	364
acétone	4,33	0,86	354
succinaldéhyde	4,80	0,21	364
acétoïne	10,10	1,03	384
malonaldéhyde	8,26	0,46	368
méthylmalonaldéhyde	4,42	0,23	
(minoritaire)	4,87	0,32	382
méthylmalonaldéhyde	3,54	0,37	442
(majoritaire)	3,44	0,17	428
benzylidène acétone	16,94	2,63	-
cinnamaldéhyde	17,79	1,16	397
glycéraldéhyde			
acide acétoacétique			

^aTemps de rétention; ^bn = 6

**Temps de rétention et caractéristiques spectrales des différents dérivés de
la luminarine 11**

Dérivés	t_r (min)	CV ^a (%)	Ion moléculaire (MH) ⁺
Luminarine 11	7,56	0,36	356
Luminarine 11 : acétylacétone	8,80	1,86	420
malonaldéhyde	12,94	1,18	410
acide	17,75	1,36	-

^aTemps de rétention

^b_n = 6

Luminarine 3 - cytidine

- CCM : silice normale (K 6F, Whatman)
phase éluante Butanol-1/acide acétique/eau (60/20/20,
v/v/v) : $R_f \approx 0,48$
- SM (FAB) : m/z 555,2 (MH)⁺

Luminarine 3 - adénosine

- CCM : silice normale (K 6F, Whatman)
phase éluante Butanol-1/acide acétique/eau (60/20/20,
v/v/v) : $R_f \approx 0,60$
- SM (FAB) : m/z 579,2 (MH)⁺

ANNEXE II

2

1 - Mesure de rendements quantiques

Pour toutes les mesures effectuées, nous avons utilisé un spectrofluorimètre LS 50 luminometer (PERKIN-ELMER) dont la source lumineuse est une lampe xenon. Chaque spectre est enregistré et stocké dans un micro-ordinateur qui permet d'effectuer les corrections des spectres. L'absorbance de toutes les solutions mesurées a été inférieure à 0,03. Chaque rendement quantique calculé l'a été suivant la relation [PARKER et REES (1960)] :

$$(\phi_f)_s = F_s \varepsilon_q C_q (0,55) / F_q \varepsilon_s C_s$$

avec : ϕ_f = rendement quantique de fluorescence

F = surface corrigée de la bande de fluorescence exprimée en unités arbitraires

ε = coefficient d'absorption molaire ($l \text{ mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

C = concentration molaire

q = substance de référence

s = substance dont le rendement quantique est à déterminer

La substance de référence utilisée a été le sulfate de quinine dans l'acide sulfurique 0,05 M ($\phi_f = 0,546 \pm 0,05$). Les critères de choix de cette substance de référence ont été définies d'après DEMAS et CROSBY (1971), dont les principaux sont :

- une bonne stabilité en solution
- une faible susceptibilité aux effets d'inhibition de fluorescence dûs à l'action de l'oxygène
- une indépendance maximale vis à vis des conditions d'excitation
- un faible recouvrement des spectres d'excitation et d'émission

- un rendement quantique bien connu.

Une correction du rendement quantique a été systématiquement effectuée, pour tenir compte de l'indice de réfraction différent des solvants utilisés pour les luminarines et le sulfate de quinine, selon la formule :

$$(\phi f)_s \text{ corrigé} = (\phi f)_s n_s^2(\text{solvant}) / n_q^2(\text{eau})$$

Les coefficients d'absorption molaire ont été déterminés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible spectrometer Model 2100 (SHIMADZU) couplé à un enregistreur. Les différentes molécules étudiées ont été mises en solution dans différents solvants, dont les concentrations étaient ajustées pour que les absorbances mesurées sur un trajet optique de 1 cm soient comprises entre 0,5 et 1,5 unités d'absorbance. Les différentes valeurs de ϵ l'ont été selon la formule :

$$\epsilon (l \text{ mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}) = \text{Absorbance} / \text{Concentration molaire}$$

Avant de procéder aux différentes mesures de rendements quantiques, il nous a semblé nécessaire de vérifier le rendement quantique de la solution de sulfate de quinine dans l'acide sulfurique 0,05 M, ceci pour pallier d'éventuelles erreurs de mesure. Pour cela, deux solutions de sulfate de quinine ont été préparées : l'une dans l'acide sulfurique 0,05 M, et l'autre dans le même acide 10 fois plus concentré (0,5 M). Le rendement quantique du sulfate de quinine dans chacune des solutions a été mesuré par rapport à l'autre considérée comme référence. Les résultats des rendements quantiques et autres paramètres physiques mesurés ont été les suivants :

- sulfate de quinine dans l'acide sulfurique 0,05 M

λ_{ex} 347 nm; λ_{em} 447 nm; λ_{0-0} 390 nm; ϵ 1,29 l mole⁻¹ cm⁻¹;

ϕ_f 0,521

- sulfate de quinine dans l'acide sulfurique 0,5 M

λ_{ex} 347 nm; λ_{em} 447 nm; λ_{0-0} 392 nm; ϵ 1,24 l mole⁻¹ cm⁻¹;

ϕ_f 0,581

2 - Quelques propriétés physiques des solvants utilisés

Solvants	n^a	η^b	D^c
Cyclohexane	1,423	0,90	2,02
Diisopropyléther	1,365	0,38	3,90
Chloroforme	1,443	0,53	4,80
Acétate d'éthyle	1,370	0,43	6,00
Tétrahydrofurane	1,405	0,46	7,60
Dichlorométhane	1,421	0,41	8,90
Diméthylsulfoxyde	1,477	2,00	4,70
Diméthylformamide	1,428	0,80	36,70
Ethanol	1,359	1,08	24,60
Acétonitrile	1,341	0,34	37,5
Méthanol	1,326	0,54	32,7
Eau	1,333	0,89	80,00

^aIndice de réfraction à 25°C

^bViscosité à 25°C

^cConstante diélectrique

ANNEXE III

1 - Propriétés spectrales d'absorbance et de fluorescence de la luminarine 3 dans différents solvants

SOLVANTS Δf	λ_{\max} U.V (nm)	ϵ (10^4 l mole ⁻¹ cm ⁻¹)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	H (cm ⁻¹)	ϕ_f	S.F	$\nu'_a - \nu'_f$ (cm ⁻¹)
CYCLOHEXANE 0,001	374	1,52	375	420	2868	0,20	1,06	2857
DISOPROPYLETHER 0,145	377	2,15	377	424	2862	0,20	1,50	2940
CHLOROFORME 0,185	403	2,83	394	450	2463	0,22	2,53	3158
ACETATE D'ETHYLE 0,199	382	2,58	387	444	2853	0,98	8,85	3317
TETRAHYDROFURANE 0,209	383	2,71	388	443	2913	0,92	8,57	3200
DICHLOROMETHANE 0,218	399	3,06	399	456	2638	0,84	9,74	3133
DIMETHYLSULFOXYDE 0,260	396	2,46	394	464	2557	0,98	9,41	3829
DIMETHYLFORMAMIDE 0,276	392	2,47	393	459	2818	0,75	6,56	3659
ETHANOL* 0,290	398	2,45	397	475	2854	0,70	6,00	4136
ACETONITRILE 0,304	391	2,56	394	464	2863	0,74	6,61	3829
METHANOL 0,308	399	2,69	399	481	2429	0,60	6,65	4273
EAU 0,320	408	1,96	403	502	2316	0,45	3,81	4894

*Réabsorption de photons dans l'éthanol : $\epsilon = 3273$ l mole⁻¹ cm⁻¹

2 - Propriétés spectrales d'absorbance et de fluorescence de la luminarine 11 dans différents solvants

SOLVANTS Δf	λ_{\max} U.V (nm)	ϵ ($10^4 \text{ l mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	H (cm^{-1})	ϕ_f	S.F	$\nu_a - \nu_f$ (cm^{-1})
CYCLOHEXANE 0,001	365	-	365	412	3045	-	-	3125
DISOPROPYLETHER 0,145	368	3,05	368	416	2888	0,35	3,70	3135
CHLOROFORME 0,185	392	3,09	392	442	2518	0,32	3,93	2886
ACETATE D'ETHYLE 0,199	377	3,19	384	429	3012	0,98	10,37	2732
TETRAHYDROFURANE 0,209	378	3,07	382	428	2869	0,98	10,47	2814
DICHLOROMETHANE 0,218	389	3,49	389	443	2416	0,98	14,17	3134
DIMETHYLSULFOXYDE 0,260	391	2,81	391	455	2706	0,98	10,17	3597
DIMETHYLFORMAMIDE 0,276	388	2,82	388	450	2668	0,96	10,16	3551
ETHANOL* 0,290	395	3,06	394	468	2944	0,89	9,26	4013
ACETONITRILE 0,304	385	2,72	387	448	2756	0,93	9,17	3518
METHANOL 0,308	393	3,03	393	471	2937	0,82	8,45	4214
EAU 0,320	399	2,07	399	489	2736	0,67	5,06	4613

*Réabsorption de photons dans l'éthanol : $\epsilon = 3320 \text{ l mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

3 - Propriétés spectrales d'absorbance et de fluorescence de la luminarine 12 dans différents solvants

SOLVANTS Δf	λ_{\max} U.V (nm)	ϵ ($10^4 \text{ l mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	H (cm^{-1})	ϕ_f	S.F	$\nu'_a - \nu'_f$ (cm^{-1})
CYCLOHEXANE 0,001	-	-	-	-	-	-	-	-
DISOPROPYLETHER 0,145	376	3,26	381	441	3524	0,34	3,15	3571
CHLOROFORME 0,185	394	3,15	390	458	2779	0,50	5,67	3807
ACETATE D'ETHYLE 0,199	380	2,70	384	451	2978	0,80	7,24	3869
TETRAHYDROFURANE 0,209	381	2,80	382	451	3219	0,75	6,53	4005
DICHLOROMETHANE 0,218	391	3,33	393	459	2833	0,55	6,47	3659
DIMETHYLSULFOXYDE 0,260	392	2,82	392	474	2830	0,98	9,78	4413
DIMETHYLFORMAMIDE 0,276	389	2,56	392	474	2933	0,66	5,75	4413
ETHANOL* 0,290	395	2,50	393	490	2774	0,54	4,87	5037
ACETONITRILE 0,304	387	2,62	390	473	2911	0,59	5,30	4499
METHANOL 0,308	394	2,77	394	498	2781	0,47	4,68	5300
EAU 0,320	404	2,04	404	512	2009	0,27	2,74	5221

*Réabsorption de photons dans l'éthanol : $\epsilon = 2000 \text{ l mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

4 - Propriétés spectrales d'absorbance et de fluorescence de la coumarine 102 dans différents solvants

SOLVANTS Δf	λ_{\max} U.V (nm)	ϵ ($10^4 \text{ l mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	H (cm^{-1})	ϕ_f	S.F	$\nu_a - \nu_f$ (cm^{-1})
CYCLOHEXANE 0,001	363	2,78	363	409	3330	0,98	8,17	3098
DISOPROPYLETHER 0,145	366	2,69	366	418	3070	0,98	8,59	3399
CHLOROFORME 0,185	372	1,91	383	435	2725	0,72	5,05	3121
ACETATE D'ETHYLE 0,199	365	2,13	376	427	2820	0,66	4,99	3177
TETRAHYDROFURANE 0,209	368	2,36	380	428	2844	0,82	6,82	2951
DICHLOROMETHANE 0,218	374	2,48	388	442	2909	0,98	8,35	3149
DIMETHYLSULFOXYDE 0,260	374	1,91	389	452	2850	0,77	5,16	3583
DIMETHYLFORMAMIDE 0,276	372	1,94	384	447	2919	0,71	4,72	3670
ETHANOL* 0,290	376	2,01	389	463	2723	0,72	5,32	4109
ACETONITRILE 0,304	370	1,93	384	445	2687	0,74	5,31	3570
METHANOL 0,308	375	1,98	390	465	2821	0,65	4,56	4136
EAU 0,320	386	-	386	475	3244	-	-	4854

*Réabsorption de photons dans l'éthanol : $\epsilon = 5203 \text{ l mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

5 - Autres propriétés d'absorbance de la C.102 et des luminarines (Lu.3, Lu.11 et Lu.12)

SOLVANTS Δf	Coumarine 102		Luminarine 3		Luminarine 11		Luminarine 12	
	$\lambda_{\max 1}/\epsilon_1$	$\lambda_{\max 2}/\epsilon_2$	$\lambda_{\max 1}/\epsilon_1$	$\lambda_{\max 2}/\epsilon_2$	$\lambda_{\max 1}/\epsilon_1$	$\lambda_{\max 2}/\epsilon_2$	$\lambda_{\max 1}/\epsilon_1$	$\lambda_{\max 2}/\epsilon_2$
CYCLOHEXANE 0,001	211/57,52		209/54,40		211/50,92		-	
DIISOPROPYLETHER 0,145	236/3,36		226/15,46		224/28,75		226/6,73	
CHLOROFORME 0,185	240/2,20		240/2,24		241/2,44		241/2,56	
ACETATE D'ETHYLE 0,199	252/0,91		253/1,20		253/1,26		253/1,10	
TETRAHYDROFURANE 0,209	218/81,80		240/3,38		219/72,56		210/167,80	
DICHLOROMETHANE 0,218	229/23,76		230/4,78		229/26,46		231/17,77	
DIMETHYLSULFOXYDE 0,260	259/0,87		260/1,21		259/1,19		261/1,15	
DIMETHYLFORMAMIDE 0,276	268/0,59		267/0,83		268/0,85		266/0,81	
ETHANOL 0,290	201/100,20		252/1,29	209/79,72	249/1,58	208/135,44	249/1,24	209/74,68
ACETONITRILE 0,304	197/221,20		197/333,13		200/205,40		197/445,20	
METHANOL 0,308	205/100,80		251/1,40	223/102,53	249/1,57	207/94,88	249/1,37	210/78,92
EAU 0,320	207/68,60	195/150,00	254/1,25 193/118,13	207/94,04	252/1,39 193/131,04	207/89,04	253/1,26 192/121,36	208/75,36

λ_{\max} est exprimée en nm. $\epsilon = \times 10^4 \text{ l mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

6 - Autres propriétés d'absorbance des dérivés Lu.3-MAD, Lu.3-MeMAD et Lu.3-acroléine

SOLVANTS Δf	Lu.3-MDA		Lu.3-MeMDA		Lu.3-acroléine	
	$\lambda_{\max 1}/\epsilon_1$	$\lambda_{\max 2}/\epsilon_2$	$\lambda_{\max 1}/\epsilon_1$	$\lambda_{\max 2}/\epsilon_2$	$\lambda_{\max 1}/\epsilon_1$	$\lambda_{\max 2}/\epsilon_2$
CYCLOHEXANE 0,001	213/10,25		209/583,73		263/4,42	209/588,55
DIISOPROPYLETHER 0,145	223/68,55		240/4,49		264/4,20	240/4,85
CHLOROFORME 0,185	241/3,87		241/3,40		263/4,67	241/3,67
ACETATE D'ETHYLE 0,199	253/1,71		252/1,49		262/4,22	
TETRAHYDROFURANE 0,209	211/583,74		240/4,27		264/3,99	241/3,98
DICHLOROMETHANE 0,218	228/41,21		228/39,70		262/5,38	228/38,67
DIMETHYLSULFOXYDE 0,260	259/1,70		260/1,52		268/4,07	
DIMETHYLFORMAMIDE 0,276	266/1,28		268/1,12		268/3,97	
ETHANOL 0,290	-		-		-	
ACETONITRILE 0,304	198/204,37		197/379,52		261/4,29	200/234,33
METHANOL 0,308	210/96,27		208/102,53		263/4,53	210/104,40
EAU 0,320	207/96,33	193/118,80	207/97,95	193/119,96	264/3,97 193/118,13	207/90,78

λ_{\max} est exprimée en nm. $\epsilon = x 10^4 \text{ l mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

7 - Influence du pourcentage d'acétonitrile dans la phase mobile (acétonitrile-tampon imidazole nitrate) sur les propriétés d'absorbance et de fluorescence de la luminarine 3 (Lu.3) et de ses dérivés luminarine 3 - malonaldéhyde (Lu.3-MDA), luminarine 3 - méthylmalonaldéhyde (Lu.3-MeMDA) et luminarine 3 - acroléine (Lu.3-ACRO)

ACETONITRILE (0 %)								
Composés	$\lambda_{\max} \cdot UV$ (nm)	ϵ	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	H (cm^{-1})	ϕ_f	S.F.	D. Stokes (cm^{-1})
Lu3	408	19368	408	503	2465	0,42	3,30	4629
Lu3-MDA	406	22952	401	502	2326	0,39	3,85	4710
Lu3-MeMDA	408	18705	401	501	2470	0,45	3,41	4550
Lu3-ACRO	408	19759	397	499	3265	0,50	3,03	4470

ϵ = coefficient d'absorption molaire en litre mole⁻¹ cm⁻¹; H = largeur de la bande d'émission à mi-hauteur en cm⁻¹;
 ϕ_f = rendement quantique de fluorescence; S.F. = sensibilité de fluorescence $\epsilon \cdot \phi_f / H$

8 - Influence du pourcentage d'acétonitrile dans la phase mobile (acétonitrile-tampon imidazole nitrate) sur les propriétés d'absorbance et de fluorescence de la luminarine 3 (Lu.3) et de ses dérivés luminarine 3 - malonaldéhyde (Lu.3-MDA), luminarine 3 - méthylmalonaldéhyde (Lu.3-MeMDA) et luminarine 3 - acroléine (Lu.3-ACRO) (suite 1)

ACETONITRILE (30%)								
Composés	λ_{\max} UV (nm)	ϵ	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	H (cm ⁻¹)	ϕ_f	S.F.	D. Stokes (cm ⁻¹)
Lu3	409	23886	409	497	2652	0,38	3,42	4359
Lu3-MDA	408	28072	402	495	2520	0,39	4,34	4308
Lu3-MeMDA	409	23313	402	496	2612	0,47	4,20	4289
Lu3-ACRO	409	25121	403	498	2525	0,38	3,78	4370

ϵ = coefficient d'absorption molaire en litre mole⁻¹ cm⁻¹; H = largeur de la bande d'émission à mi-hauteur en cm⁻¹; ϕ_f = rendement quantique de fluorescence; S.F. = sensibilité de fluorescence $\epsilon \cdot \phi_f / H$

9 - Influence du pourcentage d'acétonitrile dans la phase mobile (acétonitrile-tampon imidazole nitrate) sur les propriétés d'absorbance et de fluorescence de la luminarine 3 (Lu.3) et de ses dérivés luminarine 3 - malonaldéhyde (Lu.3-MDA), luminarine 3 - méthylmalonaldéhyde (Lu.3-MeMDA) et luminarine 3 - acroléine (Lu.3-ACRO) (suite 2)

ACETONITRILE (50%)								
Composés	λ_{\max} UV (nm)	ϵ	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	H (cm^{-1})	ϕ_f	S.F.	D. Stokes (cm^{-1})
Lu3	405	24900	399	491	2777	0,71	6,37	4359
Lu3-MDA	404	28682	399	491	2597	0,51	5,63	4308
Lu3-MeMDA	405	24413	399	490	2597	0,47	4,42	4289
Lu3-ACRO	404	24069	399	491	2824	0,67	5,71	4370

ϵ = coefficient d'absorption molaire en litre mole⁻¹ cm⁻¹; H = largeur de la bande d'émission à mi-hauteur en cm⁻¹;
 ϕ_f = rendement quantique de fluorescence; S.F. = sensibilité de fluorescence $\epsilon \cdot \phi_f / H$

10 - Influence du pourcentage d'acétonitrile dans la phase mobile (acétonitrile-tampon imidazole nitrate) sur les propriétés d'absorbance et de fluorescence de la luminarine 3 (Lu.3) et de ses dérivés luminarine 3 - malonaldéhyde (Lu.3-MDA), luminarine 3 - méthylmalonaldéhyde (Lu.3-MeMDA) et luminarine 3 - acroléine (Lu.3-ACRO) (suite 3)

ACETONITRILE (70 %)								
Composés	λ_{\max} UV (nm)	ϵ	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	H (cm ⁻¹)	ϕ_f	S.F.	D. Stokes (cm ⁻¹)
Lu3	401	21145	399	485	2846	0,67	4,98	4319
Lu3-MDA	400	28976	399	485	2640	0,51	5,60	4381
Lu3-MeMDA	400	25633	399	485	2688	0,46	4,39	4381
Lu3-ACRO	401	25422	399	487	2666	0,54	5,15	4404

ϵ = coefficient d'absorption molaire en litre mole⁻¹ cm⁻¹ ; H = largeur de la bande d'émission à mi-hauteur en cm⁻¹ ; ϕ_f = rendement quantique de fluorescence; S.F. = sensibilité de fluorescence $\epsilon \cdot \phi_f / H$

11 - Influence du pourcentage d'acétonitrile dans la phase mobile (acétonitrile-tampon imidazole nitrate) sur les propriétés d'absorbance et de fluorescence de la luminarine 3 (Lu.3) et de ses dérivés luminarine 3 - malonaldéhyde (Lu.3-MDA), luminarine 3 - méthylmalonaldéhyde (Lu.3-MeMDA) et luminarine 3 - acroléine (Lu.3-ACRO) (suite 4)

ACETONITRILE (100%)								
Composés	λ_{\max} UV (nm)	ϵ	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	H (cm ⁻¹)	ϕ_f	S.F.	D. Stokes (cm ⁻¹)
Lu3	391	25512	391	462	2739	0,65	6,05	3963
Lu3-MDA	391	32139	394	464	2670	0,71	8,55	4024
Lu3-MeMDA	391	24548	393	462	2629	0,67	6,26	3930
Lu3-ACRO	393	26687	394	466	2767	0,53	5,11	3986

ϵ = coefficient d'absorption molaire en litre mole⁻¹ cm⁻¹; H = largeur de la bande d'émission à mi-hauteur en cm⁻¹; ϕ_f = rendement quantique de fluorescence; S.F. = sensibilité de fluorescence $\epsilon \cdot \phi_f / H$

ANNEXE IV

1 - Comparaison des différentes méthodes de dérivation pré-colonne des composés carbonylés en CLHP

**FL = fluorescence; UV = ultraviolet; CL = chimiluminescence;
N.M = non mentionné; TRIS = tris (hydroxyméthyl) aminométhane.**

Réactif de dérivation	Application	Colonne	Phase mobile	Détection	Limite de détection	Référence
Dansyl hydrazine (DNS-H)	Monosaccharides	C-18 ou silice greffée cyano	Acétonitrile/eau	FL	10 pmoles	ALPENFELS (1981)
		Silice vierge	Ethanol/eau/ chloroforme	FL	3-20 pmoles	TAKEDA et coll., (1982)
	Sels biliaires	C-18	Méthanol/tampon phosphate	FL	N.M	REID et BAKER (1983)
			Tétrahydrofurane/ tampon imidazole nitrate	CL	2-4 fmoles	HIGASHIIDE et coll.(1990)
	Cétostéroïdes	C-18	Acétonitrile/ tampon TRIS	CL	100 pg/ml	KOZIOL et coll.(1984)
			Acétonitrile/ tampon TRIS	FL	N.M	WEINBERGER et coll.(1984)
			Acétonitrile ou méthanol, acétone, dioxane, tétrahydrofurane/ tampon imidazole nitrate	FL	1 pmole	IMAI et coll.(1989a; 1989b)

2 - Comparaison des différentes méthodes de dérivation pré-colonne des composés carbonylés en CLHP (suite 1)

**FL = fluorescence; UV = ultraviolet; CL = chimiluminescence;
N.M = non mentionné; TRIS = tris (hydroxyméthyl) aminométhane.**

Réactif de dérivation	Application	Colonne	Phase mobile	Détection	Limite de détection	Référence
Dansyl hydrazine (DNS-H)	Acides abscisique et jasmonique	C-18	Acétonitrile/ tampon phosphate	FL	5 pmoles	ANDERSON (1985; 1986)
	Adéhydes, cétones aliphatiques aromatiques	C-18	Acétonitrile/eau	FL/CL	< 1ppb	NONDEK et coll.(1991)
	Josamycine et roki-tamicine	C-18	Acétonitrile/ tampon acétate	FL	20 ng/ml	TOD et coll.(1992)
2,4-Dinitrophénylhydrazine (DNPH)	Aldéhydes, cétones aliphatiques saturés	C-18	Acétonitrile/eau	UV 336 nm	N.M	SELIM (1977)
		C-18	Acétonitrile/eau	UV 340 nm	1 ppm	DEMKO (1979)
	Aldéhydes aliphatiques saturés et insaturés	C-18	Méthanol/eau	UV 360 nm	N.M	VARGA-PUCHONY et coll.(1980)
		C-18	Méthanol/eau	UV 340 nm	1-6 ng	FUNG et GROSJEAN (1981)

3 - Comparaison des différentes méthodes de dérivation pré-colonne des composés carbonylés en CLHP (suite 2)

FL = fluorescence; UV = ultraviolet; CL = chimiluminescence;

N.M = non mentionné; TRIS = tris (hydroxyméthyl) aminométhane.

Réactif de dérivation	Application	Colonne	Phase mobile	Détection	Limite de détection	Référence
2,4-Dinitrophénylhydrazine (DNPH)	Aldéhydes aliphatiques saturés et insaturés	C-18	Acétonitrile/eau/tétrahydrofurane	UV 360 nm	1 ppb	REINDL et STAN (1982)
	Sels biliaires	C-18	Méthanol/tampon phosphate	UV 340 nm	20 pmoles	REID et BAKER (1983)
7-hydrazino-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-H)	Aldéhydes, cétones variés	C-8	Acétonitrile/eau	FL	200 ng/ml	GÜBITZ et WINTERSTEIGER (1984)
		Silice vierge	Benzène/chloroforme	FL	200 ng/ml	GÜBITZ et WINTERSTEIGER (1984)
4-Aminosulphonyl-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazole (ABD-H)	Aldéhydes, cétones variés	C-18	Acétonitrile/eau/acide trifluoroacétique	FL	35-2690 fmoles	UZU et coll.(1990)
4-(N,N-diméthylamino-sulphonyl)-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-H)	Aldéhydes, cétones variés	C-18	Acétonitrile/eau/acide trifluoroacétique	FL	35-2690 fmoles	UZU et coll.(1990)

4 - Comparaison des différentes méthodes de dérivation pré-colonne des composés carbonylés en CLHP (suite 3)

**FL = fluorescence; UV = ultraviolet; CL = chimiluminescence;
N:M = non mentionné; TRIS = tris (hydroxyméthyl) aminométhane.**

Réactif de dérivation	Application	Colonne	Phase mobile	Détection	Limite de détection	Référence
4-hydrazino-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole hydrazine (NBD-H. NH ₂ NH ₂)	Aldéhydes, cétones variés	C-18	Acétonitrile/eau/ acide trifluoroacétique	FL	35-2690 fmoles	UZU et coll.(1990)
Isonicotinylhydrazine (INH)	Cétostéroïdes	Silice vierge	Hexane/méthanol	UV 254 nm	2,5 pmoles	HORIKAWA et coll.(1979)
Anthracène carboxylique acide hydrazides	Acides biliaires et cétoacides	C-18	Méthanol/tampon phosphate	FL	50 fmoles	GOTO et coll.(1989)
et O-(Anthrylméthyl)hydroxylamines		Silice-greffée phenyle	Acétonitrile/ tampon phosphate	FL	20 fmoles	GOTO et coll.(1989)
2-Diméthylaminobenzohydrazide (DMA-H)	Acides abscisique et jasmonique	C-18	Acétonitrile/ tampon phosphate	FL	5 pmoles	ANDERSON (1985)
Alkyl carboxyhydrazides (Apmayl hydrazide)	Aldéhydes, cétones variés	C-18	Acétonitrile/ tampon phosphate	FL	N.M	ANDERSON (1986)

5 - Comparaison des différentes méthodes de dérivation pré-colonne des composés carbonylés en CLHP (suite 4).

FL = fluorescence; UV = ultraviolet; CL = chimiluminescence;

N.M = non mentionné; TRIS = tris (hydroxyméthyl) aminométhane.

Réactif de dérivation	Application	Colonne	Phase mobile	Détection	Limite de détection	Référence
Aryl sulfonylhydrazides (Darpsyl hydrazide et Dansyl hydrazide)	Aldéhydes, cétones variés	C-18	Acétonitrile/ tampon phosphate	FL	N.M	ANDERSON (1986)
Aryl carboxyhydrazides (Deccyl hydrazide, Dmayl hydrazide, Deayl hydrazide et Diayl hydrazide)	Aldéhydes, cétones variés	C-18	Acétonitrile/ tampon phosphate	FL	N.M	ANDERSON (1986)
1,2-Diamino-4,5-méthylène dioxybenzène (DMB)	α -Cétoacides	C-18	Méthanol/ acétonitrile/tampon phosphate	FL	4-440 fmoles	NAKAMURA et coll.(1987)
1,2-Diamino-4,5- diméthoxybenzène (DDB)	Acides N-acétyl- et N-glycolylneura- miniques	C-18	Méthanol/ acétonitrile/eau	FL	40 fmoles	HARA et coll.(1986)
4,5-Diaminophthalhydrazide (DPH)	α -Dicarbonyles	C-18	Acétonitrile/ tampon acétate	CL	1,1-300 fmoles	ISHIDA et coll.(1992)

6 - Comparaison des différentes méthodes de dérivation pré-colonne des composés dérivés des bases nucléiques en CLHP

FL = fluorescence; UV = ultraviolet; TBAHS = tétrabutylammonium hydrogène sulfate.

Réactif de dérivation	Application	Colonne	Phase mobile	Détection	Limite de détection	Référence
Bromoacétaldéhyde Chloroacétaldéhyde Iodoacétaldéhyde	Adénosine/ nucléotides dérivés	Polymères de polystyrène (échange d'anions)	Méthanol/tampon citrate-phosphate- chlorure de sodium	FL	1 fmole	NISHIDATE et coll.(1984)
Chloroacétaldéhyde	Adénosine/ nucléotides dérivés	C-18	Tampon phosphate contenant du TBAHS	FL	2-5 pmoles	RAMOS-SALAZAR et BAINES (1985)
	Adénosine/ nucléotides dérivés	C-18	Méthanol/tampon phosphate	FL	0,5-1 pmole	LEVITT et coll.(1984)
	Adénine adénosine nucléotides dérivés	Copolymères de vinyl alcool (adsorption/perméa- tion de gel)	Méthanol/tampon phosphate	FL UV 260 nm	0,5-1,7 pmole 10-30 pmoles	SONOKI et coll.(1989)
	Adénosine	C-18	Méthanol/tampon phosphate	FL	200 fmoles	ZHANG et coll.(1991)

7 - Comparaison des différentes méthodes de dérivation pré-colonne des composés dérivés des bases nucléïques en CLHP
(suite 1)

FL = fluorescence; UV = ultraviolet; TBAHS = tétrabutylammonium hydrogène sulfate.

Réactif de dérivation	Application	Colonne	Phase mobile	Détection	Limite de détection	Référence
4-Bromométhyl-7-méthoxycoumarine	Bases pyrimidiniques et nucléotides dérivés	C-18	Méthanol/acétonitrile/eau	FL	50-100 pg	YOSHIDA et HIROSE (1986)
	5-Fluorouracile	C-18 ou silice greffée cyanopropyl	Méthanol/eau	FL	< 50 fmoles	KINDBERG et coll.(1989)

8 - Comparaison des différentes techniques de dosage du malonaldéhyde.

FL = fluorescence; UV = ultraviolet; N.M = non mentionné; SP = spectrophotométrie; SF = spectrofluorimétrie; SFS = spectrofluorimétrie synchrone.

1 - Méthodes spectrophotométriques et spectrofluorimétriques

Technique	Milieu	Réactif de dérivation	Détection	Limite de détection	Linéarité	Référence
SP	Aliments	HCL et NaOH	UV-visible 245 et 267 nm	≈ 2 nmoles	10-30 nmoles/ml	KWON et WATTS (1963)
	Tissus	Acide 2-thiobarbiturique (TBA)	UV-visible 535 et 520 nm	NM	NM	UCHIYAMA et MIHARA (1978)
	Tissus	Acide 2-thiobarbiturique (TBA)	UV-visible 532 nm	1 nmole	NM	OHKAWA et coll., (1979)
	Huiles végétales	Acide 2-thiobarbiturique (TBA)	UV-visible 532 nm	NM	NM	ASAKAWA et MATSHUHITA (1980)
	Mitochondries	Acide 2-thiobarbiturique (TBA)	UV-visible 532 nm	NM	NM	SIU et DRAPER (1982)
SF	Solution aqueuse	Acide 2-thiobarbiturique (TBA)	FL	NM	NM	SAWICKI et coll., (1963)
	Plasma	Acide 2-thiobarbiturique (TBA)	FL	0,1 nmole	0-1 nmole	YAGI (1976)
	Microsomes Huiles de sardine	Chlorhydrate de méthylamine/ acétaldéhyde (Réaction de Hantzsch)	FL	5 nmoles	0-300 nmoles	KIKUGAWA et coll., (1988)

9 - Comparaison des différentes techniques de dosage du malonaldéhyde.

FL = fluorescence; UV = ultraviolet; N.M = non mentionné; SP = spectrophotométrie;

SF = spectrofluorimétrie; SFS = spectrofluorimétrie synchrone.

1 - Méthodes spectrophotométriques et spectrofluorimétriques (suite)

Technique	Milieu	Réactif de dérivation	Détection	Limite de détection	Linéarité	Référence
SF	Plasma	Acide 2-thiobarbiturique (TBA)	FL	0,11 nmole/ml	1-8 nmoles/ml	RICHARD et coll., (1992a)
SFS	Plasma Sérum	Acide 1,3-diéthylthiobarbiturique (DETBA)	FL	5 pmoles	NM	CONTI et coll., (1991)

10 - Comparaison des différentes techniques de dosage du malonalaldéhyde.

FL = fluorescence; UV = ultraviolet; N.M = non mentionné; CL = chimiluminescence.

2- Méthodes chromatographiques

Technique	Milieu	Réactif de dérivation et conditions opératoires	Détection	Limite de détection	Linéarité	Référence
CLHP	Urine	2,4-Dinitrophénylhydrazine (DNPH) C-18 Acétonitrile/eau	UV 360 nm	NM	0,3-5,5 µmole	EKSTRÖM et coll., (1988b)
	Sérum	2,4-Dinitrophénylhydrazine (DNPH) C-18 Acétonitrile/HCL	UV 310 nm	10 ng/ml	18-1440 ng/ml	KAWAI et coll., (1989)
	Solution aqueuse Microsomes	2,4-Dinitrophénylhydrazine (DNPH) C-18 Acétonitrile/HCL	UV 310 nm	8,3-25 pmoles	1-18 µg/ml	TOMITA et coll., (1990c)
	Urine	2,4-Dinitrophénylhydrazine (DNPH) C-18 Acétonitrile/eau	UV 330 nm	50 pmoles	0,5-20 nmoles/ml	SHARA et coll., (1992)

11 - Comparaison des différentes techniques de dosage du malonaldéhyde.

FL = fluorescence; UV = ultraviolet; N.M = non mentionné; CL = chimiluminescence.

2- Méthodes chromatographiques (suite 1)

Technique	Milieu	Réactif de dérivation et conditions opératoires	Détection	Limite de détection	Linéarité	Référence
CLHP	Solution aqueuse	p-Nitrophénylhydrazine C-18 Acétonitrile/isopropanol/tampon phosphate	UV 315 nm	6 ng/ml	36-720 ng/ml	KAWAI et coll., (1990)
	Microsomes Huiles de sardine	Chlorhydrate de méthylamine/ acétaldéhyde (Réaction de Hantzsch) C-18 Méthanol/tampon phosphate	FL	5 nmoles	0-300 nmoles	KIKUGAWA et coll., (1988)
	Plasma	Acide 1,3-diéthyl 2-thiobarbiturique (DETBA) C-18 Acétonitrile/eau/éthanolamine	FL	2 pmoles	10-460 pmoles	THERASSE et LEMONIER (1987)
	Plasma Sérum	Acide 1,3-diphényl 2-thiobarbiturique (DPTBA) C-18 Acétonitrile/eau/chlorure de sodium	UV-visible 537 nm	10 pmoles	50-500 pmoles	NAKASHIMA et coll., (1984 et 1985)

12 - Comparaison des différentes techniques de dosage du malonaldéhyde.

FL = fluorescence; UV = ultraviolet; N.M = non mentionné; CL = chimiluminescence;

TBABr = bromure de tétrabutylammonium.

2 - Méthodes chromatographiques (suite 2)

Technique	Milieu	Réactif de dérivation et conditions opératoires	Détection	Limite de détection	Linéarité	Référence
CLHP	Cerveau	Acide 1,3-diéthyl 2-thiobarbiturique (DETBA) Acide 1,3-diphényl 2-thiobarbiturique (DPTBA) C-18 Acétonitrile/tampon imidazole/ chlorure de sodium ou Acétonitrile/tampon imidazole/ TBABr	CL	20-200 fmoles	500-5000 fmoles	NAKASHIMA et coll., (1992)
	Huiles végétales	Dansyl hydrazine (DNSH) Silice vierge Hexane/dichlorométhane	FL	10 pg (140 fmoles)	0,01-0,1 ppm 0,2-1 ppm	HIRAYAMA et coll., (1983)
	Aliments	Acide 2-thiobarbiturique (TBA) C-18 Méthanol/eau	UV-visible 546 nm	1 ng	1-32 ng	BIRD et coll., (1983)
	Aliments Tissus	Acide 2-thiobarbiturique (TBA) C-18 Méthanol/eau	UV-visible 546 nm	NM	NM	DRAPER et coll., (1984)

FL = fluorescence; UV = ultraviolet; N.M = non mentionné; CL = chimiluminescence;

TBAP = tétrabutylammonium phosphate.

2 - Méthodes chromatographiques (suite 3)

Technique	Milieu	Réactif de dérivation et conditions opératoires	Détection	Limite de détection	Linéarité	Référence
CLHP	Solution aqueuse	Acide 2-thiobarbiturique (TBA) C-18	FL	10 fmoles	NM	YU et coll., (1986)
		Méthanol/tampon phosphate/ TBAP	UV-visible 535 nm (barette diode)	100 fmoles		
	Plasma	Acide 2-thiobarbiturique (TBA) C-18 Méthanol/tampon phosphate	UV-visible 532 nm	0,15 nmole/ml	1-4,86 nmoles/ml	WONG et coll., (1987)
	Sérum Plasma	Acide 2-thiobarbiturique (TBA) C-18 Méthanol/tampon phosphate	UV-visible 532 nm	0,05 nmole/ml (1,1 pmole)	0,1-15 nmole/ml	CARBONNEAU et coll., (1991)
	Plasma Tissus	Acide 2-thiobarbiturique (TBA) C-18 Méthanol/eau	UV-visible 532 nm	NM	0,5-10 pmoles	LEPAGE et coll., (1991)
Plasma Tissus	Acide 2-thiobarbiturique (TBA) C-18 Méthanol/tampon phosphate	UV-visible 532 nm	2,5 pmoles	0,1-2 nmoles/ml 1-20 nmoles/ml	RICHARD et coll., (1992b)	

14 - Comparaison des différentes techniques de dosage du malonaldéhyde.

**FL = fluorescence; UV = ultraviolet; N.M = non mentionné; CL = chimiluminescence;
 TBAP = tétrabutylammonium phosphate; TRIS = tris (hydroxyméthyl) aminométhane;
 TDABr = bromure de tétradecyltriméthylammonium; TBAH = hydroxyde de
 tétrabutylammonium; MTABr = bromure de myristyltriméthylammonium.**

2 - Méthodes chromatographiques (suite 4)

Technique	Milieu	Réactif de dérivation et conditions opératoires	Détection	Limite de détection	Linéarité	Référence
CLHP	Tissus	Sans dérivation Gel-TSK G1000 PW Tampon phosphate	UV 267 nm	1 ng	1-18 ng	CSALLANY et coll., (1984)
	Microsomes Tissus Aliments	Sans dérivation Silice greffée amino Acétonitrile/tampon TRIS	UV 270 nm	5 pmoles	1-100 nmoles/ml	ESTERBAUER et coll., (1984)
	Urines Microsomes	Sans dérivation C-18 Acétonitrile/tampon phosphate/ MTABr	UV 267 nm	5 pmoles	5-4000 pmoles	BULL et MARNETT (1985)
	Tissus	Sans dérivation Spherogel TSK 1000 PW Tampon phosphate	UV 267 nm	NM	NM	LEE et CSALLANY (1987)

15 - Comparaison des différentes techniques de dosage du malonalaldéhyde.

**FL = fluorescence; UV = ultraviolet; N.M = non mentionné; CL = chimiluminescence;
 TBAP = tétrabutylammonium phosphate; TRIS = tris (hydroxyméthyl) aminométhane;
 TDABr = bromure de tétradecyltriméthylammonium; TBAH = hydroxyde de
 tétrabutylammonium; MTABr = bromure de myristyltriméthylammonium.**

2 - Méthodes chromatographiques (suite 5)

Technique	Milieu	Réactif de dérivation et conditions opératoires	Détection	Limite de détection	Linéarité	Référence
CLHP	Plasma	Sans dérivation Carbohydate Acétonitrile/tampon TRIS	UV 267 nm	0,48 nmole/ml	1,5-11,8 nmoles/ml	LARGILLIERE et MELANCON (1988)
	Plasma Tissus	Sans dérivation C-18 Ethanol/tampon phosphate/ TDABr	UV 267 nm	5 pmoles	1-4 nmoles/ml	BEHRENS et MADERE (1991)
	Tissus	Sans dérivation C-18 Méthanol/tampon phosphate/ TBAH	UV 266 nm	3,34 pmoles	NM	LAZZARINO et coll., (1991)

16 - Comparaison des différentes techniques de dosage du malonaldéhyde.

ECD = electron capture detector (détecteur à capture d'électron);

TID = thermoionic detector (détecteur thermoionique) ou NPD (nitrogen phosphorus detectors).

2 - Méthodes chromatographiques (suite 6)

Technique	Milieu	Réactif de dérivation et conditions opératoires	Détection	Limite de détection	Linéarité	Référence
CG	Aliments	N-Méthylhydrazine (N-MH) DB-WAX	TID ou NPD	702,4 pg (9,8 pmoles)	8,78-87,8 µg	UMANO et coll., (1988)
	Solution aqueuse Urine	2-Hydrazinobenzothiazole (HBT) OV-17 3%	TID ou NPD	2,88 pg (0,04 pmole)	0,1-2 nmoles/ml 1-10 nmoles/ml 10-100 nmoles/ml	BELJEAN-LEYMARIE et BRUNA (1988)
	Solution aqueuse Urine	Pentafluorophénylhydrazine (PFPH) OV-17 2%	ECD	2,2 pg (0,03 pmole)	0,0625-1 nmole/ml	TOMITA et coll., (1990a)
	Solution aqueuse	N-Méthylhydrazine (N-MH) DB-WAX	TID ou NPD	7,8 pg (0,11 pmole)	NM	TAMURA et SHIBAMOTO (1991)

ANNEXE V

1 - Influence de l'excès de luminarine 3 sur le taux de greffage de la γ -globuline bovine et le pourcentage de luminarine 3 fixé sur la γ -globuline.

Excès de Lu.3 (mole)	Conc. de Lu.3 (μ M)	Conc. de γ -globuline (μ M)	Taux de greffage	Intensité de fluorescence (U.A)	Pourcentage de Lu.3 fixé ^a (%)
5	16,19	3,77	4,29	830	85,80
10	18,35	3,84	4,78	1070	47,80
20	33,40	4,20	7,95	1420	39,75
40	37,44	4,13	9,07	1530	22,68

^aPourcentage de Lu.3 fixé sur la γ -globuline = (Taux de greffage/Excès de Lu.3) x 100

2 - Influence de l'excès de luminarine 11 sur le taux de greffage de la γ -globuline bovine et le pourcentage de luminarine 11 fixé sur la γ -globuline.

Excès de Lu.11 (mole)	Conc. de Lu.11 (μ M)	Conc. de γ -globuline (μ M)	Taux de greffage	Intensité de fluorescence (U.A)	Pourcentage de Lu.11 fixé ^a (%)
5	18,73	4,47	4,19	1150	83,80
10	39,03	5,05	7,73	1760	77,30
20	45,96	4,78	9,62	1870	48,1
40	51,05	4,47	11,42	1910	28,55

^aPourcentage de Lu.11 fixé sur la γ -globuline = (Taux de greffage/Excès de Lu.11) x 100

3 - Influence de l'excès de luminarine 12 sur le taux de greffage de la γ -globuline bovine et le pourcentage de luminarine 12 fixé sur la γ -globuline.

Excès de Lu.12 (mole)	Conc. de Lu.12 (μ M)	Conc. de γ - globuline (μ M)	Taux de greffage	Intensité de fluorescence (U.A)	Pourcentage de Lu.12 fixé ^a (%)
5	8,26	3,54	2,33	460	46,60
10	15,26	3,65	4,18	580	41,80
20	24,40	4,50	5,42	900	27,10
40	28,91	4,53	6,38	1010	15,95

^aPourcentage de Lu.12 fixé sur la γ -globuline = (Taux de greffage/Excès de Lu.12) x 100

**4 - Positions des pics Raman (nm), calculées pour quatre solvants usuels
et cinq longueurs d'ondes excitatrices d'une lampe à mercure**

[ROUESSAC et ROUESSAC (1992)].

Excitation (nm)	254	313	365	405	436	écart (cm ⁻¹)
eau	278	350	416	469	511	3380
éthanol	274	344	405	459	500	2920
cyclohexane	274	344	408	458	499	2880
chloroforme	275	346	410	461	502	3020

La diffusion **Raman** provient du transfert d'une partie de l'énergie de la radiation excitatrice aux molécules de solvant sous forme d'énergie de vibration. Elle se traduit par une série de bandes symétriques de part et d'autre du pic de diffusion Rayleigh, dont l'intensité est plus forte pour les longueurs d'onde supérieures à celle de la lumière incidente. Cette émission de lumière est due au fait qu'une molécule peut changer de niveau de vibration ou de rotation pendant le processus de diffusion Rayleigh et ainsi absorber une partie de l'énergie du rayon incident. Si la fréquence d'excitation est ν , la molécule diffuse des fréquences $\nu - \nu_0$ et $\nu + \nu_0$, où l'énergie $h\nu_0$ correspond à la transition entre deux niveaux de vibration-rotation. Bien que cet effet soit de 100 à 1000 fois plus faible que la diffusion Rayleigh, il ne peut être négligé, le solvant étant par nature en quantité abondante dans la cellule. Pour chaque solvant, la différence d'énergie entre les photons

absorbés et les photons réémis conserve une même valeur. Par exemple pour l'eau, cette différence, exprimée pour des raisons de commodité en cm^{-1} , est de 3380 cm^{-1} . Ainsi, avec une source excitatrice réglée à 31950 cm^{-1} (313 nm), le pic Raman sera situé à 28570 cm^{-1} (350 nm). Lorsqu'on modifie la longueur d'onde d'excitation, on déplace l'écart mesuré entre les positions des pics Rayleigh et les raies Raman de diffusion (voir tableau ci-dessus).

TITRE

Development of some new fluorescent derivatization reagents, so called : luminarins. Application to the high-performance liquid chromatographic determinations of carbonyls compounds, nucleosides and nucleotides, and their possible use in immunoassays.

SUMMARY

This work is, in a first step, a contribution to the synthesis and the study of the photophysical properties of some derivatization reagents characterized by a quinolizinocoumarinic nucleus so called luminarins. In a second step, the optimization of the reaction with luminarins has been established especially for carbonyl compounds of biological and pharmaceutical interest, as well as nucleosides and nucleotides. Finally, the chromatographic separation of the derivatized compounds has been achieved.

Moreover the growing area of immunoassays prompted us to demonstrate the interest of luminarins in the proteins labelling especially for immunoglobulins G (IgG) via an oxidation step involving sodium periodate. The respective performance of the proposed labelling was compared with that of fluorescein. At last, the reaction between gonadotropic chorionic hormon (GCH) and luminarin hydrazide was envisaged.

In conclusion, the proposed developments look to be promising in the different area of bioanalytical, food chemicals, environmental and pharmaceuticals industries.

RESUME

Notre travail a consisté d'une part à synthétiser et à étudier les propriétés spectrales d'absorbance et de fluorescence des réactifs de dérivation possédant le noyau quinolizinocoumarine, les "luminarines", d'autre part à déterminer les conditions de leurs réactions avec certaines molécules, d'intérêt pharmaceutique ou biologique possédant dans leur structure un groupement fonctionnel carbonyle ainsi que les nucléosides et nucléotides et enfin à proposer un système chromatographique permettant la séparation des dérivés ainsi formés.

De plus, le développement des dosages immunologiques nous a incité à utiliser les propriétés de fluorescence des luminarines après greffage des immunoglobulines G. Les performances de marquage sont comparées à celle de la fluoresceïne, réactif couramment utilisé pour le marquage des protéines. Nous envisageons ensuite les possibilités de détection de l'hormone chorionique gonadotrope (HCG), après réaction chimique avec une luminarine hydrazide.

Les différentes méthodes proposées sont prometteuses pour la mise en oeuvre des dosages de routine dans les domaines de la biologie clinique, biologie moléculaire, industrie alimentaire, industrie pharmaceutique et environnement.

MOTS CLES

luminarines; fluorescence; chromatographie liquide; composés carbonylés; aldéhydes; cétones; nucléosides; nucléotides; malonaldéhyde; hydroxyméthylfurfural; immunoglobuline G; hormone chorionique gonadotrope.

GRUPE DE FORMATION DOCTORALE : PHARMACOCHEMIE

Laboratoire de Chimie Analytique II

Université Paris XI

Faculté de Pharmacie

5, rue Jean-Baptiste Clément

92296 CHATENAY-MALABRY CEDEX